

特集：腎臓学この一年の進歩

## 腎臓と再生医療

Kidney and regenerative medicine

横尾 隆

Takashi YOKOO

### はじめに

再生医療への期待は、まず1981年に胚性幹細胞(ES細胞)が樹立され、単一の細胞から目的とする細胞や組織、さらにはクローン人間の作製が可能になることが理論上示されたことに始まったとされる。さらに、京都大学山中伸弥教授によるiPS細胞の樹立法確立により、成体内の分化した細胞から多能性幹細胞まで時間を巻き戻せることが判明し、さらに期待が膨らんだ。また、遺伝子操作をしなくても成体の中に多分化能を維持した幹細胞(前駆細胞)が潜んでいて、それを単離することも可能となり、再生医療はより一層現実味を帯びてきた。“再生医療(regenerative medicine)”という言葉が広く使われるようになってからすでに15年以上が経っているが、依然として連日のように再生医療関連のニュースを目にするのは、その期待の大きさを物語っている。しかし残念ながら、腎臓は最も再生が難しい臓器とされ、ニュースとして取り上げられるようなブレイクスルーがほとんどないのが現状である。これは、腎臓が機能を発揮するためには精巧な立体構造を保つ必要があるため、幹細胞から“細胞”、“組織”の再生だけでなく、立体構造を持った“臓器”の再生まで完成しなければ臨床応用できないからであろう。例えば1つの腎臓には約100万個のネフロンがあり、それを取り巻く血管系と物質のやり取りをしている。また、最初の濾過システムである糸球体でさえ非常に複雑な構造をしている。それぞれの細胞が一律に制御されることにより尿を生成し、また、エリスロポエチンやレニンなどの内分泌機能も発揮している。やはり誰もが腎臓再生は非現実的であると感じてしまうのはよく理解できる。事実、文部科学省は平成24年にまとめた「今

後の幹細胞・再生医学研究の在り方について」においてiPS細胞研究ロードマップを提示しているが、ここにあげられている全身の細胞、臓器のなかで唯一腎細胞だけが、臨床研究に移行できるのが10年以上先であるとされている。つまり、国から腎臓再生が最も期待が薄いと公言されたようなものである。そのなかで、昨年、数少ないながら腎臓領域の再生医療の実現化に期待を抱かせるニュースがあった。本稿ではそれらを中心にこの1年の進歩について概説したい。

### 再生から新生へのパラダイムシフト

腎臓は再生が可能であろうか。まずここで、「再生」とは何かを考えてみたい。例えばプラナリアは体のどこを切り刻んでも再び同じ個体に生まれ変わることができるし、トカゲの尻尾も切られた後に完全に元の尻尾に還元される。これこそが生体の持つ再生力である。では、腎臓には再生力がないかというところではない。魚類、両生類、爬虫類は腎臓再生力を維持しており、部分的に切除してもまた元に還元できる<sup>1)</sup>。生物のなかで哺乳類と鳥類だけが再生力を失ってしまったのである。ではなぜ進化の過程で腎臓再生力を失ってしまったのだろうか。筆者はその構造に鍵があると思っている。鳥類と哺乳類は尿濃縮力を獲得するために対向流系を持ったネフロンを有している。一方、それ以外の生物は単純な直線的管構造のみのネフロンである。単純な管が途中で欠損しても一方に伸長すれば再生できるが、対向流系の再現には途中で方向転換をしなければならず、プロセスが非常に複雑になる。つまり、哺乳類と鳥類は尿濃縮力を獲得する代わりに腎再生能力を失ったと考えている。

一方ヒトは、誰もがこの複雑で精巧な臓器を母親の子宮

のなかで間違えることなく作り上げているという事実がある。究極の腎臓再生法とは、この発生の過程で遂行されるプログラムをすべて解き明かし、腎臓幹細胞にこのプログラムを与え、一から腎臓を作り上げてしまうことであろう。もしくはこのプログラムのすべてを解き明かすのではなく、異種の胎仔にプログラムを借りるという発想もある。つまり哺乳類であるわれわれは、完成された成人の腎臓を途中から作り直す再生法ではなく、新たに初めから作る再生法、つまり「再生」というより「新生」というべき方法論(つまり *de novo* 腎臓再生)が必要になると考える。したがって、幹細胞輸注による再生因子のパラクライン効果により腎機能障害の進行を抑えようとする細胞療法とは一線を画する必要があると思っている。

