

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H03175

研究課題名(和文)胎生臓器ニッチ法を用いた自己腎臓前駆細胞由来腎臓再生法の開発

研究課題名(英文)Renal regeneration derived from autologous renal progenitor cells using organogenic niche method

研究代表者

横尾 隆 (Yokoo, Takashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70301538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は発生段階にある子宮内胎児の臓器発生部位(胎生臓器ニッチ)に発生時期に合わせて臓器前駆細胞を注入し、臓器初期発生のプログラムを遂行させることにより各臓器系譜に分化誘導を行う方法(「胎生臓器ニッチ法」)を開発した。この方法は透析患者由来iPS細胞に由来するネフロン前駆細胞にも対応できることが確認された。またマーモセットを用いて再生腎臓の大型化を行ったが、新世界猿は旧来の免疫抑制剤の増量でした異種抗原制御ができないため、旧世界ザルでの検証実験が必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓再生治療の臨床応用が実現すれば、34万人を超える多くの患者が人工透析から開放されることで、社会全体の健康度や活力の向上に繋がるばかりか、人工透析医療に伴う1.4兆円を超える社会経済の負担が大きく軽減されることになる。同時に、移植医療が直面していた拒絶反応やドナー不足という大きな壁を乗り越えることが可能となる。この成功を魁として、ヒト臨床において肝、膵臓など他臓器に応用が可能であり、その医療貢献度、経済効果は計り知れない。本研究はその壮大な研究の成就における再生腎臓の大型化を担うもので、この結果もたらされた知見によりさらに大きく研究が展開する。

研究成果の概要(英文)：We are injecting organ progenitor cells into the organogenic niche of the stage-matched developing embryo and inducing differentiation into each organ lineage by executing the program of early organ development. It was confirmed that this method can also be applied to nephron progenitor cells derived from iPS cells of dialysis patient. In addition, we used a marmoset to enlarge the regenerated kidney. However, it was found that New World monkeys cannot control xeno- antigens by increasing the amount of conventional immunosuppressive agents, so it is necessary to carry out verification experiments by using Old World monkeys.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎臓再生 透析医療 iPS細胞 マーモセット

1. 研究開始当初の背景

年間1万人以上の増加を続ける透析患者は、長期透析に対する著しいQOL制限のみでなく、1.4兆円を超える透析医療費や、透析患者高齢化にともなう介護福祉の負担増など大きな社会問題を招来している。しかし腎機能を回復させる画期的かつ根本的な治療法はいまだ存在しない。こちゃんれまでの再生医療研究は、ES細胞やiPS細胞の樹立法の改良や単純組織再生が行なわれているが、実際の臨床の現場で求められる臓器不全に対応する“臓器”再生医療対応できていない。臓器再生は古くは蛙卵の天蓋部から前腎への分化誘導の成功があるが、哺乳類での機能腎臓のin vitro分化誘導の成功の報告はこれまでにない。現在の腎臓再生の取り組みとしては、1) 脱細胞化成体臓器の足場の利用 (Nat Med 2013)、2) 3Dプリンターを用いた3次元臓器構築、3) 胚盤胞補間法の利用 (Am J Pathol 2012)、4) 自己組織化技術を用いたiPS細胞からのin vitro臓器再生 (Cell Stem Cell 2013; Nature 2015)、5) organ budを用いた機能臓器再生 (Cell Stem Cell 2015)などが主に行われてきた。しかしいずれの手法も臨床応用にはまだかなりのハードルが残されており、大型動物で十分な尿毒素の排泄を確認している手法は我々の開発してきた「胎生臓器ニッチ法」のみである。

