

<特集「腎臓病診療の進歩」>

腎領域の研究

—最新の話題—

桐 田 雄 平*

京都府立医科大学大学院医学研究科腎臓内科学

Latest Topics of Kidney Research

Yuhei Kirita

Department of Nephrology,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

近年の研究手法の発達は凄まじく、特に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞) の出現や、次世代シーケンサー (NGS) の発達によるオミクス解析の進歩、コンピューターの発達による機械学習・深層学習を用いたバイオインフォマティクス、一細胞レベルでのオミクス解析、遺伝子改変技術の発達もたらした影響は計り知れない。現在はそれらを巧みに組み合わせた研究も多く、情報量が増え、質が向上している一方、より難解さが増している。本稿ではこれらの最新の研究手法について概説し、最近の研究を読み解く足掛かりとしたい。

キーワード：バイオインフォマティクス、オルガノイド、遺伝子編集。

Abstract

The development of research technologies in recent years has been tremendous, especially as the emergence of induced pluripotent stem cells (iPS cells), advances in omics analysis with the development of next-generation sequencers (NGS), bioinformatics using machine learning and deep learning with the development of computers, and the development of gene editing techniques. Many studies are now combining these technologies, increasing the volume and quality of information, but also making it more difficult to understand. In this paper, we will review these newest research technologies and provide a springboard for reading recent studies.

Key Words: Bioinformatics, Organoid, Gene editing.

はじめに

高齢化や生活習慣病の増加により慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) 患者は年々増

加しており、その健康寿命への影響から CKD への対応は喫緊の課題といえる。CKD の原因疾患は様々で、日々その病態・治療法について研究がなされている。しかし、腎臓の構造・役

令和 6 年 2 月 26 日受付 令和 6 年 3 月 1 日受理

*連絡先 桐田雄平 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地

ykirita@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.133.04.239

割の複雑さや、血液透析・腹膜透析・腎移植による腎代替療法がすでに発達している背景からか、筆者が基礎研究を始めた当時の腎領域の基礎研究は、他臓器に比べて少なからず遅れをとっていた印象があった。しかし近年の研究手法の凄まじい発達により、腎領域の基礎研究も加速度的に発展していると感じている。特に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) の出現や、次世代シーケンサー (NGS) の発達によるオミクス解析の進歩、コンピューターの発達による機械学習・深層学習を用いたバイオインフォマティクス、1細胞レベル・空間でのオミクス解析、遺伝子改変技術の発達をもたらした影響は計り知れない。

本稿では、これらの技術を用いた最新の研究について概説する。

iPS 細胞を用いた研究

2006年にiPS細胞が樹立され¹⁾、様々な臓器における再生医療への応用が期待されたが、腎領域においてはその構成細胞腫の多さや構造の複雑さから他臓器に比べて遅れをとっていた。その様な中でも発生学の進歩とともに、iPS細胞から腎臓前駆細胞を誘導し、腎臓の高次構造を再現する臓器様組織 (オルガノイド) の作製が可能となった²⁻⁴⁾。さらに近年、後述するシングルセルシーケンスという研究手法の出現もあり、腎発生の理解が飛躍的に進み、かつ作製したオルガノイドの構成細胞や成熟度を解析することが可能となったことから、オルガノイド作製プロトコルの改良がすすみ、移植可能な人工腎臓の作製という究極の目標へ向けて大きく前進している⁵⁾。また、これまでは遺伝子改変マウスなどのモデル動物が用いられることが一般的であった病態再現実験において、腎臓オルガノイドの使用が試みられている。方法は大きく2種類に分かれており、後述する遺伝子編集技術であるCRISPR-Cas9を用いて正常なiPS細胞に変異遺伝子を導入する方法と、実際に疾患を持つ患者由来のiPS細胞を用いる方法がある。前者は異常遺伝子がすでに明らかである必要があるが、実際の患者へのアプローチが不

