

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591042

研究課題名（和文） 異種胎仔の後腎組織を足場としたヒト腎臓再生法の開発

研究課題名（英文） Kidney regeneration using xeno-metanephros as a scaffold

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）：

我々は将来的にヒト臨床応用可能な腎臓再生を目指しているが、本申請研究ではその基盤研究として、マウスおよびラットを用いた小動物のエリスロポエチン（EPO）産生組織を新規発生させる事を目的とした。つまり①発達過程にある胎仔の後腎を移植する小動物モデルを用いて、異種動物間移植での EPO 産生組織の再生が可能であるか検討し、②ラットおよびマウスを用いた EPO 産生組織再生医療の基盤研究を行い、③自殺誘導遺伝子（ER-E2F1）搭載トランスジェニックマウスの後腎を足場として用いることにより、EPO 産生細胞・組織が発達継続する過程において不必要となる異種部分を排除し、目的とする EPO 産生組織再生させた。

研究成果の概要（英文）：

We established xenotransplantation models that control endogenous mesenchymal stem cell (MSC) differentiation into mature erythropoietin (EPO)-producing tissue in a niche provided by a developing xenometanephros. Transplantation of rat metanephroi into mouse omentum, and similarly pig metanephroi into cat omentum, led to the recruitment of host cells and EPO production. EPO-expressing cells were not differentiated from integrating vessels because they did not co-express endothelial markers (Tie-2 and VE-cadherin). Instead, EPO-expressing cells were shown to be derived from circulating host cells, as shown by EGFP expression in the grown transplants of chimeric mice bearing bone marrow from a transgenic mouse expressing EGFP under the control of the EPO promoter. These results suggest that donor cell recruitment and differentiation in a xenotransplanted developing organ may be consistent between species. Using metanephroi from transgenic ER/E2F1 suicide-inducible mice, the xeno-tissue component could be eliminated, leaving autologous EPO-producing tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：腎臓再生、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓は透析によりとりあえずの延命が可能であるため、死亡に直結せず研究の緊急度、要求度が低いと認知されていた。しかし現実には腎臓の問題は非常に深刻であり、高齢化や糖尿病の増加により爆発的に増え続ける透析患者に対応する医療費が底をつき、透析医療は行き詰まった医療経済の最大の課題になっており、このままでは破綻が避けられない状況である。さらに腎臓は患うと回復が非常に難しいうえに、昔に加えて寿命も延びているので、そのぶん患者も苦しむ時間が長くなっている。すでに患者の忍耐も医療経済も限界を迎えている状態にあるのだ。その中で近年注目を集める夢の治療法としての再生医療の腎臓への適応が期待されたが、実際には腎臓はその構造の複雑性のためもっとも再生が難しい（つまり不可能である）臓器とされてその再生は悲観的に捉えられてきた。しかし最近の目覚ましい再生医療研究の応用により少しずつではあるが希望の光が差し始めてきた。

## 2. 研究の目的

近年、発生段階の腎臓である‘後腎’を異種宿主動物内に移植することにより、機能的腎臓の発生継続が可能であるという報告がなされており、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注目されている。また、動物実験において後腎移植を行う事によって、ホス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。

現在ヒト臨床において腎性貧血に対する治療ではエリスロポエチン（EPO）製剤を定期的に投与する必要があるが、EPO製剤はとても高価な薬剤であり、たとえば維持透析患者に投与するEPO製剤の投与コストは患者1人当たり一年間で80万円近く

にもなり、EPO産生組織を再生することが可能となれば、これらの医療コストを大幅に削減することも実現可能と考えられる。

## 3. 研究の方法

ラットにマウス後腎を移植し、免疫抑制剤（FK506）投与下に発生を継続させる。発育した後腎のEPO産生能を血清のELISA法および、抽出mRNAのqPCRによって反定量化して確認する。またEPOがホスト由来か、ドナー由来かを種特異的プライマーを用いて確認する。さらに骨髄移植実験により骨髄由来か迷入血管内皮由来かを確認する。

## 4. 研究成果

発達過程にある胎仔の後腎を移植するラット・マウス小動物モデルを用いて、①異種動物間移植をおこなった後腎においてもEPO産生能を維持しており、またそのEPO産生細胞の起源は後腎ドナーの動物種ではなく、レシピエント動物種が起源である事を示した。②Tie2-EGFPマウス、VEcad-EGFPマウスなど、血管内皮にEGFPを発現するマウスを作成し、それらマウスの骨髄を移植した‘骨髄のみトランスジェニック’となった骨髄移植後マウスをレシピエント動物とし、Wildマウスの胎仔後腎をレシピエント動物大網部に移植し、発達継続させてEPO産生細胞がレシピエントの骨髄由来であるか、血管内皮細胞由来であるかを検討し、その結果、骨髄を起源としている事を示し、さらにその細胞は間葉系幹細胞（MSC）を起源としている可能性がある事を示した。③自殺誘導遺伝子（ER-E2F1）搭載トランスジェニックマウスの後腎を足場として用いることにより、EPO産生細胞・組織が発達継続する過程において不必要となる異種部分を排除し、目的とする動物種のEPO産生組織を再生さ

