

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた  
新規 ADPKD 病態モデルの作製

2 0 2 1

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

清水 達也

## 目次

### 1 研究の背景

#### 1-1 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)について

#### 1-2 既存の ADPKD 病態モデルについて

#### 1-3 ADPKD の細胞内病態に関する知見

#### 1-3 ヒト多能性幹細胞を用いた腎臓オルガノイドの作製

#### 1-4 疾患特異的ヒト多能性幹細胞を用いた腎疾患の病態モデリング

### 2 疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた新規 ADPKD 病態モデルの作製

#### 2-1 目的

#### 2-2 材料と方法

#### 2-3 結果

#### 2-4 考察

#### 2-5 結語

### 3 今後の課題

### 4 謝辞

### 5 出典

### 6 参考文献

### 7 図表

## 1 研究の背景

### 1-1 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)について

常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD)は、すべての人種における最も頻度の高い遺伝性疾患の一つであり、遺伝性腎疾患としては全世界の末期腎不全患者の約 10%を占める最多の疾患である[1]。有病率は報告により異なるが、疫学調査から推定された本邦の患者数は約 31,000 人で[2]、慢性透析患者の原疾患割合として 3.8%を占めている[3]。諸外国の疫学調査から推定された ADPKD 患者の頻度は 2,000～4,000 人に 1 人であるが、剖検に基づく頻度はさらに上昇する[4]。

腎臓においては、加齢とともに多数の嚢胞が進行性に増大し、両側の腎腫大をきたすことが本疾患の特徴であり、腎嚢胞の増大に伴い約半数の患者が 60 歳までに末期腎不全に至る[4]。本疾患では肝臓や脾臓にも嚢胞が生じ、腎機能の低下のみならず、腎嚢胞や肝嚢胞への細菌感染によって重篤な敗血症に至ることや、嚢胞出血あるいは腫大した腎臓や肝臓による圧迫症状により健康が損なわれる場合もある。その他、腎外症状として血管病変が重要であり、高血圧や心臓弁膜症、脳動脈瘤を合併しやすく、脳動脈瘤の破裂から致死的となる場合もある[5-6]。

近年、腎嚢胞の増大を抑制し、腎機能低下抑制効果のある薬剤としてバソプレ

シン V2 受容体拮抗薬である **tolvaptan** が臨床で使用可能となった[7]。しかし、**tolvaptan** の適応となる患者に限られることや副作用の問題、腎機能低下を完全に抑制できないことから、有効性のより高い治療法や根本的な治療薬開発が引き続き望まれている。

ADPKD の主要な原因遺伝子は **PKD1** (16p13.3) または **PKD2** (4q21) であり、それぞれ膜貫通蛋白である **polycystin1 (PC1)** または **polycystin2 (PC2)** をコードしている。臨床的に ADPKD と診断される症例のうち、**PKD1** に変異を認めるものが約 80%、**PKD2** が約 15% を占めるとされ[6, 8-9]、患者は通常、原因遺伝子のいずれかにヘテロ接合性変異を有して出生する。家族歴のない孤発例を 10～15% に認めるが、これらの一定数が *de novo* 変異による症例と考えられる[6]。

**PKD1** は 46 個のエクソンからなる巨大な遺伝子で、遺伝子産物である **PC1** は 4,303 アミノ酸からなり、N 末端側の長い細胞外領域、11 回膜貫通領域および C 末端側の短い細胞内領域から構成される[5]。**PC2** は 968 アミノ酸からなる 6 回膜貫通蛋白であり[5]、N 末端および C 末端は細胞内に位置しており、**PC1** と C 末端領域同士が相互作用すると考えられている[10]。末期腎不全に至る平均年齢から **PKD1** 変異の方が **PKD2** 変異よりも重症であり、さらに **PKD1** の中でも **PC1** 蛋白の **truncating** をきたす変異の方が **non-truncating** の場合よりも重症であるとされている[8]。

## 1-2 既存の ADPKD 病態モデルについて

動物モデルとしては、これまで主にげっ歯類の ADPKD モデルが病態解析や薬物投与研究のために用いられてきた。古くから自然発症の PKD モデルとして、Cy ラット[11]や PCK ラット[12]、pcy マウス[13]などが用いられてきた。これらはいずれも ADPKD の原因遺伝子である *PKD1/2* の ortholog とは異なる遺伝子に変異を有しており、現在は遺伝子組み換え技術により *Pkd1* または *Pkd2* に変異を導入したマウスが動物モデルとして広く使用されている[14]。*Pkd1* をホモノックアウトしたマウスは胎生致死であるため[15]、*Cre-loxP* システムを用いて *Pkd1* または *Pkd2* を時期・組織特異的にノックアウトするモデルマウスが研究には多く使用されている[16-19]。一方、ヒトの ADPKD と同様に *Pkd1* をヘテロ接合性に欠失したマウスでは、長期間の観察で軽度の腎嚢胞を生じるのみであり、ヒトの表現型を十分に再現できていない[20]。ヒトとマウスでは遺伝学的、生理学的な背景が異なり、遺伝子変異の結果に対する生体反応も異なっているために、このような差が生じると考えられる。

患者由来の組織あるいは細胞を用いた研究も考えられるが、特に ADPKD では生検などで罹患組織を得ることが一般的に行われないため、患者サンプルを用いた研究の機会は限られている。組織が得られた場合でも、通常は腎病変が進

行した段階で評価することになるため[21-22]、腎嚢胞形成初期の病態を明らかにすることは困難である。また、ADPKD 患者の腎嚢胞から初代培養を行った嚢胞上皮細胞[23]や不死化細胞株[24]も用いられるが、患者の腎嚢胞形成初期の病態を再現することは同様に困難であると考えられる。これら従来のヒト細胞やマウス由来の腎細胞株などを用いて三次元培養（スフェロイド培養）を行い嚢胞モデルとする報告も多いが[25-26]、生体における嚢胞の発生過程を十分に再現できているとは言えない。

近年、CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により、*PKD1* 変異を導入したカニクイザルの ADPKD モデルが報告されている[27]。同研究では *PKD1* 変異をヘテロ接合体で有する個体においても腎嚢胞の再現に成功しており、ヒトの病態により近いモデルとして今後の研究への期待が大きい。一方、カニクイザルを用いたモデルは長期の観察期間が必要であり、繁殖学的な特性や飼育上の問題、動物倫理に考慮する必要がある、ハイスループットの探索的研究には適さない。

### 1-3 ADPKD の細胞内病態に関する知見

ADPKD の細胞内病態に関しては、従来の動物モデルや患者由来細胞を用いて様々な経路の異常が報告されている[28-33]。その中でも中心的な役割を果たしていると考えられるのが、Ca シグナリングの異常と細胞内 cAMP 濃度の上昇で

ある[28, 34]。古典的には、PC1 および PC2 が一次繊毛において複合体を形成し、尿流を感知して細胞内 Ca 濃度を上昇させることで尿細管径を調節するという仮説があるが[35-36]、このメカニズムについては近年否定的な見解もある[37]。しかし、ADPKD の細胞では細胞内 Ca 濃度の低下[38]、小胞体からの Ca 放出の低下など[39]、何らかの Ca シグナリングの障害を認めるとする研究が多い。

ADPKD の動物モデルでは、腎臓[40-42]、胆管[43]、血管平滑筋[44]など、病変を生じる組織で cAMP レベルの上昇が報告されている。Ca シグナリングの障害により、Ca 抑制性のアデニル酸シクラーゼ 6 (adenylyl cyclase 6; AC6)が活性化され、Ca 依存性のホスホジエステラーゼ 1 (phosphodiesterase 1; PDE1)が抑制されて、細胞内 cAMP 濃度の上昇をきたすとされている[28, 34]。その他、一次繊毛において AC5 および AC6 が PC2 やプロテインキナーゼ A (protein kinase A; PKA)と複合体を形成し、Ca 依存性に AC が抑制されるメカニズムも提唱されている[45]。*Pkd1* と *Adcy6* (AC6) [46]、あるいは *Pkd2* と *Adcy5* (AC5) [47]のダブルノックアウトマウスで、*Pkd1* または *Pkd2* の単独欠損よりも腎嚢胞が軽減することから、ADPKD の腎病態における AC の役割が示唆される。また、ADPKD の治療薬である tolvaptan は、V2 受容体に拮抗して Gs 蛋白を介した AC6 の活性化を抑制する機序が想定されている[48]。

細胞内 cAMP 濃度の上昇は、PKA の活性化を介して、嚢胞上皮の細胞増殖と



嚢胞内への分泌を亢進させることで、嚢胞増大に関与するとされている[28]。 *in vitro* の研究において、ADPKD の細胞では正常細胞とは異なる様式で、PKA 依存性に mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase (MAPK/ERK)が活性化して、細胞増殖が促進すると報告されている[38, 49-51]。しかしながら、生体において細胞増殖の結果として嚢胞が形成されるのか、嚢胞形成を引き起こす他の要因が必要であるのかは不明である[21]。また、PKA の活性化は、上皮細胞の頂端膜側に存在する cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)のリン酸化を介して、管腔内へのクロライドイオンと水の分泌を亢進させ、嚢胞の形成と維持に関与すると考えられている[52]。その他、多くの ADPKD 動物モデルで、mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)の活性化が報告されている[31-32, 53]。mTORC1 の活性化は細胞増殖の亢進を介して嚢胞増大に寄与すると考えられ、モデルマウスに対する mTOR 阻害薬の投与により、腎嚢胞が縮小し、腎機能低下が抑制された報告がある[54]。ADPKD 患者における mTOR 阻害薬の大規模臨床試験では腎機能低下抑制効果が認められなかったが[55-56]、組織レベルで有効な薬剤濃度に達していなかった可能性も指摘されている[57]。

ADPKD で嚢胞が散在性に生じる理由を説明するモデルとして、two-hit theory が広く受け入れられている。これは、*PKD1* または *PKD2* の片アレルに germline

の変異(first hit)を受け継いだ個体において、嚢胞を生じる組織で体細胞変異による正常アレルでの変異やヘテロ接合性の消失をきたすことで(second hit)、嚢胞が形成されるとする仮説である[58-59]。一方、以前から *Pkd1* または *Pkd2* のハプロ不全によって、血管平滑筋細胞の **Ca** シグナリング異常[60-61]や尿細管上皮細胞の増殖亢進[62]が生じることが報告されている。また、*Pkd1* の hypomorphic アレル(p.R3277C)を有するマウスの研究で、second hit とは無関係に、変異アレルの組み合わせによって腎病変の重症度が段階的に変化する知見から、機能的な **PC1** 蛋白の量が **ADPKD** の表現型に影響する可能性が指摘されている[42]。近年では“threshold model”として、個々の上皮細胞における **PC1/PC2** 蛋白の量を中心に **ADPKD** の病態を理解しようとする試みもある[6, 33]。*PKD1/2* の遺伝子変異から腎嚢胞形成に至る機序を解明するために、患者と同じ遺伝的背景を有する **ADPKD** モデルが果たす役割は大きいと考えられる。

#### 1-4 ヒト多能性幹細胞を用いた腎臓オルガノイドの作製

胚性幹細胞 (embryonic stem cells; **ES** 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; **iPS** 細胞) は、個体を形成するすべての細胞種に分化する多能性を有している。腎臓領域では、これらの多能性幹細胞から腎前駆細胞を作製し、さらに自己組織化と呼ばれる現象により糸球体や尿細管などの三次元

のネフロン構造を含んだ腎臓オルガノイドを作製する方法が、複数報告されている[63-65]。

京都大学の方法では、胚発生を模倣した段階的な分化誘導により、ヒト多能性幹細胞からネフロン前駆細胞を 90%近い高効率で作製することが可能である(図 1) [66]。このため、表面抗原などを用いたネフロン前駆細胞の純化を必要とせず、ネフロン前駆細胞の細胞塊から気相液相界面培養により腎臓オルガノイド(ネフロンオルガノイド)を作製できる。また、この過程で増殖因子の供給源としてマウス胎仔脊髄などの生体組織の共培養を用いないことから、応用研究への汎用性も高い。

哺乳類の成体腎(後腎)は、前方中間中胚葉由来の尿管芽と後方中間中胚葉由来の後腎間葉の相互作用によって発生する[67]。前方および後方の中間中胚葉は原始線条での陥入のタイミングが異なる細胞群に由来するため[63]、多能性幹細胞からの分化誘導においても尿管芽と後腎間葉では異なる誘導法が必要である。集合管と尿管は尿管芽に由来し、糸球体や尿細管などは後腎間葉のネフロン前駆細胞に由来する[68]。既報の腎臓オルガノイドの多くは後腎間葉系譜のネフロンオルガノイドであり、尿管芽系譜の集合管細胞は含んでいない[63-66, 69]。ヒト胎児腎または成体腎とのトランスクリプトームの比較では、ネフロンオルガノイドは妊娠第 1 三半期～第 2 三半期程度の成熟度であると考えられており[64,

66, 70-72]、多能性幹細胞由来の腎組織の成熟化が今後の課題となっている。

#### 1-5 疾患特異的ヒト多能性幹細胞を用いた腎疾患の病態モデリング

ES 細胞や iPS 細胞は、ゲノム編集により疾患の原因遺伝子に変異を導入することができるほか、iPS 細胞は実際の患者から作製することも可能である[73]。これらの疾患特異的ヒト多能性幹細胞は、罹患細胞種に分化誘導することで患者の病態を再現すると考えられる。特に患者由来ヒト iPS 細胞は、患者と同一の遺伝的背景を有しており、個人の病態をより正確に反映すると考えられる。疾患特異的ヒト多能性幹細胞から腎臓オルガノイドを作製することで、ヒト細胞による腎病態の再現が可能であり、無限に増幅できる多能性幹細胞の特性を生かして、大規模な薬剤スクリーニングなど探索的研究への応用も期待される。

これまでに、ネフロン癆[74]や常染色体劣性多発性嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease; ARPKD) [71]などの遺伝性腎疾患において、患者由来ヒト iPS 細胞から腎臓オルガノイドを作製して病態モデリングを行った報告がある。ADPKD に関しては、ゲノム編集により *PKD1* または *PKD2* をホモックアウトしたヒト ES 細胞株から腎系譜細胞への分化誘導を行い、*in vitro* で嚢胞構造を再現した報告がある[75-77]。しかし、ADPKD 患者と同じく *PKD1* または *PKD2* にヘテロ接合性変異を有する場合の表現型は報告されていなかった

た。また、同報告ではヒト iPS 細胞から腎系譜細胞への分化誘導が安定せず、患者由来ヒト iPS 細胞を用いた ADPKD の病態再現も未達成であった[76]。そこで本研究では、患者由来ヒト iPS 細胞を含む疾患特異的ヒト iPS 細胞から腎臓オルガノイド作製し、新規の ADPKD 病態モデルとしての有用性を評価する方針とした。

