

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17756

研究課題名（和文）腎前駆細胞からの再生ネフロンを用いた in vivo 腎毒性評価モデルの開発

研究課題名（英文）Development of renal toxicity evaluation model using nephron progenitor replacement system

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） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：これまでの動物実験による腎毒性評価モデルは、ヒトと動物の生物学的な違いから、十分な精度を持つものではなかった。ヒトの腎臓を持ったマウスを作るという発想から、キメラ腎臓をマウスの体内で再生させる試みがなされた。そこでまず、げっ歯類の腎前駆細胞から効率的にキメラ腎臓を再生させる手法を開発することに焦点を当てた。成果として、新生仔マウスの腎臓内に外来性にげっ歯類の腎前駆細胞を移植することで、キメラとして腎臓の再生を示した。新生仔キメラ腎臓は移植7週以後も再生細胞の生着と長期的な尿細管機能の保持とシスプラチン腎症の再現が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、薬剤（シスプラチン）による腎障害の発現機序を解明する一助となるよう、新たな評価モデルとしてキメラ腎臓の応用を提示した。げっ歯類の腎前駆細胞を用いてマウス新生仔の腎皮膜内でキメラ腎臓を作り出す手法を開発し、このキメラ腎臓における再生ネフロンが毒性物質による障害反応を正確に再現することを確認した。この研究成果は、将来的にはヒトの腎臓を持ったマウスを利用した、薬剤の腎毒性評価や治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。この成果は、動物実験モデルの限界を超えるような、創薬における安全性と有効性の向上を実現するための基盤技術として、重要な一歩となることを期待したい。

研究成果の概要（英文）：Previous animal models for evaluating nephrotoxicity have not been sufficiently accurate due to the biological differences between humans and animals. The idea of creating mice with human kidneys led to an attempt to regenerate chimeric kidneys in the mouse body. First, we focused on developing a method to efficiently regenerate chimeric kidneys from rodent renal progenitor cells. As a result, they demonstrated kidney regeneration as a chimera by exogenously transplanting rodent renal progenitor cells into the kidneys of neonatal mice. The neonatal chimeric kidneys showed regenerative cell engraftment and long-term sustained of tubular function and reproduction of cisplatin nephropathy even after 7 weeks of transplantation.

研究分野：腎臓再生

キーワード：腎不全 薬剤性腎障害 シスプラチン 幹細胞 前駆細胞 再生 急性腎障害 トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

入院中の成人患者における急性腎障害 (AKI) の 26%は薬剤性との報告がある。薬剤性腎障害は治療・診断のために使用した医薬品による有害事象であり、腎障害発生によって治療の変更や中止を余儀なくされるため、実臨床における重要な課題の一つとされている。しかしながら多くの薬剤では腎障害の発現機序が不明であり、有効な対策法の確立には未だに至っていない。また創薬においてもヒトへ投与して初めて報告されることがあり、ヒトとラットでは近位尿細管の薬物トランスポーターが一部異なるため動物実験だけでヒト特有の薬物動態を再現することは難しい。本研究では、申請者らが得意とする異種動物体内で三次元腎臓を再生する技術を応用する。そしてヒト iPS 細胞への応用としてブタを発生の足場に使い、異種動物体内でのヒト腎臓再生を開発中であるが、本研究ではまず、げっ歯類での再生ネフロンに対する *in vivo* 腎毒性評価の確立を目指す。

2. 研究の目的

薬剤による腎障害は臨床や創薬の場において大きな弊害をもたらす、多大なコストを強いる深刻な問題である。前臨床試験での動物実験は尿管がヒトと異なるため十分な評価法とは言えない。ヒト腎臓に対する *in vivo* での腎毒性評価法の開発が求められる。申請者らは以前にラットの胎仔内部でヒト腎組織の再生を報告した(1)。さらに新たな技術としてラット腎前駆細胞からマウス腎臓内で異種となるラットネフロン再生に成功した(2)。近年試験管内でヒト iPS 細胞から腎前駆細胞が誘導可能となり、これらの手法を統合してブタ胎仔内でのヒト腎臓再生研究を進めている。本研究でげっ歯類での異種間ネフロン再生を用いた *in vivo* 毒性評価モデルの確立を目的とする。この研究を将来的にはヒトネフロンでの *in vivo* 腎毒性評価モデルの開発へ繋げ、今後の臨床応用を目ざしたい。

