

ヒト多能性幹細胞由来腎臓オルガノイドを用いた
近位尿細管細胞の成熟化速度制御機構の解明

佐原 義基

目次

要旨	4
略語表	6
第一章 序論	8
1-1: 腎疾患と薬剤性腎障害	
1-2: 腎臓発生と腎臓オルガノイドについて	
1-3: 近位尿細管成熟化	
1-4: シングルセル解析	
1-5: 本研究の目的	
第二章 材料と方法	14
2-1: ヒト多能性幹細胞からの腎臓オルガノイドの分化誘導	
2-2: シングルセル RNA シーケンスのための腎臓オルガノイドからの単一細胞分離	
2-3: ライブラリー調製, シーケンス, データ前処理	
2-4: データ処理とクラスタリング	
2-5: サブクラスタリング	
2-6: 腎臓系列細胞における Pseudotime Cell Trajectory (疑似時間軸細胞経路解析)	
2-7: 近位尿細管細胞 (PT 細胞) における疑似時間細胞の軌跡	
2-8: DEG 解析と IPA 解析	
2-9: 腎臓オルガノイドからの LTL 陽性細胞の分離	
2-10: qPCR とヒートマップ	
2-11: 免疫染色	
2-12: PPAR α アゴニスト処理腎臓オルガノイドサンプルの scRNA-seq 解析	
2-13: 腎臓オルガノイドと腎細胞アトラス (KCA) 胎児腎臓の統合	
2-14: 統合データを用いた疑似時間の生成	
2-15: 疑似時間の外挿	
2-16: 透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope: TEM)	
2-17: デキストラン取り込みアッセイ	
2-18: シスプラチン投与腎臓オルガノイドのフローサイトメトリー解析	
2-19: シスプラチンで処理した腎臓オルガノイドの近位尿細管における γ H2AX 陽性細胞の 定量化	

第三章 結果	22
3-1: 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化検討 (MET 刺激のタイミングの検討)	
3-2: 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化検討 (MET 刺激後の FGF9 処置期間の検討)	
3-3: 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化後の遺伝子発現量解析	
3-4: 腎臓オルガノイドのクラスタリング解析	
3-5: 疑似時間軸細胞経路解析による時間軸の作製	
3-6: 近位尿細管細胞の成熟速度調節因子の抽出	
3-7: 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いた遺伝子発現量の比較	
3-8: 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いたタンパク質再吸収能の評価	
3-9: 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いたシスプラチン毒性評価	
3-10: 公共データ (胎児腎・成人腎) との成熟度の比較	
3-11: 近位尿細管成熟化処置におけるネフロンに与える影響について	
 第四章 考察	 54
 引用文献	 60
 謝辞	 64

要旨

慢性腎臓病（Chronic kidney disease: CKD）は腎機能が慢性的（3 か月以上）に低下している状態を指す総称であり，進行すると透析を要する末期腎不全の原因となるだけでなく，心血管疾患（Cardiovascular disease: CVD）の発症や死亡のリスクファクターである。全世界で8億5千万人以上が罹患していると推定され，高齢化の進展に伴い，その罹患率は増加すると予想されているため，このCKDに対する治療薬の開発が急務となっている。ヒト多能性幹細胞（human induced pluripotent stem cells: hiPSCs）由来の腎臓オルガノイドはヒト臓器に近い3次元構造を有しており，臨床で腎毒性を示す化合物であるシスプラチン（cis-diamminedichloro-platinum(II): CDDP）による毒性や，近位尿細管におけるアルブミンの再吸収などの，ヒトの腎臓の機能を *in vitro* で再現が可能であるため，新薬開発の有用なツールとして期待されている。しかし，現在 hiPSCs 由来の腎臓オルガノイドは未熟性が原因でオルガノイドを用いた腎臓での薬物動態のすべてを再現することは困難である。

本研究では，腎臓オルガノイドを対象に経時的なシングルセル RNA シーケンシングを実施することで，腎臓オルガノイド内に Heterogeneity が存在することが明らかとなり，腎疾患の病態中心の1つである近位尿細管細胞の成熟速度における細胞の Heterogeneity についても明らかにした。また，成熟速度の遅い細胞と成熟速度の速い細胞で異なる発現を示す遺伝子上流調整因子の探索により，急速に成熟する細胞で PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) シグナル経路の活性が高いことを見出した。PPAR α 経路の活性化処置（CP775146: PPAR α 活性化剤, 9-シスレチノイン酸: RXR α 活性化剤）を行った腎臓オルガノイドは，近位尿細管の成熟に関連する遺伝子を誘導し，タンパク質の取り込み能力およびシスプラチンによる腎毒性への感受性を向上させる可能性が示された。一方で，PPAR α 経路を阻害する化合物処置（GW6471: PPAR α 阻害剤, HX531: RXR α 阻害剤）により，上記の近位尿細管成熟関連の遺伝子の発現を低下させ，デキストランの近位尿細管への取り込みは低下したことから，PPAR α 経路は近位尿細管細胞の成熟化速度を促進するだけでなく，成熟化そのものに必要であると示唆された。また，PPAR α 経路の活性化は，近位尿細管細胞以外の他のネフロン領域（ポドサイト，遠位尿細管）への影響は示さなかったことから，近位尿細管の成熟速度にのみ影響を与える可能性が示された。しかし，この近位尿細管成熟化オルガノイドの近位尿細管の成熟度は，現状のオルガノイドの成熟度に比べて高いものの，ヒト成人の腎臓の近位尿細管の成熟度には達していなかった。

以上のことから，本研究で行った，オルガノイド内での成熟速度の細胞の Heterogeneity の解析は，オルガノイドの成熟度を増加させる技術を開発できる可能性があることを示唆している。一方で，本研究での近位尿細管細胞の成熟速度を促進する方法は，ヒト成人の腎臓の成熟度に達していないため，生態模倣システム（Microphysiological systems: MPS）な

どの他の成熟化促進方法と組み合わせることで、近位尿細管の機能をより高めることができ、腎毒性薬物のスクリーニングや腎疾患に対する創薬に利用されることが期待される。

略語表

ABCB1: ATP binding cassette subfamily B member 1
ADPKD: Autosomal dominant polycystic kidney disease
AIM: Anterior intermediate mesoderm
AKI: Acute kidney injury
AveIP: Average image projection
CDDP: cis-diamminedichloro-platinum (II)
CDH6: Cadherin 6
CITED1: Cbp/P300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1
CKD: Chronic kidney disease
CLCNKB: Chloride voltage-gated channel Kb
CM: Cap mesenchyme
CPT1: Carnitine palmitoyl transferase 1
CUBN: Cubilin
CVD: Cardiovascular disease
DBD: DNA-binding domain
DEGs: Differentially expressed genes
DIKI: Drug-induced kidney injury
DSB: Double-strand break
ECAD: E cadherin
ESKD: End-stage kidney disease
EYA1: Eyes absent transcriptional coactivator and phosphatase 1
FAO: Fatty acid beta-oxidation
hiPSCs: human induced pluripotent stem cells
HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
IM: intermediate mesoderm
IRX1: Iroquois homeobox 1
ITGA8: Integrin subunit alpha 8
JAG1: Jagged canonical notch ligand 1
KCA: Kidney Cell Atlas
KIM-1: Kidney injury molecule-1
LHX1: LIM homeobox 1
LRP2: LDL receptor-related protein 2
LTL: Lotus tetragonolobus lectin

MACS: Magnetic cell sorting
MAL: Myelin and lymphocyte protein
MECOM: MDS1 and EVI1 complex locus
MET: mesenchyme-to-epithelial transition
MIP: Maximum image projection
MM: Metanephric mesenchyme
MPS: Microphysiological systems
MST: Minimum spanning tree
NPHS1: Nephritin
NPHS2: Podocin
OLFM3: Olfactomedin 3
PAX2: Paired box gene 2
PCA: Principal component analysis
PIM: Posterior intermediate mesoderm
PODXL: Podocalyxin like
POU3F3: POU class 3 homeobox 3
PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPRE: PPAR response element
PTA: Pre tubule aggregate
PTPRO: Protein tyrosine phosphatase receptor type O
RV: Renal vesicle
RXR α : retinoid X receptor alpha
SCFAs: short-chain fatty acids
scRNA-seq: single cell RNA sequencing
SIX1: Six oculis homeobox homolog 1
SIX2: Six oculis homeobox homolog 2
SLC: Solute carrier
SSB: S-shaped body
SumIP: Sum image projection
TEM: Transmission electron microscope
TMEM100: Transmembrane protein 100
tSNE: t-distribution Stochastic Neighbor Embedding
UMAP: Uniform manifold approximation and projection

第一章

序論

第一章 序論

1-1: 腎疾患と薬剤性腎障害

慢性腎臓病（Chronic kidney disease: CKD）は腎機能が慢性的（3 か月以上）に低下している状態を指す総称であり，進行すると透析を要する末期腎不全の原因となるだけでなく，心血管疾患（Cardiovascular disease: CVD）の発症や死亡のリスクファクターである。全世界で 8 億 5 千万人以上が罹患していると推定され¹，高齢化の進展に伴い，その罹患率は増加すると予想されている。日本人の CKD 患者数は，約 1,480 万人と推計され，成人の約 7~8 人に 1 人は CKD である。透析患者数は 2023 年調査では約 34 万人となっており^{2,3}，医療経済的に大きな問題となっている。そのため，CKD に対する治療薬の開発が急務となっている。急性腎障害（Acute kidney injury: AKI）は，数時間～数日の間に急激に腎機能が低下する状態である。中でも，薬剤性腎障害（Drug-induced kidney injury: DIKI）は，AKI, CKD, 末期腎不全（End-stage kidney disease: ESKD）に関連する，頻繁に報告される有害事象である⁴。新薬開発において，前臨床プロジェクトの中止理由の 82% が安全性/毒性関連の問題によるものであり⁵，その中でも腎障害は前臨床および臨床の失敗のそれぞれ 8% と 9% を占めているため⁴，新薬開発における早期でのヒトの DIKI を予測する評価系を確立することで，開発費，開発期間を短縮することができると考えられる。

1-2: 腎臓発生と腎臓オルガノイドについて

腎臓は発生学的には中間中胚葉（intermediate mesoderm: IM）から発生し，中でも前方中間中胚葉（Anterior intermediate mesoderm: AIM）から発生する尿管芽と後方中間中胚葉（Posterior intermediate mesoderm: PIM）から発生する後腎間葉（Metanephric mesenchyme: MM）の相互作用により，ネフロン構造が形成される（図 1）。このネフロン構造の発生過程において，MM は，尿管芽の周りに間葉を凝集させ，cap mesenchyme (CM)，Pre tubule aggregate (PTA) を形成する。その後，この PTA が尿管芽からのシグナルを受け，間葉上皮移行（mesenchyme-to-epithelial transition: MET）を引き起こしながら，Renal vesicle (RV) を形成し，その後，S 字体（S-shaped body: SSB）を経てネフロン構造を形成し，尿管芽が最終的に集合管となる（図 1）。

腎臓の発生

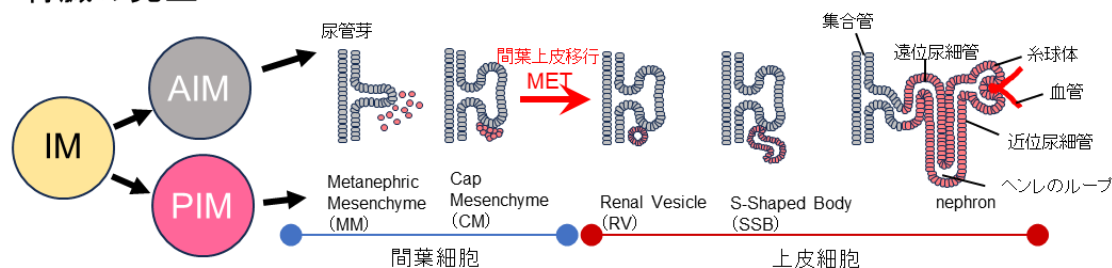


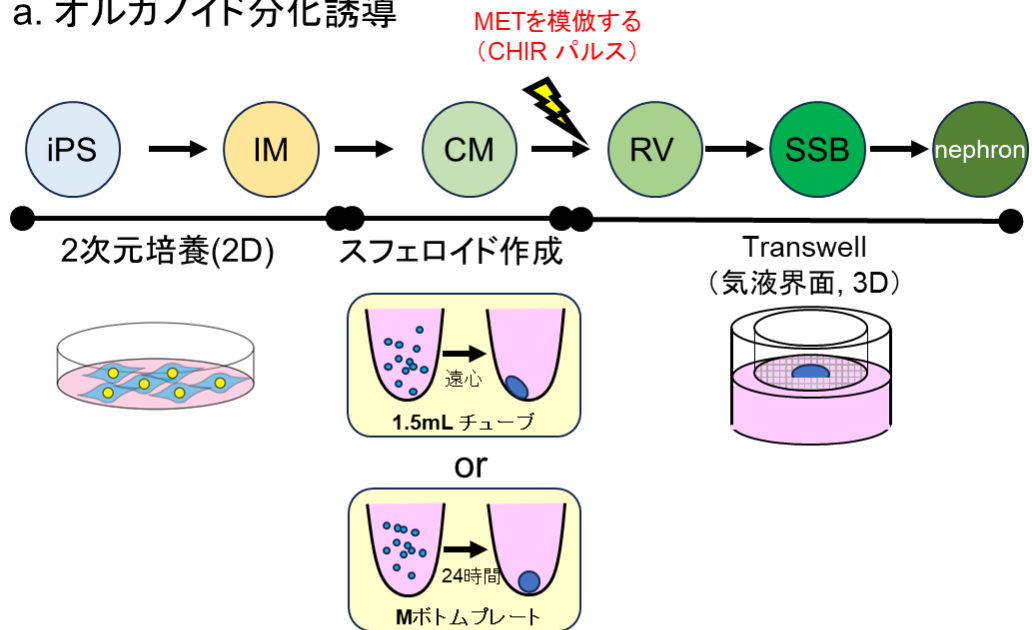
図 1 腎臓の発生の模式図

腎臓は IM から発生し, AIM と PIM に分化する。AIM 由来の尿管芽と PIM 由来の MM の相互作用により, ネフロン構造が形成される。

腎臓オルガノイドは 2015 年に初めてヒト iPS 細胞から分化誘導することで作製できることが報告され, 上述のような腎臓発生を模倣する形で分化誘導され, ネフロンと呼ばれる腎機能に重要な構造有する 3 次元組織構造体である⁶。先行研究による hiPSCs からの腎臓オルガノイドの誘導方法は, まず, IM までウェルプレートで培養したのち, その細胞からスフェロイドを形成させる (図 2a)。そのスフェロイドをトランスウェル上に移し, MET を模倣する CHIR パルス (CHIR99021 を含む培地で短時間培養する) を行うことで上皮化させ, 気液界面で培養することで腎臓オルガノイドが作製できる (図 2a)。また, hiPSCs から IM を分化する過程で, CHIR99021 の処置期間を変化させることで, AIM と PIM の存在割合を変化させることができ, 特に CHIR99021 の処置期間を 5 日間行うことで, PIM の割合が増え, ネフロンの構造体の多いオルガノイドの作製が可能である (図 2b)。

腎臓オルガノイドは, 臨床で腎毒性を示す化合物であるシスプラチンによる毒性や, 近位尿細管におけるアルブミンの再吸収などの, ヒトの腎臓の機能を *in vitro* で再現が可能である⁶。その他にも, 腎臓オルガノイドを用いた創薬研究において, シスプラチンを用いた近位尿細管障害時の再生メカニズム解析に関する報告や⁷, 線維化モデルの構築例が報告されている⁸。さらに, 常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD)^{9,10}, アルポート症候群¹¹, ネフローゼ症候群^{12,13} など, さまざまな腎疾患モデルが腎臓オルガノイドを用いて開発されている。このようなヒト病態を反映するモデルは, 有効な創薬標的の探索やヒト組織における薬剤応答性の *in vitro* における評価を可能とする有用なツールであり, 創薬研究の発展に寄与することが期待される。

a. オルガノイド分化誘導



b. CHIRとFGF9の分化誘導期間と誘導後の細胞種

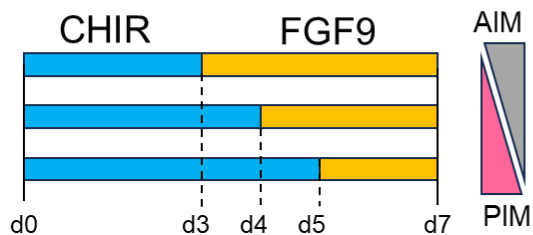


図2 腎臓オルガノイドの分化誘導プロトコール

a. 腎臓オルガノイドの分化誘導法の模式図。腎臓オルガノイドは hiPSCs から 2 次元培養により IM まで誘導したのち、その細胞を単一細胞化して 1.5mL チューブや M ボトムプレート内でスフェロイドを作製させる。その後、そのスフェロイドを transwell 上に移し、transwell の下に培地を入れることで、気液界面でオルガノイドが培養できる。Transwell に移動した直後に、MET を模倣する CHIR パルス（短期間 CHIR99021 含有培地で培養）を行うことで、CM が上皮化し RV, SSB を経てネフロンが形成される。

b. CHIR と FGF9 の分化誘導期間と誘導後の細胞種についての模式図。iPS 細胞から誘導時の最初の CHIR と FGF9 の培養期間を変化させることで、AIM と PIM の割合を変化させることができる。

1-3: 近位尿細管成熟化

AKI は、その病態の中心が近位尿細管細胞の障害であることが言われており、上述のヒトでの病態を再現するためには、近位尿細管細胞の成熟度がヒトの成熟度に近い必要がある。発生過程において、近位尿細管細胞の冊子縁の長さが長くなっていくことや^{14,15}、成熟した近位尿細管においては、尿細管の機能として重要なタンパクの再吸収能に関連したタンパク（CUBN: Cubilin, Megalin）の発現が増加していること¹⁶及び、多種多様な物質の排泄に重要な役割を果たしている Solute carrier (SLC) トランスポーターが発現していること¹⁷などがあげられる。これらの情報を指標として、*in vitro* においては、腎臓オルガノイドにシェアストレスを加えることで、近位尿細管の成熟度が向上したという報告や¹⁸、オルガノイドから単離した近位尿細管細胞を 3D チューブとして培養することで、SLC トランスポーターの発現上昇や近位尿細管の成熟度が高まっているとする報告もいくつかなされている^{19,20}。

1-4: シングルセル解析

シングルセル解析は、単一細胞着目し、個々の細胞レベルでのゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどを解析する技術であり、従来の多数の細胞をバルク集団として研究する方法と対照的な技術として発達した。中でも、シングルセル RNA シーケンス(single cell RNA sequencing: scRNA-seq)は、数千から数万の細胞について各細胞での遺伝子発現量を網羅的に計測することができるため、個々の細胞の細胞種の特定や細胞周期、分化状態などの違いについて解析することが可能である。具体的には、scRNA-seq で取得したデータを、次元圧縮による方法により、クラスタリング解析され、既存のマーカー遺伝子を確認することで、クラスターのアノテーションが可能である。また、複数の細胞から得た遺伝子発現データについて、疑似的な時間軸を作成し時系列データに再構築する解析手法が開発されている。中でも Monocle²¹は、独立成分分析により遺伝子発現データの次元圧縮を行い、2 次元平面上に投影された各細胞に対し、最小全域木 (Minimum spanning tree : MST) を用いて各点をつなぐ辺の総和が最短となる経路を探し出す。次に、細胞をつなぐ MST の長さが最長となる経路を細胞分化の主な軌跡として時系列を構築するアルゴリズムである²²。この方法を用いることで、遺伝子発現データから腎臓オルガノイド内に存在する分化過程を疑似的な時系列データに再構築し、同一細胞種における成熟度の異なる細胞集団を抽出できると考えられる。

1-5: 本研究の目的

腎臓オルガノイドを用いたバルク RNA シーケンスの結果から、同一分化誘導期間であるにもかかわらず、遺伝子発現パターンが異なる細胞集団が存在する可能性が示唆されており²³、腎臓オルガノイド内に Heterogeneity が存在することが確認されている (図 3)。そこで、我々はこの細胞の Heterogeneity に注目し、腎臓オルガノイドを経時的に scRNA-seq を

実施することで、腎疾患の病態中心の一つである近位尿細管について、急速に成熟する細胞と遅く成熟する細胞の間で発現の異なる遺伝子を制御する因子を解析し、細胞培養期間を延ばすことなく腎臓オルガノイド内の細胞の成熟速度を促進する新たな因子を特定することを目的とした。

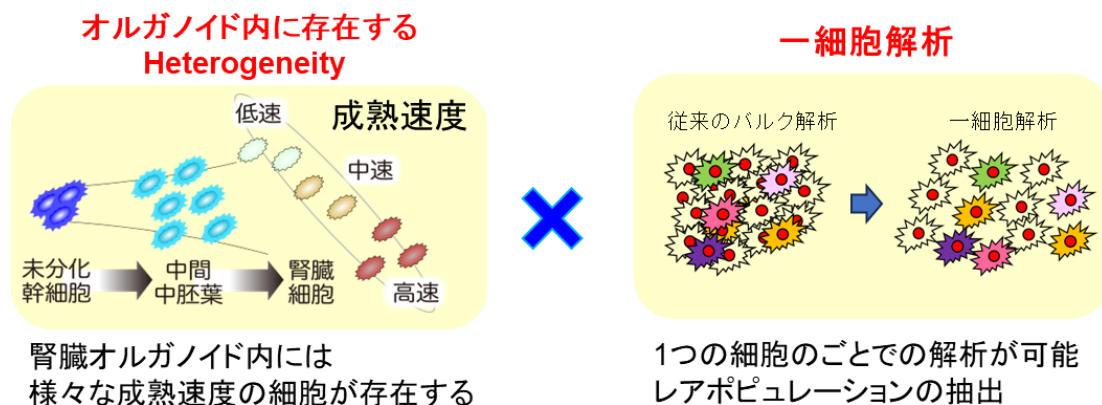


図3 オルガノイドの Heterogeneity と一細胞解析の有用性

腎臓オルガノイドは発生過程において様々な細胞へと分化し、様々な成熟速度の細胞が存在すると考えられる。また、一細胞解析技術は従来のバルク解析では抽出できなかったレアポピュレーションの抽出が可能であるため、これらの方法を組み合わせることで成熟化関連因子の抽出が可能となる。

