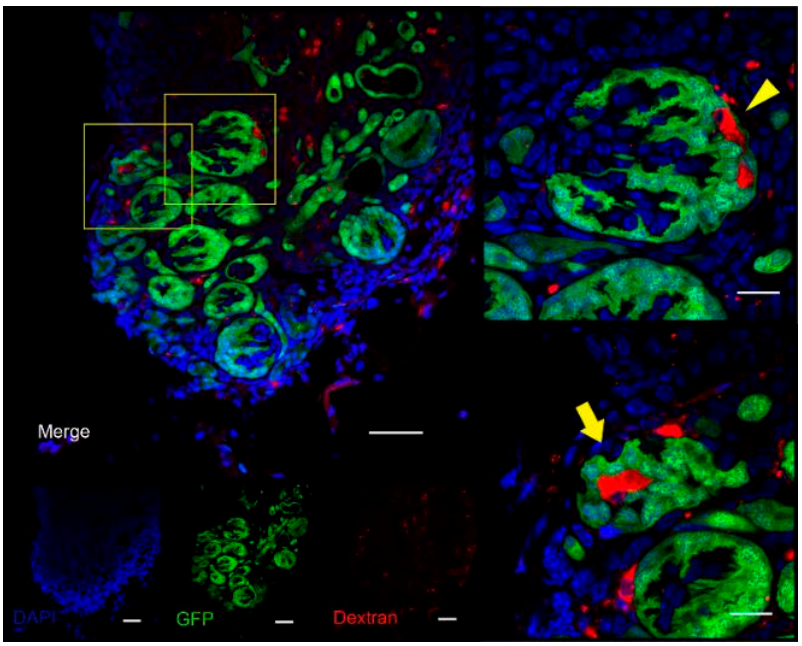
183　腎前駆細胞から尿産生能を持った異種間腎臓再生の開発	山中　修一郎

【目的】我々は新たな腎代替療法の開発のため、自己の細胞から生体内で機能し得る腎臓の再生を研究している。腎臓の幹細胞を異種胎仔の腎臓発生領域に移植し、腎臓発生に必須である複雑かつ精密な発生プログラムをそのまま借り受けることで、新たに腎を構築させるという戦略である。薬剤誘導性にネフロン前駆細胞のみが除去可能な遺伝子改変マウスを作製し、ネフロン前駆細胞の除去と同時に外来性のネフロン前駆細胞を移植することで、遺伝子改変マウスの腎発生領域内部で前駆細胞の置換をおこさせ、移植細胞由来のネフロンを再生する現象を 2017 年に報告した（前駆細胞置換法）。しかし報告時には異種間での *in vivo* 腎再生までは示せておらず、再生ネフロンが生体内で生理的機能を持つかは不明であった。そこで本研究ではラットの体内でマウスの腎臓を足場にラットのネフロン再生を試み、ラットーマウスの異種間における *in vivo* での生理機能を持った腎臓再生の検討を行った。

【方法】Six2-GFP-Cre マウス（Six2 マウス）及び C57BL/6-Gt（ROSA）26Sor[tm1（HBEGF）Awai]/J マウス（iDTR マウス）を交配させ、その胎仔（Six2-iDTR マウス）の胎生期腎臓の皮下膜下に抽出したラットの腎前駆細胞と自殺誘導因子となるジフテリアトキシンを混合し移植した。細胞移植された“膀胱付き腎臓（再生用腎芽）”をホストの成獣ラット大動脈近傍へ移植した。ホストの成獣ラットへ移植時に免疫抑制を使用した（タクロリムス 2 mg/kg 皮下注とメチルプレドニゾロン 5 mg/kg 腹腔内注、移植前日から評価日まで連日投与）。移植後 2 週間で、一般染色、免疫染色、電子顕微鏡観察で腎の形態学的評価を行った。再生腎からの産生尿を蛍光デキストラン投与による膀胱内残存を観察することで評価を行った。

【結果】免疫抑制剤使用下の成獣ラットから回収した移植 3 週間後の再生用腎芽を解析したところ、ラット前駆細胞由来の GFP を発現する糸球体構造を認め、Nephrin を発現する上皮細胞の内側に CD31 陽性の血管内皮細胞が裏打ちされていた。電子顕微鏡観察では糸球体係蹄内に赤血球を認め、糸球体に血流があることが示唆された。また、蛍光標識デキストランをホスト成獣ラットに尾静脈投与したところ、再生糸球体のボウマン腔内と Megalin を発現する近医尿管管腔に蛍光標識デキストランを認めた。ホストの血流を濾過し尿細管腔まで原尿が通過していることが示された。ラットの Native 腎前駆細胞から、前駆細胞置換法を用いたラットーマウス異種間における濾過能を持った *in vivo* での腎臓再生を示した。

