

学位論文抄録

PKD1-dependent renal cystogenesis in human induced pluripotent stem cell-derived
ureteric bud/collecting duct organoids
(*PKD1* 変異を有するヒト iPS 細胞由来尿管芽/集合管オルガノイドにおける腎嚢胞再現)

倉岡将平

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻
小児科学

指導教員

中村 公俊 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 小児科学

西中村 隆一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻 腎臓発生学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common hereditary kidney disease leading to renal failure, wherein multiple cysts are formed in renal tubules and collecting ducts derived from distinct precursors: the nephron progenitor and ureteric bud (UB), respectively. Recent progress in induced pluripotent stem cell (iPSC) biology has enabled cyst formation in nephron progenitor-derived human kidney organoids lacking PKD1 and PKD2, the major causative genes for ADPKD. However, cyst formation in UB organoids has not been achieved, despite the prevalence of collecting duct cysts in ADPKD patients.

Methods: We deleted PKD1 in human iPSCs using CRISPR-Cas9 technology and differentially induced the cells toward nephron or UB organoids. We then investigated cyst formation in both types of kidney organoid. We also examined cyst formation in UB organoids generated from ADPKD patient-derived iPSCs.

Results: As observed in nephron organoids, cysts were formed in UB organoids with homozygous PKD1 mutations upon cAMP stimulation, and to a lesser extent, in heterozygous mutant organoids. Arginine vasopressin receptor 1A was expressed in UB organoids, and some homozygous mutant organoids responded to vasopressin to form cysts. Furthermore, UB organoids generated from ADPKD patient-derived iPSCs with a heterozygous missense mutation showed cystogenesis upon cAMP stimulation.

Conclusions: We demonstrated cyst formation in PKD1 mutant UB organoids, as well as those derived from an ADPKD patient. Our findings will serve as a valuable basis for elucidating the mechanisms of ADPKD.

学位論文抄録

[背景]

常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は最も頻度の高い遺伝性腎疾患であり、腎嚢胞の進行によって 60 歳までには約半数が腎不全に至る。ADPKD では糸球体から尿管、集合管までの全ての領域から嚢胞が形成されるが、発生学的には糸球体・尿管と集合管はそれぞれネフロン前駆細胞と尿管芽という異なる前駆細胞集団から派生する。近年の幹細胞学の進歩により、ADPKD の主な原因遺伝子である PKD1 や PKD2 を欠損したヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を経てネフロンオルガノイドを誘導し、尿管嚢胞を再現することが可能になっている。しかし、ADPKD においては集合管嚢胞が主体と言われているにもかかわらず、尿管芽/集合管由来の嚢胞再現はまだ達成されていない。

[方法]

CRISPR-Cas9 技術を用いてヒト iPS 細胞の PKD1 遺伝子に変異を導入した。PKD1 変異 iPS 細胞からネフロンオルガノイドと尿管芽オルガノイドをそれぞれの方法によって誘導し、嚢胞形成について検討した。また、PKD1 のヘテロ変異を持つ ADPKD 患者から樹立された iPS 細胞からも尿管芽オルガノイドを誘導し、嚢胞形成について検討を行った。

[結果]

ネフロンオルガノイドにおける報告と同様に cAMP 活性化剤の添加によって、PKD1 ホモ変異を有する尿管芽オルガノイドから嚢胞が形成された。また PKD1 ヘテロ変異を有する尿管芽オルガノイドでも一部に嚢胞形成が観察された。ネフロンオルガノイドと異なり、PKD1 が正常な尿管芽オルガノイドからは嚢胞が形成されなかった。また、バゾプレッシン受容体 (AVPR1A) は尿管芽オルガノイドでのみ発現していることが確認され、PKD1 ホモ変異を有する尿管芽オルガノイドのみがバゾプレッシン添加に反応して嚢胞を形成した。さらに、PKD1 ヘテロ変異を持つ ADPKD 患者由来 iPS 細胞から誘導された尿管芽オルガノイドからも嚢胞が形成された。

[考察]

PKD1 変異を有する尿管芽オルガノイドにおいて嚢胞を再現することができた。尿管芽オルガノイドはバゾプレッシンに反応して嚢胞を形成するため、より臨床に近いモデルになる可能性がある。また cAMP 刺激への反応性も異なっており、ネフロンオルガノイドでは PKD1 が正常な場合でも軽度嚢胞が形成されたのに対し、正常な尿管芽オルガノイドでは全く形成されなかった。その結果として、尿管芽オルガノイドでのみ、ヘテロ変異とコントロールの間に有意な差を示すことができた。CRISPR-Cas9 によって樹立された PKD1 ヘテロ変異 iPS 細胞だけでなく、ADPKD 患者由来の iPS 細胞からも腎嚢胞を再現することができており、PKD1 ヘテロ変異によって嚢胞を生じる ADPKD の病態を、ネフロンオルガノイドより正確に反映している可能性が示唆された。

[結論]

PKD1 変異を導入した iPS 細胞及び患者由来の iPS 細胞から誘導した尿管芽オルガノイドにおいて嚢胞を再現することができた。よってこれらの iPS 細胞由来尿管芽オルガノイドはヒトの ADPKD モデルとして有用であると考えられる。