

遺伝子操作によって腎臓を作ることが出来ない動物に  
別の種の多能性幹細胞からなる腎臓を発生させることに成功！  
～腎臓移植の新しい可能性を示唆～

自然科学研究機構 生理学研究所  
国立大学法人 東京大学  
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構  
国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST)

腎臓移植は、腎不全患者に対する有効な治療法であるものの、慢性的なドナー不足となっているのが現状です。問題解決へ向けて、現在世界的に試験管内でヒト人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells:iPS 細胞) から腎臓を作ろうと試みられていますが、立体的、かつ移植に適したサイズの腎臓を作製するまでには至っていません。今回、自然科学研究機構 生理学研究所の後藤 哲平 特任研究員、小林俊寛 助教、平林 真澄 准教授らの研究グループは、東京大学 医科学研究所の中内 啓光 特任教授らや信州大学 繊維学部の保地 眞一 教授との共同研究によって、「異種胚盤胞補完法」という特殊な方法を用いて、腎臓が欠損したラットの体内に、マウスの胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell:ES 細胞) に由来する、マウスサイズの腎臓を作製することに世界で初めて成功しました。今回の成果は、異種胚盤胞補完法により腎臓の作製が可能であることを科学的に示しており、この手法によってヒト腎臓が作製され、実際に移植医療の現場で実用される可能性を示しています。本研究結果は、Nature Communications 誌(日本時間 2019 年 2 月 6 日午前 1 時)にオンライン掲載されました。

## 背景

我が国で糖尿病腎症や慢性糸球体腎炎などの疾患により、長期的に透析治療を続けている患者総数は約 33 万人にも上り、年々増加の傾向にあります。このような慢性腎不全の根本的治療には生体腎移植がもつとも有効とされていますが、腎移植希望患者数は 12,000 人を超え、ドナー<sup>1)</sup> の数が絶対的に不足しています(実際に移植を受けられる患者は総希望者数のわずか 1~2%程度)。この状況を鑑み、慢性的なドナー腎不足の解決に向けて、試験管内でヒト人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell:iPS 細胞<sup>2)</sup>) から腎臓を作り出す試みが続けられていますが、今日までに立体的、かつ移植に適したサイズの腎臓を作製するには至っていません。今回、自然科

学研究機構 生理学研究所の後藤 哲平 特任研究員、小林 俊寛 助教、平林 真澄 准教授らの研究グループは、東京大学 医科学研究所の中内 啓光 特任教授らや信州大学 繊維学部の保地 眞一 教授との共同研究によって、臓器の形成に不可欠な遺伝子 (*Sall 1* 遺伝子) を欠損させた動物個体を作製し、その体内に目的とする臓器ができるはずだった ニッチ (“空き”のある場所、の意味) を作りました。このような個体は、生きていくのに必要な臓器が欠けているので出生後は生きていくことができません。そこで着床前の受精卵に、多能性幹細胞である ES 細胞 や iPS 細胞を注入することで、ES 細胞や iPS 細胞がその“空き”を補完します。すると出生後には、体内で ES 細胞 / iPS 細胞由来の臓器を作製することができるのです。この手法は「胚盤胞補完法<sup>3)</sup>」といい、本研究グループはすでにこれまでも膵臓が欠損したマウスの体内でラットの iPS 細胞由来の膵臓を作製できることを示していました(論文情報: Kobayashi et al., Cell, 2010)。さらに、膵臓の欠損したラットの体内で、マウスの iPS 細胞由来の膵臓を作製し、その細胞の一部を糖尿病に罹患したマウスへ移植することで血糖値を正常化できることを見いだすなど、異種間における胚盤胞補完法によって作製した臓器が、移植医療に貢献できることを実証してきました(論文情報: Yamaguchi et al., Nature, 2017)。

今回本研究グループは、これまでに試みられてこなかった腎臓という大型主要臓器の再生に挑戦し、そして世界で初めて成功しました。この成果は、移植臓器を作製する再生医療の発展に大きく貢献すると期待されます。

