

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) マウス胎内を利用した iPS 細胞由来腎前駆細胞からのヒト腎臓再生技術の開発
(英語) Development of human kidney regeneration technology from iPS cell-derived renal progenitor cells using mouse fetus environment.

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山中 修一郎
(英語) Shuichiro yamanaka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東京慈恵会医科大学 内科学講座 (腎臓・高血圧内科)・助教
(英語) Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine
Jikei University School of Medicine

II 研究開発の概要

本研究の目標は、マウス体内で iPS 細胞由来のヒト腎臓を再生し、腎毒性薬物を投与して薬剤性腎障害モデルを構築することである。さらに、再生された腎臓が腎不全治療に応用できるよう、キメラ腎臓における新技術の開発を目指す。

我々は異種動物の臓器発生プログラムを利用し、胎仔腎臓内で外来性幹細胞から臓器を再生する技術を開発してきた。2017 年に、前駆細胞置換技術を確立し、ネフロン前駆細胞の入れ替えに成功した。この技術は、摘出した胎仔腎臓だけでなく、生体としての胎仔や新生仔にも適用可能である。

再生ネフロンはホストの集合管と接続し、尿が膀胱に貯留される。段階的に尿管と接続することで尿路を持った腎臓再生も可能であり、これまでの *in vivo* 応用が課題であった腎オルガノイドとは異なる利点がある。ただし、薬剤性腎障害モデルへの適用に関しては技術的なハードルがありさらなる改良が必要であった。そのため、キメラ作製技術の改良、免疫不全マウスに前駆細胞置換システムを搭載した新規マウスモデルの開発など多くの課題に対処しなければならず、本研究では多くの技術開発をおこなった。

・研究開発の成果

① iDROP (interspecies dual replacement of progenitor : 異種間二重前駆細胞置換) の開発

従来の前駆細胞置換はネフロン前駆細胞の 1 系統のみを再生していたが、間質前駆細胞も置換する 2 系統の再生として iDROP マウスを開発した。これにより、ネフロンと間質系譜細胞が同時に再生される。iDROP で再生されたキメラ腎臓は、移植後において T 細胞の浸潤が抑えられ、拒絶反応によるネフロン数の減少を通常の異種移植よりも少量の免疫抑制剤で抑制できることが示された。

② 再生範囲向上とガラス化凍結の検証

再生ネフロンの数を増やすため、移植法を改良し、再生ネフロン発生領域数が約 2.5 倍に増加した。また、ガラス化凍結法を用いて胎仔腎臓の凍結・融解が可能であることが確認された。

③ ヒト-マウスキメラネフロンの再生

ヒト細胞をドナー細胞に利用できる Six2-DTA モデルを開発し、ヒト iPS 細胞から誘導したヒトネフロン前駆細胞を移植し、ヒトとマウスが接合した幼弱なネフロンの再生に成功した。ただし、キメラ腎臓内部のヒトネフロンの成熟度や生成効率はまだ十分でなく、さらなる改良の余地がある。

④ 異種間キメラオルガノイドによる評価系の構築

誘導細胞の品質によるキメラ形成率の変動を評価できる異種間キメラオルガノイドを構築した。培地の適正化や誘導細胞のソーティングにより、ヒトとマウスのネフロンのキメラ形成率が約 60%まで向上し、誘導細胞のキメラ能評価系の基盤技術を構築した。

⑤ ニッチ移植法の開発とヒト-マウスキメラ腎臓における薬剤性腎障害の再現

従来の手法では、ヒトのネフロンを対象にした動物実験系を構築するために、胎仔腎臓の摘出やドナー前駆細胞の移植など、煩雑なプロセスが必要であった。そこで、薬剤性腎障害モデル評価に特化した新たなキメラ腎臓の作製法を構築した。

⑥ 免疫不全システムを搭載した前駆細胞置換が可能な新規マウスの作製

in vivo でヒト細胞が受け入れられる免疫不全マウスに、標的細胞が除去可能なマウスモデルを開発した。新に開発したマウスモデルは免疫不全機能を搭載し、かつ誘導剤が腎発生に影響を与えず、誘導死の速度も早い。今後、新規マウスと独自の移植法を用いたヒト化腎臓マウスモデルの作製を進めていく。

