

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17296

研究課題名（和文）胎生臓器ニッチ法による腎臓再生に最適なヒトiPS細胞由来ネフロン前駆細胞の探索

研究課題名（英文）Identifying optimal nephron progenitor cells derived from human iPS cells for kidney regeneration using organogenic niche method

研究代表者

田尻 進（TAJIRI, SUSUMU）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50646362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病に対する新規治療法として腎臓再生療法が注目されている。申請者らは、以前に胎生期腎臓に存在するネフロン前駆細胞を薬物によって除去し、外来性ネフロン前駆細胞を移植することで、移植細胞由来のネフロン再生に成功した。その手法を用いた、腎臓再生を行うにあたり、ヒトiPS細胞からネフロン前駆細胞への適切な誘導方法、ネフロン前駆細胞のSorting方法の検証をまずおこなった。その後、ネフロン前駆細胞を除去したマウス胎仔腎組織と、ヒトiPS細胞とのキメラ形成能の評価を行った。この研究により、ヒトiPS由来ネフロン前駆細胞が我々の開発した腎臓再生のセルソースとして適していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病に対する根本的な治療法は現時点では腎臓移植のみである。腎臓移植は、絶対的なドナー不足であり、昨今は異種動物からの腎臓移植なども注目を集めているくらいである。移植するための腎臓を再生することができれば、慢性腎不全治療に対する大きな一歩となる。我々の腎臓再生手法である胎生臓器ニッチ法で、ヒトiPS細胞に由来する腎臓を再生することができれば、臓器不足の問題を解決することができ、加えて従来の腎臓移植よりは免疫抑制剤を減らした腎臓移植ができる可能性がある。ヒトiPS細胞由来のネフロン前駆細胞が胎生臓器ニッチ法の有用なツールであることを示した今回の研究には大きな社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Renal regeneration therapy has attracted attention as a novel treatment for chronic kidney disease. To generate whole functional kidneys, we have employed the ‘organogenic niche method’, which uses heterozygous embryos as an organ factory. In this method, progenitor cells are applied at the area of nephrogenesis, where they differentiate into kidneys by borrowing the developing programs of the growing xeno-embryos. We succeeded in regenerating nephrons from transplanted cells by removing nephron progenitor cells present in the fetal kidney with drugs and transplanting exogenous nephron progenitor cells. To identify whether human ipsc derived nephron progenitor cell are useful for our kidney regeneration method, we performed several experiments and we concluded that human ipsc-derived nephron progenitor cells are useful for our methods.

研究分野：腎臓再生

キーワード：再生医学 腎臓再生 iPS細胞 ネフロン前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の慢性腎臓病(Chronic kidney disease : CKD)の患者数は 1330 万人いると推計されており、成人 8 人のうち 1 人は CKD 患者である。基本的な治療方針は、CKD の進行を抑制し透析導入を回避すること、高率に合併しうる心血管イベントの発症を予防することである。しかし、CKD の進行を抑えることは難しく、透析大国とよばれる我が国では末期腎不全に至り透析療法を必要とする患者数は 30 万人を超えている。唯一の根本的治療になりうる腎臓移植は、ドナーが絶対的に不足しているため、透析患者数を減らす根本的な解決法には現時点ではなりえない。加えて、移植後には生涯にわたる免疫抑制剤の内服が必要となり、健常人と同等の QOL を保つことができるとは言い難い。