「胎生臓器ニッチ法」とは、発生段階にある子宮内胎児の臓器発生部位(胎生臓器ニッチ)に発生時期に合わせて臓器前駆細胞を注入し、臓器初期発生のプログラムを遂行させることにより各臓器系譜に分化誘導を行う方法である。一度各臓器系譜に分化が始まった前駆細胞由来組織はレシピエントに移植することにより自己組織化能により発生を継続し成熟した臓器まで分化することが可能となる。我々はこの独自の方法を用いて、まずラット胎仔を用いてヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)から尿生成能を獲得した再生腎臓の樹立に成功した(PNAS2005, JASN2006; 下図左)。この再生腎臓はエリスロポエチンやレニン産生能も確認している(Transplantation 2008, J Nephrol 2012)。

本成功をうけて次に大型動物を用いて検証を進め、まず腎不全が死因の30%を超えるペットネコを用いて尿の流出とエリスロポエチン産生を確認した (Stem Cells 2013, PlosOne 2015)。さらにはクローンブタ胎仔の後腎組織の自家移植により約30g(ヒトの腎臓の1/5の重量)まで成熟できることを証明した。さらには再生腎臓が産生する尿を効率良く体外に排泄するシステム(SWPU)の構築に成功し、成体腎臓の約3分の1の腎機能を長期にわたり獲得できることを報告していた(PNAS 2015)。

2. 研究の目的

我々の開発した胎生臓器ニッチ法は、三次元臓器作成による尿性性能を獲得した腎臓再生の可能性を持ち、さらにヒト臨床応用に近づけるために以下の命題に取り組んだ。

(1) 透析患者由来iPS細胞を用いた腎臓再生はできるのか？

胎生臓器ニッチ法の利点の一つは自己細胞から樹立した再生腎臓により腎機能の改善をもたらせることである。このために自己iPS細胞を用いることを想定していたが、透析患者の体細胞は長期間にわたり尿毒症環境下に晒されているため、細胞の腎臓再生能が劣化している可能性がある。したがって臨床応用に向けて患者由来iPS細胞が使用できるか確認する必要がある。特に透析患者から樹立した線維芽細胞などは分裂能や増殖能が低下していることが報告されている。我々も透析患者から樹立した間葉系幹細胞を用いてネフロンへの分化能を比較したところ、透析患者由来間葉系幹細胞は健常者と比較してPCAFの発現が抑制されており、血管を引き込む能力が劣っていることが判明した (Yamanaka S, et al. PLoS One 9(7):e102311, 2014)。そこで、透析患者の体細胞由来iPS細胞が腎臓再生に使えるか確認することを目的とする。

(2) 霊長類を用いて安全性、有効性の検証実験が行えるか？

これまでブタを用いた同種移植実験において、大型化再生腎臓の樹立の可能性が示されたが、ヒト臨床応用に向けて、ヒトを模倣したレシピエントを用いた安全性、有効性が示せるか検証することを目的とする。この目的にはヒトと同じ霊長類が最もふさわしいと考え、コモンマーモセットを導入した。マーモセットは他の霊長類と比較して、小型なため大規模な施設導入が必要ないことや、すでに実験動物としてその飼育方法、麻酔や回復手術、術後のリハビリの方法などが確立されており、それらの情報をもとにブタ後腎をスカフォールドとして免疫抑制下に異種移植し尿の流出を確認する実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 透析患者と健常者由来 iPS 細胞の腎臓再生能の比較実験

4 年以上透析歴のある患者 3 名および年齢を合わせた腎機能正常者 3 名から Episomal plasmid または Sendai virus を用いて iPS 細胞を樹立する。形態、染色体検査、幹細胞マーカーの発現の確認 (RT-PCR および免疫染色)、3 胚葉への分化能をそれぞれ比較し、iPS 細胞の段階での差異があるか確認する。これまで確立したネフロン前駆細胞分化誘導法を用いて両者を分化させ、分化効率 (ITGA8⁺/PDGFRA⁺ 分画の比率) の比較、ネフロン前駆細胞マーカー (WT-1, PAX2, GDNF, SIX2) の発現の比較を行う。さらに、マウス脊髄との共培養によりネフロンまで分化させ形態観察、糸球体、近位尿管、遠位尿管のマーカー (NPHS1, NPHS2, VEGF, LRP2, SCL12A1, PKD1, PKD2) の発現量を比較する。さらに両者のネフロン前駆細胞を免疫不全マウスの腎臓皮膜下に移植し血管誘導能の比較を、形態および CD31/Nephrin 比で比較する。

