

腎組織の構築・再生技術

大阪工業大学工学部生命工学科, 大阪工業大学大学院工学研究科化学・環境・生命工学専攻

崎山 亮一

Ryoichi SAKIYAMA



1. はじめに

本邦の総人口は2018年に1億2,644万人, 内65歳以上は3,558万人(総人口に占める割合: 28.1%), 75歳以上では1,798万人(14.2%)に達した¹⁾。第二次世界大戦直後に比べて, 物資に恵まれた豊かな生活, 公衆衛生の発達, 医療の充実, 学歴社会が浸透している現在の本邦は, 0~18歳を年少人口, 19~74歳を生産年齢人口, 75歳以上を高年齢者人口としても, 高齢社会に突入している。高齢化とともに健康の問題が浮上するが, その一つである慢性腎臓病(CKD)患者は, 糖尿病, 腎炎, 腎硬化症など様々な疾患により腎機能が低下する疾患であり, 本邦のCKDのstage 3以降は約2,000万人と推定されている²⁾。すなわち, 6人に1人はCKD stage 3以降であり, 現在の医学では, 腎機能低下の進行を緩和することは可能であるが, 限られた治療しか行えず, 根治するには腎移植以外は難しい。しかし, 本邦の2018年度腎移植は1,865例³⁾とドナー不足は顕著である。一方, 腎機能低下がさらに進行した慢性腎不全患者は2018年末339,841人に達した⁴⁾, その治療法(血液透析, 腹膜透析)に関わる医療費は年間1兆6,000億円に上ると推計され, 総医療費の約4%を占める。このCKD stage 3で腎機能が回復すれば, 患者のquality of life (QOL)が向上するだけでなく医療経済の負担も大幅に軽減され, 社会的意義も大きい。

そこで, 腎不全(腎傷害)の新規治療法として, 多能性幹細胞(PSC)あるいは腎組織工学手法を用いた腎組織の構築・再生が注目されている。本稿では, 近年のこれらの研

究(図1)について論じる。

2. 腎前駆細胞による腎臓再生

中間中胚葉に由来する腎臓は, ネフロン前駆細胞(NPC)と間質前駆細胞, 尿管芽(UB)を含む多能性をもった前駆細胞集団である後腎間葉間の相互作用を介して発達する後腎から発生する。この後腎の尿管芽分岐形態形成に関わる成長因子の一つに, 後述する肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)がある。

近年, 多能性幹細胞からの腎臓の再生は目覚ましい進歩を遂げ, 後腎の発生を要約することにより, Taguchiらはヒト人工多能性幹細胞(h-iPSC)からNPC⁵⁾, MaeらはUB⁶⁾を分化誘導することに成功した。ただし, 腎臓の発生は非常に複雑なプロセスであるため, NPC, 間質前駆細胞, UBを腎臓の発生に適切な比率で時空間的に組み合わせる必要がある。しかし, 間質前駆細胞はまだPSCから生成されておらず, *in vitro*でPSCから腎臓全体を生成するにはまだ時間がかかる。近年, 機能的な腎臓全体を生成するために, ヘテロ接合胚を臓器工場として使用する「器官形成ニッチ法」を採用し, 前駆細胞による腎形成が試みられている。

Yamanakaらは, h-iPSC由来NPCを遺伝子改変ブタの腎形成帯に正確に注入し, ネイティブのNPCを時間および組織固有の方法で排除できるシステムを確立した。腎性ニッチ内のSix2(+) NPCの除去と, ドナー細胞による移植されたNPCの完全な置換に成功した。これらのNPCは成熟した糸球体および腎尿管管に発達し, 生体への移植後, 血流が観察された。この人工ネフロンは, 異なる種のNPCを使用して取得することができる⁷⁾。次に, ヒト胎児において腎臓だけでなく尿排泄経路を一緒に作っていく過程を, 丸ごとブタの大網の中で再生させる, すなわち, NPCだけではなく腎臓, 尿管, 尿排泄腔までを, ひとつかたまりで再