### 自己組織化能を用いた腎臓再生

多能性幹細胞から精巧な三次元構造を持った腎臓まで分化誘導させるには、とてつもなく複雑な数千、数万のプログラムが織り交じって遂行される必要があると考えられていた。しかし、これだけの複雑な構造を獲得するには、幹細胞は刺激に対し完全に受動的な反応として分化していくのではなく、能動的に自ら進んで臓器に分化していく能力(自己組織化能)を内包している必要がある。最近になり、この自己組織化能をいくつかのキーとなる刺激で賦活化させることにより、三次元臓器の作出が可能であることが眼球や腸上皮などで証明されてきた。腎臓幹細胞はこの自己組織化能が非常に強いことが明らかとなり、想像されていたより少ない因子による刺激で腎臓が再現できるのではないかと考えられるようになってきている。例えば、後腎細胞を単一細胞になるまでバラバラにした後に、遠心してペレットにし培養を継続すると、再び三次元構築を再現してネフロンになっていくと報告されている。さらにこのネフロンを腎臓皮膜下に移植すると、血管が迷入し腎機能が再現されるという<sup>2)</sup>。また、後腎間葉のなかで *Sall1* を強発現している単一細胞を培養することにより、糸球体および尿管を含む高次構造を持った構成体への分化誘導が可能となる。Osafune らは iPS 細胞からネフロン幹細胞として *Osr1* 陽性細胞を樹立し、自己組織化能を用いて成熟腎臓細胞に分化誘導に成功している<sup>3)</sup>。また Taguchi らは、iPS 細胞からわずか5つのステップにより体軸幹細胞を介して腎組織まで分化誘導させることに成功している。この前駆細胞は神経堤と共培養することにより、腎“細胞”からさらに立体的構築を形成した腎“組織”まで分化誘導が可能となる<sup>4)</sup>。

2015年、この領域で大きな二つの進歩が報告された。その一つは、横浜市立大学 武部らによる organ bud 形成を介した尿生成の成功であろう<sup>5)</sup>。これまでこの自己組織化を誘導する手法で尿生成を確認した報告はなかった。武部らは、2013年に iPS 細胞から機能を獲得した肝臓原基の培養法を開発し *Nature* 誌に報告しているが<sup>5)</sup>、この培養方法を詳細に解析することで、立体的な肝臓原基の作製には、間葉系幹細胞の存在と細胞同士が収縮し合う物理的な外的環境の条件設定が重要であることを明らかにした。この条件設定により、肝臓のみならず腎臓を含む多臓器の器官原基の作出に成功した<sup>6)</sup>。この三次元腎臓原基は、移植後すみやかに血流を有する血管網を再構成し尿を生成するという。現在はマウス胎仔から分離された腎臓前駆細胞からの原基樹立であるが、今後、iPS 細胞などの幹細胞からの樹立が期待される。

もう一つの重要な報告は、Murdoch Childrens Research Institute の中里らによる iPS 細胞から腎臓のすべての分画を持った organoid 作製であろう。ヒト iPS 細胞から培養条件を変えることにより、尿管上皮と後腎間葉を別々に誘導し、シングルセルにして混ぜ合わせた後に遠心してペレットにし、トランスウェルの上で培養することにより、糸球体から尿管まで連続したネフロンの作製に成功した。驚くことに、この organoid は糸球体まで到達した血管系および間質細胞も保持しており、また、尿管細胞の腎毒性物質に対する反応性も成熟腎臓と同様であったとしている。まさに iPS 細胞からミニチュア腎臓を *in vitro* で分化誘導することに成功したといえる。今後、薬物スクリーニングや分化誘導のメカニズム解明のみならず、成体との機能的統合による腎臓再生医療への応用が期待される。

### 胚盤胞補完法を用いた臓器再生

胚盤胞補完法 (blastocyst complementation) は、理論的には iPS 細胞からヒトサイズの腎臓再生が可能とされ、臨床に最も近いといわれている。これは、一部の組織、臓器が欠失した動物の未分化胚芽細胞に野生型同種 (allo-)、異種 (xeno-) の ES 細胞を注入することにより胚盤胞補完を誘導し、欠失した部分を完全に野生型由来にしてしまうという手法であり、古くから主に血液領域においてリンパ球作製目的で行われてきた<sup>7)</sup>。この考えを用い、腎臓欠損動物の体内で純粋ヒト腎臓を作ろうとする試みが報告された。つまり、遺伝子操作により人工的に腎臓欠失した動物を作製し、この動物の未分化胚芽細胞に ES 細胞を注入したうえ

