

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461235

研究課題名(和文)胎生組織ニッチ法による生体幹細胞誘導型臓器再生手技の開発

研究課題名(英文)Kidney regeneration using organogenic niche in growing xeno-embryo

研究代表者

横尾 隆 (Yokoo, Takashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70301538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで自己間葉系幹細胞を発生中の異種胎仔の腎臓発生ニッチに注入することにより尿生成能を獲得した再生腎臓の作成に成功している。しかしこの再生腎臓は尿路がないため尿生成量が多くなるにつれ水腎症に陥り、約4週後から徐々に腎機能が廃絶してしまう。そこで今回再生腎臓が生成した尿を効率良く排泄させる経路の開発を行った。ラット尿管原基とともに尿排泄腔ごと後腎組織(クローアカグラフト)を移植し、尿排泄腔に尿の貯留が認められる4週後に自己尿管を接続した。これにより4週後も水腎症が生じることなく尿排泄が継続し、8週後後には自尿の30%までクレアチニン、BUNを濃縮するまでの機能を獲得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：First, we transplanted metanephroi (MN) between cloned pig fetuses and gilts; they grew to about 3 cm and produced urine, although hydronephrosis was eventually observed because of the lack of an excretion pathway. Second, we demonstrated the construction of urine excretion pathways in rats. Rat MN or MN with bladders (CLs) were transplanted into host rats. Then, we connected the host animal's ureter to the developed CL bladder, a technique called the stepwise peristaltic ureter (SWPU) system. The application of the SWPU system avoided hydronephrosis and permitted the CLs to differentiate well, with CL urine being persistently excreted through the recipient ureter. This is the first report showing that the SWPU system may resolve two important problems in the generation of kidneys from stem cells: construction of a urine excretion pathway and continued growth of the newly generated kidney.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎臓再生 臓器ニッチ 幹細胞 尿路形成

1. 研究開始当初の背景

再生医療は次世代の夢の治療法として現在非常に注目されているが、腎臓への適応は難しいと考えられてきた。つまり腎臓のような実質臓器機能を発揮するためには複雑な三次構造を再現した組織を再生する必要があり、他の解剖学的に単純な臓器と比較し再生医療の臨床応用はハードルが遥かに高いとされている。しかし現在、慢性腎臓病(CKD)患者数は1330万人とされ、成人の8人に1人はCKDであり「**新たな国民病**」とされている。CKDの進行による透析導入患者数は飛躍的に伸びており、患者負担のみならず透析にかかわる莫大な医療費の増大は**新たな社会問題**となっており透析回避法は急務となっている。その中で我々はこれまで腎臓再生医療の実現化に向けた挑戦を続けてきた。その基本ストラテジーは、我々が胎生期に持っていた腎臓を作るプログラムを用いて幹細胞から機能腎臓を再生するというものである。つまり本研究は生体内で“**迷い子**”となる自己骨髄由来の内因性および外来性(輸注した)幹細胞に**再生の場(ニッチ)**を与えることにより、その微細環境で臓器になるシグナルを受けて能動的に臓器に分化誘導させるという画期的な方法であり、これまでの再生研究と一線を画す独創性をもち、これらの成功により**腎疾患治療概念の新世代を提唱**できると考える。さらに本提案の新規性として、従来の異種移植とは異なり、「異種」であるブタの胎仔臓器を一時的に利用して、患者自らの細胞由来腎臓を再生させるため拒絶反応が生じず、また一時的に利用した異種組織は不要時に排除するシステムの導入により、異種組織と共存する必要がなくなり精神的負担が軽減される。それによって、期待されながらも進んでいない、ブタの移植医療応用を妨げていた技術的課題を解決する。

今回着目した造血ホルモンであるEPOは腎性貧血で保険適応となっているが、貧血のない早期CKDでもその進行を遅らせることが多くの研究からわかってきている。しかし非常に高価な薬剤であり、また常用量で月1回以上の頻回注射継続が必要となるため、患者自己負担および医療費削減の観点からCKDの進行抑制という目的での投与することは難しい。そこでより安価なEPO補充による負担の少ないCKD進行抑制法の開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

