

腎臓を創る

熊本大学発生医学研究所 腎臓発生分野 西中村隆一

【要旨】

腎不全による人工透析患者は32万人強となり、その医療費は年間1.5兆円を超えている。腎移植が腎不全の唯一の根治的治療だが、ドナー不足に悩まされている。このような現状の一方で、腎臓のような3次元臓器を作ることは極めて困難とされてきた。しかし我々を含む複数のグループが、マウスES細胞（embryonic stem cell）及びヒトiPS細胞（induced pluripotent stem cell）から、糸球体や尿細管、さらには尿管芽（集合管）の試験管内誘導に成功した。そのため短期的には患者由来のiPS細胞を使った腎臓病態の再現が、長期的には移植用腎臓組織の作製が視野に入ってきた。本稿では腎臓発生・再生研究の最近の進展と今後の展望を述べる。

key words

腎臓再生, ネフロン前駆細胞, 尿管芽, iPS細胞

I. 糸球体と尿細管を作る

（1）腎臓を形作る3つの前駆細胞

腎臓はヒトでは100万個ものネフロンが集まった複雑な臓器である。ネフロンは腎臓の最小機能単位であり、糸球体、近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管、集合管から構成される。哺乳類の腎臓は、頭側から尾側に向かって前腎、中腎、後腎の順に発生する。前腎と中腎は魚類や両生類では機能するのに対し、哺乳類ではほぼ退化し、成体の腎臓として働くのは後腎である。そしてこの後腎は胎児期に存在する少なくとも3つの前駆細胞から形成される。すなわちネフロン前駆細胞、尿管芽、そして間質前駆細胞である（図1）。これら3つは相互作用によって腎臓を形作っている。ネフロン前駆細胞は尿管芽からの作用（主にWNT9b）によって上皮化して糸球体と尿細管を形成する。一方で、尿管芽はネフロン前駆細胞からの作用（主にグリア細胞由来神経栄養因子：GDNF）によって分岐して集合管・尿管となり、尿の排出路を形成する。そして間質前駆細胞はネフロンの間のスペースを埋めるように存在する間質（糸球体メサンギウムも含む）へと分化す

る。

（2）腎臓の起源同定に基づく腎臓組織の誘導

腎臓を作るには、その前駆細胞がどこから来るのかを突き止めなければならない。マウス胎生8.5日目に未分化中胚葉細胞から胎仔前方に中間中胚葉が形成され、それが中腎管（ウォルフ管）そして尿管芽へと分化していく。しかし、ネフロン前駆細胞の起源となる細胞は、胎生8.5日目ではまだ胎仔後端部に未分化な状態で維持されており1日遅れた胎生9.5日目に胎仔後方で中間中胚葉となり、そこからネフロン前駆細胞へと分化する（図2）¹⁾。つまり、早い段階に体幹の前方（頭側）で形成される前方中間中胚葉からは尿管芽の元となるウォルフ管（中腎管）が、遅れて後方（尾側）で分化する後方中間中胚葉からはネフロン前駆細胞が発生する。先に分化したウォルフ管は胎児体幹の形成に伴って後方へと伸長し、遅れて体幹後方にネフロン前駆細胞が形成されると前述の相互作用を開始する。つまり、腎臓（後腎）は胎児発生の異なる時期、異なる場所に起源を持つ前駆細胞から形成されていることになり、これは腎臓の系統進化（生物が水中から陸地へ進

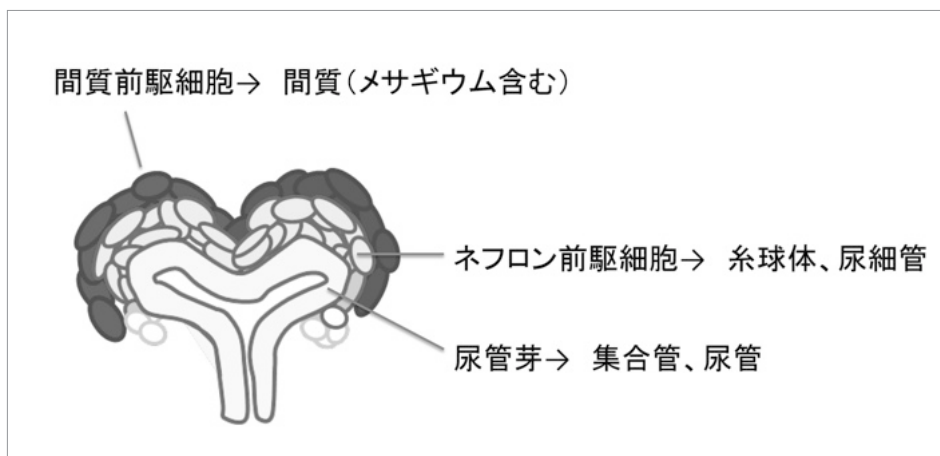


図1 腎臓を形成する3種類の前駆細胞
腎臓は、胎児期に存在するネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞から形成される