■ 著者連絡先

大阪工業大学工学部生命工学科
(〒535-8585 大阪府大阪市旭区大宮5-16-1)
E-mail. ryoichi.sakiyama@oit.ac.jp

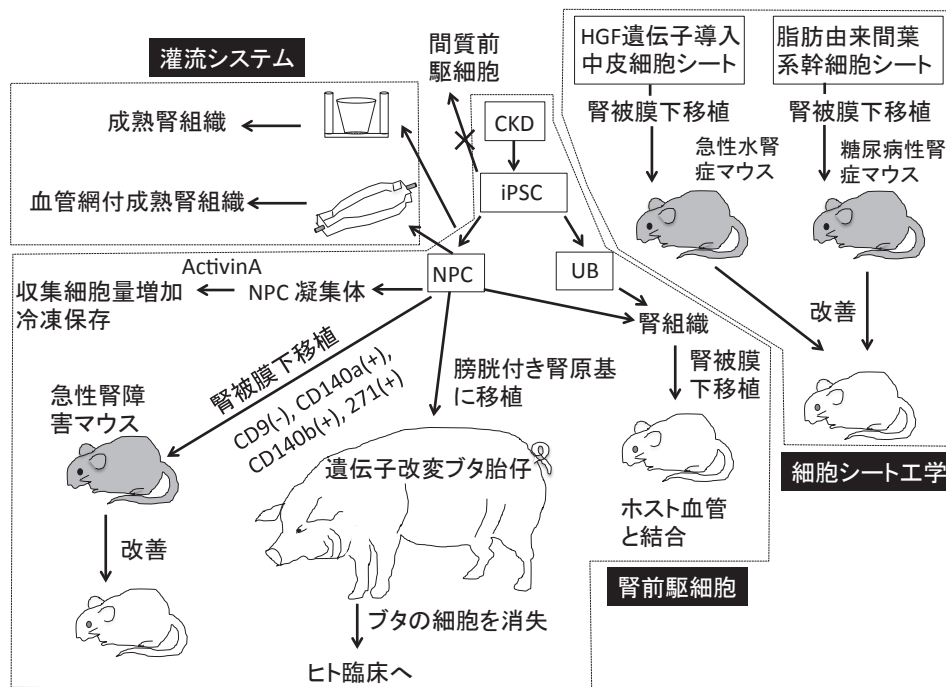


図1 腎組織の再生・構築技術

CD, human cell differentiation molecules; CKD, chronic kidney disease; HGF, hepatocyte growth factor; iPSC, induced pluripotent stem cell; NPC, nephron progenitor cell; UB, ureteric bud.

生させることを試みた。両側の腎臓を摘出して、作製したNPCと尿排泄腔を大網に植えつけ、一定期間経過後、成熟した腎臓にその動物の元々の尿管を繋ぐ手術を行い、尿が生成されて排泄されるところまで成功した⁸⁾。また、細胞種としてh-iPSCを患者から採取し治療に用いるには、非遺伝性疾患によるCKDの患者に由来するiPSCが腎臓を生成する能力を持っているかどうかの評価が不可欠である。そこで、糖尿病性腎症(DN)および糸球体腎炎による血液透析を受けている患者からiPSC(HD-iPSC)を生成し、評価した。HD-iPSCは健康人のiPSC(HC-iPSC)と同様の効率でNPCに分化した。さらに、HD-iPSC由来のNPCは、HC-iPSC由来のNPCと同等のレベルのNPCマーカーを発現し、マウス移植時に血管新生糸球体に分化した。疾患患者由来のiPSCは、腎臓再生のための細胞源として期待できる⁹⁾。これらの結果をふまえ、以下の手順で臨床試験を進めている。①患者由来のヒトiPS細胞からNPCを誘導する。②遺伝子改変ブタ胎仔の膀胱付き腎原基にNPCを注入する。③NPCを注入した膀胱付き腎原基を患者に移植し、臓器初期発生プログラムを遂行させる。④腎原基を移植した患者に尿路形成術を行い、機能的腎臓を実現する。

