

腎臓再生への取り組み

Challenges to regenerate the kidney

高里 実

Minoru TAKASATO

はじめに

末期腎不全に対する有効な治療法が開発されないまま、わが国の透析患者数は2014年に32万人を超えた(日本透析医学会調べ)。一方、唯一の根本的な治療手段である腎移植は2015年に国内で1,661症例(透析患者数の約0.5%)が実施されたが、この数字は1,597実施例に到達した2011年以降、ほぼ横ばいとなっている¹⁾。残りの99.5%の患者は依然として人工透析に頼らざるをえず、腎移植を代替するような新しい根本治療法の開発に対して強い社会的要請がある状況と言えよう。新しい根本治療法とは、究極的には人工的な腎臓を作製し移植する方法を指すが、移植可能な腎臓を作製するためには、三次元の腎臓組織を構築する医工

学的手法の開発だけでなく、質の高い腎臓前駆細胞を十分な量だけ調達する方法も確立しておかなくてはならない。本稿では、この腎臓再生医療の実現に資する研究、1) iPS細胞からの腎臓オルガノイドの作製、2) 転写因子導入による腎臓細胞の作製、3) ネフロン前駆細胞を維持・増殖する培養手法、について最新の動向を解説する(図)。

腎臓オルガノイドの作製

まずは、ヒト iPS細胞から腎臓オルガノイドを作製した研究報告について記述しよう。オルガノイドとは、臓器の前駆細胞から人工的に作製した三次元の組織構造体のことである。古くは、ニワトリの中腎原基を解離し凝集させ培

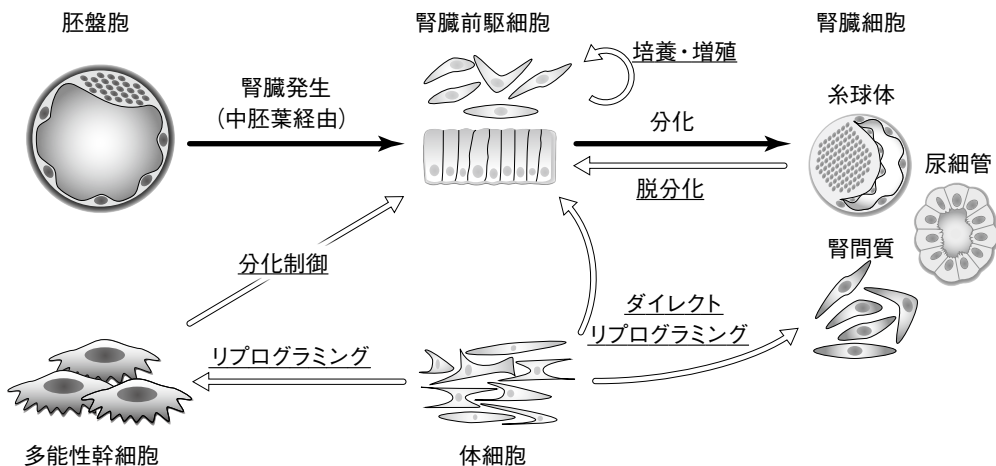


図 腎臓細胞を誘導するさまざまな手法

個体発生における腎臓の通常発生は、中胚葉発生、腎臓前駆細胞を経て各種腎臓細胞へと不可逆的に分化する(黒矢印)。一方、近年のテクノロジーの進化により、細胞種や時系で縛られていた細胞の運命を自在に操作できるようになりつつある(白矢印)。

養したところ、その凝集体内部で中腎組織が自発的に形成されたという報告がある²⁾。このように、細胞が自発的に移動し、集合し、分化し、組織構造を構築する現象を「自己組織化」と呼ぶ。ある臓器を自己組織化によって作り出したいときは、その臓器の前駆細胞を用いる必要がある。この際、ヒトの胎児から採取した本物の前駆細胞や成人の組織幹細胞を用いるのが理想であるが、iPS細胞などの多能性幹細胞を分化誘導して作製した前駆細胞を用いることもできる。例えば、ヒト iPS 細胞を分化誘導して作製した神経外胚葉を凝集させて三次元で培養すると、脳オルガノイドと呼ばれる大脳皮質特有の神経細胞の層構造を有する組織が発生する³⁾。その他、現在までに眼杯、胃、腸、肝臓、膵臓、肺、腎臓のオルガノイドがヒト多能性幹細胞から作製されているが^{4~10)}、こういったオルガノイド作製の成功は、いかに良質な前駆細胞を多能性幹細胞から分化誘導できるかにかかっている。腎臓前駆細胞を分化誘導する場合は、実際の腎臓前駆細胞の発生過程を試験管内でできるだけ忠実に再現する必要があり、そのためには個体における腎臓前駆細胞発生正しい理解が必須である。

