

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16102

研究課題名(和文) 薬剤誘導細胞除去システムを用いた新たな腎再生技術の開発とiPS細胞への応用

研究課題名(英文) Development of a new kidney regeneration method using a drug-induced cell elimination system for iPS cell derived progenitor cells

研究代表者

山中 修一郎 (yamanaka, shuichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80775544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔腎臓から抽出したネフロン前駆細胞(NPC)を同時期の胎仔腎臓に移植すると、移植NPCがネフロン発生領域に定着しホスト腎の腎発生に寄与することが確認された。しかし、既存のホストNPCとドナーNPCが混在してしまい、新生したネフロンはモザイク構造を呈していた。そこで純粋なネフロンを再生するために、薬剤を投与することでネフロン前駆細胞だけを除去するシステムを構築し、100%移植細胞由来のネフロンを再生することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は腎不全患者救済をめざした腎臓再生の研究である。腎臓は多機能かつ構成細胞が多いため再生が最も難しい臓器と考えられている。しかし、近年ではiPS細胞からの誘導技術が向上し、ネフロン様組織の再生が実現化するようになった。だが生体内で臓器として働くまでの再生は困難であった。本成果ではiPS細胞からも誘導可能なNPCを細胞源に、生体内で尿産生能を持った腎臓再生技術を開発した。腎代替療法としての臨床応用だけでなく、ヒトiPS細胞を用いた薬剤毒性試験や病態解析などのin vivo評価系としての応用も想定され、腎不全患者の救済に多面的に資する技術になると考える。

研究成果の概要(英文)：When nephron progenitor cells (NPC) extracted from mouse fetal kidney were transplanted into the fetal kidney at the same embryonic period, it was confirmed that the transplanted NPC settled in the nephron-generating region and contributed to the renal development of the kidney. However, the existing host NPCs and donor NPCs were mixed, and the new nephrons had a mosaic structure. Therefore, in order to regenerate pure nephrons constructed same-origin cells, we developed a system that eliminated only host nephron progenitor cells by administering a drug and succeeded in regenerating 100% transplanted cell-derived nephron.

研究分野：腎臓再生

キーワード：腎臓再生 再生医療 iPS細胞 前駆細胞 腎不全 ネフロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞からネフロン前駆細胞への誘導法が近年報告された⁽¹⁾。試験管内で前駆細胞からネフロンへと分化させる組織レベルでの腎再生は一定の段階へと進捗をみせる。しかし、iPS 細胞から尿の産生能もった臓器レベルへの再生手法はまだ確立されていない。尿産生には腎と血管の接続が必須であり、尿を排泄する尿路系の構築も必要となる。現時点での培養法だけでは iPS 細胞から機能を有した腎臓の再生には限界があり、生体内での再生技術開発が鍵となる。そこで将来的な臨床応用をも見据え、iPS 細胞から尿産生能を示す腎再生を実現すべく、近年動物体内を利用した臓器再生戦略が注目を浴びている⁽²⁾。ヒト iPS 細胞を動物集合胚に移植する研究は技術的にも倫理的にも課題が多い。これらの課題を克服し iPS 細胞を用いた臓器再生を実現化するために、ヒト iPS 細胞からの前駆細胞誘導技術と個体発生環境を利用した臓器再生技術の融合による新たな再生戦略の構築が打開策になると考えた。

2. 研究の目的

試験管内だけで幹細胞から 3 次元構造を持った臓器を再生することは現状困難である。個体発生を完全に模倣することができないのであれば、個体発生環境をそのまま借りてしまおうと言う発想のもと、ラットの胎内にヒト間葉系幹細胞を移植し、分泌能と尿産生能をもつヒト組織の再生を以前に報告した^(3,4)。しかし、細胞を移植する初期の腎発生領域(腎発生ニッチ)は非常に小さく、高度な移植技術が要求された。また再生されたネフロンもホストとドナーの細胞が混在したモザイク状であったため、完全な移植細胞由来ではないことが課題であった。我々は移植が容易な妊娠後期の胎仔腎臓被膜下を新たな移植部位として着目した。また、以前よりも発生後期となるため発生時期を合わせ、移植細胞をネフロン前駆細胞に変更した。ネフロンがモザイク状になってしまう原因として、腎発生ニッチにおけるホストネフロン前駆細胞の存在にあると考え、移植と同時にホストの細胞を除去するモデルマウスを準備した。ホストネフロン前駆細胞の除去を利用した腎再生法の新規開発を目的に本申請では前駆細胞置換を利用した外来性前駆細胞からのネフロン再生を検討した。