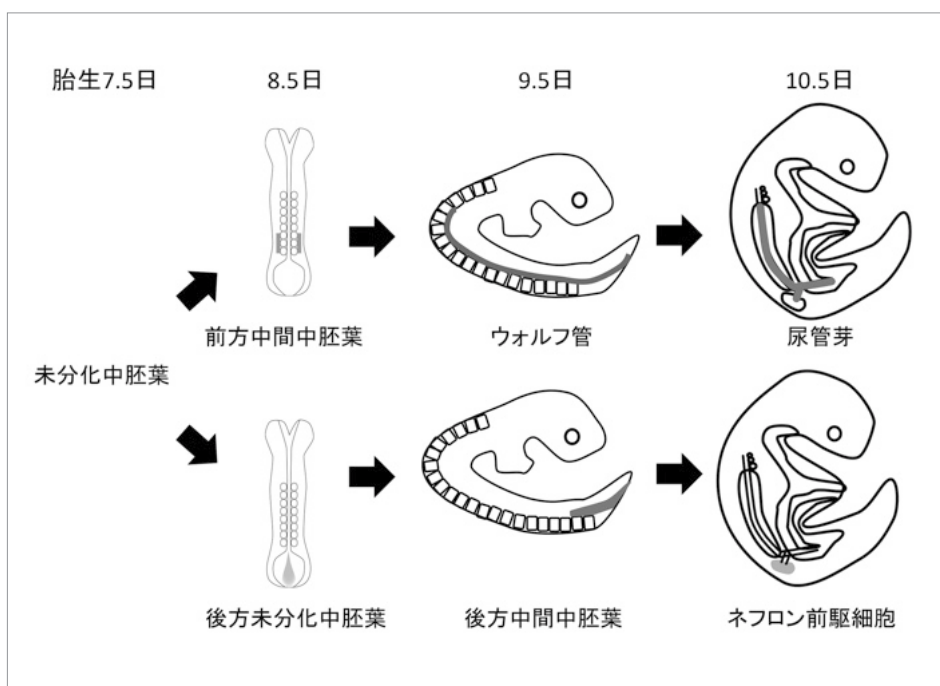


図2 マウス腎臓の発生過程
胎生8.5日に未分化中胚葉細胞から尿管芽の起源となる前方中間中胚葉が分化する。一方、ネフロン前駆細胞の起源である後方中間中胚葉は1日遅れた胎生9.5日に分化する。このように尿管芽とネフロン前駆細胞の細胞系譜は中間中胚葉への分化のタイミングも位置も異なる。

出するとともに前腎、中腎、後腎が進化したこと）とも関係性が示唆される。

ES細胞は胚盤胞（子宮着床前の胚）から樹立された細胞株であり、他のマウスの胚盤胞に注入すると、ホストと混ざってキメラマウス個体に寄与することができる。つまり身体中のすべての細胞になる能力を持っている。よって試験管内での培養条件を最適化すれば、理論的にはあらゆる細胞

種に分化させられるはずである。このES細胞様の細胞を、繊維芽細胞に4つの転写因子を導入して作られたのがiPS細胞である。我々はマウスES細胞及びヒトiPS細胞から、5ステップにわたる誘導法、つまり胎仔後端部の未分化中胚葉、後方中間中胚葉を経由してネフロン前駆細胞を誘導する方法の開発に成功した。そしてこのネフロン前駆細胞は多くの糸球体、尿細管を形成した¹⁾。

長年不可能であった腎臓組織の試験管内誘導が実に実現したわけである。

(3) ヒト iPS 細胞由来の糸球体と宿主血管の接続

糸球体は腎臓のろ過機能を担っており、ポドサイト、血管内皮細胞、メサンギウム細胞から構成される。ポドサイトは基底膜側に多数の複雑な突起（足突起）をもち、その間にはスリット膜と呼ばれる分子の篩が存在する。これによって血液中の水分は通り抜けるが血中蛋白質の大部分は尿に漏れないようになっている。このスリット膜の主な成分はネフリンである。そこで我々は、誘導ポドサイトを可視化できるように、ネフリンの遺伝子座に緑色蛍光タンパク（GFP）を挿入したヒト iPS 細胞を作製した²⁾。これからポドサイトを単離して、遺伝子発現を解析すると、生体のポドサイトで重要な働きを持つことが知られている多くの遺伝子が発現していることが判明した。