腎臓の発生は、上皮細胞である尿管芽(ウォルフ管より発芽する組織)と間葉細胞である後腎間葉(ネフロン前駆細胞)の相互作用によって進行する。この2種の腎臓前駆細胞はともに、中間中胚葉という発生初期の胎児の体幹部分に発生する中胚葉組織から生まれる。太口と西中村らの研究チーム(熊本大学)は、遺伝子改変マウスを用いてネフロン前駆細胞の発生由来を調べ、ウォルフ管は前方の中間中胚葉に由来する一方、ネフロン前駆細胞は後方の中間中胚葉から発生することを確認した。彼らはその知見に基づき、マウスの胚性幹細胞(ES細胞)およびヒト iPS 細胞からネフロン前駆細胞を特異的に分化誘導することに成功した¹¹⁾。作製したネフロン前駆細胞は、尿管管と糸球体を含むネフロンへと分化することができ、さらにこのネフロン前駆細胞をマウスの腎臓被膜下に移植すると、自己組織化したネフロンに宿主マウスの血管が入り込んで糸球体毛細血管を形成した。さらに、そこから尿が生成された痕跡も確認された¹²⁾。森實と Bonventre らのチーム(米国)は分化誘導効率をさらに最適化し、分化した細胞のおよそ90%の細胞がネフロン前駆細胞となる分化系を開発した¹³⁾。一方われわれは、ヒト iPS 細胞の分化誘導先をネフロン前駆細胞ではなく、その前段階である中間中胚葉に設定した。前方と後方の中間中胚葉を同時に発生させることで、2種の腎臓前駆細胞から腎臓オルガノイドを作製するためである。その結果、尿管管と糸球体だけでなく、集合管や血管、腎間質

細胞など、腎臓の形成に必要なあらゆる細胞を含む腎臓オルガノイドの作製に成功した¹⁰⁾。腎臓オルガノイド作製の理論と実際、および各プロトコルの詳しい特徴については別著を参照されたい^{14,15)}。

ダイレクトリプログラミング

次に、“ダイレクトリプログラミング”という古くて新しい手法を用いた腎臓再生の試みを紹介する。ダイレクトリプログラミングとは、体細胞に転写因子を強制発現させることでその細胞系譜を変換させる手法である。世界初の成功は、MyoD という転写因子をマウス線維芽細胞に強制発現して、筋芽細胞を作製した1987年の報告である¹⁶⁾。一方、近年の最も有名な例は、山中4因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*)を使って体細胞から多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立した高橋、山中らの報告である¹⁷⁾。これらの研究が示唆することは、適切な転写因子を見つけ出し、それらを強制発現させることで任意の細胞を任意の系譜に作り変えることができる、という可能性である。実際にその後も、膵β細胞や神経細胞など、さまざまな成功例が報告されている^{18,19)}、このダイレクトリプログラミングを利用して腎臓の細胞を作製した報告も現在までに2例存在する。最初の報告は2013年のオーストラリアの研究チームによるもので、ヒト腎臓近位尿管細胞(HK2細胞)に6つの遺伝子(*SIX1*, *SIX2*, *OSR1*, *EYA1*, *HOXA11*, *SNAI2*)を強制発現させることで、この細胞をネフロン前駆細胞のマーカー遺伝子である*SIX2*や*CITED1*, *PAX2*, *WT1*陽性の細胞へと脱分化させた研究である²⁰⁾。2例目はドイツの研究チームが昨年(2016年)発表したもので、彼らは4つの転写因子(*EMX2*, *HNF1B*, *HNF4A*, *PAX8*)をマウスおよびヒトの線維芽細胞に強制発現することで、これを尿管管へと変換させた²¹⁾。誘導された尿管管細胞は、三次元で培養すると球体を形成し、内腔側にMegalynを発現し刷子縁を形成した。また、アルブミンの取り込みや腎毒性薬剤(GentamicinやCisplatin)による高い細胞死応答性を呈示するなど、形態的にも機能的にも近位尿管管に近い特徴を持つ細胞であった。