そこで、申請者らは、『腎不全患者由来の腎臓を患者自身に提供する』ことで、患者を透析医療から解放放つことを目標としている。透析患者数の減少は、医療費の問題解決にもつながる。患者由来の腎臓なので、免疫抑制剤が不要となり、「QOL の向上」につながる。申請者らはすでに腎臓の前駆細胞であるネフロン前駆細胞を移植することで、移植したネフロン前駆細胞からなるネフロンを有する腎臓の再生に成功している (Yamanaka S, Nat. Commun., 2017)。iPS 細胞は、患者自身から樹立することができる多能性幹細胞であり、iPS 細胞からネフロン前駆細胞を誘導することができる。申請者らは、CKD 患者から樹立した iPS 細胞をネフロン前駆細胞・ネフロンへと分化させ、健常群と比較を行うことで、CKD 患者由来 iPS 細胞が健常群と同等のネフロンの再生能力を持つことを示している (Tajiri S, Sci. Rep., 2018)。つまり、申請者らの再生法に適した CKD 患者 iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞を供給することができれば、CKD 患者幹細胞からの腎臓再生が可能になると考えている。そのためには細かな条件検討が必要になる。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞からネフロン前駆細胞の誘導法はいくつか報告されているが、誘導法ごとでそのネフロン前駆細胞の誘導効率・特性は異なると報告されている (Haojia Wu, Cell Stem Cell, 2018)。申請者らの開発した腎臓再生法のツールに適した iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞を探索するために、下記の 5 つの検証を行うこととした。

- iPS 細胞からネフロン前駆細胞への誘導法の検証
- ネフロン前駆細胞の Sorting 法の検証
- 移植時の細胞調製法・移植法の検証
- 組織に打ち込んだ後の安全性の検証
- 移植後の再生腎臓の評価法の検証

## 3. 研究の方法

iPS 細胞からネフロン前駆細胞への誘導法の検証

iPS 細胞は、腎臓への誘導含め様々な組織への分化誘導が報告されている 201B7 株、申請者らが樹立した健常者あるいは透析患者由来の iPS 細胞株を用いる。ネフロン前駆細胞への誘導は、Taguchi 法 (Taguchi A, Cell Stem Cell, 2014)、Morizane 法 (Nat Biotechnol., 2015)、Takasato 法 (Nature, 2015) の 3 種類の方法を用いる。分化誘導効率は、フローサイトメーターを用いて「ITGA8(integrin subunit alpha 8)陽性かつ PDGFRA(platelet derived growth factor receptor alpha)陰性」のネフロン前駆細胞の陽性率を比較する。

ネフロン前駆細胞の Sorting 法の検証

各誘導法で得られるネフロン前駆細胞の陽性率にはある程度のばらつきがあることが想定される。特に分化誘導効率が低い誘導法を用いた際には、細胞投与前に ITGA8+/PDGFRA- 分画を Sorting する必要がある。セルソーターでは、純度の高いネフロン前駆細胞の Sorting が可能であるが、Sorting 時の細胞へのダメージが大きいことが報告されている。申請者らは抗体つきマグネットを用いた簡便・迅速なネフロン前駆細胞の Sorting 法を開発・報告している (図、Tajiri S, Sci. Rep., 2018)。どちらの手法を用いて Sorting した方が望ましいか検証を行う。

移植時の細胞調製法・移植法の検証

申請者らの腎臓再生法は、外来性のネフロン前駆細胞を動物胎仔腎発生部位に打ち込むことで腎臓の再生を目指している。動物胎仔腎臓はとても小さいので、打ち込む際には、専用に調整したガラス針を用いて、顕微鏡下で腎発生部位に前駆細胞を注入する。移植細胞調整時のストレスによる細胞の粘性や、不十分な細胞分散による細胞塊は、細胞移植を難しくする。そこで、ガラス針を用いたネフロン細胞移植移植に向け、最適な細胞調製法を検証する。

#### 組織に打ち込んだ後の安全性の検証

iPS 細胞は未分化な細胞なので、移植細胞内に iPS 細胞が残存していると、移植した組織内で腫瘍（奇形腫）を生じる可能性がある。申請者らは、iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞を移植するにあたり、Sorting により可能な限りネフロン前駆細胞のみを抽出し、移植する予定である。しかしながら、移植細胞内に iPS 細胞が混入している可能性もあり、この移植細胞の安全性を検証する必要がある。そこで、移植時の細胞を免疫不全マウス皮下へ投与し、奇形腫形成能を評価することで安全性の検証を行う。