我々はこれまで自己間葉系幹細胞を発生中の異種胎仔の腎臓発生ニッチに注入することにより腎臓系譜に分化させ尿生成能を獲得した再生腎臓の作成に成功し、この方法は胎生臓器ニッチ法と名付けた。同法は外来のヒト骨髄間葉系幹細胞を中腎管の発芽する部位に注入し、成長するラット胎仔内で培養することで、発生段階と全く同じ環境下に置き、腎臓発生時の各種因子のプログラムと全く同様の刺激を与え、ネフロンまで分化させる方法を開発した。このヒト間葉系幹細胞由来ネフロンは、ヒト腎臓特異的遺伝子群を発現していることは確認されている(Yokoo et al PNAS 2005)。このヒトMSC由来腎臓原基をラットの大網内に移植したところ、尿生成能を獲得したヒト間葉系幹細胞由来再生腎臓(neo-kidney)の樹立が可能であることが示された(J Am Soc Nephrol 2006)。さらにはこの再生臓器は内分泌機能も獲得していることが判明した(Transplantation, 2008)。同法により複雑な構造・機能を持つ三次元臓器の再生が現実味を持ち始めた。しかしこの再生腎臓は尿路がないため尿生成量が多くなるにつれ水腎症に陥り、約4週後から徐々に腎機能が廃絶してしまうことが問題となっていた。そこで今回再生腎臓が生成した尿を効率良く排泄させる経路の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) クロウンブタを用いた自家後腎移植

移植による免疫拒絶の影響を完全に排除するために、クロウンブタを作成しこの胎仔後腎を母体大網に移植した。クロウンブタ同士であるため、子から母への移植であるが自家移植となる。5週後に再度開腹し尿生成量、腎機能(再生腎臓からの尿中クレアチニン、BUN測定)、重量から成熟度を評価する。

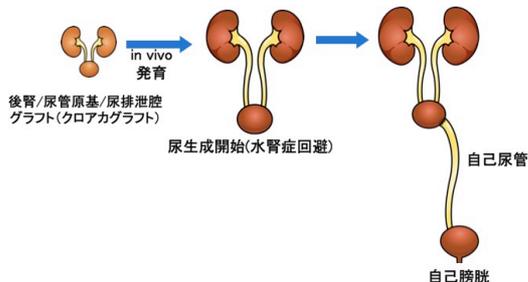
(2) ラット後腎移植とクロアカグラフト移植の比較

発生過程に尿管原基は後腎が生成する尿量に応じた蠕動運動を開始することが報告されており、これにより後腎の成長がさらに促されることが想定された。この現象が移植再生腎臓の環境でも当てはまるか検討するため、ラットを用いて尿管原基と尿排泄腔ごと後腎(クロアカグラフト)を移植し、後腎単体で移植した場合と比較した。

(3) SWPU システムの開発

クロアカグラフト移植により4週まで水腎症を起こさず後腎がほぼ正常に発育することが確認されたため、4週の段階で尿排泄腔に貯留した再生腎臓からの尿を自己尿管と接続することにより自己膀胱に導くことで途中から自己の尿排泄系を利用できない

か検討した。つまり移植後腎が生成した尿は中継地点となる尿排泄腔まで尿管原基による小さな蠕動運動にて能動的に移動し、尿排泄腔からは自己尿管による大きな蠕動運動により自己膀胱に導かれる。このような段階的蠕動運動機能をもった排泄系 (SWPU システム : Stepwise peristaltic ureter system 次図) を試行した



4. 研究成果

(1) クローンブタを用いた自家後腎移植

クローンブタ胎仔から採取した後腎を母体後腎に移植し5週後に回復したところ、移植後腎は約30グラムまで成長し尿の生成が確認されたが、組織学的検討では著しい水腎症で皮質が非薄し線維化が進行していることが確認された(図1)。したがって拒絶がない状態でも5週以上再生腎臓の機能維持が難しいことが示され、効率良い尿排泄系が必要であることが示された。

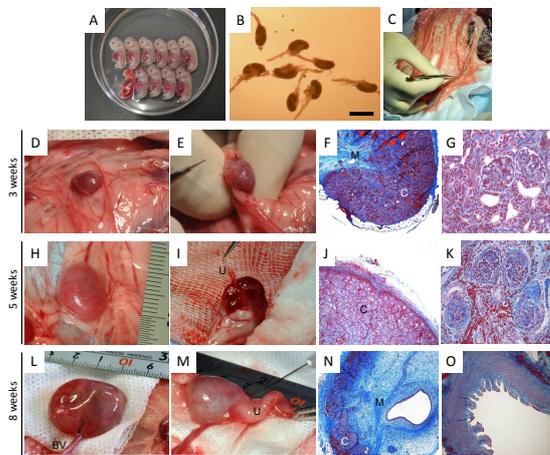


図1: クローンブタを用いた自家後腎移植: (A) E30のクローンブタ胎仔、(B)胎仔から採取した後腎組織、(C)母体大網への自家移植手技、(D, E)移植3週間後の移植片。約5mm程度に成熟している。(F, G)同移植片の組織像。成熟した糸球体、尿管が確認できる。(H, I)移植5週間後の移植片と尿管。1cm以上に発育しているのが確認される。(J, K)同移植片の組織像。糸球体構造は保たれているが間質の鬱血が目立つ。(L, M)移植8週後の移植片と尿管。水腎症、尿管が始まっている。(N, O)同移植片の組織像。皮質の菲薄化と間質の線維化が認められ、機能が廃絶していることが確認される。