一方、長船らは、h-iPSCから別個に分化誘導されたそれぞれの腎前駆細胞から腎組織を作製することは難しいことから、h-iPSCからNPCとUBそれぞれに分化する培養シ

テムを構築することに成功した。具体的には、h-iPSCから作製したNPとUBを*in vitro*で共培養させることで糸球体、尿細管などのネフロンの特徴を有した組織と集合管を連結させた腎組織を作製することに初めて成功した。さらに、マウスの腎臓被膜下に移植したiPS由来腎組織が血管と繋がり、結合した血管が機能していることを確認した。h-iPSCから選択的に分化させた複数の腎前駆細胞から腎組織を作製することに成功したことで、ヒト腎臓の発生生物学の新たな知見と腎臓疾患の仕組みの解明に繋がり、今後、腎臓の再生医療に向けた研究に大きく貢献できることが期待される¹⁰⁾。さらに、遺伝子改変せずにhESC/iPSCから誘導した腎前駆細胞の分離方法を確立するために、細胞表面マーカー、OSR1(+), Six2(+), 腎前駆細胞を濃縮できる4つのマーカーCD9(-), CD140a(+), CD140b(+), CD271(+), の組み合わせを特定した。これらの分離細胞は、細胞治療(腎臓被膜下へ移植)に使用した場合、急性腎傷害(AKI)マウスモデルの腎傷害(血中生化学値、ネクロシスや消失、腎線維化など)を改善した。腎臓疾患に対するh-iPSCベースの細胞療法および疾患モデリングの開発に期待される¹¹⁾。

他方、h-iPSCから分化誘導した細胞を治療に用いるためには、大量培養法と凍結保存法の確立が必要である。そこでTanigawaらは、h-iPSCから誘導されたNPCを凝集体で

増幅させる因子として、Wnt, fibroblast growth factor (FGF), leukemia inhibitory factor (LIF), ActivinAを加えることにより、1週間で従来法のコントロールに比べて5倍に細胞量が増え、分化された凝集体NPCは90%以上の高効率を維持できる培養法を確立した。しかも、凍結保存後も機能を維持することに成功したことで、h-iPSCから腎前駆細胞を誘導する2週間の時間を省略し、腎前駆細胞誘導法の技術を習得せずとも腎臓組織を作ることが原理的に可能であることを見いだした¹²⁾。腎臓再生へ、細胞種、細胞増殖、凍結保存、培養法、移植、機能維持と技術が向上し、臨床応用が現実化されている。

3. 細胞シートによる腎臓再生

生体組織工学(tissue engineering)は細胞、足場となる細胞外マトリックス(ECM)、増殖因子を組み合わせて、臓器の機能を代替え、補助、あるいは改善する。増殖因子の一つであるHGFは、慢性硬化性疾患に対して強力な改善・治癒作用をもつことが知られている。慢性腎不全を自然発症するICGNマウスに、リコンビナントHGFを連日4週間投与した結果、HGFを投与したマウスの腎臓においてはtransforming growth factor- β (TGF- β)の発現が強く抑制されるとともに、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの蓄積や尿細管細胞のアポトーシスが抑制される一方、尿細管細胞の増殖・再生が促進された。さらにHGFを投与したマウスでは、投与開始時に比べ腎組織が正常に近い状態に回復するとともに腎機能の改善が見られた¹³⁾。このような細胞あるいは因子などを疾患部に到達させることは容易であっても、貯留させることは難しい。実際、投与した因子の数%しか効果がなく、高い治療効果を得るには大量の因子を投与する必要がある。そのため、調整時間、コスト、労力などの増大と副作用が問題となる。この解決策の一つとして、我々は温度感受性培養皿を用いた細胞シート工学と遺伝子治療に着目した。HGFを遺伝子導入したヒト中皮細胞株を温度感受性培養皿にて培養し、HGFを徐放する中皮細胞シートの作製に成功した。このHGF遺伝子導入中皮細胞シートを、急性水腎症マウスの被膜を除去した腎臓に移植した。シート無群、中皮細胞シート群では腎傷害が時間経過とともに拡大し、腎肥大の進行がみられたが、HGF中皮細胞シート群で、腎傷害からの大幅な改善が示された¹⁴⁾。コラーゲンの沈着を示すシリウスレッド、筋線維芽細胞を示す α 平滑筋アクチン(α SMA)は、移植後28日目までシート無群、中皮細胞シート群でそれぞれ約37.5%、約20.4%の陽性であったのに対し、HGF中皮細胞シート群で約4.2%、2.6%であり、 $P < 0.01$ でどちら

