

臨床応用に向けた腎臓再生医療の現状

慈恵会医科大学腎臓高血圧内科 松本直人, 横尾 隆

key words

胚盤胞補完法, 胎生臓器ニッチ法, 尿管芽, ネフロン前駆細胞

I. はじめに

本邦における血液透析人口は2018年時点で33万9841人に達しており, 末期腎不全の治療としては欠かせない選択肢となっている。しかしながら, 血液透析は週3回4時間と患者にとっての時間の制約はかなり大きい。一方で腎移植は免疫抑制剤内服の継続は必要であるものの, 時間の制約を受けることなく生活することができる。実際, 腎移植が血液透析よりも生活の質や身体機能の改善に有効であると言われており, また死亡率に関しても改善する¹⁾。

2018年時点で生体腎移植の人数は1865人にとどまっており, 増加の一途をたどっているものの, 現状において急激な増加を望むのは難しい²⁾。

また, 本邦において透析にかかる医療費は, 年間1兆6000億円に上ると推計されており, 総医療費の4%を占める。これらの莫大な負担は医療費における財政上の問題となりうる。

そこで現在不足している腎移植のドナー不足の問題を改善する方法として, 腎再生を行うことでこれらを代替する方法が可能であるかもしれない。

哺乳類のネフロンは, 少なくとも14の異なる細胞から構成されていると言われており, これら

は, 極性を持って立体的に構築される必要がある。濾過機能をもつ糸球体, 再吸収分泌を行う尿細管, またホルモン分泌やミネラルのバランスなど複数の細胞が構成要素として必要である³⁾。このことから, 長い間, 腎臓の再生は困難であると言われてきた。

しかしながら, 発生のメカニズムが徐々に解明され始め, 2014年頃よりヒトiPS細胞から, 腎臓の前駆細胞へ分化誘導することによっていくつかのグループが成功し始めている^{4)–8)}。

腎臓の前駆細胞は大きく3つに分かれており, ネフロン前駆細胞・尿管芽・間質前駆細胞が存在する。そしてこれらが互いに相互作用をきたしながら, 腎発生は進んでいく。

太口・西中村のプロトコールでは, マウスのES細胞から尿管芽とネフロン前駆細胞をそれぞれ誘導し, 胎仔から抽出した腎臓間質前駆細胞と共培養することで, 尿管芽由来の集合管とネフロン前駆細胞由来のネフロンが連続性を持って接続し, 三次元構造の腎臓が試験管内で再生された。一方, ヒトではネフロン前駆細胞に加え新たに尿管芽を誘導したものの, ヒト間質前駆細胞が入手できなかったため, ネフロン構造と集合管までの連続性に関しては確認できていない⁷⁾。最近で

は辻本・長船のグループによって誘導初期に高濃度 CHIR 99021 を使用せずに、Smad 2/3 阻害薬を使用するといった誘導法の変更により、集合管と連続するネフロン構造を構成するヒトネフロン前駆細胞の誘導法の開発がされており⁸⁾、多能性幹細胞を用いた腎臓前駆細胞の進歩は著しい。

しかしながら、これらの多能性幹細胞から腎臓を作成する方法にはいくつかの問題点を抱えている。

腎臓は心拍出量の 20% の血液が流れ込み、それらが糸球体で濾過され、尿細管で濾過されたものの 99% が再吸収を受け、最終的には約 1.5L の尿が産生される。

上記で作成されたオルガノイドでは、多量の血流を確保するための血管系が欠如しており、また最終的に尿が産生された際の排泄経路が欠けている。そのため、十分な尿産生機能を有するネフロンの作成は困難であり、たとえ尿を産生したとしても、排泄経路の欠如により水腎症をきたして廃絶してしまうといった問題点を抱えている。

また、間質前駆細胞に関してはまだ多能性幹細胞からの誘導には成功しておらず、今後の課題となっている。

一方で、種々の細胞の複雑な相互作用を生じながら立体構造を再現するのは困難であるといった考えより、腎再生を行うにあたって全く別のアプローチとして異種の発生のメカニズムを利用し、臓器の再生を試みるアプローチがある。それらのアプローチ方法には胚盤胞補完法や我々の研究している胎生臓器ニッチ法がある。