## 研究成果

これまで膵臓の作製に有効であった「異種胚盤胞補完法」によって、腎臓を欠損させたマウスの体内に、ラットの iPS 細胞由来の腎臓を作製しようとした先行研究は失敗に終わっていましたが、なぜ失敗するのか、その理由すらよく分かっていませんでした。今回研究グループは、ラットの ES 細胞を用いてマウスの胎仔の体内にラットの腎臓を作製する際、腎臓を構成する小器官であり、血液中の水分のろ過や、再吸収を行う腎小体(ネフロン)<sup>4)</sup> の元となる「後腎間葉」<sup>5)</sup> がほとんど作られていないことを発見しました。一方で、ラット胎仔の体内の後腎間葉には、マウスの ES 細胞由来の細胞が、一定の割合で存在していました(図 1)。つまり、マウス胎仔の体内では、ラットの ES 細胞由来の後腎間葉は作られませんが、ラット胎仔の体内では、マウスの ES 細胞由来の後腎間葉が作られることが分かったのです。そこで研究グループは、腎臓を欠損させたラットの体内ならば、マウスの ES 細胞由来の腎臓が作製できるのではないかと仮説を立てました。

研究グループは、腎臓を作るうえで不可欠な *Sall1* 遺伝子<sup>6)</sup> が欠損したラットの受精卵にマウスの ES 細胞を数個注入し、ラットとマウス両方の遺伝情報を持つキメラ<sup>7)</sup> 個体を作製しました。そのような手順で「胚盤胞補完法」を行ったところ、腎臓が欠損したキ

メラ個体の体内に、マウス ES 細胞に由来する腎臓を作製（再生）することができました(図 2)。

一般的に腎臓は、血液中の老廃物をろ過し、体外に排出を行う臓器です。このろ過の作業は、ネフロンを構成する組織のひとつである糸球体で行われます（ろ過された体液を原尿という）。ろ過した後の原尿には、栄養分やタンパク質、水分、ナトリウムが含まれ、尿細管で再度血液中へ吸収されます。こうして濃縮された尿が集合管へ集まり、腎盂から尿管を通過して最終的に膀胱へ蓄えられます。同時に、尿細管と近接する毛細血管網から、一部の老廃物が直接尿中へと分泌されます。マウスの ES 細胞から作製された、再生腎臓の組織を詳しく解析したところ、ネフロンを構成する組織のうち、糸球体上皮、近位尿細管、ヘンレループ、遠位尿細管が、マウスの ES 細胞由来の細胞で構成されていました(図 3)。しかし、糸球体の中の血管や、尿細管を取り巻く血管網、原尿を集める集合管、そしてネフロン同士の間を埋める間質組織は、マウスの細胞とラットの細胞が混在したキメラ状態でした。今後は、これらのキメラ状態のままとなっていた組織についても、多能性幹細胞由来の細胞で構成された組織になるよう、更なる改良が必要です。将来的に、全ての組織が多能性幹細胞由来の細胞で作製することが出来れば、免疫抑制剤を過度に使用しないで済む、より負担の少ない移植用ドナー腎を作製することにつながります。

本研究は文部科学省科学研究費補助金、日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ (LEAP)「発生原理に基づく機能的立体臓器再生技術の開発」における分担研究「小動物胚盤胞補完により異種の体内で再生する臓器の機能検証」(研究開発担当者：平林真澄)、および自然科学研究機構「若手研究者による分野間連携研究プロジェクト」(研究代表者：後藤哲平)の助成を受けて行われました。なお、本研究成果に関わる基盤的な知見は科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業総括実施型研究 (ERATO) 中内幹細胞制御プロジェクト (研究総括：中内啓光、平成 24 年度終了) から得られたものです。

## 発表のポイント

1. *Sall1* 欠損ラット胚盤胞にマウス ES 細胞を顕微注入することで、ラットとマウスのキメラ個体を得られ、その体内にはマウス ES 細胞由来の腎臓が形成された。
2. 再生腎のネフロンは、マウス ES 細胞由来の細胞で構成されていたが、集合管や血管はマウスとラットの両方の細胞からできていた。
3. 異種胚盤胞補完法によって糖尿病治療に利用できる膵臓（膵島）の再生成功例はあるが、より複雑な構造を持つ腎臓への適用は世界初。