(2) ラット後腎移植とクロアカグラフト移植の比較後腎単体とクロアカグラフトを移植し4週間後、クロアカグラフトは後腎と比べて重量に有意差は認められなかった。しかし組織学的検討では後腎移植では3週目から尿管の拡張が始まり4週にかけて拡大していくが、クロアカグラフトでは尿管拡張は4週目でも認められなかった。間質線維化および糸球体数減少も有意差をもってクロアカグラフトが軽度であり腎機能が保持されていることが確認された。さらに排泄尿はクロアカをリザーバーとして貯留できるため尿量に有意差を持って多いことが示された。しかし、5週後には徐々に水腎症となることが明らかとなり、尿排泄腔の容量の許容範囲を超えないうちにさらに尿排泄させる必要があることが示された(図2)。

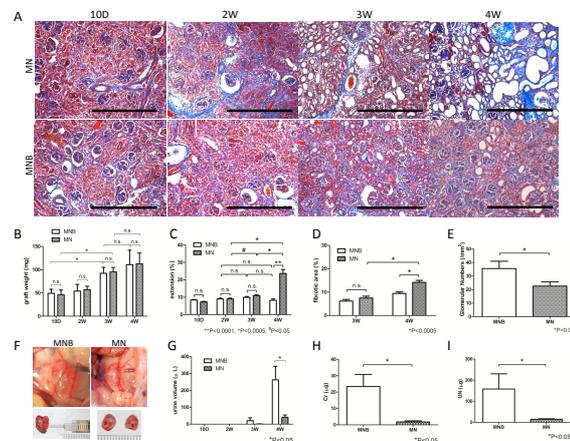


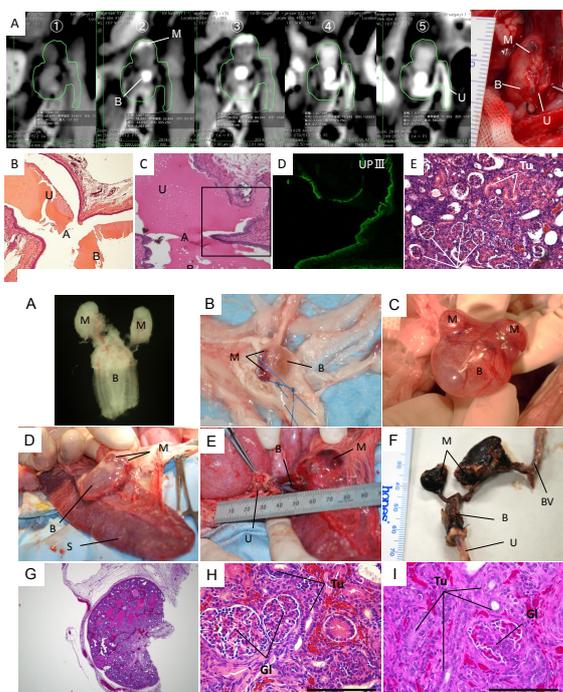
図2: ラットにおける後腎移植と黒赤移植の比較。(A)ラット大網に後腎(NM)とクロアカグラフトを移植し、10日後、2週間後、3週間後、4週間後の組織像。尿管の拡張、間質の線維化は後腎移植の方が目立ち、また糸球体数も著明に低下している。(B)重量の比較では有意差を認めない。(C)尿管の拡張は後腎移植にのみ4週目から認める。(D)間質線維化は後腎移植で著明であった。(E)糸球体数は後腎移植で著明に低下していた。(F)両者の肉眼像。クロアカグラフト移植の方が成熟していることが確認される。(G)尿量もクロアカグラフトの方が著明に多い。(H, I)尿中クレアチニン、UNもクロアカグラフトからの尿の方が濃縮されていることがわかる。以上より、尿管原基及び尿排泄腔と共に移植することにより、後腎の成熟を促すことができることがわかる。