第二章

材料と方法

第二章 材料と方法

2-1 ヒト多能性幹細胞からの腎臓オルガノイドの分化誘導

腎臓オルガノイドは hiPSC 株 CRL1502.C32 から、われわれが以前に発表したプロトコールに従って作製した⁶。具体的には、hiPSC を、1% Protein Free Hybridoma Medium II (PFHM II, GIBCO, 12040077)を添加した APEL2 (StemCell Technologies, ST-05275) (基礎培地) 中で、8 μ M CHIR99021 (TOCRIS, 4423)で 5 日間処理し、続いて FGF9 (200 ng/ml, R&D, 273-F9) とヘパリン (1 μ g/ml, Sigma, H4784) でさらに 3 日間処理した。その後、細胞を回収し、TryPLE select (GIBCO, 12563011) を用いて単細胞に解離した。PrimeSurface[®] 96M プレート (住友ベークライト) に 1 ウェルあたり 1×10^5 細胞となるように播種し、CO₂ インキュベーターで 1 日培養してスフェロイドを作製した。翌日、このスフェロイドを孔径 0.4 μ m のポリエステルメンブレン (Corning, 3450) のトランスウェルに移し、気液界面で培養した。スフェロイドは、10 μ M の CHIR99021 含有基礎培地中で 3 時間処理した後、FGF9 (200 ng/ml) とヘパリン (1 μ g/ml) でさらに 6 日間培養し、その後、培地を 1 日おきに交換しながら基礎培地でさらに 16 日間培養した。PPAR α アゴニストまたはアンタゴニスト処理については、腎臓オルガノイドを 0.3 μ M の CP775146 (PPAR α アゴニスト, TOCRIS, 4190) および 1 μ M の 9-シスレチノイン酸 (RXR α アゴニスト, abcam, ab141023) をアゴニスト処置群として、または 3 もしくは 10 μ M の GW6471 (PPAR α アンタゴニスト, TOCRIS, 4618) および 1 または 10 μ M の HX531 (RXR アンタゴニスト, TOCRIS, 3912) をアンタゴニストとして処置した。

2-2 シングルセル RNA シーケンスのための腎臓オルガノイドからの単一細胞分離

分化誘導後 15 日目, 19 日目, 23 日目, 27 日目, 31 日目の腎臓オルガノイドから単一細胞を調製するために、同じ実験回の腎臓オルガノイド 30~36 個を用いて実験を行った (15 日目は 36 個, それ以外の日は 30 個の腎臓オルガノイドを用いた)。腎臓オルガノイドを、冷活性プロテアーゼ (DPBS(+), 5 mg/mL Bacillus Licheniformis Protease (Sigma, P5380), 125 U/mL DNase (Roche, 11284932001)) 溶液にいれ、6°C で 5 分毎に 30 回ピペッティングしながら全体で 30 分間インキュベートした。各細胞懸濁液をフローサイトメトリー (FACS) 用バッファー (DPBS(-), 0.5% FBS, 2mM EDTA) + 125 U/mL DNase で希釈し、300 $\times$ g で 10 分間、4°C で遠心した後、上清を除去した。このステップを 2 回繰り返した後、懸濁液を 35 μ m フィルター付きチューブ (Falcon) に通し、単一細胞を含む細胞懸濁液を調製した。死細胞及びダブレットの除去のため、アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット (ナカライ, 15342-54) を用いて、BD FACSAria[™] II & III を実施し、単一細胞を取得した。

2-3 ライブラリー調製, シーケンス, データ前処理

前述の細胞懸濁液を 1,000cells/ μ L に調整し、Chromium Single Cell 3' reagent Kits (V3)を

用いてメーカーの指示に従ってライブラリーを調製した。ライブラリーは, Illumina NovaSeq 6000 Sequencing システムを用いて, 細胞あたり平均 60,653 リードの深度でシーケンスした。得られた FASTQ ファイルを, Cell Ranger パイプライン(10X Genomics, v.3.0.2)を用いて, ヒトゲノム (GRCh38) にマッピングした。各サンプルについて cellranger count を行った後, 全サンプルを cellranger aggr で集約し, 遺伝子発現マトリックスを作成した。

2-4 データ処理とクラスタリング

RStudio (v.3.6.1) 上の R パッケージ Seurat (v.3.1.1)²⁴ を使用して, サンプルからの前処理されたデータをさらに処理し, 個別に分析した。クラスタリングは Seurat を用いて行った。データの品質管理のため, 細胞の UMI 数, ミトコンドリア遺伝子検出率, 遺伝子検出率をバイオリンプロットで作成し, $nCount_RNA > 5000$, $percent.mt < 30$, $nFeature_RNA < 7500$ のフィルターにかけた。次に, 液滴あたりのリード数を 10000 にアライメントし, 対数スケールで正規化した。クラスタリング解析のために, 発現レベルの分散を用いて 2000 個の変動性の高い遺伝子を抽出し, サンプル全体のデータを用いて遺伝子ごとに Z スコア化した。特に, UMI カウント, ミトコンドリア遺伝子検出率, S 期スコア, G2M 期スコアに対する依存性を補正した。Z スコア化した発現量を用いて PCA を行い, JackStrawPlots と ElbowPlots から, クラスタリングのための主成分数を上位 20, 分解能を 0.4 に設定した。細胞種のアノテーションは, マーカー遺伝子とクラスター特異的遺伝子の発現を調べることで同定した。

2-5 サブクラスタリング

クラスター (以下 CL) 2, CL12, CL13 (NPC/PTA), CL4, CL5, CL9 (尿細管), CL0, 1, 7 (糸球体) についてサブクラスター解析を行った。クラスタリング解析は, 上述の全細胞をクラスタリングする方法と同様に, 目的のクラスターを抽出した後, 正規化, 高変動遺伝子の抽出, 細胞周期スコアの算出, Z スコアリング, PCA, 主成分数の選択, クラスタリング, マーカー遺伝子およびクラスター特異的遺伝子の抽出を行い, サブクラスターについてアノテーションを行った。

2-6 腎臓系列細胞における Pseudotime Cell Trajectory (疑似時間軸細胞経路解析)

腎細胞系のクラスターである CL2, CL12, CL13 (NPC/PTA), CL4, CL5, CL9 (尿細管), CL0, 1, 7 (糸球体) のサンプルを抽出し, Monocle2 (ver.2.14.0) を用いて分化の軌跡を計算した。抽出された細胞を用いて, 分散の大きい 1624 個の遺伝子について PCA を行い, 上位 10 個の主成分を用いて tSNE (t-distribution Stochastic Neighbor Embedding) を作製し, データを 2 次元に圧縮した。tSNE 密度とピークデータを用いて, $\rho > 100$, $\delta > 15$ でクラスタリングを行った結果, 8 つのクラスターが得られた。クラスター間で特定の遺伝子が検出され, q 値が 0 の 2021 遺伝子を用いて Pseudotime cell trajectory plot を作製した。遺

伝子が分化軸上に整列しているかどうかをチェックするために、既知のマーカー遺伝子を用いて分岐ヒートマップを作製した。

2-7 近位尿細管細胞（PT 細胞）における擬似時間細胞の軌跡

擬似時間細胞軌跡の PT 状態にある細胞（図 5a, c の PT 細胞）と, UMAP サブクラスターングにより近位尿細管の発生系統に注釈付けられた細胞（図 4g, h : RV, Medial SSB, PT1, PT2 クラスターの細胞）を抽出した。これらの細胞を、腎臓系列細胞における擬似時間細胞軌跡の解析と同様に解析して特定の遺伝子を検出し, q 値が最も低い上位 320 遺伝子を抽出した。この 320 遺伝子からミトコンドリア遺伝子とリボソームタンパク質をコードする遺伝子を除外して擬似時間細胞軌跡プロットを作成した。成熟マーカーは、擬似時間細胞軌跡プロットの後半部分（擬似時間 14-19）とそれ以外の細胞の発現変動遺伝子（Differentially expressed genes: DEGs）を抽出し、近位尿細管細胞でより高発現しているものを選択することで取得した。

2-8 DEG 解析と IPA 解析

DEG は Seurat の関数 FindMarkers を用い, Poisson の方法で抽出した。上流の制御因子は、上記の方法で抽出した DEG を用いて, Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen) により解析した。

2-9 腎臓オルガノイドからの LTL 陽性細胞の分離

調製した単細胞懸濁液に LTL (Lotus tetragonolobus lectin) -ビオチン結合体 (Vector Laboratories, B-1325-2, 1:50) を加え, 4°C で 15 分間インキュベートした。その後, サンプルを 300 × g, 4°C で 5 分間遠心し, 上清を除去した。ペレットは FACS バッファーで 2 回洗浄した。その後, 抗ビオチンマイクロビーズ Ultra Pure (Miltenyi) を加え, 4°C で 15 分間インキュベートした後, サンプルを 300 × g, 4°C で 5 分間遠心し, 上清を除去した。ペレットを FACS バッファーで 2 回洗浄した。この細胞懸濁液を、磁場で固定した MS カラム (Miltenyi) を用いた MACS 法で精製し, LTL 陽性細胞を得た。

2-10 qPCR とヒートマップ

分化誘導過程における各細胞, 腎臓オルガノイド及び, LTL 陽性近位尿細管細胞から, Purelink RNA micro kit (ThermoFisher Scientific) を用いて全 RNA を抽出した。得られた全 RNA を鋳型として, Prime Script RT マスターミックス (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA は, TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR により定量し, 発現解析を行った。qRT-PCR に用いたプライマーの配列を(表 1)に示す。ヒートマップは R パッケージの Heatmap2 を用いて作成し, 樹形は Ward の方法を用いて解析した。

表 1 qPCR で使用した遺伝子のプライマー

gene	Forward	Reverse
ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
CDH6	CGATTCCCCCAGAGTACATACC	GTCGCTGGCTTTGATTCTGC
CITED1	CTCACCTGCGAAGGAGGATG	CCCAGGGTAGTGCAGAAATGG
EYA1	ATCTAACCAGCCCGCATAGC	GTGCCATTGGGAGTCATGGA
JAG1	TCGTGCTGCCTTTCAGTTTC	GATCATGCCCCGAGTGAGAAGC
PAX2	GCAACCCCGCCTTACTAAT	AACTAGTGGCGGTCATAGGC
LHX1	ATGCAACCTGACCGAGAAGT	CAGGTCGCTAGGGGAGATG
SIX1	CTGGTTTAAGAACCGGAGGC	TTGGTTCTGCTTGTGGAGGA
SIX2	AGGAAAGGGAGAACAACGAGAA	GGGCTGGATGATGAGTGGT
NPHS1	TGGTGTGTTTGGCTATCGGG	TGCTCCCAGATTTCTCCACG
PODXL	AGTAACTGGGCAAAGTGTGAGG	GGCTTTGACTGCTCGGCATA
SYNPO	AGCCCAAGGTGACCCGAAT	CCCTGTCACGAGGTGCTGGC
SLC3A1	ACCACACTGTGAATGTTGATGTC	AGTAGCTCATTGGCATGAAGTAGA
SLC22A6	ACCATCGTGACTGAGTGGGA	AAGATGAGTACCTTCCGGCG
CD31	AAACCACTGCAGAGTACCAGG	GCCTCTTTCTTGTCCAGTGTC
APOC3	GCAGGGTTACATGAAGCACG	GAAGTGAAGCCATCGGTCAC
FABP1	TCTCCGGCAAGTACCAACTG	GATTTCCGACACCCCTTGA
CPT1A	ATGTACGCCAAGATCGACCC	TGACCACGTTCTTCGTCTGG
CYP27A1	GAGAAACAGCCAGCCTGCTA	CTTCTGGATCAGCCTTGCGA
PPARA	ACTTATCCTGTGGTCCCCGG	CCGACAGAAAGGCACTTGTGA
RXRA	GACGGAGCTTGTGTCCAAGA	CCTCCAAGGACGCATAGACC
UGT2A3	GTAAGGCATTAGGAAGGCCCA	ACCATCTTCCCCTGAAGTCTG
AZGP1	AGACCCTGAAAGACATCGTGG	CCGCTGCTTCTGTTATTCTCG
SLC39A4	GCCTTCGCTGGTCTCTACG	CCCGTACTTTCAACATCGCC
BHMT	CCCTTGGCTTACCACACTCC	ATCCCATCTGGTGGCAACTC
SERPINA1	AGGCACCACCACTGACCTG	GTATCTGTCTTCTGGGCAGCAT
APOA1	GCGCTCTCGAGGAGTACACTA	TATTCTGAGCACCGGGAAGGG
SPARCL1	TATAGGTACCACTGAGCCTGGA	GGAAGCTCATGCAAGAATCCACAG
ACE2	AGAAAGCAGTCTGCCATCCC	GCTGTCAGGAAGTCGTCCAT
AQP6	ACTGGCTGCTCCATGAATCC	GTGCCTGTGAGGATAGCCAG
CUBN	AACTTCCTAATCCCCAGCGG	GTCCACCTCCTCAGTTCCTG
LRP2	AGGTGCATTCCCCAGTCTTG	GTGCCGGTCACACCTGAATA
SLC34A1	CAGACCTCATAGTGGGTGCC	GAAGGCATAGGCAGAGGTCC
SLC22A2	CTGAGCTGTACCCACATTCA	CAAGTACGCCGAAAACCATCA
SLC31A1	TCTCACCATCACCCAACCAC	AAAAGCTCCAGCCATTTCTCC
SLC27A2	TACATTCCGGTGGAAAGGGGA	ATGCCAATGCGACCCTCAT
SLC47A2	CTGGGCGCTCTTCCTCAACA	ATCACCGGAAGTCCTGGAATGAA
ABCB1	CCATGCTCAGACAGGATGTGA	ATCATTGGCGAGCCTGGTAG

2-11 免疫染色

オルガノイドを DPBS (-) 中 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間, 4°Cで固定し, その後 DPBS (-) で 3 回洗浄した。その後, オルガノイドを 10%ロバ血清, 0.3% Triton X /DPBS (-) を用いて室温で 3 時間ブロッキングし, その後一次抗体とともに 4°Cで一晩インキュベートした。0.3% Triton X/DPBS (-) で 5 回洗浄後, 二次抗体を 4°Cで一晩インキュベートした。抗体は, 以下の抗体と希釈液を用いた: マウス抗 ECAD (上皮細胞, 遠位尿細管マーカー, 1:300, 610181, BD Biosciences), ヒツジ抗 NPHS1 (ポドサイトマーカー, 1:300, AF4269, R&D Systems), LTL-ビオチン (近位尿細管マーカー, 1:300, B-1325, Vector Laboratories), ヤギ抗 KIM-1 (近位尿細管障害マーカー, 1:300, AF1750, R&D Systems), ウサギ抗 Megalin(LRP2) (近位尿細管マーカー, 1:300, ab76969, abcam), マウス抗 γ H2AX (DNA ダメージマーカー, 1:100, DNA Damage Detection Kit γ H2AX Red, G266, 同仁化学研究所)。画像は Zeiss LSM800 共焦点顕微鏡または CQ1 (横河電機) を用いて撮影した。免疫蛍光分析はすべて 3 回以上繰り返し, 代表的な画像を示した。

2-12 PPAR α アゴニスト処理腎臓オルガノイドサンプルの scRNA-seq 解析

腎臓オルガノイドは 15 日目まで上記と同様の方法で分化させた。対照群には 15 日目から 23 日目まで基礎培地に 0.2%DMSO を添加し, PPAR α アゴニスト投与群には 15 日目から 23 日目まで基礎培地に 0.3 μ M CP775146 および 1 μ M 9-シスレチノイン酸を添加した。scRNA-seq データは, タイムコースの scRNA-seq データを取得した時と同じ方法でデータを取得した。ライブラリーは Illumina NovaSeq 6000 Sequencing system を用いて, 細胞あたり平均 165,692 リードの深度で配列決定した。

得られたデータは上記と同様に Seurat で解析を行った。データの品質管理のため, percent.mt<25, 2500<nFeature_RNA<9500 のフィルターをかけた。コントロール群と PPAR α アゴニスト投与群のデータは, Seurat パッケージのアンカーベースの CCA 統合 (FindIntegrationAnchors 関数と IntegrateData 関数) を用いて統合した。統合された発現データを Z スコアに正規化した後, PCA を行った。クラスタリングの主成分数は上位 20 位までとし, 分解能は 0.2 とした。

2-13 腎臓オルガノイドと腎細胞アトラス (KCA) 胎児腎臓の統合

KCA 胎児メタデータから, 腎臓オルガノイドにも存在すると想定される以下のアノテーションを付した細胞を抽出した: "Cap mesenchyme", "Proliferating cap mesenchyme", "Proximal RV", "Distal RV", "Proliferating distal RV", "Proximal SSB", "Medial SSB", "Distal SSB", "Proximal UB", "Podocyte", "Proximal tubule", "Loop of Henle", "Endothelium", "Stroma progenitor", "Proliferating stroma progenitor".

Seurat パッケージのアンカーベース CCA 統合 (FindIntegrationAnchors 関数と

IntegrateData 関数) を用いて, 6 人のドナーの KCA 胎児²⁵ と 2 つの腎臓オルガノイドサンプルを統合した。統合された発現データを Z スコアに正規化した後, PCA を実行した。クラスタリングの主成分数は上位 20 位まで, 分解能は 0.2 に設定した。

2-14 統合データを用いた擬似時間の生成

擬似時間は KCA²⁵ のメタデータを用いて作成した。具体的には, KCA 胎児サンプルの近位尿細管細胞群と mSSB 細胞群の発現変動遺伝子を抽出した (FindMarkers: logfc.threshold=0.5, min.pct=0.5, test.use="poisson")。KCA Fetal サンプルの CL4 および 3 つの KCA Child サンプル (Wilms1、Wilms2、Wilms3) の PT クラスターのデータをマージし, 前述の遺伝子セットを用いて PCA を行った。

2-15 擬似時間の外挿

上記で作成した擬似時間を用いて, オルガノイドと成体腎臓の近位尿細管のデータを外挿し, それらの成熟度を比較した。オルガノイドの近位尿細管細胞の擬似時間は, オルガノイドの CL4 における正規化された発現量と, 前述の PCA における第一主成分の負荷量の積から計算した。外挿用の胎児腎臓データは GSE114530²⁶ から入手し, TransferData を用いて CL4 に分類される細胞を近位尿細管細胞として抽出した。この細胞群についても, オルガノイドと同様の方法で擬似時間を算出した。外挿用の成人腎臓のカウントデータは GSE202109²⁷ から取得し, メタデータは UCSC Cell Browser から取得した。近位尿細管とラベルされた細胞は, 近位尿細管細胞として抽出し, この細胞群についてもオルガノイドと同様の方法で擬似時間を算出した。

2-16 透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope: TEM)

TEM 用の組織サンプルはリン酸緩衝 2% グルタルアルデヒドで固定し, その後 2% 四酸化オスミウムで水中 3 時間後固定した。その後, 段階的にエタノールで脱水し, エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラミクロトームを用いて超薄切片を得た。超薄切片を酢酸ウラニルで 10 分間, 鉛染色液で 5 分間染色し, TEM (HITACHI H-7600、100kV) で観察した。得られた画像は Fiji による定量に使用し, 近位尿細管細胞の細胞質面積とエンドソームの数とサイズを測定した。解析には, Control 群では 24 枚, PPAR α アゴニスト投与群では 23 枚の画像を用い, それぞれ 26 個の細胞を抽出した。

2-17 デキストラン取り込みアッセイ

トランスウェル内の気液界面で培養した分化 26 日目の腎臓オルガノイドを, pHrodoTM Red Dextran, 10,000 MW, for Endocytosis (Invitrogen, P10361) を 10 mg/mL 添加した培地に加え, 5% CO₂ インキュベーター内 37°C で 24 時間インキュベートした。その後, オルガノイドを氷冷 DPBS (-) で 3 回洗浄し, LTL-FITC ((1:100) Vector Laboratories, FL-1321)

を含む DPBS (-) に 4°C で 2 時間ロードした。染色した腎臓オルガノイドの蛍光を CV8000 (横河電機) で観察した。画像は x20 レンズで撮影し, 2x2 のタイル状画像を取得した後, Z スタックとして厚さ 100 μm の画像を 5 μm ごとに撮影した。LTL 蛍光には Average image projection (AveIP) を, デキストラン蛍光には Sum image projection (SumIP) を用い, 3D 画像から 2D 画像を作成した。データ解析は CellPathfinder (横河電機) を用いて行った。近位尿細管面積あたりのデキストランの蛍光強度は, オルガノイドの LTL 領域内のデキストランの総蛍光強度を LTL 陽性領域の面積 (μm^2) で割ることにより算出した。これらの値は, コントロール群の平均値を 1 として正規化した。

2-18 シスプラチン投与腎臓オルガノイドのフローサイトメトリー解析

分化 23 日目の腎臓オルガノイドを, 5 μM のシスプラチン (シスプラチン点滴静注 10mg 「マルコ」(日医工) より調整) を含む培地で 6 日間培養した。培地は 1 日おきに交換した。腎臓オルガノイドからの単細胞分離に用いたのと同じ方法で腎臓オルガノイドを単細胞に解離し, 細胞を 4%PFA/DPBS (-) に懸濁し, 37°C で 10 分間インキュベートした。その後, 細胞を 300 x g, 4°C で 5 分間遠心し, 上清を除去した。細胞を 90% の冷メタノールに懸濁し, 氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を FACS バッファーに再懸濁し, 10^6 cells/100 μL とした。LTL-FITC (FL-1321, Vector Laboratories) を 1:100 の濃度で添加し, 混合物をローテーターを用いて 4°C で 30 分間インキュベートした。細胞懸濁液を 300 x g, 4°C で 5 分間遠心し, 上清を除去して FACS バッファーに再懸濁し, 35 μm フィルター付きチューブ (352235, Falcon) に通した。細胞懸濁液をフローサイトメーター (NovoCyte, Agilent) で測定した。データは Flowjo (Ver10.6.2) で解析した。

2-19 シスプラチンで処理した腎臓オルガノイドの近位尿細管における γH2AX 陽性細胞の定量化

染色した腎臓オルガノイドは CQ1 (横河電機) を用いて蛍光観察した。オルガノイド全体を撮影するため, 以下の条件で撮影を行った。画像は x10 レンズで撮影し, 3x3 のタイル画像を取得した後, Z スタックとして 10 μm ごとに撮影した。LTL, γH2AX , DAPI 蛍光については, MIP (Maximum image projection) を用いて 3D 画像から 2D 画像を作成した。データ解析は CellPathfinder (横河電機) を用いて行い, γH2AX 陽性細胞数は, オルガノイドの LTL 陽性領域内に存在する γH2AX 陽性細胞の総数を LTL 陽性領域の総面積 (μm^2) で割ることにより算出した。次に, これらの値をシスプラチン無処置群の平均値で正規化し, 1 とした。

第三章

結果

第三章 結果

3-1 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化検討 (MET 刺激のタイミングの検討)

腎臓発生におけるネフロン形成の最初のステップとして、後腎間葉と尿管芽との相互作用により、ネフロン前駆細胞が MET を引き起こす。これによりネフロン前駆細胞は、上皮化し RV を形成し、SSB を経て、糸球体、近位尿細管、遠位尿細管のセグメントを持ったネフロンに分化する²⁸(図 4b)。

今回の腎臓オルガノイドにおいては、scRNA-seq により成熟化因子を抽出するために、ネフロンの構造が多い腎臓オルガノイドの作製が必要である。先行研究における腎臓オルガノイドの作製方法においては、hiPSCs から CHIR99021 含有培地で 5 日間処置することにより、PIM を多く作製することができ、結果としてネフロンの構造体の多いオルガノイドが作製できる⁶。しかし、このプロトコールにおける最適な CHIR パルスの時期については検討されていない。そこで、iPS 細胞からの分化誘導の際の MET を模倣した刺激である CHIR パルスを行わない状態で培養した際に、自発的な MET が分化誘導後何日で起こるかを検証することで、本誘導法における最適な MET のタイミングを確認した (図 4a)。