再生ネフロンの濾過能評価



183. 腎前駆細胞から尿産生能を持った異種間腎臓再生の開発

山中　修一郎

東京慈恵会医科大学 内科学講座 腎臓・高血圧内科

Key words：腎臓再生，前駆細胞，iPS 細胞

緒　言

我が国の透析患者数は 32 万人を超え、世界では今なお増加の一途をたどる。腎臓は機能が廃絶し末期腎不全に至っても腎代替療法による生命維持が可能であるが、一生涯に渡る透析治療は患者に大きな負担を強いる。一方、本邦の腎移植症例数は年間 1,600 例程度にとどまっており、腎移植は充分に行き渡っていない。この様な現状を打破するために、新たな選択肢となる腎代替療法の開発をめざし、我々は自己の細胞から生体内で機能し得る腎臓の再生を研究している。

我々の腎再生戦略は、幹細胞を動物胎仔の腎臓発生領域に移植し、腎臓発生に必須である複雑かつ精密な発生プログラムをそのまま借り受けることで、新たな腎臓を移植細胞から構築させるというものである。具体的には、ヒト間葉系幹細胞をラット胎仔腎発生領域に打ち込み、自己組織化へと分化を促しヒト細胞由来のネフロンを再生させる（胎生臓器ニッチ法）[1，2]。再生腎には尿排泄路がないため産生した自身の尿により水腎症となり次第に廃絶してしまう問題があったが、ホスト尿管と段階的に接続することで尿排泄路を確立し、長期間にわたる維持を可能にしている [3]。

我々は新たに、iPS 細胞から誘導が可能な腎前駆細胞に着目し、腎前駆細胞を用いた胎生臓器ニッチ法による腎再生を我々は 2017 年に報告した [4]。薬剤誘導性にネフロン前駆細胞のみを除去可能な遺伝子改変マウスを作製し、そのネフロン前駆細胞を除去した胎生期腎臓内部に外来性にネフロン前駆細胞を移植することで、腎発生領域内部で前駆細胞の置換がおこり、移植細胞由来の新たなネフロンが再生される。今までの置換モデルではドナーとホストはマウスを用い同種由来であった。将来的に臨床応用への転換を考えた場合、ヒトの腎前駆細胞をブタなどの異種動物の腎内部へ移植することが想定されるため、異種間で“前駆細胞置換”が可能かを検証しなければならない。そこで本研究ではまずラットーマウスの異種間で機能を持った腎臓の再生を試みた。すなわち前駆細胞置換システムを搭載した遺伝子改変マウスの後腎を足場に、ラット細胞由来の腎臓をホストと同種であるラット体内に移植し *in vivo* 環境下での尿産生能の検討を行った。

方　法

1.　ネフロン前駆細胞除去モデルマウスの作製

腎再生の足場として胎生期腎臓（後腎）を利用するために、ネフロン前駆細胞（NPC）が特異的に除去可能な遺伝子組換えマウスを作製した。具体的には Six2 陽性 NPC に Cre recombinase が発現する Six2-GFPCre マウスと Rosa-floxed-stop-iDTR マウスを交配させ、Six2-iDTR マウスの胎仔を得た（図 1）。同マウスは Six2 陽性 NPC 特異的にジフテリア毒素受容体（DTR）が発現したマウスで、ジフテリア毒素（DT）の投与により NPC のみのアポトーシス誘導が可能である。

2.　移植腎前駆細胞の調製

移植腎前駆細胞は GFP ラット胎仔後腎を酵素処理により分散し調製した。まず胎齢 15.5 日の GFP ラット胎仔より後腎を採取した（図 1）。採取した後腎は Accutase で 37℃、15 分インキュベートし、その間 5 分毎にピペッティングを行うことで、single cell に分散した。分散液を 300 g、5 分で遠心し、上清を破棄後、PBS で懸濁した。細胞懸濁液

