

腎臓再生研究の潮流

—腎オルガノイド研究の現状と展望—

Trends and progress in kidney organoid research

太口敦博*¹ 西中村隆一*²

Atsuhiko TAGUCHI and Ryuichi NISHINAKAMURA

はじめに

近年、臨床再生医学領域では日本や米国を中心に、iPS細胞(人工多能性幹細胞)などの多能性幹細胞から体細胞(網膜色素上皮細胞や血小板, ドーパミン産生細胞, 脊髄神経細胞など)を分化誘導・大量培養し, 実際に患者へ投与する臨床研究が進められている。一方で基礎研究領域においては, 小さなスケールの臓器様立体組織「オルガノイド」を用いて, これまでの実験動物を用いた生体内解析やヒト二次元培養細胞を用いた生体外解析では追えなかった生命現象にアクセスしようとする動きが活発である。さらに, 次世代シーケンシング技術を用いたゲノムワイドな遺伝子情報解析, それをシングルセル解析と呼ばれる単一細胞レベルの解像度で行う流れが急速な広がりをみせている。本稿では腎臓の再生研究領域のなかでも特に近年進歩が著しい, 腎オルガノイド研究と, それを用いた応用研究を中心に, 最新の知見と世界的な研究の潮流・展望について概説する。

オルガノイド研究の歴史と背景

2000年代前半頃までに各臓器の初期発生過程で主要な役割を果たす液性シグナル因子やその下流で働く転写調節因子の機能解析が急速に進むと, この生体内の青写真に基づいて, マウスやヒトのES細胞から神経細胞, 膵島β細胞, 心筋細胞などの分化誘導研究が報告され始めた。2007年にヒトiPS細胞の作製法が確立されたことで, ヒト臓器

細胞の分化誘導研究は更なる拡がりと進展をみせたが, この頃の分化誘導研究は平面培養で, 効率的に均質な目的細胞を誘導しようとするものが主流であった。近年, すでに臨床試験へと進んでいる, 「細胞」を用いた再生医療研究の対象臓器細胞もこの時期の研究の流れを汲む, 細胞単位である程度機能が見込まれるものが多い。

しかしながら, 例えば腎臓のように三次元構造なしには機能しえない臓器の再生を見据え, 臓器本来の立体構造をどのように再現するかは大きな課題であった。これを克服すべく, 誘導した細胞を人為的に立体再配置できる, インクジェットプリンタ技術を応用したバイオプリンティングをはじめとするバイオエンジニアリング技術の領域参入が相次いだ。これに対し, 笹井らは, 神経系組織をモデルに, 分化誘導の過程を三次元の細胞凝集体の状態に継続させることで, 「細胞自律的に」組織本来の立体構造を形成させるというコンセプトを提唱し¹⁾, 2011年には胎児の眼胚構造を再現して大きなインパクトを与えた²⁾。また Cleversらは, 2009年に成体マウスの腸管から, 腸上皮の幹細胞を単一細胞で単離して成長因子および細胞外基質の存在下に三次元増幅培養することで, 腸の陰窩と微絨毛の立体構造を模した腸オルガノイドの作製を報告した³⁾。これらの報告は, 生体外で発生あるいは幹細胞ニッチの局所環境を再現し, そこに本来の構成細胞群を共存させれば, 細胞間コミュニケーションによって細胞任せに立体形成が行われることを示していた。その後, この臓器様構造体「オルガノイド」を作製する潮流が本格化し, 脳や内耳, 肝臓, 膵臓, 大腸, 胃, 肺, 腎臓, 歯牙, 毛包などさまざまな臓器のオルガノイドが報告された⁴⁾。しかしながら, これらのオルガノイドも, 臓器のなかの一部, つまり「小構造」を再現し

