

機関番号：32651

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200018

研究課題名（和文） 医学と工学の癒合による自己幹細胞由来腎臓再生法の実現化

研究課題名（英文） Kidney regeneration using autologous stem cells

研究代表者

横尾 隆 (YOKOO TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70301538

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで発育中の異種胎仔の腎臓発生部位にヒト骨髄由来間葉系幹細胞を注入し、体内で培養することにより腎臓系譜への分化誘導することに成功し、この幹細胞由来腎臓原基をさらにホスト大網内に移植することにより成熟させ尿生成能などの機能を獲得し再生腎臓を樹立した。この成功は3次元構築をもつ臓器そのものの再生の実現化に向けヒト臨床応用につながる可能性を持つ。そこで本研究ではヒト臨床に近づけるためより安全性を高めたスケールアップモデルを検討した。

研究成果の概要（英文）：

Significant advances have been made in stem cell research over the past decade. A number of non-hematopoietic sources of stem cells (or progenitor cells) have been identified including endothelial stem cells and neural stem cells. These discoveries have been a major step towards the potential regeneration of organs for clinical applications using stem cells. The worldwide shortage of donor kidneys means that this approach has garnered significant attention in the field of nephrology. We challenged to use autologous stem cells to build kidney using developmental program of xeno-embryo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
総計	25,300,000	7,590,000	32,890,000

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、異種胎仔

1. 研究開始当初の背景

現在爆発的に増加し続ける腎不全は、長期透析患者に対する著しいQOL制限のみでなく、1兆円を超える透析医療費や、透析患者の介護福祉の負担の拡大が大きな社会問題となっており、透析に代わる次世代の革新的治療法が大いに期待されている。我々はこれまで異種胎仔の発生プロセスを利用し

て、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞より尿生成能を獲得した再生腎臓をラット体内で形成することに成功した。このシステムは、単に幹細胞輸注による軽症腎不全の改善効果を期待するものでなく、構築さえも破壊された末期腎不全患者を救済すべく、透析患者自身から移植可能な機能腎臓を患者体内に樹立するという独創的な観点に立っており、他の腎

臓器再生研究と目的を隔する。

2. 研究の目的

今回さらに安全性を高めるためウイルスに代替するバイオマテリアルを用いた除放システムを開発した。またこれまでのラットの成功を大動物で検証し、よりヒトサイズに近い臓器再生を目指す。

3. 研究の方法

1) ヒト間葉系幹細胞およびマウス iPS 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)は Cambrex Bio Science 社より購入し、3継代以内に使用した。細胞の標識には以前報告したようにレトロウイルスを用いて LacZ 遺伝子を導入した。またマウス iPS 細胞は自治医大花園教授より供与を受けた。

2) 動物

Sprague-Dawley ラットは三協サボサービスより購入し SPF 下に飼育した。またブタは研究分担者の大西が、また実験ネコは研究分担者の上地が所属施設の験動物委員会の承認を得た上で供与して行なった。

3) 温度感受性ポリマーの準備

ポリマーはメビオール社より購入した。以前報告した GDNF 感染用アデノウイルス AxCAhGDNF を用いて COS-1 細胞に糖化 GDNF (生物学的活性を持った) を発現させ、それを回収することにより活性型 GDNF タンパクを得た。フィルターろ過後、1mg/mL に調整し 4℃ のポリマーに溶解し (GDNF ポリマー) 使用まで 37℃ (固型型) で維持した。

4) ELISA

GDNF の発現推移についてはプロメガ社の ELISA kit (GDNF Emax Immunoassay System1) を用いて GDNF 蛋白量を測定した。

5) 発育中ラット胎仔内培養

hMSCs は GDNF 溶解ありとなしのポリマーとともに、または GDNF のみの上清とともに発育中ラット胎仔の腎臓発生部位に注入した (5x10³/embryo)。注入後すぐに全胚培養器 (池本理化 Model RKI10-031) で胎仔発育を継続させ、注入細胞に腎臓発生シグナルを与えた。

6) 後腎器官培養

全胚培養後、後腎組織を単離し 12mm 径 0.4・m Nucleopore filter (コーニング社製) 上で培養した。下層には 20%FBS/DMEM/110mg/L sodium pyruvate を加えた。