その結果、本プロトコールを用いたネフロン前駆細胞の作製では、分化誘導 7 日目において、EYA1 (Eyes absent transcriptional coactivator and phosphatase 1), SIX1 (Sine oculis homeobox homolog 1), CITED1 (Cbp/P300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1) などの MM 及びネフロン前駆細胞マーカーの発現が高いことが示された。特に、CM マーカーである SIX2 (Sine oculis homeobox homolog 2) は 9 日目で発現が上昇していた (図 4d)。また、MET 後に発生する RV のマーカーである LHX1 (LIM homeobox 1) は 9 日目から発現し始め、11 日目により高く発現することが示された (図 4d)。また、CDH6 (Cadherin 6) や JAG1 (Jagged canonical notch ligand 1) などの SSB のマーカーは 11 日ごろから高い発現を示した (図 4d)。また、明視野画像においても、9 日目の細胞は上皮様の構造は見られないのに対して、12 日目の画像では、上皮様の構造が見られていることから (図 4c 白矢印)、分化誘導後 9 日目のタイミングで、MET 様の刺激 (CHIR パルス) を行うことで、強制的に同じタイミングで MET を引き起こすことができる可能性が考えられた。

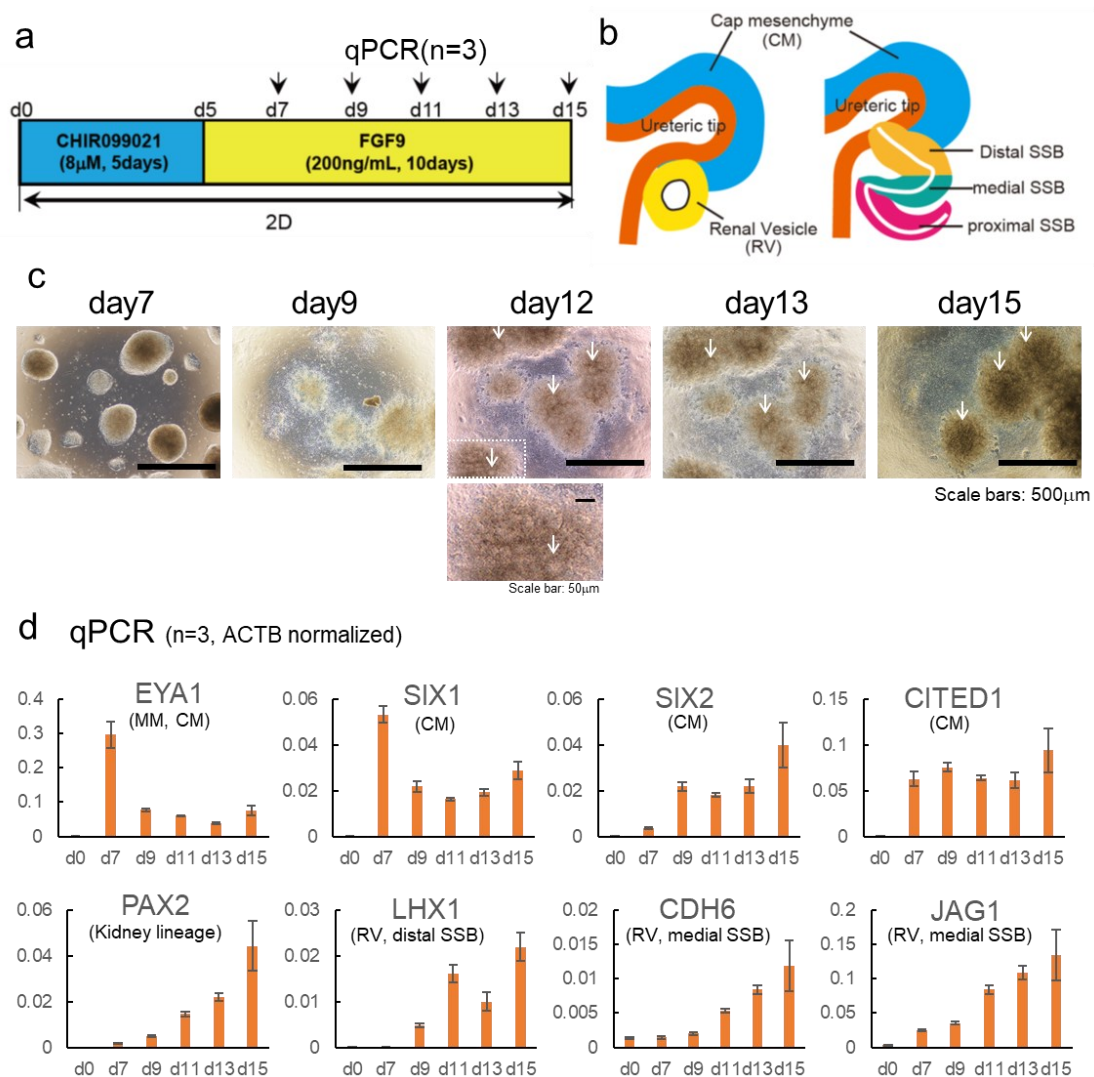


図4 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化検討 (MET 刺激のタイミングの検討)

a. iPS 細胞からネフロン前駆細胞を誘導するプロトコルの模式図。自発的に MET を引き起こす時期を確認するために分化誘導 15 日目まで 2D で培養し, MM, CM, RV, SSB などのマーカーで qPCR を行った (n=3, Mean±SE)。**b.** 腎臓の発生時にみられる MET 後の間葉細胞の上皮化 (RV 形成) と RV から SSB への変化の模式図。MM が, CM になったのちに, MET により上皮化し RV となる。その後 RV は Ureteric tip から近い方から Distal SSB, Medial SSB, Proximal SSB に分割される。**c.** 分化誘導後 7, 9, 12, 13, 15 日における位相差顕微鏡画像。12 日目の画像の一部を拡大した図を下に示す。12 日目付近から上皮用の構造 (白矢印) がみられるようになる。**d.** MM, CM, RV, SSB などのマーカー遺伝子の経時的な qPCR 結果。CM マーカーの SIX2 は 9 日目から発現が上昇し, 上皮化の指標である RV マーカーは, 9 日目から上昇し始め, 11 日目で発現がさらに高くなることから, 9 日目付近で自発的な MET が起こることがわかる。(PAX2: Paired Box 2)

3-2 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化検討(MET 刺激後の FGF9 処置期間の検討)

以前のプロトコールでは, CHIR パルス後に, FGF9 を添加しないとオルガノイドの nephrogenesis が起こらなかったことから, CHIR パルス後の FGF9 含有培地による培養は, ネフロン形成に必須であると示唆される⁶。しかし, その培養期間とネフロン形成については調査されていない。そこで, より多くのネフロンが形成できる CHIR パルス後の FGF9 培地の期間を検討した。具体的には, CHIR パルス後の FGF9 の処置期間を 0, 2, 4, 6 日としたのち, 全分化誘導期間が 25 日になった時点での腎臓オルガノイドの免疫染色により, より多くのネフロンが発生する条件について検証した (図 5a)。25 日目の明視野画像とネフロン構成細胞マーカーである NPHS1 (Nephrin: 糸球体マーカー), Megalin(近位尿細管マーカー), ECAD (E cadherin: 遠位尿細管マーカー) を用いた免疫染色により, FGF9 含有培地の処置期間が長いほど, ネフロンの構造が多くなる傾向が認められた(図 5b, c)。また, 4 日間と 6 日間を比較すると, FGF9 含有培地で 6 日間処置した腎臓オルガノイドでは, 糸球体の構造にボウマン腔様の空間が認められた (図 5d 黒矢頭)。以上のことから, CHIR パルス後の FGF9 含有培地での培養期間が 6 日間あれば十分なネフロンの数を持つオルガノイドが作製できると考えられる。

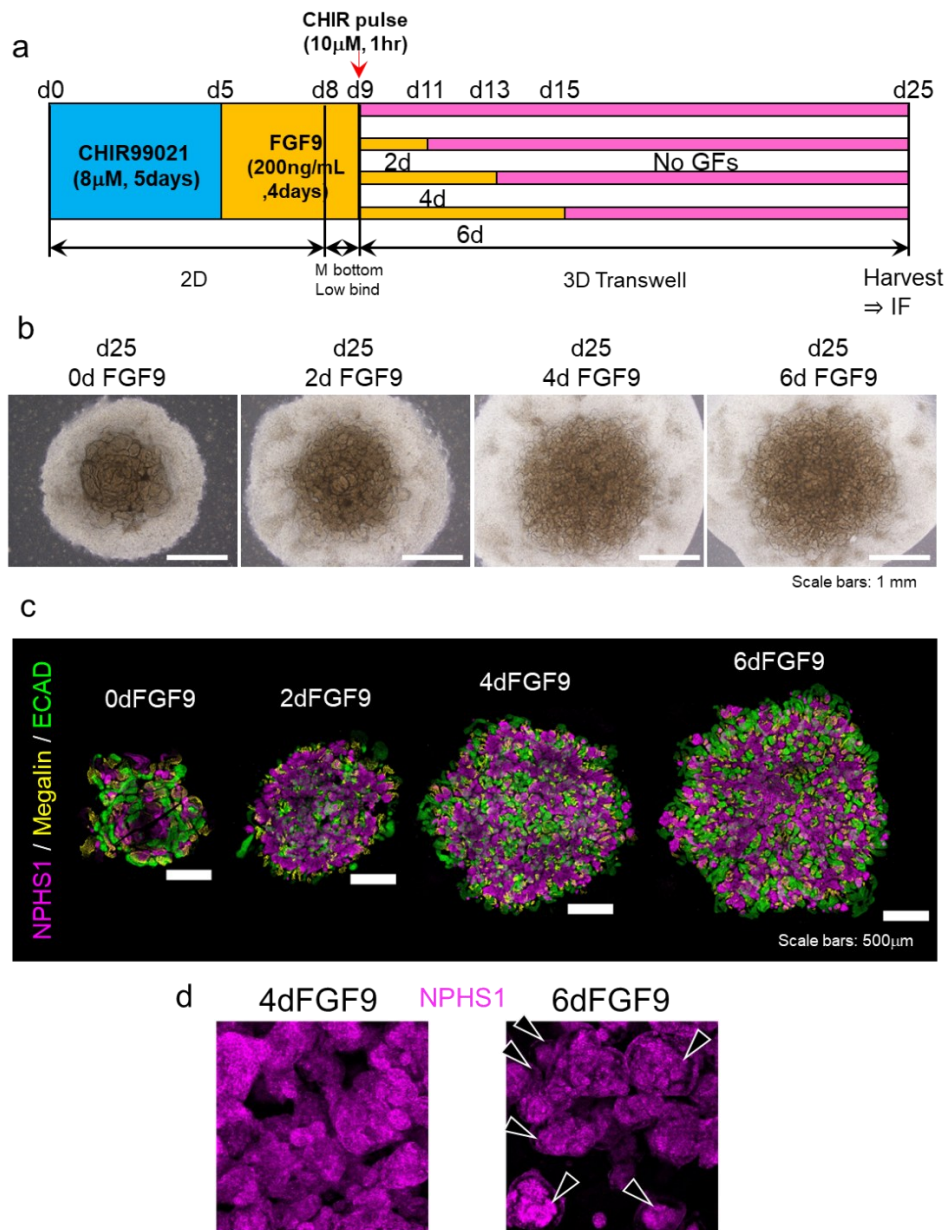


図5 CHIR パルス後の FGF9 含有培地での培養期間の検討

a. iPS 細胞から腎臓オルガノイドを作製する際のプロトコールの模式図。CHIR パルス後の FGF9 含有培地での誘導期間の最適化の検討を行った。**b.** それぞれの分化誘導条件における、分化誘導後 25 日目の腎臓オルガノイドの位相差顕微鏡画像。スケールバー: 1mm.
c. それぞれの分化誘導条件における、分化誘導後 25 日目の腎臓オルガノイドの免疫染色画像。NPHS1 (系球体): マゼンタ, Megalin (近位尿細管): 黄色, ECAD (遠位尿細管): 緑で示す。スケールバー: 500 μm. FGF9 含有培地の期間に応じて、ネフロン数が増える(大きさが大きくなる)。**d.** 4 日間と 6 日間 FGF9 含有培地で培養した際の腎臓オルガノイドにおける NPHS1 の染色画像の拡大図。黒矢頭で示すように、6 日間 FGF9 含有培地で培養した腎臓オルガノイドでは、系球体の構造に空間が見られるようになる。

3-3 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化後の遺伝子発現量解析

前述の方法で最適化した条件を踏襲して、腎臓オルガノイドの分化誘導過程において経時的な遺伝子発現量解析を行った（図 6a）。その結果、後腎間葉, CM マーカーである EYA1 は経時的に遺伝子発現量が減少していき、分化誘導 15 日目付近からは発現量が低い状態ではほぼ頭打ちとなった（図 6b）。LHX1, JAG1 などの SSB マーカーは, CM から上皮化する過程で発現が増加する（13, 15 日目付近）が、その後ネフロン構成細胞へと分化するため, SSB は減少し、それに伴って遺伝子発現も減少した（図 6b）。ネフロン構成細胞マーカーや血管内皮細胞マーカーは, FGF9 を除いた培地で培養を開始した次の時点（19 日目）から、発現し始めることから、基礎培地から FGF9 を抜くことによって、自己組織化によりネフロン構成細胞へと分化していくことが示された（図 6b）。

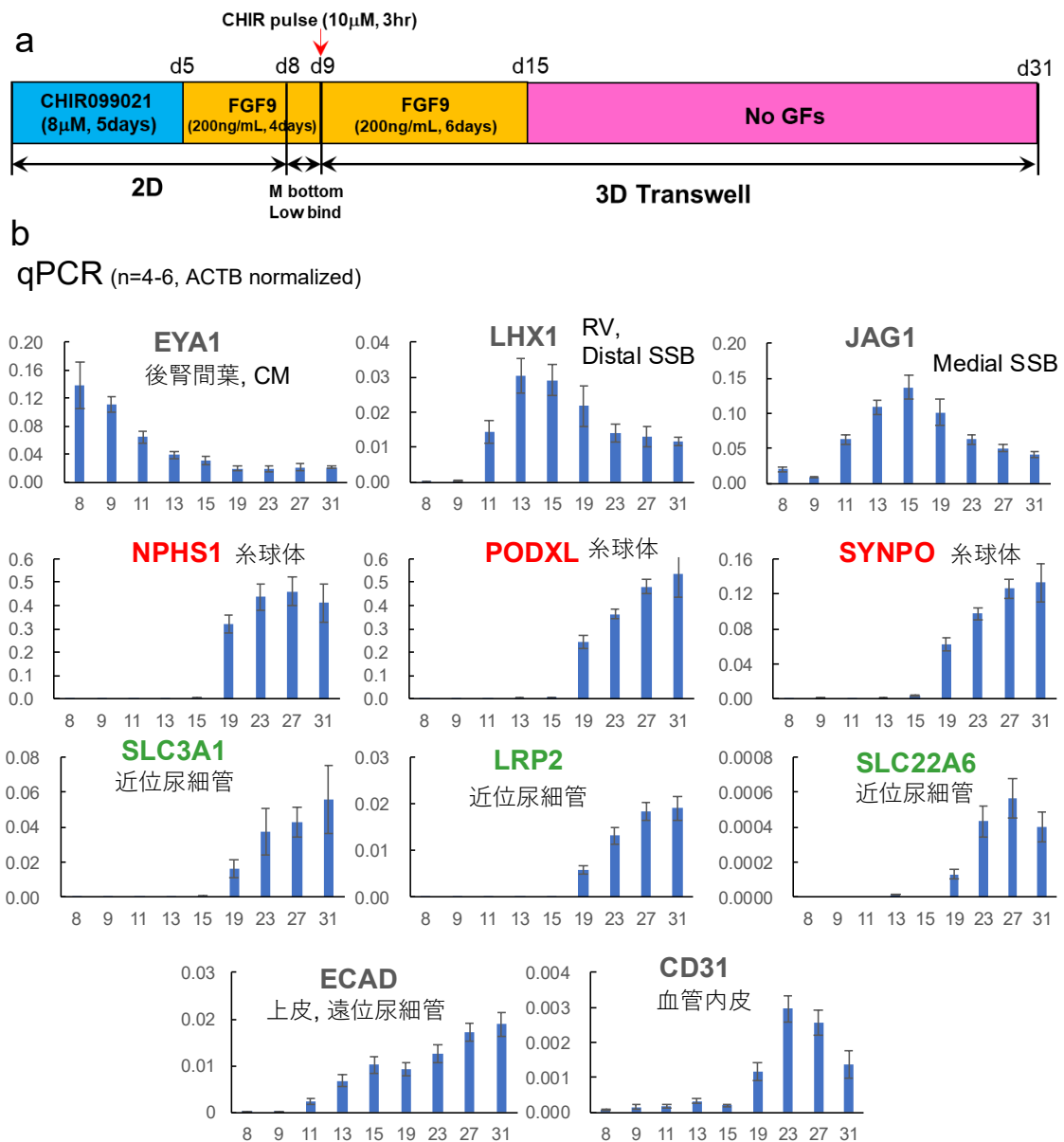


図6 腎臓オルガノイドの分化誘導法の最適化後の遺伝子発現量解析

a. iPS 細胞から腎臓オルガノイドを作製する際の最適化したプロトコルの模式図。 **b.** ネフロン前駆細胞マーカー、ネフロン構成細胞（糸球体、近位尿細管、遠位尿細管）マーカー及び血管内皮細胞マーカーの経時的な遺伝子発現量を示す (n=4~6, Mean ± SE)。MM, CM マーカーの EYA1 は経時的に減少していき、分化誘導 15 日目付近でほぼ頭打ちとなる。LHX1, JAG1 などの SSB マーカーは、CM から上皮化する過程で発現が増えていく (13, 15 日目付近) が、その後ネフロン構成細胞へと分化するため、減少していく。ネフロン構成細胞マーカーや血管内皮細胞マーカーは、FGF9 を除いた培地で培養を開始した次の時点 (19 日目) から、発現が認められる。

3-4 腎臓オルガノイドのクラスタリング解析

これまでの検討から、最適な MET 開始時期の検討と、ネフロン構成細胞に分化し始める前までに、必要なネフロン数を確保するために必要な FGF9 含有培地での培養期間を検討してきた。その最適化した分化誘導方法を用いて、ヒト腎臓オルガノイド内のネフロン構成細胞の Heterogeneity について明らかにするため、ネフロン構成細胞マーカー遺伝子が発現し始める前の段階である分化誘導後 15 日目から、4 日おきに 5 点（15, 19, 23, 27, 31 日目の 5 つの時点）のオルガノイドを用いて、scRNA-seq を行った（図 7a）。scRNA-seq によって得られた細胞の特徴を調べるために、次元削減手法である Uniform manifold approximation and projection(UMAP)によるクラスタリング解析を行い、17 の異なる細胞クラスター(CL)を検出した（図 7b）。これらのクラスターについて、既知のマーカー遺伝子を使用してアノテーションを実施したところ、ネフロン前駆細胞（NPC/PTA; CL2, 12）、糸球体（CL0, 1, 7, 13）、近位尿細管（CL4）、遠位尿細管（CL5）、といったネフロンを構成する細胞群のクラスターに加えて、オフターゲット系統（CL6: 軟骨, 11: ニューロン_1, 14: 筋肉, 15: ニューロン_2）にクラスタリングされる細胞集団が存在することが示された（図 7d）。また、UMAP 解析結果から、分化誘導後 15 日目の細胞は、UMAP 上で比較的固まった細胞集団として存在していたが、日を追うごとに UMAP 上を分散していく様子が認められ、最終的にはネフロンおよび腎間質の各セグメントへと分化することが明らかとなった（図 7c）。これらの結果は、経時的にサンプリングした腎臓オルガノイドを scRNA-seq 解析に用いることで、発達中のネフロンの遺伝子の変化を単一細胞レベルで確認できることを示している。

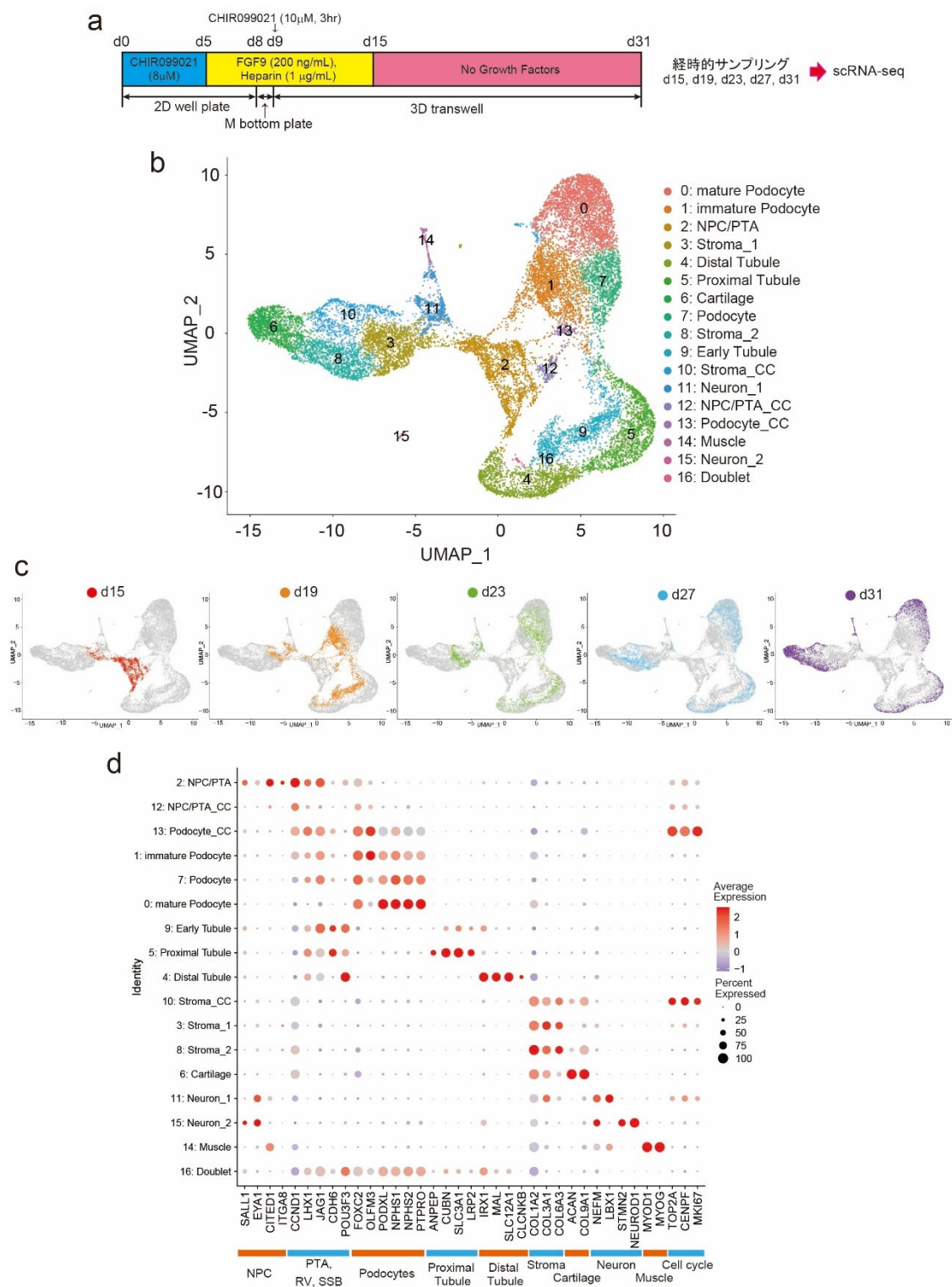


図7 腎臓オルガノイド経時的サンプリングにおける scRNA-seq によるクラスタリング解析

a. iPS 細胞から腎臓オルガノイドを誘導するプロトコルの模式図。b. クラスタごと

に色分けされた腎臓オルガノイドの UMAP プロット。17 のクラスターに分類された。**c.** 分化日ごとに色分けされた腎臓オルガノイドの UMAP プロット。15 日目ではプロットの中心に集まっている細胞集団が、経時的にプロットの外側へと広がっていく様子が示されている。**d.** すべてのクラスターにおける既知の腎臓マーカー遺伝子のドットプロット。腎臓を構成する細胞のクラスター以外にも、オフターゲットの細胞集団（軟骨、神経、筋肉など）も認められる。

