

花田三四郎 (国立国際医療研究センター). (ポスター  
ショートプレゼンテーション: 光源・回路・放電現象,  
照明理論, 光関連材料デバイス) アルキル基修飾した  
発光性シリコンナノ粒子の特性. 平成 25 年度 (第 46 回)  
照明学会全国大会. 名古屋, 9 月.

- 11) 馬目佳信, 藤岡宏樹, 池田恵一, 武山 浩. (ポスター: 乳頭癌・基礎病理) 甲状腺乳頭癌に関連する糖鎖修飾型抗原の細胞内局在の検討. 第 46 回日本甲状腺外科学会学術集会. 名古屋, 9 月.
- 12) 藤岡宏樹, 清水信夫, 馬目佳信, 山本健二, 池田恵一, 鎌田美乃里, 富澤康子. 人工鼻による類似臭判別アルゴリズムの検討. 第 51 回日本人口臓器学会大会 (JSAO2013). 横浜, 9 月.
- 13) Fujioka K, Hanada S<sup>1)</sup>, Inoue Y (Toho Univ), Shiraishi K, Manome Y, Kanaya F<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>National Center for Global Health and Medicine). (Health Effects and Toxicity-*In Vivo*) Bottom-up evaluation model for central nerve nanotoxicology. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Nagoya, Oct.
- 14) 秋吉宏平, 鎌田美乃里, 藤岡宏樹, 池田恵一, 渡邊美智子, 馬目佳信. 胆管細胞癌細胞株の 3 次元培養. 第 130 回成医会総会. 東京, 10 月.
- 15) Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Kanaya F, Shiraishi K, Yamamoto K, Manome Y. Bottom-up brain model for nano-brain toxicology assay. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013). Kitakyushu, Nov.
- 16) 藤岡宏樹, 池田恵一, 武山 浩, 馬目佳信. 甲状腺癌細胞株の糖鎖構造と浸潤能の比較. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会. 和歌山, 11 月.
- 17) 池田恵一, 馬目佳信, 東條克能. (ポスター 5: 生理活性ペプチド) ニコチンによる酸化ストレス負荷条件下におけるウロコルチン I の病態生理的役割; HL-1 心筋細胞培養系による検討. 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 大阪, 11 月. [日内分泌誌 2013; 89(2): 749]
- 18) 神谷 育, 門沙央理, 三浦茉莉子, 鎌田美乃里, 池田恵一, 馬目佳信, 藤岡宏樹. (ポスター発表プログラム) 菓子由来の餡に含まれるポリフェノール量と抗酸化作用の検討. 平成 26 年度日本食品科学工学会関東支部大会・第 93 回日本栄養・食糧学会関東支部大会合同シンポジウム. 東京, 3 月.

## V. その他

- 1) 藤岡宏樹, 清水信夫. 匂い分析装置の感知精度, 及び表現力向上のためのアルゴリズムの開発. 統計数理研究所・共同研究リポート 2014; 318: 1-30.