7) 全後腎 X-gal 染色および形態観察

発育した後腎組織は 2%PFA で 2 時間固定し detergent buffer で洗浄後、前述の X-gal 染色を行なった。反応後 10%ホルマリンで再固定しパラフィン切片をヘマトキシリン染色して観察した。

8) FACS-Gal assay

発育した後腎組織は 500mL の type 1 collagenase で消化後フィルターを通し蛍光 di-β-D-galacgtopyranoside と反応させた。蛍光染色され LacZ 陽性細胞はフローサイトメーターで計測された。

9) 後腎器官培養

E 1 5 S D ラット胎仔から単離した後腎を 2 層培養皿の上層に置き下層に 20%FCS/DMEM を入れて 5 %CO₂ 環境下で培養した。

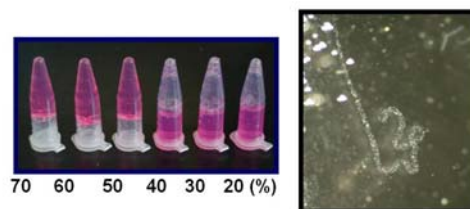
10) 統計解析

データは平均値±SE で示した。統計解析は二群間で two-sample t-test を行い、P<0.05 を統計学的有意差とした。

4. 研究成果

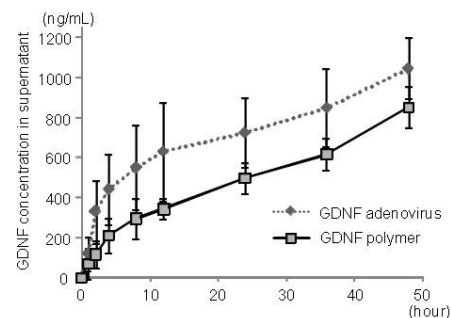
1) 温度感受性ポリマー注入の条件設定

マウスピペットでの細胞注入するためには極力粘性が低いほうがいいため、低温で液化し、高温でゲル化する特性を維持できるもっとも低いゲル溶解濃度の設定を行なった。その結果ゲルを 40%まで希釈しても特性が失われないことが確認されたため、以降この濃度で実験を進めた。



2) 温度感受性ポリマーからの GDNF の放散

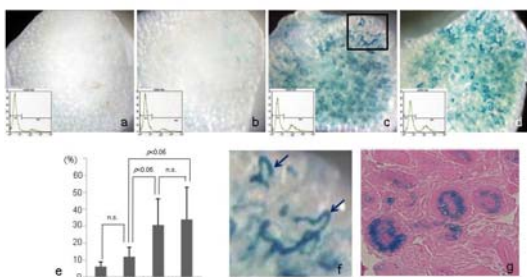
4度で液化した状態のゲルに GDNF 蛋白を溶解した後 37度でゲル化させた。このゲル (GDNF ポリマー) を 24well plate に固層化し、上層に Hank's 液を加え、定期的に回収



し ELISA により GDNF 濃度を測定し、徐々に放散されていくか確認した。下図に示すように時間とともに GDNF は放散した。その動態は GDNF をアデノウイルスで導入した MSCs (GDNF-adenovirus) と有意差はなく、ほぼ同等であった。

3) MSCs から腎臓系譜への分化誘導

上記の結果に基づき、温度感受性ポリマーを用いて MSCs から腎臓系譜への分化誘導が可能か検討した。LacZ 遺伝子導入でラベリングを行なった MSCs を GDNF ポリマーとともに発生中の胎仔の尿管が発芽部位に注入し、48 時間発生を継続させた後、6 日間器官培養を行なった。組織はホルマウント X-gal 染色および FACS-gal アッセイを行なった。FIG. 3 に示すように LacZ 陽性領域 (つまり MSCs 由来領域) が GDNF ポリマーに溶解して注入することにより拡大していた。また、強拡大像より、MSCs は管腔構造を呈していることが示された。

