

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09630

研究課題名（和文）臓器ニッチを用いたヒトiPS細胞から腎への分化誘導法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to induce differentiation from human iPS cells to the kidney using organ niches

研究代表者

松本 啓 (Matsumoto, Kei)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30439799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：腎臓再生療法を実現するために我々は胎生臓器ニッチ法（異種胎仔の腎発生部位に幹細胞・腎前駆細胞を注入することで動物の分化シグナルを入れ腎へと分化誘導させる方法）を用いているが、今回新たな遺伝子改変動物（Six2発現腎前駆細胞を薬剤投与により特異的に除去するSix2-iDTRマウス）を開発し、腎前駆細胞を特異的に除去し、外部細胞由来の糸球体を作成することに成功した。これはマウスとラットの異種間においても再現可能であった。このマウスを活用してvivo環境において胎仔の腎を単離することなく、母体内の胎仔腎へアプローチするExoUtero注入法を用いて母体内での糸球体発生にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末期腎不全患者における腎代替療法には血液透析、腹膜透析、腎移植があるが、昨今の医療経済の逼迫状況や患者QOLのさらなる改善を考えると、新たな治療法の実現が急務であり、第4の治療法として腎再生医療が期待されている。

本研究は腎臓再生医療を目指す上で重要となる基盤技術の確立として、ヒトiPS細胞から分化誘導した腎前駆細胞を移植する臓器ニッチの改善を目指して小動物における研究を行い、一定の良好な結果を得られた。

将来のヒト臨床応用を目指した大型化、さらなる効率化を目指して行く必要がある。

研究成果の概要（英文）：In order to realize kidney regeneration therapy, we have used the fetal organ niche method, in which stem cells and renal progenitor cells are injected into a heterologous fetus' renal development site to induce the differentiation to the kidney. This was reproducible between mouse and rat heterozygotes. We utilized these mice to successfully develop maternal glomeruli in the kidney using the Exo Utero injection approach to the maternal fetal kidney in vivo environment.

研究分野：腎臓再生医療

キーワード：腎臓再生医療 幹細胞 臓器ニッチ法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、深刻な臓器不足に陥っている腎臓移植医療に対する打開策として、無限の臓器供給源としての異種腎移植が注目されている。動物実験においては後腎（こうじん：発達過程の幼若腎）移植を行う事により、レシピエントの腎機能や生命予後を改善させるという報告も散見される。我々は過去に動物実験において後腎を成獣ホスト大網部に移植し発生させた新規発生腎がホストの状態に応じてレニン及びエリスロポエチン(EPO)の調節能を持つ事を報告した。また自殺誘導遺伝子を全身に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、その後腎を移植するモデルにおいて、後腎の発達過程で自殺誘導をかける事により移植を受けたレシピエント動物の種由来の EPO を発現する EPO 産生組織の開発に成功し報告した。しかし、この EPO 産生組織の長期機能維持は難しく、数週間で組織が廃絶してしまうため、今後さらなる改良が必要と考えられた。発達組織には糸球体が含まれるために尿を産生するが、尿細管やその先の尿路排泄系の発生が不十分である。そこで後腎を含む膀胱つき総排泄腔(クロアカ)を移植し、発達継続したクロアカ由来の膀胱にホスト動物の尿管を吻合する事によって、この尿のう胞や水腎症の問題を解決出来る事をブタモデルも含めて証明した。次なるステップとしてヒト iPS 細胞 (hiPSCs) やヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) から尿を産生する腎組織や EPO 産生組織を誘導することを目的に基盤技術の確立としてマウス・ラットなど小動物モデルを用いて検討する事とした。

2. 研究の目的

本申請研究ではマウスモデルにおいて単離した外来性の腎前期細胞またはヒト iPS 細胞から誘導した腎前駆細胞を用いて、尿を産生する腎組織や EPO 産生組織を発生させる事を目的とした。その中で特にネフロン前駆細胞を外來細胞由来に置換する事に重点をおいた。

3. 研究の方法

(1) 今回、新しい Tg マウスを用いた。腎の発達過程において後腎間葉でネフロンに分化する Six2 陽性細胞をジフテリアトキシン (DT) 投与によって特異的に除去をすることが可能となる Six2-iDTR マウスを適宜交配して用いた。細胞ソースとしてマウス胎仔腎由来の腎前駆細胞を準備し Six2-iDTR マウスの後腎に実体顕微鏡下でマイクロインジェクションを行い、その後腎を別の成獣レシピエントマウスに移植する事で発達継続させ DT を連日投与した。分化発達過程でレシピエントのネフロン部分が除去され、外部から注入した腎前駆細胞に置き換わること、またそれがマウス・ラットの異種間にも成り立つこと免疫抑制ラットを用いて検討した。

(2) 後腎組織の損傷を最小限にとどめ、効率的に発達継続させ、Six2-iDTR マウスのシステムが作動する至適条件に関して検討した。特に幼若な後腎は単離が難しく、その後の *in vitro* における器官培養での発達継続を考慮した場合の解決策として ExoUtero 注入法を検討した。具体的には妊娠 Six2-iDTR マウスに全身麻酔を施し、子宮を体外へ表出し、母体内へ戻す事によって母体の中で発達継続させた。投与経路は腹腔内投与、羊膜内投与を行った。

