

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 腎疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Renal Diseases

研究開発課題名： (日本語) 霊長類を用いた再生腎臓による実践的前臨床試験
(英語) Preclinical trial of kidney regeneration using primate

研究開発代表者 (日本語) 慈恵大学 腎臓・高血圧内科 教授 横尾 隆
所属 役職 氏名： (英語) Jikei University, Kidney/Hypertension, Professor, Takashi Yokoo

実施期間： 平成28年4月1日～平成29年3月31日

研究開発分担者 (日本語) 慈恵大学 腎臓・高血圧内科 助教 横手伸也
所属 役職 氏名： (英語) Jikei University, Kidney/Hypertension Clinical Associate, Shinya Yokote

研究開発分担者 (日本語) 慈恵大学 大学院生 山中修一郎
所属 役職 氏名： (英語) Jikei University, PhD Student, Shuichiro Yamanaka

研究開発分担者 (日本語) 慈恵大学 大学院生 田尻 進
所属 役職 氏名： (英語) Jikei University, PhD Student, Susumu Tajiri

研究開発分担者 (日本語) 慈恵大学 臨床疫学研究部 教授 松島 雅人
所属 役職 氏名： (英語) Jikei University, Division of Clinical Epidemiology, Professor, Masato Matsushima

研究開発分担者 (日本語) 慈恵大学 再生医学研究部 教授 岡野ジェイムス洋尚
所属 役職 氏名： (英語) Jikei University, Division of Regenerative Medicine, Professor, Hirotaka James Okano

分担研究 (日本語) 日齢設定した妊娠ブタ飼育管理・子宮内ブタ胎仔細胞注入手技実施
開発課題名: (英語) Supply and maintenance of pregnant pig, and cell injection into the nephrogenic niche of porcine embryos

研究開発分担者 (日本語) 明治大学 農学部 教授 長嶋比呂志
所属 役職 氏名: (英語) Meiji University, School of Agriculture, Professor, Hiroshi Nagashima

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

我々はこれまで「患者由来細胞から機能を持った再生腎臓を樹立し透析に変わる治療法とする」という究極の目標に向け、自己細胞を異種胎仔の腎臓発生環境(ニッチ)で腎臓系譜に分化誘導し、再び生体内に戻して成熟腎臓を再生するという「胎生臓器ニッチ法」を開発し、臨床応用に向けて研究を進めてきた。これまでに①腎臓前駆細胞樹立、②臓器への分化、③腎機能獲得、④安全性向上、⑤産業化とステップを定め、それぞれの工程を別の実験系、動物を用いて行ってきた。そこで、これまで報告した全工程を完遂し、ヒト腎臓に発生過程・構造の近い霊長類(マーモセット)の自己細胞から腎臓を再生し、「腎臓再生の **proof of concept** を取得」することが本研究の目的である。

初年度である本年はまず、子宮内で発育中のブタ胎仔の腎臓発生ニッチにエコー下で細胞注入を試みた。しかし胎生 30 日以前のブタ胎仔は非常に脆弱であり、的確に細胞注入するのはかなり難しいことが明らかとなった。一方胎生 40 日以降のブタ胎仔の **nephrogenic zone** にエコー下でアクセスすることは容易であることが確認された。そこで胎生 30 日のブタ胎仔に細胞を注入するシステムの構築は継続しながら、これがうまくいかなかった場合を考え、細胞注入の **time window** を広げるシステムの開発を新たに開始した。まずマウスにおいて **nephrogenic zone** に腎臓前駆細胞を注入して **native** に統合されるか検討したところ、腎臓前駆細胞は **in vivo** でネフロンに分化するものの統合はされないことが明らかとなった。これは **nephrogenic zone** は **native** の腎臓前駆細胞で占拠されており、外来の細胞がニッチに入り込めないためと想像した。このため遺伝子改変モデルを用いて **timely** にニッチを開けるシステムを開発し同様の実験を行なったところ、効率良く外来の腎臓前駆細胞によるネフロンを構築することに成功した。これにより腎臓再生の **time window** を開くことに成功したためより簡便な腎臓再生のシステム開発が可能と判断し大型動物での検証を開始した。