## 2 疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた新規 ADPKD 病態モデルの作製

### 2-1 目的

ゲノム編集により *PKD1* 遺伝子に変異を導入したヒト iPS 細胞株、および *PKD1* 遺伝子に変異を有する ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から腎臓オルガノイドへ分化誘導し、ADPKD の新規病態モデルを作製して、病態解析や創薬研究への応用の可能性を明らかにする。

### 2-2 材料と方法

#### 1 ゲノム編集による *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株の作製

ヒト iPS 細胞は StemFit AK02N 培地（タカラバイオ）を用いて、フィーダーフリー条件で維持培養を行った。既報にてオンフィーダー条件で作製された 585A1 株[78]、4A6 株[79]、ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株(Patient A:

CiRA00009, Patient B: CiRA00007) [80]については、フィーダーフリー化した後、実験に使用した。継代は 4 日毎に行い、定期的にマイコプラズマ感染を否定した。

本研究では、健常者由来ヒト iPS 細胞株である 585A1 株に対して、CRONUS (CRISPR-Cas9 regulated by transcription and nuclear-shuttling) システム[81]を用いて、非相同末端結合により *PKD1* 変異を導入する方針とした。CRONUS システムは、*piggyBac* ベクターを用いてあらかじめ Cas9 と gRNA を標的細胞に導入しておき、gRNA が恒常的に発現した状態で Cas9 活性を二重に制御することで、誘導可能かつ高効率なゲノム編集を可能としている。Cas9 はグルココルチコイド受容体(GR)との融合蛋白(Cas9-GR)となっており、Dox 誘導型プロモーター下に転写が制御されている。このため、ドキシサイクリン投与下に Cas9-GR が発現した状態で、さらにデキサメタゾン投与することで Cas9-GR の核移行が促され、Cas9 によるゲノム編集が可能となる[81]。

ゲノム編集のターゲット選定に当たり、*PKD1* の exon1-33 と 98%近い相同性を有する偽遺伝子が同じ染色体上に 6 個(*PKD1P1-PKD1P6*)存在するため[8]、この範囲は避ける方針とした。モデルマウスの既報で、*Pkd1* exon34 の欠失によって著明な腎嚢胞を生じることが報告されており[82]、*PKD1* exon34 上流(intron33)の 3'スプライス部位をターゲットに gRNA を作製し、exon skipping に

よる **exon34** の欠失をもたらす方針とした。

まず、維持培養中の **585A1** 株に対して **FuGENE6**（プロメガ）を用いたリポフェクション法により、**TetO-Cas9-GR-IRES-mCherry** 配列を含む *piggyBac* ベクター(Addgene ID 100596)、および **gRNA-RFP** を発現する *piggyBac* ベクター(**pPV-H1-ccdB-mEF1 $\alpha$ -RiH**) (Addgene ID 100598)を、順次 *piggyBac* トランスポザーゼ発現ベクターとともに細胞内に導入した。それぞれのベクターには **puromycin** 耐性遺伝子または **hygromycin** 耐性遺伝子が組み込まれており、遺伝子導入に成功したコロニーの選別は、リポフェクション後に **puromycin** または **hygromycin** を添加した維持培地を用いることで薬剤選択により行った。

**Cas9** と **gRNA** の両者を導入後のコロニーについてチップ先端を用いてコロニーピックアップを行い、維持培地中で **iPS** 細胞を増幅後に一部をストックした。残りの **iPS** 細胞をドキシサイクリンとデキサメタゾンで同時に処理してゲノム編集を誘導した後、バルクのゲノム **DNA** を回収し、サンガー法による配列解析を行いゲノム編集効率のスクリーニングを行った。ゲノム編集が高頻度に生じていると予想された株について、さらにフローサイトメトリーによるシングルセルの単離を行い、細胞を増幅した後、ゲノム **DNA** の回収とストックを行った。

## 2 ゲノム編集の確認

ゲノム DNA の抽出は、Cell Lysis Solution および Protein Precipitation Solution (Qiagen)を用いて、新鮮な iPS 細胞から行った。*PKD1* 変異の解析に使用したプライマーの一式を、表 1 に示す。PCR は KOD FX Neo (東洋紡)を用いて、Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)で施行した。精製後の PCR 産物をテンプレートとして、BigDye Xterminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて、3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)によるサンガー法のシーケンシングを行い、配列を解析した。

## 3 腎臓オルガノイドの分化誘導

未分化 iPS 細胞から腎臓オルガノイドへの分化誘導は、既報の方法を用いて行った[66]。維持培地中でサブコンフルエントとした iPS 細胞を 0.5 mM EDTA/PBS(-)を用いてシングルセルに解離し、10  $\mu$ M Y-27632 (和光純薬)を添加した StemFit AK02N 培地に懸濁して、iMatrix-511 (ニッピ)のコーティングを施した 24 ウェルプレート(Corning)に  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。翌日から、増殖因子を含んだ Stage1~Stage6 の培地を順次用いて、ネフロン前駆細胞を作製した (図 1)。ネフロン前駆細胞を Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.)を用いてシングルセルに解離し、U 底の低接着 96 ウェルプ



レートに  $1.0 \times 10^5$  cells/well で分注した後、300G×3 分で遠心した。翌日、細胞塊を形成しているので、20  $\mu$ l ピペットチップを用いて Transwell (Corning) のインサート上に移し、10 日間の気相液相界面培養を行って、自己組織化による腎臓オルガノイド作製を行った[66]。

#### 4 RT-qPCR

Total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて行い、cDNA の合成は ReverTra Ace (東洋紡) を用いて行った。qPCR は SYBR Green PCR Master Mix (タカラバイオ) を用いて、Step One Plus Real-Time PCR システム (Thermo Fisher Scientific) にて施行した。内在性コントロールには *GAPDH* を使用した。本研究で使用したプライマーの配列を表 1 に示す。

#### 5 免疫染色

腎臓オルガノイドの固定は、4%パラホルムアルデヒド（ナカライテスク）/PBS(-)を用いて 4°C, overnight で行い、その後 PBS(-)で洗浄した。切片の作製は、さらに 30%スクロース/PBS(-)を用いて 4°C, overnight で置換した後、OCT コンパウンド（サクラファインテックジャパン）で包埋し、凍結後のサンプルをクライオスタット(Leica)で 8  $\mu$ m 厚に薄切した。ホルマウント免疫染色および

切片の免疫染色は、5% donkey serum (Millipore)/0.25% Triton X-100（ナカライテスク）/PBS(-)を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、5% donkey serum/0.25% Triton X-100/PBS(-)に希釈した一次抗体と 4°C, overnight でインキュベートし、0.25% Triton X-100/PBS(-)で 2 回洗浄後、同様に希釈した二次抗体と室温で 2 時間インキュベートした。2 回洗浄後、Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (Dako)を用いてカバーガラスで封入し、BZ-X700 (KEYENCE)または共焦点顕微鏡 LSM 710 (Zeiss)で蛍光撮影を行った。

## 6 フローサイトメトリー

気相液相界面培養 10 日目の腎臓オルガノイドを TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) を用いて 37°C, 15 分で細胞解離した。10  $\mu$ M Y-27632 を含む 2% fetal bovine serum (FBS, ATCC)/PBS(-)をバッファーとして、細胞の染色は 1.5 ml エッペンドルフチューブを用いて on ice, 30 分で行った。最後に核染色を DAPI で行い、35  $\mu$ m セルストレーナーを通した後、FACS Aria II セルソーター (BD)でデータを取得した。解析は FACS Diva Software (BD)を使用し、死細胞分画は解析から除外した。本研究で使用した抗体のリストは表 2 に記載する。

## 7 嚢胞形成および嚢胞形成抑制実験

腎臓オルガノイドの嚢胞形成実験では、気相液相界面培養 10 日目の腎臓オルガノイドに対してインサート下の培地中に 10  $\mu$ M forskolin（和光純薬）を添加し、2 日毎に新鮮な薬液で培地交換を行って 7 日後に評価した。その他の薬剤 (50 ng/ml epidermal growth factor (EGF, PeproTech), 25  $\mu$ M blebbistatin (Toronto Research Chemicals), 10  $\mu$ M cisplatin（和光純薬）, 1  $\mu$ M arginine vasopressin (AVP, Tocris Bioscience))についても同様に評価した。

嚢胞形成抑制実験では、腎臓オルガノイドの気相液相界面培養 10 日目から、10  $\mu$ M forskolin の存在下に、いずれかの薬剤 (1-10  $\mu$ M tolvaptan (Axon Medchem), 10-100  $\mu$ M CFTR inhibitor 172 (Cayman Chemical), 1-10  $\mu$ M everolimus (Cayman Chemical) , 1-10  $\mu$ M rapamycin (Cayman Chemical))を併用して、嚢胞形成に与える影響を評価した。

## 8 嚢胞面積率の定量

嚢胞形成および嚢胞形成抑制実験を行った、気相液相界面培養 17 日目の腎臓オルガノイドについて BZ-X700 を用いて位相差像を撮影した。画像解析は、IN Cell Translator software および IN Cell Developer Toolbox software (GE healthcare)を用いて、自動化されたプロトコルで行った。嚢胞の面積率(cystic area)は、各オルガノイド全体の面積（ピクセル数）に占める透過性（輝度値）

の高い領域（ピクセル数）の割合として計測した。

## 9 統計解析

統計解析には、GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software Inc.)を用いた。平均値の差の検定には一元配置分散分析または二元配置分散分析を用いて、多重比較には Bonferroni 法による補正を行った。P 値 < 0.05 を統計学的有意と判断した。

### 2-3 結果

#### 1 ゲノム編集による *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株の作製

*PKD1* 遺伝子に PC1 蛋白の truncating をきたす変異があると、non-truncating の場合よりも、腎予後が不良であると報告されている[8]。そこで本研究では、*PKD1* exon34 上流の 3'スプライス部位をターゲットに gRNA を作製し、exon34 の exon skipping によりフレームシフト変異を生じさせる方針とした(図 2 上)。座位特異的なゲノム編集は、CRISPR-Cas9 システムを応用した CRONUS システムにより導入した[81]。樹立された *PKD1* ヘテロ変異ヒト iPS 細胞株および *PKD1* ホモ変異ヒト iPS 細胞株について、サンガー法によりゲノム DNA のシーケンシングを行い、ゲノム編集前の株と波形データを比較したところ、それぞれ

片アレルおよび両アレルに gRNA ターゲット付近のゲノム編集を生じていることを確認した (図 2 下)。さらに転写レベルでのゲノム編集の効果を評価するために、iPS 細胞から total RNA を抽出しオリゴ dT プライマーにて逆転写後、*PKD1* コーディング配列の exon34 付近の PCR 増幅を行い、精製した PCR 産物についてシーケンシングを行った。その結果、*PKD1* ヘテロ変異株および *PKD1* ホモ変異株の変異アレルについて、17 塩基対または 20 塩基対の欠失を認めた (図 3 左)。また、配列の比較から、*PKD1* ホモ変異株の片アレルは *PKD1* ヘテロ変異株の変異アレルに由来することが推測された。当初目的としていた exon 34 全体の exon skipping は生じていなかったが、これは exon34 のゲノム配列中に早い段階で 3' スプライス部位のコンセンサス配列である「AG」 (図 3 左の cDNA 配列に赤字で示す) が出現し、この部位でスプライシングを受けるためと考えられた。cDNA 配列からアミノ酸配列を予測したところ、変異アレルはいずれもフレームシフト変異となっており、未成熟終止コドン (premature termination codon; PTC) の出現を伴い、PC1 蛋白の truncating をきたすと推測された (図 3 右)。

*PKD1* 変異を有するヒト iPS 細胞に形態学的な異常は認めず、ゲノム編集に伴う核型異常がないことを G バンド分染法により確認した (図 4)。

## 2 *PKD1* 変異が腎臓オルガノイドの分化に与える影響の評価

野生型ヒト iPS 細胞株および *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株から、既報の分化誘導法を用いてネフロン前駆細胞を作製した[66]。さらに 10 日間の気相液相界面培養を行って、腎臓オルガノイドを作製した (図 5 上)。野生型ヒト iPS 細胞株において、分化段階に応じた *PKD1* 遺伝子発現量を RT-qPCR により評価したところ、ネフロン前駆細胞から腎臓オルガノイドに分化が進む段階で、*PKD1* の有意な発現量増加を認めた (図 6)。一方、*PKD1* cDNA の gRNA ターゲット部位にプライマーを設計して RT-PCR を行ったところ、*PKD1* ホモ変異株の腎臓オルガノイドでは PCR 増幅が生じなかった (図 7)。

*PKD1* 変異が腎臓オルガノイドの分化や構造に与える影響を評価するために、気相液相界面培養 10 日目の腎臓オルガノイドで免疫染色による評価を行った。野生型の腎臓オルガノイドおよび *PKD1* 変異を有する腎臓オルガノイドの両方で、糸球体マーカーである podocalyxin (PODXL)、近位尿細管マーカーである *Lotus tetragonolobus* lectin (LTL)、遠位尿細管マーカーである CDH1 陽性の構造物を認め、明らかな形態の差はなかった (図 5 下)。さらに腎臓オルガノイドを構成する細胞の割合をフローサイトメトリーにて評価したところ、生細胞に占める EpCAM 陽性の尿細管細胞、生細胞に占める LTL 陽性の近位尿細管細胞、EpCAM 陽性細胞に占める LTL 陽性の近位尿細管細胞、生細胞に占める PODXL

陽性の糸球体細胞のそれぞれについて、*PKD1* 変異の有無によらず同等であった（図 8）。また、ネフロン前駆細胞と腎臓オルガノイドにおける近位尿細管マーカー(*LRP2*, *CUBN*, *SLC22A6*)および嚢胞関連遺伝子(*CFTR*, *EGFR*, *AVPR2*)の発現量を RT-qPCR で評価したが、腎臓オルガノイドにおける発現量は *PKD1* 変異の有無によらず同等であった（図 9）。

### 3 Forskolin 投与による腎臓オルガノイドの嚢胞形成の検討

次に、腎臓オルガノイドに対して薬剤処理を施すことで嚢胞構造を再現できないか検討した。アデニル酸シクラーゼ活性化薬である *forskolin* や膜透過性の cAMP アナログは、マウス胎仔腎[83-84]、従来の細胞種を用いたスフェロイドモデル[25-26, 38]、ARPKD 患者由来ヒト iPS 細胞から作製した腎臓オルガノイド[71]など、多様な組織で嚢胞の再現に利用されている。そこで、気相液相界面培養 10 日目の腎臓オルガノイドに対して DMSO または *forskolin* を 7 日間投与したところ、コントロールとして DMSO を投与した場合に嚢胞構造は再現されないが、*forskolin* 投与により腎臓オルガノイド内に嚢胞構造が再現されることを見いだした（図 10）。*Forskolin* 投与により野生型の腎臓オルガノイドにおいても嚢胞が形成されるものの、画像の定量評価では *PKD1* の遺伝子型に応じて、嚢胞面積率(cystic area)に有意な増加を認めた（図 10）。