*¹(独)マックス・プランク分子遺伝学研究所

*²熊本大学発生医学研究所

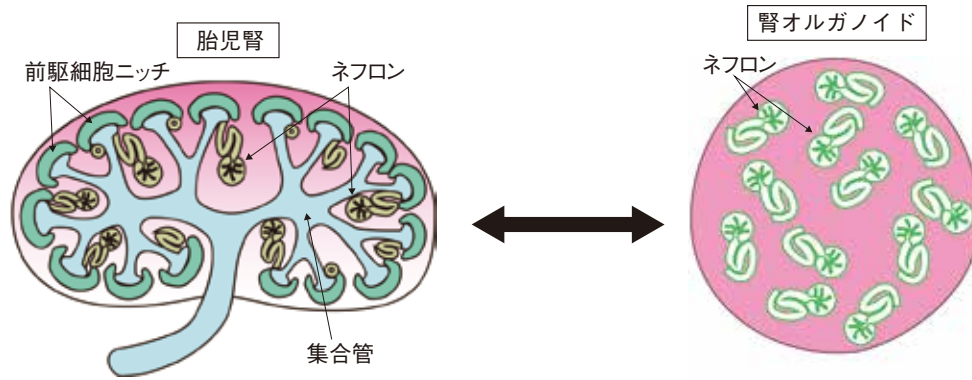


図1 胎児の腎臓とこれまでの腎臓オルガノイドの比較

胎児の腎臓はネフロン同士が集合管で接続されるとともに、辺縁部で前駆細胞ニッチを有するのに対し、腎臓オルガノイド内のネフロンは組織中に散在し、前駆細胞ニッチを持たない。

(文献 10 より引用, 改変)

ているにすぎない。すなわち、心臓オルガノイドは決して2心房2心室の立体構造を再現できていないわけではなく、腸オルガノイドは筋層を伴って蠕動運動をする腸管を形成しているわけでもない。したがって、「オルガノイド」から臓器固有の高次構造を有する「オルガン」への昇華には依然高い壁があるのが現状である。

腎臓オルガノイド研究の変遷とこれまでの課題

腎臓オルガノイド研究も腎臓発生研究の進展と歩みを共にしてきた。以前から胎児期の腎臓原基である後腎にはネフロン上皮の元になる「ネフロン前駆細胞」、間質系細胞の元になる「間質前駆細胞」、集合管・尿管の元になる「尿管芽」と呼ばれる3つの前駆細胞集団が存在することが知られていた。しかしこれらの前駆細胞を誘導するにあたり、その共通の源とされてきた中間中胚葉組織から3者がどのように系統分離するか、さらに中間中胚葉はその前段階の未分化中胚葉、ひいては多能性幹細胞からどのようなシグナルによって分化するのかが不明であった。2005年にはDresslerらがマウスES細胞から⁵⁾、2013年には長船らがヒトiPS細胞から⁶⁾、中間中胚葉様の細胞を経た腎臓系譜への分化誘導法を報告した。これらの誘導組織にはいずれも尿管芽マーカー遺伝子の一部を発現する上皮構造が形成されたが、本来ネフロン前駆細胞から尿管芽と同時に分化するポドサイトの形成は認められなかった。

そこでわれわれは、生体における中間中胚葉の形成過程を知るために細胞系譜追跡を行い、ネフロン前駆細胞および間質前駆細胞と尿管芽が、それぞれ後方中間中胚葉と前

方中間中胚葉という時空間的に異なる起源に由来することを見出した。この生体内の新たな知見に基づいた誘導設計図の見直しにより、マウスおよびヒト多能性幹細胞から尿管芽とポドサイトの両方の三次元構造を有した腎臓オルガノイドの作製が可能になった⁷⁾。一方Littleらは、尿管芽とネフロン前駆細胞が分化する中間のタイミングで誘導すると、ネフロン様構造に加え、GATA3陽性の尿管芽様上皮細胞が存在する、つまり尿管芽とネフロンが同時に誘導できたと報告した⁸⁾。この報告以前にもBelmonteらは、ヒトES細胞から尿管芽系マーカーを発現する上皮細胞を選択的に誘導したと報告していた⁹⁾。しかしながら、これらの報告で示された尿管芽様細胞はいずれも、生体の腎臓に見られるような、枝分かれした集合管の先にネフロン同士が接続し、1つの尿管へと集約されるという「高次構造」は再現されていなかった(図1)¹⁰⁾。このことは、将来的に再生腎組織に尿を産生させることを見据えた際に致命的であり、いかにして集合管系組織を腎臓オルガノイドに組み込むか、すなわち、その元になる機能的な尿管芽を誘導するかが次の焦点となった。