しかし誘導した糸球体には血管内皮細胞やメサンギウム細胞が存在せず、ポドサイトのみで構成されていた。さらに誘導ポドサイトは形態的に未熟であり、その一つの原因として、ポドサイトが本来相互作用すべき細胞、つまり血管内皮細胞と接していないことが考えられた。生体のポドサイトは血管内皮由来成長因子（VEGF）等の分泌によって血管内皮細胞を引きつけることができる。そこで、ヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞に分化誘導をかけた後に免疫不全マウスに移植すると、20 日目には、ヒトの糸球体に多数のマウス血管が入り込んだヒト糸球体が観察された²⁾。さらにポドサイトの突起は複雑化し、スリット膜様構造が電子顕微鏡で観察された。また、スリット膜の外側にあたる糸球体の管腔は拡張し、沈殿物の堆積が認められ、血液からのろ過を示唆する所見と考えられた。ヒト iPS 細胞由来の腎臓糸球体が生体の血管とつながった報告はこれが初めてである。とはいえ、その血管は極めて細い。太い血管が腎動脈から腎臓髄質を経て皮質の糸球体へ入り、さらに尿細管周囲に分布するという複雑な走行を再現することが、今後の課題の一つである。

(4) ヒト iPS 細胞由来の尿細管の機能

現在、腎臓組織の誘導法は複数のグループから報告されている。これらには類似した部分と異なる部分があり、最終産物の質の違いの検討は今後の課題である。米国の森實らは簡便かつ高効率なネフロン前駆細胞誘導法を提唱している³⁾。オーストラリアの高里らは、ネフロン前駆細胞に加えて、尿管芽、間質前駆細胞という腎臓のすべての細胞系譜を有するヒト腎臓オーガノイドを試験管内で作成したと報告し、注目を集めた⁴⁾。これらの報告では、近位尿細管が再吸収能や抗がん剤による選択的細胞死を示すこと、つまり尿細管がある程度機能を有していることを示している。これらをさらに成熟させる方法が開発されれば、薬剤の毒性試験等への応用が期待される。

II. 分岐する尿管芽と腎臓の高次構造を作る

(1) 尿管芽の誘導

腎臓誘導の研究は急速に進んでいるが、どの報告も尿を作って流すことには成功していない。それは尿の排出路、つまり集合管と尿管が形成されていないからであり、そのためには尿管芽の誘導が必須である。尿管芽は頻回に分岐し、その一つ一つの先端に糸球体と尿細管が接続する。分岐した尿管芽は、糸球体・尿細管から流れてくる尿を集合管として回収し、尿管という一つの出口に集める。こういった構造を試験管内で作れるかが次の課題になるわけである。上述の高里らは、ヒト iPS 細胞から一つのプロトコルでネフロン前駆細胞と尿管芽を誘導したと報告しているが⁴⁾、尿管芽に特徴的な分岐や単一の出口の形成は認められていない。

我々は、マウスで詳細な解析を行うことによって、マウス ES 細胞およびヒト iPS 細胞から分岐構造をもつ尿管芽の誘導に成功した⁵⁾。これは 7 ステップにわたる方法である。上述のように、マウス尿管芽の系譜は、胎生 8.5 日に未分化中胚葉から前方中間中胚葉となり、これはネフロン前駆