嚢胞の由来を明らかにするために、嚢胞形成後（気相液相界面培養 17 日目）の腎臓オルガノイドについて免疫染色を行ったところ、大部分の嚢胞は LTL 陽性の近位尿細管から生じると考えられた（図 11）。

#### 4 ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から作製した腎臓オルガノイドの嚢胞形成

ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から腎臓オルガノイドが作製可能か、既報で樹立されていた 2 系統の患者由来ヒト iPS 細胞株を用いて実験を行った。Patient A 由来の CiRA00009 株は *PKD1* 遺伝子にヘテロ接合性のナンセンス変異 (Q3895X) を有しており、Patient B 由来の CiRA00007 株は *PKD1* 遺伝子にヘテロ接合性のミスセンス変異 (G3818R) を有している [80]。これらの株（以後、ADPKD 患者株とする）から選択的分化誘導によりネフロン前駆細胞を作製した後、気相液相界面培養を行ったところ、両方で糸球体 (PODXL)、近位尿細管 (LTL)、遠位尿細管 (CDH1) を含む腎臓オルガノイドが作製可能であった（図 12）。また、LTL 陽性の近位尿細管上皮において頂端膜側に抗 ARL13B 抗体で染色される一次繊毛が存在していることを確認した（図 13）。*PKD1* ゲノム編集株と同様に自発的な嚢胞形成を認めなかったため、気相液相界面培養 10 日目の腎臓オルガノイドに対して 7 日間の forskolin 投与を行ったところ、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドも嚢胞構造を再現することを確認した。健常者由来ヒト iPS 細



胞株から作製した腎臓オルガノイドとの比較では、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドにおいて有意な **cystic area** の増加を認めた (図 14)。免疫染色では、一部 **CDH1** 陽性の遠位尿細管由来と思われる嚢胞を認めたが (図 15、矢印)、大部分は **PKD1** ゲノム編集株の結果と同様に、**LTL** 陽性の近位尿細管から生じた嚢胞と考えられた (図 15)。免疫染色およびヘマトキシリン・エオジン染色による **forskolin** 投与後の組織の経時的評価では、**forskolin** 投与 1 時間後の早期に **LTL** 陽性の近位尿細管の内腔拡張が認められた (図 16)。さらに **forskolin** 投与 6 時間後には、拡張した尿細管の一部で **Pkd1** ホモ欠損マウスの既報[82, 85]に類似した上皮細胞の扁平化が観察された (図 16、矢印)。

## 5 Forskolin 以外の嚢胞形成条件に関する検討

まず、培養期間を延長することで嚢胞が生じるか検討したが、**PKD1** ゲノム編集株および ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドの両方で、少なくとも気相液相界面培養 30 日目までに肉眼的な嚢胞形成は認めなかった (図 17)。

ADPKD 患者の腎嚢胞由来初代培養細胞を用いた既報で、患者細胞では **cAMP** 刺激が **ERK** の活性化を介して、細胞増殖を促進するメカニズムが報告されている[50]。そこで、**ERK** を活性化する **EGF** を投与することで嚢胞が形成されるか検討したが、腎臓オルガノイド全体のサイズがわずかに増加したものの、肉眼的

に嚢胞は形成されなかった（図 17）。

*PKD1* ホモ欠損 ES 細胞から分化誘導した腎系譜細胞において、ミオシン II 阻害薬である *blebbistatin* が嚢胞形成を促進した既報があり [77]、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドを用いて *blebbistatin* による嚢胞形成を検討した。その結果、*blebbistatin* 投与後の腎臓オルガノイド内に嚢胞様に観察される部分を認めた。尿細管毒性のある *cisplatin* や ADPKD で嚢胞の増悪因子と考えられている *AVP* では、腎臓オルガノイド内に嚢胞は再現されなかった（図 18）。

## 6 ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドを用いた嚢胞形成抑制実験

ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドを用いて、ADPKD の治療薬候補として報告のある薬剤が腎臓オルガノイドの嚢胞形成を抑制するか検討した。バソプレシン V2 受容体拮抗薬である *tolvaptan* は、現在臨床で使用されている ADPKD の治療薬である。しかし、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドにおいて *tolvaptan* は *forskolin* による嚢胞増大抑制効果を認めなかった。一方、モデルマウスにおける腎嚢胞増大抑制の報告 [86] のある CFTR 阻害薬は、高濃度での投与により腎臓オルガノイドの嚢胞増大を抑制した。また、mTOR 阻害薬である *everolimus* および *rapamycin* は、いずれも腎臓オルガノイドの嚢胞増大を抑制した（図 19）。腎臓オルガノイドの切片の評価では、CFTR 阻害薬の併用によ

り forskolin 投与後早期の尿細管拡張が抑制された (図 20)。

## 2-4 考察

本研究では、患者数が多く疾患の重症度も高いと考えられる *PKD1* 変異を有する ADPKD 症例[8]を対象として、疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた腎病態モデルを作製した。まず、CRISPR-Cas9 システムを用いて *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株 (ヘテロ変異株およびホモ変異株) を樹立し、*PKD1* 変異が腎臓オルガノイドの分化に影響しないことを示した。次に、腎臓オルガノイドへの forskolin 投与により腎臓オルガノイド内に嚢胞が再現されることを見だし、*PKD1* の遺伝子型に応じて cystic area が増大することを示した。ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドも forskolin 投与後に嚢胞を再現し、健常株と比較して cystic area が増大することを明らかにした。さらに、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドを用いて、ADPKD の治療薬候補として報告のある薬剤の嚢胞増大抑制効果を評価し、病態モデルとしての妥当性を検証した。

既報では、ゲノム編集により *PKD1* または *PKD2* をホモノックアウトしたヒト ES 細胞株を用いて、腎組織における嚢胞形成が再現されているが[75-77]、疾患特異的ヒト iPS 細胞株を用いて ADPKD の腎嚢胞を再現した報告はなかった。本研究では、新規の知見として *PKD1* ヘテロ変異株を含む *PKD1* ゲノム編集株、

および ADPKD 患者株から作製した腎臓オルガノイドで嚢胞の再現に成功しており、本病態モデルが従来にはない *PKD1* の遺伝子型を有する病態解析のためのツールとなることが期待される。なお、本研究の公表とほぼ同時期に別の研究グループから、ゲノム編集を行った *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株から作製した腎臓オルガノイド（ネフロンオルガノイド）を用いて、forskolin による嚢胞の再現が報告されている[87]。本研究とは異なるネフロンオルガノイドの作製方法[63]であり、*PKD1* の変異導入部位も異なっているが、同様の結果が再現されている。しかしながら、ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から作製したネフロンオルガノイドでの疾患の表現型は報告されなかった[87]。

疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した ADPKD モデルでは、*PKD1* ホモ変異株の腎臓オルガノイドにおいても自発的な嚢胞形成を認めていないが、その原因の一つとして腎臓オルガノイド自体の成熟化が十分でないことが考えられる。両アレルに異なる *PKD1* 変異を有する胎児の症例報告（父方のアレルが hypomorphic と推測される）では妊娠第 2 三半期の終わり（妊娠 27 週）に腎腫大を認めるが[88]、腎臓オルガノイドは妊娠第 1 三半期～第 2 三半期程度の胎児腎に相当する成熟度であり[64, 66, 70-72]、機能的な PC1 蛋白を完全に欠損した場合でも自発的な嚢胞形成のタイミングに達していない可能性がある。また、生理的な条件での嚢胞形成のためには、腎臓オルガノイド内での尿産生など既

報では未達成の要素が必要である可能性も考えられる。

疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した本研究のモデルでは、嚢胞を再現するために AC 活性化薬である forskolin による刺激を必要としている。モデルマウスでの知見から ADPKD の腎病変における AC の役割が示されており[46-48]、本研究のモデルにおける forskolin の投与は、AC の活性化という ADPKD の細胞内病態の一部を再現し増強する役割が考えられる。一方で、forskolin の投与が PC1 蛋白の必要量を増大させるなどの理由で、PKD1 変異に伴う表現型を顕在化させることに役立っている可能性も考えられる。

ADPKD ではネフロンおよび集合管の様々な領域から嚢胞が形成される[6]。疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した本研究のモデルにおける嚢胞は、免疫染色による評価で主に LTL 陽性の近位尿細管由来と考えられた。これは、Pkd1 を欠損したモデルマウスにおいて近位尿細管から嚢胞が生じる知見[41-42]や、ヒトの ADPKD において LTL 陽性の嚢胞上皮が存在している知見[24]と一致する。本研究のモデルにおける PKD1 依存性の嚢胞増悪メカニズムは、ADPKD 患者の *in vivo* の腎嚢胞と何らかの病態を共有する可能性が考えられる。

最後に、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドを用いて、既存薬剤の嚢胞増大抑制効果を検証した。バソプレシン V2 受容体拮抗薬である tolvaptan は ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドにおける嚢胞増大抑制効果を示さなか

ったが、本研究の腎臓オルガノイドは V2 受容体を発現する集合管細胞を含んでおらず (図 9)、さらに V2 受容体の刺激を介さずに forskolin が直接細胞内の AC を活性化することから、妥当な結果と考えられた。一方で、モデルマウスでの有効性が報告されている CFTR 阻害薬[86]または mTOR 阻害薬[54]の投与は、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドにおいても嚢胞増大抑制効果を示した。本研究の嚢胞増大抑制実験における薬剤の作用機序や薬剤自体が腎臓オルガノイドに与える毒性の影響を今後検証する必要があるが、疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した本研究の ADPKD モデルが薬物投与研究にも応用可能であることを示す結果であると考ええる。

ADPKD では原因遺伝子の変異から腎嚢胞形成に至るメカニズムが明らかにされておらず、根本的な病態に即した創薬ターゲットの選定が困難である。一方、疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した本研究の ADPKD モデルは無限に増幅可能な iPS 細胞の特性を活かして、ハイスループットの探索的研究にも応用が期待される。嚢胞形成という表現型に着目した ADPKD の治療薬スクリーニングを行うことで、従来のモデルでは明らかにされてこなかった新規の病態や創薬ターゲットの同定に貢献する可能性がある。

## 2-5 結語

CRISPR-Cas9 システムを用いて、*PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株を樹立した。

*PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株および ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から腎臓オルガノイドを作製し、forskolin 処理によって腎臓オルガノイド内に嚢胞を再現した。疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した本病態モデルは、ADPKD の病態解析や創薬のための探索的研究に応用が期待される。

### 3 今後の課題

本研究の腎臓オルガノイドにおける forskolin 投与の意義、および forskolin による *PKD1* 依存性の嚢胞増悪メカニズムを明らかにする必要がある。嚢胞増大抑制実験に関しては、疾患特異的ヒト iPS 細胞から作製した本研究のモデルにおける候補薬剤の嚢胞増大抑制メカニズムまたは毒性の評価を行う必要がある。

### 4 謝辞

このような研究の機会を与えていただき、研究全体の御指導、御校閲を賜った筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻腎臓内科学分野教授 山縣邦弘先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり御指導、御鞭撻を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門教授 長船健二先生に心より感謝申し上げます。また、多くの御指導、御助言をいただいた同研

究室の前伸一先生、荒岡利和先生をはじめとする皆様に感謝の意を表します。

## 5 出典

本学位論文では Biochemical and Biophysical Research Communications. 529:1186-1194, 2020 doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.141 に掲載された論文の内容を、Elsevier B.V.の規定にしたがって再利用している。

## 6 参考文献

- [1] A.B. Chapman, O. Devuyst, K.-U. Eckardt, et al., Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference, Kidney Int. 88 (2015) 17-27.
- [2] E. Higashihara, K. Nutahara, M. Kojima, et al., Prevalence and renal prognosis of diagnosed autosomal dominant polycystic kidney disease in Japan, Nephron 80 (1998) 421-427.
- [3] 日本透析医学会：わが国の慢性透析療法の現況. 2019年末の慢性透析患者に関する集計.
- [4] 成田一衛（監修）. エビデンスに基づく多発性嚢胞腎PKD診療ガイドライ



ン2020. 東京医学社 2020.

- [5] K. Skorecki, G.M. Chertow, P.A. Marsden, et al., Brenner and Rector's The Kidney, 10th ed. ELSEVIER 2015.
- [6] C. Bergmann, L.M. Guay-Woodford, P.C. Harris, S. Horie, D.J.M. Peters and V.E. Torres. Polycystic kidney disease, Nat. Rev. Dis. Primers 4 (2018) 50.
- [7] V.E. Torres, A.B. Chapman, O. Devuyst, et al., Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease, N. Engl. J. Med. 367 (2012) 2407-2418.
- [8] E. Cornec-Le Gall, M.P. Audrézet, Y. Le Meur, et al., Genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: 20 years on, Hum. Mutat. 35 (2014) 1393-1406.
- [9] E. Cornec-Le Gall, V.E. Torres and P.C. Harris. Genetic complexity of autosomal dominant polycystic kidney and liver disease, J. Am. Soc. Nephrol. 29 (2018) 13-23.
- [10] F. Qian, F.J. Germino, Y. Cai, et al., PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain, Nat. Genet. 16 (1997) 179-183.
- [11] J. Kaspereit-Rittinghausen, K. Rapp, F. Deerberg, et al., Hereditary

- polycystic kidney disease associated with osteorenal syndrome in rats, *Vet. Pathol.* 26 (1989) 195-201.
- [12] M. Katsuyama, T. Masuyama, I. Komura, et al., Characterization of a novel polycystic kidney rat model with accompanying polycystic liver, *Exp. Anim.* 49 (2000) 51–55.
- [13] H. Takahashi, J.P. Calvet, D. Dittmore-Hoover, et al., A hereditary model of slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse, *J. Am. Soc. Nephrol.* 1 (1991) 980-989.
- [14] S. Nagao, M. Kugita, D. Yoshihara and T. Yamaguchi, Animal models for human PKD, *Exp. Anim.* 61 (2012) 477-488.
- [15] S. Muto, A. Aiba, Y. Saito, et al., Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted *Pkd1* mutant, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 1731-1742.
- [16] S. Shibazaki, Z. Yu, S. Nishio, et al., Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of *Pkd1*, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 1505-1516.
- [17] V. Patel, L. Li, P. Cobo-Stark, et al., Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia, *Hum.*

- Mol. Genet. 17 (2008) 1578-1590.
- [18] M, Ma, X. Tian, P. Igarashi, et al., Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease, Nat. Genet. 45 (2013) 1004-1012.
- [19] H. Happé and D.J.M. Peters, Translational research in ADPKD: lessons from animal models, Nat. Rev. Nephrol. 10 (2014) 587-601.
- [20] W. Lu, X. Fan, N. Basora, et al., Late onset of renal and hepatic cysts in *Pkd1*-targeted heterozygotes, Nat. Genet. 21 (1999) 160-161.
- [21] T. Nadasdy, Z. Laszik, G. Lajoie, et al., Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases, J. Am. Soc. Nephrol. 5 (1995) 1462-1468.
- [22] X. Song, V. Di Giovanni, N. He, et al., Systems biology of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): computational identification of gene expression pathways and integrated regulatory networks, Hum. Mol. Genet. 18 (2009) 2328-2343.
- [23] P.D. Wilson, R.W. Schrier, R.D. Breckon and P.A. Gabow, A new method for studying human polycystic kidney disease epithelia in culture, Kidney Int. 30 (1986) 371-378.

