腎臓を創る

西中村 隆一

Key words 腎臓再生, ネフロン前駆細胞, 尿管芽, iPS細胞

はじめに

腎不全による人工透析患者数は増加の一途をたどって32万人となり¹⁾, その医療費は年間1.5兆円を超えている。腎移植が腎不全の唯一の根治的治療だが, ドナー不足に悩まされている。このような現状の一方で, 腎臓のような三次元臓器を作成することは極めて困難とされてきた。実際, 文部科学省のヒトiPS (induced pluripotent stem) 細胞研究のロードマップでも腎臓の再生は全ての臓器の中で最後に位置付けられている。しかし, ここ数年, 複数のグループがiPS細胞からヒト腎臓組織の誘導に成功し, 腎臓を作成することは夢物語ではなくなりつつある。少量の血液からiPS細胞が簡単に作製できるようになった現在, 患者由来のiPS細胞から腎臓組織を作製して病態を再現し, 病因を解明して治療薬を探索する戦略も視野に入ってきた。本稿では, 腎臓発生・再生研究の最近の進展と今後の展望を述べる。

1. 糸球体と尿細管を創る

1) 胎児期に存在するネフロン前駆細胞とその起源

ネフロンは腎臓の最小機能単位であり, 糸球体, 近位尿細管, Henleのループ, 遠位尿細管, 集合管から構成される。そして, 腎臓は100万個ものネフロンが集まった複雑な臓器である。しかし, 元をたどると, 腎臓は, ネフロン前駆細胞, 尿管芽, 間質前駆細胞というわずか3つの前駆細胞集団から作られている (図1)。ネフロン前駆細胞は尿管芽からの作用によって上皮化して糸球体と尿細管を形成する。一方で, 尿管芽はネフロン前駆細胞からの作用によって分岐して集合管・尿管となり, 尿の排出路を形成する。そして, 間質前駆細胞は間質 (糸球体メサンギウムを含む) に分化する。ネフロン前駆細胞という語句は, 糸球体と尿細管にのみ分化するという意味では正確ではないが, 狭義の意味で頻用されている。

熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野

114th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Educational Lecture : 4. Creating the kidney *in vitro* and *in vivo*.

Ryuichi Nishinakamura : Department of Kidney Development, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Japan.

本講演は, 平成29年4月14日 (金) 東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

図1 腎臓を形成する3種類の前駆細胞

胎児期に存在するネフロン前駆細胞，尿管芽，間質前駆細胞から腎臓は形成される。

糸球体と尿細管を作るには，ネフロン前駆細胞を作る必要がある。では，そのネフロン前駆細胞はどのように作れば良いのだろうか。そのためには，ネフロン前駆細胞の前駆細胞を探す必要がある。我々は，遺伝子改変マウスを使った細胞系譜追跡によって，ネフロン前駆細胞の祖先が胎生8.5日のマウスの後端部に未分化な中胚葉として存在することを見出した²⁾。興味深いことに，尿管芽の祖先は，それよりやや頭側に存在する前方中間中胚葉に存在していた。つまり，腎臓は，発生早期に系統分離した2つの細胞集団が後日，再会して相互作用してでき上がることになる。

2) ヒトiPS細胞からの糸球体と尿細管の誘導

では，マウス胎仔後端部の未分化中胚葉は何から作れば良いか。ここで使うのがES (embryonic stem) 細胞である。ES細胞は胚盤胞（子宮着床前の受精卵）から樹立された細胞株であり，他のマウスの胚盤胞に注入すると，ホストと混ざってキメラマウス個体に寄与することができる。つまり，生体内では，身体中の全ての細胞になる能力を持っている。よって，試験管内での培養条件を最適化すれば，理論的にはあらゆる細胞種に分化させられるはずである。ちなみに，このES細胞様の細胞を，胚盤胞からではなく，線維芽細胞に4つの転写因子を導入して作られたのがiPS細胞である。我々は，マウス

の腎臓発生を忠実になぞることによって，マウスES細胞から胎仔後端部の未分化中胚葉，そして，ネフロン前駆細胞を経由して，糸球体と尿細管を試験管内で誘導することに成功した。さらに，ほぼ同様のプロトコルを用いて，ヒトiPS細胞からも糸球体と尿細管を誘導することができた²⁾。長年不可能であったヒト腎臓組織の試験管内誘導がついに実現したわけである。