これらダイレクトリプログラミングの研究を成功させるための必要条件は2つある。1つ目は強制発現する転写因子が特定できること。これは一般的に、まずは目的とする細胞系譜のマーカー遺伝子を指標とするレポーター細胞株を作製するところから始まる。例えば、目的の細胞がiPS細胞であれば*Fbx15*、近位尿管管であれば*Cdh16*の遺伝子座に緑色蛍光蛋白質GFP遺伝子をノックインした体細胞

が使用されている^{17,21)}。次に、目的とする細胞系譜を特徴づける転写因子群をこの細胞株に網羅的に強制発現させ、目的細胞(GFP陽性細胞)を誘導する。そこから1つずつ因子を抜いていき、誘導効率を極端に下げる転写因子、つまりマスター転写因子を特定する。最後に、最大の誘導効率が維持できる範囲で強制発現する転写因子の数を最少にできるような、マスター転写因子の組み合わせを模索する。2つ目の必要条件は、目的細胞が安定的に生存できる培養環境が確立されていることである。この培養環境が整っていないければ、せっかく誘導した目的細胞も直ちに消失してしまう可能性がある。iPS細胞を樹立した例では、多能性幹細胞であるES細胞の培養手法がすでに確立されていたので、iPS細胞をその培養条件下で樹立しつつ培養することができた。一方、先に紹介したネフロン前駆細胞の例(2013年)であるが²⁰⁾、ネフロン前駆細胞が安定的に生存できる培養条件が確立されていないなかでの研究であった。その結果、誘導した細胞がネフロン前駆細胞のマーカー遺伝子を発現することは確認されたものの、それを増殖させることはできず、ネフロン分化能の有無を十分に確認することはできなかった。しかし近年、ネフロン前駆細胞を取り巻く細胞環境(ニッチ)の研究が進み、その知見を活用して、ネフロン前駆細胞の培養条件の開発が進んでいる。次の項では、この研究に関する最新の動向を紹介したい。

ネフロン前駆細胞の人工培養

ヒトのネフロン前駆細胞は36週齢で枯渇し、それに伴い新規のネフロン形成は止まる(マウスでは生後2~3日で枯渇する)。生体内では、この個体発生の限られた期間にネフロン前駆細胞は発生し、増殖し、そしてネフロンへ分化して消失する。このように生体内でネフロン前駆細胞が一定期間だけ増殖し、その後消失してしまうのはなぜなのか。少なくとも現在までの研究によると、初期のネフロン前駆細胞と比較して、後期のネフロン前駆細胞は増殖能力や未分化性を維持する能力が落ちている、つまりネフロン前駆細胞の状態が時間とともに変化することがわかっている^{22,23)}。では、何がその変化を生むのだろうか。ネフロン前駆細胞の「老化」によるものなのか。もし老化が原因だとしたら、それは時間経過によるものなのか、あるいは細胞周辺環境の変化によるものなのか。残念ながら、その原因・仕組みはいまだ特定されていないが、この謎を解き明かすためには、ネフロン前駆細胞を人工的に培養するという手法を用いることが特に有効となる。すなわち、ネフロン

前駆細胞を人工培養する系を用いれば、培養条件を変化させなくともネフロン前駆細胞が時間経過とともに老化してしまうのか、それとも培養条件を変化させることで老化を速めたり遅らせたりすることができるのかを細かく解析できるためである。しかしそのためにはまず、この一過性にしか存在しない不安定なネフロン前駆細胞が安定的に生存できる人工培養系を開発するところから始めなくてはならない。そして、この困難な課題にチャレンジした3研究チームがこの1年余りで相次いで以下の研究成果を発表した。

まずはOxburghらの研究チーム(米国)の成果について述べる。彼らは以前にマウス腎臓発生の研究で、Smadを介したBMPシグナルがネフロン前駆細胞の状態を分化方向へと一歩進めることを示していた²⁴⁾。そこで彼らは、ネフロン前駆細胞の増殖や維持に必要とされるFGF9やWntシグナルとともに、このSmad経路の抑制剤LDN193189を培地に含める工夫をし、ネフロン前駆細胞が分化しない培地の作製に成功した²⁵⁾。マウス胎児のネフロン前駆細胞を培養した実験では、100%近い細胞がネフロン前駆細胞マーカー遺伝子*Cited1*を発現したまま、少なくとも6回の継代に成功し、その後、実際にネフロンへ分化することも確認された。ヒトiPS細胞を分化誘導して作製したネフロン前駆細胞にも同じ培地を適用したところ、2回までは継代することができた。しかしこの培地には、培養したネフロン前駆細胞が尿管管へは分化するものの、糸球体へは分化できないという欠点があった。