要であることと、変異遺伝子以外は同じ遺伝的背景で比較できることが大きなメリットである。後者は実際の患者で起こっている病態が文字通り試験管内で再現され、変異遺伝子の同定に結び付けられる。実例をあげると、KuraokaらはCRISPR-Cas9を用いてPKD1変異を導入したiPS細胞と、ADPKD患者由来のiPS細胞の両方を用いた腎臓オルガノイドで嚢胞の形成の病態を再現した⁶⁾。これらの技術を用いたさらなる病態解明や遺伝子治療への応用が期待される。

オミクス解析

我々の体の設計図は核酸であるアデニン (A)・グアニン (G)・チミン (T)・シトシン (C) の4塩基の配列で構成される二重螺旋構造のDNAとして保存されている。我々の細胞は、設計図であるDNAから必要部分をmessenger RNA (mRNA) に転写 (transcription) し、mRNAからタンパク質に翻訳 (translation) して様々な働きをする。

オミクス (omics) とは総体 (ome: オーム) を解析することである。オームには遺伝子DNAの総体であるゲノム (genome)、DNAを修飾するエピゲノム (epigenome)、DNAの転写産物であるmRNAの総体であるトランスクリプトーム (transcriptome)、RNAの翻訳産物であるタンパク質の総体であるプロテオーム (proteome) があり、それぞれの網羅的解析がゲノミクス、エピゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスである (図)。「網羅的解析」とあるように、それぞれのデータは膨大であり、データの取得も解析も簡単で

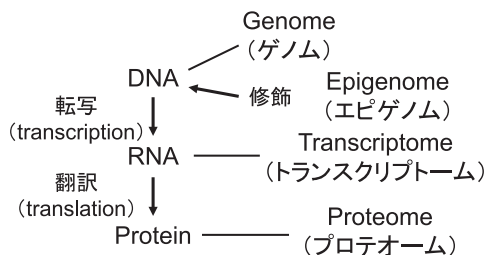


図 ome の概念

はなかった。しかし近年の次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) の登場と発達により膨大な塩基配列を短時間で一度に読み取ることができるようになり、加えてコンピューターの発達によりその膨大なデータを機械学習・深層学習を用いて短時間で解析することが可能となった。

ゲノミクスでは、ヒトのDNAはヒトゲノムプロジェクトにより2003年に解読は完了し、AGTCの塩基配列で表されるデータベースとして使用可能となっている。健常者とある疾患の患者のDNAを比較することにより、疾患原因遺伝子を明らかにできる。古くから行われている手法として連鎖解析があり、家系内での遺伝情報と疾患の受け継がれ方を比較することで原因遺伝子を同定できる。この手法は、単一遺伝子病の疾患原因遺伝子の同定には効果的であったが、多因子疾患の発症に関わる疾患感受性遺伝子の大半は、単独では発症リスクを高める効果は小さいため、同定することは困難であった。近年はNGSの出現・発達によるゲノム情報の取得時間・コストの大幅な低減と、それに付随する研究の大規模化、遺伝統計学の発展によりゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) と呼ばれる研究手法が確立・発展した。GWASは特定の疾患などの表現型を持つ群と健常者それぞれの全ゲノムを網羅的に解析することにより、疾患感受性遺伝子を同定することができる。腎領域でもステロイド感受性ネフローゼ症候群やIgA腎症などの原発性糸球体疾患や糖尿病性腎臓病、CKDなどでGWASが用いられ、多くの疾患感受性遺伝子が明らかになっている⁷⁻¹⁰⁾。

エピゲノムとは、DNAの塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子制御であり、DNAのメチル化や、DNAを折りたたむクロマチンを構成するヒストンの修飾 (アセチル化・リン酸化・メチル化)、microRNAなどの非翻訳性RNA (non coding RNA) がある。エピゲノムは環境の影響で変化して細胞の記憶として定着し、世代を超えて継承される。癌や生活習慣病との関わりが指摘されており、近年では