・研究開発の意義

本研究では、既存の胎生キメラ技術の改良として、ネフロンと間質の 2 系統を同時に再生する iDROP システムを開発した。細胞の移植範囲を増やすように移植法を改善し、臓器凍結のためにガラス化凍結法を導入し、凍結融解が可能であることを示した。さらに、iPS 細胞由来のヒト腎臓を用いたマウスでの腎臓再生の分野でも複数の技術を開発した。Six2-DTA モデルを用いた臓器培養でヒトとマウスのキメラネフロンの再生に

成功し、ヒト人工腎臓前駆細胞の品質を評価するキメラ能評価システムを構築した。また、免疫不全マウスの胎仔における脆弱性の問題を克服するために移植法を開発し、ヒト-マウスのキメラ腎臓で薬剤性腎障害を再現することを可能にした。さらに免疫不全システムを搭載した新たな標的細胞除去モデルマウスを開発したことで、今後ヒトの腎臓再生への応用へと進めたい。

本研究は、まだ部分的な再生ではあるが、将来的には再生領域および構成細胞をさらに増やし、腎不全患者さんに対する新規治療法の開発につなげたいと考える。また、長期慢性投与薬の腎障害や腎移植に伴う免疫抑制剤の副作用などの低減、さまざまな腎疾患に対する治療法の開発などにも貢献できると期待される。これらの技術がさらに進化し、安全性や再現性が確保されれば、ヒト腎臓の再生医療における実用化が現実味を帯びてくるだろう。

The goal of this study is to regenerate iPS cell-derived human kidneys in mice and to establish a model of drug-induced renal injury by administering nephrotoxic drugs. Furthermore, we aim to develop new technologies in chimeric kidneys so that the regenerated kidneys can be used to treat renal failure.

Research and development achievements.

(i) Development of iDROp (interspecies dual replacement of progenitor).

We have developed mice in which nephron progenitor cells (NPCs) and stromal progenitor cells (SPCs) can be removed simultaneously. This enabled simultaneous regeneration of nephrons and stromal cells from NPCs and SPCs extracted from rats. This system was named iDROp, and it was shown that chimeric kidneys regenerated by iDROp suppressed T cell infiltration after xenotransplantation and reduced the number of nephrons due to rejection with a smaller dose of immunosuppressive drugs than in conventional xenotransplantation.

(ii) Validation of improved regenerative range and vitrification freezing.

To increase the number of regenerated nephrons, the transplantation method was improved and the number of regenerated nephron-generating regions increased approximately 2.5-fold. In addition, it was verified that the vitrification freezing method could be used to freeze and thaw foetal kidneys.

(iii) Regeneration of human-mouse chimeric nephrons.

The Six2-DTA model, which allows the use of human cells as donor cells, was developed and successfully used to regenerate human-mouse-connected immature nephrons.

(iv) Establishment of an evaluation system using interspecies chimeric organoids.

Heterologous chimeric organoids were constructed to examine the chimerisation potential of induced cells. By optimising the medium and sorting induced cells, the chimera formation rate of human and mouse nephrons was increased to about 60%.

(v) Generation of novel mice with immunodeficiency system capable of progenitor cell replacement.

Conventional methods require complicated processes such as removal of fetal kidneys and transplantation of donor progenitor cells in order to construct an animal experimental system for human nephrons. Therefore, we developed a new method to produce chimeric kidneys specifically for the evaluation of drug-induced renal injury models.

(vi) Generation of novel mice capable of progenitor cell replacement with an immunodeficiency system.

The newly developed mouse model is equipped with immunodeficient function, while the inducer does not affect renal development and the speed of induced death is fast.

Much of the research and development in this study was aimed at the clinical application of kidney regeneration as a regenerative medicine, albeit in rodents. Although still in the process of development, we hope to further increase the number of regenerative areas and constituent cells in the future, leading to the development of novel therapies for patients with renal failure. It is also expected to contribute to the reduction of kidney damage from long-term chronically administered drugs and the side effects of immunosuppressive drugs associated with kidney transplantation, as well as to the development of treatments for various renal diseases. If these technologies are further developed and their safety and reproducibility are ensured, the practical application of human kidneys in regenerative medicine will become a reality.