せる事が可能であることを証明した。

将来的にヒト臨床応用可能な自己細胞由来の EPO 産生組織の再生を目指しているが、その基盤研究として、マウスおよびラットを用いた小動物の EPO 産生組織を生体内で長期維持させる事を目的として更なる検討を行っている。

#### 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 19 件)

1. Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, Iwai S, Yokote S, Teratani T, Gheisari Y, Tsuji O, Okano H, Utsunomiya Y, Hosoya T, Okano HJ, Nagashima H, Kobayashi E. Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* 30: 1228-1235, 2012
2. Yokote S, Yamanaka S, Yokoo T: de novo kidney regeneration by using stem cells. "Toward personalized cell therapies by using stem cells" *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. (in press)
3. Kanzaki G, Tsuboi N, Miyazaki Y, Yokoo T, Utsunomiya Y, Hosoya T. Diffuse tubulointerstitial nephritis accompanied by renal crystal formation in an HIV-infected patient undergoing highly active antiretroviral therapy. *Intern. Med.* 51: 1543-1548, 2012
4. Masuda S, Yokoo T, Sugimoto N, Doi M, Fujishiro S, Takeuchi K, Kobayashi E, and Hanazono Y. A simplified in vitro teratoma assay for pluripotent stem cells injected into rodent fetal organs. *Cell Med.* 3; 103-112, 2012
5. Yokote S, Yokoo T. Stem cells in kidney regeneration. Special issue: Stem cells, regenerative medicine, and cancer. (guest editors: Singh SR and Hoffman W) *Current Medical Chemistry* 19; 6009-6017, 2012
6. Okabe M, Tsuboi N, Yokoo T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Hosoya T. A case of idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis with a transient glomerular deposition of nephritis-associated plasmin receptor antigen. *Clin Exp Nephrol* 16: 337-341, 2012
7. Yokote S, Yokoo T, Matsumoto K, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T. The effect of metanephros transplantation on blood pressure in anephric rats with induced acute hypotension. *Nephrol Dial Transpl* 9; 3449-3455, 2012

8. Iwai S, Kikuchi T, Kasahara N, Teratani T, Yokoo T, Sakonju I, Okano S, Kobayashi E. Impact of normothermic preservation by tehextracellular type solution containing with trehalose on rat kidney grafting from a cardiac death donor. *PlosOne* 7(3) e33157, 2012

9. Yokote S, Yokoo T, Matsumoto K, Ohkido I, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T: Metanephros transplantation prevents the progression of vascular calcification in rats with adenine-induced renal failure. *Nephron Experimental Nephrology* 120: e32-40, 2012

10. Matsumoto K, Yokoo T, Yokote S, Utsunomiya Y, Ohashi T, Hosoya T. Functional development of a transplanted embryonic kidney: Effect of transplantation site. *J. Nephrol.* 25: 50-55, 2012

11. Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S: Potential use of stem cells for kidney regeneration. *International Journal of Nephrology* 2011: 1-9, 2011

12. Okabe M, Tsuboi N, Suzuki T, Yokoo T, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Ohno I, Hosoya T. A case of slowly progressive scleroderma kidney. *Clin Exp Nephrol* 15:430-433, 2011

13. Tokuda M, Yamane T, Matsuo S, Ito K, Marui R, Hioki M, Tanigawa S, Nakane T, Yamashita S, Inada K, Shibayama K, Miyanaga S, Yoshida H, Miyazaki H, Date T, Yokoo T, Yoshimura M: Relationship between renal function and the risk of recurrent atrial fibrillation following catheter ablation. *Heart* 97(2) 137-142, 2011

14. 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

15. Yokoo T, Kawamura T: Xenobiotic kidney organogenesis –A new avenue for renal transplantation- *J. Nephrology* 22: 312-317, 2009

16. 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

[学会発表] (計 59 件)

1. 横尾 隆 : 知ってください! 慢性腎臓病 (CKD) ~早期発見から再生医療まで~ 第 24 回腎臓病を考える都民の集い 平成 25 年 3 月 17 日 東京
2. 横尾 隆 : 透析会費の為の腎臓再生の実現化に向けて -本当に透析はやめられるのか- 平成 24 年度千葉県医師会委託研修会 平成 25 年 2 月 20 日 柏 千葉

