

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590911  
 研究課題名 (和文) 異種胎児を用いた自己間葉系幹細胞由来クローン腎臓作製法の開発  
 研究課題名 (英文) Establishment of Cloned kidney derived from autologous mesenchymal stem cells using xeno-embryos  
 研究代表者：横尾 隆 (YOKOO TAKASHI)  
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：70301538

## 研究成果の概要：

腎臓のもつ解剖学的複雑性のため、慢性腎不全に対する再生医療はこれまでの他臓器で行われてきた再生医療研究とは異にした全く新たなアプローチが必要になると考えられる。我々はこれまで異種胎児の発生プログラムを用いた全く新しいアプローチによってヒト骨髄由来間葉系幹細胞からネフロンへの分化誘導に成功し、さらにこのヒト由来腎臓原器をホスト動物の大網内で腎臓への分化をさらに誘導し、尿生成能も持たせることに成功した。つまりヒト由来腎臓をラット体内で機能させることが可能となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：間葉系幹細胞、腎臓再生、異種胎児、移植

## 1. 研究開始当初の背景

現在本邦における末期腎不全患者数は 26 万人を超えるに至っているが、今後糖尿病患者の増加、高齢化に伴いその数はさらに爆発的に増えることが予想されている。腎臓は人工透析による代償が可能な臓器であるが、医療費の高騰を伴い現在日本における国庫負担

は 1 兆円を超え世界的にも 2001 年から 2010 年までの 10 年で 1 兆ドルを超える歳出になり、次の 10 年ではその倍以上となると予想されている (Lysaght MJ JASN 2002)。さらに日本では透析患者のほとんどが身体障害者一級と認定されるため医療費以外にも各種福祉による保護の対象となり、この歳出を

含めると一人当たり年間 1000 万円近くが必要となると試算されている。この事実は広く知られていないが、身内に透析患者がいない家庭にとってはこれだけの支出が税金から賄われていることは理解されにくく、今後制度の見直しとともに患者負担の増大は不可避となるであろう。一方で透析患者も著しい QOL 低下に苦しみ続けなければならない。現在透析技術の向上に伴い透析時間の短縮が可能となり仕事をしながら自立できる透析患者は増えてはいるが、それでも現行では血液透析なら週 3 回 3 - 4 時間は必要であり、この時間的制約のため職種はかなり限定され、透析導入前とまったく同じ条件で働くのは難しい。また常に食事、水分、活動範囲などの制約が付きまとい、また骨病変、血管病変などの透析合併症のため腰痛や下肢痛などの耐え難い自覚症状を持つ。臨床の現場にいるとこのような悲惨な光景を現実に目の当たりにすることとなり、すでに透析医療の限界が迫っていることを痛感する。昨今紙面を賑わせている病氣腎移植という一部の医療機関の暴走とも取れる行為は、このような切羽詰った状況が背景にあると考える。

このように透析医療は患者のみの問題でなく社会全体の問題であり、すでに社会経済的にも患者負担的にも限界を迎えている。我々はこの危機的状況を認識し社会へ喚起するとともに、これまでの「透析をいかに楽にするか」や「透析患者の QOL をいかに上げるか」に主眼がおかれていた腎臓研究から「いかに透析をなくすか」の研究へ転換しなければならない時期であった。

## 2. 研究の目的

腎臓再生研究の一番の問題点は、腎臓が解剖学的に非常に複雑で、また独自に違った機能

を持つ細胞がネットワークを形成し腎機能を発揮するため、腎臓再生には機能を持った腎臓構成単位を作り出さなければならないことにある。そこで本研究において、まず複雑な構造を持つネフロンへの分化法を確立し、そこにホストの血管を迷入させるという 2 段階のシステムによってヒト由来細胞から尿生成機能を持った新規腎臓を構築することが可能か検討する。