(3) 次に ExoUtero 法により体外から腎前駆細胞注入を行い、子宮体内における外来性腎前駆細胞が定着するかを検討した。腎前駆細胞を移植注入した胎仔を術後 6 日間発育させた。また Tg マウス胚に腎前駆細胞を移植した。すべての例で移植細胞の増殖と分化を測定した。

(4) 腎間質前駆細胞 (stromal progenitor cells : SPC) のメサンギウム細胞と腎間質系細胞への分化を検証した。SPC を含む RPC を野生型の胎仔マウスの腎形成帯に単に移植するだけでは、SPC の分化には不十分であるため、SPC の純度を高めるために、幼若な間質細胞の細胞表面マーカーである血小板由来成長因子受容体アルファ (platelet-derived growth factor receptor alpha : PDGFRa) をターゲットにして RPC をソーティングし、PDGFRa 陽性細胞を移植して検討した。

(5) 将来のヒト臨床応用を目指して、異種移植のさらなる検討のために、ブタクロアカをコモン・マーモセットへ移植するモデルを確立し、免疫抑制療法の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 異種間での腎前駆細胞の入れ替えの検討：既存の宿主ネフロン前駆細胞 (nephron progenitor cells : NPC) を除去することにより、培養ディッシュ上でドナーマウスまたはラットの NPC から新しいネフロンへ 100% 置換できることが可能であることを証明した。次に NPC 置換による異種間のネフロンの *in vivo* 再生の可能性を検討した。ラット腎前駆細胞と DT を含む NPC を Six2-iDTR マウス E13.5 の後腎皮膜下に注入し、免疫抑制剤を投与したレシピエントラットに移植した。その結果、ラット/マウスのキメラ腎の再生に成功した。新生糸球体とレシピエント血管との機能的な関連性と新生糸球体の濾過機能を組織学的に明らかにした。

(2) Six2-iDTR モデルへの投与経路の検討：Tg マウス胎児を用いて 2 種類の DT 投与経路 (腹腔内投与と羊膜内投与) を評価した。胎児は E18.5 で帝王切開により分娩し、胎仔マウスの腎臓で RNA 発現を評価した。さらに、DT 用量 (25、5、0.5、0.05ng/胎児体) の影響を調べた。DT の羊膜内注射により、腎臓の容積の減少、糸球体の喪失、および分化マーカーの発現の低下が認められた。腹腔内投与では、NPC の除去に十分な効果が得られず、羊膜内注射が DT の最適投与経路であることが確認された。

(3) ExoUtero 法による細胞注入の検討：母体内での不透明な子宮筋層を切開することにより、子宮体内であっても E13~14 日齢の胎仔の後腹腔に腎前駆細胞を移植することが可能であった。移植細胞由来の糸球体が作られ、ろ過機能を有し、胎仔の成長や生存に影響を与えなかった。腎領域に移植された細胞はドナーとレシピエントのキメラ腎前駆細胞となった。TG 動物に移植された腎前駆細胞は、レシピエントの尿管芽に接続する新しいネフロンの形成を誘導した。

(4) 腎間質系再生の検討：幼若な間質細胞の細胞表面マーカーである PDGFRa をターゲットにして RPC をソーティングして移植した。間質性線維芽細胞、血管周皮細胞、傍糸球体細胞など、多数のメサンギウム細胞や他の腎間質系細胞の再生に成功した。このように外因性 SPC から間質細胞を再生する方法を用いることにより、腎臓再生医療や腎臓発生学など、今後さまざまな分野に貢献し、疾患モデルの作成にも寄与するかもしれない。

