

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790794

研究課題名（和文） 恒久的なドナー腎臓再生を目標とした腎臓再生アッセイ法の開発と大型動物への応用

研究課題名（英文） Establishment of assay system of renal generation and development of livestock animal model for permanent production of donor kidney

研究代表者

臼井 丈一（USUI JOICHI）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70447340

研究成果の概要（和文）：腎臓の幹細胞・発生システムの解明により、腎臓移植医療の臨床実現化を長期的な目標とした恒久的なドナー臓器の作成方法の開発を行った。iPS細胞・ES細胞を用いたドナー臓器（腎臓・膵臓）作成方法の開発（Cell 2010、Am J Pathol 2012）に留まらず、幹細胞システム評価のための安定した腎臓分化のアッセイ系の確立、腎臓病発症研究への展開、大型動物への応用を目指し研究を遂行した。

研究成果の概要（英文）：I have progressed to develop how to produce donor kidneys using kidney stem cells and kidney developmental mechanism. I made studies of the production of donor kidney with iPS/ES cells, the establishment of in vitro assay for kidney differentiation, expansion to human kidney diseases and livestock animal experiment.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学、再生医学、幹細胞、腎移植、腎臓発生、糸球体腎炎

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全患者は依然増加している。先進諸国では腎移植が積極的に施行される傾向にあるが、全世界的に慢性的なドナー不足のため末期腎不全に陥ってから腎移植施行までの待機期間はむしろ延長しつつある。将来的な末期腎不全患者の増加に伴う施設や医療費などの医療環境に対応するためには十分量のドナー腎臓の確保は解決すべき深刻な問題であり、腎臓再生医療に求められる課

題である。

細胞移植や臓器移植といった形で再生医療を論じる上で、多分化能を有する幹細胞への期待は大きい。しかし、腎臓では体性幹細胞の同定はいまだ確定的でなく、一時盛んに研究された骨髄細胞の障害腎臓修復過程への寄与もさほど大きいものではないと判明しつつある。胚盤胞内部細胞塊より樹立されたES細胞は多分化能を持ち種々の細胞分化の研究に用いられ、*in vitro* でそれを特定の

細胞系譜に分化誘導する分化制御法の開発は再生医学研究のトピックである。ES細胞を用いた *in vitro* 分化研究では腎臓のような胚発生中期以降に複雑な組織形成へと向かう器官への分化は難しいことが知られている。哺乳類の成体腎臓である後腎は胚発生中期に中間部中胚葉より発生する。具体的には後腎間葉細胞と尿管芽上皮という2つのコンポーネントの相互作用により腎臓発生は始まり、最終的に数十種類という他臓器には見られない程の多種類の機能細胞への分化とそれらによる糸球体・尿管を中心とした複雑なネフロン構造の構成により、成体腎臓が完成する。腎臓の発生時期とその過程の複雑さから、*in vitro* でES細胞から腎臓を誘導することが非常に手間のかかる難仕事であることは容易に推察できる。また、最近の生物学研究の話題を独占しているiPS細胞の発明により、再生医学に対する関心は一段と高まりをみせている。幹細胞医療の臨床実現化を念頭に置いた際に、発達臓器の分化制御プロセスを詳細に解析し、幹細胞の再生プロセスに応用することは再生医学における重点課題である。

多分化能を有するES細胞を胚盤胞へ注入すれば産生個体はキメラマウスを形成する。*rag-2* ノックアウト (KO) マウスにこの技術を用いた胚盤胞補完 (blastocyst complementation) によるT細胞、B細胞系譜のレスキュー実験が過去に報告されている。このキメラマウス・アッセイは、*in vitro* アッセイ系の存在しないT細胞系譜の分化を確認する *in vivo* アッセイ系として広く用いられている。我々はこのアッセイを固形臓器の再生、欠損腎臓の新規作製方法に応用している。具体的には、後腎間葉細胞の異常により成熟腎臓が欠損する *sall1* (*spalt family gene*) KO マウスの胚盤胞に蛍光色素で標識したマウスES細胞を注入しキメラマウスを作成した。これらキメラマウスの胎仔から新生仔の腎臓(後腎)を解析した結果、*sall1* KO ホモ接合かつキメラマウスではネフロンの大部分を占める後腎間葉細胞由来細胞が蛍光標識陽性細胞で構成されていた。このことは、後腎間葉細胞がES細胞由来細胞でほぼ完全に置換されていることを意味しており、ES細胞由来のキメラ腎臓を作製することに成功した。