CKDとの関連も研究されている。Yanらはシトシンメチル化部位の網羅的解析によるエピゲノムワイド関連解析 (epigenome-wide association study: EWAS) と単一細胞レベルでのオープンクロマチン領域の網羅的解析を組み合わせることにより、腎臓病発症のリスクとなるエピジェネティックな変化を明らかにした¹¹⁾。

トランスクリプトーム解析は、細胞や臓器における全てのmRNAの発現状況を網羅的に解析し、そのふるまいを明らかにすることである。例えば、健常者の腎臓とAKIの腎臓のトランスクリプトーム解析を行うことにより、AKI時の腎臓で何が起きているのかを網羅的に明らかにできる。2017年にAKIについてRNA-seqを用いてその病態を詳細に研究した論文がLiuらから発表された¹²⁾。AKIの動物実験モデルである両側腎虚血再灌流傷害 (IRI) を成体マウスに施し、傷害後1年までの腎臓を経時的に採取し、RNA-seqおよび組織学的検討を行なった。RNA-seqの解析結果から、数時間、数日、1~4週間、6~12ヶ月に分けられる、それぞれの期間で特徴的な遺伝子発現の変化が明らかとなった。特にIRI後1~4週間の腎臓では、炎症や線維化に関わる遺伝子群の発現が顕著であった。

1 細胞レベルでのオミクス解析

技術の進歩は凄まじく、最近では組織レベルではなく、単一細胞レベルでのRNA-seq (single cell RNA-seq, scRNA-seq) が可能となった¹³⁻¹⁵⁾。現在最も使用されている10X Genomics社のChromiumシステムは、数千から100万の細胞のトランスクリプトームを短時間のうちに一度に取得することができる。これまでのRNA-seqでは、ある遺伝子の発現が亢進していることがわかっていても、それが一体どの細胞で発現されているのかはわからなかったが、scRNA-seqではそれを明らかにできる。例えば、障害腎において炎症を惹起する遺伝子が発現していたとしても、組織レベルのRNA-seq (bulk RNA-seq) では尿細管細胞、線維芽細胞、炎症細胞などのいずれの細胞が発現していたのかわ

からないが、scRNA-seqではこれを明らかにできるため、病態をより詳細に解明できる。しかし、scRNA-seqのデータは単一細胞それぞれから得られたRNA-seqデータが数千から数万個分集合した形として出力されるため、データ量は膨れ上がり、通常のコンピューターではファイルを開けることすらできない。そのため、ワークステーションやサーバーなどの高性能なコンピューターが必須となる。NGSデータを処理することにより、細胞と遺伝子発現量の膨大な行列(Digital gene expression matrix)が出力され、この行列をRやPythonなどの統計ソフトを用いた機械学習でクラスタリング(Clustering)や次元削減をして可視化する。クラスタリングとは、遺伝子発現情報の行列から類似した細胞を分類していくことであり、腎臓であれば尿細管細胞・線維芽細胞・内皮細胞などに機械学習で分類されていく。ただし、分類された集団(Cluster)はどういった細胞種なのかは自動で判断されないため、既知の情報と照らし合わせて細胞の種類を同定する(Annotation)。Clustering・Annotation後は通常のbulk RNA-seqと同様にDEG解析やパスウェイ解析を行なう。またscRNA-seqの強みとして、複数の細胞種の遺伝子発現情報が得られているため、リガンドやその受容体の発現強度から、細胞間の相互作用やネットワークを推測することができる¹⁶⁾。

筆者らは、マウス急性腎傷害モデル(両側腎IRI)に対して経時的にscRNA-seqを行い、急性腎傷害時の全腎臓構成細胞の遺伝子発現の変化を明らかにした¹⁷⁾。急性腎障害後の腎臓では、大半の尿細管は完全に再生するが、一部の尿細管上皮細胞は「FR-PTC; Failed Repair Proximal Tubular Cell」と呼ばれる不完全な再生による新たな細胞状態になることを発見した。FR-PTCは線維化や炎症を惹起する遺伝子を発現していたため、急性腎傷害から慢性腎臓病に至る「鍵」となる細胞群と考えられた。FR-PTCはIRI後2週間で最も多く観察されたため、前述のbulk RNA-seqで明らかとなったIRI後1~4週間の炎症・線維化に関わる遺伝子群は、