3) ヒトiPS細胞由来の糸球体と血管の接続

糸球体は腎臓のろ過機能を担っており，ポドサイト，血管内皮細胞，メサングウム細胞から構成される。ポドサイトは基底膜側に多数の複雑な突起（足突起）を持ち，その間にはスリット膜と呼ばれる分子の篩^{ふるい}が存在する。これによって血液中の水分は通り抜けるが，血中蛋白質の大部分は尿に漏れないようになっている。このスリット膜の主な成分はネフリンである。そこで，我々は，誘導ポドサイトを可視化できるように，ネフリンの遺伝子座に緑色蛍光蛋白質（green fluorescent protein : GFP）を挿入したヒトiPS細胞を作製した³⁾。これからポドサイトを単離して，遺伝子発現を解析すると，生体のポドサイトで重要な働きを持つことが知られている多くの遺伝子が発現していることが判明した。

しかし，誘導した糸球体ポドサイトは形態的にはまだ未熟であり，その原因の1つとして，ポドサイトが本来相互作用すべき細胞，つま

図2 ヒトiPS細胞由来の腎臓組織

- A：試験管内で作製した緑に光るヒト腎臓組織。丸い一つひとつが糸球体。
 B：マウスへの移植によって血管を取り込んだヒトiPS細胞由来の糸球体。内部に多数の赤血球（矢尻）が見られ、拡張した腔内にはろ過を示唆する物質（*）が存在する。
 C：マウス血管（緑色）がポドサイト（桃色）の間に入り込んでいる。
 D：ポドサイトの細胞突起間に形成されたる過膜構造（矢印）。

り、血管内皮細胞と接していないことが考えられた。生体のポドサイトは血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor：VEGF）等の分泌によって血管内皮細胞を引きつけることができる。そこで、ヒトiPS細胞由来のネフロン前駆細胞に1日だけ分化誘導をかけた後に免疫不全マウスに移植すると、20日目には、ヒトの糸球体に多数のマウス血管が入り込んだヒト糸球体が観察された³⁾。さらに、ポドサイトの突起は複雑化し、スリット膜様構造が電子顕微鏡で観察された（図2）。また、スリット膜の下流にあたる糸球体の管腔（Bowman嚢）は拡張し、沈殿物の堆積が認められ、血液からのろ過を示唆する所見と考えられた。ヒトiPS細胞由来の腎臓糸球体が生体の血管とつながった報告はこれが初めてである³⁾。

2. 機能を持つ腎臓を創る

1) ヒトiPS細胞由来の尿細管の機能

現在、腎臓組織の誘導法は複数のグループから報告されている。これらには類似した部分と異なる部分があり、最終産物の質の違いの検討は今後の課題であるが、筆頭著者の多くが日本人であることは特筆すべきであろう。米国の森實らは、簡便かつ高効率なネフロン前駆細胞誘導法を提唱している⁴⁾。オーストラリアの高里らは、ネフロン前駆細胞に加え、尿管芽、間質前駆細胞という腎臓の全ての細胞系譜を有するヒト腎臓オーガノイドを試験管内で作製したと報告し、注目を集めた⁵⁾。これらの報告では、近位尿細管が再吸収能や抗がん薬による選択的

細胞死を示すこと、つまり、尿細管がある程度機能を獲得していることを示している。これらをさらに成熟させる方法が開発されれば、薬剤の毒性試験等への応用が期待される。

2) iPS細胞からの尿管芽の誘導

腎臓誘導の研究は急速に進んでいるが、どの報告も尿を作って流すことには成功していない。それは尿の排出路、つまり、集合管と尿管が形成されていないからであり、そのためには尿管芽の誘導が必須である。尿管芽は頻回に分岐し、その一つひとつの先端に糸球体と尿細管が接続する。分岐した尿管芽は、糸球体・尿細管から流れてくる尿を集合管として回収し、尿管という1つの出口に集める。こういった構造を試験管内で作れるかが次の課題になる。高里らは、ヒトiPS細胞から1つのプロトコルでネフロン前駆細胞と尿管芽を誘導したと報告しているが⁵⁾、尿管芽に典型的な分岐や単一の出口の形成は認められていない。前述のように、尿管芽とネフロン前駆細胞はマウスでは初期段階で系統分離していることから、尿管芽の誘導にはネフロン前駆細胞とは異なる条件が必要かもしれない。高里らが誘導できたと報告している第3の系譜である間質前駆細胞に関しても、どれくらい生体に近いかが今後の課題であろう。

3) 血管と血流をもつ腎臓組織へ

ネフロン前駆細胞、尿管芽、間質前駆細胞という3つに加えて、血管内皮細胞が有機的に再構築されることが機能的な三次元構造の形成には必須である。我々はヒトiPS細胞由来の糸球体に血管が接続することを示したものの、その血管は極めて細い。太い血管が腎動脈から腎臓髄質を経て皮質の糸球体へ入り、そこから出て、尿細管周囲に分布するのを再現することは、現時点では難しい課題である。しかし、腎臓の濾過機能にとって豊富な血流は必須であり、挑戦する意義は大きい。