3. 研究の方法

申請者らが開発した発生の腎臓にネフロン前駆細胞を移植することでキメラ形成を通じて尿管細胞を再生する手法を用いた。具体的には、GFP マウス (B6) の E13.5 の胎仔から腎臓を摘出し、融解酵素(アキュターゼ)を用いて単一細胞化させた懸濁液を作成する。懸濁液をハミルトンシリンジを用いて、出生後 1 日目の新生仔マウス (B6) に移植した。移植後、急性期単回投与群として 13 日目にシスプラチンを 10 または 20 mg/kg を腹腔内投与で単回投与し、2 日後に回収した。また慢性期反復投与群として、28 日目より週 1 回、連続 4 週間でシスプラチンを 5 または 7 mg/kg 腹腔内投与で投与した。キメラ腎臓を回収し、免疫染色による組織評価、シングルセル RNA シークエンス解析を行った。

4. 研究成果

新生仔移植の侵襲性の評価

子宮内胎仔への細胞移植 (exo utero 法) では、目標の腎発生領域に細胞を到達させることが難しく (18%)、熟練した手技者でないと胎仔の生存率が低かったため、より移植しやすく効率のよいキメラ個体を作りたいと考えた。マウスではヒトと異なり出生後もネフロン前駆細胞が残存し、腎発生が継続しているため、この時期に外来前駆細胞を注入すれば取り込まれることが期待された。実際に P3 までの新生仔マウスには NPC が存在していた。

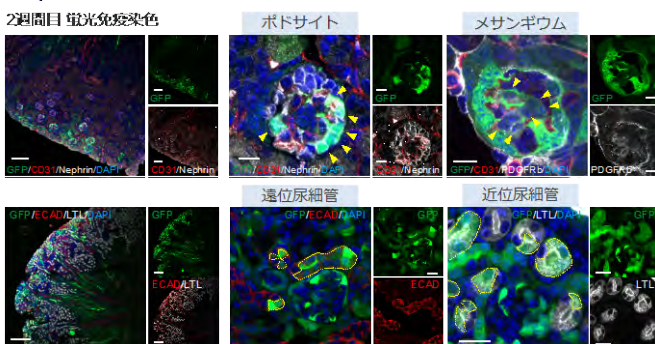
新生仔マウスを麻酔下で背部切開して腎臓を露出させ、実体顕微鏡で確認しながらハミルトンシリンジで移植する方法を開発し、GFP 陽性マウス腎前駆細胞を B6 マウス P0-1 の新生仔の腎被膜下に、実体顕微鏡で確認しながら注入した。注入の成否は GFP 標識によりリアルタイムで評価することができた。

移植したホストマウスをそのまま実母のもとで飼育させたところ、ホストは半数以上が生存でき (P0: 43% (n=44)、P1: 85% (n=39))、移植による個体の成長障害は見られなかった。

新生仔移植の細胞成熟の評価

移植 2 日後の新生仔 (P3) の腎臓では、外側にホストの腎発生ニッチが残存していたが、注入した GFP 陽性細胞の集団も辺縁に存在していた。細胞を注入した領域では、cap mesenchyme に GFP 陽性細胞が取り込まれていて、キメラ状のニッチが形成されたことが分かった。一方、ホスト腎の深部には NPC が残っており分化が完了しているため、深部に注入した細胞はキメラを形成することができなかった。移植 2 週間までホストを発育させる

図1) 新生仔腎臓への移植でキメラネフロンを形成



と、100%の個体で GFP 細胞の定着が確認でき、胎仔移植と比較して効率がよい方法であると言えた。ポドサイトや、近位尿細管、遠位尿細管上皮細胞に分化したキメラネフロンが確認できた。また、GFP 陰性のホストの血管内皮細胞が侵入して、キメラネフロン成熟が促進されている様子も分かった(図 1)。ただし、一部ではモザイク状になっていない自己凝集型外来ネフロンも存在していた。

このキメラネフロンが成熟しているのかどうかを、シングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) で評価した。

ドナー細胞と、EGFP 陰性ホスト細胞とで、各ネフロン細胞の遺伝子発現パターンを比較してみると、それぞれで非常に高い相関があり、native の腎臓とほぼ同等に成熟したことが示唆された。さらに、近位尿細管細胞に絞ってホストとドナーを比較すると、シスプラチンの取り込み・排泄に関与しているトランスポーターが同等に発現していた。