主にFR-PTCから発現していたと考えられる。

空間的トランスクリプトーム解析

scRNA-seqではどの細胞種がどのような遺伝子を発現しているかが網羅的にわかるが、組織は三次元構造であるため、その細胞がどこに存在するのかわからない。これまで、遺伝子発現の局在を調べるためには、組織切片でin situ hybridizationなどの手法で単一もしくは数個の遺伝子の局在を調べるしかなかった。しかし最近、空間的トランスクリプトーム解析(Spatial transcriptomics)という、位置情報を保持したトランスクリプトーム解析を行う手法が開発された¹⁸⁾。現在では10X Genomics社が発売するVisiumなどが主に用いられており、2021年にDixonらがマウスのAKIモデルにおいて使用している¹⁹⁾。先述のscRNA-seqと同様にIRIによるAKI後の腎臓を経時的に評価しており、scRNA-seqでは明らかにできなかった空間的情報が見事に補完されている。

遺伝子編集技術

遺伝子編集は、任意の標的部位のDNA二本鎖を切断し(double-strand break: DSB)、DSB修復機構を利用して標的配列の欠失や挿入などの変異による遺伝子機能の破壊(ノックアウト)や、外来遺伝子の挿入(ノックイン)を行う。1996年にZFN(zinc-finger nuclease)が報告されて以降、遺伝子編集技術が生命科学分野において一般的となって久しいが、2012年のCRISPR-Casシステムの出現は世界に衝撃を与えた。CRISPR-Cas以前の遺伝子編集技術は人工制限酵素を用いて標的DNAの塩基配列を改変していたが、タンパク質のDNA結合ドメインを標的配列に応じて作製するのが煩雑であった。しかし、CRISPR-CasシステムはRNA誘導型DNA切断酵素であり、短いRNA(ガイドRNA)とそれに結合するCasヌクレアーゼによって簡便に遺伝子編集を行うことができる画期的なツールである。細胞実験や遺伝子改変マウスの作成などで広く活用されているが、遺伝子スクリーニングにも活用されている。CRIS-

PR スクリーニングは CRISPR-Cas9 による遺伝子ノックアウトをゲノムスケールで行うことで、特定の表現型に関連する遺伝子を網羅的に検出する技術である。Liらは IRI による障害機序のひとつであるフェロトシスという細胞死において、7-DHC (デヒドロコレステロール) のレベルを規定する酵素群が重要であることを CRISPR スクリーニングで明らかにし、腎臓の IRI において 7-DHC を薬理的に調整することでその障害を低減できることを明らかにした²⁰⁾。腎移植や心血管手術による腎機能の低下を予防し得る画期的な報告である。

また、最近では移植領域においても CRISPR-Cas は活用されている。生体腎移植での提供臓器不足は世界共通の問題であり、その解決策として異種移植 (xenotransplantation) が注目されている。特にブタは、多胎妊娠であり繁殖がやすく安定した供給が可能であり、また成長が早く 6 ヶ月程度で臓器サイズがヒトと同等となることから、臓器供給源として期待されている。しかし、異種臓器への超急性期拒絶反応や移植臓器からの感染症伝搬の問題が指摘されており、それを解決する手段として CRISPR-Cas

システムによる遺伝子編集が活用されている。最近、ブタの細胞上の異種自然抗原の除去と補体の活性化およびそれに伴う消費性凝固障害や炎症反応を抑制するヒト遺伝子の導入により、正着率が飛躍的に向上している²¹⁾。国内でも、本学や東京慈恵会医科大学などがブタ腎臓を用いた異種移植の臨床研究を計画しており、近い将来の腎代替療法の選択肢として現実味を帯び始めている。