機能的尿管芽の誘導と組み込みによる腎臓の高次構造を再現する試み

生体の発生過程で尿管芽は、1つの芽から樹状分岐を繰り返して、1つの幹から枝分かれした集合管ネットワークを形成する。さらに、その先端ではネフロン前駆細胞を未分化に維持しつつ、その一部をネフロン上皮へと分化させる役割を担うことが知られている。われわれはまず生体内の

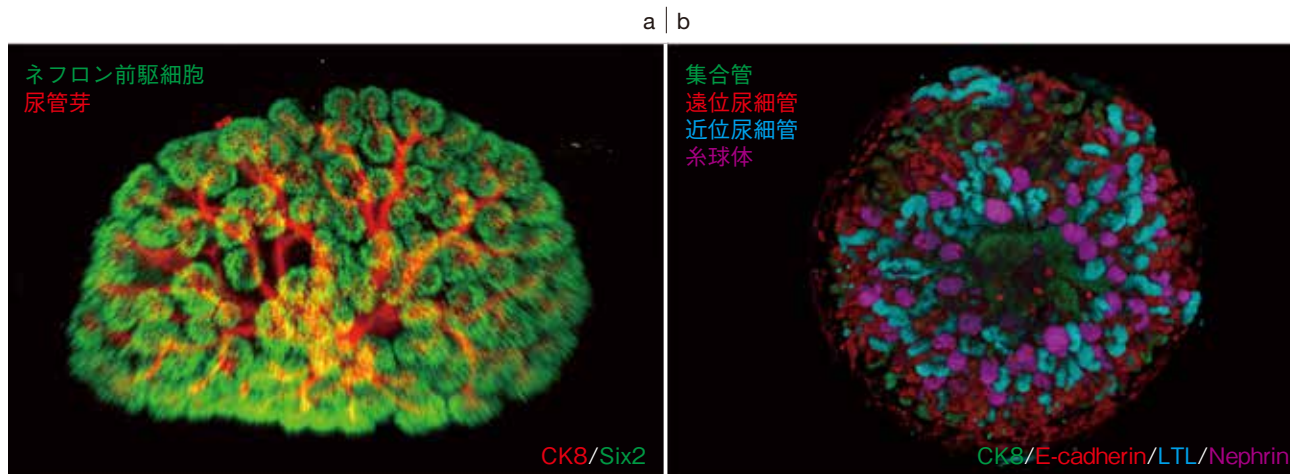


図2 マウス ES 細胞由来の尿管芽とマウス胎仔ネフロン前駆細胞・間質前駆細胞を組み合わせたオルガノイド
 a: 未分化ネフロン前駆細胞はオルガノイドの辺縁部, 尿管芽の先端で維持される。
 b: オルガノイドの内部で分化したネフロンを示す。(文献11より引用, 改変)

発生過程の情報を収集すべく、初期発生段階のマウス胚から採取した尿管芽およびその前駆体、ウォルフ管細胞を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。これにより、ウォルフ管の分化過程で、レチノイン酸および Fgf, Wnt シグナルが継続的に活性化していること、ウォルフ管が前駆細胞の時期に一時的に CXCR4/KIT 陽性分画に濃縮されることを見出した。さらに、ウォルフ管の前駆細胞である前方中間中胚葉誘導の至適培養時間とシグナルを同定したことで、マウス ES 細胞から尿管芽を誘導する方法を確立した。この誘導尿管芽組織から1つの「芽」を単離し、マウス胎仔のネフロン前駆細胞および間質前駆細胞と組み合わせて凝集させ、腎原基を「再構成」すると樹状分岐形成が観察され、胎児の腎臓の集合管組織のようなネットワーク構造を構築できた(図2a)。また、腎オルガノイドの辺縁部では未分化なネフロン前駆細胞ニッチの形成を(図2a)、内部には分化したネフロンの形成を認め(図2b)、前述の3つの機能特性を保持した尿管芽が誘導できていることが確認できた。さらに、胎仔ネフロン前駆細胞の代わりにマウス ES 細胞から誘導したネフロン前駆細胞を用いてもオルガノイドを構成することができた。これらの結果から、ネフロン前駆細胞と尿管芽の分化誘導にはその発生過程に応じた別々の誘導シグナルが必要であること、さらには、機能的な前駆細胞同士を組み合わせれば、胎仔腎臓の高次構造までもがある程度再現できることが示された¹¹⁾(図3)。