## 今後の展開

異種胚盤胞補完法によって腎臓の作製が可能であることを科学的に証明できました。今後、生命倫理についての議論や、法律の整備が必要となることが予想されますが、将来的に異種胚盤胞補完法によって作製されるヒト腎臓が、移植医療の場へ提供されるようになると期待されます。

### <用語説明>

#### 1) ドナー

臓器や胚を提供する人や動物。

2) 多能性幹細胞: 人工的に構成された培養条件下で無限の増殖能を持ち、生体の全ての組織の細胞に分化が可能な細胞。多能性幹細胞のうち、受精卵に含まれる細胞を培養した細胞を「胚性幹細胞 (ES 細胞)」、体細胞に遺伝子を導入することで人工的に ES 細胞と同等の能力を持った細胞を「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)」という。

#### 3) 胚盤胞補完法

臓器がない(作られない)特殊な環境を動物体内に誘導し、この空間を多能性幹細胞の増殖・分化の場として活用し、多能性幹細胞由来の臓器を形成させる方法。

#### 4) ネフロン

腎臓の最小機能単位。人では左右両腎臓を合わせて約 2 百万個存在し、各ネフロンでろ過、再吸収、分泌、濃縮が行われ、尿を生成する。

#### 5) 後腎間葉

腎臓は後腎間葉と尿管芽という 2 つの胎仔組織の相互作用によって形成され、前者からネフロンが作られる。後腎間葉の中に *Sall1* 陽性のネフロン前駆細胞が存在する。

#### 6) *Sall1* 遺伝子 (spalt like transcription factor 1)

腎臓発生に必須な遺伝子。腎臓以外に肝臓、手指、耳、肛門、脳を含む多くの組織で発現している。

#### 7) キメラ

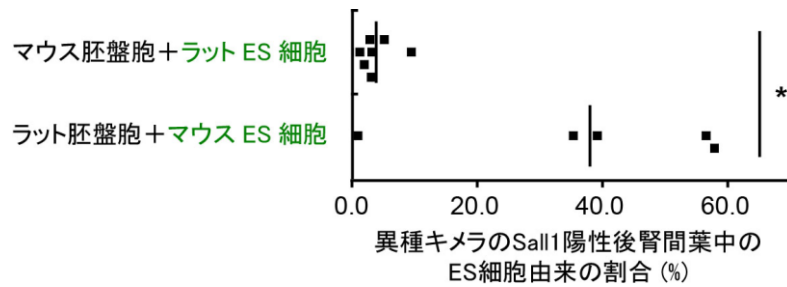
遺伝的背景の異なる 2 つ以上の細胞によって構成された 1 つの動物である。受精卵同士を集合させる、あるいは受精卵へ多能性幹細胞を注入することによって作出できる。

#### 8) GFP マウス

オワンクラゲが持つ緑色蛍光タンパク質 (GFP: Green Fluorescent Protein) の遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスで、各種細胞のレポーターとして利用されている。

