

腎臓再生医療の研究の現状

横尾 隆 山中修一郎

東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科

key words : 腎臓再生, ニッチ, 間葉系幹細胞, iPS 細胞, 自己組織化能

要 旨

腎臓はその解剖学的な複雑さから、最も再生が難しいとされている臓器であり、腎臓再生は多くの研究者から敬遠されてきた領域である。しかし国内外には果敢にもその難題にチャレンジしている研究チームがある。まだまだ透析患者の元に届くには高い壁がいくつも残されているが、現在の最先端とされている研究内容を紹介するとともに、臨床応用に向けて問題点を抽出してみたい。

1 はじめに

山中伸弥教授のノーベル賞受賞とともに再生医療研究のブームが巻き起こり、最近では毎日のように再生医療の話題がニュースとなっている。いかにももうすぐ患者の手に届くような扱われ方をしているが、はたして現状が正確に伝わっているのだろうか。国は再生医療による技術開発を経済復興のきっかけの一つと考え、iPS 技術を中心に多額の研究費を投入しているが、輸出できるような技術開発はそんなに容易ではない。なんとか臨床に届けようと、規制緩和のための法律の改正や倫理面での許容拡大などが次々に行われているが、国際的には批判されることも多く、Nature Medicine 誌や Science 誌に批判的なコメンタリーが掲載されている。その中で STAP 細胞の騒動は日本発のサイエンスに対する信頼を大きく損なうこととなり、

STAP 細胞の存在の如何にかかわらず大きな十字架を背負うこととなってしまった。臨床へのハードルが一層上がってしまったことは否めない事実である。

ただ、ここで諦めたほうがいいというのではない。再生医療は可能性が無限にあるだけに浮き足立った研究でブームで終らせるのではなく、地に足をつけた地道な研究を進めていくべきであろうと考えている。

本稿では、腎臓再生に向けてのチャレンジングで独創的な研究を紹介し、その臨床応用の可能性について総説してみたい。

2 間葉系幹細胞輸注による AKI 細胞療法

女性のドナーから移植を受けた男性腎不全患者の移植腎に男性由来 (Y chromosome 陽性) 尿細管細胞が出現することが報告され¹⁾、骨髄中に腎臓構成細胞に変わりうる幹細胞 (骨髄幹細胞) が存在することが示唆されていた。その中で Kale らは、骨髄細胞を外来性に注入することで治療効果をもたらすことを最初に報告した²⁾。このあとより、骨髄内のいろいろな分画、および違った腎障害モデルを用いて次から次へと多くの論文が発表された。しかしマーカー遺伝子の偽陽性などの問題が指摘され³⁾、現在では骨髄内の腎臓幹細胞の存在、もしくはこれらの腎臓再生への貢献について否定的な意見が大半である。ただし幹細胞の輸注による治療戦略は否定されていないようであり、特に間葉系幹細胞 (MSC) を輸注すると障害部位に

集簇するという特性により、急性腎障害モデルで一定の治療効果を認めることが示唆されている⁴⁾。

MSCは1970年、Friedensteinらによって骨髄から初めて同定された非造血幹細胞であり、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの間葉系へ分化能を有す多能性間葉系前駆細胞 (multipotent mesenchymal progenitor cells) と考えられている⁵⁾。MSCは組織幹細胞として成体の各所に存在するため、分離操作だけで樹立でき、iPS細胞や腎前駆細胞で分化誘導に使用される転写因子や増殖因子などを必要としない。そのため樹立は容易であり、比較的低コスト・短期間で大量調整も可能である。また、MHC-class II抗原 (HLA-DR) やCD40, CD80, CD86を発現しないため、免疫原性が低く、他人 (同種異系) の間葉系幹細胞でも投与可能となる⁸⁾。これらは間葉系幹細胞が細胞療法として活用しやすい利点となっている。近年では、急性腎障害への細胞療法としてMSCが有効であるとの報告が多くなされ⁶⁾、AKIにおける再生医療の尖峰として研究が盛んに行われている。すでにアメリカでは、心臓手術患者のAKI予防として、MSCの投与効果をみる第1相臨床試験が進行中である⁷⁾。