(2) マーモセットを用いた異種移植実験

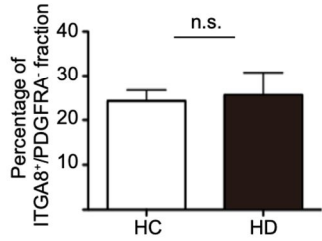
上記で樹立したヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞をブタ後腎スカフォールドに注入後、マーモセットの大網および傍大動脈後腹膜に移植する。マーモセットは新世界ザルであるので、ヒトで用いる抗体医薬は効果がないため、従来のメチルプレドニゾロン、タクロリムス、MMF の 3 剤の量を調整させることにより異種免疫制御を行う。移植 4 週間後尿排泄腔に尿の貯留が確認できれば、我々が開発した SWPU 法を用いて自己尿管と尿排泄腔を接続し尿の流出を確認する。

4. 研究成果

(1) 本学倫理委員会承認の上、透析患者 (原疾患は糖尿病性腎症、慢性腎炎、急速進行性糸球体腎炎) 3 名 (それぞれ透析期間 46 週間、57 週間、85 週間) の血液から単核球を分離し iPS 細胞を樹立した。同時に腎機能正常の健常コントロールより iPS 細胞を樹立した。それぞれ形態上の差異はなく、また karyotype に異常なく、RT-PCR および免疫染色による幹細胞マーカーの発現パターンは相同であった。また doubling time に有意差は認めなかった。それぞれの iPS 細胞を免疫不全マウスへ移植したところテラトーマ形成し、内胚葉、外胚葉、中胚葉全てに分化していることが確認された。以上より、検討した限りでは透析患者由来 iPS 細胞は健常コントロールと差異が認められなかった。

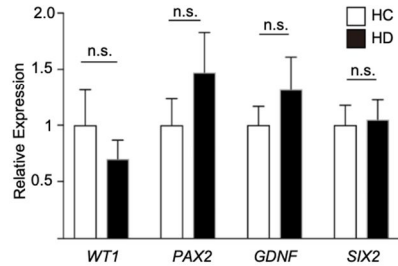
そこで、これら iPS 細胞からネフロン前駆細胞への分化能を比較した。ネフロン前駆細胞への分化誘導効率を ITGA8 陽性細胞かつ PDGFRA 陰性細胞陽性率で検討したところ、透析患者 iPS 細胞と健常 iPS 細胞では有意さがなかったことが確認された (図 1 左)。分化後の細胞のネフロン前駆細胞マーカー (WT1, PAX2, GDNF, SIX2) を比較しても有意差は認めなかった (図 1 右)。

