

奨励金No.1596

食塩感受性高血圧症モデルとなりうるヒト iPS 細胞由来腎皮質集合管オルガノイドの作製

前 伸一

京都大学 特定拠点講師

Development of a potential model for salt-sensitive hypertension using human iPS cell-derived renal cortical collecting duct organoids

Shin-Ichi Mae

Kyoto University, Program-Specific Research Center Junior Associate Professor



高血圧は食塩摂取量と密接に関係する生活習慣病であり、腎皮質集合管におけるナトリウム再吸収の異常が病態に関与する。しかし、ヒトの食塩感受性高血圧を的確に再現する細胞モデルは存在しなかった。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から皮質集合管オルガノイドを作製する技術確立し、ENaC 発現を指標とするレポーター細胞株を樹立した。本モデルは食塩感受性の分子機構解明や新規高血圧治療法の開発に貢献することが期待される。

Hypertension is a lifestyle-related disease closely related to salt intake, and abnormal sodium reabsorption in the renal cortical collecting duct is involved in its pathogenesis. However, no cellular models accurately replicating human salt-sensitive hypertension have been established. In this study, we developed a method to generate cortical collecting duct organoids from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and established a reporter cell line using ENaC expression as an indicator. This model is expected to facilitate our understanding of molecular mechanisms underlying salt sensitivity and contribute to the development of novel hypertension treatments.

1. 研究内容

1. 要旨

高血圧は主要な生活習慣病の一つであり、食塩摂取量との関連が強く示唆されている。腎臓は食塩摂取量の変動にかかわらず血圧を恒常的に維持する機能を有するが、その調節機構が破綻するとナトリウムの過剰な再吸収を生じ、高血圧が引き起こされる。このような機構破綻の一因として「食塩感受性」が挙げられるが、その病態を的確に再現するヒト腎皮質集合管細胞モデルはこれまで確立されていない。近年、ヒト iPS 細胞から腎皮質集合管オルガノイドを作製する手法が報告され、腎集合管に関する発生物学的研究や病態モデルの構築に対する注目が高まっている。そこで本研

究では、ヒト iPS 細胞から腎皮質集合管オルガノイドを作製する技術を新たに開発し、皮質集合管を特異的に単離可能とするレポーター細胞株を樹立した。これまで、食塩感受性を反映するヒト腎皮質集合管モデルは存在していなかったが、本研究の成果により、高血圧の病態解明および新規治療法開発に向けたモデル系の基盤の構築が期待される。そして、本モデルを応用することで、従来の高血圧治療とは異なる視点からの生活習慣病治療法の開発にもつながる可能性がある。

2. 背景・目的

本態性高血圧症は明らかな異常が認められずに血圧が高くなる疾患であり、本邦において約 4,300

万人の患者数が推定される代表的な生活習慣病の1つである。成人の約3人に1人が高血圧という現状から、本疾患は国民病と位置づけられ、脳卒中、心筋梗塞、心不全、末期腎不全などの重篤な疾患のリスク因子として重要な医学および社会的課題となっている。近年、非侵襲的な血圧測定法の進歩や、カルシウム拮抗薬をはじめとする有効な治療薬の開発により、高血圧管理は一定の進展をみせているが、根本的な予防・治療法の確立には至っていない。

高血圧と食塩摂取量の強い相関関係は多くの疫学研究により明らかとなっており、食塩感受性という概念が注目されている。腎臓は、食塩摂取量の変動にかかわらずNa排泄と体液量を調整することで血圧を一定に保つ役割を担っているが、腎機能が保たれていても高血圧に至る例があり、その背景には食塩感受性の個人差が存在すると考えられている。腎臓では濾過されたNaのうち70%が近位尿細管、20%がヘンレの太い上行脚、5%が遠位尿細管で再吸収される一方、皮質集合管での再吸収量は全体のわずか4%に過ぎないが、ENaC（上皮型Naチャネル）によるNa再吸収がホルモンにより厳密に調節されている点で極めて重要である。ENaC活性の恒常的亢進を特徴とするLiddle症候群が高血圧を呈することからも、皮質集合管におけるENaCの制御が血圧調節に果たす役割の大きさがうかがえる。

しかし、ENaCの発現や活性を制御する分子機構には未解明の点が多く、マウスなど動物由来のモデルではヒトとの種差が存在することから、ヒトの病態を的確に反映する*in vitro*モデルの開発が求められている。本研究では、ヒトiPS細胞から腎皮質集合管細胞への分化誘導法を確立し、ENaCの発現調節機構を評価可能な新たなヒト細胞モデルを構築する。これにより、食塩感受性高血圧の発症メカニズムを細胞・分子レベルで解明し、将来的な予防法・治療法の開発につなげることを目指す。

3. 方法・結果

腎集合管は胚発生過程において胎生期腎組織である中腎管から伸長する尿管芽の分枝形態形成を経て構築される。しかし、ヒトiPS細胞から作製される従来の尿管芽オルガノイドでは中腎管と尿管芽の明確な区別が困難であり、生体と同様の一方向性の管状構造を再現することはできていなかった。本研究では、ヒトiPS細胞由来の中腎管上皮細胞塊を、50%マトリゲルで構成された厚く柔らかい基質上に配置することで、中心から全方向に伸長するのではなく、生体と同様に一方向に管状に伸長する中腎管構造の形成に成功した。さらに、従来培養に用いられていたCHIR99021をWnt3aに置き換えることで、アポトーシスの抑制と安定した伸長が得られた。