#### 移植後の再生腎臓の評価法の検証

ヒトの細胞の核に特異的に染まる抗体を用いることで、ヒト細胞と、もとより存在するマウスの細胞を区別することができる。打ち込んだヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞が、動物胎仔腎臓内で分化できるか、ネフロン特異的に染まる抗体を使用し評価を行う。

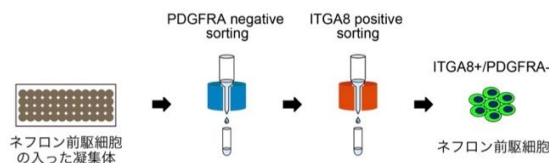
### 4. 研究成果

#### iPS 細胞からネフロン前駆細胞への誘導法の検証

iPSC 細胞からネフロン前駆細胞への誘導法として、Taguchi ら、Morizane ら、Takasato らが用いた方法を検証した。このうち、申請者らの研究室において、効率よく NPCs への分化誘導可能であった Taguchi, Morizane らの方法に絞って検証を行った。Morizane らの方法の方がより効率よく分化誘導することが可能であり、加えて Taguchi らの方法が Sphere をつくる三次元培養なのに対し、Morizane らの方法は平面培養で誘導可能な二次元培養法のため培養操作が容易であり、誘導後の細胞懸濁などの細胞調製も簡単であった。しかしながら、実際にネフロン前駆細胞除去後のマウス後腎に移植してみると、Taguchi らの方法で誘導したネフロン前駆細胞はわずかながらそこに定着するものの、Morizane らの方法で誘導したネフロン前駆細胞は定着することができず、Taguchi らの分化誘導法を用いて検証することとした。ネフロン前駆細胞マーカーである ITGA8 陽性かつ PDGFRA 陰性細胞の陽性率は約 40% 程度であった。Morizane らは iPS 細胞からネフロン前駆細胞への分化誘導過程において Noggin を加えることで誘導効率を高めていたため、Taguchi らの分化誘導法に Noggin を加えることで誘導効率が高くなるか検証を行ったが、Noggin あり群、無群において誘導効率に差は認めなかった。以上のことから、iPS 細胞からネフロン前駆細胞への誘導は Taguchi らが報告した方法を用いて行うこととした。

#### ネフロン前駆細胞の Sorting 法の検証

各誘導法で得られるネフロン前駆細胞の陽性率にはある程度のばらつきがあることが想定される。特に分化誘導効率が低い誘導法を用いた際には、細胞投与前に ITGA8+/PDGFRA- 分画を Sorting する必要がある。申請者らは 2018 年に磁石つき抗体を目的細胞に付着させることにより、磁石を用いた簡便な Sorting 法を試み、短時間で効率よく NPCs である ITGA8 陽性かつ PDGFRA 陰性細胞を純化することに成功した (Tajiri S, Sci. Rep., 2018)。この方法により 90%程度まで目的細胞を純化することができ、純化したネフロン前駆細胞をマウス胎仔脊髄と共培養することで、ネフロンへと分化させることに成功した。このことは Sorting の際に使用した抗体つき磁石が分化誘導能に大きな影響を与えないことを示すものである。