で、発生を継続させることにより注入細胞由来腎臓を作製するというストラテジーである。これまで Usui らは, Sa111 欠失マウスの blastocyst に野生型マウス ES 細胞を注入することにより, 注入細胞由来腎臓の作出に成功したことを報告した<sup>8)</sup>。当初は allo であるから成立するのではないかといわれ, ヒトへの応用は不可能とされてきたが, 近年ラット-マウス間の xeno でも成立することが膀胱再生において報告され<sup>9)</sup>, ヒトへの応用が現実味を帯びてきた。同グループは膀胱欠損遺伝子改変ブタを作製し, ブタ iPS 細胞からブタ膀胱の作製にも成功している<sup>10)</sup>。この手法の最大の問題点は, ヒトとブタなどの異種動物とのキメラを作出することが倫理的に許容されるかであろう。国際的には批判的な意見もある。特に脳を含む神経細胞と生殖細胞へヒト細胞が迷入することは, ヒトの意識・感情を持ったキメラの作製やキメラの繁殖など非常に大きな問題をもたらすことが懸念されていた。これに対して昨年この研究チームから, 内胚葉のみに制限された分化誘導が可能であることを示すデータが報告された<sup>11)</sup>。内胚葉系の分化誘導に重要な役割を果たす転写因子である Mix11 を Tet-Off システムにより誘導できるマウス ES 細胞を作製し, 胚盤胞補完法により膀胱欠失マウスの blastocyst に注入し, 発生中期に Mix11 を発現させることにより, ES 細胞由来部分を内胚葉系譜に制限することができるという<sup>11)</sup>。膀胱は内胚葉由来であるため, この方法でかなり臓器特異性を持たせることが可能となる。腎臓は中胚葉由来であり, この方法は直接応用することはできないが, 方法論としてはかなり進歩したと考えられる。現在, 政府科学技術会議調査会が一定の案件を条件に, 動物性集合胚を代理母動物の子宮に移植しキメラを出産することを容認する方針を打ち出しており, これらの方法を導入することにより倫理的なハードルをクリアできる可能性が現実味を帯びてきた。今後, 霊長類と異種間のキメラ動物の効率良い樹立が鍵になるであろう。

### 胎生臓器ニッチ法を用いた臓器再生法

この方法は, 外来の臓器前駆細胞を臓器が発生する部位・時期(臓器ニッチ)に注入し, 成長する胎仔内で *ex vivo* 培養することで, 発生段階と全く同じ環境下に置き, 臓器発生時の初期プログラムと全く同様の刺激を与え, その後は自己組織化能に任せて成体内で臓器まで分化させる方法である。われわれは同法を用いて, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)からネフロンまで分化誘導し, さらに, このヒト由来腎臓組織をラットの大網内に移植し, 血管の迷入を誘

導し, ホストの血管を統合した新規腎臓(neo-kidney)を作出することに成功している<sup>12,13)</sup>。この neo-kidney は, レシピエントの血液を濾過した尿生成能<sup>13)</sup>やエリスロポエチン産生能を獲得<sup>14)</sup>していることが確認された。また, 薬剤によりアポトーシスを誘導できる遺伝子改変マウスの胎仔を用いることで, 不要となった後に異種部分を排除する安全システムの開発にも成功している<sup>15)</sup>。