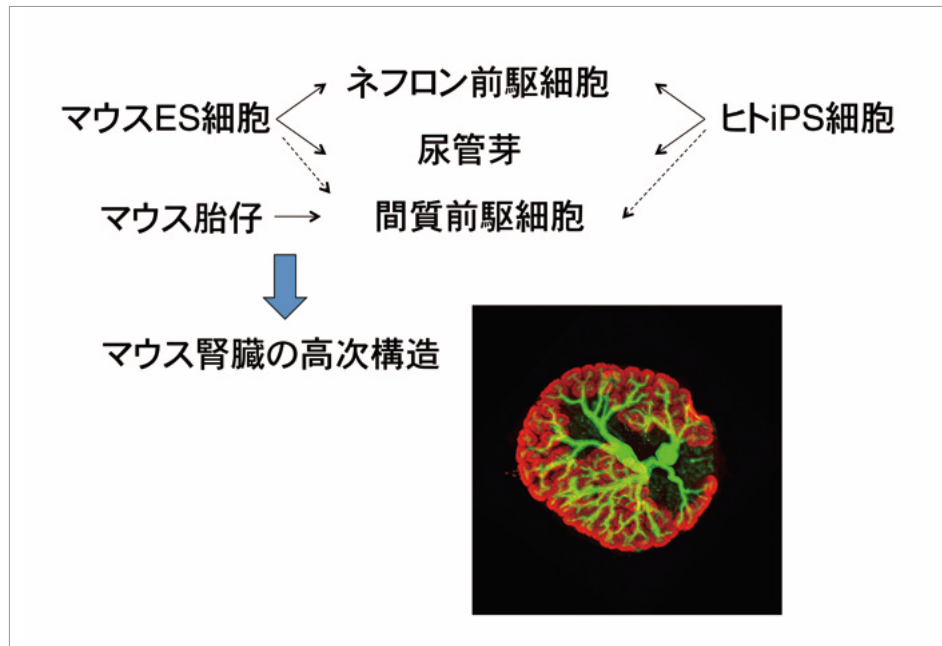


図3 試験管内で再構築した腎臓の高次構造
マウス ES 細胞から誘導した尿管芽・ネフロン前駆細胞とマウス胎仔由来の間質前駆細胞を凝集させて培養した。尿管芽は多数に分岐し、その先端部にネフロン前駆細胞が配置される。ヒト iPS 細胞からもネフロン前駆細胞と尿管芽の誘導は可能である。点線の矢印は未達成。

細胞の系譜が未分化中胚葉から後方前方中間中胚葉になるタイミングより 1 日早い (図 2)。この未分化中胚葉の維持は試験管内では Wnt によって制御でき、尿管芽の誘導には 1.5 日が最適であった。これはネフロン前駆細胞誘導に必要な 2.5 日に比して 1 日短く、試験管内誘導と生体内で一貫性のある結果となった。さらに、このステップの前後の培養条件もすべてネフロン前駆細胞とは異なっており、結局 2 つの系譜の誘導には全く異なる方法が必要であることが明らかになった。これは尿管芽とネフロン前駆細胞という 2 つの細胞系譜が発生段階の極めて早期で分かれていることを示唆している。

(2) 高次構造をもつ腎臓組織の作成

こうやって誘導された尿管芽は、試験管内で突出する芽のような形態を示した。そこで、マウス ES 細胞から誘導した尿管芽とネフロン前駆細胞を、胎生 11.5 日のマウス胎仔由来間質前駆細胞と凝集して培養すると、生体の尿管芽と同様に複数回分岐した。また分岐した尿管芽の先端にはネフロン前駆細胞が維持され、そこから内側に向

かって遠位尿細管や近位尿細管、糸球体が形成された (図 3)⁵⁾。よって、誘導した尿管芽は分岐能、ネフロン前駆細胞維持能、ネフロン分化能の全てを有することが証明されたとともに、我々の方法によって試験管内で腎臓の高次構造を再構築できることが示された。

しかし、間質前駆細胞がないと尿管芽の分岐やネフロンの分化は起きなかったため、この 3 つ目の前駆細胞の重要性も明らかになった。我々はヒト iPS 細胞からも尿管芽を誘導することに成功しているが、間質前駆細胞をヒト胎児から入手できないため、高次構造をもつヒト腎臓組織はまだ作れていない。よってマウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞からの間質前駆細胞誘導は今後の重要な課題である。上述のように、ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞を単一のプロトコルで誘導したという報告は存在するが⁴⁾、それぞれの系譜の最適誘導条件が全く異なることが明らかになった今、単一の条件で形成される組織は本物とは似て非なるものである可能性が高い。腎臓の異なる前駆細胞をそれぞれ別の方法で誘導して組み合わせることが、腎臓の高次構造への鍵

であると考えられ、本物の間質前駆細胞の誘導が急務である。

Ⅲ. 患者由来の iPS 細胞を使った研究展望

近年、患者からの iPS 細胞が比較的容易に樹立できるようになっていることから、疾患を試験管内で再現し、病態を解析し、さらには創薬へ応用しようとする試みが盛んにおこなわれている。また CRISPR-Cas 9 法によって、iPS 細胞のゲノムに望みどおりに変異を入れられるようになり、患者サンプルを介さずとも病態を解析できるようになりつつある。腎臓領域においても、遺伝性の糸球体や尿管疾患への応用が理論的に可能である。実際、ポドサイトでの遺伝子欠損や多発性嚢胞腎のモデルなどが報告されている⁶⁾。しかし、現時点では誘導できる腎臓組織が未熟（おそらく受精後 9-10 週くらいのヒト胎児に相当）であり、血流を持たない場合がほとんどであるために、生体の症状を完全に再現することは難しい。より成熟し、血流を伴った組織が誘導できるようになれば、再現できる疾患も飛躍的に増加すると期待される。