MSCによる腎保護効果は複数の機序が複合的に作用していると考えられるが、その中でも抗炎症作用が最も期待される。炎症細胞はAKIの初期段階に関与することが知られており¹¹⁾、マクロファージ、好中球、T細胞の活性化がAKIを促すとされる⁵⁾。間葉系幹細胞は、障害を受けた炎症の強い糸球体や尿細管の内皮細胞へ接着分子 (VCAM) を介すことで、免疫調整作用 (PDL-1, HLA-G5, CTLA4) を直接的・間接的にもたらす⁸⁾。様々な液性因子による間接的作用は強い免疫抑制効果を発揮する^{5,6)}。これらの作用により、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞は活性化が阻害され、逆に制御性T細胞の発現が促進される。これらの結果、AKIにおける炎症が抑えられ、腎機能改善の一因になると考えられている⁶⁾。

AKIの細胞療法において、MSC自体は腎臓組織へ分化することはないと現在は考えられている⁷⁾。しかし、MSC特有の腎保護効果については、動物実験において、様々な急性腎障害モデルをもとに複数報告されており⁵⁾、いくつかの臨床試験も進行している⁸⁾。

3 胎生組織ニッチ法による部分的腎臓再生法

上述のように、MSC輸注による細胞療法で障害臓器の再生を目指すという戦略は、腎不全が進行する前の3次元構築が保たれている時期には適応となるであろう。しかし、透析患者のように進行した慢性腎不全ではすでに組織構築が著しく破壊されているため、単純な細胞の補足では改善が望めない。そこで次に考えられるのが、生体内の幹細胞にしかるべきニッチを与えることにより、特定の臓器に分化誘導するという戦略である。つまり生体幹細胞のソースとなるべき患者自身の生体環境 (in vivo) を活用した機能組織の樹立の試みである。

この方法は最近魚類を使って報告された⁹⁾。魚類は成魚でも腎臓が障害を受けてもネフロンを再生する能力を有するが、この腎再生のもととなる前駆細胞群がゼブラフィッシュで同定され、この細胞をわずか10~20個ほど移植すると、生体内 (in vivo) で発生プログラムが作動し機能を持つネフロンが新たに形成される¹³⁾。ただし、哺乳類の生体にはこうした能力が備わっていないため、我々は、胎生組織を“足場”(ニッチ)として利用し、生体内で発生プログラムを作動させることにより腎機能を復元しようとする試みを検討してきた。

ラットモデルにおいて、発生初期の幼弱後腎組織 (=ニッチ組織) を大網内に移植すると、驚いたことに、骨髄からMSCが動員され移植後腎に集簇し、そこで分化シグナルを受けてエリスロポエチン (EPO) 産生細胞に分化することが明らかとなった¹⁰⁾。EPOのリコンビナントタンパク質は、広く腎性貧血に使用されているが高コストであり、またEPO発現ウイルスを用いた遺伝子治療も臨床応用には至っていない。我々が生体内で作成したEPO産生細胞は、腎性貧血を改善させたことから、組織再生の前段階である自己成熟細胞の誘導に、成体幹細胞のニッチ組織として胎生臓器が有効であることが示された。さらに薬剤誘導にてアポトーシスを惹起する遺伝子改変マウス (自殺マウス) の後腎組織をニッチとして移植することにより、EPO産生組織樹立後に異種部分を排除することも可能であることが示された¹⁰⁾。この胎生組織ニッチ法は、腎性貧血の治療のみならず、組織の三次元構築がその機能発揮に必須な組織 (腺臓など) に活用しう

る、普遍的組織再生法に繋がるのが強く期待される。

4 de novo 腎臓再生法の開発

透析が必要となる末期腎不全では、部分的に腎臓を再生するのではなく、腎臓全体を新たに作り直す de novo 腎臓再生が必要となる。これはハードルがさらに高くなるが、無謀にもチャレンジしているグループがある。本総説ではその中から最も進んでいると考えられる五つを紹介する。