比較対象として、in vitro でマウス胎仔腎細胞からなるスフェロイドを形成し気液平面で培養した。するとこれらの近位尿細管トランスポーターの発現は、胎仔腎臓よりは上昇していたものの発生時期を揃えた正常マウス腎臓と比較して低く、培養時期を延長することで却って悪化したため、in vitro 培養系では十分な尿細管機能が再現できないことが示唆された。

新生仔移植のシスプラチン腎障害の評価

キメラネフロンを用いて、シスプラチン誘導急性腎障害モデルを作製した。

ホスト個体へのシスプラチン腹腔内投与により、近位尿細管細胞において、ドナー細胞・ホスト細胞共に同程度に、用量依存性に *Kim1* の発現が増加したことを免疫染色で確認した。

シスプラチン腎症を scRNA-seq でも評価した。すると、まずシスプラチン投与による個々の遺伝子発現の変化幅が、ホスト細胞における変化と、ドナー細胞における変化の間に有意な相関関係が示された。特に変動の大きさの上位遺伝子を、シスプラチンで上昇したもの、低下したものを列挙すると、ホストとドナー細胞との間で共通しているものが多かった。それは *Havcr1* (*Kim1*)、*Spp1*、*Clusterin* などの既知の急性腎障害マーカーを含んでいた。一方、両者で共に発現が低下した遺伝子は *Slc34a1* などのトランスポーターや *Pck1* (糖新生に関与) などの細胞恒常性に関わっている遺伝子であり、シスプラチンによる細胞毒性が示唆された。つまり、キメラネフロンは腎障害を再現することができた。

キメラネフロン長期生着

この新生仔キメラは、移植 2 ヶ月後でも全例で GFP 細胞集団が残存していた。標識低分子デキストランの全身投与後に腎臓を回収すると、糸球体や尿細管に組み込まれたキメラネフロンが生着しており、糸球体内や尿細管管腔内に蛍光物質が存在することから濾過排泄機能も確認できた。

一方、同じ GFP マウス腎前駆細胞をスフィア状にしたものを成獣の免疫不全マウスへ腎被膜下移植すると、4 週間後の時点でスフィアの尿細管の拡張が出現し、8 週間にはネフロン構造が確認できないほどに廃絶した。

このことから、新生仔キメラはホスト尿路との接続を有し長期生着を可能とする点で、従来の成獣移植より優れていることが示唆された。

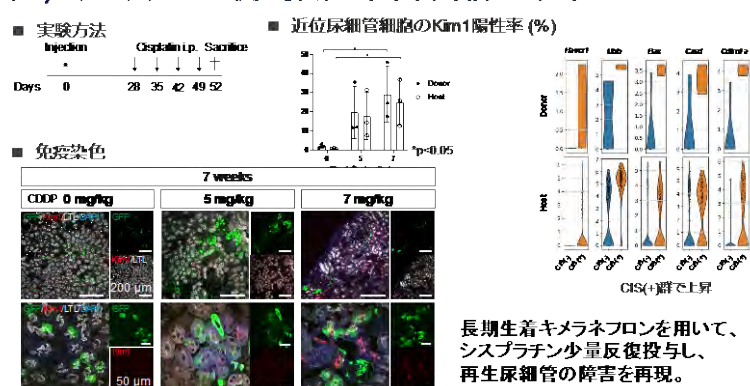
長期生着キメラネフロンを用いた、薬剤の反復投与試験

キメラネフロンが長期生存できることを活用し、シスプラチンの少量反復投与による慢性毒性モデルを作製した。まずシスプラチン投与なしの検体を観察すると、2 週後の時点で見られたような自己凝集ネフロンが見られなかった。また外来近位尿細管細胞における *Kim1* の発現率が、2 週後では 10% を超えてしまう検体もあり、一部の自己凝集ネフロンにおいて尿排泄路がないことによる内圧上昇の影響が示唆されたのに対して、2 ヶ月後のものでは陽性率が低く抑えられており、より生理的な状態の外來細胞が純化されたと考えられた。

シスプラチン投与に伴い、用量依存性に外来近位尿細管細胞における *Kim1* の発現が上昇し、ホストでの変化と同様であった。

scRNA-seq を行うと、*Gclc*、*Btg2*、*Gas6* などの腎障害に対して保護的に作用することが指摘されている遺伝子の発現がドナー、ホストで共通して上昇していた。

