
iPS細胞を用いた腎臓再生医療

～エリスロポエチン産生細胞樹立から全機能腎臓へ～

横尾 隆

東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科

Functional Kidney Regeneration using iPS cells

Takashi YOKOO

Division of Nephrology and Hypertension,

Department of Internal Medicine, Jikei University

<要約>

現在わが国では、腎機能が廃絶する腎不全に陥っても透析または移植により生命維持が可能である。特にドナー不足の現状ではほとんどの腎不全患者が透析に依存した生活を送ることになる。この透析患者は高齢化や糖尿病の増加により爆発的に増えており、現在33万人が透析を行なっている。透析患者は食事や生活の制限を強いられ著しいQOL（生活の質）の低下を余儀なくされる。また透析関連医療費は一人当たり年間約500万円を超え、その年間総額は1.4兆円以上にのぼり、国庫に大きな負担をかけている。この様な現状から、我々は、以前から腎臓を臓器としてまるまる『再生』する腎臓再生に取り組んできた。

人は一つの受精卵が分化してできるので、腎臓も受精卵からできている。一方、発生の段階で受精卵は腎臓前駆細胞に分化するだけでなく、この前駆細胞がうまく腎臓に分化できるような環境（ニッチ）も作る。このニッチの中の前駆細胞は腎臓の芽（後腎）となりやがて成熟した腎臓になる。そこで遺伝子操作により薬剤存在下で既存の前駆細胞を除去することにより外来性前駆細胞のみニッチ内で成熟できるシステムを開発したところ、100%外来性のネフロン前駆細胞由来のネフロンを樹立することに成功した。さらにこれを生体内に移植することにより血管を誘導することが可能となり、腎機能獲得も確認できた。本技術により、異種胎仔のニッチを使用することで外来性のネフロン前駆細胞より成熟腎機能を獲得した臓器まで分化できることが示された。今回の成功はラットとマウスでの実験に基づいているため、今後ヒトiPS細胞由来ネフロン前駆細胞でも証明する必要がある。その上で、いよいよヒト臨床試験へのステップに進めたいと考えている。

1. はじめに

現在、腎代替療法は血液透析、腹膜透析および腎移植であるが、それぞれが近年の種々の改良により、以前よりQOLが向上し生命予後も飛躍的に延長している。一方、これらの進歩により新たな問題も生じてきた。一つは経済問題である。透析に関わる医療費の年間約500万円に加え一級身

障害者としての福祉の支出が以前より問題となっていたが、透析患者の生命予後の改善に伴い透析が長期に及ぶため支出の拡大の問題が改めて浮き彫りになっている。とくにQOLを高めるための先端医療ではさらに支出が増えることも考えられ、大きな社会問題となってきた。もう一つは国際問題である。腎代替療法について世界に目を向けると少なくとも228万人を超える腎不全患者が透析や移植を受けることができないため死亡しており、その数は特にアジアやアフリカの低所得層の多い国に偏っていると報告されている¹⁾。貧富の差が直接生死の境目になるということは国際社会の批判を免れず、ほぼ100%の末期腎不全患者が透析を受けられる透析大国の日本に対する眼は厳しく、国際的な責務を果たすように期待をうける。その中で山中先生がiPS細胞の樹立法を発表し一躍「再生研究の日本」と印象付けられたわが国では、再生医療の腎疾患治療への応用が期待される。しかし腎臓は最も再生が難しい臓器とされ、実現化が懐疑的に扱われている臓器のひとつである。文部科学省が平成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、ここに挙げられている全身の細胞、臓器の中で唯一腎臓だけが、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。つまり国からも腎臓再生がもっとも期待が薄いと公言されたようなものである。

ではやはり腎臓再生は無理なのであろうか。私は無理ではないと考えている。なぜなら我々はこの複雑で精巧な臓器を発生過程で間違えることなく作り上げることができるからである。つまり哺乳類である我々は、完成された成人の腎臓を途中から作り直す再生法でなく、新たに初めから作る再生法、つまり「再生」というより「新生」または「創生」というべき方法論が必要になると考える。したがって究極の腎臓再生法とは、この発生過程で遂行されるプログラムを全て解き明かし、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。しかし、我々はこのプログラムをすべて解明するのは非常に困難で時間がかかると考え、異種の胎仔からこのプログラムを“借用”するという概念のもと研究を進めてきた。