透析患者由来iPSCは健常者群と同等の効率でネフロン前駆細胞へ分化可能



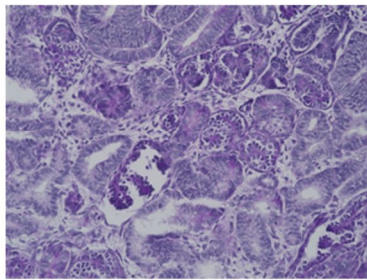
分化開始14日目のITGA8陽性かつPDGFRA陰性細胞陽性率

透析患者iPSC由来ネフロン前駆細胞は健常者群と同レベルのネフロン前駆細胞マーカーを発現



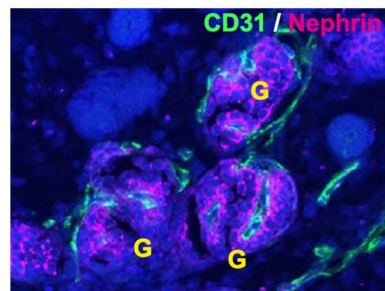
続いてこれらのiPS細胞をマウス脊髄の共培養によりネフロンまで分化誘導を行った。透析患者由来iPS細胞もネフロンへ分化し、形態上は健常者由来と区別ができなかった。また糸球体、近位尿細管、遠位尿細管マーカーの発現を比較したところ全てにおいて両群で有意差を認めなかった(図2左)。そこで、それぞれのネフロン前駆細胞を免疫不全マウスの腎臓皮膜下に移植し血管誘導能を比較した。その結果形態上も両群で差異を認めず、CD31/Nephrin比で誘導血管を半定量したしてもやはり有意さがなかった(図2右)。

透析患者iPSC由来ネフロン前駆細胞は健常者群と同程度に成熟したネフロンへ分化可能

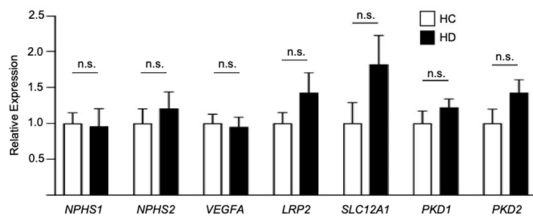


慢性腎炎由来の腎不全患者iPSC由来ネフロン

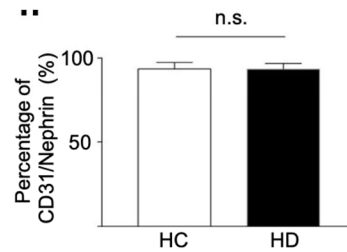
透析患者iPSC由来糸球体は生体内で健常者と同程度の血管誘導能を持つ



免疫不全マウス腎臓被膜下に移植



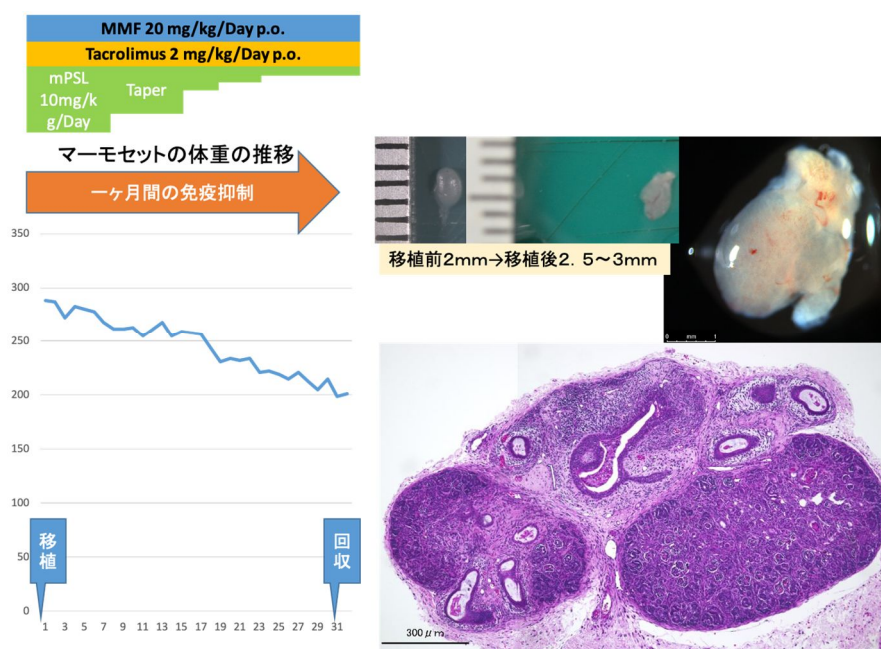
糸球体、近位、遠位尿細管マーカーの発現に有意差なし



両群ともにネフリン陽性糸球体のほぼ100%に血管が侵入していた

以上より、透析患者の体細胞は primary culture では劣化が認められるものの、iPS 細胞に誘導することで劣化がキャンセルされ、そこから樹立された前駆細胞は健常者と遜色ない程度の再生能を維持していることが確認された。