3. 研究の方法

(1)ネフロン前駆細胞除去モデルマウスの作成

腎発生ニッチ内のネフロン前駆細胞 (NPC) を腎発生期だけに特異的に除去する、スイッチングシステムを検討した。具体的には Six2 陽性 NPC に Cre recombinase が発現する Six2-GFPCre マウスと Rosa-floxed-stop-iDTR マウスを交配させ、Six2-iDTR マウスの胎仔を得た。同マウスは Six2 陽性 NPC 特異的にジフテリア毒素受容体 (DTR) が発現したマウスで、ジフテリア毒素 (DT) の投与により NPC のみのアポトーシス誘導が可能であった⁽⁵⁾。

(2)移植腎前駆細胞の調整

移植腎前駆細胞は GFP マウス胎仔後腎を酵素処理により分散し調整した。まず胎齢 13.5 日の GFP マウス胎仔より後腎を採取した。採取した後腎は Accutase で 37℃、15 分インキュベートし、その間 5 分毎にピペティングを行うことで、single cell に分散した。分散液を 300g、5 分で遠心し、上清を破棄後、PBS で懸濁した。細胞懸濁液を 40 µm セルストレーナーで処理し、細胞塊を取り除いた。10mg/ml のジフテリア毒素 (DT) を含む PBS 溶液で再懸濁し、700g、3 分で遠心後、上清を完全に取り除いた。残った DT 含有の腎前駆細胞ペレットを移植細胞として使用した。後腎への移植までは氷冷で保存した。

(3)胎生期腎臓への細胞移植

胎齢 13.5 日齢の Six2-iDTR マウス胎仔を背側からのピンセットで切開し後腎を露出させた。ガラス管を後腎腎盂側より刺入し、腎被膜直下に先に調整した DT 含有の GFP マウス腎前駆細胞を注入した。その後、後腎を尿管および膀胱が付着した状態 (クロアカ) で胎仔より単離した。以降、外来性腎前駆細胞を移植された前駆細胞除去システム後腎またはクロアカを腎再生用腎芽とする。

(4)同種間での in vivo 腎臓再生

以前より後腎を成獣の後腹膜下に移植すると、ホスト血管が侵入し糸球体と統合、尿を産生することが知られている⁽⁴⁾。本研究でも腎再生用腎芽をホストである成獣のマウスに移植することで、in vivo での腎臓再生を試みた。腎芽はホストマウスの腹部の傍大動脈領域の後腹膜下に移植した。移植 2~3 週後に開腹の上移植腎臓を蛍光実体顕微鏡下で観察した。その後回収した検体は 4% PFA に 3 時間浸漬後、20% スクロース/PBS に一晩浸漬し、OCT コンパウンドで包埋した。8 µm で薄切して凍結切片を作成し、HE 染色、免疫染色および電子顕微鏡観察にて組織学的評価を行った。

(5)異種間での in vivo 腎臓再生

異種間でも検討すべく、ラットのネフロン前駆細胞を E15.5 の GFP ラット胎仔から抽出し、同種での方法と同様に胎齢 13.5 日齢の Six2-iDTR マウス後腎を用いて、腎再生用腎芽を作製した。成獣ラットの後腹膜下に再生用腎芽を移植した。ホストラットには移植前日から評価日まで連

日でタクロリムス (TAC) 2mg/kg 皮下注とメチルプレドニゾロン (MP) 5mg/kg 腹腔内注を行った。移植 3 週後に開腹の上移植腎臓を蛍光実体顕微鏡下で観察した。その後回収した検体は 4%PFA に 3 時間浸漬後、20%スクロース/PBS に一晚浸漬し、OCT コンパウンドで包埋した。8 μm で薄切して凍結切片を作成し、HE 染色、免疫染色および電子顕微鏡観察にて組織学的評価を行った。