## 3. 研究の方法

本研究において免疫的寛容段階の異種の胎児を“臓器工場”として用い自己の臓器をつくるという全く新しいアプローチによって外来性の間葉系幹細胞から、個々の腎臓構成細胞でなくネフロンへの分化を誘導することが可能か検討する。実際には骨髄から得られたヒト間葉系幹細胞に腎臓発生に必須である GDNF 遺伝子を導入した後、腎臓が出来る以前の未熟な異種胎児の腎臓発芽部位に注入する。この胎児を全胚培養器を用い腎臓原器が形成されるまで子宮外で成長させ、さらに器官培養にて腎臓の発育を継続させ、ヒト間葉系幹細胞由来の腎臓構成単位（ネフロン）及びその周囲の間質の構築を確認する。さらにこのシステムをさらに改良しヒト由来腎臓原器をさらに血管迷入期直前にホストの体内に戻すことにより、ホストの血管系を統合した機能的新規腎臓を作成できるか検討する。つまり現在のシステムにより作製したヒト由来腎臓原器をさらにホストラットの大網内に移植し、腎臓発育とともにホスト血管の迷入を誘導しホストの尿を生成できるか検討する。これまでの予備実験では E13.5 以上の後腎組織をラット大網内に移植すると発育を継続できることを確認している。ホストの血管系が迷入していること

を確認するために LacZ ラットの 大網に上記方法にて作製した間葉系幹細胞由来後腎組織を移植し、移植臓器に迷入している血管系がホスト由来であることを証明する。腎機能評価は新規腎臓からの尿及び血清のクレアチニン、BUN の濃度測定などで行う。

### 3. 研究成果

我々脊椎動物はもともとひとつの受精卵であったが、わずかな時間にいろいろな刺激を受け個体へと発生していく。その発生の初期段階においてそれぞれの臓器もわずかな細胞群から非常に複雑な構成単位を形成していく。つまり時間的空間的にプログラムされた多種多様の刺激が 3 次元的に一分の狂いなく幹細胞に作用することにより個体間で殆ど差がない臓器へと分化していく。そこで発育中の異種の胎児の体内を“臓器工場”として用いることができないか検討した。つまり臓器形成段階の胎児は免疫機能確立前で異種の細胞を拒絶なく受け入れることが可能であるため、外来の幹細胞を生きた胎児の臓器が形成される部位に注入することで、発生段階と全く同じ環境下に置き、臓器発生時の各種因子と全く同様の刺激を与えることで注入した幹細胞から臓器を作り出せるか検討した。遺伝子改変した間葉系幹細胞を腎臓が出来る前のラット胎児の腎臓発芽部位に注入し、全胚培養器を用いこの胎児を生きたまま子宮外で成長させた後、さらに器官培養にて腎臓の発育を継続させた。その結果注入した間葉系幹細胞由来の腎臓の一部（ネフロン及びその周囲の間質）の形成が確認された。

続いてこの腎臓原器に尿生成能を獲得させることに挑んだ。まず後腎発生の血管迷入期前後に後腎を大網に移植することにより

移植後腎はさらに成長を続け尿生成を開始するという現象に着目した。妊娠 13.5 日以降のラット胎児の後腎は大網内で発育を継続することが確認されたため、ヒト間葉系幹細胞を妊娠 11.5 日ラット胎児体内で 48 時間培養した後 24 時間器官培養を行い、妊娠 13.5 日後腎相当の大きさまで発育させてから成獣ラットの大網内に移植した。移植後腎臓原基は急速に成長し 2 週間後には元の腎臓の 10~20%の重量になっていた。我々はこのヒト間葉系幹細胞由来腎臓組織を新規腎臓 (neokidney) と名づけさらに検討を行った。LacZ トランスジェニックラットをレシピエントとして用いた実験にて、大網内で成長した新規腎臓内の血管系は LacZ 陽性でありレシピエントの血管が統合されていることが示された。さらに電子顕微鏡にて糸球体係蹄内に赤血球が確認されておりレシピエントの循環系が糸球体係蹄まで達していることが示唆された。同時に糸球体上皮細胞の高次構造がしっかり構築されていることが確認されたため、レシピエントの血液をろ過することが可能であると推察された。このため腎臓原基を大網内で 4 週間成長させたところ新規腎臓は水腎症を呈することが確認された。これは新規腎臓が尿生成を開始したが尿管が大網内の脂肪組織に埋もれてしまって流出路が絶たれてしまったために生じたと考えられた。このため拡張した尿管からマウスピペットを用いて貯留した液体を吸引し生化学的検討を加えたところ、血清値と比較し尿素窒素およびクレアチニン値が明らかに濃縮され尿組成に近いことが確認され、新規腎臓が血清をろ過したことが示唆された。