- [24] M. Loghman-Adham, S.M. Nauli, C.E. Soto, et al., Immortalized epithelial cells from human autosomal dominant polycystic kidney cysts, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285 (2003) F397-F412.
- [25] D.P. Wallace, J.J. Grantham and L.P. Sullivan, Chloride and fluid secretion by cultured human polycystic kidney cells, *Kidney Int.* 50 (1996) 1327-1336.
- [26] T.H. Booij, L.S. Price and E.H.J. Danen, 3D Cell-Based Assays for Drug Screens: Challenges in Imaging, Image Analysis, and High-Content Analysis, *SLAS Discov.* 24 (2019) 615-627.
- [27] T. Tsukiyama, K. Kobayashi, M. Nakaya, et al., Monkeys mutant for *PKD1* recapitulate human autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nat. Commun.* 10 (2019) 5517.
- [28] V.E. Torres and P.C. Harris, Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 (2014) 18-32.
- [29] T. Seeger-Nukpezah, D.M. Geynisman, A.S. Nikonova, et al., The hallmarks of cancer: relevance to the pathogenesis of polycystic kidney disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 11 (2015) 515-534.
- [30] M. Ma, A.-R. Gallagher and S. Somlo, Ciliary Mechanisms of Cyst

Formation in Polycystic Kidney Disease, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 9 (2017) a028209.

- [31] V. Padovano, C. Podrini, A. Boletta and M.J. Caplan, Metabolism and mitochondria in polycystic kidney disease research and therapy, Nat. Rev. Nephrol. 14 (2018) 678-687.
- [32] L.F. Menezes and G.G. Germino, The pathobiology of polycystic kidney disease from a metabolic viewpoint, Nat. Rev. Nephrol. 15 (2019) 735-749.
- [33] M.B. Lanktree, A. Haghighi, I. di Bari, et al., Insights into Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease from Genetic Studies, Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 16 (2021) 790-799.
- [34] F.T. Chebib, C.R. Sussman, X. Wang, et al., Vasopressin and disruption of calcium signalling in polycystic kidney disease, Nat. Rev. Nephrol. 11 (2015) 451-464.
- [35] S.M. Nauli, F.J. Alenghat, Y. Luo, et al., Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells, Nat. Genet. 33 (2003) 129-137.
- [36] S.M. Nauli, S. Rossetti, R.J. Kolb, et al., Loss of polycystin-1 in human cyst-lining epithelia leads to ciliary dysfunction, J. Am. Soc. Nephrol. 17

(2006) 1015-1025.

- [37] M. Delling, P.G. DeCaen, J.F. Doerner, et al., Primary cilia are specialized calcium signalling organelles, *Nature* 504 (2013) 311-314.
- [38] T. Yamaguchi, S.J. Hempson, G.A. Reif, et al., Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006) 178-187.
- [39] C. Xu, S. Rossetti, L. Jiang, et al., Human ADPKD primary cyst epithelial cells with a novel, single codon deletion in the PKD1 gene exhibit defective ciliary polycystin localization and loss of flow-induced Ca<sup>2+</sup> signaling, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292 (2007) F930-945.
- [40] T. Yamaguchi, S. Nagao, M. Kasahara, et al., Renal accumulation and excretion of cyclic adenosine monophosphate in a murine model of slowly progressive polycystic kidney disease, *Am. J. Kidney Dis.* 30 (1997) 703-709.
- [41] A.K. Ahrabi, F. Jouret, E. Marbaix, et al., Glomerular and proximal tubule cysts as early manifestations of *Pkd1* deletion, *Nephrol. Dial. Transplant.* 25 (2010) 1067-1078.
- [42] K. Hopp, C.J. Ward, C.J. Hommerding, et al., Functional polycystin-1

- dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 4257-4273.
- [43] T.V. Masyuk, A.I. Masyuk, V.E. Torres, et al., Octreotide inhibits hepatic cystogenesis in a rodent model of polycystic liver disease by reducing cholangiocyte adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, *Gastroenterology* 132 (2007) 1104-1116.
- [44] S.N. Kip, L.W. Hunter, Q. Ren, et al.,  $[Ca^{2+}]_i$  reduction increases cellular proliferation and apoptosis in vascular smooth muscle cells: relevance to the ADPKD phenotype, *Circ. Res.* 96 (2005) 873-880.
- [45] Y.-H. Choi, A. Suzuki, S. Hajarnis, et al., Polycystin-2 and phosphodiesterase 4C are components of a ciliary A-kinase anchoring protein complex that is disrupted in cystic kidney diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 10679-10684.
- [46] S. Rees, W. Kittikulsuth, K. Roos, et al., Adenylyl cyclase 6 deficiency ameliorates polycystic kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 (2014) 232-237.
- [47] Q. Wang, P. Cobo-Stark, V. Patel, et al., Adenylyl cyclase 5 deficiency reduces renal cyclic AMP and cyst growth in an orthologous mouse model

of polycystic kidney disease, *Kidney Int.* 93 (2018) 403-415.

- [48] K. Hopp, C.J. Hommerding, X. Wang, et al., Tolvaptan plus pasireotide shows enhanced efficacy in a PKD1 model, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (2015) 39-47.
- [49] K. Hanaoka and W.B. Guggino, cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells, *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 (2000) 1179-1187.
- [50] T. Yamaguchi, S. Nagao, D.P. Wallace, et al., Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys, *Kidney Int.* 63 (2003) 1983-1994.
- [51] T. Yamaguchi, D.P. Wallace, B.S. Magenheimer, et al., Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40419-40430.
- [52] K. Hanaoka, O. Devuyst, E. Schwiebert, et al., A role for CFTR in human autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) C389-C399.
- [53] O. Ibraghimov-Beskrovnaya and T.A. Natoli, mTOR signaling in polycystic



kidney disease, Trends Mol. Med. 17 (2011) 625-633.

- [54] J.M. Shillingford, K.B. Piontek, G.G. Germino and T. Weimbs, Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of *Pkd1*, J. Am. Soc. Nephrol. 21 (2010) 489-497.
- [55] A.L. Serra, D. Poster, A.D. Kistler, et al., Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease, N. Engl. J. Med. 363 (2010) 820-829.
- [56] G. Walz, K. Budde, M. Mannaa, et al., Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease, N. Engl. J. Med. 363 (2010) 830-840.
- [57] G. Canaud, B. Knebelmann, P.C. Harris, et al., Therapeutic mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease: What is the appropriate serum level?, Am. J. Transplant. 10 (2010) 1701-1706.
- [58] F. Qian, T.J. Watnick, L.F. Onuchic, et al., The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 1, Cell 87 (1996) 979-987.
- [59] T.J. Watnick, V.E. Torres, M.A. Gandolph, et al., Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal

dominant polycystic kidney disease, *Mol. Cell* 2 (1998) 247-251.

- [60] Q. Qian, L.W. Hunter, M. Li, et al., *Pkd2* haploinsufficiency alters intracellular calcium in vascular smooth muscle cells, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1875-1880.
- [61] N. Morel, G. Vandenberg, A.K. Ahrabi, et al., *PKD1* haploinsufficiency is associated with altered vascular reactivity and abnormal calcium signaling in the mouse aorta, *Pflugers Arch.* 457 (2009) 845-856.
- [62] M.Y. Chang, E. Parker, S. Ibrahim, et al., Haploinsufficiency of *Pkd2* is associated with increased tubular cell proliferation and interstitial fibrosis in two murine *Pkd2* models. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (2006) 2078-2084.
- [63] A. Taguchi, Y. Kaku, T. Ohmori, et al., Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell* 14 (2014) 53-67.
- [64] M. Takasato, P.X. Er, H.S. Chiu, et al., Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis, *Nature* 526 (2015) 564-568.
- [65] R. Morizane, A.Q. Lam, B.S. Freedman, et al., Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury,

Nature Biotechnol. 33 (2015) 1193-1200.

- [66] H. Tsujimoto, T. Kasahara, S.-I. Sueta, et al., A modular differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells, Cell Rep, 31 (2020) 107476.
- [67] F. Costantini and R. Kopan, Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development, Dev. Cell 18 (2010) 698-712.
- [68] A. Kobayashi, M.T. Valerius, J.W. Mugford, et al., Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development, Cell Stem Cell 3 (2008) 169-181.
- [69] S.E. Howden, S.B. Wilson, E. Groenewegen, et al., Plasticity of distal nephron epithelia from human kidney organoids enables the induction of ureteric tip and stalk, Cell Stem Cell 28 (2021) 671-684.
- [70] E. Garreta, P. Prado, C. Tarantino, et al., Fine tuning the extracellular environment accelerates the derivation of kidney organoids from human pluripotent stem cells, Nature Mater. 18 (2019) 397-405.
- [71] J.H. Low, P. Li, E.G.Y. Chew, et al., Generation of human PSC-derived

- kidney organoids with patterned nephron segments and a de novo vascular network, *Cell Stem Cell* 25 (2019) 373-387.
- [72] A. Subramanian, E.-H. Sidhom, M. Emani, et al., Single cell census of human kidney organoids shows reproducibility and diminished off-target cells after transplantation, *Nature Commun.* 10 (2019) 5462.
- [73] P. Karagiannis, K. Takahashi, M. Saito, et al., Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development, *Physiol. Rev.* 99 (2019) 79-114.
- [74] T.A. Forbes, S.E. Howden, K. Lawlor, et al., Patient-iPSC-derived kidney organoids show functional validation of a ciliopathic renal phenotype and reveal underlying pathogenetic mechanisms, *Am. J. Hum. Genet.* 102 (2018) 816-831.
- [75] B.S. Freedman, C.R. Brooks, A.Q. Lam, et al., Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8715.
- [76] N.M. Cruz, X. Song, S.M. Czerniecki, et al., Organoid cystogenesis reveals a critical role of microenvironment in human polycystic kidney disease, *Nat. Mater.* 16 (2017) 1112-1119.

- [77] S.M. Czerniecki, N.M. Cruz, J.L. Harder, et al., High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping, *Cell Stem Cell* 22 (2018) 929-940.
- [78] K. Okita, T. Yamakawa, Y. Matsumura, et al., An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells, *Stem Cells* 31 (2013) 458-466.
- [79] T. Toyohara, S.-I. Mae, S.-I. Sueta, et al., Cell therapy using human induced pluripotent stem cell-derived renal progenitors ameliorates acute kidney injury in mice, *Stem Cells Transl. Med.* 4 (2015) 980-992.
- [80] T. Ameku, D. Taura, M. Sone, et al., Identification of MMP1 as a novel risk factor for intracranial aneurysms in ADPKD using iPSC models, *Sci. Rep.* 6 (2015) 30013.
- [81] K. Ishida, H. Xu, N. Sasakawa, et al., Site-specific randomization of the endogenous genome by a regulatable CRISPR-Cas9 *piggyBac* system in human cells, *Sci. Rep.* 8 (2018) 310.
- [82] W. Lu, B. Peissel, H. Babakhanlou, et al., Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted *Pkd1* mutation, *Nat. Genet.*

17 (1997) 179-181.

- [83] T.A. Natoli, T.C. Gareski, W.R. Dackowski, et al., *Pkd1* and *Nek8* mutations affect cell-cell adhesion and cilia in cysts formed in kidney organ cultures, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294 (2008) F73-83.
- [84] K. Jansson, A.-N.T. Nguyen, B.S. Magenheimer, et al., Endogenous concentrations of ouabain act as a cofactor to stimulate fluid secretion and cyst growth of in vitro ADPKD models via cAMP and EGFR-Src-MEK pathways, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303 (2012) F982-990.
- [85] S. Nishio, M. Hatano, M. Nagata, et al., *Pkd1* regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 910-918.
- [86] B. Yang, N.D. Sonawane, D. Zhao, et al., Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 1300-1310.
- [87] S. Kuraoka, S. Tanigawa, A. Taguchi, et al. *PKD1*-dependent renal cystogenesis in human induced pluripotent stem cell-derived ureteric bud/collecting duct organoids. *J. Am. Soc. Nephrol.* 31 (2020) 2355-2371.
- [88] R.D. Gilbert, P. Sukhtankar, K. Lachlan and D.J. Fowler, Bilineal

inheritance of *PKD1* abnormalities mimicking autosomal recessive polycystic disease, *Pediatr. Nephrol.* 28 (2013) 2217-2220.