(5)再生ネフロン の濾過能評価

再生ネフロン の濾過能評価のため、検体回収の 1 時間前にホストマウスまたはホストラットに尾静脈から蛍光標識デキストラン(テトラメチルローダミン標識 1mg/body)の投与を行った。組織回収後、上記と同様に凍結切片とし、蛍光デキストランの検出を行った。

4. 研究成果

(1)同種間での腎前駆細胞からの腎再生

マウス胎仔から抽出した NPC を含む細胞集団を移植した腎再生用腎芽は器官培養において 5 日目に移植細胞由来のネフロンを認めた。腎発生ニッチを観察すると完全にネフロン前駆細胞は移植細胞由来であった。ホストの細胞を除去しない場合(非置換モデル)は約 30%しか定着しなかったが、ホストの NPC を除去すること(置換モデル)で 100%移植細胞由来であることが示された(図 1)。この腎再生用腎芽を成獣マウスの後腹膜下に移植したところ同様に腎発生ニッチで NPC が置換され、ホスト血管と統合した糸球体を認めた。さらに、蛍光標識デキストランを投与することで尿の濾過も確認された。ホストとドナーの NPC をジフテリア毒素による自殺システムを応用することで、前駆細胞を置換させ、移植細胞由来のネフロンを再生させることに成功した⁽⁵⁾。

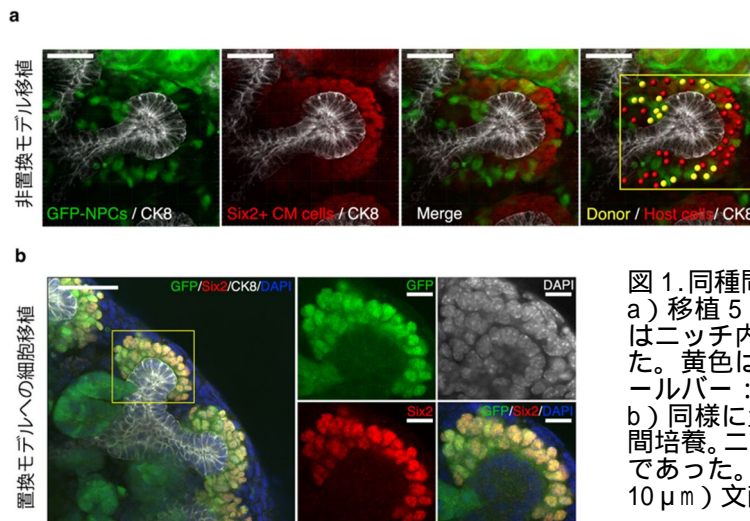


図 1. 同種間での腎臓再生

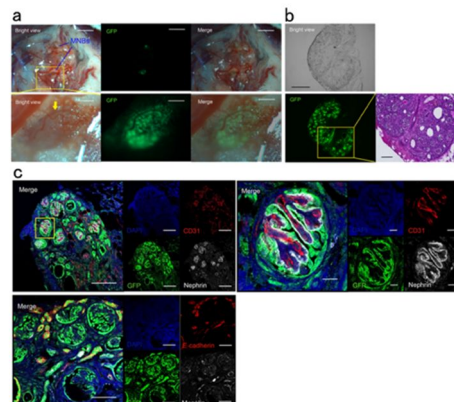
a) 移植 5 日間培養後の評価。非置換モデルではニッチ内の NPC は 30%が移植細胞由来であった。黄色は移植 NPC、赤色はホスト NPC (スケールバー: 40 μm)
b) 同様に置換モデルに GFP-NPC を移植し 5 日間培養。ニッチ内の NPC はすべて移植細胞由来であった。(スケールバー 左図: 40 μm, 右図: 10 μm) 文献 5 より引用