4-1 生体由来足場を用いた腎臓再生

生体由来足場を用いた臓器再生が臓器再生で最近注目を集めている。つまり死亡した個体から臓器を摘出し脱細胞化して足場だけにした後、ES 細胞または臓器前駆細胞を注入し各箇所でも成熟細胞に分化させることにより、3次元臓器を再現しようとする試みである。

この概念は心臓再生研究において、死体心臓を再生心臓の足場に用いる方法として最初に報告された。摘出した心臓の冠動脈からデタージェント（いわゆる石鹼水のようなもの）を注入し脱細胞化を行った後、新生仔の心筋細胞を注入することにより心筋細胞に分化させることが可能になるという¹¹⁾。

最近この成功に端を発して、肝臓、肺といった高次元臓器の構築と機能の再現が相次いで報告され、にわかに注目されるようになった^{16,17)}。この手法は比較的構造が単純な臓器であれば成功が想像できるが、腎臓は最も複雑な構造を持つ臓器であるので流用するのは無理があると考えられてきた。事実、ラットの摘出腎臓にマウスの ES 細胞を注入し、ES 細胞由来の血管や糸球体、尿管に分化するという報告がみられたが¹²⁾、尿生成能などの腎機能の獲得にはいたらなかったとされた。しかし昨年、この手法を用いて腎機能を獲得したという報告があった¹³⁾。これによると、脱細胞化したラット、ブタの腎臓の足場に、腎動脈から HUVEC を、尿管から新生仔の腎臓細胞を注入すると腎臓が形成され、それを移植すると尿が作られるというのである。

これらの成功例はすべて同じハーバード大学の同じ研究チームからの報告であり、世界中で追試されているようであるが、尿生成能獲得を再現できたという報告はまだみられていないようである。ただ、もし事実

だとすれば非常に簡単に腎臓再生が可能になる可能性があり、注目を集めている。

4-2 3D プリンター

最近紙に書かれた文字等のプリンターではなく、立体構造をそのまま再現する 3D プリンターが徐々に普及してきている。この 3D プリンターを医療の領域にも活用しようとする動きがある。

最近も、京都大学のグループが、耳の再生に 3D プリンターで作成した鋳型を用いる研究がニュースになっている。ただ腎臓のような非常に複雑な構造を持つ臓器には応用が難しそうで、これまでに学術誌に掲載された論文はないようである。ただ以前より、ウェイクフォレスト大学泌尿器科の Anthony Atala 博士が、3D プリンターを用いた臓器再生研究を行っており、腎臓も 3D プリンターで再生できると発言している。これまで一切論文化されていないため真偽のほどは不明であるが、昨年アメリカ腎臓学会の Kidney Week 2013 での招待講演で研究内容が明らかにされた。それによると、3D プリンターで再生した腎臓は血栓のため 3 日間しかもたないが、その間は尿を生成するということである。またその時に腎生検所見を提示していたが、正常の腎組織と見分けがつかないレベルであった。にわかには信じがたい内容であったが、もし事実なら 3D プリンターで腎臓再生させれば臓器不足などなくなるのかもしれない。この講演の詳細については American Journal of Kidney Disease (AJKD) の公式ブログに詳しいのでご興味のある方は参照されたい (<http://ajkdblog.org/2013/11/12/kidney-week-2013-need-an-organ-print-an-organ/>)。

4-3 杯盤胞補完法を用いた臓器再生

少なくとも現時点で日本において最も実現化が近いとされている腎臓再生法は、胚盤胞補完法 (blastocyst complementation) 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他種 (allo-)、異種 (xeno-) の ES 細胞を注入することにより杯盤胞補完を誘導し、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成のために行われてきた²⁰⁾。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成し、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成するというストラテジーである。