そこで最終年度はヒト間葉系幹細胞を集合管系 (尿管・集合管) に分化させる試みを行った。将来尿管芽 (UB) に分化する細胞群 (UB 原基) の存在領域に間葉系肝細胞を

移植し、その場の内在性シグナルを与えることで、UB への分化を促した。UB は、中腎の導管として頸胸境界部から総排泄腔へと伸びるウォルフ管の尾端に形成される。胚が大きいため扱いやすく、胎生でないため操作後の胚を卵内で培養できるニワトリ胚を用いた。腎臓発生に必須な遺伝子の発現パターンは、ニワトリと哺乳類間で高度に保存されていることを確認した。蛍光色素 DiI を用いた系譜解析の結果、6 から 12 体節期というごく初期の胚の、最終体節近傍の中間中胚葉が、ニワトリのウォルフ管および UB の原基であった。しかし、間葉系幹細胞をニワトリの UB 原基領域に移植しても分化は見られなかった。そこで、UB 原基に強く発現している遺伝子である *PAX2* を導入した後 UB 原基領域に移植して発生を継続したところ、間葉系幹細胞は尾側に移動し、移植 2 日後にはウォルフ管上皮に取り込まれた (投稿中)。さらに RT-PCR を行なったところ、*PAX2* を導入した間葉系幹細胞は、移植前の時点では、ウォルフ管の発生に必須な遺伝子である *LIM1* を発現していなかったが、ウォルフ管上皮に取り込まれた後の hMSC には *LIM1* の発現が見られた。これらの結果は、間葉系幹細胞がニワトリ胚内でウォルフ管に分化したことを強く示唆する。遺伝子導入や移植方法の改良により、ネフロン再生のプロトコールと組み合わせて、腎臓全体をヒト間葉系幹細胞から再生できる可能性があると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, Ohashi T, Sado Y, Kawamura T, Okabe M, Hosoya T, Kobayashi E. Generation of transplantable erythropoietin-producer derived from human

mesenchymal stem cells. *Transplantation* 85: 1654-1658, 2008 (査読あり)

2) Yokoo T, Fukui A, Kobayashi E: Application of regenerative medicine for kidney diseases. *Organogenesis* 3:34-43, 2007 (査読あり)

3) Yokoo T, Awai T, Yamazaki H, Fukuda Y, Hayashi F, Hosoya T: Emphysematous cystitis complication in a patient undergoing hemodialysis. *Clin Exp Nephrol* 11: 247-250, 2007 (査読あり)

4) Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M, Kobayashi E: Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 1026-1034, 2006 (査読あり)

5) Miyazaki Y, Ueda H, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T: Inhibition of endogenous BMP in the glomerulus leads to mesangial matrix expansion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340: 681-688, 2006 (査読あり)

[学会発表] (計 37 件)

1) Yokoo T. Kidney regeneration using organogenesis of xeno-embryo. Satellite Symposium in Toronto University. June 3, 2008 Toronto, Canada

2) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, Hosoya T, Kobayashi E. Application of non-viral GDNF diffusion for development of chimeric rat kidney with human components. The American Transplant Congress May31-June4 2008 Toronto, Canada

3) Yokoo T, Akira F, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T: Kidney regeneration using an artificial thermoreversible bio-diffuser of GDNF. American Society of Nephrology 40<sup>th</sup> Annual

Renal Week Meeting. 1-5 Nov 2007 San Francisco, California, USA.

4) Yokoo T: Mesenchymal stem cells and their renal potential. 4<sup>th</sup> World Congress of Nephrology, 21-25 April 2007 Rio de Janeiro, Brazil

5) Yokoo T, Fukui A, Utsunomiya Y, Kawamura T, Okabe M, Hosoya T: Generation of erythropoietin-producing self organs using human mesenchymal stem cells. American Society of Nephrology 39<sup>th</sup> Annual Renal Week Meeting. 16-19 Nov 2006 San Diego, California, USA.

〔図書〕 (計 1 件)

1) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, Kawamura T: Renal stem cells and kidney regeneration in *Regulatory Networks in Stem cells* (edited by Rajasekhar VK and Vemuri M) Humana Press INC., NJ USA

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕

ホームページ : <http://www.yokoolab.com>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 隆 (YOKOO TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70301538