全サンプルに用いたパラメータでは分類できなかった詳細な細胞種を同定するために、CL2, CL12, CL13 (NPC/PTA) , CL4, CL5, CL9 (尿細管) , CL0, 1, 7 (糸球体) についてサブクラスタリング解析を行った。NPC/PTA クラスターのサブクラスタリングでは、NPC/PTA クラスター (EYA1, CITED1, ITGA8(Integrin subunit alpha 8)) 以外に、発生過程で見られる RV (CCND1, LHX1, JAG1) や SSB (proximal: OLFM3(Olfactomedin 3), distal: POU3F3(POU class 3 homeobox 3), IRX1(Iroquois homeobox 1)) のクラスターを含む 6 つのサブクラスターに分類されることが示された (図 7e, f)。尿細管クラスター (CL4, 5, 9) のサブクラスタリングでは、遠位尿細管系譜の distal SSB (dSSB) および遠位尿細管マーカー (POU3F3, IRX1, MAL(Myelin and lymphocyte protein), MECOM(MDS1 and EVI1 complex locus), SLC12A1, CLCNKB(Chloride voltage-gated channel Kb)) と、近位尿細管系譜の medial SSB (mSSB) および近位尿細管マーカー (CDH6, HNF4A(Hepatocyte nuclear factor 4 alpha), SLC3A1, CUBN, LRP2(LDL receptor related protein 2, Megalin) を使用し、サブクラスタリングを行った。これにより、サブクラスタリング実施前のクラスタリング解析において「Early Tubules」とされたクラスター (図 7b, CL9) が mSSB または dSSB に分類することができ、尿細管クラスターとされた一部の細胞には、RV 由来の細胞やポドサイト由来の細胞も含まれていたことから、サブクラスタリング解析による詳細な細胞集団のクラスタリングが可能であった (図 7g, h)。糸球体クラスター (CL0, 1, 7) のサブクラスタリングでは、糸球体形成初期に発現する OLFM3 が高発現するクラスターや、ポドサイトマーカー (PODXL(Podocalyxin like), NPHS1, PTPRO(Protein tyrosine phosphatase receptor type O)) の発現レベルが異なるクラスターを分類することができた。このことから、糸球体クラスターのサブクラスタリングにより、ポドサイト内で異なる成熟レベルを持つポドサイトが分類することが可能となった (図 7i, j)。

3-5 疑似時間軸細胞経路解析による時間軸の作製

次に、ネフロン前駆細胞からネフロン構成細胞へ発生する過程における、細胞成熟速度 Heterogeneity を解析するため、3-4 でアノテーションされたネフロン系統の細胞を抽出し、Monocle 2 を用いて疑似時間軸細胞経路解析を実施した (図 8a-e)。単一細胞の転写プロファイル遺伝子発現の変化とともに 3 次元に配置することで、4 つの分岐と 7 つの細胞状態で構成される軌跡が作成された (図 8a)。この軌跡プロットは、細胞がまず NPC/PTA 状態から始まり、ポドサイトまたは尿細管系統に分化した後、尿細管系譜が近位尿細管と遠位尿細管に分岐することが示された (図 8b-e)。

図 8b-e のプロット内に示した、2 つの分岐点の前後での遺伝子発現を示すヒートマップを作成した (図 8f, g)。各分岐点における遺伝子発現変化を確認したところ、分岐点 1 からの疑似時間に沿った遺伝子発現を示すヒートマップでは、NPC/PTA マーカー遺伝子 (SIX2, CCND1, TMEM100 (Transmembrane protein 100), ITGA8, EYA1) の発現は分岐前で高く、未熟ポドサイトマーカー遺伝子 (SIX1, OLFM3) の発現がポドサイトへの軌跡で高い発現が見られ、その後、成熟ポドサイトマーカー遺伝子 (NPHS1, NPHS2 (Podocin), PTPRO, PODXL) の発現が高くなることが示された。一方で、尿細管への軌跡では、medial- distal RV および SSB のマーカー (LHX1, JAG1) が最初に発現し、その後、疑似時間の後半で遠位尿細管マーカーおよび近位尿細管マーカーの発現がみられた (図 8f)。尿細管の分岐を示す分岐点 2 のヒートマップでは、細胞が近位尿細管 (ABCB1 (ATP binding cassette subfamily B member 1), HNF4A, SLC3A1, LRP2, CUBN) または遠位尿細管 (MECOM, CLCNKB, MAL, SLC12A1) に分化する様子が示された (図 8g)。注目すべき点として、PTA からの遠位尿細管への系譜の決定は近位尿細管への系譜の決定よりも先に起こることが解析結果から示され、これはヒトネフロン発生に関する先行研究と一致していた²⁹。以上のことから疑似時間軸細胞経路解析によって並べられた細胞の順番は、ヒト腎形成過程を模倣していることが示唆された。

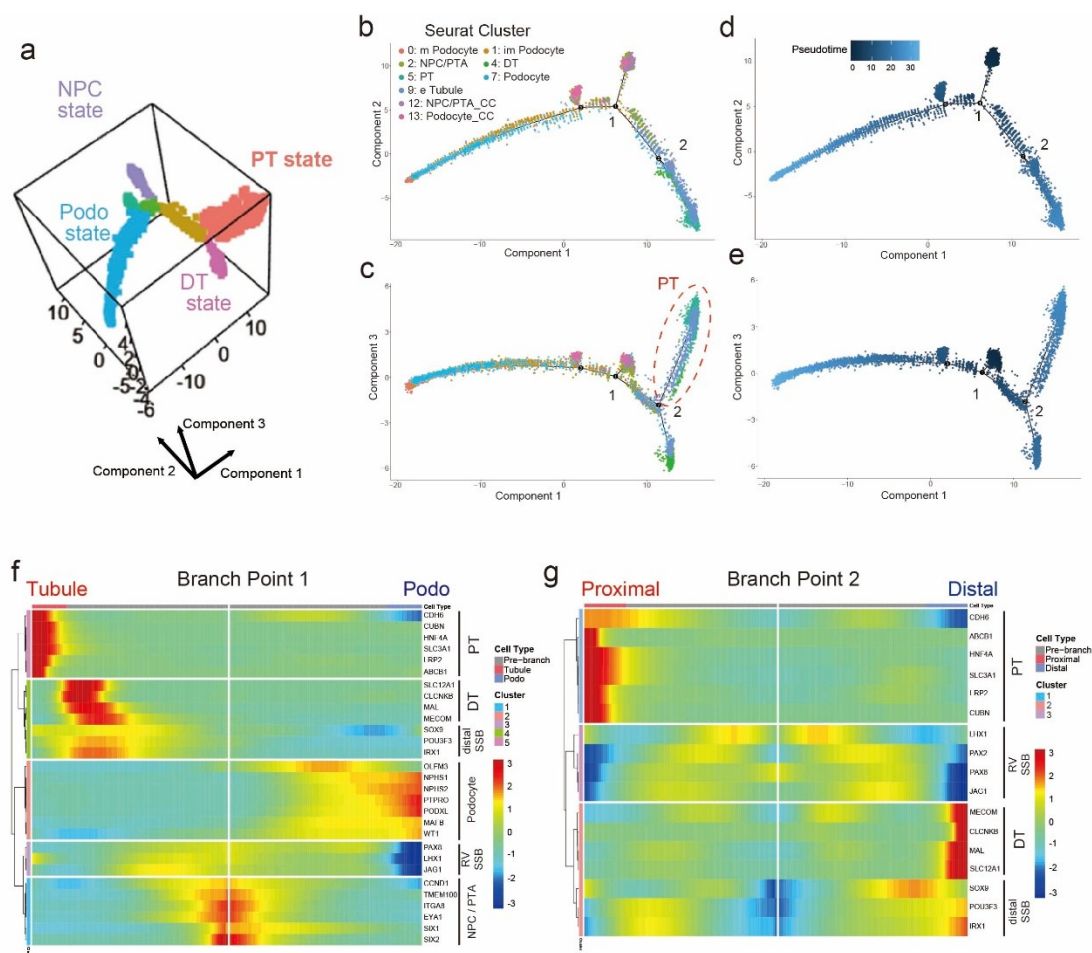


図8 ネフロン系統の細胞を用いた疑似時間軸細胞経路解析

a. 3次元でプロットした疑似時間軸細胞経路解析。カラーは枝分かれ前後の状態ごとに表示し、それぞれの状態に対して遺伝子発現を確認することでアノテーションした。**b, d.** コンポーネント 1 とコンポーネント 2 に基づく疑似時間細胞軌跡のプロット。**b** は Seurat クラスターごとに色分けし、**d** は疑似時間で色分けしたプロット。**c, e.** コンポーネント 1 とコンポーネント 3 に基づく疑似時間細胞軌跡プロット。**c** は Seurat クラスターごとに色分けし、**e** は疑似時間で色分けしたプロット。「1」と「2」は分岐点を示し、赤い破線は近位尿管状態 (PT) を示す。**f, g.** 分岐点 1 (**f**) および分岐点 2 (**g**) における、腎臓発生に関する既知のマーカー遺伝子の分岐型ヒートマップ。

3-6 近位尿細管細胞の成熟速度調節因子の抽出

次に、近位尿細管の成熟に焦点を当て近位尿細管細胞における成熟速度を調節するための因子を抽出するために、近位尿細管としてアノテーションされた細胞のデータを Monocle 解析で再解析した。Seurat の尿細管クラスター (CL4, 5, 9) のサブクラスター解析で近位尿細管系譜 (RV, mSSB, PT1, PT2) としてアノテーションされた細胞 (図 7g, h) と, Monocle の細胞軌跡で近位尿細管状態として注釈された細胞 (図 8a) の積集合の細胞を近位尿細管系譜細胞として次の解析に用いた。これらの細胞データを用いて、同様に Monocle 解析を実施したところ、分岐のない近位尿細管細胞の疑似時間細胞軌跡プロット (0-20) が作成できた (図 9a, b)。この疑似時間細胞軌跡プロットの疑似時間の後期に高発現する遺伝子群を特定し (図 9c, d), これらの遺伝子を、以降の実験で近位尿細管成熟のマーカーとして使用した。

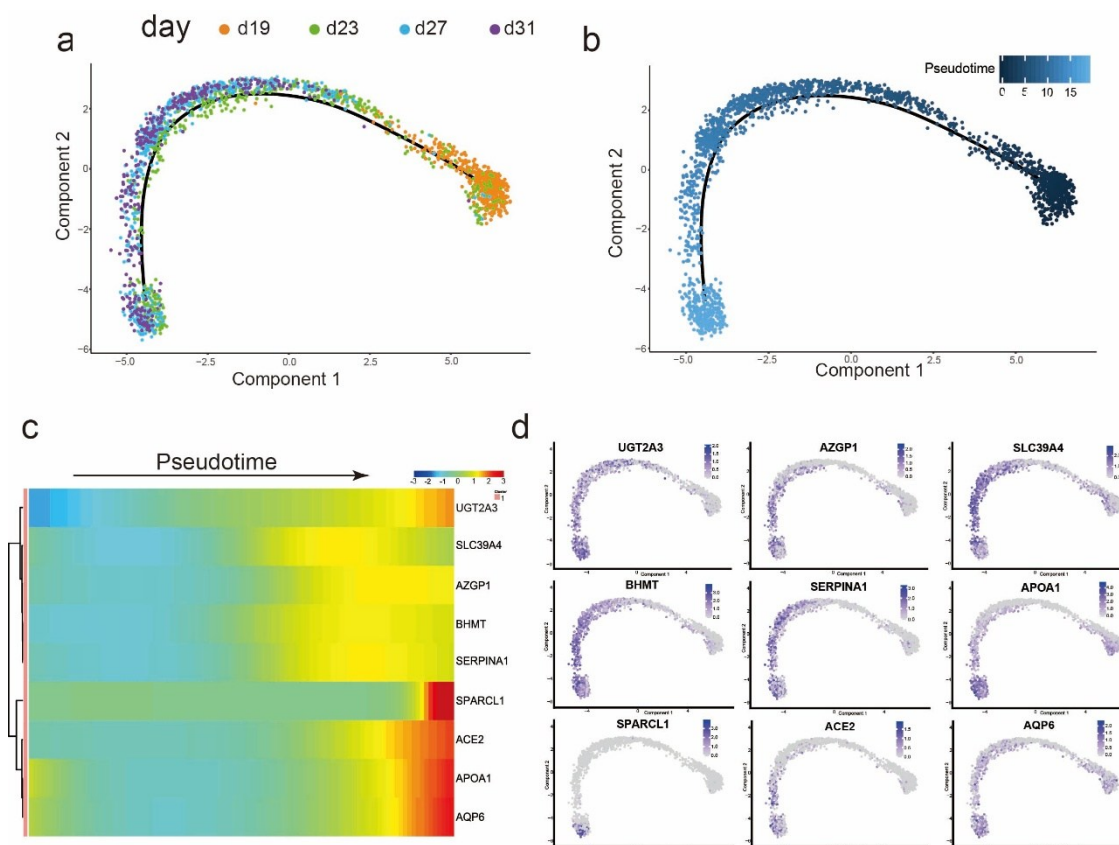


図 9 近位尿細管細胞を用いた疑似時間軸細胞経路解析

a, b. 腎臓オルガノイド中の近位尿細管系統細胞の疑似時間細胞軌跡プロット。a は日数ごとに色分けし, b は疑似時間で色分けしたプロットを示す。この結果から、近位尿細管細胞を1つの疑似時間軸に示すことができた。c, d. 疑似時間細胞軌跡の後期段階で変化する遺伝子の疑似時間ヒートマップ (c) と、それらの遺伝子の特徴プロット (d) (いずれも近位尿細管系統細胞を使用)。これらの遺伝子群を近位尿細管細胞の成熟化マーカー遺伝子として、以降の試験で用いることとした。

この疑似時間を使用して、各日の細胞軌跡を示すバイオリンプロットを作成した(図 10a)。バイオリンプロットでは、サンプリング 19 日の細胞はほぼすべて初期の擬時間 (0-5) にプロットされ、23 日の細胞は後期の擬時間 (10-20) に出現し、31 日の細胞は初期の擬時間 (0-5) にほとんど存在しないことが示された (図 10a)。予想通り、各サンプリング日の細胞は様々な疑似時間を持つような広い分布を示しており、このことは、近位尿細管細胞の成熟速度における細胞の Heterogeneity を示していると考えられた (図 10a, b)。

次に、近位尿細管成熟の疑似時間細胞軌跡を使用して、同じ成熟レベルで異なるサンプリング日の細胞を比較し、成熟速度に関連する遺伝子セットを抽出した。特定の成熟レベルを分析することで、短期間で特定の成熟レベルまで分化した細胞はより早い成熟速度を持つと推定できる。本研究では、擬時間 8-11 を成熟段階として設定し、その範囲内の 23 日目の細胞 (図 10a の青い括弧「a」、成熟速度が速い細胞) と 27 日目の細胞 (図 10a の赤い括弧「b」、成熟速度が遅い細胞) を比較して、差次的発現遺伝子 (Differentially expressed genes: DEGs) を得た。

時間依存的に発現レベルが上昇する遺伝子を除外するため、19 日目と 31 日目の細胞での遺伝子発現レベルを比較し、19 日目の細胞で高発現する遺伝子を成熟関連遺伝子から除外した。このようにして得られた DEGs は、近位尿細管の成熟速度の調節に関与していると予想され、232 個の遺伝子が特定された (表 2)。これらの DEGs の上流調節因子を特定するために、Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) を用いた上流調節因子解析を実施した。その結果、DEGs を調節する候補分子の多くは核受容体によって活性化される経路に関連していることが示され、PPARA, HNF4A, および PPAR α アゴニスト (ピリニキシン酸, ベザフィブラート, モノ (2-エチルヘキシル) フタレート, フェノフィブラートなど) が含まれていた (図 10c)。以上のことから、PPARA および HNF4A に関連する経路が、成熟速度が速い近位尿細管細胞で活性化され、腎臓オルガノイドの近位尿細管の成熟を促進することが示唆された。

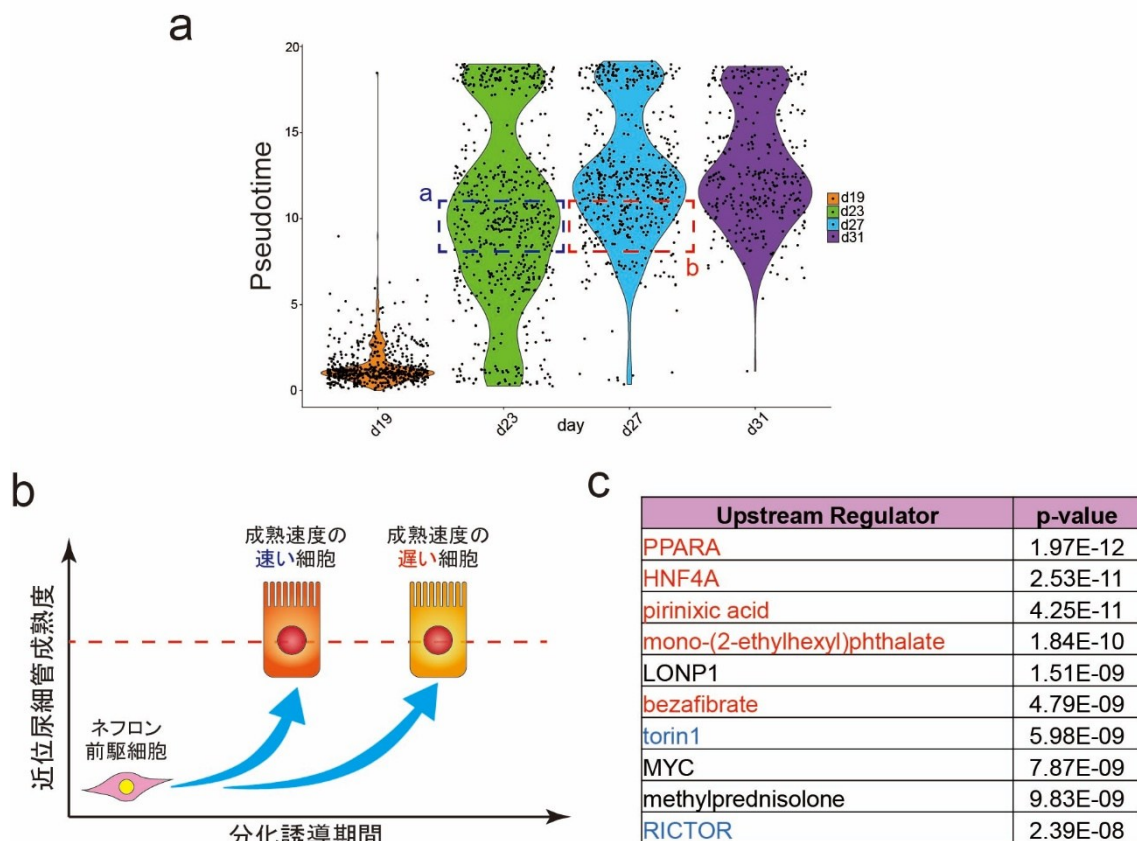


図 10 近位尿管細胞の成熟速度をコントロールする因子の抽出方法

a. 各タイムポイントにおける近位尿管系統細胞の疑似時間に対するバイオリンプロット。青と赤の括弧は、それぞれ 23 日目および 27 日目において、疑似時間が 8~11 の近位尿管細胞を示す。**b.** 成熟化速度を制御する因子の抽出方法の模式図。成熟度順に並べた細胞の同一成熟度において、分化誘導期間の短い細胞は短期間で特定の成熟度に達するため、「成熟化速度の速い細胞」と定義できる。一方、分化誘導期間が長い細胞は、長い時間を経て特定の成熟度に達するため、「成熟化速度の遅い細胞」と定義できる。**c.** IPA を用いた Upstream Regulator の p-value の Top10。赤字は、解析結果により、実験サンプルの発現から Upstream Regulator が活性化されていると予想されたものを示し、青字は不活性化されていると予想されたものを示す。

表 2 時間依存的遺伝子を除外後の day 23 の擬似時間 8~11 で高発現を示す DEG(232 遺伝子)

Gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	Fold change
AP0A1	2.983E-02	0.938	0.448	0.116	7.580E-28	1.918
SLC51B	1.055E-39	0.864	0.824	0.386	2.680E-25	1.820
SLC13A1	4.032E-28	0.783	0.497	0.13	1.175E-23	1.721
TUBB4B	5.318E-190	0.767	1	1	1.351E-185	1.702
S100A1	5.184E-33	0.747	0.606	0.348	1.318E-28	1.678
AOT	5.067E-30	0.728	0.691	0.391	1.287E-25	1.657
SLC39A4	3.105E-38	0.675	0.836	0.58	7.687E-34	1.596
HAO2	1.711E-18	0.651	0.1	0.087	4.347E-14	1.570
RON	9.136E-23	0.640	0.667	0.29	2.321E-18	1.558
ALDH1A1	1.248E-107	0.632	0.982	0.935	3.146E-103	1.549
PSAT1	9.912E-20	0.610	0.521	0.203	2.518E-15	1.527
NIT2	2.269E-59	0.603	0.994	0.964	5.764E-55	1.519
FARP1	2.898E-15	0.590	0.37	0.065	7.363E-11	1.514
ETPH	3.068E-55	0.596	0.964	0.949	7.797E-51	1.512
PPP1R16A	4.501E-33	0.592	0.964	0.797	1.253E-28	1.507
ADPE	0.800E-09	0.575	1	0.993	0.000E-00	1.490
ACSM2A	1.753E-20	0.557	0.715	0.562	4.455E-16	1.471
TPD52L1	1.033E-20	0.543	0.758	0.565	2.623E-16	1.457
SLC34A1	6.740E-14	0.541	0.384	0.072	1.712E-09	1.455
GPX3	1.547E-25	0.540	0.842	0.696	3.741E-21	1.454
NQO2	3.676E-19	0.539	0.758	0.551	1.620E-14	1.453
AZOP1	2.121E-16	0.537	0.436	0.167	5.889E-12	1.451
KL6	7.259E-25	0.514	0.891	0.783	1.844E-20	1.428
MS1	1.889E-19	0.513	0.861	0.659	4.799E-15	1.427
SERPBN1	9.220E-16	0.512	0.564	0.225	2.343E-11	1.426
TUBG1	3.463E-18	0.487	0.799	0.667	8.799E-14	1.401
TMEM256	3.298E-37	0.482	0.988	0.971	8.378E-33	1.397
MSRA	1.448E-14	0.478	0.697	0.384	3.783E-10	1.393
PEBP1	2.449E-01	0.478	1	1	6.730E-07	1.392
STOM	5.729E-16	0.477	0.782	0.522	1.455E-11	1.392
TXNDC17	5.013E-40	0.477	0.982	0.971	1.274E-35	1.391
KIRBP4	2.584E-14	0.475	0.642	0.37	6.571E-10	1.390
GIFR	1.567E-14	0.473	0.715	0.464	3.980E-10	1.388
ACOX2	6.043E-14	0.471	0.6	0.304	1.535E-09	1.387
FTL	0.000E+00	0.471	1	1	0.000E+00	1.386
CHCHD10	3.815E-31	0.471	0.994	0.957	9.693E-27	1.386
GATM	8.180E-16	0.466	0.721	0.5	2.078E-11	1.382
GLTPD2	9.376E-14	0.462	0.721	0.442	2.382E-09	1.377
PERP	6.717E-20	0.457	0.982	0.855	1.706E-15	1.373
MTTP	7.783E-13	0.456	0.521	0.261	9.611E-09	1.372
GAINT11	2.630E-21	0.453	0.945	0.855	5.748E-17	1.369
GALK1	1.068E-13	0.450	0.745	0.507	2.713E-09	1.366
SRFS	2.712E-24	0.443	0.982	0.978	6.899E-20	1.360
TMEM292L2	4.307E-31	0.442	0.988	0.971	1.094E-26	1.358
CD68	3.854E-13	0.432	0.782	0.486	9.470E-09	1.350
SDMI1	4.091E-15	0.431	0.806	0.717	1.039E-10	1.349
IBSD17D14	8.467E-13	0.430	0.752	0.457	2.151E-08	1.347
SLC25A5	5.544E-37	0.425	1	0.993	1.409E-32	1.342
CHP1	5.697E-16	0.422	0.952	0.826	1.447E-11	1.340
MBPL1	7.293E-17	0.418	0.921	0.884	1.853E-12	1.336

Gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	Fold change
ASRGL1	9.166E-12	0.412	0.642	0.471	2.329E-07	1.330
CLDN2	2.477E-11	0.410	0.594	0.275	6.293E-07	1.329
VTN	3.445E-11	0.408	0.491	0.196	9.259E-07	1.327
TMGN3	8.845E-26	0.404	0.994	1	1.739E-21	1.324
DNP41	4.637E-21	0.399	0.992	0.993	1.178E-16	1.319
F12	8.800E-11	0.397	0.558	0.37	2.261E-06	1.317
ACADVL	7.128E-16	0.392	0.97	0.877	1.811E-11	1.312
AGMAT	1.740E-10	0.391	0.636	0.37	4.421E-06	1.312
ATP5PF	9.606E-36	0.390	0.994	1	2.440E-31	1.310
ASR1	2.004E-13	0.390	0.842	0.754	5.092E-09	1.310
SCRN2	2.708E-13	0.387	0.848	0.717	6.881E-09	1.308
TCEA2	1.377E-13	0.383	0.952	0.855	3.499E-09	1.304
LOXN	1.580E-18	0.376	0.976	0.928	4.014E-14	1.298
LNC00671	4.920E-10	0.376	0.673	0.442	1.250E-05	1.298
ATP10V1F	3.202E-47	0.372	1	1	8.136E-43	1.294
PRLD	6.763E-12	0.371	0.848	0.754	1.718E-07	1.294
DPYS	1.307E-11	0.371	0.8	0.63	3.322E-07	1.289
PXMP2	2.201E-10	0.368	0.83	0.594	5.992E-06	1.290
CLDN10	8.543E-13	0.367	0.885	0.732	2.170E-08	1.290
PNP	2.094E-13	0.367	0.945	0.826	5.320E-09	1.290
CMBL	2.445E-09	0.363	0.606	0.348	6.213E-05	1.286
GBC2	2.317E-10	0.362	0.836	0.674	5.887E-06	1.285
APP	4.764E-20	0.360	0.539	0.333	1.210E-15	1.283
APOR	5.569E-09	0.358	0.176	0.022	1.415E-04	1.282
TM7SF2	7.085E-18	0.356	0.988	0.978	1.800E-13	1.280
EC1	5.256E-15	0.355	0.976	0.942	1.335E-10	1.279
CTSV	1.513E-09	0.355	0.291	0.101	3.844E-05	1.279
RGS14	2.807E-11	0.354	0.891	0.797	7.132E-07	1.278
CTSL	5.102E-09	0.352	0.799	0.428	1.296E-04	1.276
OC4R	1.215E-12	0.352	0.845	0.855	3.066E-08	1.276
ACNA2B	8.925E-08	0.348	0.576	0.304	2.267E-04	1.273
ANPAP	8.557E-09	0.348	0.461	0.232	2.174E-04	1.273
IGF2P	3.482E-09	0.345	0.538	0.121	8.064E-05	1.270
KAR1A1	4.158E-13	0.344	0.945	0.942	1.056E-08	1.269
NDUFB10	2.195E-26	0.343	1	1	5.578E-22	1.269
YIF1A	1.904E-12	0.343	0.958	0.906	4.837E-08	1.269
ANXA6	1.073E-08	0.342	0.418	0.283	2.725E-04	1.267
PORL1	1.310E-18	0.340	1	1	3.329E-14	1.266
LRP2	1.174E-08	0.340	0.703	0.529	2.983E-04	1.266
BAG3	7.630E-11	0.338	0.921	0.848	1.938E-06	1.264
CYP27A1	3.568E-12	0.337	0.952	0.862	9.064E-08	1.263
SRFS	3.851E-26	0.335	0.83	0.474	1.004E-04	1.261
RAK29	7.347E-09	0.334	0.812	0.659	1.994E-04	1.261
PRDX	4.833E-35	0.333	1	1	1.228E-30	1.260
GPRD8	1.976E-22	0.331	0.994	1	5.021E-18	1.258
CT11aE54	7.976E-12	0.331	0.964	0.877	2.026E-07	1.258
GPD1	2.372E-08	0.329	0.739	0.543	6.027E-04	1.256
ALDH9A1	8.670E-10	0.328	0.939	0.812	2.203E-05	1.255
ADH5	1.939E-12	0.326	0.976	0.984	4.925E-08	1.253

Gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	Fold change
SLC25A1	1.763E-09	0.323	0.891	0.79	4.480E-05	1.251
DHRS11	2.524E-08	0.322	0.418	0.167	6.413E-04	1.250
HDH2	3.660E-11	0.322	0.97	0.935	9.320E-07	1.250
PC	1.875E-08	0.322	0.424	0.145	4.764E-04	1.250
PECR	7.399E-08	0.322	0.733	0.543	1.880E-03	1.250
KLHDC3B	4.411E-08	0.321	0.758	0.63	1.121E-03	1.249
SIX1G1	7.027E-11	0.321	0.945	0.942	1.785E-06	1.249
TMEM150A	1.280E-10	0.320	0.952	0.899	3.252E-06	1.248
AOTRAP	8.365E-09	0.319	0.897	0.754	2.125E-04	1.247
PLIN2	4.753E-10	0.316	0.915	0.804	1.208E-05	1.245
DDIT3	1.165E-07	0.315	0.539	0.261	2.960E-03	1.244
ABCC3	4.406E-08	0.315	0.388	0.167	1.119E-03	1.244
TSC22D3	6.416E-08	0.315	0.655	0.543	1.630E-03	1.244
NABP1	8.876E-08	0.314	0.479	0.232	2.255E-03	1.243
DCXR	8.133E-09	0.314	0.915	0.783	2.066E-04	1.243
CTSF	1.117E-07	0.309	0.376	0.203	2.837E-03	1.239
SLCNR1	6.360E-08	0.309	0.255	0.116	1.616E-03	1.239
NDUFAF2	2.104E-07	0.308	0.77	0.587	5.344E-03	1.238
SLC25A4	5.874E-09	0.307	0.964	0.826	1.492E-04	1.237
CALM1	3.090E-14	0.306	0.988	0.978	7.850E-10	1.236
INTG4	2.511E-07	0.306	0.521	0.254	6.379E-03	1.236
DCDC2	3.062E-10	0.305	0.958	0.862	7.779E-06	1.235
ATP5FD1	3.170E-19	0.303	0.982	1	8.054E-15	1.234
ARC6A	4.120E-07	0.303	0.467	0.304	1.047E-02	1.234
GGH	6.035E-08	0.303	0.848	0.768	1.531E-03	1.233
AKR7A2	1.252E-09	0.302	0.766	0.884	3.182E-05	1.233
UGCG	1.788E-12	0.302	0.994	0.92	4.568E-08	1.233
CYB5A	1.456E-18	0.301	1	1	3.699E-14	1.232
NOP2P	4.914E-07	0.301	0.624	0.399	1.249E-02	1.232
SAT1	3.469E-10	0.300	0.933	0.884	8.812E-06	1.231
SKORR	1.835E-08	0.300	0.891	0.848	4.663E-04	1.231
PRDX1	2.795E-23	0.299	0.994	1	7.102E-19	1.231
GILS	3.009E-09	0.299	0.945	0.877	7.644E-05	1.230
ACADM	1.811E-07	0.299	0.812	0.71	4.602E-03	1.230
RASL12	5.101E-07	0.298	0.521	0.312	1.296E-02	1.229
MZT2B	1.950E-15	0.296	0.994	0.986	4.955E-11	1.228
TMFM2B	3.866E-07	0.296	0.491	0.232	9.822E-03	1.228
PTGR1	5.760E-16	0.296	0.952	0.993	1.463E-11	1.228
AGPAT3	7.668E-07	0.296	0.642	0.486	1.948E-02	1.227
RAH30-AS1	7.643E-07	0.295	0.636	0.362	1.942E-02	1.227
DDT	3.229E-09	0.295	0.939	0.92	8.203E-05	1.227
INTV1	3.548E-49	0.294	1	1	9.014E-45	1.226
SERPBN6	6.388E-07	0.294	0.539	0.319	1.624E-02	1.226
TLR4	6.229E-07	0.293	0.479	0.29	1.583E-02	1.225
CDP1	6.220E-07	0.293	0.539	0.312	1.580E-02	1.225
PSPI1	8.893E-07	0.293	0.576	0.37	2.259E-02	1.225
MRPS15	1.011E-07	0.292	0.921	0.819	2.276E-03	1.224
NDUFA4	1.814E-26	0.292	0.994	1	4.609E-22	1.224
FNDCK1	1.245E-06	0.290	0.618	0.399	3.162E-02	1.222
SEPHS2	2.452E-11	0.287	0.988	0.971	6.229E-07	1.220

Gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	Fold change	Gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	Fold change
NTRCP	9.831E-07	0.287	0.788	0.63	2.498E-02	1.220	ECI1	7.911E-10	0.256	0.945	0.978	2.010E-05	1.195
LAMTOR5	5.742E-21	0.286	1	0.993	1.459E-16	1.220	NDUFS2	1.250E-06	0.256	0.945	0.855	1.177E-02	1.194
GAMT	1.170E-06	0.286	0.697	0.529	2.973E-02	1.219	ALKBH7	2.422E-08	0.255	0.994	0.971	6.153E-04	1.194
PDLIM2	6.377E-07	0.284	0.8	0.674	1.620E-02	1.218	RPS18	1.098E-80	0.255	1	1	2.790E-76	1.193
TMEM205	2.250E-08	0.284	0.939	0.92	5.717E-04	1.218	RBM3	5.858E-09	0.255	0.982	0.971	1.488E-04	1.193
FCRL8	7.383E-07	0.284	0.412	0.232	1.876E-02	1.218	MPC1	5.696E-07	0.254	0.933	0.877	1.447E-02	1.192
ACAT1	9.243E-09	0.283	0.903	0.855	2.548E-04	1.217	NDUFP1	3.572E-07	0.254	0.952	0.913	9.074E-03	1.192
PRDX5	1.746E-07	0.283	0.315	0.072	4.480E-03	1.217	GLOD4	1.004E-06	0.254	0.952	0.913	3.550E-02	1.192
ITR2	1.438E-06	0.283	0.624	0.486	3.652E-02	1.216	PRDX2	5.948E-18	0.252	0.994	1	1.511E-13	1.191
CDH6	1.594E-06	0.281	0.697	0.58	4.050E-02	1.215	OSTC	2.464E-09	0.250	1	0.993	6.260E-05	1.189
PTF1	1.892E-08	0.281	0.952	0.884	4.808E-04	1.215	5CGB2A1	1.954E-06	-0.253	0.018	0.159	4.964E-02	0.839
RC3	2.893E-09	0.280	0.958	0.884	3.549E-05	1.214	LINC02171	1.937E-07	-0.255	0.001	0.297	9.12E-03	0.838
LINC01781	1.024E-20	0.279	1	0.986	2.602E-16	1.213	CLDN11	2.443E-07	-0.269	0.121	0.13	6.205E-03	0.830
C1QTNF12	5.316E-08	0.277	0.885	0.71	1.351E-03	1.212	BASP1	3.542E-09	-0.277	0.848	0.913	8.999E-05	0.825
CTSB	4.530E-09	0.277	0.964	0.928	1.152E-04	1.212	MAI	3.387E-08	-0.280	0.061	0.196	8.606E-04	0.824
EIF3K	8.762E-14	0.276	0.994	1	2.226E-09	1.210	FFEMPI1	5.989E-08	-0.284	0.133	0.319	1.521E-03	0.821
OSPE1	0.678E-20	0.275	0.994	1	2.205E-15	1.210	RX1	3.797E-08	-0.289	0.521	0.725	9.647E-04	0.818
HSNRP8	8.564E-07	0.275	0.861	0.717	2.176E-02	1.210	FXR1D2	6.357E-09	-0.295	0.848	0.92	1.615E-04	0.815
TUFM	1.249E-11	0.274	0.994	0.993	3.172E-07	1.209	PLEKHA1	5.837E-17	-0.320	0.264	1	1.483E-12	0.801
DUSP23	1.185E-06	0.274	0.782	0.696	3.011E-02	1.209	BLNK	6.208E-09	-0.335	0.207	0.514	1.577E-04	0.793
TMEM47	1.295E-08	0.273	0.988	0.935	3.292E-04	1.208	PLC4	4.054E-10	-0.336	0.733	0.855	1.039E-05	0.792
GDH	1.962E-09	0.273	0.982	0.971	9.986E-05	1.208	RXN	5.669E-10	-0.338	0.606	0.812	1.440E-05	0.791
SMNBS2	4.830E-07	0.273	0.279	0.094	1.227E-02	1.208	SLC12A1	4.177E-10	-0.358	0.048	0.13	1.06E-05	0.780
IGD	7.777E-09	0.273	0.964	0.942	1.978E-04	1.208	COH1L3	1.249E-10	-0.361	0.655	0.826	1.173E-06	0.779
SLC3A2	9.437E-08	0.272	0.933	0.877	2.398E-03	1.207	SLIT1RKS	2.138E-10	-0.363	0.164	0.464	5.432E-06	0.777
PFB	6.212E-11	0.271	1	0.971	1.586E-06	1.207	WDFC2	6.903E-11	-0.374	0.17	0.275	1.754E-06	0.772
COYE	8.346E-11	0.270	1	0.986	2.118E-06	1.206	LINC02381	1.301E-16	-0.386	0.807	0.928	3.305E-12	0.765
BSY1	4.747E-07	0.270	0.291	0.094	1.137E-02	1.206	PKM	3.464E-16	-0.414	0.764	0.957	8.800E-12	0.751
VPSB1	1.423E-06	0.270	0.861	0.746	3.616E-02	1.206	CA12	2.640E-13	-0.420	0.273	0.478	6.707E-09	0.747
HADHB	5.256E-07	0.269	0.903	0.79	1.330E-02	1.205	RXN5	3.077E-16	-0.435	0.691	0.899	7.817E-12	0.740
HDHD3	1.065E-07	0.269	0.909	0.92	2.708E-03	1.205	CPE	2.698E-16	-0.466	0.503	0.703	6.854E-12	0.724
NDUFB8	3.882E-10	0.268	0.976	0.978	9.862E-06	1.204	WN17H	7.442E-11	-0.491	0.024	0.312	1.891E-06	0.711
PCSK1N	3.226E-14	0.268	0.964	0.92	8.195E-10	1.204							
ZNHIT1	8.834E-11	0.268	0.988	0.993	1.736E-06	1.204							
CRYL1	1.886E-10	0.268	0.982	0.978	4.792E-06	1.204							
PSMD7	2.128E-08	0.267	0.976	0.942	5.407E-04	1.203							
COX4I1	3.491E-16	0.267	1	1	8.868E-12	1.203							
TMBM46	1.914E-29	0.266	1	1	4.863E-25	1.203							
ATP9F1	6.955E-30	0.266	1	1	1.767E-25	1.202							
NDUFB5	1.148E-08	0.266	0.97	0.964	2.917E-04	1.202							
UQCRCB1	1.624E-09	0.266	0.994	0.978	4.127E-05	1.202							
PRK2	1.038E-06	0.266	0.321	0.101	2.613E-02	1.201							
EPHX2	6.821E-08	0.264	0.97	0.891	1.735E-03	1.201							
TKCR	1.065E-10	0.263	0.982	0.986	2.781E-06	1.200							
LJMDA4	6.522E-07	0.263	0.267	0.058	1.657E-02	1.200							
HADHA	3.613E-09	0.258	0.982	0.971	9.179E-05	1.196							
NDUFB3	1.110E-07	0.257	0.97	0.971	2.819E-03	1.195							
ACAA1	1.300E-07	0.257	0.945	0.935	3.304E-03	1.195							
COX6A1	4.337E-21	0.257	1	1	1.102E-16	1.195							
BH3	5.807E-14	0.256	0.988	1	1.475E-09	1.195							

3-7 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いた遺伝子発現量の比較

これまでの scRNA-seq 解析から、腎臓オルガノイド内の近位尿細管細胞で成熟速度の速い細胞において高発現する DEGs が、PPAR α 経路の下流ターゲットとして特定された。そのため、PPAR α アゴニストとターゲット遺伝子の転写活性化に必要なヘテロダイマーを形成する RXR α (retinoid X receptor alpha) アゴニストを培地に添加することで、これらの DEGs を上方制御し、近位尿細管の成熟を促進できるかを検証した (図 11, 図 12a, b)。サブクラスター解析 (図 7e-j) によると、腎臓オルガノイドの分化誘導は 15 日目には近位-遠位のパターンがすでに開始していることが観察されたため、15 日目からアゴニスト、アンタゴニストを添加し、23 日目の腎臓オルガノイドをサンプリングして、Magnetic cell sorting (MACS) を用いて近位尿細管細胞を分離した (図 12a, b)。

PPAR α と RXR α アゴニスト (PPAR α アゴニスト処置群) を組み合わせて処理した分化誘導方法で作製した腎臓オルガノイドから精製した近位尿細管細胞において、PPAR α 経路の下流遺伝子の発現レベルが上昇し、近位尿細管細胞における PPAR α 経路の活性化が確認できた (図 12c)。さらに、近位尿細管成熟マーカー (図 12e) がアゴニスト処置群で有意に上昇した。一方、PPAR α アンタゴニスト GW6471 および RXR α アンタゴニスト HX531 は、PPAR α 経路の下流遺伝子及び、近位尿細管成熟マーカーの発現を低下させた (図 12d, f)。近位尿細管マーカー遺伝子については、いくつかの遺伝子は PPAR α アゴニスト処置により発現が有意に増加しており (LRP2, CUBN, SLC34A1, ABCB1), それ以外の遺伝子も、有意差はないものの増加傾向であった (SLC22A2, SLC31A1, SLC27A2, SLC47A2) (図 12g)。

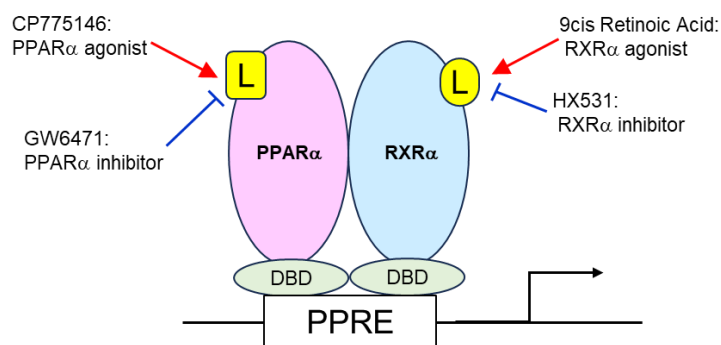


図 11 PPAR α の転写活性化の模式図とそれぞれのアゴニストと阻害剤

PPAR α は RXR α とヘテロダイマーを形成し、DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain: DBD) が PPAR 応答配列 (PPAR response element: PPRE) に結合することで転写活性化される。また、それぞれの核受容体のリガンド結合部位に対するアゴニストと阻害剤を示す。

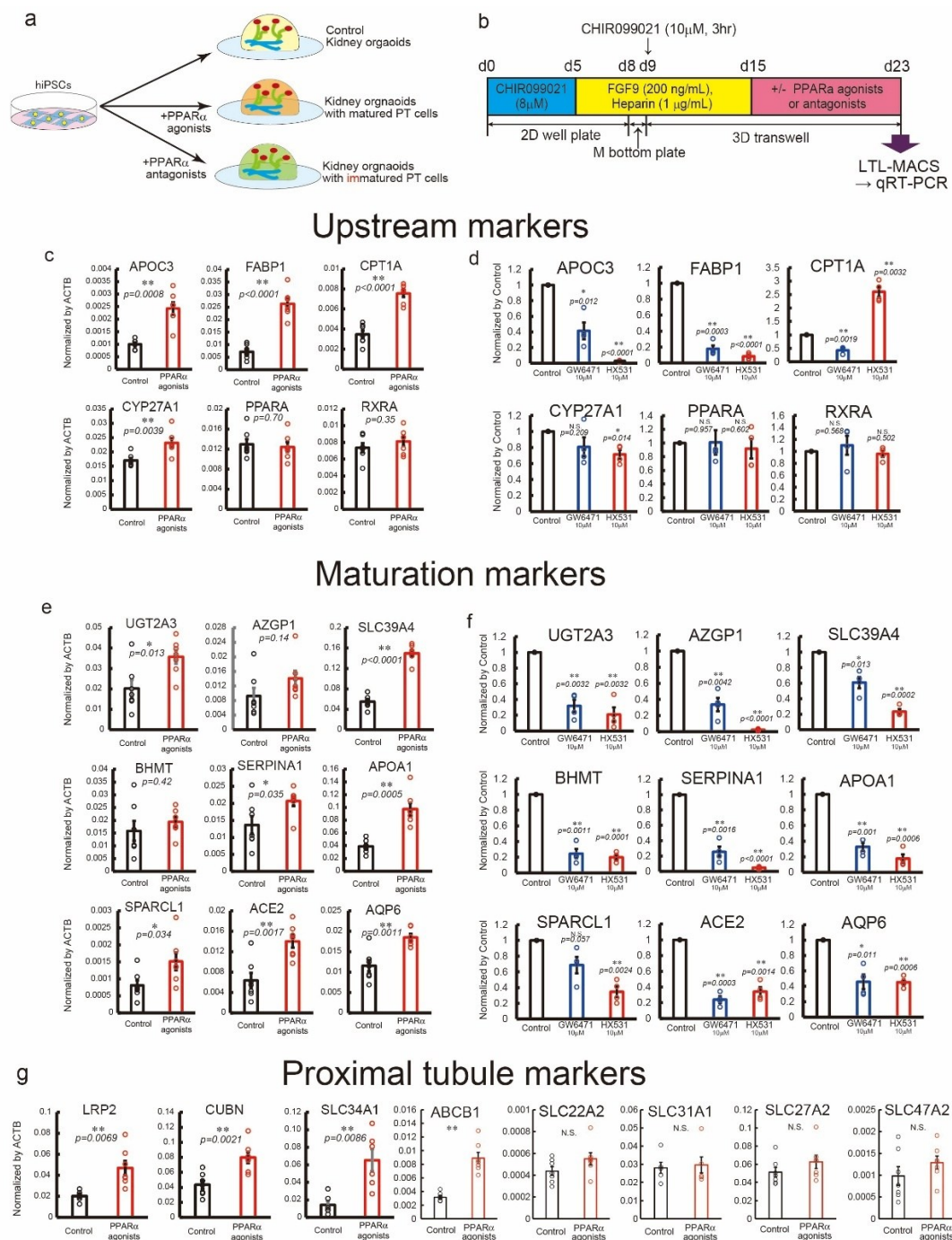


図 12 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いた遺伝子発現量の比較

a, b. iPS 細胞から腎臓オルガノイドを誘導するプロトコルの模式図。PPAR α パスウェイの活性化や抑制するような化合物を処置し、3つの条件で試験を実施した。それぞれの化合物は分化誘導 15 日目から加えた。**c, d.** 腎臓オルガノイドの 23 日目における近位尿細管細胞での、PPAR α 経路の下流遺伝子および PPARA と RXRA の発現量を示す。c はアゴニスト処置群、d は阻害剤処置群 (GW6471: PPAR α 阻害剤, HX531: RXR α 阻害剤) の結果を