これまで Usui らは、Sall 1 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¹⁴⁾。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腎臓再生において報告され¹⁵⁾、ヒトへの応用が現実味を帯びてきた。同グループは、腎臓欠損遺伝子改変ブタを作成し、ブタ iPS 細胞からブタ腎臓の作成に成功している¹⁶⁾。この手法は、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が問題となると思われる。しかし、最近となり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たことにより、一気に現実味を帯びてきた。今後キメリズムの制御およびキメラ動物の効率よい樹立が鍵になるであろう。

4-4 異種胎仔発生プログラム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、発生段階とまったく同じ環境下に置き、臓器発生時の各種因子のプログラムとまったく同様の刺激を与え、臓器まで分化させる方法である。

我々は同法を用いて、ヒト骨髄由来 MSC からネフロンまで分化誘導することに成功した¹⁷⁾。さらにこのヒト由来腎組織を、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た¹⁸⁾。この neo-kidney は、レシピエントの血液をろ過した尿生成能¹⁸⁾やエリスロポエチン産生能を獲得¹⁹⁾していることが確認された。また、ヒトへの臨床応用を検討する際に、ウイルスを使用したグリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line derived neurotrophic factor; GDNF) 遺伝子導入は安全面・倫理面から大きな障害があると考え、ウイルスを用いず人工的に特殊な温度反応性を獲得したポリマーから GDNF を徐放させるシステムを導入し、より安全に幹細胞から腎臓系譜への分化誘導法を

開発し報告した²⁰⁾。

一方、上記のような尿管発芽部位、時期に間葉系幹細胞を注入するシステムでは、集合管より尿管側は異種になってしまうという問題が残る。そこで我々はこの問題に対し、集合管系もヒト間葉系幹細胞由来にするシステムの開発も行っている。つまり、発生初期に尿管芽原基の存在領域にヒト間葉系幹細胞を移植し、ウォルフ管から尿管芽すべてをヒト由来にできないかという試みである。発生の初期段階にアクセスできる実験系として鶏卵を用いて実験したところ、尿管芽原基に強く発現している PAX2 遺伝子を導入したヒト間葉系幹細胞は、移植後尾側に移動しながら 2 日後にはウォルフ管に分化していることが確認されている²¹⁾。現在これらの細胞がさらに尿管芽まで分化可能であるか検討中である。これに成功すれば、発生初期 (ウォルフ管発生時期) と、尿管芽発芽時期の 2 段階移植法により、whole kidney 再生も可能ではないかと考えて研究を展開している。

現在、我々はヒト腎機能代替を目指し、より大きな neo-kidney を作る目的で、ブタ胎仔を用いた腎臓再生システムの開発に着手している。

4-5 自己組織化技術による臓器再生法

究極の臓器再生法は、幹細胞がすでに持っている分化能を賦活化させることにより 3 次元構築を再現することである。つまり少数の細胞群が外部からの刺激を受けることなく、自らの内在的な特性を発揮して複雑な高次構造を組み上げていく技術 (自己組織化技術) による臓器再生法である。近年、網膜組織²²⁾や腸管粘膜²³⁾、脳などで報告された。

たとえば、網膜組織では 3,000 個程度の ES 細胞から眼杯と酷似した杯状の網膜組織を 3 次元的に形成させ、さらにこの組織の 3 次元培養を続けることにより秩序だった多層構造を有し、神経細胞間のシナプスを形成している神経網膜組織を再生することに成功している²⁹⁾。腎臓においては、Osafune らが、後腎間葉の中で Sall 1 を強発現している単一細胞から、糸球体および尿細管を含む高次構造を持った構成体への分化誘導に成功している²⁴⁾。また、後腎組織は自己組織化能を強く維持しているようで、後腎を個々の細胞レベルまで単離した後に遠心して塊にして培養すると再びネフロンを形成し始める、という非常に興味深い現象が

報告された²⁵⁾。それを腎皮膜下に移植すると血管が迷入して尿を作り始めるという²⁶⁾。この現象を利用して Osafune らは、iPS 細胞から Osr 1 陽性細胞を介して成熟腎臓細胞への分化誘導に成功している²⁷⁾。さらに最近では Nishinakamura らが、iPS 細胞から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大きなニュースとして取り上げられた²⁸⁾。ほぼ同時期に、iPS 細胞や ES 細胞から自己組織化能を用いて尿管芽細胞やネフロン作成に成功したという報告があり^{29,30)}、全腎臓を自己組織化能で再生させようという試みが世界中で進行している。