During human embryogenesis, a single fertilized cell develops into a whole body within 266 days. The resulting neonate has every organ positioned correctly, indicating that this single fertilized ovum contains a blueprint from which the body forms, including the kidney. Therefore, it can be imagined that by applying exogenous pluri- or multi-potent stem cells in the organogenesis niche at exactly the right time, a whole kidney might be regenerated via a normal nephrogenesis programming. Previously, we generate the functional human kidney in rat by applying GDNF

producing mesenchymal stem cells into the niche of organogenesis in growing rat embryo followed by transplantation to the rat omentum. To increase the volume of urine from regenerated kidney, we tried to use pig, however, we found that injecting the cells at the site of nephrogenic niche of pig embryo before the ureteric bud is hard to achieve. In contrast, injecting the cells into nephrogenic zone of developing metanephros after forming in the embryo is not very difficult even in the pig embryo. Xeno-part can be removed by xeno-elimination system, which we established previously, Therefore, we tried to examine the possibility of this alternative system. To do this, we first establish a system in which the cells were precisely injected in the nephrogenic zone of growing embryo in mouse. At first, exoutero development system, in which embryo in uterus can be harmlessly observed, allowing a time- and region-specific intervention, and we also established the system, in which cells can be injected at the precise site and precise amount, called SAFIS. Using this system we tried to inject nephron progenitor into the nephrogenic zone however, they were bounced back because nephrogenic zone is full with native progenitors and could not integrate in the native metanephros. Therefore, we further generated a system, by which native nephron progenitor can be selectively eliminate by drug administration. We found that by eliminating progenitor cells in the nephrogenic zone by genetic manipulation, external progenitor cells may replace nephrogenic zone and differentiate into nephron. This nephron were further integrated vasculature in vivo following transplantation. We used progenitor cells dissociated from other metanephros but currently progenitor cells can be differentiated from pluripotent stem cells like iPS cells or somatic cells, we are currently trying to use iPS cells for this purpose.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 6 件、国際誌 1 件）

1. Xinaris C, Benedetti V, Novelli R, Abbate M, Rizzo P, Conti S, Tomasoni S, Corna D, Pozzobon M, Cavallotti D, Yokoo T, Morigi M, Benigni A, Remuzzi G. Functional Human Podocytes Generated in Organoids from Amniotic Fluid Stem Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2016, 27(5), 1400-11.
2. 横尾隆. 腎臓再生研究の現状と課題～本当に透析患者に届くのか～. *発達腎研究会誌*. 2016, 24(1), 2-5.
3. 横尾隆. ここまできた腎臓の再生. *日本臨床腎移植学会雑誌*. 2016, 4(2), 177-80.
4. 松本啓, 横尾隆. やさしい再生医療 12 臨床編 他分野の再生医療・腎臓再生への道程. *腎と透析*. 2016, 80(4), 444-7.
5. 松本啓, 横尾隆. 再生医療の進歩と臨床応用 腎臓再生. *Journal of Clinical Rehabilitation*. 2016, 25(8), 804-10.
6. 田尻進, 横尾隆. 腎臓再生治療への挑戦. *循環器内科*. 2016, 80(4), 317-21.
7. 松本啓, 横尾隆. 腎臓再生療法の課題と将来展望. *Nephrology Frontier*. 2017, 15(4), 28-33.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Transplanted Embryonic Kidneys as a Tool to Understand Renal Organogenesis, Oral, Yokoo T, American Society of Nephrology Kidney Week, 2016/11/18, 国外.
2. New Strategy for Kidney Regeneration Using DiSCAS:The Drug-Induced Specificity Cell Ablation System, Oral, Yamanaka S, Fujimoto T, Tajiri S, Matsumoto K, Ogura M, Yokoo T, American Society of Nephrology Kidney Week, 2016/11/18, 国外.
3. Hemodialysis Patients-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Powerful Tool For Kidney Regeneration, Oral , Tajiri S, Fujimoto T, Yamanaka S, Matsumoto K, Ogura M, Yokoo T, American Society of Nephrology Kidney Week, 2016/11/19, 国外.
4. 再生腎臓における尿排泄路機構の構築, 口頭, 横手伸也, 長嶋比呂志, 小林英司, 横尾隆, 第 61 回日本透析医学会学術集会・総会, 2016/06/12, 国内.
5. 腎臓再生研究の今, 口頭, 横尾隆, 第 46 回日本腎臓学会西部学術大会, 2016/10/14, 国内
6. 血液透析患者由来 iPS 細胞は腎臓再生のツールとして適しているか?, 口頭, 山中修一郎, 田尻進, 藤本俊成, 松本啓, 岡野ジェイムス洋尚, 横尾隆, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/03/08, 国内.
7. 前駆細胞置換による腎臓再生, 口頭, 山中修一郎, 田尻進, 藤本俊成, 松本啓, 岡野ジェイムス洋尚, 横尾隆, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/03/09, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 腎臓再生医療の実現化に向けた課題と期待, 横尾隆, 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会 第 34 回公開健康講座, 2016/10/08, 国内.
2. 放っておくと怖い、慢性腎臓病～初期対応から再生医療まで～, 横尾隆, 四街道地区医師会市民公開講座, 2016/10/22, 国内.
3. 透析に代わる次世代腎不全治療を目指した腎臓再生法の開発, 横尾隆, 第 24 回バイオビジネス・パートナーリング, 2017/02/21, 国内.

(4) 特許出願