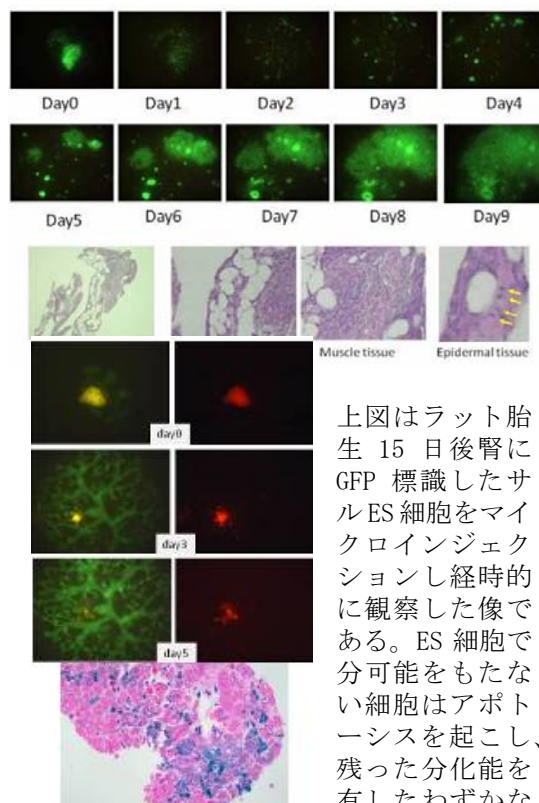


この事象は、温度感受性ポリマーが GDNF の拡散媒体として機能していることを示唆する。温度感受性ポリマーはウイルスの代役をこなし、GDNF を除放することにより腎臓再生を誘導した。このポリマーは温度感受性に液化、ゲル化を繰り返すのみでなく、hMSCs を刺激なしの状態では多分化能を保持し、刺激が加わるとともに分化誘導が可能であることが示されている。また一般に使われる 3 次元培養用のゲルは未知の蛋白や異種蛋白が含まれている場合が多いが、このポリマーは完全に無菌化で化学合成されているため、異種蛋白の影響を全く受けない。このことは臨床応用に向けた安全性評価のうえで大変重要な事実であり、今後更なる有効性安全性を高めることで、ヒト臨床応用に向けたトライアルを進めていくつもりである。

4) 幹細胞分化能の評価方法の開発に成功

現在再生医療に活用する幹細胞として、その分化能の多様性より胚性幹細胞 (ES 細胞) や iPS 細胞が中心になって研究が進められてきた。しかし昨今では、発癌などの危険性や、

樹立までにかかる時間的問題、さらには倫理面での問題が取りざたされている。一方骨髄細胞は間葉系幹細胞、造血幹細胞、内皮幹細胞などが豊富に含まれていることが明らかとなっている。患者自身から採取可能であり、また薬剤により末梢血への動員採取も可能である。3 胚葉系譜へ分化が進んでいるため、ES 細胞や iPS 細胞ほど多分化能を有さない代わりに、発癌の可能性はなく安全性に優れている。我々はこれまで一貫して成人から採取できる骨髄由来幹細胞を用いた腎臓再生システムを開発してきたが、その中でこの“ある程度”腎臓への系譜へ commit した臓器特異的前駆細胞の評価システムを開発した。本方法は、ES 細胞や iPS 細胞という多能性幹細胞が、3 胚葉への分化能を維持していることを迅速に評価する方法である。本来多分化能の維持評価には免疫不全マウスの筋肉内に注入して 3 ヶ月後にテラトーマが出来るかどうかにより評価することが一般的である。しかし本評価法は、時間がかかりすぎるため本プロジェクトにおける臓器前駆細胞の選出には不適である。我々は、ラット胎生 15 日の後腎組織に幹細胞を注入することにより、分化速度が驚異的に加速され、わずか 10 日間で 3 胚葉への分化能の有無を判断できることを発見した。



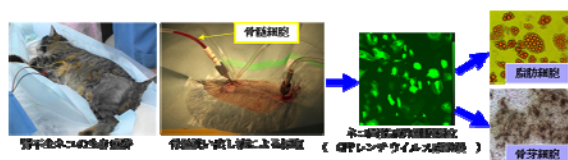
上図はラット胎生 15 日後腎に GFP 標識したサル ES 細胞をマイクロインジェクションし経時的に観察した像である。ES 細胞で分化可能をもたない細胞はアポトーシスを起こし、残った分化能を有したわずかな細胞群が急激に分裂している。この腫瘍の組織像は図に示すようにテラトーマの形成を起こしている。