2. 胎生臓器ニッチ法

自己幹細胞から腎臓再生させる「胎生臓器ニッチ法」とは、発生段階にある異種胎仔の臓器発生部位（臓器ニッチ）を抽出し、発生時期を合わせた臓器前駆細胞を注入し臓器初期発生のプログラムを遂行させ、各臓器系譜に分化誘導を行う方法である。腎臓系譜に分化が始まった前駆細胞由来組織はレシピエントに移植することで自己組織化能により発生を継続し成熟した臓器まで分化することが可能となる。特にニッチ内の既存の前駆細胞を遺伝子操作で任意の時期に排除することにより、外来の前駆細胞由来の“尿の生成能を獲得した臓器”まで成熟させることができる。この方法による腎臓再生は3つのステップからなる。ステップ1は、透析患者血液よりiPS細胞を樹立しさらにネフロン前駆細胞（Nephron Progenitor Cells: NPC）まで分化誘導する。ステップ2は、このNPCから宿主（患者）体内で尿を作る臓器まで分化させる。そしてステップ3はこの再生腎臓に尿を体外に誘導する排泄系を与える。この3つのステップが完遂すれば腎臓再生が可能となり、透析患者は透析からの離脱または回数の減少が可能になる。

1) ステップ1：iPS細胞からネフロン前駆細胞へ

現在報告されているiPS細胞からネフロン前駆細胞への樹立法は主に3つある。一つは熊本大学のTaguchiらによる樹立法で、iPS細胞から体軸幹細胞を経てNPCまで分化誘導するものである。同法を用いて樹立したNPCはマウス胎仔脊髄と共培養することにより非常に精巧なネフロンを再現することが報告されている²⁾。これまで精巧なプログラムを完遂させるためには無数のプログラムが必要と考えられていたが、同法ではわずか5種の刺激で完成させており、改めて世界を驚かせた。特徴はsphereの状況で培養することであり、3次元臓器の発生としてはより実際に近い状況を作り出していると考えられる。一方ハーバード大学のMorizaneらは平面培養条件で90%を超える高効率のiPS細胞からネフロン構成細胞の誘導法を開発している³⁾。同法は安価でもありより多くの研究者が採用していると聞く。さらにTakasatoらによる樹立法はネフロン構成細胞への分化のみならず、血管系や間質細胞さらに尿管芽由来の集合管までを統合した形での再生に成功した⁴⁾。我々は上記3法全てに再現性があることを確認したが、少なくとも我々のラボで最も安定してNPCへの分化誘導が可能であったTaguchiらの方法を採用した。同法を用い透析患者血液から樹立されたiPS細胞が健常者由来と同等の腎臓再生能をもったNPCまで分化可能であることを示した⁵⁾。これにより透析患者由来iPS細胞も腎臓再生用に用いることができることが判明した。