を 40μm セルストレーナーで処理し、細胞塊を取り除いた。0.1 ng/μl の DT を含む PBS 溶液で再懸濁し、700 g、3 分で遠心後、上清を完全に取り除いた。残った DT 含有の腎前駆細胞ペレットを移植細胞として使用した。後腎への移植までは氷冷で保存した。

3. 胎生期腎臓への細胞移植

胎齢 13.5 日齢の Six2-iDTR マウス胎仔後腎を再生足場に利用した。マイクロピンセットを用いて同マウス胎仔の後腎を背側からのアプローチで露出させた。ガラス管を後腎腎盂側より刺入し、腎被膜直下に、先に調整した DT 含有の GFP ラット腎前駆細胞を注入した。その後、後腎を尿管および膀胱が付着した状態（クロアカ）で、傷つけないように慎重に胎仔より単離した。

4. 異種間での *in vivo* 腎臓再生

腎前駆細胞を移植したクロアカをホストである LEW ラットに移植することで、*in vivo* での腎臓再生を試みた（図 1）。クロアカはホストラットの腹部の傍大動脈領域の後腹膜下にした。ホストラットには移植前日から評価日まで連日でタクロリムス（TAC）2 mg/kg 皮下注とメチルプレドニゾロン（MP）5 mg/kg 腹腔内注を行った。移植 3 週後に開腹の上移植腎臓を蛍光実体顕微鏡下で観察した。その後回収した検体は 4℃ 4%PFA に 3 時間浸漬後、20%スクロース／PBS に一晩浸漬し、OCT コンパウンドで包埋した。8μm で薄切して凍結切片を作製し、HE 染色、免疫染色および電子顕微鏡観察にて組織学的評価を行った。

5. 再生ネフロンの濾過能評価

再生ネフロンの濾過能評価のため、検体回収の 1 時間前にホストラットに尾静脈から蛍光標識デキストラン（テトラメチルローダミン標識 1 mg/body）の投与を行った。組織回収後、上記と同様に凍結切片とし、蛍光デキストランの検出を行った。

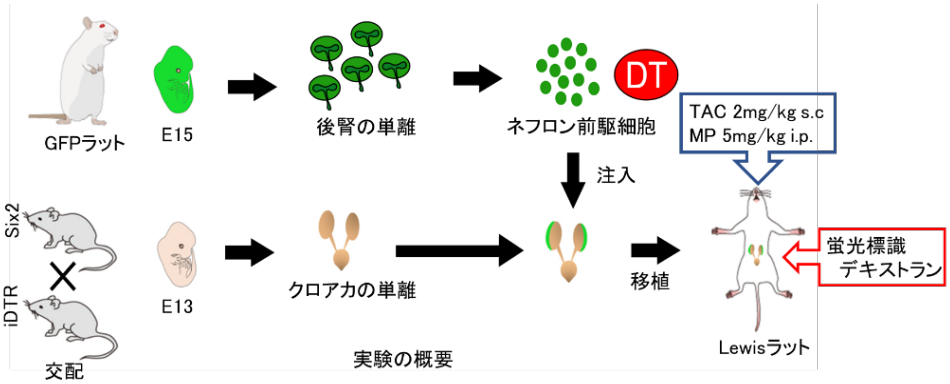


図 1. 実験の概要図

結　果

1. 異種間での *in vivo* 腎臓再生

TAC 2 mg/kg/day s.c.および MP 5 mg/kg/day で免疫抑制をかけた LEW ラットをホストとして、GFP ラット腎前駆細胞を移植した Six2-iDTR マウス胎仔後腎を移植した。移植 3 週間後にはクロアカの発育を認め、GFP を広範に発現した後腎を認めた（図 2a）。発育した後腎にはホストラットからの血管侵入が観察された（図 2a、矢印）。回収検体の切片を観察したところ、GFP を発現した移植細胞由来の糸球体、尿細管の再生を確認できた（図 2b）。また GFP 発現とマージする ECAD 陽性の遠位尿細管、Megalin 陽性の近位尿細管、そして Nephrin 陽性糸球体と移植したラット細胞由来のネフロン構造が確認できた（図 2c）。電子顕微鏡では糸球体足細胞によるスリット構造、尿細管刷子縁などの腎微細構造も再現されていることを確認した（図 2d）。糸球体係蹄内には赤血球の存在を確認した（図 2d）。すなわち Six2-D Six2-DTR マウス腎発生ニッチを利用してラット体内でラットネフロンの再生に成功した。