一方で、間葉系譜に分化したヒト骨髄間葉系

幹細胞を注入した場合、テラトーマの形成は見られず、後腎内に統合される像が認められる。したがってこのシステムは iPS 細胞が 3 胚葉への総てへの分化能を失う条件、もしくは間葉系幹細胞が多分化能を獲得する条件を確認する評価系として活用することが出来る。したがってこの評価系を用いて骨髓細胞より腎臓再生に最も適した腎臓前駆細胞を抽出し供給できる。

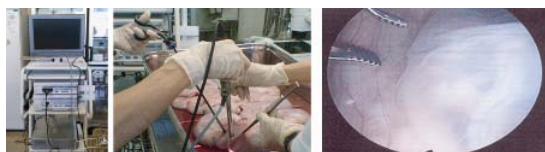
4) ネコMSCの樹立

再生腎臓のスケールアップのため、ブタを用いたネコ腎臓の再生を行う。このためまずネコMSCの樹立を行った。ネコの骨髓細胞採取は、全身麻酔の上骨髄洗い出し法により採取すした。採取したネコ骨髓細胞は脂肪細胞や骨芽細胞へ分化能を有する間葉系幹細胞へ分化させることが可能であった。この細胞はGFPレンチウイルスによりマーキングもできることが確認されている。



5) ブタ胎仔発生プログラム活用のための子宮内細胞注入手技の確立。

ヒト手術用腹腔鏡を用いて妊娠胎仔の観察および既成の把持鉗子を用いて胎仔の保定を試みたが、尿膜につつまれた胎仔を確実に把持することは困難であった。また(上図)。また不安定な固定状況で、既成の注射針(30G)を用いて経子宮壁的に注入を試みたが、胎仔体表で滑ってしまい目的とする腎臓発生部位への注入は不可能であった(下図)。そこで羊水中に浮揚している胎仔を保定する目的で陰圧把持デバイスの開発を今後行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計18件)

1. Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S: Potential use of stem cells for kidney regeneration. International Journal of Nephrology (in press)
2. Matsumoto K, Yokoo T, Yokote S, Kawamura T, Utsunomiya Y, Ohashi T, Hosoya T. Functional development of a transplanted embryonic kidney: Effect of transplantation site. J. Nephrol. (in press)
3. Gheisari Y, Yokoo T, Matsumoto K, Fukui A, Sugimoto N, Ohashi T, Kawamura T, Hosoya T, Kobayashi E. A thermoreversible polymer mediates controlled release of GDNF to enhance kidney regeneration. Artif Organs 34: 317-331, 2010
4. Yokoo T, Kawamura T: Xenobiotic kidney organogenesis -A new avenue for renal transplantation- J. Nephrology 22: 312-317, 2009
5. Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M: Integration of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct in chicken embryos. Biochem Biophys Res Commun 385: 330-335, 2009
6. Yokoo T, Kawamura T, Kobayashi E. Stem cells for kidney repair: Useful tool for acute renal failure? Kidney Int 74: 847-849, 2008
7. 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
8. Yokoo T, Fukui A, Okabe M, Kobayashi E: Stem cells and kidney organogenesis. Frontiers in Bioscience 13: 2814-2832, 2008

〔学会発表〕(計63件)

1. 横尾 隆、松成ひとみ、岩井聡美、松本啓、辻 収彦、岡野James洋尚、岡野栄之、長嶋比呂志、小林英司: ブタをscaffoldとする腎臓再生IV エリスロポエチン産生組織の体内発生法の開発。第10回日本再生医療学会総会 平成23年3月2日 東京
2. 岩井聡美、横尾 隆、松成ひとみ、田中友加、寺岡善布史、大段秀樹、長嶋比呂志、小林英司: ブタをscaffoldとする腎臓再生III, ネコにおける新規エリスロポエチン補充療法の開発。第10回日本再生医療学会総会 平成23年3月1日 東京
3. 松成ひとみ、横尾 隆、岩井聡美、渡邊将人、梅山一大、中野和明、前原美樹、Medin

JA、長嶋比呂志、小林英司：ブタをscaffoldとする腎臓再生III. Suicide geneを発現する遺伝子改変ブタの作出。第10回日本再生医療学会総会 平成23年3月1日 東京

4. 長嶋比呂志、松成ひとみ、横尾 隆、岩井聡美、小林英司：ブタをscaffoldとする腎臓再生I. クローンブタを利用した腎臓原基の発達能の検証。第10回日本再生医療学会総会 平成23年3月1日 東京