示す。**e, f.** 腎臓オルガノイドの 23 日目における近位尿細管細胞での成熟マーカー遺伝子の発現量を示す。**e** はアゴニスト処置群, **f** は阻害剤処置群 (GW6471: PPAR α 阻害剤, HX531: RXR α 阻害剤) の結果を示す。**g.** 腎臓オルガノイドの 23 日目における近位尿細管細胞でのマーカー遺伝子の発現量を示す。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表示した。統計的有意性は対応のない t 検定 (両側) で評価した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

3-8 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いたタンパク質再吸収能の評価

近位尿細管の主な機能の 1 つに、尿中に排出されたタンパク質の再吸収がある。ラット胎児の近位尿細管では、発達に伴い細胞内エンドソームの数が増加し、発達の後期には $0.5 \mu\text{m}^2$ を超える小胞が形成されることが報告されている^{14,15}。これらの先行研究に基づき、PPAR α アゴニスト処置群における近位尿細管の機能的成熟を、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて近位尿細管細胞領域あたりのエンドソーム数を定量化することで評価した (図 13)。

その結果、細胞領域あたりのエンドソーム数が有意に増加し、大型エンドソーム ($0.5 \mu\text{m}^2$ 以上) の数も PPAR α アゴニスト処置群で高いことが確認された (図 13e, f)。

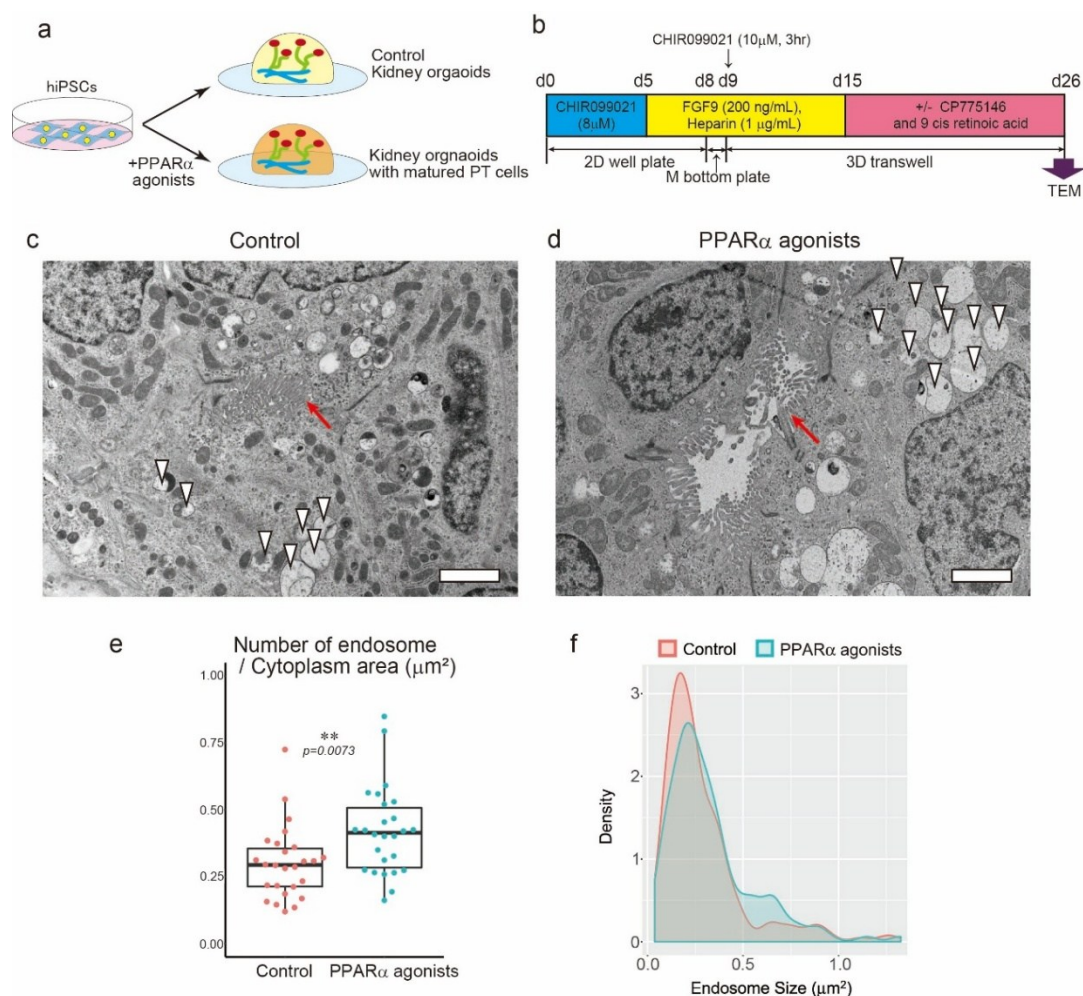


図 13 TEM 画像を用いた近位尿細管成熟化オルガノイドにおけるタンパク質再吸収能の評価

a, b. 腎臓オルガノイドの分化誘導スキーム。c, d. 分化誘導後 26 日目における腎臓オルガノイドの TEM 画像 (c: Control, d: PPAR α アゴニスト処置群)。Control 群, PPAR α アゴニスト処置群ともに、近位尿細管細胞に刷子縁 (赤矢印) が認められ、細胞質には多くの小胞 (エンドソーム (白矢頭)) が認められる。スケールバー: 2 μm 。e. 近位尿細管細胞における細胞質 1 μm^2 当たりのエンドソーム数。f. 各群におけるエンドソームの大きさに対する密度プロット。PPAR α アゴニスト処置群において、エンドソーム数の増加と、大きいサイズ (0.5 μm^2 以上) のエンドソームの割合が増加していることが確認できる。

さらに、近位尿細管細胞の再吸収機能を 10 kDa デキストランの 24 時間取り込み実験を用いて評価した (図 14a, b)。その結果、PPAR α アゴニスト処置群では近位尿細管領域あたりのデキストラン取り込み量が増加した (図 14c, d)。この取り込み量は、PPAR α アンタゴニスト処置群では有意に減少した (図 14e-i)。

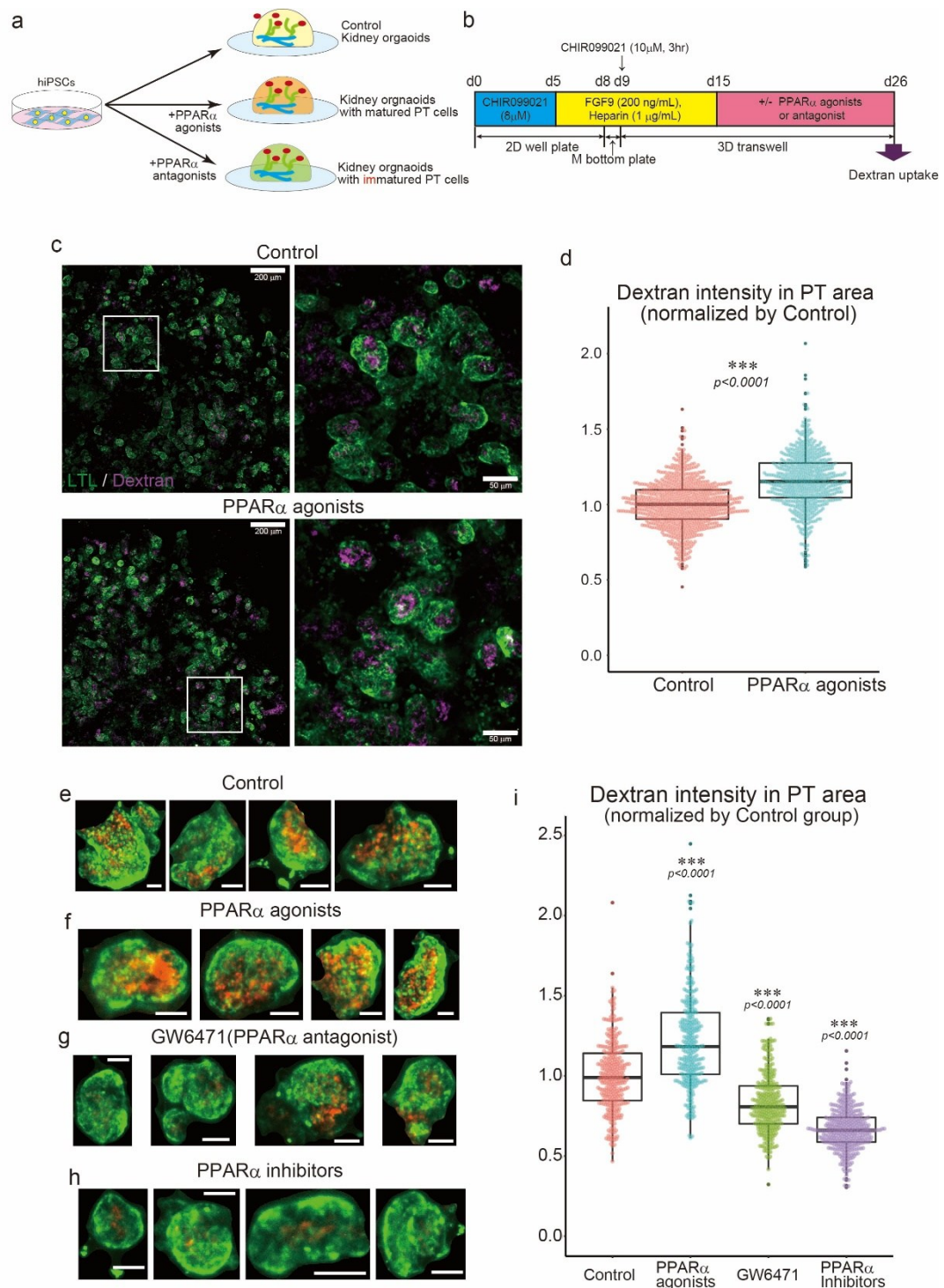


図 14 蛍光デキストランを用いた近位尿細管成熟化オルガノイドにおける再吸収能の評価
a, b. 腎臓オルガノイドの分化誘導スキーム。**c.** コントロール群および PPAR α アゴニスト処置群における, pHrodoTM Red Dextran の腎臓オルガノイドへの取り込みの免疫染色画像を示し, 右のパネルはそれぞれの条件の拡大画像を示す。LTL (近位尿細管): 緑, pHrodoTM

Red Dextran 10,000 MW: マゼンタ, スケールバー: 200 μm および 50 μm . **d.** 近位尿細管 (PT) 領域におけるデキストランの強度のドットプロット (コントロール群で正規化した) を示す; コントロール群: $n = 746$ (5 個のオルガノイド由来), PPAR α アゴニスト処置群: $n = 652$ (5 個のオルガノイド由来)。統計的有意性是对应のない t 検定 (両側) で評価した (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。 **e-h.** 各処理条件下における近位尿細管の免疫染色画像を示す。 **e:** コントロール, **f:** PPAR α アゴニスト処理, **g:** GW6471 (PPAR α 阻害剤) 処理, **h:** PPAR α 阻害剤 (GW6471 と HX531) 併用処理した腎臓オルガノイド近位尿細管の拡大図。 LTL (近位尿細管): 緑, pHrodo™ Red Dextran (10,000 MW): 赤, スケールバー: 200 μm . **i.** 近位尿細管領域におけるデキストランの蛍光強度を, コントロール群で正規化したドットプロットを示す。コントロール群: $n = 313$ (3 個のオルガノイド由来), PPAR α アゴニスト処置群: $n = 295$ (5 個), GW6471 処理群: $n = 293$ (5 個), PPAR α 阻害剤 (GW6471 + HX531) 併用処置群: $n = 375$ (5 個)。統計的有意性是对应のない t 検定 (両側) で評価した (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

3-9 近位尿細管成熟化オルガノイドを用いたシスプラチン毒性評価

ヒト iPS 細胞由来腎臓オルガノイドの作製が報告されて以来, 腎臓オルガノイドが腎毒性スクリーニングに利用されることが期待されている。そこで, シスプラチンを使用して成熟した腎臓オルガノイドが腎毒性試験に適しているか評価した。シスプラチンは近位尿細管細胞に損傷を与える抗がん剤であり, 以前に報告されているように, シスプラチンは腎臓オルガノイドの近位尿細管において用量依存的に細胞死を引き起こす⁶。低用量のシスプラチン (5 μM) でもオルガノイドに最小限の影響を与えることが知られている³⁰。さらに, シスプラチン 5 μM で 1 日処理すると, 近位尿細管で γH2AX 陽性細胞が増加し, シスプラチンによる細胞損傷が示唆されている³¹。細胞で DNA ダメージが生じると, DNA の Double strand break (DSB) 後にヒストン H2AX のリン酸化 (γH2AX) が起こり, DNA 損傷部位でドット状の構造体 (γH2AX foci) を作ることが知られている^{32,33,34}。一方で, 細胞増殖が S 期の細胞では DNA ダメージに関わらず, 細胞核全体で γH2AX 染色が陽性となることが知られている³⁵。そこで, 腎臓オルガノイドにおける, シスプラチンの毒性に対する感受性が, 成熟度が変化したことにより増加するか確認するために, 成熟マーカーの発現が有意に増加する 23 日目から, 1 日間 (24 日目まで) および 6 日間 (29 日目まで) シスプラチンを低濃度 (5 μM) で処置したオルガノイドの γH2AX を評価することで検証した^{30,31} (図 15a, b)。結果として, 1 日間のシスプラチン処理では, 両群ともに, 近位尿細管における γH2AX 陽性細胞の数が有意に増加した。6 日間のシスプラチン処理では, PPAR α アゴニスト処置群での γH2AX の増加がコントロール群に比べて著しく高かった (図 15c-e)。細胞核全体の γH2AX

染色の陽性像については、両群で観察された一方、PPAR α アゴニスト処置群では特に LTL 陽性の近位尿細管において、 γ H2AX foci の陽性像が観察された (Fig. 15c, d, f)。以上のことから、シスプラチン処置により、DNA ダメージが増加することが示された。

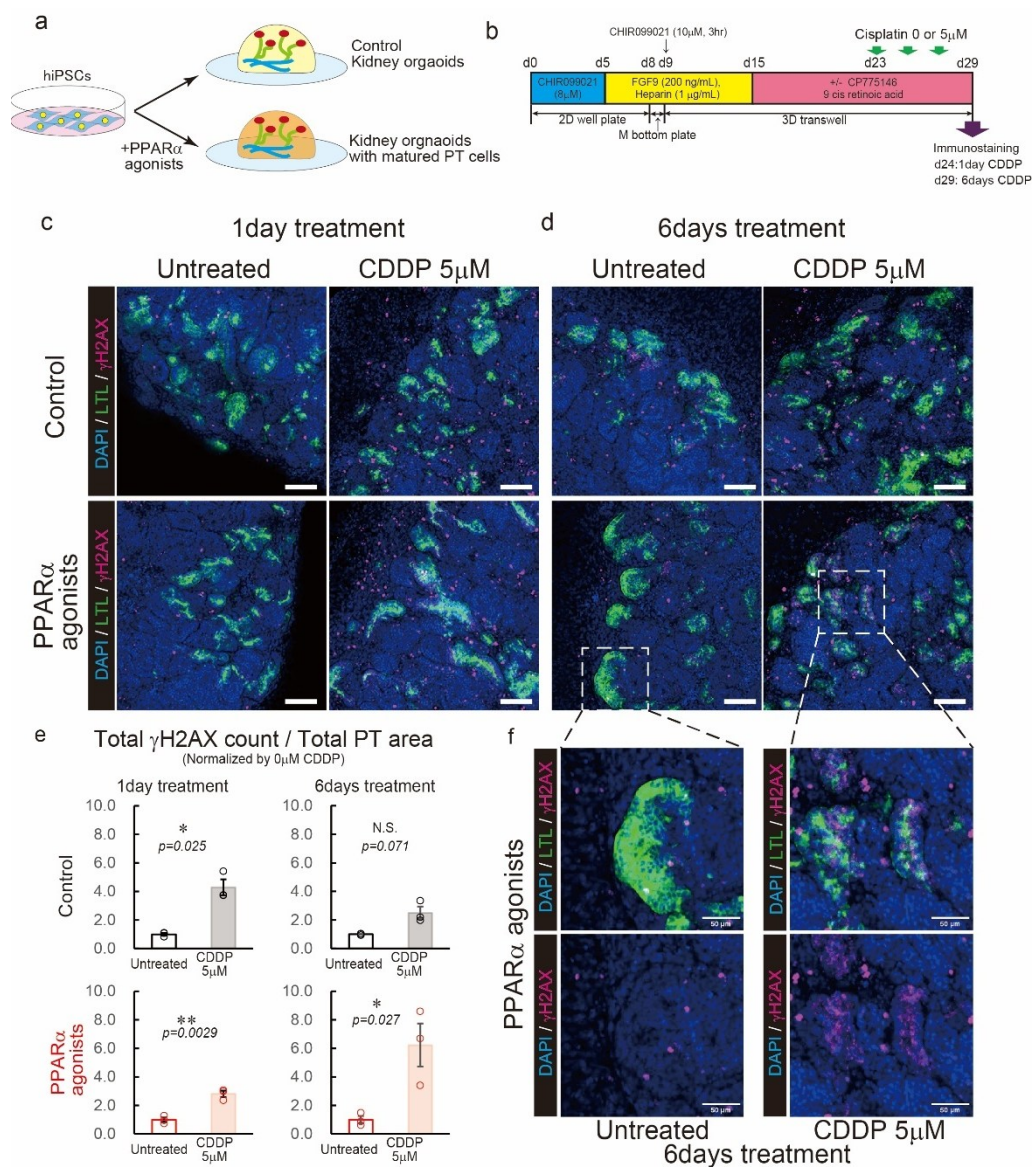


図 15 腎臓オルガノイドの成熟近位尿細管におけるシスプラチン誘発性腎毒性アッセイ

a, b. シスプラチン誘発性腎毒性アッセイのための PPAR α アゴニストで処理したヒト iPS 細胞由来腎臓オルガノイドの誘導プロトコールの模式図。 **c, d.** コントロール群および PPAR α アゴニスト処置群において、シスプラチンを 1 日および 6 日間処理した際の代表的な免疫染色画像。DAPI: 核 (青), LTL: 近位尿細管 (緑), γ H2AX: DNA ダメージマーカー (マゼンタ), スケールバー: 100 μ m. **e.** シスプラチン処理後 (1 日および 6 日) の腎臓オルガノイド内近位尿細管 (PT) 領域における γ H2AX の総数の定量結果。Y 軸は、シスプ

ラチン未処理群の平均値を 1 として正規化した。腎臓オルガノイド全体の画像を取得し、各群 3 個のオルガノイドで染色を実施した。データは平均±標準誤差で表示した (n=3)。統計的有意性是对应のない t 検定 (両側) で評価した (*p<0.05, **p<0.01)。f. PPAR α アゴニスト処置群におけるシスプラチンを 6 日間処理した際の免疫染色画像(d)の一部を拡大した画像を示す。上は DAPI: 核 (青), LTL: 近位尿細管 (緑), γ H2AX: DNA ダメージマーカー (マゼンタ), スケールバー: 50 μ m. 下は DAPI: 核 (青), γ H2AX: DNA ダメージマーカー (マゼンタ), スケールバー: 50 μ m. シスプラチン処置により, DNA の DSB 後に確認される DNA 損傷部位でドット状の構造体 (γ H2AX foci) が観察できる。

近位尿細管の障害マーカーとして、KIM-1 (Kidney injury molecule-1) が知られている。KIM-1 は通常、腎臓にほとんど発現していないが、障害を受けることにより近位尿細管細胞に増加し、その細胞外ドメインが切断されて尿中に放出されるため³⁶, AKI の早期診断と重症度予測の尿中バイオマーカーである^{37,38}。そこで、シスプラチンによる近位尿細管細胞への障害を KIM-1 の免疫染色により評価した。シスプラチン処理 6 日後の KIM-1 の発現は、コントロール群では 2 群間で差はほとんど見られなかった (p = 0.50)。PPAR α アゴニスト処置群においては、有意な差は認められなかったが (p = 0.10), シスプラチン処置で上昇傾向であった (図 15f, g)。

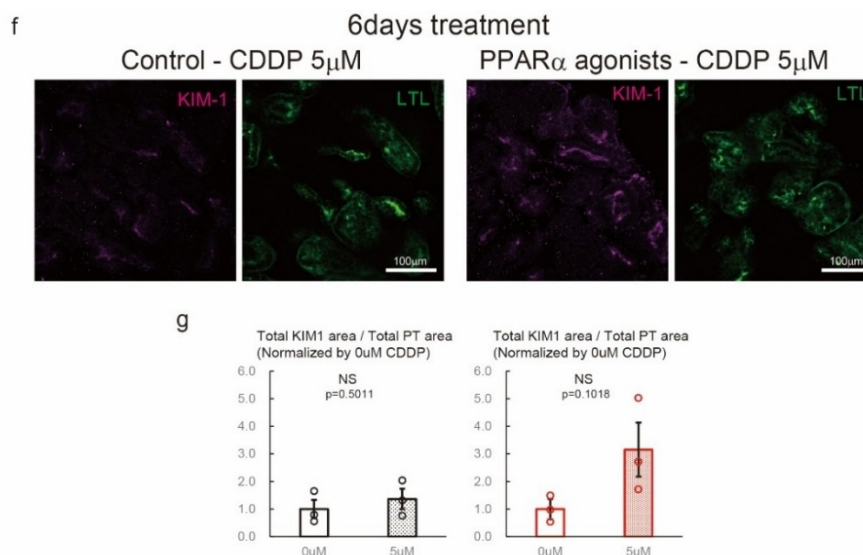


図 15 続き

f. コントロール群および PPAR α アゴニスト処置群において、シスプラチンを 6 日間処理した際の代表的な免疫染色画像。DAPI(核): 青, LTL (近位尿細管): 緑, KIM-1 (近位尿細管障害マーカー): マゼンタ, スケールバー: 100 μ m. g. シスプラチン処理 6 日後の腎