次に、この欠点を克服したネフロン前駆細胞用維持培地を発表したのが、谷川、西中村(熊本大学)ら日本の研究チームである。谷川らは以前の研究で、ラットのネフロン前駆細胞を維持する培地の開発に成功していたが²⁶⁾、この培地をマウスやヒトにも適用できるように調整する必要があった。また、西中村らは以前の研究で、Notchシグナルをネフロン前駆細胞で亢進させると、ネフロン前駆細胞が幹細胞性を維持できずにネフロンへと分化してしまう現象を報告していた²⁷⁾。ここから彼らは、ラット用の培地にFGF9やWntシグナル、低濃度のBMP7とともに、Notchシグナルの抑制剤DAPTを添加することで、マウスのネフロン前駆細胞、およびヒトiPS由来のネフロン前駆細胞を分化させずに培養できる培地を開発した²⁸⁾。この培地で培養したネフロン前駆細胞は、80%以上がネフロン前駆細胞マーカー遺伝子*Six2*、*Cited1*の発現を維持し、尿管管のみならず糸球体への分化能も保持していた。ただし、ヒトiPS細胞由来のネフロン前駆細胞については、継代により

ネフロン分化能が消失してしまった。

3番目の報告はBelmonteらの研究チーム(米国)によるものである²⁹⁾。前記の2チームは接着培養法を用いたが、このチームは低接着U底プレートを使用した三次元培養法を採用した。また、培地に添加している各種増殖因子や化学物質の組み合わせは前記の2チームと非常に似通っているが、LDN193189やDAPTを添加せず、逆に高濃度のBMP7を添加した。この培地でマウス胎児のネフロン前駆細胞を培養すると、ほぼ100%の細胞がSix2, Cited1を発現し、糸球体を含むネフロンへ分化する能力を維持できたばかりでなく、その特徴・能力を維持したまま100回以上の継代(15カ月以上の培養期間)が可能であった。彼らはさらに、ヒトの胎児から抽出した腎臓からネフロン前駆細胞を入手し、この培養法を試したところ、同様にネフロン前駆細胞性を維持したまま、50回以上の継代(7カ月以上の培養期間)が可能であった。高濃度のBMPシグナル下でネフロン前駆細胞が分化せずにいられる現象は興味深いもので、他の研究者による追試報告が待たれる。ただし、ネフロン前駆細胞を事実上無限に増殖させることができるこの培養方法は、非常に高い有用性を持っていると言える。

おわりに

さまざまな種類の細胞が三次元的に組み合せて発生する腎臓は、人工的に組織を構築するのが非常に難しく、再生が難しい臓器であるとされてきた。その認識は今も間違っていない。しかし、近年の腎臓研究の進展により、腎臓再生医療実現の希望の光は急速に大きく明るくなってきた。「自己組織化」という、臓器の前駆細胞が持つ天性の力を利用することで、初期の三次元の腎臓組織を試験管内で作製できるところまできた。また、発生学の知見に基づき、ネフロン前駆細胞の人工培養・増殖が可能になっている。さらに、転写因子を強制発現させることで線維芽細胞からネフロン前駆細胞や腎臓上皮細胞を誘導することもできるようになった。例えば、これらのテクノロジーを組み合わせることで、ヒトの任意の細胞から腎臓の前駆細胞を誘導し、それを培養増殖し、そこから自己組織化によって三次元腎臓組織を作製する、といった新しい再生医療の開発につながるができるだろう。iPS細胞を経由しないことでテラトーマが形成される心配がなく、移植後の安全性が高まるなどの利点がある。また、三次元の人工腎臓組織に関しては、これをどのように成熟化させるかが今後の研究の焦点になっていくであろう。成熟化なくしては、移植に