5 おわりに

現在、臨床応用を考えている再生医療は、幹細胞からβ細胞などの成熟細胞に分化して移植するか、皮膚や心筋をシート状にして貼付けるといった単純構造組織の再生が中心となっている。しかし、患者由来の幹細胞から新たに患者の臓器を作ってそれを移植するという SF にでも出てくるような画期的な技術開発も、実臨床に必要な技術と考える。腎臓再生はもっとも魅力的で最も難しい命題であるが、現在の異常な盛り上がり過ぎ、過剰な熱が冷めたとしても、地に足をつけた研究展開で腎臓再生医療が実現化することを強く期待する。

文 献

- Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, et al. : A role for extra-renal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int*, 62; 1285-1290, 2002.
- Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. : Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest*, 112; 42-49, 2003.
- Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, et al. : Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*, 115; 1743-1755, 2005.
- Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. : Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15; 1794-1804, 2004.
- de Almeida DC, Donizetti-Oliveira C, Barbosa-Costa P, et al. : In Search of Mechanisms Associated with Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies for Acute Kidney Injury. *Clin Biochem Rev*, 34; 131-144, 2013.
- Bassi ÈJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, et al. : Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*, 8; 329-342, 2012.
- Tögel FE, Westenfelder C : Kidney protection and regeneration following acute injury: progress through stem cell therapy. *Am J Kidney*, 60; 1012-1022, 2012.
- Bussolati B, Hauser PV, Carvalhosa R, et al. : Contribution of stem cells to kidney repair. *Curr Stem Cell Res Ther*, 4; 2-8, 2009.
- Diep CQ, Ma D, Deo RC, et al. : Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature*, 470; 95-100, 2011.
- Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, et al. : Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells*, 30; 1228-1235, 2012.
- Ott HC, Matthiesen S, Goh S-K, et al. : Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*, 14; 213-221, 2008.
- Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, et al. : Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*, 20; 2338-2347, 2009.
- Song JJ, Guyette JP, Glipin SE, et al. : Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med*, 19; 646-651, 2013.
- Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, et al. : Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol*, 180; 2417-2426, 2012.
- Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al. : Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, 142; 787-799, 2010.
- Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. : Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110; 4557-4562, 2013.
- Yokoo T, Ohashi T, Shen J-S, et al. : Human mesenchymal stem cells in rodent whole embryo culture are reprogrammed to contribute kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102; 3296-3300, 2005.
- Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, et al. : Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol*, 17; 1026-1034, 2006.
- Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, et al. : Generation of transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 85; 1654-1658, 2008.
- Gheisari Y, Yokoo T, Matsumoto K, et al. : A thermoreversible polymer mediates controlled release of glial cell line-derived neurotrophic factor to enhance kidney regeneration. *Artif Organs*, 34; 642-647, 2010.
- Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, et al. : Integration of human

- mesenchymal stem cells into the Wolffian duct in chicken embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 385; 330-335, 2009.
- 22) Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. : Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472; 51-56, 2010.
- 23) Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. : Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470; 105-110, 2011.
- 24) Osafune K, Takasato M, Kispert A, et al. : Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development*, 133; 151-161, 2006.
- 25) Unbekandt M, Davies JA : Dissociation of embryonic kidneys followed by reaggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int*, 77; 407-416, 2010.
- 26) Xinaris C, Beneditti V, Rizzo P, et al. : In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol*, 23; 1857-1868, 2012.
- 27) Mae S, Shono A, Shiota F, et al. : Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 4; 1367, 2013.
- 28) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. : Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 14; 53-67, 2014.
- 29) Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez S, et al. : Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol*, 15; 1507-1515, 2013.
- 30) Takasato M, Er PX, Becroft M, et al. : Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol*, 16; 118-126, 2013.