胚盤胞補完法

胚盤胞補完法とは、遺伝的に臓器が欠損する動物の受精卵（胚盤胞）に正常な多能性幹細胞を注入してキメラ動物を形成することで、欠損していた臓器を注入した多能性幹細胞が補完し、臓器欠損動物の体内に多能性幹細胞由来の臓器を再生させる方法である。

Pdx 1 は膵臓形成に必須の遺伝子であるが、2010 年 Kobayashi らは Pdx 1 ノックアウトマウ

スの作成に成功し、Pdx 1 ノックアウトマウスの胚盤胞にマウス iPS 細胞を移植することで、同種間での膵臓を、また同時に Pdx 1 ノックアウトマウスの胚盤胞にラット iPS 細胞を移植し、異種間となるラット細胞由来の膵臓再生にも成功した⁹⁾。

その後も、胚盤胞補完法を用い 2012 年には腎臓形成に必須の遺伝子である Sall 1 をノックアウトしたマウスの胚盤胞にマウス多能性幹細胞を移植し、同種間でのキメラ腎臓再生を報告した¹⁰⁾。また 2019 年には、Sall 1 ノックアウトラットの胚盤胞にマウス ES 細胞を注入することで異種間での腎再生にも成功した¹¹⁾。

腎再生への応用への次の段階として大型動物における臓器再生が検討されており、2013 年 Matsunari らは膵臓欠損のブタの作成にも成功し、健常ブタの胚細胞を注入することで胚盤胞補完法のモデルが大型動物においても応用可能であることが証明された¹²⁾。

胚盤胞補完法の問題点は、ヒト iPS 細胞を利用して異種間キメラを作成した際に、神経細胞や生殖細胞に寄与する可能性であったが、これに対して近年、内胚葉のみに制限された分化誘導が可能であることを示すデータが報告された¹³⁾。これらは、腎臓は中胚葉由来のため直接利用できるわけではないが今後の応用が期待される。

また、多能性幹細胞は、その表現型によってナイーブ型とプライム型に分類される。そして、ヒト iPS 細胞はプライム型であるが、このプライム型多能性幹細胞はキメラ形成能を持たない。そのため、胚盤胞補完法へのヒトへの直接の応用が難しいとされてきた。

近年は、ヒト多能性幹細胞の時期をステージマッチするためにホスト側への移植時期を遅らせることでキメラを獲得する可能性があるなどの報告や¹⁴⁾、抗アポトーシス因子である BCL 2 を強制発現することで、移植後のヒト iPS 細胞のアポトーシスを予防してキメラ形成を起こし、ヒトーブタ間での血管作成に成功した報告もある¹⁵⁾。