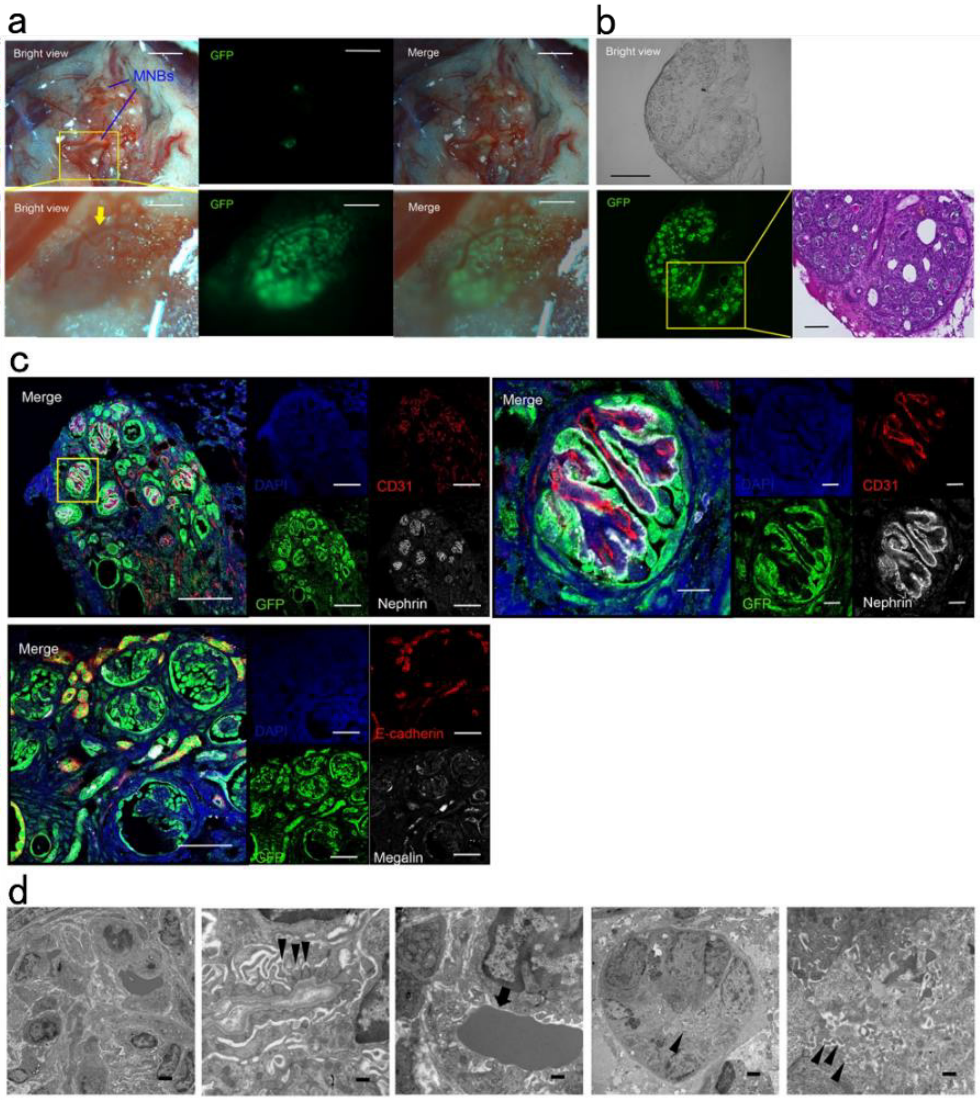


図 2. 異種間での *in vivo* 腎臓再生

a) 移植 3 週後の評価。後腎の発育を認め、後腎には広範に GFP が発現している。黄色矢印はホスト血管の侵入を示している（スケールバーは、上図：2 μm、下図：250 μm）。

b) GFP 陽性の糸球体、尿細管構造を腎全体に認める。HE 染色像では糸球体、尿細管の再生を認める（スケールバーは、左図：300 μm、右下図：100 μm）。

c) GFP 陽性かつ Nephrin 陽性の糸球体を認める。糸球体内にはホストより CD31 陽性血管内皮が侵入している。GFP 陽性かつ Megalin 陽性の近位尿細管、E-cadhelin 陽性の遠位尿細管を認める（スケールバーは、左上図：100 μm、右上図：10 μm、左下図：50 μm）。

d) 再生糸球体において足細胞によるスリット構造を認める。また係蹄内に赤血球を認める。再生尿細管には刷子縁が観察される（スケールバーは、左図：2 μm、左から 2 番目図：500 μm、中央図：500 nm、右から 2 番目図：2 μm、右図：500 nm）。