(2) マーモセット 実験開始にあたり、慈恵医大動物実験施設にマーモセット 飼育室とその全室、手術室およびリカバリー室の整備を行った。全身麻酔を行い挿管の上、人工呼吸器管理とし、血圧、脈拍や SatO₂、心電図のモニタリングしながら安定して開腹手術を行えるように環境整備を行った。マーモセット は非常に神経質でありストレスがかかるとすぐに食思不振や下痢症状が強まるが、プレイルームや好物の捕食などを適宜取り入れ安定飼育もできるようになった上で実験を開始した。マーモセットは新世界ザルであり霊長類であるものの人とは系統樹が離れているため、ヒトの同種移植で用いられるリツキシマブなどの抗体医薬は無効である。したがってこれまでの実験異種移植での報告が多い従来のメチルプレドニゾン、タクロリムス、MMF の組み合わせのみとし、その量の調節にて異種免疫制御を図った。当初、後腎は抗原性が低く移植時の拒絶反応が低く抑えられることが知られているため、E28 ブタ胎仔から単離した後腎組織を移植し少量の免疫抑制剤で維持したが、拒絶反応が強烈に認められ徐々に増量を余儀なくされた。結局、メチルプレドニゾン 10mg/kg/day から開始して漸減、タクロリムス内服 2mg/kg/day、MMF 内服 20mg/kg/day で拒絶反応を回避することができることが判明した。しかしこの量ではマーモセットは食事摂取不良、下痢の持続が生じてしまい移植時 300 グラム程度であった体重が、4 週間には安落殺の考慮を必要とする 200 グラムまで低下してしまった(図 3 左)。全身の栄養不良が著しく、結局拒絶が抑えられた移植片であるが尿生成するまで発育することができないことが判明した(図 3 右)。



このため、残念ながら胎生臓器ニッチ法の安全性、有効性の確認の目的でマーモセットをヒトの模擬患者として用いることはできないことが判明した。したがってヒトに用いる抗体医薬などの使用できる免疫抑制手段の種類が豊富な旧世界ザルを用いて検証を進めることとしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tajiri Susumu, Yamanaka Shuichiro, Fujimoto Toshinari, Matsumoto Kei, Taguchi Atsuhiko, Nishinakamura Ryuichi, Okano Hiroataka James, Yokoo Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14919-14919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-33256-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga S, Yamanaka S, Fujimoto T, Tajiri S, Uchiyama T, Matsumoto K, Ito T, Tanabe K, Yokoo T	4. 巻 496
2. 論文標題 Optimal route of diphtheria toxin administration to eliminate native nephron progenitor cells in vivo for kidney regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1176-1182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.01.166	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Fujimoto T, Yamanaka S, Tajiri S, Takamura T, Saito Y, Matsumoto K, Takase K, Fukunaga S, Okano HJ, Yokoo T	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo regeneration of interspecies chimeric kidneys using a nephron progenitor cell replacement system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6965-6965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43482-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takashi Yokoo
2. 発表標題 Kidney Regeneration
3. 学会等名 16th Asia Pacific congress of Nephrology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yokoo T
2. 発表標題 Transplanted Embryonic Kidneys as a Tool to Understand Renal Organogenesis.
3. 学会等名 American Society of Nephrology(ASN) Kidney Week 2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takashi Yokoo
2. 発表標題 Generation of the human kidney in animal hosts
3. 学会等名 IXA 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科 http://www.jikei-kidneyht.jp/</p>
--

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
研究分担者	村山 嘉延 (Murayama Yoshinobu) (80339267)	日本大学・工学部・准教授 (32665)	