5. Matsumoto K, Yokoo T, Yokote S, Kawamura T, Ohashi T, Hosoya T, Tsuji O, Okano JH, Okano H, Kobayashi E. Use of the E2F1 transgenic suicide-inducible mice permit regeneration of completely human kidneys. American Society of Nephrology Renal Week 2010 November 18, 2010 Denver CO, USA

6. Yokote S, Yokoo T, Matsumoto K, Ohkido I, Kawamura T, Hosoya T. Transplantation of metanephros suppresses the vascular calcification in rats with adenine-induced renal failure. American Society of Nephrology Renal Week 2010 November 19, 2010 Denver CO, USA

7. 横尾 隆：教育講演2 腎臓再生による抜本的腎不全治療法の開発。第62回日本泌尿器科学会西日本総会 平成22年11月6日 鹿児島

8. 横尾 隆：特別講演 再生医療と移植医療の融合による抜本的腎不全治療法の開発 第14回北海道移植フォーラム 平成22年7月10日 札幌 北海道

9. 横尾 隆：シンポジウムII 異種組織の適応現象を利用した腎臓再生法の開発 第14回日本適応医学会学術集会 平成22年7月3日 東京

10. 横尾 隆：特別講演II 透析回避を目的とした機能腎臓再生法の開発。第22回小児腎臓病漢方研究会 平成22年7月1日 大阪

11. 横尾 隆：シンポジウム2 臨床応用に向けた腎臓再生。In vivoでの腎臓再生。第53回日本腎臓学会学術総会 平成22年6月16日 神戸

12. Matsumoto K, Yokoo T, Nagashima H, Matsunari H, Iwai S, Yokote S, Hosoya T, Ohashi T, Kobayashi E: Xeno-metanephros can be used as a scaffold of producing host animal's erythropoietin. The 12th Asian Pacific Congress of Nephrology. June 5-8. COEX Korea

13. Yokoo T: MSC and their utility for renal failure. 招待講演 Symposium 08 Acute Kidney Injury: Basic. The 12th Asian Pacific Congress of Nephrology. June 5-8. COEX, Korea.

14. 横尾 隆 特別講演「移植可能な実践的臓器再生法の開発」第22回神奈川移植医学

会 平成22年5月15日 横浜 神奈川

15. 横尾 隆 医学と工学の融合による自己幹細胞由来腎臓再生法の実現化。シンポジウム1 臨床に繋がる再生医療の現状と近未来。日本医工学治療学会 第26回学術大会 平成22年4月3日

16. 横尾 隆、松成ひとみ、岩井聡美、松本啓、長嶋比呂志、小林英司：異種胎仔組織をもしいた再生腎臓誘導法の開発。第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月19日 広島国際会議場 広島

17. 岩井聡美、横尾 隆、杉本直美、松成ひとみ、長嶋比呂志、小林英司：急性腎不全に陥った腎臓への胎仔由来組織の移植効果ーパイオイメージング・ラットを用いた検討。第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月19日 広島国際会議場 広島

18. 杉本直美、横尾 隆、増田茂夫、花園 豊、竹内賢吾、松成ひとみ、長嶋比呂志、土居雅子、小林英司。胎仔腎臓原基の器官培養を利用した幹細胞スクリーニングー手技の仔細と蛍光画像パターンによる分類。第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月19日 広島国際会議場 広島

19. 増田茂夫、杉本直美、竹内賢吾、横尾 隆、小林英司、花園 豊：iPS細胞迅速スクリーニング系としてのラット胎仔メタネフロン器官培養の可能性。第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月18日 広島国際会議場 広島

20. Yokoo T. de novo organogenesis using mesenchymal stem cells. Japan-Israel Workshop on Stem cells February 23rd 2010 Haifa Israel

21. 横尾 隆：「再生」 シンポジウム1：代替治療の問題点と未来治療 第10回腎不全病態治療研究会 平成21年12月12日 東京

22. 横尾 隆：ここまできた腎臓再生医療 第30回動物臨床医学会記念年次大会 腎泌尿器分科会セミナー 平成21年11月20-22日 大阪国際会議場

23. Yokoo T, Matsumoto K, Nagashima H, Matsunari H, Iwai S, Hosoya T, Kobayashi E. Creation of EPO producing tissue using Xeno-metanephros as a biocompetent scaffold in a bigger animal model for the clinical application. American Society of Nephrology Renal Week 2009, October 27-November 1, San Diego CA USA