図 1

異種キメラ体内においてマウス ES 細胞はラット ES 細胞と比較すると後腎間葉に分化し易い。

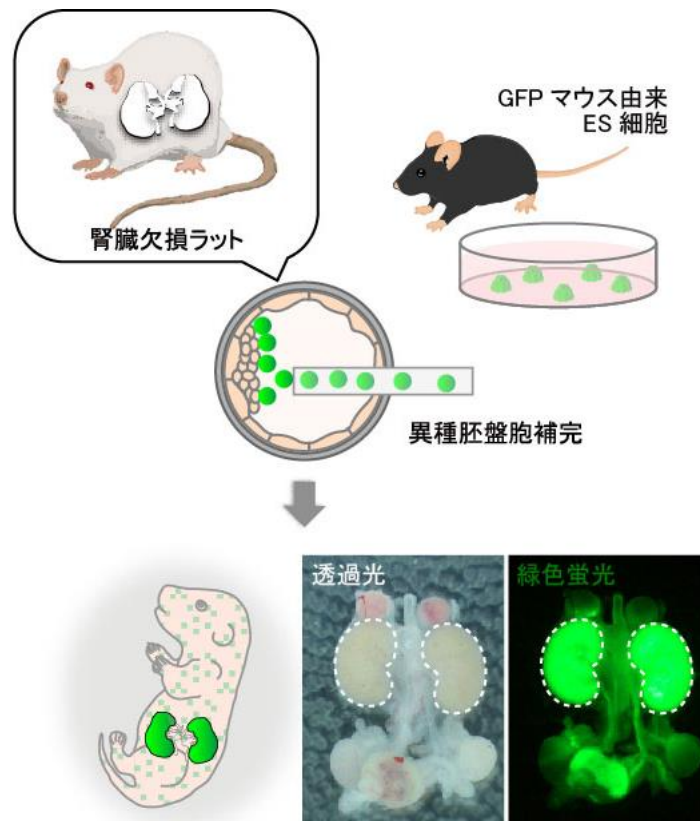


### 解説

異種キメラ体内の *Sall1* を発現する後腎間葉の細胞のうち ES 細胞から分化した細胞の割合を求めたところ、ラット ES 細胞由来は全後腎間葉の細胞のわずか4%であったのに対し、マウス ES 細胞由来は38%であった。これは、マウス ES 細胞がラット ES 細胞と比較して、有意に後腎間葉へ分化し易い（図中のアスタリスクは統計的に有意である）ことを示す。

図 2

胚盤胞補完法の適用により腎臓欠損ラット体内にマウス ES 細胞由来の腎臓を作製できた。



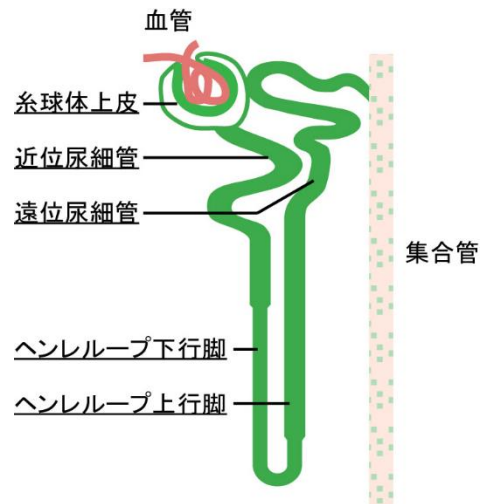
腎臓欠損ラット体内でマウス由来腎臓ができる

### 解説

腎臓欠損となる運命のラット胚盤胞に GFP マウス<sup>8)</sup>由来 ES 細胞を頭微注入する異種胚盤胞補完を行ったところ、腎臓欠損ラット体内に GFP 陽性の ES 細胞由来の腎臓が形成されていた。図中の点線は腎臓を示す。

図 3

再生腎臓のネフロンはマウス ES 細胞由来だった。



#### 解説

腎臓におけるネフロンおよび集合管の模式図。異種胚盤胞補完によって *Sall1* 遺伝子欠失による腎臓欠損ラット体内で作製されたマウス ES 細胞由来の腎臓のうち、糸球体上皮細胞、尿細管、ヘンレループ、といったネフロン構成要素がマウスの細胞（緑色で示した）で構成されていた。一方、血管や集合管はマウスの細胞とラットの細胞が混じったキメラ状態だった。

## 論文情報

<論文タイトル・著者情報>

### **Generation of pluripotent stem cell-derived mouse kidneys in *Sall1*-targeted anephric rats**

Tepei Goto<sup>1</sup>, Hiromasa Hara<sup>1\*</sup>, Makoto Sanbo<sup>1</sup>, Hideki Masaki<sup>2</sup>, Hideyuki Sato<sup>2</sup>, Tomoyuki Yamaguchi<sup>2</sup>, Shinichi Hochi<sup>3</sup>, Toshihiro Kobayashi<sup>1,4</sup>, Hiromitsu Nakauchi<sup>2,5</sup> & Masumi Hirabayashi<sup>1,4</sup>

1. Center for Genetic Analysis of Behavior, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Aichi, Japan.
2. Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan.
3. Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano, Japan.
4. The Graduate University of Advanced Studies, Okazaki, Aichi, Japan.
5. Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

\*Current affiliation: Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi, Japan.

Nature Communications. 日本時間 2019 年 2 月 6 日 (水) 午前 1 時オンライン掲載