Ⅳ. 腎臓を動物体内で作る

動物の体内で腎臓を作ろうとする試みもあり、腎臓を欠損するノックアウトマウスの胚盤胞に、正常なマウス ES 細胞を注入することによって、ES 細胞由来の腎臓を作製したことが報告されている⁷⁾。しかし使用した Sall 1 ノックアウトマウスではネフロン前駆細胞が障害されるため、ネフロン前駆細胞はドナー ES 細胞由来になるものの、尿管芽や血管はホスト由来のままであり、解決策が必要である。最近、山中らはネフロン前駆細胞が枯渇する遺伝子改変マウス胎仔の腎臓を取

り出し、そこに外来性のネフロン前駆細胞を注入することで腎臓の再形成を観察しているが⁸⁾、これにも同様の問題が残る。とはいえ近年、遺伝子工学が進展しノックアウトラットやノックアウトブタが作製できるようになったため、一つの臓器を欠損するブタの胚盤胞や臓器形成領域にヒト iPS 細胞を注入して臓器を作成しようという構想が出現している。実際、脾臓欠損ラットの胚盤胞にマウス ES 細胞を注入することで、ラット体内でマウス由来の脾臓を作成し、それを使って糖尿病モデルのマウスを治療できるという報告がなされている⁹⁾。また脾臓を欠損するブタを作成し、ブタ胚の細胞を使って脾臓を再構築する技術も確立された¹⁰⁾。しかしヒト iPS 細胞をブタ胚盤胞に注入するとヒト・ブタの全身性キメラ生物を作ってしまう可能性があり、倫理的な問題を抱えている。特に中枢神経系や生殖細胞へのヒト細胞の寄与は問題となるだろう。一方で既に米国のグループから、ヒト iPS 細胞をブタ胚盤胞に注入して、寄与率は低いながらもヒト細胞がブタ組織と共存するキメラ動物を作成したとの報告があり¹¹⁾、波紋が広がっている。ブタ胎仔の臓器形成領域への移植であればこういった倫理的問題を回避できるが、移植技術の向上が必須である。

逆に、ブタの臓器をヒトに移植する方向でも研究が進んでいる。CRISPR-Cas 9 法を用いて異種免疫拒絶に関係するブタの主要組織適合遺伝子を複数個欠損させ、ヒトに移植すると、数カ月以上生着したという情報が流れている。ブタの内在性レトロウイルスによる感染の危険性も懸念されていたが、やはり CRISPR-Cas 9 法を用いてこれを除去することに成功したという報告があり¹²⁾、異種移植が現実のものとなり得る可能性が出てきている。以上のように、現状ではそれぞれの方法論に解決すべき課題が残されており、実際の臨床応用に向けてはどの方法が最短かつ安全であるかは見通せない。しかしながら、それぞれの技術的進歩が互いに影響を与えることで腎臓の再生医療研究は日々前進している。

V. おわりに

腎臓細胞の試験管内誘導法にも動物内で腎臓を作る方法にもまだ解決すべき課題が多く残されている。とはいえ、腎臓を作ることは、もはや「夢物語」ではなく、到達可能な「目標」になったと言える。米国ではアメリカ国立衛生研究所(NIH)が先導してRebuilding a kidneyというコンソーシアムが立ち上がっている¹³⁾。腎臓を作ることは確かに困難な課題だが、だからこそ複数の

研究室が連携して達成を前倒ししようとするものである。日本の研究者の一層の奮起を期待したい。

【謝辞】

本稿で紹介した成果に大きく貢献した太口敦博博士を始めとする熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野の新旧メンバーに深く感謝する。

利益相反の開示
該当なし

参考文献

- 1) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, 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
- 2) Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol* 27: 1778-1791, 2016
- 3) Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 33: 1193-1200, 2015
- 4) Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 526:564-568, 2015
- 5) Taguchi A and Nishinakamura R. Higher-order kidney organogenesis from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 21: 730-746, 2017
- 6) Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 6: 8715, 2015
- 7) Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, et al. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 180:2417-2426, 2012
- 8) Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, et al: Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun* 8, 1719, 2017
- 9) Yamaguchi T, Sato H, Kato-Itho M, et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542:191-196, 2017
- 10) Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4557-4562, 2013
- 11) Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 168: 473-486, 2017
- 12) Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 357:1303-1307, 2017
- 13) Oxburgh L, Carroll TJ, Cleaver O, et al. (Re)Building a Kidney. *J Am Soc Nephrol* 28:1370-1378, 2017