さらに、尿管芽誘導過程においてもCHIR99021の代替としてR-spondin1を用い、GDNF濃度を従来の20分の1（5 ng/mL）に低減することで、細胞死を抑えながら尿管芽の発芽と伸長を誘導できた。そして、形成された尿管芽組織に対し、機械的な切離とマトリゲル中での再構築によって分枝形態形成を促進し、高度に分枝したオルガノイドを作製することに成功した（図1）。得られたオルガノイドは、RET陽性の尿管芽先端部細胞およびウロプラキン陽性の尿管・腎盂様細胞を含んでおり、改良した方法で作製した尿管芽は生体内と同様の発生学的機能を有していることが分かった。

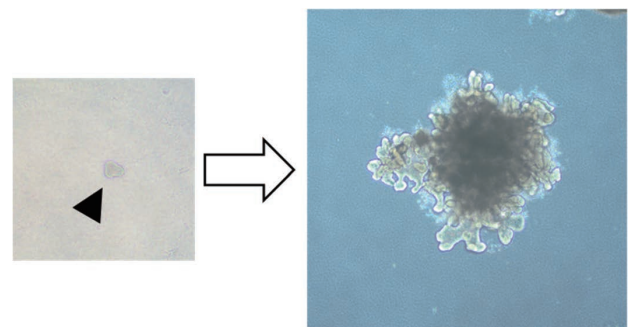


図1. 切離した尿管芽からの分枝形態形成

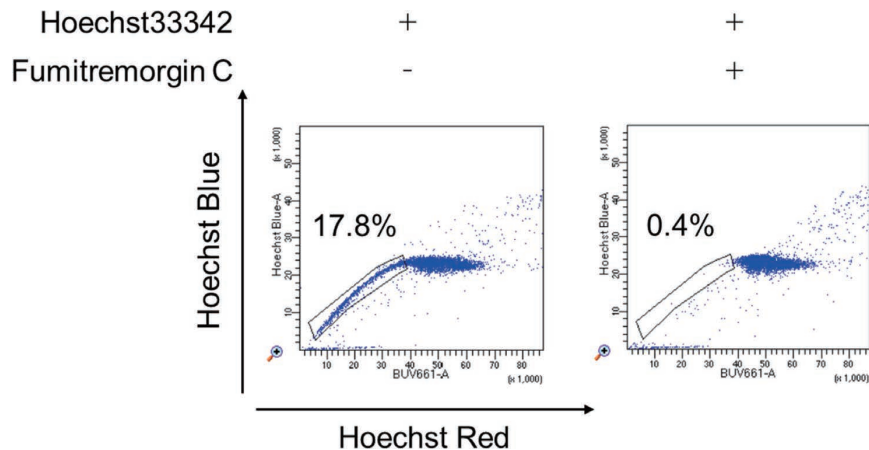


図 2. Hoechst33342 排出による尿管芽細胞の単離

一方で、尿管芽を効率的かつ均一に単離するため、シングルセル RNA シークエンシングにより尿管芽マーカー *WNT11* 陽性細胞で高発現している細胞表面抗原を探索したが、抗体によるフローサイトメトリーでの濃縮には限界があった。そこで、トランスポーター *ABCG2* の機能に着目し、Hoechst33342 色素の排出能を指標とする side population 法を応用した。その結果、色素排出細胞を単離することで *WNT11* 発現細胞が濃縮され（図 2）、これらから形成した細胞塊により分枝オルガノイドの再構築が可能であることが確認された。

また、単離した尿管芽から拡大培養した尿管芽先端部細胞を用いて集合管オルガノイドを作製したところ、集合管マーカー *AQP2* 陽性細胞および一部 *SCNN1B* 陽性細胞が確認され、皮質集合管様細胞の分化誘導にも成功した。皮質集合管の単離を目的として、*ENaCα* サブユニット遺伝子 *SCNN1A* 座位に GFP を相同組換えで導入したレポーター iPS 細胞株を樹立し、薬剤耐性遺伝子を除去後も尿管芽への分化能を維持していることを確認した。

4. 考察

本研究では、ヒト iPS 細胞から 1 本の管状に伸長する中腎管組織を作製し、そこから尿管芽を発

芽させる新たな培養方法を開発した。従来の方法では全方向に伸長が起こっていたが、本法では生体内と同様の方向性を持つ分枝形態形成が可能となった。さらに、尿管芽を含む組織においてシングルセル RNA シークエンシングを行い、*WNT11* 陽性細胞に特異的な表面抗原を探索した。その結果、*ABCG2* トランスポーター活性に着目し、Hoechst33342 色素排出能を指標とする尿管芽単離法を確立した。単離した尿管芽細胞からは集合管オルガノイドを作製でき、一部に皮質集合管が含まれることを免疫染色で確認した。また、*ENaCα* の α サブユニットをコードする *SCNN1A* 遺伝子座に GFP を導入したレポーター iPS 細胞を樹立し、皮質集合管細胞の単離と機能解析のための基盤を構築した。これらの成果は、ヒト腎集合管の発生メカニズムの解明に貢献するとともに、食塩感受性高血圧の新規病態モデル開発につながることを期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

該当なし