再構成腎オルガノイドの課題と展望

われわれの尿管芽誘導法はヒト iPS 細胞からの分化誘導にも応用可能で、誘導ヒト尿管芽をゲルの中で三次元培養すると、樹状分岐形成が確認できる。しかしながら、ヒト胎児の前駆細胞は入手できないことから、マウスのような再構成実験系による更なる機能アッセイを行うことや、誘導尿管芽がどの程度ヒトの陽性対象に近いのかを客観的に検証することが難しいという問題がある。ゆえに今後、誘導細胞のみでヒト腎臓原基の高次構造を再現するためには、機能的な間質前駆細胞の分化誘導法の開発が必須であり、各前駆細胞の誘導精度を確認するためにも、陽性対象となるヒトの胎児細胞の遺伝子発現情報の整備が待たれる。

前述のマウス多能性幹細胞を用いたオルガノイドを、遺伝子発現プロファイルを基にマウスの胎児腎と比較すると胎生 15.5 日目相当であることが判明した¹¹⁾。したがって、このオルガノイドをさらに大きく成長させ、成体に近いものへと成熟させ、最終的に濾過機能を付与するためには、誘導組織内に血管網を導入し、そこに血液を灌流させることが必要である。オルガノイドでどのように血管網を構築するかは臓器間で共通の問題であり、この領域における今後の重要課題と言える。

シングルセル解析とヒト胎児サンプルを用いた生体情報リソースの構築

2018 年に入り、多くのシングルセル解析の報告がなさ

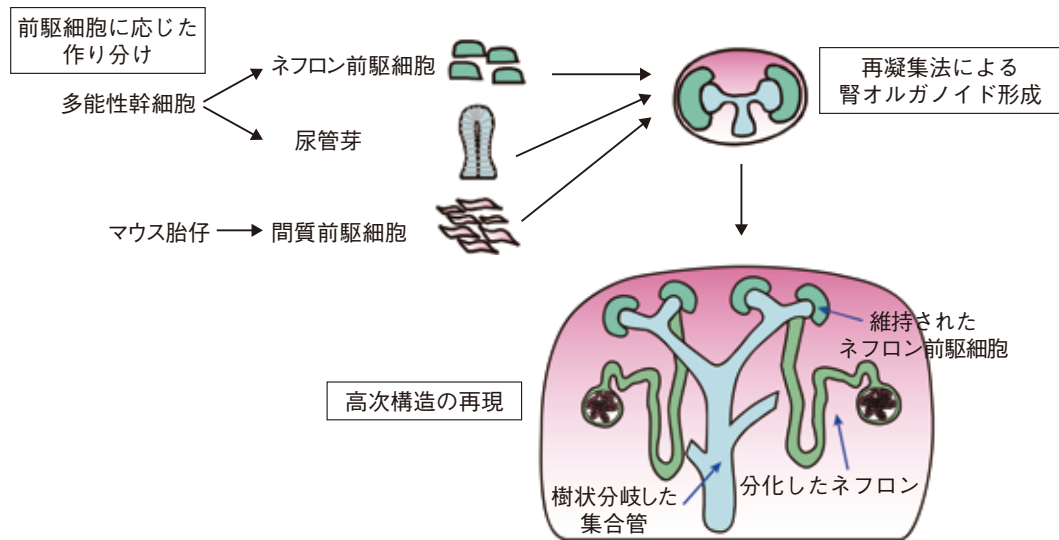


図3 多能性幹細胞から腎臓の高次構造を再現する戦略の概要

多能性幹細胞からネフロン前駆細胞と尿管芽を別々に誘導し、胎仔間質前駆細胞と凝集して腎臓原基を再構成する。
(文献 11 より引用, 改変)