3. 横尾 隆：臓器再生研究の現状と未来 - 成体幹細胞由来腎臓再生技術の開発- 第8回久留米 Young Investigators Meeting 平成25年2月4日 久留米市 福岡
4. 横尾 隆：成体幹細胞由来腎臓再生法の開発。第16回循環器再生医療研究会 平成24年11月17日 東京
5. 横尾 隆：発生プログラムを利用した臓器再生法の開発 -CKD 治療の抜本的改革をめざして- 山梨腎再生医学研究会 平成24年10月4日 山梨
6. Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S, Yamana S, Izuhara Y, Hosoya T: Kidney regeneration using the embryonic niche for nephrogenesis. Asia-Pacific Kidney Development Workshop. 21<sup>st</sup> September, Adelaide, Australia.
7. 横尾 隆：腎臓の再生に挑む。シンポジウム17 器官・臓器の再生医療をめざす！第12回日本抗加齢医学会総会 平成24年6月23日 横浜
8. 横尾 隆、横手伸也、松本 啓、山田哲史、寺谷 工、小林英司、岡野 James 洋尚、細谷龍男：胎生組織ニッチ法による成体幹細胞誘導型臓器再生技術の開発。第1回日本再生医療学会総会 平成24年6月12日 横浜
9. Takashi Yokoo, Kei Matsumoto, Shinya Yokote, Tatsuo Hosoya: Generation of erythropoietin-producing host tissue by transplantation of a developing embryonic kidney scaffold. RENAL DISCOVERIES Extramural Grant Winner's Poster Session Meeting. November 10, 2011 Philadelphia, USA
10. 横尾 隆：腎臓再生医療の現状と期待。第1回県央CKDフォーラム 平成23年10月6日 海老名 神奈川
11. 横尾 隆：腎再生医学の現状と展望。第58回香川腎疾患談話会 平成23年9月17日 高松 香川
12. 横尾 隆：特別講演 I「臓器再生医療の最前線」第6回四谷 Medical Forum 平成23年7月22日 東京
13. 横尾 隆：エリスロポエチン産生細胞の Cell biology と Therapeutic utility. ワークショップ3：腎臓の線維化と再生を担う細胞群を探る 第54回日本腎臓学会学術総会 平成23年6月15日 横浜 神奈川
14. 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 東京
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. Takashi Yokoo: MSC and their utility for renal failure. 招待講演 Symposium 08 Acute Kidney Injury: Basic. The 12<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology. June 5-8. COEX, Korea.
20. 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
21. 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
22. 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
23. Takashi Yokoo: de novo organogenesis using mesenchymal stem cells. Japan-Israel Workshop on Stem cells February 23<sup>rd</sup> 2010 Haifa Israel
24. 横尾 隆：透析回避を目指した実践的腎臓再生法の開発研究-医工学との融合によるさらなる発展を目指して-「第4回モノづくり連携大賞」受賞記念シンポジウム 平成21年12月21日 郡山
25. 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
26. 横尾 隆：ここまでの腎臓再生医療 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
27. Takashi Yokoo, Kei Matsumoto, Hiroshi Nagashima, Hitomi Matsunari, Satomi, Iwai, Tatsuo Hosoya, Eiji Kobayashi. 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

28. Takashi Yokoo, Hiroshi Nagashima, Hitomi Matsunari, Satomi Iwai, Tatsuo Hosoya, Eiji Kobayashi: Xeno-metanephros as a biocompetent scaffold for kidney regeneration. IPTA-IXA 2009, 12-16<sup>th</sup> October Venice Italy

29. 横尾 隆：腎再生医療最前線。腎再生セミナー 平成21年9月28日 つくば市 栃木

30. 横尾 隆：腎疾患の治療最前線。第一回 ATAGO associate conference 平成21年7月17日 東京

31. 横尾 隆：医獣連携による腎臓再生法の開発研究。第1回医学獣医学ジョイントカンファレンス 平成21年7月6日 十和田 青森

32. 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。JST「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

33. 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 22-26<sup>th</sup> 2009, Milan Italy.

34. 横尾 隆：複雑な構造を持つ臓器の再生法の開発。発生工学の最先端：第一回バイオ・ナノテクフォーラム イブニングセミナー21 平成21年4月27日 東京

〔図書〕（計6件）

1. 横尾 隆：移植可能な腎臓再生。再生医療叢書（全8巻）日本再生医療学会監修 第5巻 代謝系臓器（後藤満一、大橋一夫編集）朝倉書店 東京(in press)

2. 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

3. 横尾 隆：再生医療による腎臓の作製 in 腎不全ハンドブック-CKD から先端透析療法：up to data-（監修・編集：斉藤明）pp. 302-303 医薬ジャーナル社 大阪

4. 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

5. 横尾 隆：腎臓疾患関連の遺伝子多型・遺伝子治療 in 腎臓病ゴールデンハンドブック（栗山哲 編集） 213-219 南江堂

6. 横尾 隆：二次性糸球体腎症 in 薬学生ののための新臨床医学—症候および疾患とその治療（市田公美、細山田真 編集） 574-578 廣川書店

〔産業財産権〕  
なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<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・講師  
研究者番号：70301538

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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・研究副主幹  
研究者番号：30414890