も製薬にも応用利用できないためである。ただし、そのためには例えば、臓器の血管化がどのように制御されているのか、細胞の老化はなぜ起こるのか、などの基本的な生命現象を理解しなければならない。高度なテクノロジーを開発するためには、今まで以上にしっかりと基礎発生学研究の土台が必要となる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. 日本移植学会・日本臨床腎移植学会. 腎移植臨床登録集計報告(2016)2015年実施症例の集計報告と追跡調査結果. 移植 2016; 51: 124-144.
2. Trinkaus JP, Groves PW. DIFFERENTIATION IN CULTURE OF MIXED AGGREGATES OF DISSOCIATED TISSUE CELLS. Proc Natl Acad Sci USA 1955; 41: 787-795.
3. Lancaster MA, Renner M, Martin C, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature 2013; 501: 373-379.
4. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. Cell Stem Cell 2012; 10: 771-785.
5. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. Nature 2014; 516: 400-404.
6. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. Nature 2011; 470: 105-109.
7. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. Nature 2013; 499: 481-484.
8. Hohwieler M, Illing A, Hermann PC, Mayer T, Stockmann M, Perkhof L, et al. Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. Gut 2016. gutjnl-2016-312423.
9. Dye BR, Hill DR, Ferguson MAH, Tsai Y-H, Nagy MS, Dyal R, et al. *In vitro* generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. Elife 2015; 4: e05098.
10. Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. Nature 2015; 526: 564-568.
11. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, et al. 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.
12. Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, Yoshimura Y, Ohmori T, Sakuma

- T, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 27 : 1-14.
13. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, Kishi S, Valerius MT, Bonventre JV. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 2015 ; 33 : 1193-1200.
 14. Takasato M, Little MH. A strategy for generating kidney organoids : Recapitulating the development in human pluripotent stem cells. *Dev Biol* 2016. doi : 10.1016/j.ydbio.2016.08.024.
 15. 高里 実. ヒト iPS 細胞を用いた腎臓オルガノイド作製の理論と実践. *臨床免疫・アレルギー科* 2016 ; 65 : 485-491.
 16. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987 ; 51 : 987-1000.
 17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-676.
 18. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008 ; 455 : 627-632.
 19. Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 7038-7043.
 20. Hendry CE, Vanslambrouck JM, Ineson J, Suhaimi N, Takasato M, Rae F, et al. Direct transcriptional reprogramming of adult cells to embryonic nephron progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2013 ; 24 : 1424-1434.
 21. Kaminski MM, Tasic J, Kresbach C, Engel H, Klockenbusch J, Müller AL, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into renal tubular epithelial cells by defined transcription factors. *Nat Cell Biol* 2016 ; 18 : 1269-1280.
 22. Chen S, Brunskill EW, Potter SS, Dexheimer PJ, Salomonis N, Aronow BJ et al. Intrinsic age-dependent changes and cell-cell contacts regulate nephron progenitor lifespan. *Dev Cell* 2015 ; 35 : 49-62.
 23. Short KM, Combes AN, Lefevre J, Ju AL, Georgas KM, Lambert T, et al. Global quantification of tissue dynamics in the developing mouse kidney. *Dev Cell* 2014 ; 29 : 188-202.
 24. Brown AC, Muthukrishnan SD, Guay JA, Adams DC, Schafer DA, Fetting JL, et al. Role for compartmentalization in nephron progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 4640-4645.
 25. Brown AC, Muthukrishnan SD, Oxburgh L. A synthetic niche for nephron progenitor cells. *Dev Cell* 2015 ; 34 : 229-241.
 26. Tanigawa S, Sharma N, Hall MD, Nishinakamura R, Perantoni AO. Preferential propagation of competent SIX2+ nephronic progenitors by LIF/ROCKi treatment of the metanephric mesenchyme. *Stem Cell Reports* 2015 ; 5 : 435-447.
 27. Fujimura S, Jiang Q, Kobayashi C, Nishinakamura R. Notch2 activation in the embryonic kidney depletes nephron progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 21 : 803-810.
 28. Tanigawa S, Taguchi A, Sharma N, Perantoni AO, Nishinakamura R. Selective *in vitro* propagation of nephron progenitors derived from embryos and pluripotent stem cells. *Cell Rep* 2016 ; 15 : 801-813.
 29. Li Z, Araoka T, Wu J, Liao H-K, Li M, Lazo M, et al. 3D Culture supports long-term expansion of mouse and human nephrogenic progenitors. *Cell Stem Cell* 2016 ; 19 : 516-529.