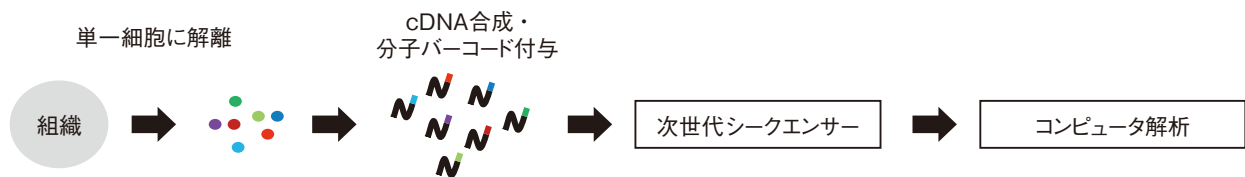


図4 シングルセル技術を用いた遺伝子発現解析法の概略

れ、腎臓オルガノイド関連領域では、ヒト胎児における遺伝子発現情報の提供と、オルガノイドの構成細胞に対する細胞レベルでのより詳細な解析に応用され始めている。シングルセル RNA-seq は、マイクロフルイディクス流路などを用いた単一細胞の単離、RNA 抽出、逆転写反応と cDNA の増幅、ライブラリー調整、さらに次世代シーケンシング (NGS) を用いたシーケンシング、コンピュータ解析という流れで行われる (図 4)。ライブラリー調整までの段階で各細胞特異的な分子バーコードを与えることで、シーケンシング情報が再び各単一細胞へと帰属され、単一細胞ごとの遺伝子発現情報が得られる。この技術を用いれば、サンプル自体を事前にソートすることなく、集団の中の一定の特徴を共有する亜集団を retrospective に分類することができる。McMahon らは、ヒト胎児腎臓におけるシングルセル RNA-seq および組織学的な遺伝子発現解析を行い、ヒトネフロン前駆細胞にのみ *SIX1* 遺伝子が継続的に発現することや、ヒトの遠位尿管の集合管接続部でこれまで尿管芽

マーカーとされてきた *GATA3* 遺伝子が発現することなど、個々の遺伝子の発現パターンがヒトとマウスでは部分的には異なることを示した^{12~14)}。これまでヒト多能性幹細胞の分化誘導研究においては、マウス胎仔の情報に基づいたマーカー遺伝子が使用されてきたが、今後のオルガノイド研究において、ヒト胎児の各発生段階ごとの腎臓構成細胞の遺伝子プロファイリング情報が集積していけば、誘導の精度を高めるうえで貴重な情報源となることが期待される。

一方、Freedman らはロボットを使った自動大量培養システムとシングルセル RNA-seq 解析を組み合わせ、同じ親株から分離した 3 つのヒト多能性幹細胞株の間、さらには各細胞株のなかでも継代数によって至適培養条件 (誘導初期の Wnt アゴニストの濃度や分化誘導に供すべき細胞数) が異なることを示した¹⁵⁾。これは、われわれを含め多能性幹細胞を用いた分化誘導研究で必ず経験することであるが、いかにして異なる遺伝的背景を持つ細胞株間の多様性を加味して誘導条件を標準化し、多能性幹細胞の維持培養