も有意に低下した。一方、尿管結紮に伴う体重あたりの腎体積は、シート無群、中皮細胞シート群：21~28 mm²/g vs. HGF中皮細胞シート群：約5 mm²/gと有意に低下した。また、腎実質の厚みは、約1.1 mm vs. 8.8 mmと約8倍の差があり、HGF中皮細胞シート群で有意に厚みを維持した。さらに、腎血流量は、平均で約1.0 ml/min以下であったのに対し、HGF中皮細胞シート群は約3.7 ml/minであり、有意に維持された。HGF中皮細胞シートによる強力な線維化の抑制、腎構造の維持が示された。

また、関連研究では、脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)移植が、DNの有望な治療法であることから、ASC細胞シートを作製し、DNラットモデルの腎被膜下に移植した。ASCシート群は、移植後腎被膜下に14日間生存した。さらに、アルブミン尿および尿中TNF α のレベルは、偽手術およびASC懸濁液を静脈内投与した群よりも、ASCシート群で有意に低かった。組織学的に、ASCシート群は、近位尿細管の軽度の萎縮を示し、腎尿細管構造を維持した。ASCシート群では移植効率が向上し、腎傷害の進行が抑制された。ASCシート技術はDNの有望な新しい治療法になる可能性がある¹⁵⁾。細胞シート工学が腎不全の有意義な治療法の一つとして期待される。

4. 灌流システムを用いた腎オルガノイドの作製

Tissue engineeringのアプローチから、*in vitro*でh-iPSCから高機能化した腎オルガノイドを構築する際、培養システムの培地流れに着目した研究も進められている。静的(流れのない)培養では栄養不足と排出物の蓄積が問題となることから、Sekiyaらは、安定した微小環境、継続的な栄養素の供給、および廃棄物の除去を備えた気液界面灌流培養システムによるh-iPSCから腎オルガノイド作製を行った¹⁶⁾。多孔質膜上に播種したオルガノイドの下に灌流された培地が、オルガノイド全体に拡散して気液界面を維持した。灌流された培養液の低流量(2.5 μ l/min)では、尿細管形成に関連する細胞骨格および基底膜の再編成を促進したが、高流量では(10 μ l/min)減少した。本灌流システムは、適切な灌流条件で、成長因子の拡散と組織構築を変更することで、腎オルガノイドの組織化を加速させ、腎オルガノイドの上皮細胞および組織の組織化を*in vitro*で加速させた。

一方、ヒトiPS細胞由来する腎オルガノイドは、静的培養ではほとんど無血管で未成熟な糸球体および管状であった。Homanらは、分化誘導11日目から1.5% fetal bovine serum (FBS)、共培養なし、足場となるECMにgelatin-fibrin、培地にARPMIを用いて10日間静的培養を行