## プロジェクト研究部 腎臓再生研究室

室長: 横尾 隆 腎臓再生医療

### 教育・研究概要

現在爆発的に増加を続ける腎不全は, 長期透析患者に対する著しい QOL 制限のみでなく, 1.4 兆円を超える透析医療費や, 透析患者の高齢化にともなう介護福祉の負担拡大が大きな社会問題となっている。現在透析患者は 30 万人を超えているが, その数は今後も爆発的に増加することが予想され近い将来透析に対する保健医療は破綻することが容易に想像されている。しかし現在腎機能を回復させる画期的かつ根本的な治療法はいまだ存在しない。当研究室はこの危機的状況を打開すべく, これまで不可能とされていた抜本的な腎不全治療開発研究の新世代を切り開くことを最終的な目的とする。我々はこれまで透析患者自身の細胞を利用して, 機能腎臓を患者体内に樹立するという独創的な観点に立って腎臓再生研究に取り組んできた。これまでの研究では, ラット胎仔の腎臓発生部位にヒト間葉系幹細胞を注入し, 胎仔体内で腎臓系譜に分化させることで腎臓原器を樹立することに成功した。この原器をさらに体網内に移植することにより血管系を獲得した成熟腎臓となり, 尿生成能を獲得するだけでなく, エリスロポエチンやレニン分泌といった腎臓内分泌機能も獲得させることに成功している。さらには, ヒトサイズの腎臓再生に挑戦するためブタ胎仔の子宮内操作により, 約 30 グラムの腎臓の再生に成功した。しかし現行のシステムでは, プログラムを用いる異種胎仔の腎臓が混入したヒト-異種動物のキメラ腎臓になってしまう。我々はこの問題に対し, アポトーシスを薬剤存在下で誘導する遺伝子を搭載したトランスジェニックマウス及びブタを作成したが, アポトーシスにより異種部分を排除するタイミングが非常に難しく, 腎機能の獲得に悪影響を及ぼすことが確認されている。そこでヒト臨床に応用するためには純粋ヒト腎臓の作成システムが必要となる。本年度は, 医工学技術, ブタの発生工学技術を統合し, 我々が独自に提唱する腎臓再生誘導法を実現化するための研究開発を開始した。

具体的には, 腎臓のみが欠損した遺伝子改変動物 (マウス, ブタ) の胎仔を作成し, 本来腎臓が出来るはずであった部分, つまり大きく開いた developmental niche に, 腎不全患者由来間葉系幹細胞, ま

たは iPS 細胞由来腎臓幹細胞を注入し純粋な患者由来腎臓原器を樹立し、これを体網内で成熟系とすることにチャレンジしている。すでに、透析患者由来間葉系幹細胞および iPS 細胞の樹立は成功している。またこれまで iPS 細胞から腎臓幹細胞への分化誘導法が多く報告されているが、我々の研究室でもその誘導に成功しておりこれを用いてもっとも効率が良い細胞を選出することを予定している。現在まで① Six2Cre マウスと R26Notch2 マウス（当研究室でコロニーを樹立済）をかけ合わせることで腎臓欠損マウスを樹立することが可能で、生直後まで生存可能であることを確認、② ExUtero 法により E13.5 胎仔を経子宮壁に細胞を注入し妊娠を継続させて E19 で帝王切開し生児を得ることに成功、③ Sall1 KO ブタの作成に成功し腎臓が発生していないことを確認済みである。今後これらを用いて、下記を順次開始して行く。

#### 1. 腎臓欠損マウスを用いた ExUtero 細胞注入による純粋注入細胞由来腎臓の樹立

DsRed TG マウス(当研究室でコロニー樹立済み)の胎仔 (E9.11.5-13.5) から後腎組織を採取し、single cell suspension にした後、妊娠させた腎臓欠損マウスの胎仔に ExUtero 法で細胞を注入し、その後妊娠を継続させ、すべての細胞が DsRed で赤く蛍光発色する腎臓の樹立を行う。その際に、もっとも発育が良好な胎仔の週齢を特定するとともに、子宮内胎仔の腎臓発生部位（尿管芽発芽部位）に的確に細胞が注入できるデバイスの開発を行う。既にプロトタイプ開発は開始しており、一定深度まで到達した後一定細胞数を注入する電子制御機能を搭載に成功しており、子宮壁貫通を容易にするバイブレーション機能、及び手ぶれ防止機能を付加する予定である。安定して腎臓発生が出来るようになった後に、最適な注入細胞の選定の為に次の細胞群を比較する。

#### 2. 腎臓欠損ブタを用いたエコー下細胞注入による純粋注入細胞由来腎臓の樹立

マウスを用いて選定した腎臓再生に最適な患者由来の腎臓幹細胞を用いて、腎臓欠損 Sall1KO ブタを用いたスケールアップシステムの開発を行う。現在 E40 の妊娠ブタに経皮的エコーガイド下に正常胎仔の腎臓部位に細胞注入することは成功している。しかし E40 では発生がかなり進んでおり腎臓再生 niche としては十分機能しないことが予想される。腎臓欠損ブタであるので、niche が空いている time window は広いことが予想されるが、エコーガイド下に上記で開発したデバイスを用いて細胞注入する