臓器オルガノイド内近位尿細管 (PT) 領域における KIM-1 領域の定量結果。Y 軸は、シスプラチン未処理群の平均値を 1 として正規化した。腎臓オルガノイド全体の画像を取得し、各群 3 個のオルガノイドで染色を実施した。データは平均±標準誤差で表示した (n = 3)。統計的有意性は対応のない t 検定 (両側) で評価した。

シスプラチン処理 6 日後のフローサイトメトリー分析 (図 16a, b) では、コントロール群では近位尿細管細胞群の割合に変化は見られなかった ($p = 0.75$) が、PPAR α アゴニスト処置群では顕著に減少した ($p = 0.06$) (図 16c, d)。これらの結果は、腎臓オルガノイド内で PPAR α シグナルを活性化することが、低用量シスプラチンによる近位尿細管細胞の腎毒性に対する感受性を高める可能性があることを示唆している。

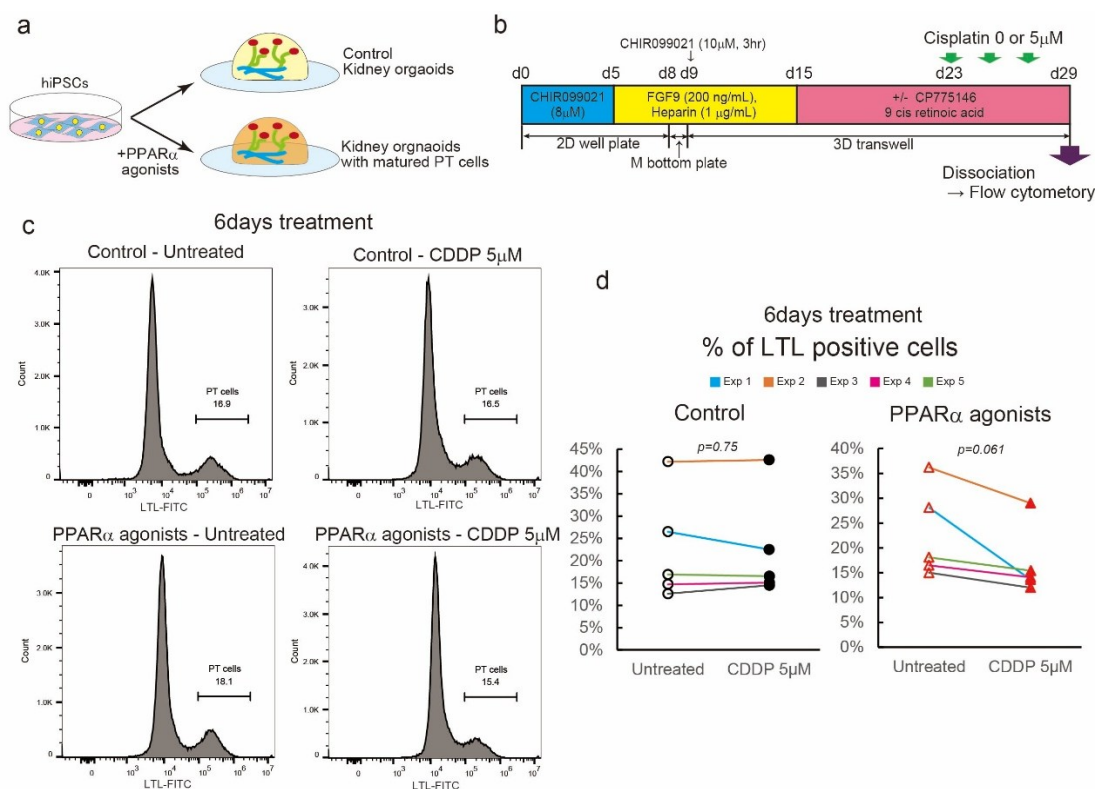


図 16 腎臓オルガノイド中の成熟近位尿細管を用いたシスプラチン誘発性腎毒性アッセイ (フローサイトメトリーの結果)

a, b. シスプラチン誘発性腎毒性アッセイのための PPAR α アゴニストで処理したヒト iPS 細胞由来腎臓オルガノイドの誘導プロトコールの模式図。 **c.** LTL-FITC の代表的なヒストグラム。左上: コントロール群・未処理, 右上: コントロール群・シスプラチン(CDDP) 5 μ M 処理, 左下: PPAR α アゴニスト処置群・未処理, 右下: PPAR α アゴニスト処置群・CDDP 5 μ M 処理。数値は LTL-FITC 陽性細胞 (近位尿細管細胞) の割合を示す。 **d.** コン

コントロール群および PPAR α アゴニスト処置群における, CDDP 5 μ M を 6 日間処理する前後の LTL 陽性細胞の割合。線の色は同一実験の個体を示す (n = 5)。統計的有意性是对应のある t 検定で評価した。

3-10 公共データ（胎児腎・小児腎・成人腎）との成熟度の比較

腎臓オルガノイド内の近位尿細管細胞の成熟度をヒト腎臓と比較するために, 23 日目のコントロール群および PPAR α アゴニスト処置群を対象に scRNA-seq を実施した。はじめに, 取得した腎臓オルガノイド 23 日目の scRNA-seq データを, Kidney Cell Atlas (KCA) から取得可能なヒト胎児腎の scRNA-seq データと統合し (図 17a), 胎児のアノテーションと既知のマーカー遺伝子に基づいて 9 つのクラスターをアノテーションした (図 17b, c, e) その結果, 腎臓オルガノイドと胎児腎ともに, すべてのクラスターにおいて, 細胞が存在していることを確認した (図 17b, d)。また, それぞれのクラスターの存在比については, 胎児腎サンプルでは, NPC/PTA/SSB (CL1, 2), Stroma (CL3, 7, 8), 血管内皮細胞 (CL6) の割合が多く, ポドサイト (CL0) は腎臓オルガノイドのサンプルで多い割合を示した (図 17b, d)。一方で, 近位尿細管 (CL4), ヘンレのループ, 遠位尿細管 (CL5) は胎児腎と腎臓オルガノイドではほぼ同程度の割合を示した (図 17b, d)。

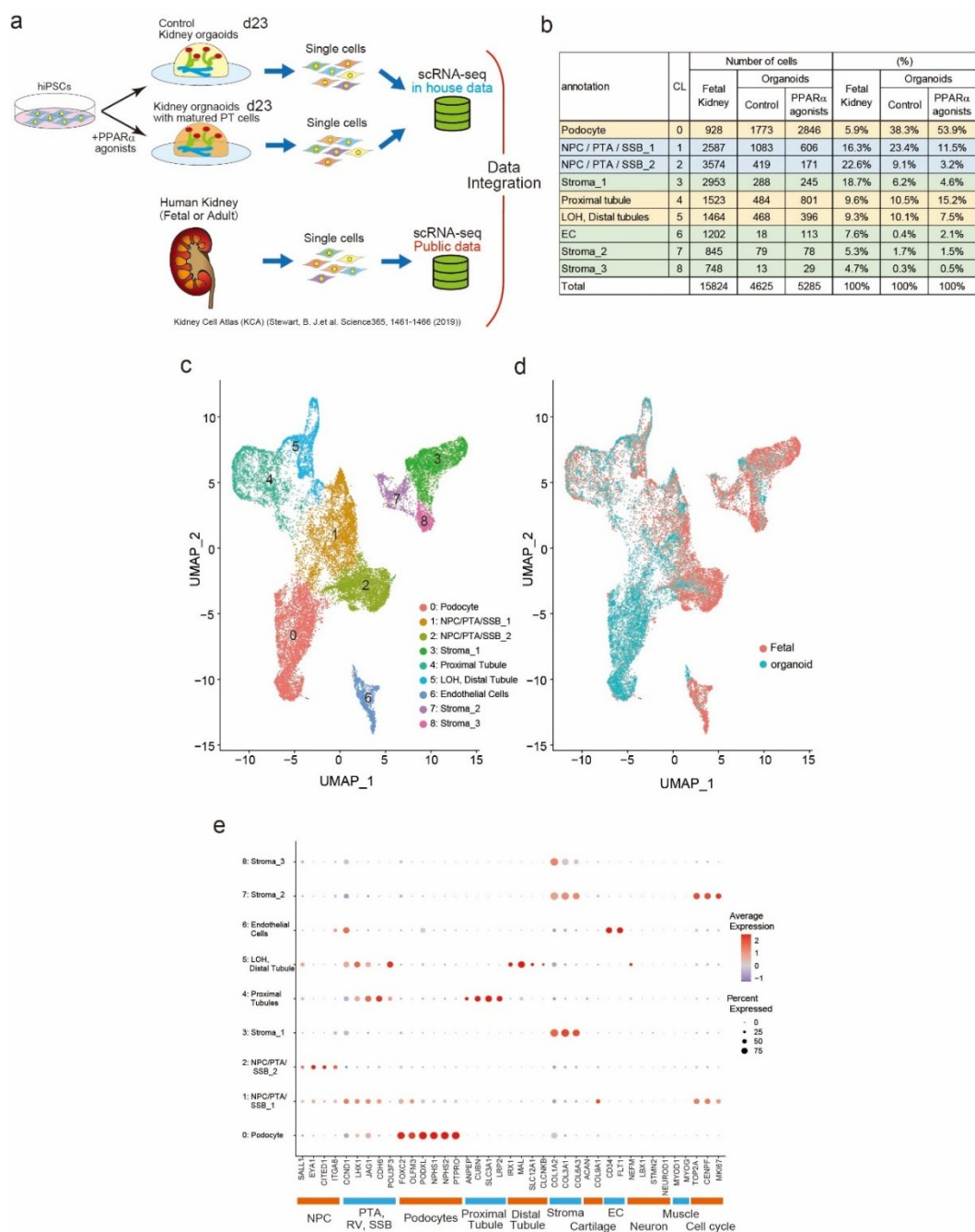


図 17 scRNA-seq を用いた、胎児、小児、成人の腎臓および腎臓オルガノイド内の近位尿管細胞の成熟度の比較

a. 腎臓オルガノイド及びヒト腎臓組織（胎児・小児・成人）から得られた scRNA-seq の公共データとの統合の模式図。 **b.** 腎臓オルガノイドと胎児データの scRNA-seq を統合した後のクラスター内の細胞数と割合の表を示す。 **c, d.** 腎臓オルガノイドおよび胎児腎における UMAP プロット。c はクラスターごと、d はデータの由来ごとに色分けしたプロットを示す。 **e.** すべてのクラスターにおける既知の腎臓マーカー遺伝子のドットプロット。

次に、これらの近位尿細管細胞の成熟度を胎児・小児および成人腎と比較するために、胎児腎における mSSB と近位尿細管細胞の間の DEGs を取得し、KCA の胎児 mSSB, PT, および KCA の小児 PT に対して主成分分析 (Principal component analysis: PCA) を実施した (図 18a)。このデータを用いて成熟度の擬似時間を作成し、オルガノイドの近位尿細管細胞を胎児, 小児, 成人サンプルと比較した。その結果, PPAR α アゴニスト処置群はコントロール群よりもわずかに高い擬似時間位置にシフトした (図 18b)。注目すべきことに、腎臓オルガノイドにおける近位尿細管細胞の成熟度は、ヒト胎児腎の成熟度の範囲内にとどまっていた (図 18b)。

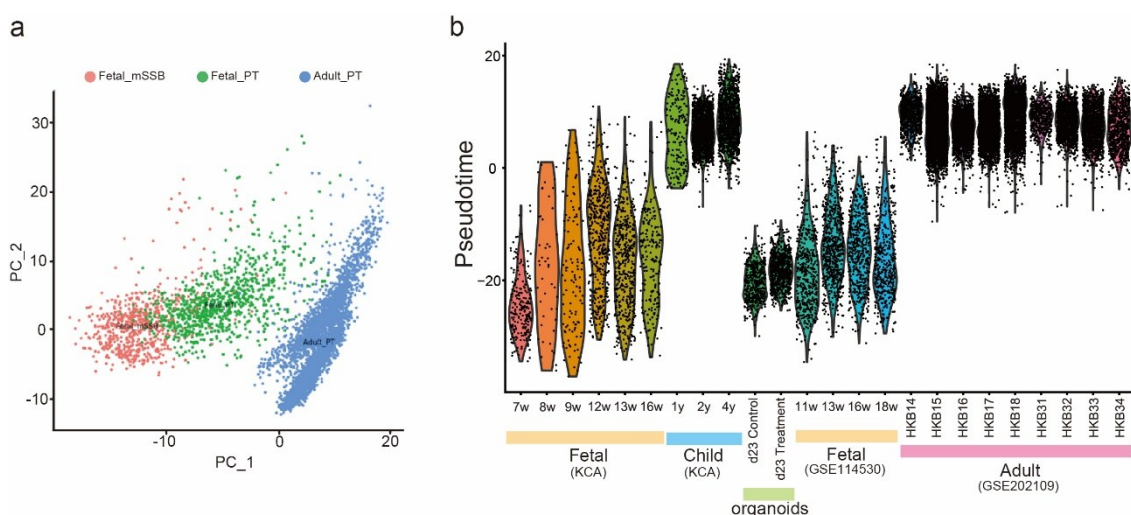


図 18 腎臓オルガノイド由来近位尿細管細胞と公共データからの近位尿細管細胞の成熟度の比較

a. KCA データベースから取得した、胎児 mSSB, PT および小児 PT の細胞に対しての主成分分析(PCA)。PC_1 の軸が成熟度と関連している可能性が示唆される。**b.** KCA 胎児, KCA 小児, 腎臓オルガノイド, 胎児腎 (GSE114530), 成人腎 (GSE202109) における近位尿細管の成熟度の擬似時間のバイオリンプロット。a で作成した成熟度の疑似時間軸 (PC_1) を胎児腎 (GSE114530), 成人腎 (GSE202109) のサンプルにも適応させ、軸の正当性を示した。PPAR α 処置オルガノイドでは、わずかに成熟度が上昇している傾向がみられるが、胎児期の腎臓の成熟度と同程度であり、小児や成人の腎臓の成熟度には達していない。

3-11 近位尿細管成熟化処置におけるネフロンに与える影響について

これまで, PPAR α 経路を活性化させることにより作製した腎臓オルガノイドは近位尿細管の成熟度を増加させることを示した。次に, この PPAR α 経路を活性化することによる他の腎臓のセグメントへの影響について検証した。コントロール群, PPAR α 処置群における, 分化誘導後 23 日の scRNA-seq の結果から, ネフロン構成細胞のうち, ポドサイト, 近位尿細管, 遠位尿細管の割合について検証すると, PPAR α アゴニスト処理の有無にかかわらず, 近位尿細管細胞の割合は変化していない可能性が示された (図 19a)。しかし, ポドサイトに関してはわずかに増加, 遠位尿細管についてはわずかに減少する傾向がみられた (図 19a)。それぞれのクラスター内において, 成熟マーカー (図 9c,d) のバイオリンプロットを用いて 2 群間で比較すると, 近位尿細管クラスター (CL4) では, PPAR α アゴニスト処置群の方がこれらのマーカーを発現する細胞の割合が高いことが確認された (図 19b 右)。またこれらの成熟マーカーの発現は, 予想した通りポドサイトクラスター (CL0) や遠位尿細管クラスター (CL5) では PPAR α アゴニストによって上方制御されることはなかった (図 19c 右, d 右)。しかし, CL5 の細胞においては, マーカー遺伝子の発現はわずかに PPAR α アゴニスト処置群で高い可能性が示された。

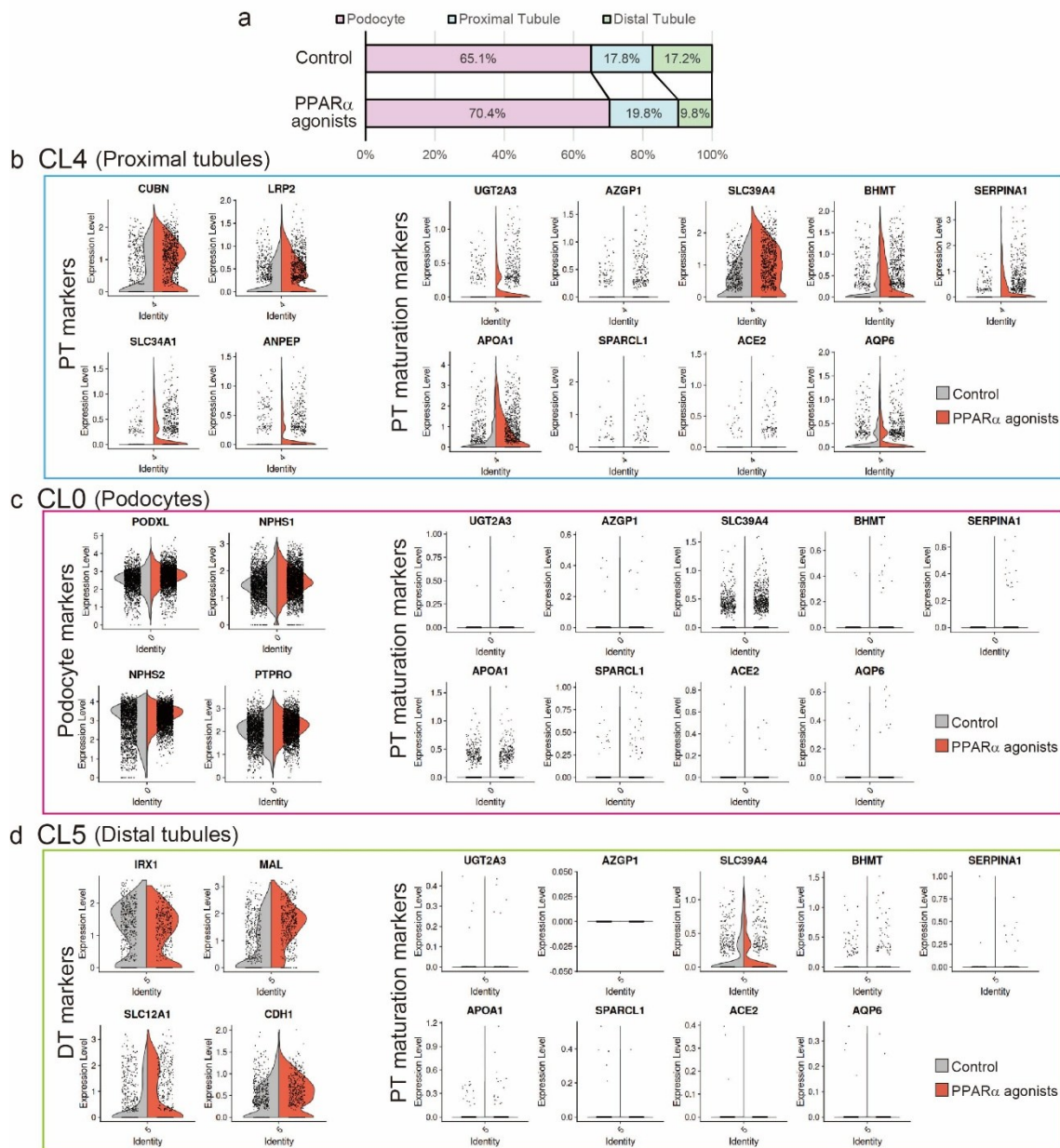


図 19 scRNA-seq データを用いたコントロール及び PPAR α アゴニスト処置腎臓オルガノイドの比較

a. コントロール及び PPAR α アゴニスト処置腎臓オルガノイドにおけるポドサイト、近位尿細管、遠位尿細管の割合の変化の棒グラフ。 b, c, d. コントロール及び PPAR α アゴニスト処置腎臓オルガノイドにおける近位尿細管クラスター (CL4, b), ポドサイトクラスター (CL0, c), 遠位尿細管クラスター (CL5, d) でのそれぞれのマーカー遺伝子 (左) と近位尿細管成熟化マーカー遺伝子 (右) のバイオリンプロット。ドットは個々の細胞を示す。

腎臓オルガノイド全体の免疫染色画像では、両群間で個々のネフロンセグメント構造に明らかな変化は認められなかった（図 20a, b）。また、腎臓オルガノイド内の近位尿細管細胞集団（LTL-FITC 陽性）の割合には、両群間で有意差はなく（図 20c, d），これは、PPAR α 経路の活性化がネフロン発達初期における運命決定に影響を及ぼさないことを示唆している。以上の結果から、腎臓オルガノイドにおける近位尿細管の成熟マーカーが PPAR α 経路を介して調節されることを示唆している。

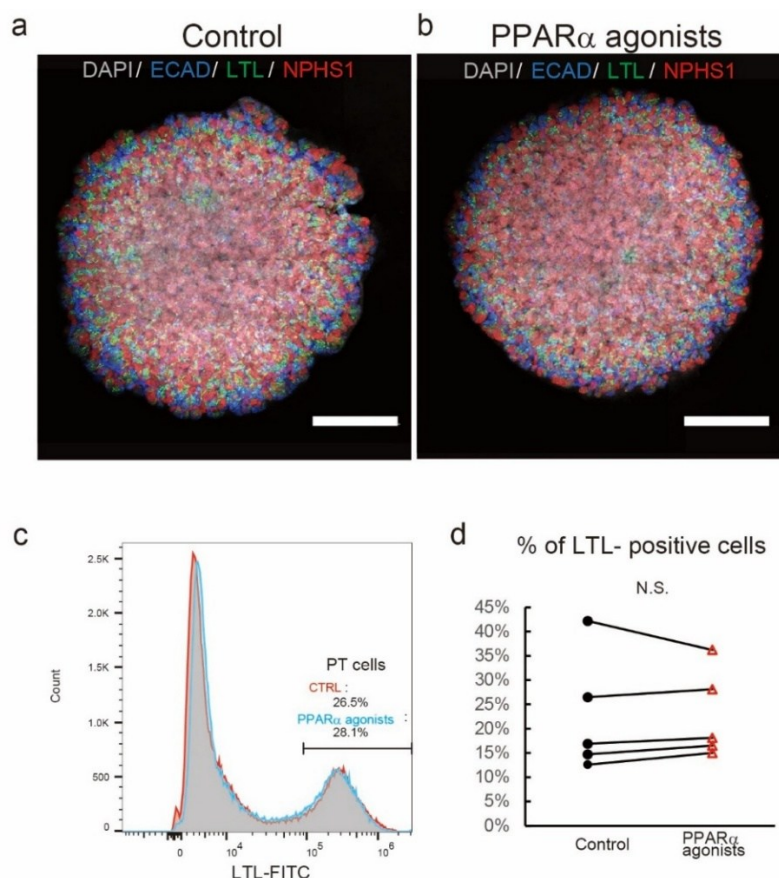


図 20 免疫染色及びフローサイトメトリーによるコントロール及び PPAR α アゴニスト処置腎臓オルガノイドの比較

a, b. 分化誘導後 23 日目におけるコントロール(a)及び PPAR α アゴニスト処置(b)腎臓オルガノイドの免疫染色画像。スケールバー：1 mm。DAPI（核）：白, ECAD（遠位尿細管）：青, LTL（近位尿細管）：緑, NPHS1（糸球体）：赤。 c. LTL-FITC の代表的なヒストグラム。赤線: コントロール群, 青線: PPAR α アゴニスト処置群。数値は LTL-FITC 陽性細胞（近位尿細管細胞）の割合を示す。 d. コントロール群および PPAR α アゴニスト処置群における LTL 陽性細胞の割合。線は同一実験の個体を示す (n = 5)。統計的有意性は対応のある t 検定で評価した。