(5) 免疫抑制下のコモン・マーモセットへブタクロアカ移植を行ったところ、methylprednisolone と tacrolimus、Mycophenolate mofetil の 3 剤併用で 3~4 週間の生着が可能であったが、今後さらなる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5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 1 - 12
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 Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, Matsumoto K, Fukunaga S, Kim BS, Okano HJ, Yokoo T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1719-1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01922-5	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 該当する
1. 著者名 Fukunaga Shohei, Yamanaka Shuichiro, Fujimoto Toshinari, Tajiri Susumu, Uchiyama Taketo, Matsumoto Kei, Ito Takafumi, Tanabe Kazuaki, Yokoo Takashi	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 Biochemical and Biophysical Research Communications	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Yatsumu, Yamanaka Shuichiro, Fujimoto Toshinari, Tajiri Susumu, Matsumoto Naoto, Takamura Tsuyoshi, Matsumoto Kei, Yokoo Takashi	4. 巻 520
2. 論文標題 Mesangial cell regeneration from exogenous stromal progenitor by utilizing embryonic kidney	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 627 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.080	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 Yamanaka Shuichiro, Saito Yatsumu, Fujimoto Toshinari, Takamura Tsuyoshi, Tajiri Susumu, Matsumoto Kei, Yokoo Takashi	4. 巻 30
2. 論文標題 Kidney Regeneration in Later-Stage Mouse Embryos via Transplanted Renal Progenitor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2293 ~ 2305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1681/ASN.2019020148	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 Fujimoto Toshinari, Yamanaka Shuichiro, Tajiri Susumu, Takamura Tsuyoshi, Saito Yatsumu, Matsumoto Kei, Takase Kentaro, Fukunaga Shohei, Okano Hiroataka James, Yokoo Takashi	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 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 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13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 松本啓, 若井聡美, 松成ひとみ, 藤本俊成, 斎藤弥積, 高村毅, 高瀬健太郎, 田尻進, 山中修一郎, 横手伸也, 福井亮, 小林英司, 長嶋比呂志, 横尾隆
2. 発表標題 腎臓再生医療へ向けてのコモン・マーモセットを用いた in vivo ブタ腎発生の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Fukunaga, Shuichiro Yamanaka, Toshinari Fujimoto, Susumu Tajiri, Taketo Uchiyama, Kei Matsumoto, Takafumi Ito, Kazuaki Tanabe, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Optimal route of diphtheria toxin administration to eliminate native nephron progenitor cells in vivo for kidney regeneration
3. 学会等名 55回欧州腎臓学会議・欧州透析移植学会議 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuichiro Yamanaka , Yatsumu Saitou, Toshinari Fujimoto , Susumu Tajiri, Tsuyoshi Takamura, Kei Matsumoto, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Exo utero method to regenerate nephrons from nephron progenitor cells in the living fetus
3. 学会等名 アメリカ腎臓学会 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本俊成、山中修一郎、田尻進、松本啓、福永昇平、横尾隆
2. 発表標題 マウス腎発生ニッチを用いたラットネフロンの再生 : in vivoでの異種間ネフロン再生の検討
3. 学会等名 第20回 日本異種移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本俊成、山中修一郎、田尻進、松本啓、福永昇平、岡野ジェイムス洋尚、横尾隆
2. 発表標題 マウス後腎内でのラットネフロンの再生 : in vivoでの異種間ネフロン再生の検討
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuichiro Yamanaka, Kei Matsumoto, Susumu Tajiri, Toshinari Fujimoto, Shohei Fukunaga, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Generation of interspecies chimeric nephrons from nephron progenitor cells by conditional elimination and replacement
3. 学会等名 American society of Nephrology KIDNEYWEEK 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshinari Fujimoto, Shuichiro Yamanaka, Susumu Tajiri, Kei Matsumoto, Shohei Fukunaga, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Regeneration of rat nephrons in the mouse metanephros: in vivo regeneration of nephrons between different species under the administration of optimal immunosuppressive agents
3. 学会等名 American society of Nephrology KIDNEYWEEK 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shohei Fukunaga, Shuichiro Yamanaka, Toshinari Fujimoto, Susumu Tajiri, Taketo Uchiyama, Kei Matsumoto, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Establishment of the fetal nephron progenitor cells elimination in the uterus using iDTR system
3. 学会等名 ISN FRONTIERS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinari Fujimoto, Shuichiro Yamanaka, Susumu Tajiri, Kei Matsumoto, Shohei Fukunaga, Takashi Yokoo
2. 発表標題 In vivo regeneration of nephrons between different species under the administration of the optimal immunosuppressive agent using the drug-induced cell elimination system
3. 学会等名 ISN FRONTIERS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福永 昇平、山中 修一郎、藤本 俊成、田尻 進、松本 啓、横尾 隆
2. 発表標題 iDTR systemを用いた母胎内胎児腎前駆細胞除去モデルの作成
3. 学会等名 日本医工学治療学会 第34回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 啓、横尾 隆
2. 発表標題 「胎生臓器ニッチ法を用いた腎臓再生」
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤本俊成、松本啓、田尻進、山中修一郎、福永昇平、横手伸也、後藤花子、Kim Bum Soo、小林英司、横尾隆
2. 発表標題 カフ法を用いた異種心移植モデルによる免疫抑制療法の検討
3. 学会等名 第19回 日本異種移植研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山中修一郎、田尻進、藤本俊成、松本啓、岡野ジェイムス洋尚、横尾隆
2. 発表標題 前駆細胞置換による腎臓再生
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔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
研究協力者	山中 修一郎 (Yamanaka Shuuiichiro)	東京慈恵会医科大学・腎臓・高血圧内科 (32651)	

6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田尻 進 (Tajiri Susumu)	東京慈恵会医科大学・腎臓・高血圧内科 (32651)	
研究協力者	藤本 俊成 (Fujimoto Toshinari)	東京慈恵会医科大学・腎臓・高血圧内科 (32651)	
研究協力者	福永 昇平 (Fukunaga Shohei)	東京慈恵会医科大学・腎臓・高血圧内科 (32651)	
研究協力者	齊藤 弥積 (Saito Yatsumu)	東京慈恵会医科大学・腎臓・高血圧内科 (32651)	
研究協力者	横尾 隆 (Yokoo Takashi)	東京慈恵会医科大学・腎臓・高血圧内科・教授 (32651)	