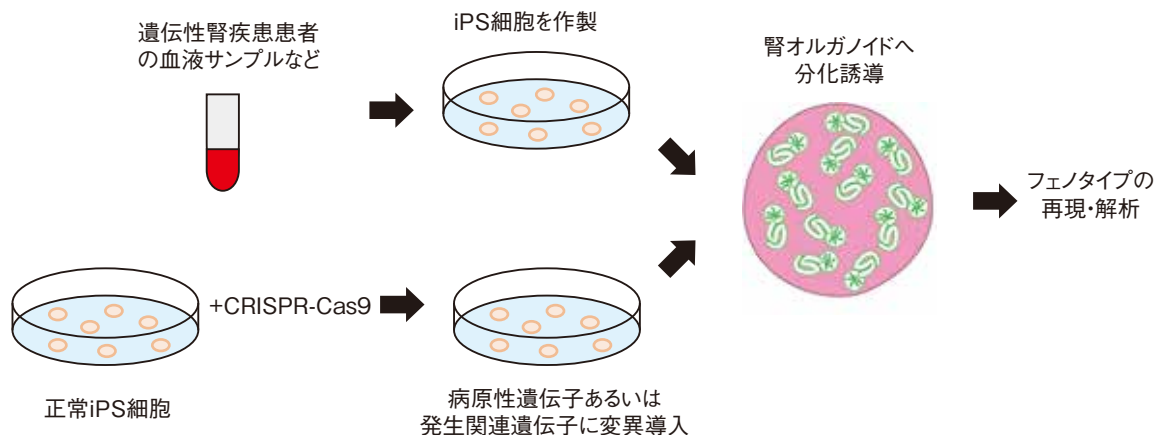


図5 ヒト腎オルガノイドを用いた疾患モデリングと発生研究

におけるゆらぎを抑えて実験系の再現性をコントロールしうるか、その難しさの一端を示した報告と言える。

また Humphreys らは、以前に報告された Takasato ら⁸⁾と Morizane ら¹⁶⁾の各誘導プロトコルで誘導した腎オルガノイドをシングルセル解析で比較し、これらのプロトコル間でオルガノイドを構成する腎臓細胞に違いがあること、腎臓系譜以外の細胞が混入していること、ヒト成体腎臓サンプルに比べて未成熟であること、さらに、腎臓系譜以外の細胞特異的に活性化しているシグナルを阻害することでこれらの細胞がある程度除外できることなどを報告した¹⁷⁾。興味深いことに、尿管芽とネフロン前駆細胞を同時に誘導したとしていた Takasato らの方法で誘導した腎オルガノイドには尿管芽と特定できる細胞は認められないと結論づけており、このことは、われわれが示したように、真に機能的な尿管芽を誘導するためには、ネフロン前駆細胞誘導とは異なる誘導条件で個別に誘導する必要があることを裏付けていると言えよう。

腎オルガノイドを用いた疾患モデリングとヒト発生遺伝学研究

近年のオルガノイド研究のもう一つの大きな潮流は、遺伝性疾患を持った患者から樹立した iPS 細胞や、人工的に CRISPR-Cas9 などの遺伝子編集技術を用いて変異を導入した細胞からオルガノイドを作製し、病態の一部を *in vitro* で再現したり、ヒト腎臓発生過程における遺伝子機能を解析したりするものである(図5)。Freedman らは、遺伝子編集技術で *PKD1/2* 遺伝子に変異を与えたヒト多能性幹細胞からオルガノイドを作製し、尿細管に嚢胞様構造が形成される

ことや、Poxocalyxin 遺伝子の機能欠失で誘導ポドサイト同士の細胞間接着に異常が起こることを報告している^{18,19)}。そのほかにも、ネフロン癆の患者由来の腎オルガノイドで繊毛形成異常を観察した報告²⁰⁾があるほか、われわれは、ネフリン遺伝子座の片アレルに欠損を、もう一方のアレルに点変異を保持した先天性ネフローゼ症候群の患者から作製した iPS 細胞を用いて、ネフリン蛋白のポドサイトの細胞外膜上への局在が極端に減弱したことを報告している²¹⁾。また、発生過程でネフロン前駆細胞と尿管芽に共通して発現する転写因子 PAX2 をノックアウトした iPS 細胞では、ネフロン前駆細胞誘導およびネフロン形成には大きな異常が見られない一方で、尿管芽系譜では尿管芽の分化効率が低下するとともに上皮構造が維持できずに消退するという、系譜ごとに異なる表現型が存在することも明らかになった^{11,22)}。このように、iPS 細胞を用いればヒト細胞で自在に遺伝子の機能欠失・獲得研究を行うことができ、さらにオルガノイドでフェノタイプを観察することで、ある程度の組織学的解析が可能であることから、腎オルガノイドは新たな研究資源を提供していると言えよう。一方で、近年の報告が示すように、オルガノイドと真のヒト腎組織では、構成細胞の違いや血流・尿流の有無といった違いがあるほか、培養実験ならではのフェノタイプのゆらぎ、さらには用いる誘導プロトコルによるバイアスなど考慮すべき点も多く、実際にどの程度生体における病態や機能が再現されているかについては慎重な解析と解釈が必要である。