2. 再生ネフロン濾過能の証明

再生腎臓を移植したラットに蛍光標識したデキストランを静脈投与すると、再生糸球体のボウマン腔や尿細管腔内に移行することが確認された（図 3）。つまりラット移植細胞より再生したネフロンとホストラットの血管が機能的に結合し、濾過能を有することが示された。

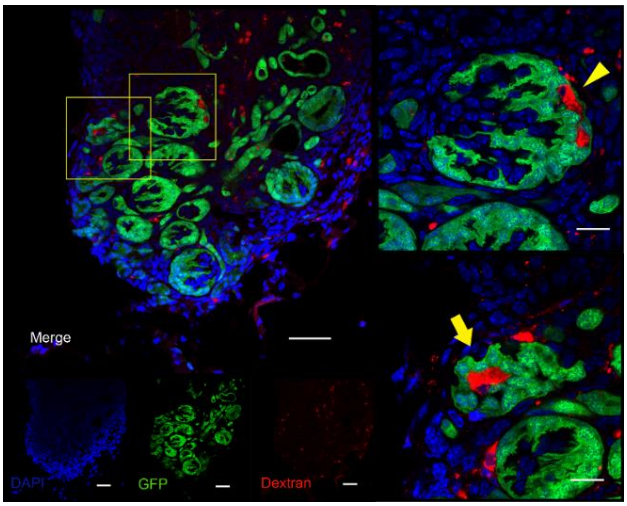


図 3. 再生ネフロンの濾過能評価

再生糸球体ボウマン腔および尿細管腔内にデキストランの集積を認める。これは再生ネフロンの濾過能を示す（スケールバーは、左図：50μm、右上・右下図：10μm）。

考　察

我々の最終目標は自己のヒト幹細胞から生体内で機能を果たす腎臓の再生である。そして本研究の目的は前駆細胞置換法を用いラットーマウスの異種間であっても *in vivo* で再生腎が生着および発育・再生、そして尿の産生が可能かを検証することであった。そこでジフテリアトキシン（DT）投与によってネフロン前駆細胞（NPC）だけを除去させるトランスジェニックマウスを用い、E13.5 日目の胎生期腎臓（後腎）の腎皮膜下に、後腎とは異種であるラットから抽出したラット NPC を移植した（図 1）。ラットの腎前駆細胞が移植されたマウスの後腎を再生用腎芽と呼び、さらにその腎芽を成獣ラットの後腹膜へと移植した。移植は通常の腎移植とは異なり、後腹膜に数 mm のポケットを作りその腔に腎芽を置いてくるだけである。マウスの後腎部分が異種となるためホストの成獣ラットには本手法に適正化した投与量の免疫抑制剤を使用した。移植 3 週間後の再生用腎芽内部には移植細胞由来のラットネフロンを認めた。組織学的解析では、これまで *in vitro* では確認できなかった糸球体内に上皮細胞を裏打ちする形で存在する血管内皮細胞を認め、さらに電子顕微鏡で係蹄内に赤血球の存在を認めたことから血流の存在も示唆された。さらに、ラット成獣に糸球体基底膜を通過可能な蛍光標識デキストランを投与したところ、再生糸球体のボウマン腔内にデキストランを認め、再生糸球体に濾過能があることが示された（図 3）。また、興味深いことに糸球体内に見られた血管は GFP を発現しておらず、マウス胎生腎臓内の間質前駆細胞や血管前駆細胞などに由来するのか、ホスト動物側からの由来かはまでは区別できなかったが、移植細胞由来ではないことが確認できた。今後さらに種特異的な免疫染色等での検討を重ね再生糸球体の血管系譜解析にも迫りたい。

本結果から異種の腎臓を再生の足場にホストの尿が産生可能なネフロン再生を示すことができた。将来的にはブタの腎臓を足場に、ヒトの iPS 細胞から誘導した NPC を使いヒト腎臓再生へ繋げることを考えている（図 4）。近年 CRISPR-Cas9 等のゲノム編集技術の発展によりマウス以外の動物での遺伝子編集が比較的容易となった。我々は *Six2* 遺伝子に着目し、ブタのネフロン前駆細胞だけを特定の薬剤によって除去するシステムの導入に着手している。異種が含まれるキメラ臓器を用いたヒト腎臓再生は、適切な免疫抑制プロトコール設定や感染などの安全性確保、

