

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 特殊な変異を持つ多発性嚢胞腎患者由来の腎臓オルガノイドを用いた
早期発症嚢胞の再現

(英語) Modeling early-onset cystogenesis using kidney organoids derived from a patient with
polycystic kidney disease harboring unusual mutations

研究開発実施期間: 令和5年7月6日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西中村 隆一

(英語) NISHINAKAMURA Ryuichi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人 熊本大学 発生医学研究所 教授

(英語) Professor, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

II 研究開発の概要

【背景】

常染色体顕性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は、主に一次線毛に発現する PKD1/2 の変異によって集合管及び尿細管が徐々に拡張して成人期に嚢胞を呈する、腎不全の原因として最も多い遺伝性疾患である。治療法としてはバソプレシン受容体の拮抗薬があるが根治療法はなく、新規治療法が望まれている。PKD1/2 は嚢胞形成を抑制しているとされるが、マウスでは *Pkd1* ヘテロ欠失は嚢胞を形成せず、ホモ欠失は胎生致死になってしまう。一方、患者由来（つまりヒトのヘテロ変異）の腎臓オルガノイドでは嚢胞の再現が難しく、実際に用いられるのはゲノム編集によって PKD1 あるいは PKD2 をホモ欠失する iPS 細胞が主体であり、幹細胞研究のボトルネックになっていた。研究分担者の三浦（東京女子医大）は、胎児期から多数の腎嚢胞を呈する患者を担当しており、嚢胞発症のタイミングから常染色体潜性多発性嚢胞腎 (ARPKD) と推定していたが、意外にも PKD1 の複合ヘテロ接合性ミスセンス変異、つまり ADPKD であることが判明した (Taniguchi et al. Kidney Med. 2024)。そこでこの患者から腎臓オルガノイドを作る計画を立案した。

【目的】

本研究は、PKD1 の複合ヘテロ変異を持つ患者由来の iPS 細胞から腎臓オルガノイドを誘導して嚢胞を再現することを目的とした。患者血液から iPS 細胞を樹立し、腎臓オルガノイドを誘導して、早期嚢胞の再現を検討した。さらにゲノム編集技術を用いて変異を修復した iPS 細胞株を樹立した。並行して iPS 細胞の技術

移転を行い、共同研究体制を構築した。

〔研究開発項目と結果〕

患者由来 iPS 細胞の樹立

熊本大学と東京女子医大の倫理審査委員会から承認を得た上で、患者血液細胞に山中 4 因子を episomal vector 法で導入して、iPS 細胞を 4 クローン樹立した。

腎臓オルガノイド誘導による嚢胞の再現

患者由来 iPS 細胞複数クローンを腎臓オルガノイドに誘導し、cAMP 活性化剤フォルスコリンを投与したところ、どれも数日以内に嚢胞が発生し、2-3 週で大きな嚢胞に成長した。しかし個人差や細胞株間の差が影響する可能性があり、同じ遺伝的背景で検討するために遺伝子変異を修復することとした。

変異の修復

ヒト PKD1 には多数の pseudogene が存在するため、pseudogene ではなく本物の遺伝子座で変異の修復を行う必要がある。そこで、変異配列のみを切断する gRNA とそれで切断されないドナー DNA を設計して、患者 iPS 細胞に導入し、本物の遺伝子のみを増幅・検出できる PCR primer を設計して sequence 解析を行った。これによって母親由来変異の矯正株、父親由来変異の矯正株をそれぞれ単離した。その上でこれらから腎臓オルガノイドを誘導した。さらに父母両方の変異を矯正したクローンを樹立する必要があると考えている。

iPS 細胞技術の移転

腎臓オルガノイドのプロトコール及び実験操作の動画を送付し、数回の Zoom 会議を行った上で、東京女子医大の若手研究者を熊本大学に招聘し、iPS 細胞の維持培養及び腎臓オルガノイドの誘導実習を行った。その後、iPS 細胞を熊本大学から東京女子医大に送付した。これらによって、iPS 細胞技術の移転及び疾患研究者（東京）と iPS 細胞研究者（熊本）との共同研究体制を構築できた。

〔考察と今後の展望〕

多発性嚢胞腎は腎不全・透析に至る最も多い遺伝性疾患であり、成果の社会的・医療経済的インパクトは大きい。しかし嚢胞研究で使われるのはゲノム編集で PKD 1 をホモに欠失させたオルガノイドが主体であって、嚢胞の再現頻度が低い患者由来オルガノイドはほとんど使われていない。本計画は複合ヘテロ変異によって PKD1 活性が単純ヘテロより低いレベルにある患者細胞を用いている。本 iPS 細胞は、PKD1 を完全欠損するわけではなく、全長はできているが細胞膜への移行障害などによって機能が低下していると考えられる。それを回復させる薬剤探索などに使用できるため、樹立した患者由来 iPS 細胞は RIKEN バイオリソースセンターに寄託することによって、研究者及び企業に広く使っていただけると期待している。