図2) シスプラチンの反復投与試験による尿細管障害の誘導



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsumoto Naoto, Matsui Kenji, Saitou Yatsumu, Takamura Tsuyoshi, Yamanaka Shuichiro, Yokoo Takashi, Kobayashi Eiji	4. 巻 36
2. 論文標題 Techniques of fragile renal organoids transplantation in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Cirrgica Brasileira	6. 最初と最後の頁 e361102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1590/acb361102	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 Watanabe Masahito, Umeyama Kazuhiro, Nakano Kazuaki, Matsunari Hitomi, Fukuda Toru, Matsumoto Kei, Tajiri Susumu, Yamanaka Shuichiro, Hasegawa Koki, Okamoto Kazutoshi, Uchikura Ayuko, Takayanagi Shuko, Nagaya Masaki, Yokoo Takashi, Nakauchi Hiromitsu, Nagashima Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Generation of heterozygous PKD1 mutant pigs exhibiting early-onset renal cyst formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 s41374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00717-z	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 Yamanaka Shuichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of chimeric kidneys using progenitor cell replacement: Oshima Award Address 2021	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 s10157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02191-3	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, Matsumoto Naoto, Yamanaka Shuichiro, Yokoo Takashi, Kobayashi Eiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Beneficial Impact of Interspecies Chimeric Renal Organoids Against a Xenogeneic Immune Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2022.848433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.848433	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 松本直人, 山中修一郎, 横尾隆	4. 巻 91
2. 論文標題 新しい手法を駆使した腎臓病研究の最前線】腎臓発生・再生 発生ニッチ補充による腎臓再生法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 919-922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 松本啓、齋藤弥積、山中修一郎、横尾隆	4. 巻 13
2. 論文標題 エリスロポエチンと再生医療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 667-675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Fujimoto Toshinari, Yamanaka Shuichiro, Tajiri Susumu, Takamura Tsuyoshi, Saito Yatsumu, Matsumoto Naoto, Matsumoto Kei, Tachibana Toshiaki, Okano Hiroataka James, Yokoo Takashi	4. 巻 32
2. 論文標題 Generation of Human Renal Vesicles in Mouse Organ Niche Using Nephron Progenitor Cell Replacement System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108130 ~ 108130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108130	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, Matsui Kenji, Fujimoto Toshinari, Takamura Tsuyoshi, Saito Yatsumu, Matsumoto Naoto, Tajiri Susumu, Matsumoto Kei, Yokoo Takashi	4. 巻 2
2. 論文標題 In?vivo regeneration of neo-nephrons in rodents by renal progenitor cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100314 ~ 100314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100314	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 松本 直人, 山中 修一郎, 横尾 隆	4. 巻 89
2. 論文標題 【腎臓の構成細胞から再考する:基礎と臨床】腎臓を構成する細胞の再生 iPS細胞研究の視点より	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 315-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 山中修一郎, 横尾 隆	4. 巻 12
2. 論文標題 【腎臓再生のup to date】動物の発生ニッチを利用した前駆細胞からの腎臓再生	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 280-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 齋藤弥積, 山中修一郎, 横尾 隆	4. 巻 28
2. 論文標題 腎間質の発生機構と再生	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 発達腎研究会誌	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

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 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 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) 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7件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山中修一郎
2. 発表標題 前駆細胞と異種胎生ニッチが生み出す ハイブリッド腎臓と異種再生医療
3. 学会等名 21回日本再生医療学会総会 シンポジウム12 「3次元臓器再生」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 異種動物の胎内発生ニッチを利用した臓器再生
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、ワークショップ 新たな国民病、慢性腎臓病の病態を分子生物学的に解明する
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 2021026380 実験ことはじめ-you can do it now:ITそれが見えたら研究しよう- 知っておきたいゲノム編集ことはじめ
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 イメージングで視る腎臓の再生 蛍光標識で視るハイブリッド型再生腎臓
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 修一郎
2. 発表標題 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 (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 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 (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 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
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分担執筆、松井賢治、山中修一郎、横尾隆	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 290
3. 書名 ビジュアルアブストラクトで読みとく 腎臓論文ベストセレクション	

〔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
---------	---------