7 図表

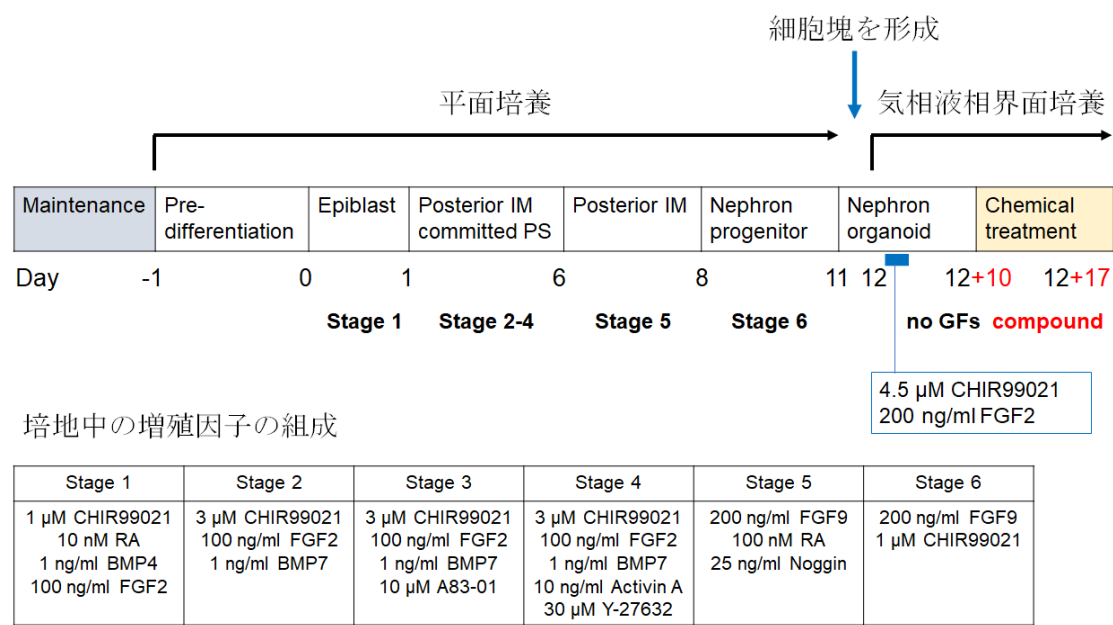


図 1 ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞および腎臓オルガノイドへの分化誘導  
プロトコル（文献[66]から図を新たに作成）

IM: intermediate mesoderm, PS: primitive streak, GF: growth factor, RA: retinoic acid, BMP: bone morphogenetic protein, FGF: fibroblast growth factor



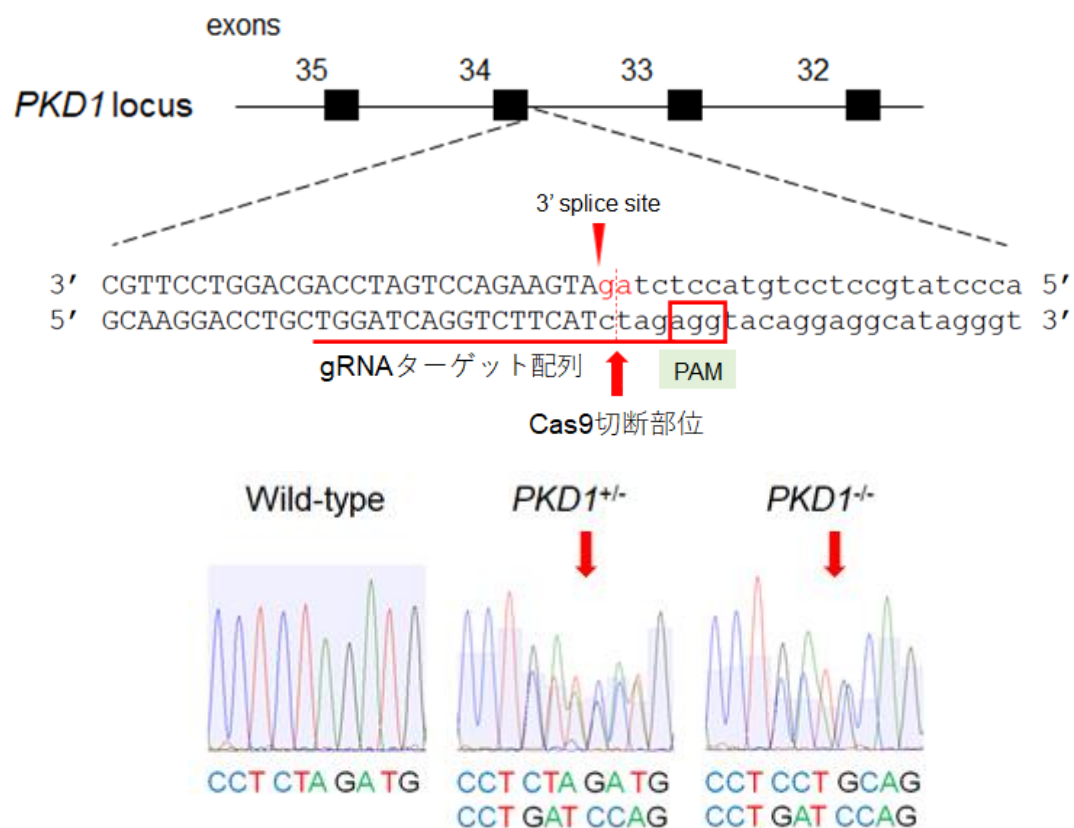


図 2 gRNA 設計部位のシェーマ（上）とサンガー法シーケンシングによるゲノム DNA の変異の確認（下）

（上）gRNA ターゲット配列を赤線で示す。gRNA は、*PKD1* exon34 上流 (intron33)の 3'スプライス部位（赤矢頭）のコンセンサス配列(AG)内（赤矢印の位置）で Cas9 による DNA 二本鎖切断を生じるように設計されている。PAM: protospacer adjacent motif

（下）*PKD1* 変異株において、Cas9 による DNA 二本鎖切断が予測される位置（赤矢印）の近傍でゲノム編集が生じていることがわかる。

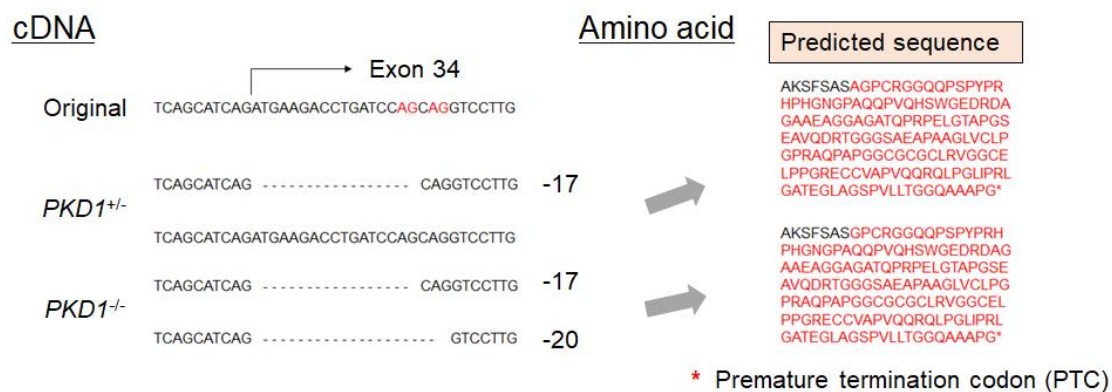


図3 サンガー法シーケンシングによる cDNA の変異の確認（左）と予測アミノ酸配列（右）

（左）*PKD1* コーディング配列の exon34 付近のシーケンシングの結果、*PKD1* ヘテロ変異株および *PKD1* ホモ変異株の変異アレルについて、17 塩基対または 20 塩基対の欠失を認める。ゲノム編集の結果、新たに 3' スプライス部位と認識されたと思われる「AG」の位置を赤字で示す。

（右）予測アミノ酸配列からは、変異アレルはいずれもフレームシフト変異となっており、未成熟終止コドン(premature termination codon, PTC)の出現を伴い、PC1 蛋白の truncating をきたすと推測される。

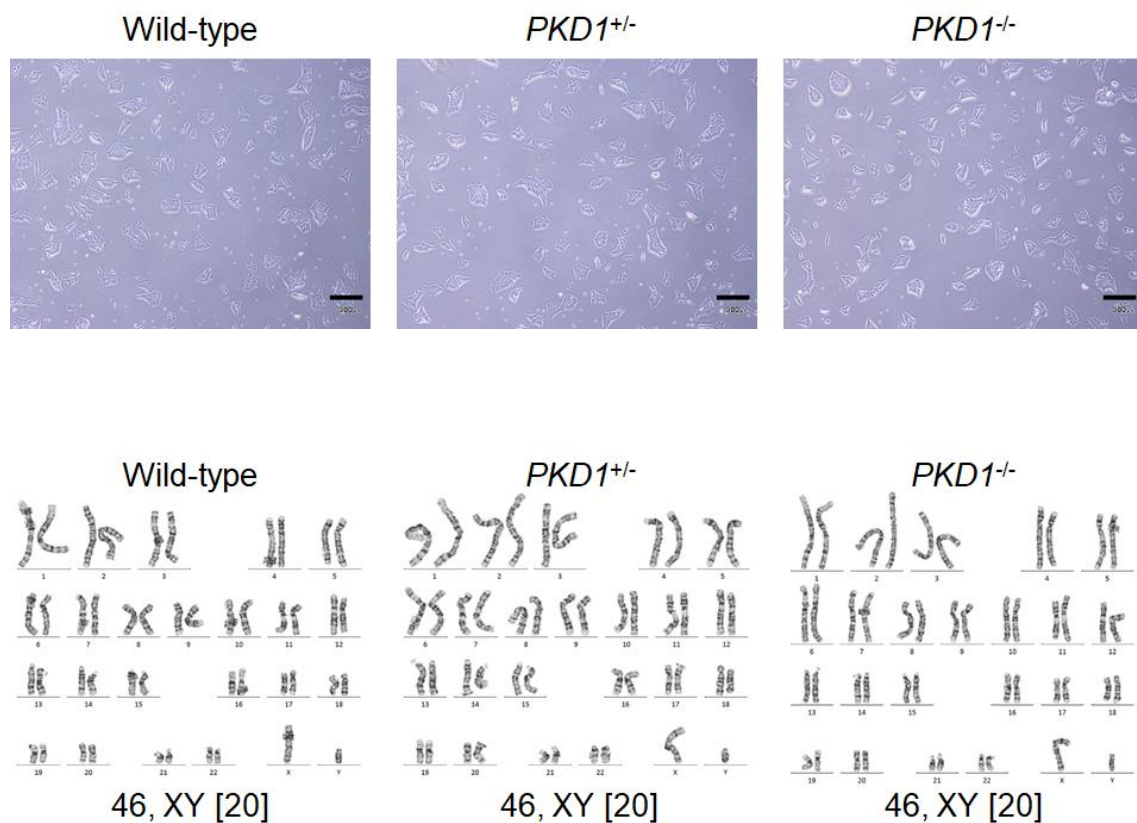


図 4 ゲノム編集による *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株の光顕像（上）および核型解析の結果（下）

（上）ゲノム編集後のヒト iPS 細胞における形態学的な異常は認めない。Scale bar, 300  $\mu$ m

（下）G バンド分染法による評価では、ゲノム編集に伴う核型異常は認めない。

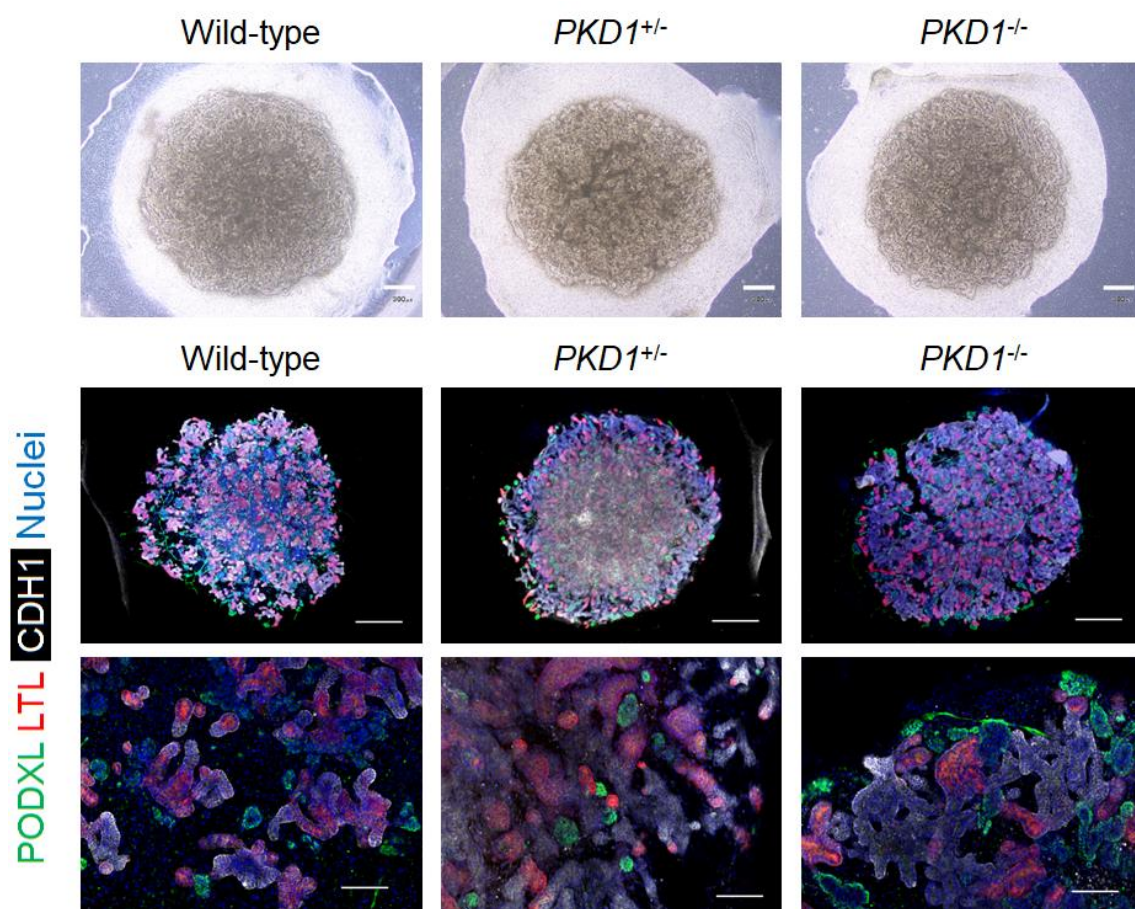


図5 *PKD1* 変異ヒト iPS 細胞株から分化誘導した気相液相界面培養 10 日目の腎臓オルガノイドの光顕像（上）および免疫染色像（下）

（上）*PKD1* 変異による、自発的な嚢胞形成は明らかでない。Scale bar, 300  $\mu$ m

（下）*PKD1* の遺伝子型によらず、腎臓オルガノイド内に糸球体や尿細管などのネフロン構造が形成されるが、嚢胞構造は認めない。

podocalyxin (PODXL) : 糸球体マーカー、*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、CDH1 (E-cadherin) : 遠位尿細管マーカー、Scale bar, 500  $\mu$ m

（上段）、100  $\mu$ m（下段）

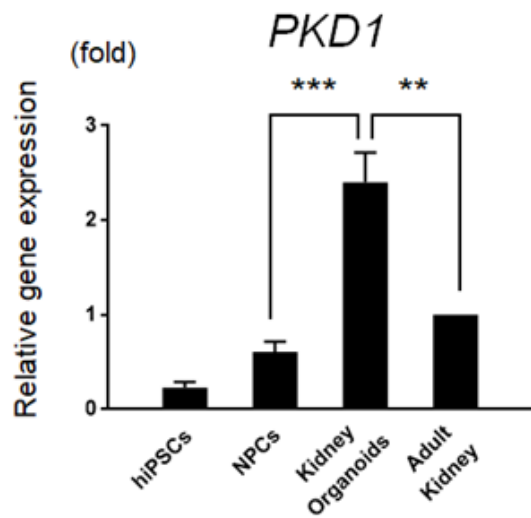


図 6 野生型ヒト iPS 細胞株における分化段階に応じた *PKD1* 遺伝子発現量の評価(RT-qPCR)

ネフロン前駆細胞(NPCs, nephron progenitors)から腎臓オルガノイドに分化が進む段階で *PKD1* 遺伝子発現量の有意な増加を認める。

\*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.001 (n=3, mean ± SE)

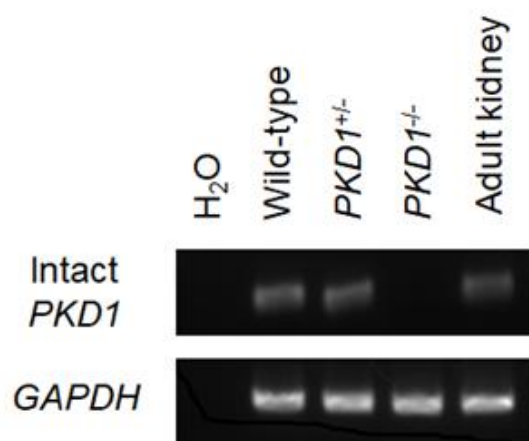


図 7 腎臓オルガノイドにおける intact な *PKD1*-mRNA の発現の確認(RT-PCR)