(3) SWPU システムの開発

段階的蠕動運動昨日を持った排泄系 (SWPU システム) を樹立し再生腎臓からの尿を自己膀胱に導いたところ、後腎は水腎症を形成することなく、また生成された尿は効率良く体外に排泄されることが確認された。造影剤を用いたCT scanでも血液中の造影剤が成熟した後腎組織を介して尿路に排泄される像が

確認された。移植8週後のクローアグラフトから排泄された尿を回収しBUNおよびクレアチニン濃度を測定し自己尿と比較したところ、自己尿の30%を超える濃度であることが確認された。このため自己腎臓を摘出したところ生命予後の改善効果があることも確認された。

図3: SWPU システムによる尿路確保の確認。(A)造影剤を用いたCTスキャン像。造影剤がクローアグラフトから自己尿管に流出していることが確認される。(B, C)尿排泄腔と自己尿管の吻合部の組織像。開口が維持されているのが確認される。(D)同部位のuroplakin III染色像。移行上皮が連続しているのが確認される。(E)移植8週後の移植片の組織像。成熟した腎組織が確認される。(F, G)移植4週、8週後の尿中UNとクレアチニン濃度。自己尿の約30%の濃度まで濃縮されている。(H)自己腎臓摘出後の生存曲線。SWPU システムでクローアグラフトを移植した場合、生命



予後を改善できることが証明された。

さらにこの SWPU システムが大型動物でも機能するか確認するために、クローンブタのクローアグラフトを母体に移植したところ、後腎移植に比較し大きく成熟し組織学的にも水腎症を回避できていることが確認された(図4)。

図4: クローンブタを用いた SWPU システムの検証。(A) E30 のクローンブタから採取したクローアグラフト。(B)母体大網に移植後3週間の移植片。(C)同5週後の移植片。二つの後腎とその中央に尿を含んだ尿排泄腔が確認できる。(D, E)移植後4週で尿排泄腔と自

己尿管を吻合した。(F)吻合1日後血行が確認される。(G, H)吻合4週目の組織像。成熟した糸球体、尿細管が確認できる。

本法は再生腎臓の尿排泄系として他のシステムで再生された腎臓にも活用可能であり汎用性が高いと考えられ、腎臓再生医療の臨床応用に向けて一つの課題を克服できたと考えられる

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 11 件)

①Yokote S, Yokoo T, Organogenesis for kidney regeneration, *Current Opinion in Organ Transplantation*, Vol. 18, No. 2, 2013, pp. 186-90

DOI: 1097/MOT.0b013e32835f070d

②Iwai S, Sakonju I, Okano S, Teratani T, Kasahara N, Yokote S, Yokoo T, Kobayash E, Impact of ex vivo administration of mesenchymal stem cells on the function of kidney grafts from cardiac death donors in rat, *Transplant Proc*, Vol. 46, No. 5, 2014, pp. 1578-84

DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.12.068.

③Yokoo T, Kidney regeneration with stem cells: an overview, *Nephron Exp Nephrol*, Vol. 126, No. 2, 2014, pp. 54-8

DOI: 10.1159/000360662.

④Xinalis C, Yokoo T, Reforming the Kidney Starting with a single-cell suspension, *Nephron Exp Nephrol*, Vol. 126, No. 2, 2014, pp. 107-12

DOI: 10.1159/000360682.

⑤Izuhara L, Tatsumi N, Miyagawa S, Iwai S, Watanabe M, Yamanaka S, Katsuoka Y, Nagashima H, Okano HJ, Yokoo T, Generation of a feline swine endothelial cell line by expression of feline

decay-accelerating factor, *PLoS One*, Vol. 10, No. 2, 2015, pp. e0117682

DOI: 10.1371/journal.pone.0117682.

⑥Yokote S, Matsunari H, Iwai S, Yamanaka S, Uchikura A, Fujimoto E, Matsumoto K, Nagashima H, Kobayashi E, Yokoo T. Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 112, No. 42, 2015, pp. 12980-5

DOI: 10.1073/pnas.1507803112.

⑦Xinaris C, Benedetti V, Novelli R, Abbate M, Rizzo P, Conti S, Tomasoni S, Corna D, Pozzobon M, Cavallotti D, Yokoo T, Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Functional Human Podocytes Generated in Organoids from Amniotic Fluid Stem Cells,

J Am Soc Nephrol, 2015, Epub ahead of print
DOI: 10.1681/ASN.2015030316.