これらの技術の腎臓再生への応用が今後期待される。

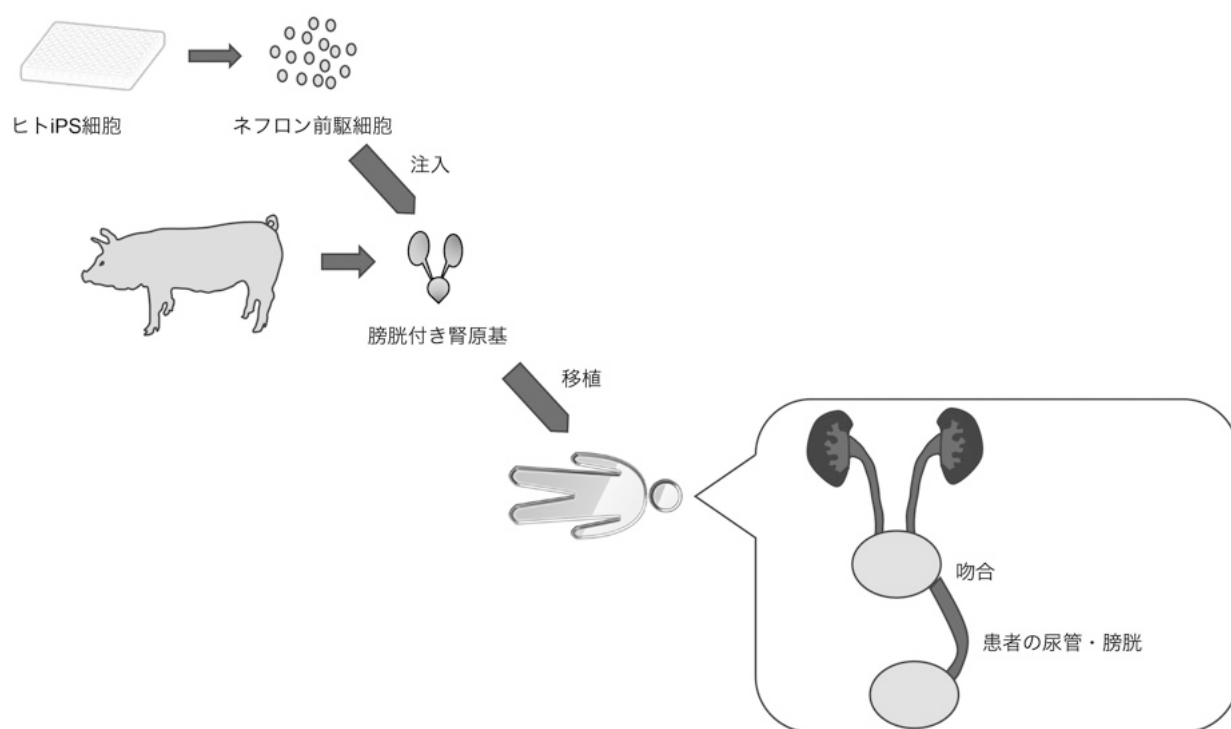


図 我々の目指す腎再生の流れ

Ⅱ. 胎生臓器ニッチ法

我々は、グリア細胞株由来の神経栄養因子を導入したヒト間葉系幹細胞をラット胎児の腎発生部位に注入することで、キメラ腎臓の作製が可能であることを示し、異種の発生メカニズムを利用して、腎臓の発生を行うことに成功した。それらの新生腎臓は尿だけでなくエリスロポエチンの産生も示し、この手法を胎生臓器ニッチ法と命名した^{16) - 17)}。

この手法を応用し、我々は現在ヒトにおける腎再生の臨床応用を目指している。

腎再生を行うにあたって以下の4つのステップを考えている。

- ①ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞へ分化誘導
- ②遺伝子改変ブタ胎仔の膀胱付き腎原基にネフロン前駆細胞を注入
- ③ネフロン前駆細胞を注入した膀胱付き腎原基を患者さんに移植し、臓器初期発生プログラムにて腎臓を作成する

- ④腎原基を移植した患者さんに尿路形成術を行い、機能的腎臓を実現する

①ヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞へ分化誘導

腎不全患者の iPS 細胞からネフロン前駆細胞を誘導することにより免疫抑制剤を減量または使用しなくて済む可能性を考慮し、透析患者由来の iPS 細胞及び健常者から採取した iPS 細胞においていくつかの比較検討を行った。実際に健常者と透析患者の iPS 由来のネフロン前駆細胞マーカーの発現、尿管芽との相互作用に必要であるシグナルの1つである GDNF の発現、血管を引きつける力が同程度で有ることを示し、透析患者の iPS 細胞由来の iPS 細胞がセルソースとして利用できることを示した¹⁸⁾。

②遺伝子改変ブタ胎仔の膀胱付き腎原基へのネフロン前駆細胞の注入

前駆細胞の分化能は特定の系統へと分化能が限定されており、中枢神経系や生殖系に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えた。そこで、我々は

腎臓の前駆細胞を遺伝子改変動物の後腎の腎被膜下に存在する nephrogenic zone に打ち込むことで移植したネフロン前駆細胞をネフロンへと分化させる手法を開発した (Para Nephrogenic zone Direct Approach : PaNDA)¹⁹⁾。

③ネフロン前駆細胞を注入した膀胱付き腎原基の移植し、臓器初期発生プログラムにて腎臓を作成

Six 2 陽性ネフロン前駆細胞にジフテリア毒素受容体 (DTR) を特異的に発現させた Six 2-iDTR トランスジェニックマウスを作製した。そのマウスを用いて、ジフテリア毒素 (DT) を投与することで、既存のネイティブホストマウス NPC を排除し、同時に腎前駆細胞を移植することで前駆細胞が置き換わり、移植細胞由来の新生ネフロンを in vitro で再生する手法を報告した (前駆細胞置換法)。この前駆細胞置換は 1 つの腎発生領域 (Cap mesenchyme) において 100% の置換効率であった¹⁹⁾。その後、移植細胞をマウスからラットに変え、異種のマウス腎臓を足場に免疫抑制条件下の成獣ラット体内で、血管系を発達させたラット腎臓の再生にも成功している²⁰⁾。しかしながら、ヒト細胞は一般的に DTR (ヒトヘパリン結合性上皮細胞増殖因子) を恒常的に発現しているため、ジフテリア毒素を投与するとヒト細胞が死滅してしまう。iDTR システムを直接ヒト細胞に適用することはできないため、Six 2 + NPC を標的とする CreERT 2 システムを用いたほかの消去系の確立に着手している。このシステム