オルガノイド以外の腎臓再生関連研究

オルガノイド研究が広がる一方で、前述の臨床研究のように個々の細胞レベルでの応用を考へる場合は、その細胞を純粋培養するという方向性も残る。長船らは、慢性腎臓病における腎性貧血を細胞移植により解決する方法として、ヒト iPS 細胞から Epo 産生能力を持つ胎児肝臓細胞様の細胞を誘導したことを報告している²³⁾。さらに、この細胞をアデニン投与で慢性腎不全状態にしたモデルマウスに移植することで貧血症状を改善できたとしており、今後、既存の Epo 製剤に代わる治療へと発展するかどうか注目される。

一方、先に *in vitro* でオルガノイド内に血管網を構築することの難しさに触れたが、宿主動物の体内で、ヒト誘導腎臓前駆細胞からヒト腎臓組織を構築させることで血管網を保持する腎臓を作製するという試みも存在する。以前中内らは、動物の腎臓が発生しないように遺伝子改変したホストの胚盤胞にドナー由来の多能性幹細胞を補完することで、宿主動物の体内にドナー細胞由来の腎臓を作らせるという手法を報告していた^{24,25)}。この方法は画期的ではあるが、ヒト iPS 細胞は多能性幹細胞であるため、たとえ腎臓のみが欠損する遺伝子改変動物に補完する場合でも、一定の割合で腎臓以外の臓器にもヒト細胞が混入したキメラ動物が生まれる可能性を否定できない。そこで横尾らは、遺伝子改変マウスを用いて、ネフロン前駆細胞およびそれが分化したネフロンのみがジフテリアトキシン存在下に死滅するような遺伝子改変ホストマウスを用意し、胎生 13.5 日目で腎臓を膀胱・尿管つきで回収、*in vitro* でドナーネフロン前駆細胞とともにジフテリアトキシンを投与したのちに傍大動脈領域に再移植するという方法を報告している²⁶⁾。これにより、これまでのネフロン前駆細胞の注入実験よりも高い効率でドナー由来の細胞がネフロン形成に寄与すること、さらにドナー細胞にラットのネフロン前駆細胞を用いても同様のことが可能であることを報告している。この実験では、ネフロン上皮系譜以外の間質系細胞や集合管組織、血管網などは依然ホスト由来であるが、将来的にこれらをすべてドナー由来に置換できるかが今後の課題と言えよう。

おわりに

腎オルガノイド研究は、その作製法すら未解明であった時代から、多能性幹細胞さえ適切に維持できれば、どこで

も誰でも作製しうる時代へと移行しつつある。腎オルガノイドはどこまで生体の腎臓に近づけるのか、そして腎オルガノイドを用いてどのような新しい知見を見出し、臨床医学へ還元できるのか。また、オルガノイドを作らずに腎臓の機能再生へと導く新たな方法論が生まれるのか。腎臓再生研究領域へ発生学、臨床再生医学、腎臓病学などさまざまな研究者が参入することによって、今後、どのような研究が展開されていくのか注目される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文献

1. Sasai Y. Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture. *Nature* 2013 ; 493(7432) : 318-326.
2. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011 ; 472(7341) : 51-56.
3. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009 ; 459(7244) : 262-265.
4. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016 ; 165(7) : 1586-1597.
5. Kim D, Dressler GR. Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16(12) : 3527-3534.
6. Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahan AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 1367.
7. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 ; 14(1) : 53-67.
8. Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Chuva de Sousa Lopes SM, Little MH. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015 ; 526(7574) : 564-568.
9. Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, Gallegos T, Suzuki K, Okamura D, Wu MZ, Dubova I, Esteban CR, Montserrat N, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol* 2013 ; 15(12) : 1507-1515.