うことで成熟した血管網付腎オルガノイドの生成に成功した。さらに、腎オルガノイドにかかる剪断応力を11日目から12日目は ~ 0.0001 dyn/cm², 12日目から21日目までは $0.008 \sim 0.035$ dyn/cm²にした結果、管状上皮細胞と有足細胞の付随する形態形成とともに、豊富な血管と糸球体区域の成熟で有意な増強を示した。剪断応力は、生物学的発見を促進する重要なパラメータであり、ECM, 流量条件, 培地の構成成分, 増殖因子など、総合的にオルガノイド形成に影響を与える。開発した流体チップを利用した腎臓オルガノイド形成法は、腎臓オルガノイド内に形成された微小血管ネットワークが灌流可能であることをまだ保証していないが、*in vitro*で、器官形成、腎毒性、尿管細管および糸球体疾患、および腎臓再生を調査するための新しい道を拓くことが期待される¹⁷⁾。

5. おわりに

三十数年前までは、成熟した細胞を未分化の細胞に戻すことや腎臓の再生は不可能と思われていた。しかしながら、研究者達の並々ならぬ情熱と努力、不屈の精神により腎臓発生の機序が徐々に解明され、そこに生体の環境を模倣したtissue engineeringが加わることで、不可能と考えられていた腎不全治療に、大きな光が差し込んでいる。すなわち、腎不全の進行を食い止めることが厳しい現治療法を糧に探求し続け、新しい治療法にチャレンジすることで、腎臓再生による延命あるいは根治治療が現実になろうとしている。腎再生療法により、患者のQOL向上と社会復帰が容易になり、健康寿命に腎不全患者の余命が少しでも近づけることを期待する。1953年にDNAの分子構造が発見され67年の時が流れたバイオテクノロジーは、tissue engineeringなど、さらなる新しい他分野技術との融合により日進月歩の進展をとげ、さらなる発展による医療への貢献が望まれる。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) 内閣府：令和元年版高齢社会白書，2019
- 2) 今井圓裕，堀尾 勝：特集：慢性腎臓病（CKD）—日本人における慢性腎臓病（CKD）の現状—。日腎会誌 **48**: 703-10, 2006
- 3) 日本臨床腎移植学会・日本移植学会：腎移植臨床登録集計報告（2019）。2018年実施症例の集計報告と追跡調査結

- 果，2019
- 4) 日本透析医学会：わが国の慢性透析療法の現況（2018年12月31日現在）。<https://docs.jsdt.or.jp/overview/index.html> Accessed 2 Sep 2020
- 5) 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
- 6) Mae SI, Ryosaka M, Toyoda T, et al: Generation of branching ureteric bud tissues from human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **495**: 954-61, 2018
- 7) Yamanaka S, Tajiri S, Fujimoto T, et al: Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat Commun* **8**: 1719, 2017
- 8) Yokote S, Matsunari H, Iwai S, et al: Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 12980-5, 2015
- 9) 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* **8**: 14919, 2018
- 10) Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, et al: A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages from Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* **31**: 107476, 2020
- 11) Hoshina A, Kawamoto T, Sueta SI, et al: Development of new method to enrich human iPSC-derived renal progenitors using cell surface markers. *Sci Rep* **8**: 6375, 2018
- 12) Tanigawa S, Naganuma H, Kaku Y, et al: Activin Is Superior to BMP7 for Efficient Maintenance of Human iPSC-Derived Nephron Progenitors. *Stem Cell Reports* **13**: 322-7, 2019
- 13) Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, et al: Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* **101**: 1827-34, 1998
- 14) Oka M, Sekiya S, Sakiyama R, et al: Hepatocyte Growth Factor-Secreting Mesothelial Cell Sheets Suppress Progressive Fibrosis in a Rat Model of CKD. *J Am Soc Nephrol* **30**: 261-76, 2019
- 15) Takemura S, Shimizu T, Oka M, et al: Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cell sheets directly into the kidney suppresses the progression of renal injury in a diabetic nephropathy rat model. *J Diabetes Investig* **11**: 545-53, 2020
- 16) Sekiya S, Kikuchi T, Shimizu T: Perfusion culture maintained with an air-liquid interface to stimulate epithelial cell organization in renal organoids in vitro. *BMC Biomed Eng* **1**: 15, 2019
- 17) Homan KA, Gupta N, Kroll KT, et al: Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat Methods* **16**: 255-62, 2019