は、タモキシフェンによる自殺システムであり一般的にヒト細胞には影響がないと予想され、これらの自殺システムを搭載した遺伝子改変ブタを現在作成中である。

④腎原基を移植した患者さんに尿路形成術を行い、機能的腎臓を実現する

前述した通り、現状の腎再生における大きな障壁の 1 つとして尿排泄経路の確保ができていないことにある。そこで我々は膀胱付き後腎をある程度発育させてレシピエント動物の尿管を、マイクロサージャリー技術を導入して吻合することで、再生腎臓が産生する尿がクロアカ膀胱を經由して、レシピエント尿管からレシピエント膀胱内に持続的に排泄できることを確認しこれらの手法を SWPU (Stepwise Peristaltic Ureter (SWPU) system) と名付けた²¹⁾。現在ブタとサルを用いた前臨床試験を行っており、ある程度の結果は確認できているが、これはまた別の機会にご報告させていただきたい。

Ⅲ. 終わりに

現在様々なグループが再生腎を臨床に届けるために日々研究を勧めている。生理機能を持った実質臓器としての腎再生を行っていく上では、先に述べた通りまだいくつもの障壁があるが、今後の研究により 1 日でも早く腎臓再生医療が実現し患者さんの所に届くのを期待したい。

参考文献

- 1) Landreneau, Kandace, Kathryn Lee, and Michael D. Quality of life in patients undergoing hemodialysis and renal transplantation-a meta-analytic review. Nephrology nursing journal 37.1 (2010): 37
- 2) 日本移植学会: 臓器移植ファクトブック 2019,2019
- 3) Lee JW, Chou CL, Knepper MA. Deep sequencing in microdissected renal tubules identifies nephron segment-specific transcriptomes. Journal of the American Society of Nephrology. 2015 Nov 1;26(11):2669-77.
- 4) Takasato M. et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. Nat. Cell Biol. 16, 118-126 2014
- 5) Takasato M. et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis.

Nature 526, 564-568 2015.

- 6) Morizane R. et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat. Biotechnol.* 33, 1193-1200 2015.
- 7) Taguchi A. 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
- 8) Tsujimoto H et al. "A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages from Pluripotent Stem Cells." *Cell Reports* 31.1 (2020): 107476.
- 9) 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;142:787-799.
- 10) Usui J. et al. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am. J. Pathol.* 180, 2417-2426 (2012).
- 11) Teppei G et al. Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in *Sall1*-targeted anephric rats *Nat Commun* 10: 1719, 2019
- 12) Matsunari H. et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 4557-4562 (2013)
- 13) Kobayashi T, Kato-Itoh Megumi, Nakauchi H. Targeted organ generation using *Mixl1*-inducible mouse pluripotent stem cells in blastocyst complementation. *Stem Cells Dev* 2015;24:182-189.
- 14) Mascetti et al.: Human-mouse chimerism validates human stem cell pluripotency. *Cell stem cell* 18.1: 67-72. 2016
- 15) Das S et al. :Generation of human endothelium in pig embryos deficient in *ETV2*. *Nature biotechnology* 38.3: 297-302, 2020
- 16) Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, Sakurai K, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, et al.: Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3296-3300, 2005
- 17) Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Kawamura T, et al.: Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol* 17: 1026-1034, 2006
- 18) Tajiri S, Yamanaka S, Fujimoto T, Matsumoto K, Taguchi A, Yokoo T, Nishinakamura R et al.: Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration. *Sci Rep* 8: 14919, 2018
- 19) Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, Matsumoto K, Fukunaga S, Kim BS, et al.: Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun* 8: 1719, 2017
- 20) Fujimoto T, Yamanaka S, Tajiri S, Takamura T, Saito Y, Matsumoto K, et al.: In vivo regeneration of interspecies chimeric kidneys using a nephron progenitor cell replacement system. *Sci Rep* 9: 6965, 2019
- 21) Yokote S, Matsunari H, Iwai S, et al. Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 12980-12985.