また、三浦が主宰する東京女子医大腎臓小児科には全国から遺伝性腎疾患の患者が集まってくるので、三浦が iPS 細胞の基本技術を習得し、その長所と短所を把握することは、多発性嚢胞腎の病態解明に留まらない大きな意義を有する。嚢胞腎にとどまらず他の腎疾患にも共同研究を展開したい。

Background

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited cause of renal failure. Mutations in PKD1/2, which are mainly expressed in primary hair cells, cause the gradual dilation of collecting ducts and tubules, resulting in cysts forming in adulthood. Although vasopressin receptor antagonists are available, there is no curative therapy, and novel therapies are needed. PKD1/2 suppresses cyst formation; however, in mice, heterozygous deletion of *Pkd1* does not result in cyst formation, while homozygous deletion causes embryonic lethality. However, it is difficult to reproduce cysts in patient-derived kidney organoids (i.e., human heterozygous), so induced pluripotent stem (iPS) cells with homozygous deletion of PKD1 or PKD2 by genome editing are mainly used in experiments. This has been a bottleneck in stem cell research. Dr. Miura, a co-investigator of this study, has been working with a patient who has had multiple renal cysts since the fetal period. Based on the timing of cyst onset, the patient was presumed to have autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). However, it was found to be a compound heterozygous missense mutation of PKD1, i.e., ADPKD (Taniguchi et al., *Kidney Med.*, 2024). Therefore, we devised a plan to produce kidney organoids from this patient.

Aim

This study aimed to reproduce cysts by generating kidney organoids from iPS cells derived from a patient with compound heterozygous mutations in the PKD1 gene. We established iPS cells from patient blood and induced kidney organoids to recapitulate early-stage cysts. Furthermore, we established iPS cell lines with repaired mutations using genome editing technology. In parallel, we transferred the iPS cell technology to Dr. Miura and established a collaborative research framework.

Results

Establishment of Patient-Derived iPS Cells

After receiving approval from the ethical review committees at Kumamoto University and Tokyo Women's Medical University, we established four iPS cell clones by introducing the Yamanaka 4 factor into patient blood cells using the episomal vector method.

Reproduction of Cysts Induced by Renal Organoids

When several clones of patient-derived iPS cells were induced into kidney organoids and treated with the cAMP activator forskolin, cysts formed within a few days and grew into large cysts within two to three weeks. However, individual differences and differences between cell lines may affect the results. Therefore, we decided to repair the genetic mutation to study the phenotypes under the same genetic background.

Repair of the Mutations

Since there are many pseudogenes in human PKD1, we must repair the mutation at the real locus, not the pseudogene. Therefore, we designed a gRNA that cleaves only the mutated sequence, as well as donor DNA that is not cleaved by the gRNA. We introduced these into patient iPS cells and designed PCR primers that can amplify and detect only the authentic gene. We then performed sequence analysis. Using this method, we isolated corrective clones of the maternal mutation and corrective clones of the paternal mutation. Kidney organoids were then induced from these clones. It will also be necessary to establish clones in which both the maternal and paternal mutations are corrected.

Transfer of iPS Cell Technology

We shared videos of the kidney organoid protocol and experimental procedures, held Zoom meetings, and invited young researchers from Tokyo Women's Medical University (TWMU) to Kumamoto University for hands-on training in iPS cell maintenance culture and kidney organoid induction. The iPS cells were then sent from Kumamoto University to TWMU. These efforts enabled us to transfer iPS cell technology and establish a collaboration framework between disease researchers in Tokyo and iPS cell researchers in Kumamoto.

Perspectives

Autosomal dominant polycystic kidney disease is the most common genetic disease that leads to renal failure and dialysis. The social and economic health impact of this disease is significant. However, cyst research has primarily relied on organoids with a homozygous PKD1 deletion created through genome editing. Organoids derived from patients, which produce cysts less frequently, have rarely been used. This project uses patient cells with lower PKD1 activity than simple heterozygous cells due to compound heterozygous mutations. The iPS cells are not completely deficient in PKD1, but PKD function is insufficient presumably due to impaired migration to the cell membrane. The patient-derived iPS cells will be deposited at the RIKEN BioResource Center, where they are expected to be widely used by researchers and companies. Additionally, patients with hereditary renal diseases from all over Japan visit Tokyo Women's Medical University, led by Dr. Miura. Therefore, it is of great significance for Dr. Miura to master basic iPS cell technology and understand its strengths and weaknesses. We would like to expand our collaboration to other renal diseases.