我々は腎臓欠損モデル動物にキメラ動物の作製に使用する blastocyst complementation を組み合わせるといった新たな手法を用いてES細胞由来の腎臓を作製したその成果を世界有数の学会を中心に現在公表している。この手法を用いることにより複雑なドナー臓器を確実に容易に作成可能になるという点で、再生医療実現化における本固形臓器作成方法の開発の意義は非

常に大きく、世界的な脚光を浴びつつある。しかし、この手法を実際の臨床実現化に導くためには、異種間キメラ個体の開発およびキメラ個体の制御、臓器欠損大型動物の作製、ヒトES細胞の安全性の確立、iPS細胞の応用など多くの課題が存在し、一つずつ解決する必要がある。

2. 研究の目的

腎臓の幹細胞・発生システムの解明により、腎臓移植医療の臨床実現化を長期的な目標とした恒久的なドナー臓器の作成方法の開発を行う。iPS細胞・ES細胞を用いたドナー臓器作成方法の開発 (*in vivo* アッセイ法)、幹細胞システム評価のための安定した腎臓分化のアッセイ系の確立 (*in vitro* アッセイ法)、腎臓病発症研究への展開、大型動物への応用を目指し研究を遂行した。

(1) 多能性幹細胞 (ES細胞・iPS細胞) を用いたキメラ腎臓の作成 (*in vivo* アッセイ系) : *In vivo* アッセイ系:iPS細胞研究は国家的なプロジェクトとなり、*sall1* KO マウスを用いたキメラ腎臓作成法をiPS細胞で行うことは国家的プロジェクトに大きく貢献することとなり、第一に実践すべき課題である。具体的には、Blastocyst complementation により初期胚に注入した幹細胞による欠損臓器の全ての置換が可能であることが証明されれば、A.成熟ネフロンへの分化能を有する幹細胞の同定を可能とすること(腎臓発生や幹細胞のアッセイ法としての有用性)、B.遺伝子改変幹細胞を使用することにより腎発生に重要な遺伝子の同定が可能となること、C.生理機能的、形態学的に複雑な腎臓を丸ごと作成する方法の開発へとつながること(ドナー腎臓の作成法の開発)等応用性の高い研究成果となる。また、大型動物への研究展開を目指し、ブタ腎臓特異的分子の解析・クローニングを進めている。

(2) マウス腎臓分化アッセイ系の開発と腎臓幹細胞の純化法の確立 (*in vitro* 実験) : 幹細胞医療の臨床実現化を念頭に置いた際に、発達臓器の分化制御プロセスを詳細に解析し、幹細胞の再生プロセスに応用することは再生医学における重点課題である。胎児腎臓(後腎間葉)の発生プロセスを解明するための研究基盤としてまず後腎間葉における幹細胞・前駆細胞レベルの高度かつ安定した純化方法の開発を必須である。分化プロセスへの幹細胞システムの導入を評価するにあたり、*in vivo* モデルだけではなく、クローナルな *in vitro* 腎臓分化アッセイ系の開発を目指し研究を遂行する。

(3) 幹細胞学研究のヒト腎臓病研究への応用(研究期間途中で追加した課題) : 腎臓幹細胞や腎臓発生の研究成果をヒントに、ヒト腎臓病発症メカニズム解明の研究へ展開して

いる。

3. 研究の方法

(1) 多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) を用いたキメラ腎臓の作成 (in vivo アッセイ系) : 幹細胞 (ドナー細胞 : ES 細胞、iPS 細胞) と腎臓欠損マウス (*sall1* 遺伝子ノックアウトマウス・ホモ接合体) との間でキメラマウスを作成することにより、腎臓を置換することが可能か否か検討する。また、大型腎臓欠損動物の開発を目標としてブタ・ホモログの cDNA (mRNA) クローニングを行う。また、マウスやヒトで実績のある腎臓形成性遺伝子である *SALL1* を候補遺伝子として腎臓欠損ブタの開発を目指す。

(2) In vitro アッセイ法 : Wnt4 遺伝子発現フィーダー細胞上でのマウス胎児腎臓前駆細胞の分化アッセイは当研究室ですでに再現可能となっている。自己作成した抗体を含む各種細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いマウス胎児腎臓細胞の発現パターンを解析し、それら複数の抗体の組合せを用いて、幹細胞・前駆細胞を高率に含む分画を純化する検討する。胎児腎臓における結果を踏まえ、成体腎臓の前駆細胞評価や ES 細胞・iPS 細胞などの多能性幹細胞の in vitro での腎臓作成へ応用を図る。