*PKD1* cDNA の gRNA ターゲット部位にプライマーを設計して RT-PCR を行う

と、*PKD1* ホモ変異株の腎臓オルガノイドでは PCR 増幅が生じない。

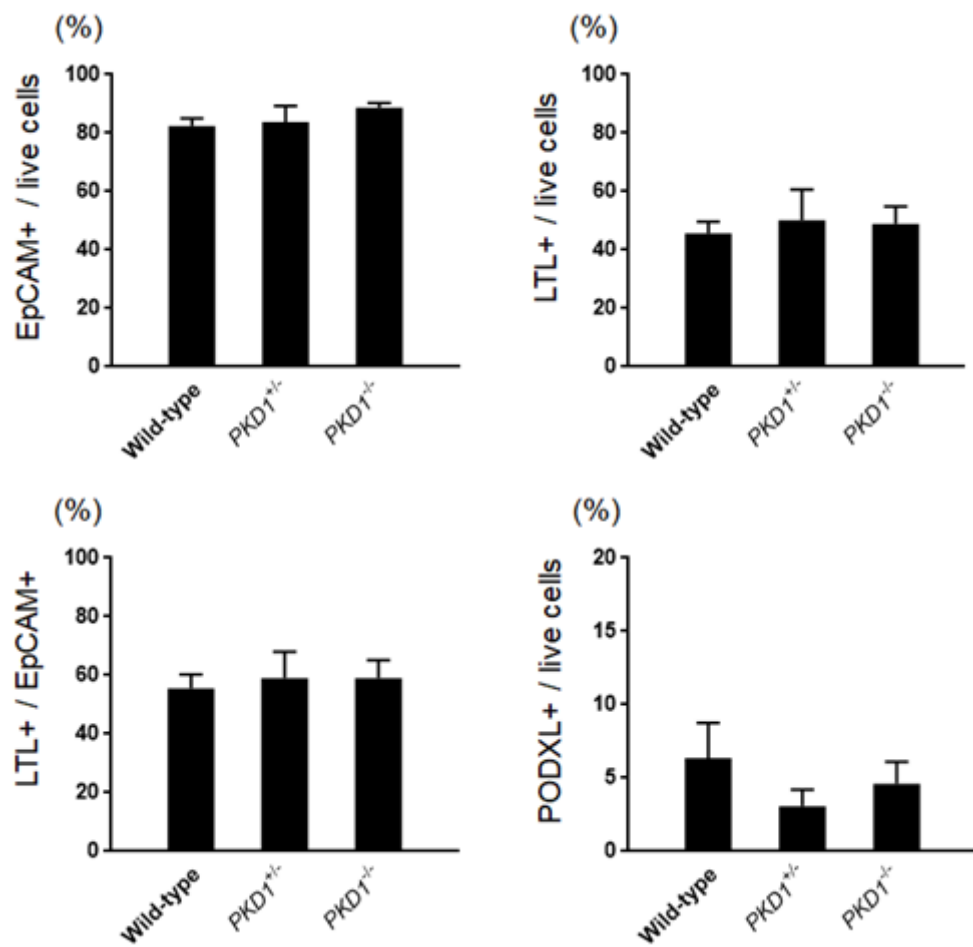


図 8 腎臓オルガノイドを構成する細胞のフローサイトメトリーによる割合の評価

EpCAM : 尿細管マーカー、*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、podocalyxin (PODXL) : 糸球体マーカー

(n=4, mean ± SE)



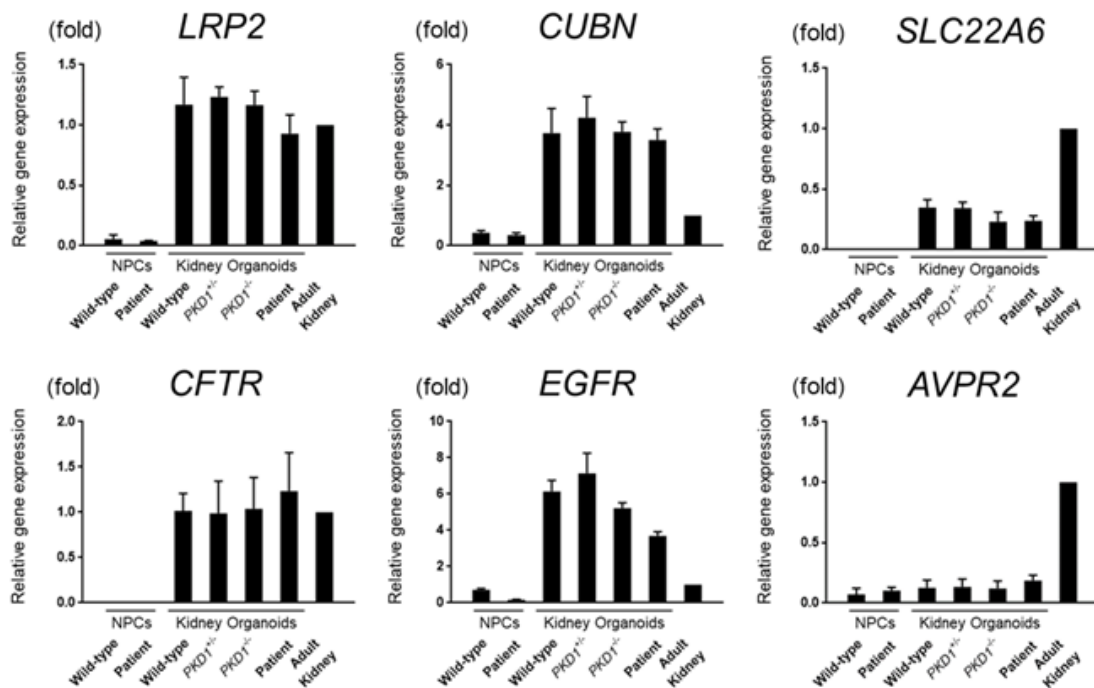


図 9 ネフロン前駆細胞(nephron progenitors; NPCs)と腎臓オルガノイドにおける近位尿細管マーカー(*LRP2*, *CUBN*, *SLC22A6*)および嚢胞形成関連遺伝子(*CFTR*, *EGFR*, *AVPR2*)の遺伝子発現量の評価(RT-qPCR)

(n=3, mean  $\pm$  SE)



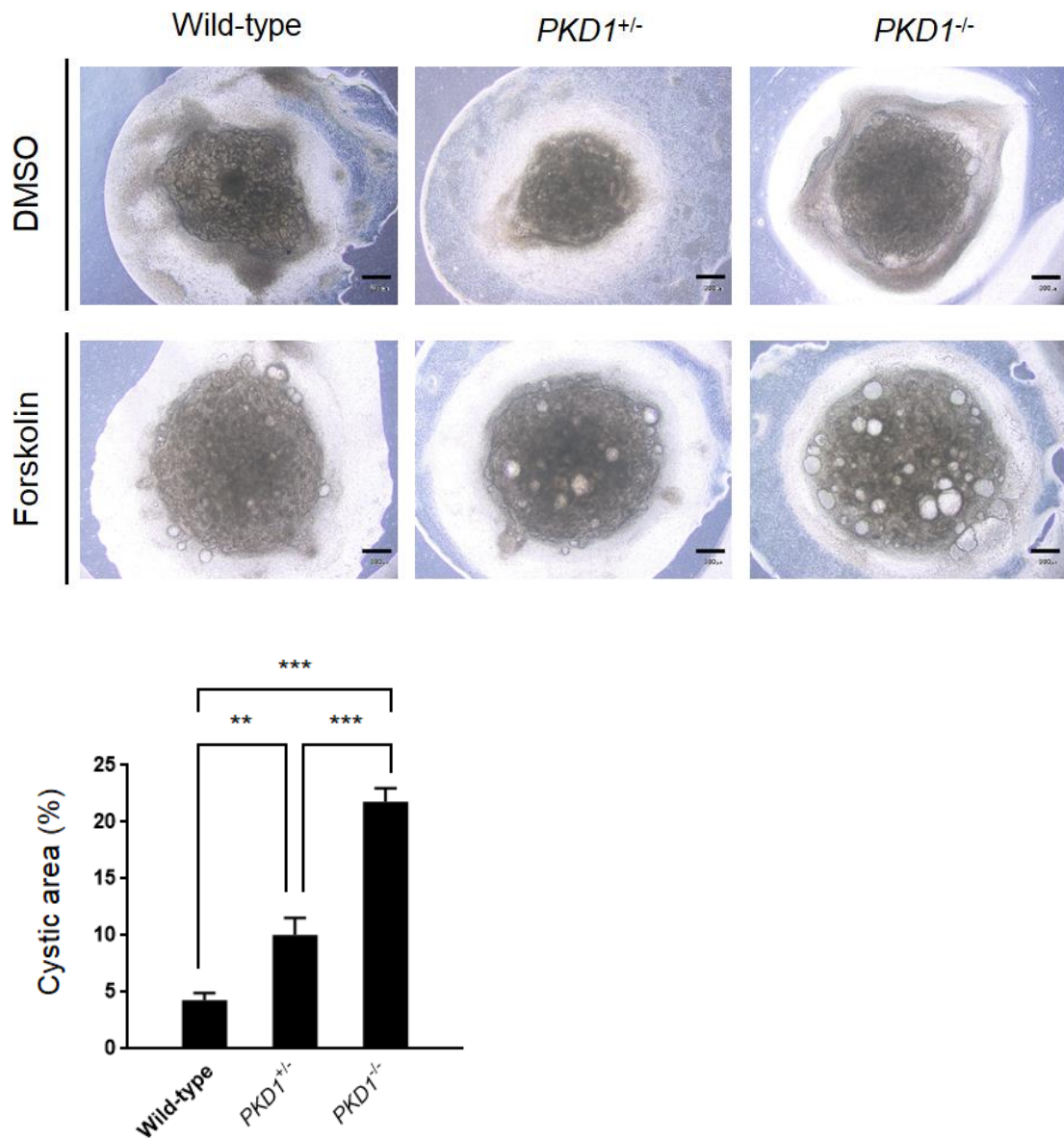


図 10 嚢胞形成実験後の腎臓オルガノイド（気相液相界面培養 17 日目）の光顕像（上）および forskolin を投与した腎臓オルガノイドの嚢胞部分の面積率(cystic area)の定量結果（下）

（上）DMSO を投与した腎臓オルガノイドでは明らかな嚢胞を生じないが、forskolin を投与した場合、腎臓オルガノイド内に嚢胞構造が再現される。

Forskolin を投与した場合、野生型の腎臓オルガノイドでも嚢胞構造を生じるが、

*PKD1* 変異株でより顕著である。Scale bar, 300  $\mu$ m

(下) Forskolin 投与後の腎臓オルガノイドでは、*PKD1* の遺伝子型に応じて、*PKD1* ヘテロ変異株および *PKD1* ホモ変異株において、有意な嚢胞面積率(cystic area)の増加を認める。

\*\*p <0.005, \*\*\*p <0.001 (n=12, mean  $\pm$  SE)

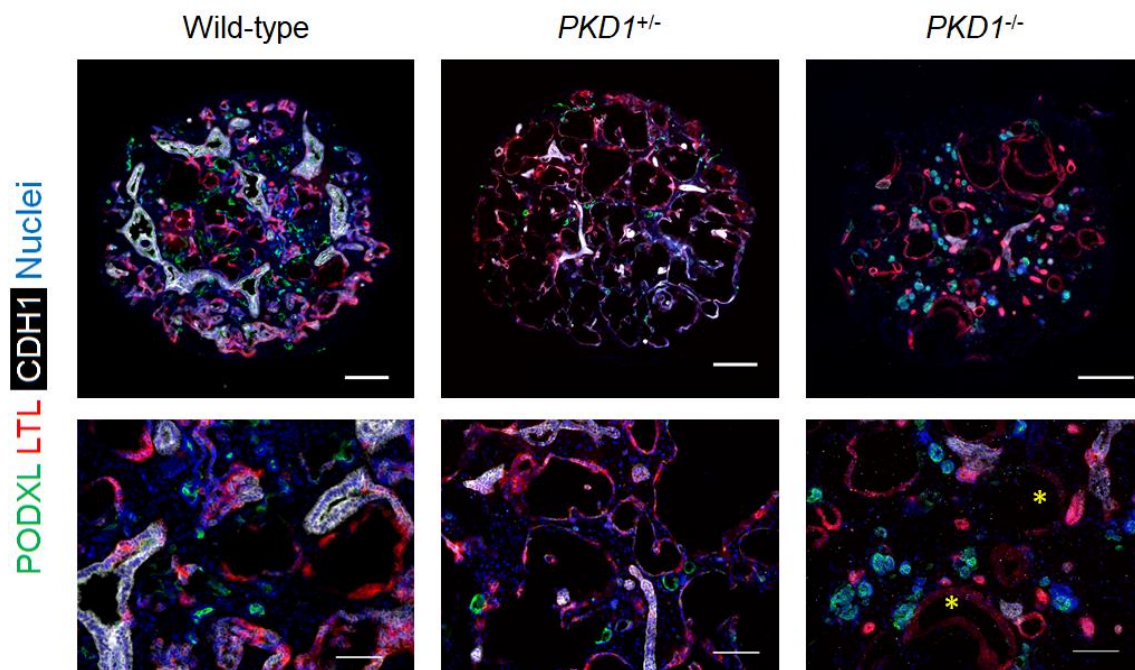


図 11 嚢胞形成後の腎臓オルガノイド（気相液相界面培養 17 日目）の免疫染色像

嚢胞は主に LTL 陽性の近位尿細管に由来すると考えられる。一部に LTL の染色性が低下した嚢胞を認める（アスタリスク）。

podocalyxin (PODXL) : 糸球体マーカー、*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、CDH1 (E-cadherin) : 遠位尿細管マーカー、Scale bar, 300  $\mu\text{m}$

(上)、100  $\mu\text{m}$  (下)