倫理面などまだ多くの課題が残る。しかし、我々が提案する動物内での腎臓再生手法による、ラットーマウスでのげっ歯類異種間モデルを用いた機能腎再生の実証は、ヒト腎臓再生へ向けた基盤的な知見になると考える（図 4)。また本成果は、ヒト iPS 細胞を用いた薬剤毒性試験や病態解析などの *in vivo* 評価系としても展開可能と考える。

一連の研究結果は論文として取りまとめ、国際科学雑誌に投稿して受理された（Fujimoto T, Yamanaka S, et al., 2019, Sci Rep)。

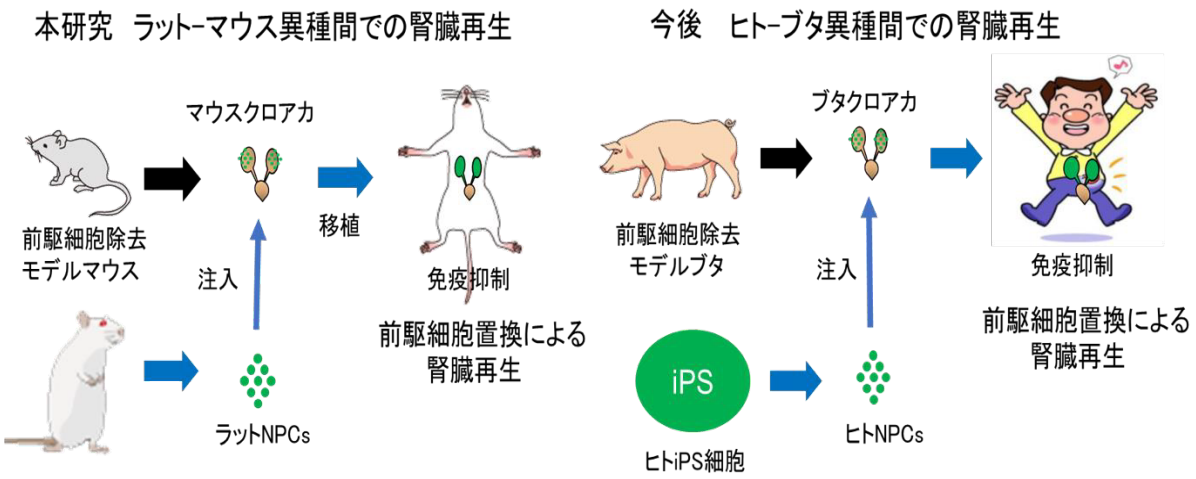


図4.　ヒト腎臓再生への展望

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学内科学講座腎臓・高血圧内科の横尾隆教授、松本啓、田尻進、齋藤弥積大学院生、松本直人大学院生、再生医学研究部の岡野ジェイムス洋尚教授、藤本俊成大学院生、高村毅大学院生である。

文　献

1) Yokoo T, Ohashi T. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 1;102(9):3296-300. Epub 2005 Feb 22. PubMed PMID: 15728383; PubMed Central PMCID: PMC552897.

2) Yokoo T, Fukui A. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. J Am Soc Nephrol. 2006 Apr;17(4):1026-34. Epub 2006 Mar 8. PubMed PMID: 16524947.

3) Yokote S, Matsunari H. Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Oct 20;112(42):12980-5. doi: 10.1073/pnas.1507803112. Epub 2015 Sep 21. PubMed PMID: 26392557; PubMed Central PMCID: PMC4620909.

4) Yamanaka S, Tajiri S. Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. Nat Commun. 2017 Nov 23;8(1):1719. doi: 10.1038/s41467-017-01922-5. PubMed PMID: 29170512; PubMed Central PMCID: PMC5701015.

5) Fujimoto T, Yamanaka S. In vivo regeneration of interspecies chimeric kidneys using a nephron progenitor cell replacement system. Sci Rep. 2019 May 6;9(1):6965. doi: 10.1038/s41598-019-43482-2. PubMed PMID: 31061458; PubMed Central PMCID: PMC6502858.