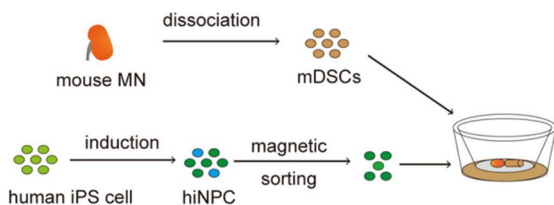


【図】 マグネットを用いたネフロン前駆細胞のSorting

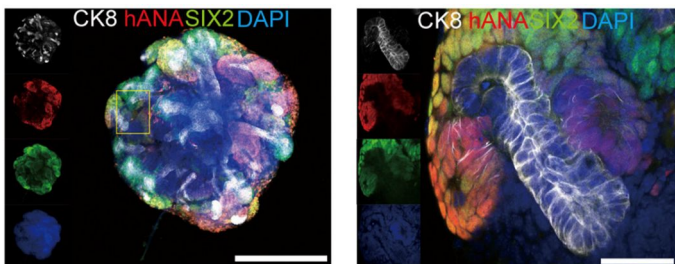
#### 移植時の細胞調製法・移植法の検証

移植の際、細胞をガラス管につめて、胎仔後腎へ移植することが必要になる。しかしながら、移植は手技的に難易度がたかく、マウス胎仔後腎の個数も限られているので、ヒト iPS 由来ネフロン前駆細胞とマウスの後腎に含まれる細胞が後腎内で相互に影響し合い、ヒトとマウスの細胞からなるキメラ腎臓が再生できるのか検証するには、不向きである。そこで申請者は、*in vitro* で簡便に検証できる実験系の立ち上げをおこなった。具体的には、マウス後腎をバラバラにし、そこにヒト iPSC 由来ネフロン前駆細胞を混ぜ、遠心し、凝集させることでより簡便に、より必要細胞数が少なく、キメラ腎臓をつくることができないか、検証する方法である。

京都大学より提供いただいたユビキタスに GFP を発現するヒト iPS 細胞 (Methods 101, 43-55, doi:10.1016/j.ymeth.2015.12.012 (2016)) からネフロン前駆細胞を誘導し、そこにマウス後腎をバラバラにした細胞を混ぜ合わせ、凝集させ、効率よくキメラ腎臓を作成する条件の検討を行った。さらに作成したキメラ腎臓を免疫不全マウスへ移植することで、免疫不全マウスの血管がキメラ腎臓へ入り込むことも確認した (Biochemical and Biophysical Research Communications



<マウスとヒトのキメラ腎臓>



(Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 662, 25 June 2023, Pages 18-25 より)

組織に打ち込んだ後の安全性の検証

iPS 細胞から目的細胞へ誘導を行い、それを移植すると、残存した iPS 細胞由来の腫瘍 (テラトーマ) が生じることがある。これは将来的な臨床応用を目指す上で大きな問題となる。申請者らが使用した抗体つき磁石により純化したネフロン前駆細胞の安全性を検証するために、免疫不全マウスの皮下へ移植を行い、テラトーマが形成されるかどうか検証をおこなった。その結果、テラトーマは形成されなかった。これは、抗体つき磁石によって純化したネフロン前駆細胞の安全性を示すものである。

移植後の再生腎臓の評価法の検証

今後は動物胎仔腎に実際に打ち込み、キメラ腎を作成することを目標としている。ヒト細胞とホストの細胞をみわける手段として、二つの方法を検討している。一つ目は、前述した GFP を導入した iPS 細胞由来の細胞を用いることである。これを用いることで、蛍光顕微鏡下での移植が容易になる。解析の際は、GFP に対する抗体を用いることで、移植細胞とホストの細胞を区別することができる。二つ目は、組織解析の際に、ヒト抗核抗体に特異的に反応する抗体を用いることである。この手法は移植手技の際にはあまり有用でないが、その後の組織解析のとき、染色が容易であり、ヒトとホスト由来の細胞を容易に区別することができる。これらの手法を用いて、ひきつづき、in vivo でのキメラ腎臓の解析をすすめていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Naoto, Yamanaka Shuichiro, Morimoto Keita, Matsui Kenji, Nishimura Sandy, Kinoshita Yoshitaka, Inage Yuka, Fujimori Koki, Kuroda Takao, Saito Yatsumu, Takamura Tsuyoshi, Fujimoto Toshinari, Tajiri Susumu, Matsumoto Kei, Inoue Makoto, Kobayashi Eiji, Yokoo Takashi	4. 巻 662
2. 論文標題 Evaluation of the ability of human induced nephron progenitor cells to form chimeric renal organoids using mouse embryonic renal progenitor cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 18~25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.04.052	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------