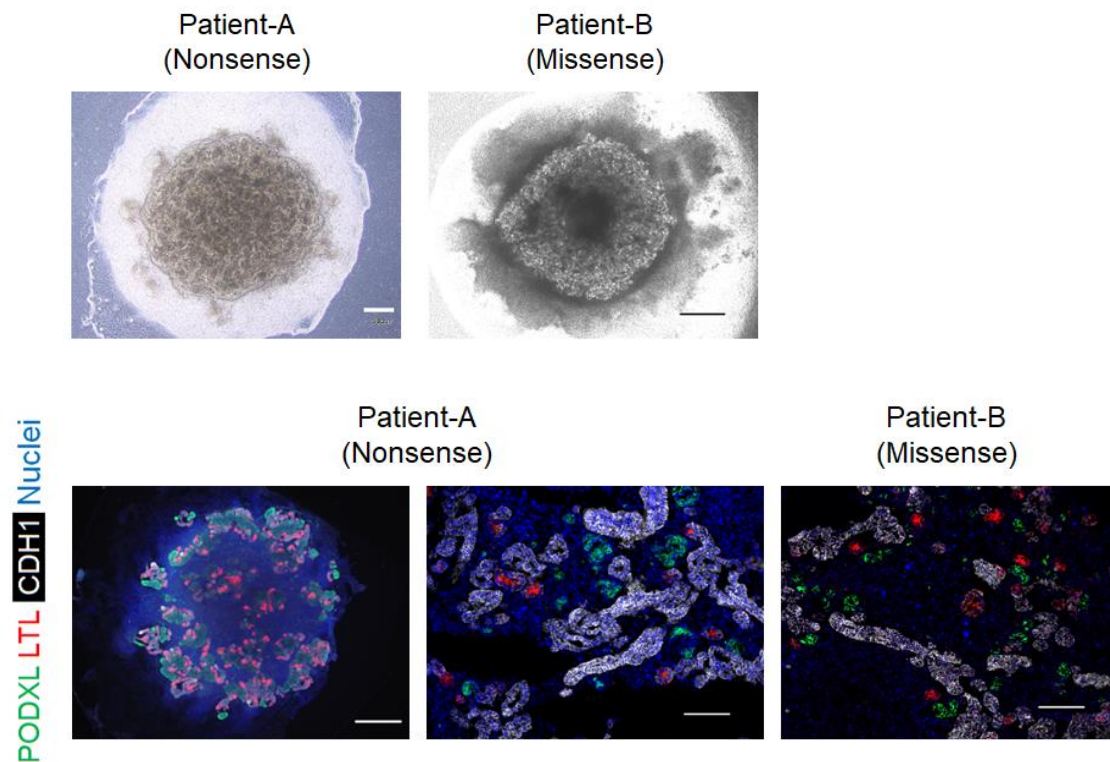


図 12 ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から分化誘導した腎臓オルガノイド（気相液相界面培養 10 日目）の光顕像（上）および免疫染色像（下）

（上）*PKD1* ゲノム編集株と同様に、ADPKD 患者株から分化誘導した腎臓オルガノイドにおいても自発的な嚢胞形成は明らかでない。Scale bar, 300  $\mu\text{m}$ （左）、500  $\mu\text{m}$ （右）

（下）ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイド内に糸球体や尿細管などのネフロン構造が形成されるが、嚢胞構造は認めない。

Podocalyxin (PODXL) : 糸球体マーカー、*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、CDH1 (E-cadherin) : 遠位尿細管マーカー、Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ （左）、100  $\mu\text{m}$ （中央および右）

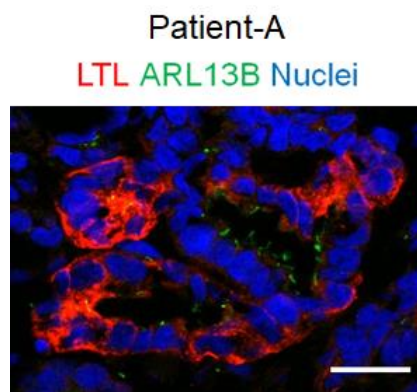


図 13 ADPKD 患者株由来腎臓オルガノイドの近位尿細管における一次繊毛の形成の確認

LTL 陽性の近位尿細管細胞の頂端膜側に、抗 ARL13B 抗体で染色される一次繊毛を認める。

*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、ARL13B : 一次繊毛マーカー、Scale bar, 50  $\mu$ m

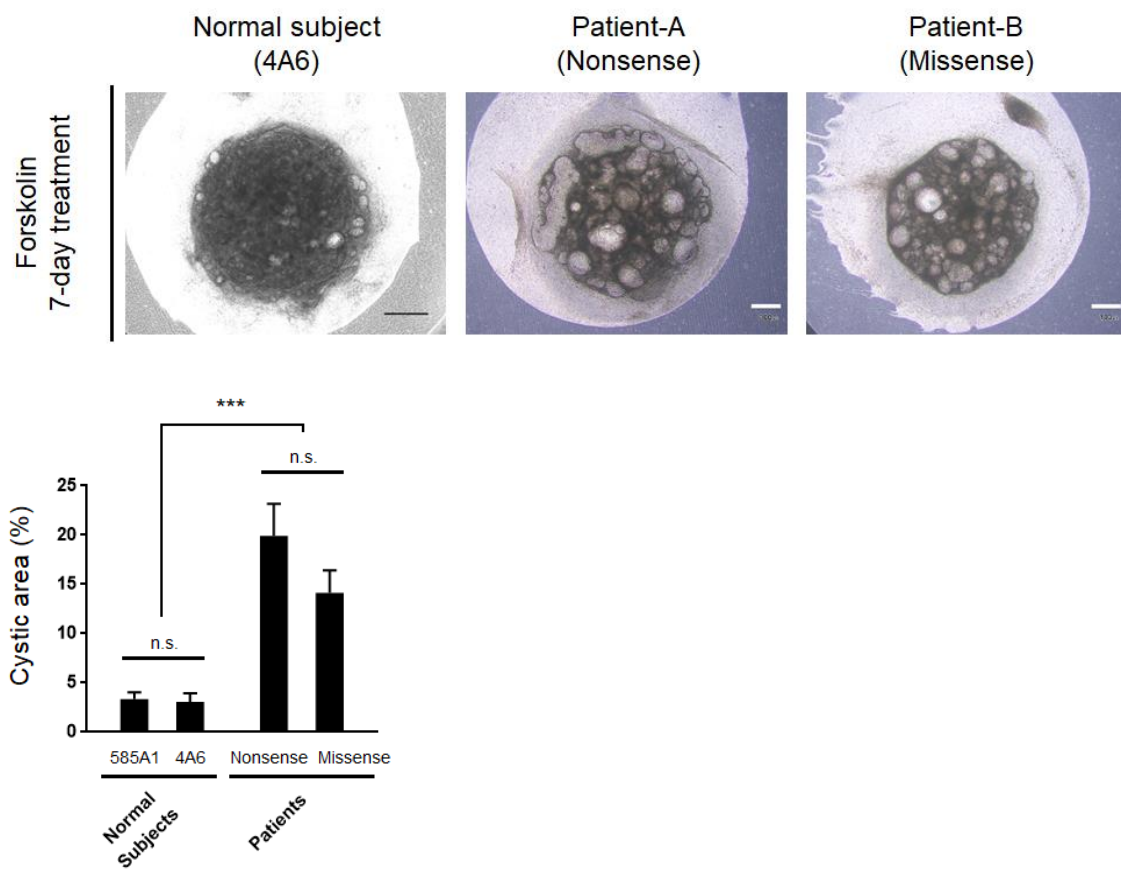


図 14 健常者および ADPKD 患者由来ヒト iPS 細胞株から分化誘導した腎臓オルガノイドにおける囊胞形成後の光顕像（上）および囊胞部分の面積率(cystic area)の定量結果（下）

（上）健常株でも囊胞構造を生じるが、ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドでより顕著である。Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ （左）、300  $\mu\text{m}$ （中央および右）

（下）ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドでは健常株と比較して、有意な囊胞面積率(cystic area)の増加を認める。

n.s. not significant, \*\*\*p < 0.001 (n=7, mean  $\pm$  SE)



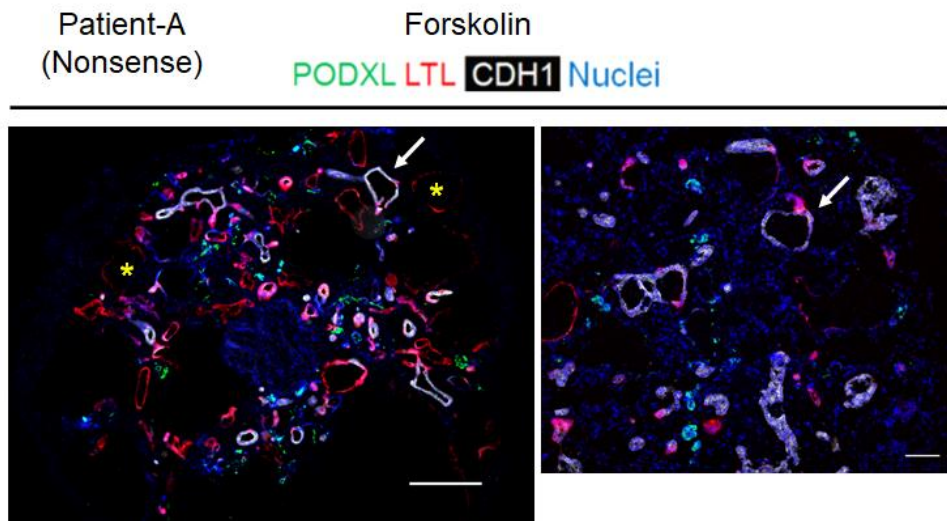


図 15 嚢胞形成後（気相液相界面培養 17 日目）の ADPKD 患者株由来腎臓オルガノイドの免疫染色像

一部 CDH1 陽性の遠位尿細管由来の嚢胞を認めるが（矢印）、大部分は LTL 陽性の近位尿細管から生じた嚢胞である。一部に LTL の染色性が低下した嚢胞を認める（アスタリスク）。

podocalyxin (PODXL) : 糸球体マーカー、*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、CDH1 (E-cadherin) : 遠位尿細管マーカー、Scale bar, 500  $\mu\text{m}$  (左)、100  $\mu\text{m}$  (右)

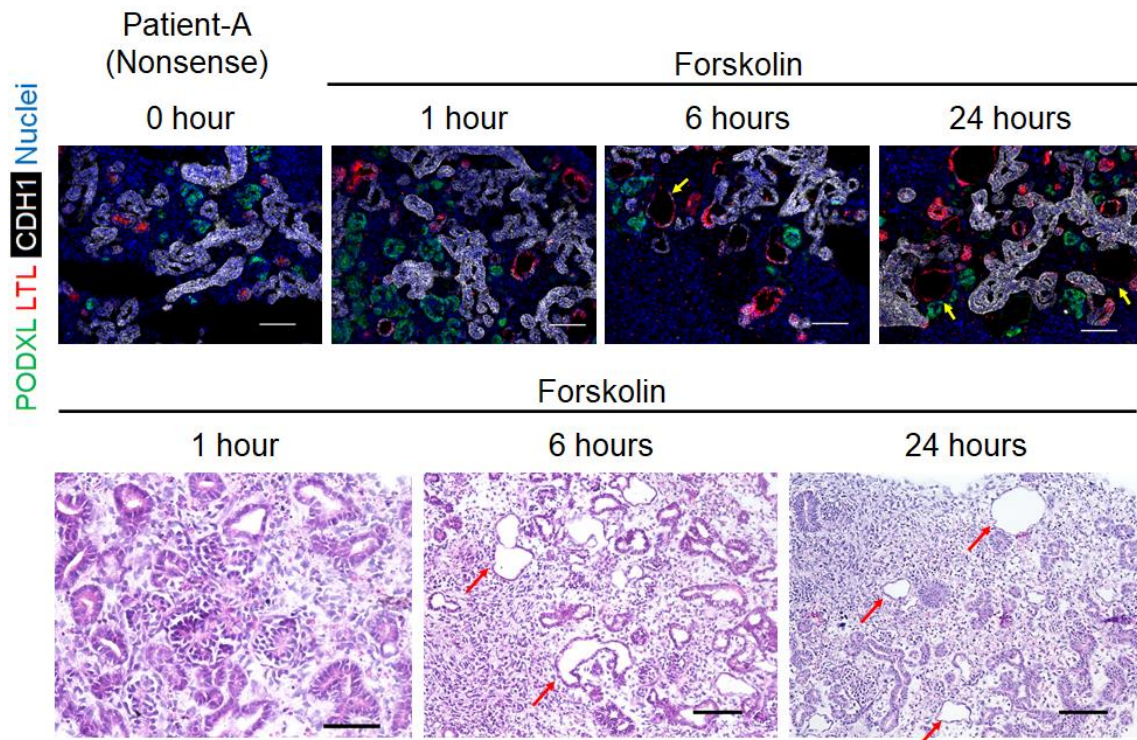


図 16 ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドにおける嚢胞形成の経時的変化の免疫染色（上）およびヘマトシキリン・エオジン染色（下）による評価

Forskolin 投与 1 時間後の早期に、LTL 陽性の近位尿細管で内腔拡張が認められる。Forskolin 投与 6 時間後には、拡張した尿細管の一部で扁平化した上皮細胞が観察される（矢印）。

podocalyxin (PODXL) : 糸球体マーカー、*Lotus tetragonolobus* lectin (LTL) : 近位尿細管マーカー、CDH1 (E-cadherin) : 遠位尿細管マーカー、Scale bar, 100 μm



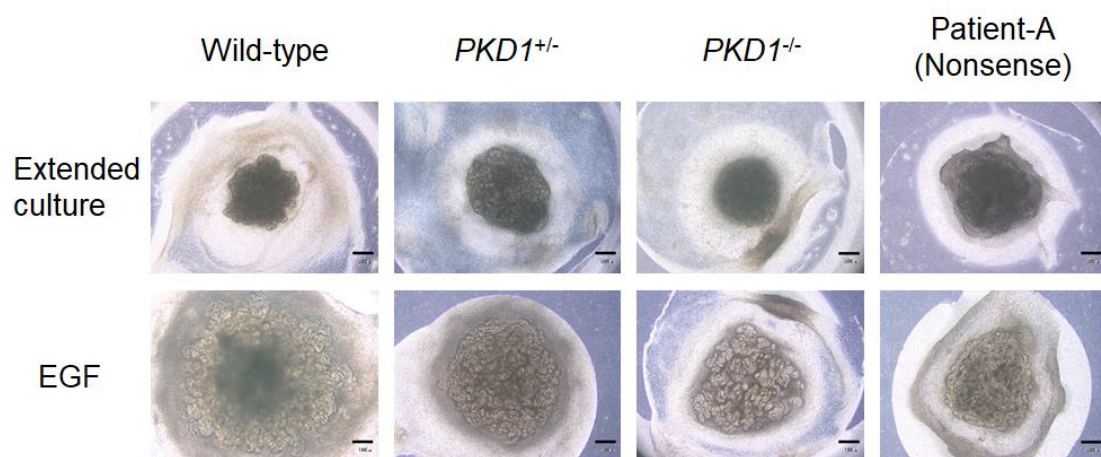


図 17 Forskolin 以外の嚢胞形成条件の検討 1

培養期間の延長（上段）（左から、気相液相界面培養 40 日目、30 日目、33 日目、30 日目）、または EGF 投与（下段）（気相液相界面培養 17 日目）を行った腎臓オルガノイドの光顕像。*PKD1* ゲノム編集株および ADPKD 患者株由来のいずれの腎臓オルガノイドも、明らかな嚢胞形成を認めない。