生成された尿は, ラット体内で发育した neo-kidney では 100  $\mu$ L 前後であるが, ブタ体内で 10mL 以上になることが示されていたが, 問題は, この尿をいかに native の膀胱を介して体外に排出するかであった。単純に考えれば, 尿排泄により拡張した尿管と膀胱を生体適合性のあるチューブで連結すればよいと思われるが, 尿管には発生段階から蠕動運動により後腎から生成された尿を掻き出す能力があり, たとえチューブがうまく開口していても, やはり水腎症となり 4 週間程度で腎機能は廃絶してしまう。一方, native の尿管を直接再生腎臓と連結しても, 尿量と蠕動運動のアンバランスにより効率的に尿を掻き出せず, 同様に水腎症となる。つまり, 少しずつ増加する尿量に適合した蠕動運動を持つ尿管が必要であった。これは想定外の問題点であったが, 最近になってクリアすることが可能となり, 昨年報告するに至った<sup>16)</sup>。この方法は, 後腎を尿管と膀胱の原基ごと(クロアカグラフトとして)移植し, 尿管原基が蠕動運動機能を徐々に開始して膀胱原基に尿が貯留し始めたところで native の尿管と連結することにより, 段階的に蠕動運動を強めることが可能となり尿を効率良く膀胱まで導くというストラテジーである。この step wise peristaltic ureter (SWPU) システムにより, 移植後腎は機能廃絶することなく尿を流出することが可能となることが示された。ブタでの検証も終わり, 現在マーモセットを用いての検証の段階となっている。さらにこの方法は, 発癌性などのリスクの少ない患者由来の成体幹細胞を用いることが最大のメリットであるが, 透析患者体内の成体幹細胞は長期間尿毒症物質に晒されるため臓器再性能が劣化している可能性がある。事実われわれの検討では, 透析患者から採取した脂肪由来 MSC は血管新生能が劣っていた<sup>17)</sup>。現在, この劣化を特殊な方法を用いてリセットするシステムの開発に着手している。本法はキメラ動物を作出せずに完遂が可能であり, 倫理的ハードルが胚盤胞補完法より低いと考えられ, 実用化に向けてさらに研究を進めている。

## おわりに

今回、「腎臓学この一年の進歩」という特集で再生医療を取り上げていただいたので、昨年1年間に発表されたなかで今後マイルストーンになるであろう重要な論文を紹介した。前回2014年(日腎会誌56巻1号)に同様の特集が組まれたときに執筆した内容とかなり様変わりしており、まさに日進月歩の進歩を遂げている領域と言える。まだまだ透析患者に届くには多くの難関を越えなければならずかなりの時間がかかりそうであるが、いつの日か透析、移植に次ぐ第3極の腎不全治療法として、腎臓再生が臨床応用される日が来ることを期待したい。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文献

- Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors : an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nat Reviews Nephrol* 2013 ; 9 : 137-146.
- Xinalis C, Beneditti V, Rizzo P, Abbate M, Corna D, Azzollini N, Conti S, Unbekandt M, Davis JA, Morigi M, Nenigni A, Remuzzi G. *In vivo* maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1857-1868.
- Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Okubo A, Toyoda T, Takahashi k, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 1367.
- Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 ; 14 : 53-67.
- Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013 ; 499 : 481-484.
- Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, Matsuzaki T, Yamazaki T, Toyohara T, Osafune K, Nakauchi H, Yoshikawa HY, Taniguchi H. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell* 2015 ; 16 : 556-565.
- Chen J, Lansford R, Stewart V, Young F, Alt FW. RAG-2-deficient blastocyst complementation : An assay of gene function in lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4528-4532.
- Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 2012 ; 180 : 2417-2426.
- Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Iбата M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010 ; 142 : 787-799.
- Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg LA, Nakauchi H. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas *in vivo* in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 4557-4562.
- Kobayashi T, Kato-Itoh Megumi, Nakauchi H. Targeted organ generation using Mixl1-inducible mouse pluripotent stem cells in blastocyst complementation. *Stem Cells Dev* 2015 ; 24 : 182-189.
- Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, Sakurai K, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Takahashi M, Terada Y, Eto Y, Kawamura T, Osumi N, Hosoya T. Human mesenchymal stem cells in rodent whole embryo culture are reprogrammed to contribute kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 3296-3300.
- 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* 2006 ; 17 : 1026-1034.
- Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, Ohashi T, Sado Y, Suzuki H, Kawamura T, Okabe M, Hosoya T, Kobayashi E. Generation of transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2008 ; 85 : 1654-1658.
- 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* 2012 ; 30 : 1228-1235.
- Yokote S, Matsunari H, Iwai S, Yamanaka S, Uchikura A, Fujimoto E, Matsumoto K, Nagashima H, Kobayashi E, Yokoo T. A urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys : the stepwise peristaltic ureter system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 12980-12985.
- Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuhara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. *PLoS One* 2014 ; 9 : e102311.