3. 患者由来のiPS細胞を使った研究展望

近年、患者からのiPS細胞が比較的容易に樹立できるようになっていることから、疾患を試験管内で再現し、病態を解析し、さらには創薬へ応用しようとする試みが盛んに行われている。また、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9法によって、iPS細胞のゲノムに望みどおりに変異を入れられるようになり、患者サンプルを介さずとも病態を解析できるようになりつつある。腎臓領域においても、遺伝性の糸球体や尿管管疾患への応用が理論的に可能である。実際、ポドサイトでの遺伝子欠損や多発性嚢胞腎のモデル等が報告されている⁶⁾。しかし、現時点では誘導できる腎臓組織が未熟であり、それまでに発症する疾患でない症状を再現できない。より成熟した組織が誘導できるようになれば、再現できる疾患も飛躍的に増加すると期待される。

4. 腎臓を動物体内で創る

動物の体内で腎臓を作ろうとする試みもあり、腎臓を欠損するノックアウトマウスの胚盤胞に、正常なマウスES細胞を注入することによって、ES細胞由来の腎臓を作製したことが報告されている⁷⁾。しかし、使用したノックアウトマウスの特徴のために、ネフロン前駆細胞はドナーES細胞由来であるものの、尿管芽や血管はホスト由来であり、解決策が必要である。とはいえ、近年、遺伝子工学が進展し、ノックアウトラットやノックアウトブタが作製できるようになったため、1つの臓器を欠損するブタの胚盤胞にヒトiPS細胞を注入して臓器を作製しようという構想が出現している。実際、脾臓欠損ラットの胚盤胞にマウスES細胞を注入することで、ラット体内でマウス由来の脾臓を作製し、それを使って糖尿病モデルのマウスを治療できるという報告がなされている⁸⁾。また、脾臓を

欠損するブタを作製し、ブタ胚の細胞を使って膀胱を再構築する技術も確立された⁹⁾。しかし、ヒトiPS細胞をブタ胚盤胞に注入すると奇妙な生命体を作出してしまう可能性があり、倫理的な問題を抱えている。特に中枢神経系や生殖細胞へのヒト細胞の寄与は問題となるだろう。一方で、既に米国のグループがヒトiPS細胞をブタ胚盤胞に注入し、寄与率は低いながらも、ヒト細胞がブタ組織と共存するキメラ動物を作製したとの報告があり¹⁰⁾、波紋が広がっている。

おわりに

腎臓細胞の多能性幹細胞からの誘導は他臓器に比べ大きく遅れてきたが、発生過程の解析に立ち返ることで、ようやく胎児期相当の糸球体や尿管が誘導できる段階になった。しかし、実際の再生医療へと応用するためには、解決す

べき課題がまだ多く残されている。動物内で腎臓を作る方法にも技術的・倫理的問題が立ちふさがっている。とはいえ、腎臓を作ることは、もはや「夢物語」ではなく、到達可能な「目標」になったと言えよう。米国では、NIH (National Institutes of Health) が先導してReBuilding a Kidneyというコンソーシアムが立ち上げられている¹¹⁾。腎臓を作ることは確かに困難な課題だが、だからこそ、複数の研究室が連携して達成を前倒ししようとするものである。日本の研究者のいっそうの奮起を期待したい。

謝辞 本稿で紹介した成果に大きく貢献した太口敦博博士をはじめとする熊本大学発生医学研究所腎臓発生分野の新旧メンバーに深く感謝する。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) 日本透析医学会：わが国の慢性透析療法の現況（2015年末時点）
- 2) Taguchi A, 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.
- 3) Sharmin S, et al : Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol* 27 : 1778–1791, 2016.
- 4) Morizane R, et al : Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 33 : 1193–1200, 2015.
- 5) Takasato M, et al : Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 526 : 564–568, 2015.
- 6) Freedman BS, et al : Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 6 : 8715, 2015.
- 7) Usui J, et al : Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 180 : 2417–2426, 2012.
- 8) Yamaguchi T, et al : Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542 : 191–196, 2017.
- 9) Matsunari H, et al : Blastocyst complementation generates exogenic pancreas *in vivo* in apantecric cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 : 4557–4562, 2013.
- 10) Wu J, et al : Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 168 : 473–486, 2017.
- 11) Oxburgh L, et al : (Re)Building a Kidney. *J Am Soc Nephrol* 28 : 1370–1378, 2017.
- 12) 西中村隆一 企画：国民病「腎疾患」治療の光が見えてきた！腎臓のサイエンス。実験医学 34, 2016.