10. 太口敦博. YIA 受賞講演 多能性幹細胞から尿管芽の誘導法の確立と胎児腎臓の高次構造の再現. 日腎会誌 2018 ; 60 (8) : 1207-1212.
11. Taguchi A, Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2017 ; 21 (6) : 730-746 e6.
12. Lindstrom NO, McMahon JA, Guo J, Tran T, Guo Q, Rutledge E, Parvez RK, Saribekyan G, Schuler RE, Liao C, Kim AD, Abdelhalim A, Ruffins SW, Thornton ME, Baskin L, Grubbs B, Kesselman C, McMahon AP. Conserved and divergent features of human and mouse kidney organogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 (3) : 785-805.
13. Lindstrom NO, Guo J, Kim AD, Tran T, Guo Q, De Sena Brandine G, Ransick A, Parvez RK, Thornton ME, Baskin L, Grubbs B, McMahon JA, Smith AD, McMahon AP. Conserved and divergent features of mesenchymal progenitor cell types within the cortical nephrogenic niche of the human and mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 (3) : 806-824.
14. Lindstrom NO, Tran T, Guo J, Rutledge E, Parvez RK, Thornton ME, Grubbs B, McMahon JA, McMahon AP. Conserved and divergent molecular and anatomic features of human and mouse nephron patterning. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 (3) : 825-840.
15. Czerniecki SM, Cruz NM, Harder JL, Menon R, Annis J, Otto EA, Gulieva RE, Islas LV, Kim YK, Tran LM, Martins TJ, Pippin JW, Fu H, Kretzler M, Shankland SJ, Himmelfarb J, Moon RT, Paragas N, Freedman BS. High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping. *Cell Stem Cell* 2018 ; 22 (6) : 929-940 e4.
16. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, Kishi S, Valerius MT, Bonventre JV. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 2015 ; 33 (11) : 1193-1200.
17. Wu H, Uchimura K, Donnelly EL, Kirita Y, Morris SA, Humphreys BD. Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics. *Cell Stem Cell* 2018. doi : 10.1016/j.stem.2018.10.010. [Epub ahead of print]
18. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, Saad AF, Li MK, Hughes MR, Werff RV, Peters DT, Lu J, Baccei A, Siedlecki AM, Valerius MT, Musunuru K, McNagny KM, Steinman TI, Zhou J, Lerou PH, Bonventre JV. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 8715.
19. Kim YK, Refaeli I, Brooks CR, Jing P, Gulieva RE, Hughes MR, Cruz NM, Liu Y, Churchill AJ, Wang Y, Fu H, Pippin JW, Lin LY, Shankland SJ, Vogl AW, McNagny KM, Freedman BS. Gene-edited human kidney organoids reveal mechanisms of disease in podocyte development. *Stem Cells* 2017 ; 35 (12) : 2366-2378.
20. Forbes TA, Howden SE, Lawlor K, Phipson B, Maksimovic J, Hale L, Wilson S, Quinlan C, Ho G, Holman K, Bennetts B, Crawford J, Trnka P, Oshlack A, Patel C, Mallett A, Simons C, Little MH. Patient-iPSC-derived kidney organoids show functional validation of a ciliopathic renal phenotype and reveal underlying pathogenetic mechanisms. *Am J Hum Genet* 2018 ; 102 (5) : 816-831.
21. Tanigawa S, Islam M, Sharmin S, Naganuma H, Yoshimura Y, Haque F, Era T, Nakazato H, Nakanishi K, Sakuma T, Yamamoto T, Kurihara H, Taguchi A, Nishinakamura R. Organoids from nephrotic disease-derived iPSCs identify impaired NEPHRIN localization and slit diaphragm formation in kidney podocytes. *Stem Cell Reports* 2018 ; 11 (3) : 727-740.
22. Kaku Y, Taguchi A, Tanigawa S, Haque F, Sakuma T, Yamamoto T, Nishinakamura R. PAX2 is dispensable for *in vitro* nephron formation from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2017 ; 7 (1) : 4554.
23. Hitomi H, Kasahara T, Katagiri N, Hoshina A, Mae SI, Kotaka M, Toyohara T, Rahman A, Nakano D, Niwa A, Saito MK, Nakahata T, Nishiyama A, Osafune K. Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells ameliorate renal anemia in mice. *Sci Transl Med* 2017 ; 9 (409) : eaaj2300.
24. Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 2012 ; 180 (6) : 2417-246.
25. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010 ; 142 (5) : 787-799.
26. Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, Matsumoto K, Fukunaga S, Kim BS, Okano HJ, Yokoo T. Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun* 2017 ; 8 (1) : 1719.