24. Yokoo T, Nagashima H, Matsunari H, Iwai S, Hosoya T, Kobayashi E: Xeno-metanephros as a biocompetent scaffold for kidney regeneration. IPTA-IXA 2009, 12-16th October Venice Italy

25. 横尾 隆：ブタ胎仔発生系を用いた分化による臓器（腎・肝・膵）形成プロジェクト

の提案。J S T 「安全なiPS細胞を用いた創薬・診断・再生医療の実現に向けて」ワークショップ。平成21年5月27日 東京

26. Yokoo T, Matsunari H, Nagashima H, Iwai S, Matsumoto K, Fukui A, Kawamura T, Hosoya T, Kobayashi E. Kidney regeneration from mesenchymal stem cells using xeno-metanephros as a biocompetent scaffold. World Congress of Nephrology May 22-26th 2009, Milan Italy.

27. Matsumoto K, Yokoo T, Fukui A, Tawamura T, Kobayashi E, Ohashi T, Hosoya T. Physiological renin production from xeno-metanephros transplanted in the paraaortic area. World Congress of Nephrology May 23rd 2009, Milan Italy.

28. Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M. Human mesenchymal stem cells can differentiate into the wolffian duct cells in chicken embryos. World Congress of Nephrology May 23rd 2009, Milan Italy.

29. 横尾 隆：ブタ胎児を用いたヒト腎臓再生法の開発 特別講演II 第12回日本異種移植研究会 平成21年3月7日 鹿児島

30. 横尾 隆、小林英司：腎臓の再生。シンポジウム13 「移植医療と再生医療①」第8回日本再生医療学会総会 平成21年3月6日 東京

31. 横尾 隆、岩井聡美、長嶋比呂志、松成ひとみ、遠藤 薫、上地正美、小林英司：ブタ後腎組織を足場とした自己骨髄由来腎臓再生法の開発。第8回日本再生医療学会総会

32. 横尾 隆：透析回避に向けた腎臓再生医療の最前線。第38回近畿小児腎臓病研究会 11月29日 大阪

33. Yokoo T: Advancement in Regenerative Medicine and Stem cell Applications: Kidney Regeneration. 6th Asia Pacific Cord Blood Bank Consortium. November 14, 2008 Tokyo Japan

34. Yokoo T: Closing remarks at Basic and Clinical Science Symposium “Bone marrow-derived cells and kidney diseases”. American Society of Nephrology 2008 Renal Week November 5, 2008 Philadelphia USA

35. 横尾 隆：腎臓をつくろう シンポジウム12 挑戦！ー移植可能な臓器を作る 第44回日本移植学会総会 平成20年9月21日 大阪

36. Yokoo T: Kidney regeneration by xeno-embryonic nephrogenesis. KIDSTEM International Conference 17th-19th September 2008 Liverpool UK

37. Kotaro Kai, Takashi Yokoo, Takashi

Murakami, Satoshi Teraoka, Eiji Kobayashi. Renal organogenesis across the mouse to rat xenogenic barrier under the tacrolimus monotherapy. 22nd International Congress of the Transplantation Society 10-14 August 2008 Sydney Australia

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

39. 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

〔図書〕(計5件)

1. Yokoo T, Yanagita M: Stem cell therapy against oxidative stress and hypoxia. in *Oxidative Stress in Basic Research and Clinical Practice* (edited by Miyata T, Echardt K-U, Nangaku M) 673-687, 2011 Springer New York, USA

2. Yokoo T, Fukui A, Kawamura T, Kobayashi E. Chapter 4: Kidney development and regeneration in Stem cell: organogenesis and cancer (edited by Shree Ram Singh) p57-75 Research Signpost Press, Karala, India

3. 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) pp379-390 Humana Press INC., NJ USA

〔その他〕

ホームページ等

URL: 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・講師

研究者番号：70301538

(2) 研究分担者

上地 正実 (UECHI MASAMI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90296426

大西 彰 (OONISHI AKIRA)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子

組換え家畜センター・副研究主幹

研究者番号：30414890