(2)異種間での in vivo 腎臓再生

同種と同様に、Six2-iDTR マウス胎仔後腎の腎被膜下に GFP ラットから抽出した NPC を含む前駆細胞集団を移植し、成獣ラットの後腹膜下に移植した。ホストの LEW ラットには TAC 2mg/kg/day s.c.および MP 5mg/kg/day で免疫抑制をかけた。移植 3 週間後には腎再生用腎芽の発育を認め、GFP の発現を広範に認めた(図 2a)。発育した後腎にはホストラットからの血管侵入が観察された(図 2a, 矢印)。回収検体の切片を観察したところ、GFP を発現した移植細胞由来の糸球体、尿細管の再生を確認できた(図 2b)。また GFP 発現とマージする ECAD 陽性の遠位尿細管、Megalin 陽性の近位尿細管、そして Nephrlin 陽性糸球体と移植したラット細胞由来のネフロン構造が確認できた(図 2c)。前駆細胞置換によってラットのネフロン再生にも成功した⁽⁶⁾。

図 2. 異種間での in vivo 腎臓再生

a) 移植 3 週後の評価。後腎の発育を認め、後腎には広範に GFP が発現している。黄色矢印はホスト血管の侵入を示している。(スケールバー 上図: 2 μm, 下図: 250 μm)
b) GFP 陽性の糸球体、尿細管構造を腎全体に認める。HE 染色像では糸球体、尿細管の再生を認める(スケールバー 左図: 300 μm, 右下図: 100 μm)
c) GFP 陽性かつ Nephrlin 陽性の糸球体を認める。糸球体内にはホストより CD31 陽性血管内皮が侵入している。GFP 陽性かつ Megalin 陽性の近位尿細管、E-cadherin 陽性の遠位尿細管を認める。(スケールバー 左上図: 100 μm, 右上図: 10 μm, 左下図: 50 μm) 文献 6 より引用



2. 再生ネフロン濾過能の証明

再生腎臓を移植したラットに蛍光標識したデキストランを静脈投与すると、再生糸球体のボウマン腔や尿細管腔内に移行することが確認された(図3)。つまりラット移植細胞より再生したネフロンとホストラットの血管が機能的に結合し、濾過能を有することが示された(5)。これは同種マウスでの腎再生でも同様に見られた(4)。

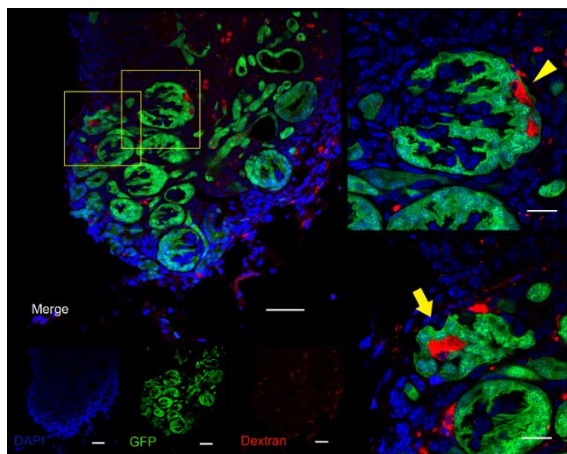


図3. 再生ネフロンの濾過能評価
再生糸球体ボウマン腔および尿細管腔内にデキストランの集積を認める。これは再生ネフロンの濾過能を示す。(スケールバー 左図: 50 μ m, 右上・右下図: 10 μ m)
文献6より引用

今回の検討から同種・異種を問わず、げっ歯類において胎生期腎臓を再生の足場に前駆細胞を入れ替えることで、ホストの尿産生が可能なネフロンの再生が可能であった。ネフロンを移植細胞由来にするには前駆細胞の除去が必要であったが、発生初期から Six2 をノックアウトしてしまうと、腎発生環境であるニッチがそもそも形成されないため、移植前駆細胞がネフロン再生に寄与せず、ホストの尿路系とも接続しないことが考えられた。腎臓がネフロン発生領域であるニッチをある程度形成した時期を対象にネフロン前駆細胞を移植することが重要であり、さらにホスト側のネフロン前駆細胞を除去することが完全な入れ替えには必須であった。この前駆細胞置換によって外来性でかつ異種の前駆細胞が利用できたことから、将来的にはブタの腎臓を足場に、ヒトの iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞を使い、ヒト腎臓再生へ繋げることを考えている。近年 CRISPR-Cas9 等のゲノム編集技術の発展によりマウス以外の動物での遺伝子編集が比較的容易となった。我々は Six2 遺伝子に着目し、ブタのネフロン前駆細胞だけを特定の薬剤によって除去するシステムの開発に着手している。異種が含まれるキメラ臓器を用いたヒト腎臓再生は、適切な免疫抑制プロトコール設定や感染などの安全性確保、倫理面などまだ多くの課題が残る。しかし、我々が提案する動物内での前駆細胞置換を利用した腎臓再生手法は腎代替療法としての臨床応用だけでなく、ヒト iPS 細胞を用いた薬剤毒性試験や病態解析などの in vivo 評価系としての応用も想定しており、腎不全患者の救済に多面的に資する技術になると考える。