おわりに

iPS 細胞、オミクス解析、遺伝子編集技術を主体に腎臓領域の最近の研究について概説した。研究手法の飛躍的な進歩により、研究成果も飛躍的に増加・向上しているが、その分研究は複雑化、コストも増大し、かつ競争は激化しており、優秀な人材と時間、豊富な資金の必要性がより浮き彫りになってきている。日本ではすでに科学技術力の低下が囁かれており、研究資金・人材の確保のための対応が急務と考えられる。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006.
- 2) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, et al. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 14: 53-67, 2014.
- 3) Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526: 564-568, 2015.
- 4) 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*, 33: 1193-1200, 2015.
- 5) 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*, 23: 869-881 e8, 2018.
- 6) Kuraoka S, Tanigawa S, Taguchi A, Hotta A, Nakazato H, Osafune K, et al. PKD1-Dependent Renal Cystogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ureteric Bud/Collecting Duct Organoids. *J Am Soc Nephrol*, 31: 2355-2371, 2020.
- 7) Gbadegesin RA, Adeyemo A, Webb NJ, Greenbaum LA, Abeyagunawardena A, Thalagahoda S, et al. HLA-DQA1 and PLCG2 Are Candidate Risk Loci for Childhood-Onset Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 26: 1701-1710, 2015.
- 8) Kiryluk K, Sanchez-Rodriguez E, Zhou XJ, Zanoni F, Liu L, Mladkova N, et al. Genome-wide association analyses define pathogenic signaling pathways and prioritize drug targets for IgA nephropathy. *Nat Gen*

- et, 55: 1091-1105, 2023.
- 9) Salem RM, Todd JN, Sandholm N, Cole JB, Chen WM, Andrews D, et al. Genome-Wide Association Study of Diabetic Kidney Disease Highlights Biology Involved in Glomerular Basement Membrane Collagen. *J Am Soc Nephrol*, 30: 2000-2016, 2019.
 - 10) Wuttke M, Li Y, Li M, Sieber KB, Feitosa MF, Gorski M, et al. A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet*, 51: 957-972, 2019.
 - 11) Yan Y, Liu H, Abedini A, Sheng X, Palmer M, Li H, et al. Unraveling the epigenetic code: human kidney DNA methylation and chromatin dynamics in renal disease development. *Nat Commun*, 15: 873, 2024.
 - 12) Liu J, Kumar S, Dolzhenko E, Alvarado GF, Guo J, Lu C, et al. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI Insight*, 2, 2017.
 - 13) Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 161: 1187-1201, 2015.
 - 14) Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemes J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*, 161: 1202-1214, 2015.
 - 15) Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun*, 8: 14049, 2017.
 - 16) Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, Vento-Tormo R. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc*, 15: 1484-1506, 2020.
 - 17) Kirita Y, Wu H, Uchimura K, Wilson PC, Humphreys BD. Cell profiling of mouse acute kidney injury reveals conserved cellular responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117: 15874-15883, 2020.
 - 18) Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, Lundmark A, Navarro JF, Magnusson J, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 353: 78-82, 2016.
 - 19) Dixon EE, Wu H, Muto Y, Wilson PC, Humphreys BD. Spatially Resolved Transcriptomic Analysis of Acute Kidney Injury in a Female Murine Model. *J Am Soc Nephrol*, 33: 279-289, 2022.
 - 20) Li Y, Ran Q, Duan Q, Jin J, Wang Y, Yu L, et al. 7-Dehydrocholesterol dictates ferroptosis sensitivity. *Nature*, 626: 411-418, 2024.
 - 21) Anand RP, Layer JV, Heja D, Hirose T, Lassiter G, Firl DJ, et al. Design and testing of a humanized porcine donor for xenotransplantation. *Nature*, 622: 393-401, 2023.