第四章

考察

本研究では、分化誘導日数の異なる腎臓オルガノイドを用いて、scRNAseq を行うことにより、ヒト iPS 細胞由来腎臓オルガノイド内に Heterogeneity が存在し、近位尿細管細胞の成熟速度の異なる細胞における遺伝子発現の違いから、PPAR α 経路が近位尿細管細胞の成熟速度を促進していることが明らかとなった。また、PPAR α アゴニストを活性化させた分化誘導法により作製した腎臓オルガノイドの近位尿細管細胞において、疑似時間の後期で高発現している遺伝子の発現レベルの有意な上昇を認めた。また、成熟化した腎臓オルガノイドの近位尿細管では、尿細管再吸収に関連するエンドソーム量の増加、及び近位尿細管へのデキストラン取り込みの増加が認められ、近位尿細管の機能としても成熟度が高まっていることが明らかとなった。この腎臓オルガノイドを用いたシスプラチン処置による腎毒性評価については、成熟化した近位尿細管細胞を持つ腎臓オルガノイドでより、シスプラチンによる細胞死の増加が認められ、*in vitro* における腎臓オルガノイドを用いた薬剤の評価に有用であると示唆された。

4-1 分化誘導方法の最適化

本研究では、腎臓オルガノイドの近位尿細管細胞の heterogeneity を確認し、成熟速度の異なる細胞群が scRNA-seq で検出できるか検討するため、分化誘導法の最適化を行った。腎臓発生におけるネフロン前駆細胞からネフロン構成細胞が発生していく過程での成熟速度に差がみられるかどうかを検出するために、ネフロン構成細胞が分化する最初のステップである、MET のタイミングをそろえる必要があると考えられた。そこで、腎臓オルガノイドの分化誘導過程において、MET を模倣する刺激である CHIR パルスをしない条件下で、自発的に MET が起こり始める時期について検討した。その結果、MET 後に発生する RV のマーカーである LHX1 の発現は、9日目ごろより発現が増加していくことから、9日目には、上皮化できるような分化状態であること、また、一部の細胞で MET による上皮化が起こり始めていると考えられる。よって、9日目に CHIR パルスを行うことで、強制的にすべての細胞で MET を起こすシグナルを与え、上皮化のスタート時点を統一することができると考え、CHIR パルスの時期を9日目とする分化誘導法を用いて scRNA-seq を実施することとした。

CHIR パルス後の培養に関しては、先行研究において、FGF9 を含む培地での培養期間がないと、上皮化した細胞の維持ができない結果が得られているため⁶、今回の誘導条件における、FGF9 培地の最適培養期間を検討した。結果として、FGF9 培地での培養期間が長くなるにつれ、ネフロン構成細胞が多く存在するオルガノイドが作製できることが示唆され、FGF9 培地で6日間培養した条件では、4日間培養した条件で見られなかったボウマン腔様の構造がみられたことから、より成熟度が高い腎臓オルガノイドが作製されている可能性が示された。その後の培養には FGF9 を含まない基礎培地を用いることで、細胞間の自己組織化により、ネフロン前駆細胞から糸球体、近位尿細管、遠位尿細管へと分化していくことが確認されたため、この期間で scRNA-seq のサンプリングを行うことで、分化細胞におけ

る heterogeneity を確認することができることが示唆された。

4-2 scRNA-seq を用いた近位尿細管細胞の成熟化因子の抽出について

まず、我々は腎臓オルガノイドについての scRNA-seq を行い、腎臓オルガノイドの分化状態の経時的変化について解析を行った。その結果、今回使用したタイムコースにおける腎臓オルガノイドは 15 日目においてネフロン前駆細胞 (NPC/PTA) の細胞が多く存在し、そこからポドサイト、近位尿細管、遠位尿細管へと経時的に変化していく様子が確認できた。また、経時的な腎臓オルガノイドの発生過程において、腎臓以外の系譜の細胞も発生していることが確認できた。これらの腎臓以外の系譜の細胞が発生することは、他の論文^{39,40,41}でも報告されており、これらの細胞を減らすような分化誘導方法についても検討が必要であると考えられる。

UMAP で解析したクラスタリング結果のうち、腎臓系譜の細胞について、より詳細に細胞種を同定するために、サブクラスタリングを行ったところ、NPC/PTA からネフロンへの分化の過程で存在する、RV, SSB などの細胞についてもアノテーションすることが可能であった。これらの腎臓系譜の細胞を用いて、発生過程の順番に並べるために疑似時間軸細胞経路解析を行った結果、これらの細胞を 3 次元で発生過程順に並べることができ、疑似時間の時間軸が分化の時間軸で変化することをマーカー遺伝子の発現の時間的变化により確認した。また、疑似時間軸細胞経路解析の結果から、NPC/PTA の細胞から、まず Podocyte と Tubules の 2 つの系譜に分岐し、その後、Tubules の系譜が近位尿細管、遠位尿細管の系譜に分岐することが示された。この結果は、先行研究と一致する²⁹ことから、この疑似時間軸細胞経路解析により並べられた細胞の順番は、発生過程を模倣していることが示唆された。

この疑似時間軸細胞経路解析から、近位尿細管系譜にアノテーションされた細胞を抽出し、再度、疑似時間軸細胞経路解析を実施したところ、近位尿細管細胞を発生過程の順番に一つに並べることができた。注目すべきは、同一の近位尿細管にアノテーションされた細胞においても、疑似時間の異なる細胞が確認できたことから、成熟度の異なる細胞が存在することが示唆された。また、分化誘導日数が異なる細胞において、同一の疑似時間を持つ細胞が存在することが確認でき、それらの細胞の違いから成熟速度をコントロールする因子の抽出を試みた。結果として、成熟速度が速い細胞群で発現が高かった遺伝子群を制御する因子として、PPAR α 経路の活性化が抽出され、PPAR α 経路を活性化させることにより腎臓オルガノイドの成熟度が増加する可能性が示された。

4-3 PPAR α 経路と腎臓オルガノイドの成熟化について

PPAR α は、RXR α とヘテロ二量体を形成し、特定のシスエレメントである PPAR α リガンド反応配列 (PPRE, DR-1) に結合して脂質代謝に関連する遺伝子群の発現を調節する核内受容体である⁴²。ヒトでは、PPAR α は主に脂肪酸の分解が盛んな組織 (脂肪組織、肝臓、心臓、筋肉、腎皮質) で発現し、腎臓では近位尿細管や髄質の太い上行脚に豊富に存在し、メ

サンギウム細胞では少ない⁴³。また、近位尿細管細胞はミトコンドリアが多く存在するため、脂肪酸β酸化 (Fatty acid beta-oxidation: FAO)とミトコンドリア呼吸は、近位尿細管の機能において重要な役割を果たす⁴⁴。最近の研究では、ヒト腎臓の発生過程において、解糖系から FAO への代謝シフトがあることが示唆されており、短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids: SCFAs) の一種である酪酸を添加すると、CPT1 (Carnitine palmitoyl transferase 1) の発現および近位尿細管マーカーの発現が上昇し、ヒト iPSC 由来の腎臓オルガノイドで FAO が成熟した近位尿細管の機能に重要であることが示されている⁴⁵。したがって、この酪酸処理による近位尿細管の成熟は、PPAR α 経路の活性化が近位尿細管の成熟に関与しているという本研究の結果を支持している。最近の研究では、ヒト腎臓オルガノイドでの近位尿細管分化と代謝変化の相関が示された⁴⁶。線維化モデルマウスでは、正常マウスに比べて酸化的リン酸化と脂質代謝が低下しており、これらの因子が近位尿細管の維持に重要であることが示唆されている。この研究では、酸化的リン酸化を促進する培地で4日間腎臓オルガノイドを培養したところ、解糖系に適した培地で培養した場合に比べて近位尿細管の数が増加したことを示した。しかし、この研究では、PPAR α アゴニスト単独での近位尿細管への影響については調査されていない。本研究では、腎臓オルガノイドがネフロンのパターニングを完了した後、PPAR α アゴニストで処理することで、成熟マーカー遺伝子の発現が増加したことを示した。したがって、PPAR α アゴニスト処理後の近位尿細管の成熟マーカー遺伝子の発現増加は、新たな近位尿細管への分化を促進するのではなく、近位尿細管細胞の成熟が加速された結果であると考えられる。これは、腎臓における PPARA の発現が近位尿細管と髄質の太い上行脚で豊富であることから示唆される⁴³；いくつかの scRNA-seq データでも、PPARA が主に腎臓の近位尿細管細胞で発現していることが確認されている^{47,48} (KIT Kidney Interactive Transcriptomics: <https://humphreyslab.com/SingleCell/>)。実際、本研究では、scRNA-seq によって特定されたポドサイトクラスター (CL0) および遠位尿細管クラスター (CL5) では、コントロール群と PPAR α アゴニスト処置群との間で近位尿細管成熟マーカー遺伝子の発現に有意差は見られなかった。これらの結果は、PPAR α 経路がポドサイトや遠位尿細管の成熟速度を調節には関与しない可能性があることを示唆している。

4-4 タンパク質再吸収能の評価

今回、近位尿細管細胞の成熟マーカー遺伝子が PPAR α アゴニスト処置群で増加していることを示したが、転写以外の糖鎖修飾、タンパク質の分解、局在変化などにより、遺伝子発現が制御される遺伝子もあり、タンパクレベルでの評価が必要であると考えられる。本研究においては、直接的なタンパクレベルでの評価はできていないが、近位尿細管の機能評価を行うことで、タンパクレベル増加の検証を行った。

具体的には、タンパク質の再吸収は近位尿細管において CUBN, Megalin を介して引き起こされる現象であるため、PPAR α アゴニスト処置群でこれらの遺伝子発現レベルの上昇だけでなく、タンパクレベルでも上昇するのであれば、タンパク質の取り込み能が増加すると

考えられる。今回の結果から, PPAR α アゴニスト処置群で電子顕微鏡画像におけるエンドソームの数が有意に増加し, 0.5 μm^2 以上の大型エンドソームの数も増加していることが示された。また, デキストランの取り込みについても, PPAR α アゴニスト処置群で有意に増加し, PPAR α 阻害剤処置群で有意に減少した。以上のことから, PPAR α アゴニスト処置によって近位尿細管において CUBN, Megalin の発現が増加したしたことによりタンパク質再吸収能が増加したことが示唆される。今後は, CUBN, Megalin のタンパク質の定量試験の実施が必要である。

4-5 近位尿細管成熟化腎臓オルガノイドのシスプラチンを用いた腎毒性評価

本研究では, 低用量のシスプラチンによる長期間の治療が特に近位尿細管において細胞死を引き起こす条件を用いて, 腎臓オルガノイドでシスプラチン誘発腎毒性を評価した³⁰。シスプラチンは, SLC22A や SLC31A1 など, 基底側の細胞膜に発現する輸送体を介して, またメガリンを介したエンドサイトーシスにより近位尿細管細胞に取り込まれ, その結果アポトーシスを引き起こす⁴⁹。フローサイトメトリーの結果, シスプラチン処置により近位尿細管細胞の割合が減少した。SLC22A2 および SLC31A1 の遺伝子発現レベルは, PPAR α アゴニスト処置群でコントロール群より高い傾向が見られたが, 発現に有意な差は観察されなかった。よって, 本研究で確認したシスプラチンによる近位尿細管細胞の細胞死は, これらの輸送体を介した取り込みの増加が直接関与する可能性は低いと考えられるが, 今後はこれらの輸送体のタンパク質レベルを確認する研究が必要である。

シスプラチンは, Megalin を介したエンドサイトーシスで取り込まれることが報告されている⁵⁰。本研究では, PPAR α アゴニスト処置群で CUBN や Megalin の遺伝子発現レベルが有意に増加し, TEM およびデキストラン取り込み実験の結果, エンドサイトーシスによる取り込みが増加することが示された。これにより, シスプラチンの感受性が高まったのは, LRP2 を介したエンドサイトーシスによるシスプラチンの取り込みの増加によるものであることが示唆される。エンドサイトーシスによるシスプラチンの取り込み増加が細胞死の増加を引き起こしている可能性を検証するために, 今後エンドサイトーシスを抑制する薬剤を用いた実験が必要であると考えられる。

4-6 公共データを用いた近位尿細管細胞の成熟度の比較

本研究では, PPAR α アゴニストで処理した腎臓オルガノイドの近位尿細管における成熟遺伝子の発現の違いは統計的に有意であったものの, 成熟度は妊娠 11~18 週の胎児の近位尿細管とほぼ同じレベルであり, 子供や成人の近位尿細管の成熟度には達していなかった。この原因としては, PPAR α アゴニストによる近位尿細管の成熟促進を目的とした期間が 9 日間と限られた期間であったためであると考えられる。人間の妊娠期間が 10 か月であることを考慮すると, オルガノイド培養の期間は小児の成熟段階まで進むには不十分である可能性がある。上記を踏まえて, より高いレベルの近位尿細管の成熟度を持つ腎臓オルガノイ

ドを作製するためには、本研究で用いた方法や長期培養法、及び腎臓発生の中胚間葉の早期パターンニングを改善する分化技術など、複数の方法論を組み合わせる必要があると考えられる⁵¹。

4-7 まとめ

本研究の腎オルガノイドの分化過程に関する時間経過的 scRNA-seq 解析により、分化誘導中の PPAR α 経路の活性化が近位尿細管細胞の成熟速度を促進できることが明らかになった。これにより、近位尿細管細胞での遺伝子発現レベルの増加と機能的な成熟、そしてシスプラチン誘発腎毒性への感受性の増加が引き起こされる可能性を示した。今後、このアプローチによって成熟速度が増加した近位尿細管細胞は、さらなる毒性評価やヒトへの外挿研究のための Microphysiological System (MPS) に使用される可能性が示唆される。したがって、本研究で行った、オルガノイド内での成熟速度の細胞の Heterogeneity の解析は、オルガノイドの成熟度を増加させる技術を開発できる可能性があることを示唆している。将来的には、さまざまなオルガノイドの成熟速度を強化するための類似の技術が、薬物スクリーニング、再生医療、その他の応用においてより効果的に使用される可能性がある。

引用文献

1. Jager, K. J. *et al.* A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* **34**, 1803–1805 (2019).
2. 阿部雅紀. CKD診断ガイドライン2023. 日大医誌 **82**, 319–324 (2023).
3. わが国の慢性透析療法の現況(2023年12月31日現在) .
4. Connor, S., Roberts, R. A. & Tong, W. Drug-induced kidney injury: Challenges and opportunities. *Toxicol. Res. (Camb)*. **13**, 1–9 (2024).
5. Cook, D. *et al.* Lessons learned from the fate of AstraZeneca’s drug pipeline: A five-dimensional framework. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 419–431 (2014).
6. Takasato, M. *et al.* Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* **526**, 564–568 (2015).
7. Gupta, N. *et al.* Modeling injury and repair in kidney organoids reveals that homologous recombination governs tubular intrinsic repair. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabj4772 (2022).
8. Lemos, D. R. *et al.* Interleukin-1b activates a MYC-dependent metabolic switch in kidney stromal cells necessary for progressive tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 1690–1705 (2018).
9. Shimizu, T. *et al.* A novel ADPKD model using kidney organoids derived from disease-specific human iPSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **529**, 1186–1194 (2020).
10. Vishy, C. E. *et al.* Genetics of cystogenesis in base-edited human organoids reveal therapeutic strategies for polycystic kidney disease. *Cell Stem Cell* **31**, 537–553.e5 (2024).
11. Hirayama, R. *et al.* iPSC-derived type IV collagen α 5-expressing kidney organoids model Alport syndrome. *Commun. Biol.* **6**, 1–11 (2023).
12. Ohmori, T. *et al.* Impaired NEPHRIN localization in kidney organoids derived from nephrotic patient iPS cells. *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).
13. Jansen, J. *et al.* Human pluripotent stem cell-derived kidney organoids for personalized congenital and idiopathic nephrotic syndrome modeling. *Dev.* **149**, (2022).
14. Okada, T. & Morikawa, Y. Development of the proximal tubule of the fetal rat kidney : Morphometry and ultrastructural findings. *Ann. Anat.* **175**, 89–94 (1993).
15. Larsson, L. & Maunsbach, A. B. Differentiation of the vacuolar apparatus in cells of the developing proximal tubule in the rat kidney. *J. Ultrastructure Res.* **53**, 254–270 (1975).
16. Nielsen, R., Christensen, E. I. & Birn, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int.* **89**, 58–67 (2016).
17. Giacomini, K. M. *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 215–236 (2010).

18. Homan, K. A. *et al.* Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat. Methods* **16**, 255–262 (2019).
19. Banan Sadeghian, R. *et al.* Cells sorted off hiPSC-derived kidney organoids coupled with immortalized cells reliably model the proximal tubule. *Commun. Biol.* **6**, 1–17 (2023).
20. Ma, C. *et al.* Efficient proximal tubule-on-chip model from hiPSC-derived kidney organoids for functional analysis of renal transporters. *iScience* **27**, 110760 (2024).
21. Trapnell, C. *et al.* The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 381–386 (2014).
22. tori, K. & Endo, M. 植物における組織特異的な転写制御機構と 1 細胞トランスクリプトームデータの時系列解析アルゴリズム.) K. Torii M. Endo-1 *BSJ-review* **8**, 71 (2017).
23. Phipson, B. *et al.* Evaluation of variability in human kidney organoids. *Nat. Methods* **16**, 79–87 (2019).
24. Stuart, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888–1902.e21 (2019).
25. Stewart, B. J. *et al.* Spatiotemporal immune zonation of the human kidney. *Science (80-.).* **365**, 1461–1466 (2019).
26. Hochane, M. *et al.* Single-cell transcriptomics reveals gene expression dynamics of human fetal kidney development. *PLoS Biology* **17**, (2019).
27. McEvoy, C. M. *et al.* Single-cell profiling of healthy human kidney reveals features of sex-based transcriptional programs and tissue-specific immunity. *Nat. Commun.* **13**, 1–18 (2022).
28. Shechter, Ari. Schwartz, G. Development of the Mammalian Kidney. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2018).
29. Lindström, N. O. *et al.* Progressive Recruitment of Mesenchymal Progenitors Reveals a Time-Dependent Process of Cell Fate Acquisition in Mouse and Human Nephrogenesis. *Dev. Cell* **45**, 651–660.e4 (2018).
30. Digby, J. L. M., Vanichapol, T., Przepiorski, A., Davidson, A. J. & Sander, V. Evaluation of cisplatin-induced injury in human kidney organoids. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **318**, F971–F978 (2020).
31. Morizane, R. *et al.* Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1193–1200 (2015).
32. Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. & Iliakis, G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5678–5694 (2008).
33. Löbrich, M. *et al.* γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662–669 (2010).

34. Podhorecka, M., Skladanowski, A. & Bozko, P. H2AX phosphorylation: Its role in DNA damage response and cancer therapy. *J. Nucleic Acids* **2010**, (2010).
35. Dhuppar, S., Roy, S. & Mazumder, A. γ H2AX in the S Phase after UV Irradiation Corresponds to the Sites of DNA Replication and Not DNA Damage. *SSRN Electron. J.* 1–14 (2020). doi:10.2139/ssrn.3517532
36. Waanders, F., Van Timmeren, M. M., Stegeman, C. A., Bakker, S. J. L. & Van Goor, H. Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J. Pathol.* **220**, 7–16 (2010).
37. Coca, S. G., Yalavathy, R., Concato, J. & Parikh, C. R. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int.* **73**, 1008–1016 (2008).
38. Ho, J. *et al.* Urinary, plasma, and serum biomarkers' utility for predicting acute kidney injury associated with cardiac surgery in adults: A meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* **66**, 993–1005 (2015).
39. Wu, H. *et al.* Comparative Analysis and Refinement of Human PSC-Derived Kidney Organoid Differentiation with Single-Cell Transcriptomics. *Cell Stem Cell* **23**, 869–881.e8 (2018).
40. Subramanian, A. *et al.* Single cell census of human kidney organoids shows reproducibility and diminished off-target cells after transplantation. *Nat. Commun.* doi:10.1038/s41467-019-13382-0
41. Combes, A. N., Zappia, L., Er, P. X., Oshlack, A. & Little, M. H. Single-cell analysis reveals congruence between kidney organoids and human fetal kidney. *Genome Med.* 1–15 (2019). doi:10.1186/s13073-019-0615-0
42. Ruan, X., Zheng, F. & Guan, Y. PPARs and the kidney in metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **294**, 1032–1047 (2008).
43. Guan, Y., Zhang, Y., Davis, L. & Breyer, M. D. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **273**, (1997).
44. Forbes, J. M. Mitochondria-Power Players in Kidney Function? *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 441–442 (2016).
45. Wang, G. *et al.* Spatial dynamic metabolomics identifies metabolic cell fate trajectories in human kidney differentiation. *Cell Stem Cell* **29**, 1580–1593.e7 (2022).
46. Dhillon, P. *et al.* The Nuclear Receptor ESRR α Protects from Kidney Disease by Coupling Metabolism and Differentiation. *Cell Metab.* **33**, 379–394.e8 (2021).
47. Wu, H. *et al.* Single-cell transcriptomics of a human kidney allograft biopsy specimen defines a diverse inflammatory response. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 2069–2080 (2018).
48. Muto, Y. *et al.* Single cell transcriptional and chromatin accessibility profiling redefine

- cellular heterogeneity in the adult human kidney. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
49. Pabla, N. & Dong, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* **73**, 994–1007 (2008).
 50. Hori, Y. *et al.* Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 1783–1791 (2017).
 51. Vanslambrouck, J. M. *et al.* Enhanced metanephric specification to functional proximal tubule enables toxicity screening and infectious disease modelling in kidney organoids. *Nat. Commun.* **13**, 5943 (2022).

謝辞

本研究の遂行及び論文の執筆にあたり、終始厚いご指導を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 高次生命科学専攻 分子病態学分野 高里 実 准教授に厚く御礼申し上げます。実験に際し、大塚製薬株式会社 創薬戦略部の國吉勇輝研究員には、scRNA-seq のデータ解析について、多大なご助言、ご協力をいただきました。理化学研究所 生命機能科学研究センター ヒト器官形成研究チームのテクニカルスタッフの福井智恵さんには実験実施のご協力をいただきました。また、ヒト器官形成研究チームの皆様には、実験データについての議論、助言など、多大なご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

本研究は、理研 BDR-大塚製薬連携センターからの支援及び、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業新学術領域研究 (研究領域提案型)、日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業による助成を受けて行われました。

最後に、日々の理解と支え、そして変わらぬ愛情をもって私を励まし続けてくれた家族に、心からの感謝を捧げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yoshiki Sahara, Chie Fukui, Yuki Kuniyoshi, and Minoru Takasato

Proximal tubule cell maturation rate and function are controlled by PPAR α signaling in kidney organoids.

Communications biology, 7(1):1532. 2024

doi: 10.1038/s42003-024-07069-6.