<引用文献>

- 1) Geuens T, van Blitterswijk CA, LaPointe VLS. Overcoming kidney organoid challenges for regenerative medicine. *NPJ Regen Med.* 2020;5:8. Published 2020 Apr 30. doi:10.1038/s41536-020-0093-4
- 2) Suchy F, Nakauchi H. Interspecies chimeras. *Curr Opin Genet Dev.* 2018;52:36-41. doi:10.1016/j.gde.2018.05.007
- 3) Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, 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.* 2005;102(9):3296-3300. doi:10.1073/pnas.0406878102
- 4) Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, et al. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4):1026-1034. doi:10.1681/ASN.2005101043
- 5) Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, et al. Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun.* 2017;8(1):1719. Published 2017 Nov 23. doi:10.1038/s41467-017-01922-5
- 6) Fujimoto T, Yamanaka S, Tajiri S, et al. In vivo regeneration of interspecies chimeric kidneys using a nephron progenitor cell replacement system. *Sci Rep.* 2019;9(1):6965. Published 2019 May 6. doi:10.1038/s41598-019-43482-2

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

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 Toshinari, Yamanaka Shuichiro, Tajiri Susumu, Takamura Tsuyoshi, Saito Yatsumu, Matsumoto Kei, Takase Kentaro, Fukunaga Shohei, Okano Hirotaka 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) 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 -
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) 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 Tajiri Susumu, Yamanaka Shuichiro, Fujimoto Toshinari, Matsumoto Kei, Taguchi Atsuhiko, Nishinakamura Ryuichi, Okano Hirotaka 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 -
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 B. S., Okano H. J., 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 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 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 -

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) doi: 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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 胎仔への経子宮的細胞移植法の確立と腎欠損胎仔における腎前駆細胞からのin vivo腎臓再生
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会 (神戸)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 異種動物の胎生期腎臓を足場に 利用した腎前駆細胞からの腎臓再生
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会 (郡山) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 ワークショップ口演, Kidney regeneration from renal progenitor cells, borrowing embryonic kidneys from other species as a developmental niche
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会(福岡) (招待講演)
4. 発表年 2019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 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shohei Fukunaga a , Shuichiro Yamanaka a , Toshinari Fujimoto a , Susumu Tajiri a , Taketo Uchiyama a , Kei Matsumoto a , Takafumi Ito b , Kazuaki Tanabe b , 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 55th ERA-EDTA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 腎臓再生への挑戦 ネフロン前駆細胞を用いた実質臓器再生への挑戦
3. 学会等名 第63回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中修一郎
2. 発表標題 腎臓再生医療の進捗と課題 ネフロン前駆細胞から機能腎臓再生
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 修一郎 , 斎藤 弥積 , 高村 毅 , 藤本 俊成 , 田尻 進 , 松本 啓 , 横尾 隆
2. 発表標題 胎仔への経子宮的細胞移植法の確立と腎欠損胎仔における腎前駆細胞からのin vivo腎臓再生
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 Shuichiro Yamanaka
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 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shuichiro Yamanaka
2. 発表標題 Generation of nephrons from nephron progenitor cells by the progenitor replacement system
3. 学会等名 ISN frontiers- International Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuichiro Yamanaka
2. 発表標題 A novel system to regenerate the kidney by replacing nephron progenitor cells in an empty niche.
3. 学会等名 ISN World Congress of Nephrology - International Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山中修一郎
2. 発表標題 再生医療最前線 前駆細胞からネフロン再生 (シンポジウム)
3. 学会等名 第62回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 共著 山中修一郎 監修：中元 秀友	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 408
3. 書名 これまでがわかる。これからがわかる。透析療法最前線 各論 08. これからの透析医療：再生医療最前線	

〔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
---------------------------	-----------------------	----