著者プロフィール



桐田 雄平 Yuhei Kirita

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科腎臓内科学・助教

略歴：2008年3月 弘前大学医学部医学科卒業
 2008年4月 公立南丹病院（現・京都中部総合医療センター） 初期研修医
 2010年4月 公立南丹病院（現・京都中部総合医療センター） 腎臓内科
 2012年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科 腎臓内科学専攻
 2016年4月 京都府立医科大学 腎臓内科 病院助教
 2017年4月 Washington University in St. Louis, Renal division, Postdoctoral fellow
 2019年12月 京都府立医科大学腎臓内科 病院助教
 2022年4月 京都府立医科大学 助教

専門分野：腎臓内科

- 主な業績：1. Hino T, Omura S, Nakagawa R, Togashi T, Takeda S, Hiramoto T, Tasaka S, Hirano H, Tokuyama T, Uosaki H, Ishiguro S, Kagieva M, Yamano H, Ozaki Y, Motooka D, Mori H, Kirita Y, Kise Y, Itoh Y, Matoba S, Aburatani H, Yachie N, Karvelis T, Siksny V, Ohmori T, Hoshino A, Nureki O. An As-Cas12f-based compact genome editing tool derived by deep mutational scanning and structural analysis. *Cell*, **186**: 4920-4935, 2023.
2. Minami Y, Hoshino A, Higuchi Y, Hamaguchi M, Kaneko Y, Kirita Y, Taminishi S, Nishiji T, Taruno A, Fukui M, Arany Z, Matoba S. Liver lipophagy ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through extracellular lipid secretion. *Nat Commun*, **14**: 4084, 2023.
3. Gerhardt LMS, Koppitch K, van Gestel J, Guo J, Cho S, Wu H, Kirita Y, Humphreys BD, McMahon AP. Lineage Tracing and Single-Nucleus Multiomics Reveal Novel Features of Adaptive and Maladaptive Repair after Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*, **34**: 554-571, 2023.
4. Ikemura N, Taminishi S, Inaba T, Arimori T, Motooka D, Katoh K, Kirita Y, Higuchi Y, Li S, Suzuki T, Itoh Y, Ozaki Y, Nakamura S, Matoba S, Standley DM, Okamoto T, Takagi J, Hoshino A. An engineered ACE2 decoy neutralizes the SARS-CoV-2 Omicron variant and confers protection against infection in vivo. *Sci Transl Med*, **14**: eabn7737, 2022.
5. Kitani T, Kidokoro K, Nakata T, Kirita Y, Nakamura I, Nakai K, Yagi-Tomita A, Ida T, Uehara-Watanabe N, Ikeda K, Yamashita N, Humphreys BD, Kashihara N, Matoba S, Tamagaki K, Kusaba T. Kidney vascular congestion exacerbates acute kidney injury in mice. *Kidney Int*, **101**: 551-562, 2022.
6. Higuchi Y, Suzuki T, Arimori T, Ikemura N, Mihara E, Kirita Y, Ohginati E, Mazda O, Motooka D, Nakamura S, Sakai Y, Itoh Y, Sugihara F, Matsuura Y, Matoba S, Okamoto T, Takagi J, Hoshino A. Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2. *Nat Commun*, **12**: 3802, 2021.
7. Kirita Y, Wu H, Uchimura K, Wilson PC, Humphreys BD. Cell profiling of mouse acute kidney injury reveals conserved cellular responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, **117**: 15874-15883, 2020.
8. Wilson PC, Wu H, Kirita Y, Uchimura K, Ledru N, Rennke HG, Welling PA, Waikar SS, Humphreys BD. The single-cell transcriptomic landscape of early human diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **116**: 19619-19625, 2019.
9. Wu H, Kirita Y, Donnelly EL, Humphreys BD. Advantages of Single-Nucleus over Single-Cell RNA Sequencing of Adult Kidney: Rare Cell Types and Novel Cell States Revealed in Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, **30**: 23-32, 2019.
10. 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*, **23**: 869-881, 2018.