Scale bar, 300  $\mu$ m

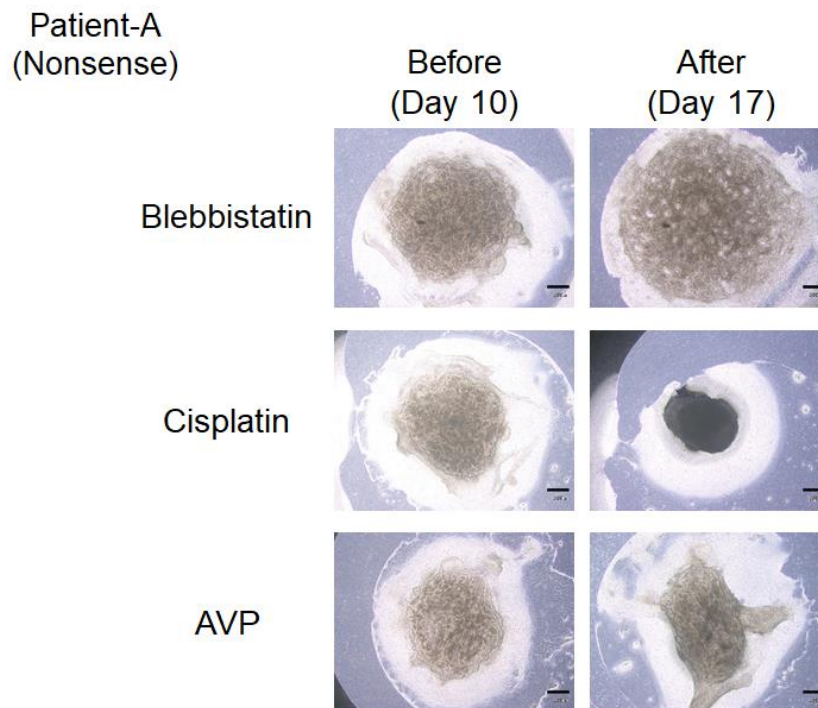
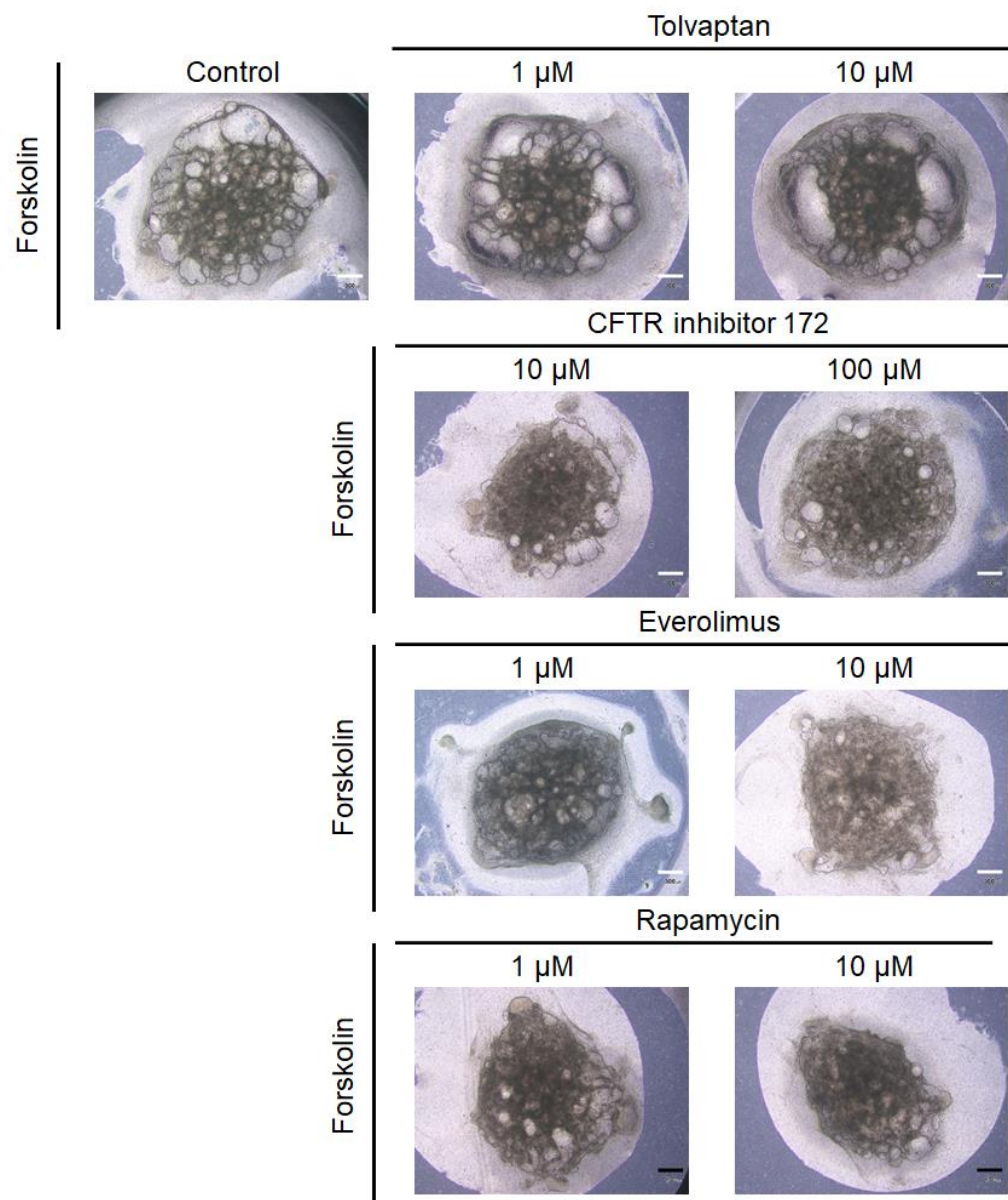


図 18 Forskolin 以外の嚢胞形成条件の検討 2

ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドにおいて、blebbistatin の投与後に腎臓オルガノイド内に嚢胞様構造の出現を認めた。Cisplatin や arginine vasopressin (AVP)の投与では、嚢胞構造は再現されなかった。

Scale bar, 300  $\mu$ m



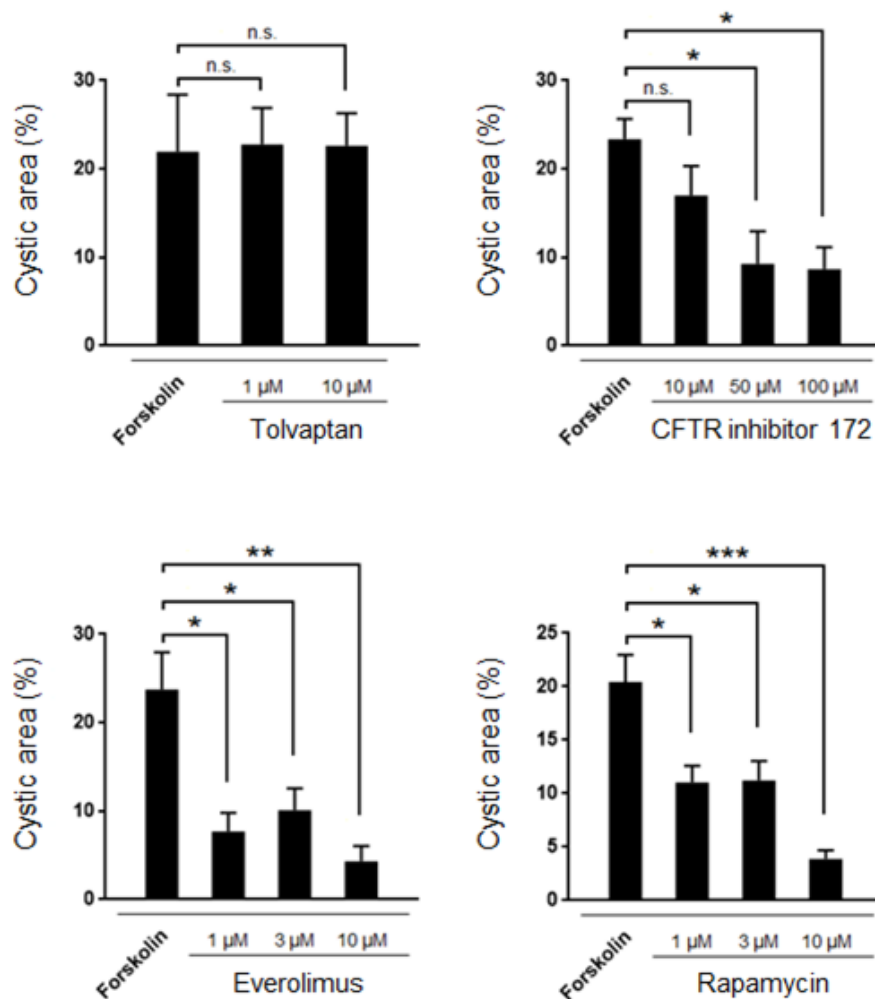


図 19 ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドを用いた嚢胞形成抑制実験

薬剤投与後（気相液相界面培養 17 日目）の腎臓オルガノイドの光顕像（前頁）

および嚢胞部分の面積率(cystic area)の定量結果

Tolvaptan による嚢胞の増大抑制効果は認めなかったが、CFTR inhibitor 172、

everolimus、rapamycin により、有意な cystic area の減少を認めた。

Scale bar, 300 μm

n.s. not significant, \*p < 0.05, \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.001 (n=3, mean ± SE)

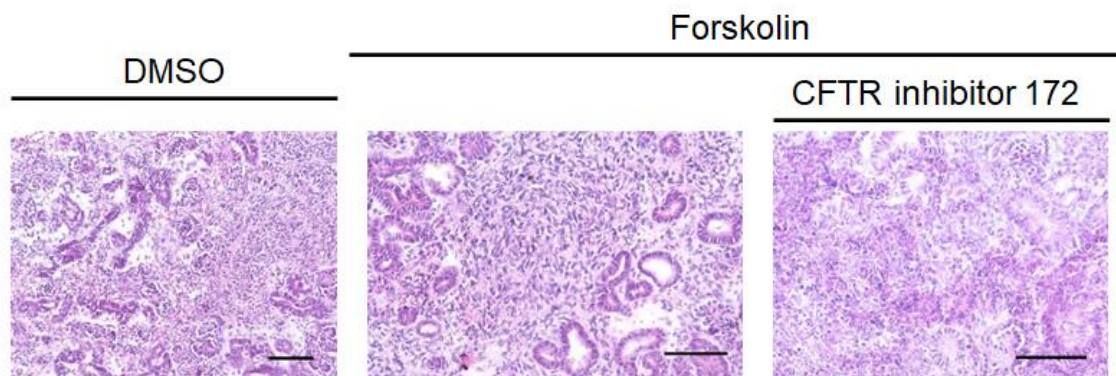


図 20 CFTR 阻害薬の併用が forskolin による尿細管拡張に与える影響の評価

DMSO のみを投与した ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイド（左）。CFTR 阻害薬の併用により、forskolin 投与後早期（1 時間）の尿細管拡張（中央）が抑制される（右）（ヘマトキシリン・エオジン染色）。

Scale bar, 100  $\mu$ m

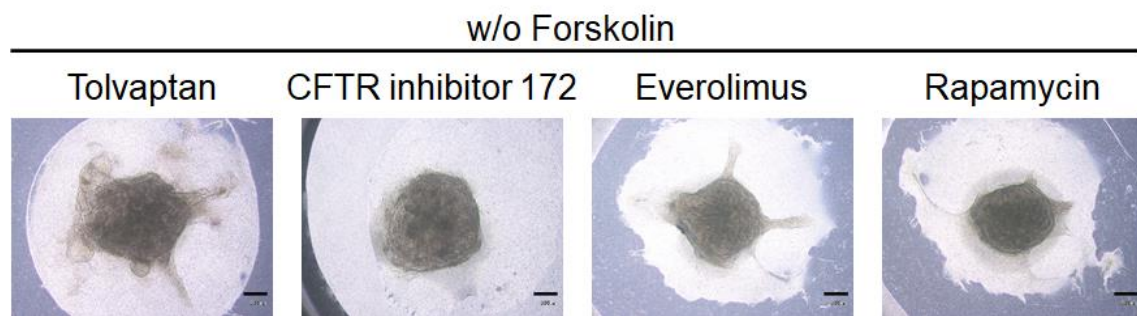


図 21 ADPKD 患者株由来の腎臓オルガノイドに対する薬剤投与後の光顕像

Scale bar, 300  $\mu$ m

表 1. 本研究で用いたプライマー

ゲノム編集の解析に用いたプライマー

Gene name	Primer Sequence (5'-3')
<i>PKD1</i> (genomic DNA)	CCAGAGGAGGACGGCTTCT
	GAGAGCCGGACACTCACAG
<i>PKD1</i> (cDNA)	CGTCCATTGTGGGTAGCAAT
	TCTCTGTCTTCTCCCCAGGA

RT-qPCR に用いたプライマー

Gene name	Primer Sequence (5'-3')
<i>hGAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>hPKD1</i>	AGGACTACGAGATGGTGGAGTT
	CATCCCTTCAAAGCGGACTT
Intact <i>hPKD1</i>	AGATGAAGACCTGATCCAGC
	TCTCTGTCTTCTCCCCAGGA
<i>hLRP2</i>	CCTGCTCTGCCCAAGCTGCC
	GCAGTCTCAGGTCCAAAACCAGACA
<i>hCUBN</i>	TTCTTACGGGGTCTGCTCAA
	GCAAGCCTTGGAATTTTCTCTCA
<i>hCFTR</i>	AAAAGGCCAGCGTTGTCTCC
	AAACATCGCCGAAGGGCATT
<i>hEGFR</i>	TTCCTCCCAGTGCCTGAA
	GGGTTCAGAGGCTGATTGTG
<i>hSLC22A6</i>	CTGTATCCCACAATGATCC
	GGCAGTCATGCTCACCAGT
<i>hAVPR2</i>	GTCGCACCTATGTCACCTGG
	ACTGGCATGAATCTCCCGGA

表 2. 本研究で使用した一次抗体およびレクチン

Antibody	Manufacturer	Cat. No	Dilution	Analysis
PODOCALYXIN	R&D	AF1658	1:100	IF, FC
biotinylated LTL	Vector laboratories	B-1325	1:200	IF, FC
CDH1	BD Bioscience	610181	1:100	IF
ARL13B	Proteintech	17711-1-AP	1:1,000	IF
EpCAM-APC	Miltenyi Biotech	130-113-260	1:50	FC
anti-mouse IgG <sub>1k</sub> -APC	Thermo Fisher Scientific	17-4714-81	1:50	FC

IF: Immunofluorescence, FC: Flow cytometry

LTL: *Lotus tetragonolobus* lectin