(3) 幹細胞学研究のヒト腎臓病研究への応用 : 腎臓発生や幹細胞の知見を元に、ヒト腎臓病へ応用展開する。腎臓血管形成のキー成長因子である VEGF の阻害薬に関連した腎臓病の臨床病理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) を用いたキメラ腎臓の作成 (in vivo アッセイ系 : ES 細胞、iPS 細胞と腎臓欠損マウスとの間でキメラマウスを作成すると、腎臓は ES 細胞あるいは iPS 細胞由来の細胞で置換できることを確認した。発達腎臓の in vivo アッセイ系の再現できたと同時に、再生医学的にはドナー腎臓を作成する一手法の開発に成功した。キメラ腎臓の後腎間葉に由来するネフロンはドナー細胞 (幹細胞) 由来であることを組織学的に確認した。キメラ腎臓の糸球体は血流を伴い、尿腔を形成し (機能面)、基底膜形成を含む正常な形態形成を確認した。本研究結果は国内外で高い評価を受け、論文は 2012 年の *Am J Pathol* に掲載された。さらに、このキメラ腎臓アッセイを活用した発達腎臓メカニズムの解析を実施し、腎臓血管は後腎以外に由来すること (angiogenic) を明らかにし、2012 年の日本腎臓学会学術総会で発表した。今後論文発表を予定している。腎臓以外の他臓器では、同様の実験手法を用いたキメラ腎臓の作成に成功し、すでに論文発表している (*Cell* 2010)。

また、大型動物、ブタへの応用展開に関しては、*SALL1* 分子の遺伝子クローニング、発現分布の確認を完了しており、腎臓欠損ブタ開発への作業を継続する予定である。

(2) マウス腎臓分化アッセイ系の開発と腎臓幹細胞の純化法の確立 (in vitro 実験) : 幹細胞・前駆細胞活性のある細胞群を判定する in vitro アッセイ系の再現にも成功した。低密度平面培養によるコロニー形成の確認がなされ、後腎間葉細胞群の中にこのアッセイ系に反応する細胞が存在していた。これまでに一部の細胞群を選別可能な接着分子等の表面マーカーを 6 種同定している。現在この解析成果を元に多重染色により組み合わせる細胞画分の選別を行い、幹細胞・前駆細胞活性のある細胞集団の判定作業を継続している。

(3) 幹細胞学研究のヒト腎臓病研究への応用 : VEGF 阻害薬による腎臓病 5 症例を集積し、臨床病理学的特徴を明らかにした。臨床症候の軽微な症例も含め、全例で血栓性微小血管障害を認めること、他の薬剤性尿細管障害など複合的な腎臓病を呈することを確認した。今後、アメリカ腎臓学会、論文での発表を予定している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Usui J, et al. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 2012; 180: 2417-2426, 査読有
DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.03.007

(2) 臼井丈一、山縣邦弘、腎疾患アプローチのための解剖生理、薬局、Vol.63、2012、pp.972-975、査読無

(3) 臼井丈一、研究の窓辺、血圧、Vol.18、2011、pp.1272-1273、査読無

(4) 臼井丈一、山縣邦弘、腎疾患アプローチのための解剖生理、薬局、Vol.62、2011、pp.538-541、査読無

(5) Kobayashi T, ... Usui J et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 142: 787-799, 査読有

(6) 臼井丈一、山縣邦弘、腎疾患アプローチのための解剖生理、薬局、Vol.61、2010、pp.500-503、査読無

[学会発表] (計 3 件)

(1) 西中村隆一、... 臼井丈一、他、遺伝子改変マウスを用いた腎臓再構築の試み、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜、横浜市

(2) 臼井丈一、他、腎臓欠損マウスに作成した iPS 細胞キメラ腎臓 (腎臓再生モデル) における脈管形成の解析、第 55 回日本腎臓

学会学術総会、2012年6月1日、パシ
フィコ横浜、横浜市

(3) 白井丈一、他、腎臓欠損モデルマウスと
blastocyst complementation を組み合わ
せたマウス ES/iPS 細胞由来腎臓の作成、
第15回分子腎臓研究会、2009年9月5日、
京都市

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名 称 : BLASTOCYST
COMPLEMENTATION を利用した臓器再
生法

発明者 : 中内啓光, 小林俊寛, 李允秀, 白井
丈一

権利者 : 国立大学法人東京大学

種類 : 国際出願

番号 : PCT/JP2008/051129

出願年月日 : 2008年8月28日

国内外の別 : 国際出願

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学腎臓内科学研究紹介 HP

[http://www.tsukuba-igaku-kidney.com/up/i
ndex.php?mode=s&cate=3&seq=40](http://www.tsukuba-igaku-kidney.com/up/index.php?mode=s&cate=3&seq=40)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 丈一 (USUI JOICHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 70447340