2) ステップ2：ネフロン前駆細胞から機能腎臓へ

腎臓再生の次のステップはネフロン前駆細胞から立体構造を持った機能腎臓へ分化誘導する工程となる。

これまで我々は上述の「胎生臓器ニッチ法」を用いヒト骨髄由来間葉系幹細胞からネフロンまで分化誘導することに成功した⁶⁾。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⁷⁾。このneo-kidneyは、レシピエントの血液をろ過した尿生成能⁷⁾ やエリスロポエチン産生能を獲得⁸⁾ していることが確認されている。ただしこれらは全てラットでの研究成果でありヒト応用には大型動物を用いて再生腎臓をヒトサイズまで大きくする必要があった。つまりラットの発生プログラムを用いるとラットサイズの腎臓までしか成長しないため、ヒト腎臓かそれ以上の大きさの腎臓を持つ異種動物の腎臓発生プログラムを用いる必要があった。このためブタ胎仔を用いることとした。しかしラットと違いブタ胎仔は羊水中に浮遊しており、この状態の胎仔の腎臓発生ニッチに細胞を的確に注入することは技術的難易度が極めて高くラットでの成功を直接応用することができなかった。尿管芽が発芽する前のE28以前のブタ胎仔は非常に柔軟で内視鏡などの遠隔操作で細胞注入することは極めて難しい。しかしその後の検討でE40以降の胎仔であればエコー下でカテラン針を用いてnephrogenic zoneへ比較的容易にアクセスが可能ながわかった。しかしその頃の後腎組織のnephrogenic zoneにはすでに既存のネフロン前駆細胞が存在するため、外来性にネフロン前駆細胞を注入してもキメラ腎臓ができてしまった。そこでさらに改良をかさね遺伝子操作によりタイムリーにnephrogenic zoneから既存のネフロン前駆細胞を除去するシステムを開発し、外来のネフロン前駆細胞をすりかえることができるか検討したところ、驚いたことに100%の細胞が置き

替わり、その後の発生を続けネフロンまで分化することが判明した。さらにヒト応用を見据え、異種間でのネフロン形成ができるか確認したところ、少なくともラット-マウス間ではキメラネフロンの形成が可能であった⁹⁾。この成功をうけ、ヒトで使用できるようにこのシステムを搭載した遺伝子改変ブタの作成に着手している。

3) ステップ3：尿排泄系の獲得

体内に尿の生成能を持った再生腎臓が樹立されても排泄系がないと尿管は周囲組織に埋もれてしまい、水腎症となって約4週間で機能が廃絶してしまう。したがって有効な尿排泄経路を付与する必要がある。当初、人工のチューブで拡張した尿管と膀胱をつないだが、尿管の原基の微細な蠕動運動がないためチューブは開口していても結局水腎症になってしまった。この欠点を克服するため、尿排泄腔（クロアカ）と尿管原基ごと移植しクロアカに尿が溜まり始めた時点でnative尿管と接続することにより、効率よく尿を体外に誘導できることがわかったため、この方法をStep wise peristaltic ureter (SWPU) システムと名付けた¹⁰⁾。これにより水腎症を起こすことなく再生腎臓は発育を続け、nativeの尿の約30%のクレアチニン、BUNを排泄できることが確認された。この尿排泄システムにより上記3ステップがそれぞれ別々のin vivo実験系で完遂されたこととなる。

3. おわりに

2007年にヒトiPS細胞の樹立法が報告された当初、日本発の輸出可能な医療経済基盤となりうることを期待され、10年間で1,100億円を超える予算が組まれ精力的に研究が進められてきた。しかし残念ながら臨床応用までたどり着いた治療法はないのが現状である。昨年度、パーキンソン病や心不全、血小板、角膜などが矢継ぎ早に臨床試験や治験が承認され、2019年はいよいよその有効性がどのくらい示されるのか運命の年になるのかもしれない。腎臓はこれらの臓器と比較し一歩も二歩も遅れを取っているのは事実であるが、既に巨額の医療費の支出が余儀なくされているcommon diseaseを対象としており社会的には最も再生医療の応用が期待される臓器であると信じている。現在はまだ夢物語として語られることが多いが、実現化を信じて全力で邁進したいと考えている。

<文献>

- 1) Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. : Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systemic review. Lancet 2015; 385: 1975-1982.
- 2) 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 2014; 14: 53-67.
- 3) Morizane R, Lam AQ, et al. : Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. Nat Biotechnol 2015; 33: 1193-1200.

-
- 4) Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. : Kidney Organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015; 526; 564-568.
 - 5) Tajiri S, Yamanaka S, Fujimoto T, et al. : Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration. *Sci Rep.* 2018 Oct 8; 8(1) : 14919.
 - 6) Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, et al. : Human mesenchymal stem cells in rodent whole embryo culture are reprogrammed to contribute kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102; 3296-300.
 - 7) 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.* 2006; 17; 1026-1034.
 - 8) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, et al. : Generation of transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2008; 85; 1654-1658.
 - 9) Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, et al. : Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun* (in press)
 - 10) Yokote S, Matsunari H, Iwai S, et al. : A urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys: the stepwise peristaltic ureter system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112; 12980-12985.