⑧Bussolati B, Maeshima A, Peti-Peterdi J, Yokoo T, Lasagni L, Renal Stem Cells, Tissue Regeneration, and Stem Cell Therapies for Renal Diseases, Stem Cells Int, Vol.2015:302792, 2015, DOI: 10.1155/2015/302792.

⑨Fukui A, Yokoo T, Kidney regeneration using developing xenoembryo, Curr Opin Organ Transplant, Vol. 20, No. 2, 2015, pp.160-4
DOI: 10.1097/MOT.0000000000000176.

⑩Yamanaka S, Yokoo T, Current Bioengineering Methods for Whole Kidney Regeneration, Stem Cells International, Article ID 724047, 2015
DOI:10.1155/2015/724047.

⑪Katsuoka Y, Ohta H, Fujimoto E, Izuhara L, Yokote S, Kurihara S, Yamanaka S, Tajiri S, Chikaraish T, Okano HJ, Yokoo T, Intra-arterial catheter system to repeatedly deliver mesenchymal stem cells in a rat renal failure model, Clin Exp Nephrol, Vol.20, No.2, 2016, pp.169-77
DOI:10.1007/s10157-015-1161-8.

[学会発表] (計 10 件)

①横尾 隆、幹細胞・再生、第56回日本腎臓学会学術総会、2013年5月10日、東京国際フォーラム

②Fukui A, Matsumoto K, Yokoo T, Differentiation of human mesenchymal stem cells into the ureteric bud in chicken embryos, ISN FOREFRONTS SYMPOSIUM2013, Sep. 2013, Florence

③Yokote S, Yamada A, Yamanaka S, Izuhara L, Katsuoka Y, Matsumoto K, Yokoo T, Comparison of multipotency for differentiation of MSCs from CKD rats, ISN FOREFRONTS SYMPOSIUM2013, Sep. 2013, Florence

④横尾 隆、腎臓再生と包括的腎代替療法の治療戦略、第43回日本腎臓学会東部学術大会、2013年10月4日、グランドプリンスホテル新高輪

⑤Yokote Y, Yamanaka S, Katsuoka Y, Tajiri S, Ohkido I, Ogura M, Yokoo T, The Effect of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Vascular Calcification in Rats with Adenine-induced Kidney Disease, American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week, Nov.13th, 2014, Philadelphia

⑥Benedetti V, Xinari C, Tomasoni S, Rizzo P, Novelli R, Corna D, Yokoo T, Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Engineering Transplantable 3D Renal Tissue From a Suspension of Human Amniotic Fluid Stem Cells and Mouse

Metanephric Cells, American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week Kidney. Nov.13th, 2014, Philadelphia

⑦Fukui A, Yamanaka S, Yokote S, Yokoo T, Analysis of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients for kidney regeneration, World Congress of Nephrology WCN2015, Mar. 2015, Cape Town.

⑧山中 修一郎、岡野 ジェイムス洋尚、横尾 隆、腎臓再生のための長期透析患者における脂肪由来間葉系幹細胞の解析、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月20日、パシフィコ横浜

⑨横尾 隆、腎臓再生医療・細胞治療の未来 腎臓再生の現状と未来、第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月7日、名古屋国際会議場

⑩横尾 隆、腎臓再生医療の未来、第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月7日、名古屋国際会議場

[図書] (計 2 件)

①関谷 佐智子、清水 達也、関根 秀一、糸賀 和義、大和 雅之、岡野 光夫、岡 雅俊、新田 孝作、横尾 隆、メディカルレビュー社、再生医療 機能的腎組織再生の組織工学的手法による検討、2014、356

②山中 修一郎、横尾 隆、中外医学社、Annual Review2014 腎臓 分子生物学6 機能的腎臓再生法の開発の現況、2014、112-6

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：移植用臓器及び臓器構造体
発明者：横尾隆/(株)TESホールディングス/
学校法人明治大学/小林英司/長嶋比呂志/松成ひとみ

権利者：学校法人明治大学/
株式会社TESホールディングス/
東京慈恵会医科大学
腎臓・高血圧内科 主任教授 横尾隆

種類：特許

番号：PCT/JP2015/084216

出願年月日：2015年12月14日

国内外の別：国外

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

[報道] (計 3 件)

①横尾 隆、BBC News、Lab-grown kidneys work in animals、2015年9月22日

②横尾 隆、再生腎臓で尿輩出 ラットで成功「臨床応用へ前進」、毎日新聞、2015年9月23日

③横尾 隆、再生腎臓からの排尿 ねずみで成功、NHK ニュース、2015年11月12日

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・腎臓・高血圧内科・

主任教授

研究者番号：70301538