ことにより、より腎臓発生初期 (E30) に近い胎仔に注入を試みる。これにより透析患者由来腎臓原器の樹立が可能となると予想される。既に腎臓欠損ブタ (Sall1 ノックアウトブタ) の作成は終了している。

#### 「点検・評価」

本研究は異種の臓器発生プログラムを一時的に借用し、自己の細胞から自己の腎臓を自己体内で作成するというこれまでの再生研究と別次元の独創性をもち、その成功により移植医療が直面していた拒絶反応やドナー不足という大きな壁を乗り越えることが可能となる。この成功を魁として、ヒト臨床において肝、脾臓など他臓器に応用が可能であり、その医療貢献度、経済効果は計り知れない。

従来から異種移植医療の臓器ドナーとしてのブタの利用が提唱されてきた。しかし、従来型の異種移植、すなわちブタからヒトへの臓器移植には、拒絶反応の克服という技術的問題のみならず、ブタ組織が体内に存在する精神的嫌悪感などが、異種移植を一般の治療法として定着させるための大きな障害となっている。本研究は、従来型の異種移植とは異なり、ブタの胎仔臓器を一時的に利用して、患者の自己腎臓 (self-kidney) を再生させるという、全く新しい着想に基づくものである。自己の細胞由来の腎臓であれば拒絶反応が生じず、異種組織と共存する必要がなくなり精神的負担が軽減される。それによって、期待されながらも進んでいない、ブタの移植医療応用を妨げていた技術的課題を解決する。同時に本研究には、医工学の大市場への進出を促進する効果が期待出来る。

#### 研究業績

##### I. 原著論文

- 1) Yamada A, Yokoo T, Yokote S, Yamanaka S, Izuhara L, Katsuoka Y, Shimada Y, Shukuya A, Okano HJ, Ohashi T, Ida H. Comparison of multipotency and molecular profile of MSCs between CKD and healthy rats. *Hum Cell* 2014; 27(2): 59-67. Epub 2014 Feb 5.
- 2) Hara S<sup>1)</sup>, Umeyama K<sup>2)</sup>, Yokoo T, Nagashima H<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Meiji Univ), Nagata M<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ of Tsukuba). Diffuse glomerular nodular lesion in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. *PLoS One* 2014; 9(3): e92219.
- 3) 原 怜史<sup>1)</sup>, 横尾 隆, 梅山 一<sup>2)</sup>, 長嶋比呂志<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>明治大), 長田道夫<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>筑波大). Dominant-negative 変異型 hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$  (HNF1  $\alpha$ )

導入糖尿病ブタにおける糸球体結節性病変の解析. 日腎学会誌 2013 ; 55(3) : 378.

## II. 総 説

- 1) Yokote S, Yokoo T. Organogenesis for kidney regeneration. *Curr Opin Organ Transplant* 2013 ; 18(2) : 186-90.
- 2) 横手伸也, 宮崎陽一, 横尾 隆. 【腎臓病の up to date - 病態に基づいた治療の最前線 -】 代替療法 腎臓の発生と再生医療. *カレントセラピー* 2013 ; 31(6) : 625-9.
- 3) 横尾 隆. 循環器疾患における再生医療の展望 腎不全に対する幹細胞由来の腎臓再生. *循環 plus* 2013 ; 14(3) : 10-2.
- 4) 横尾 隆. 臨床応用に向けた腎臓再生研究 第58回日本透析医学会教育講演より. *日透析医学会誌* 2013 ; 46(11) : 1055-60.
- 5) 横尾 隆. 腎性貧血を標的とした新しい創薬に向けて 成体幹細胞由来EPO産生細胞による貧血再生療法の開発. *日透析医学会誌* 2013 ; 46(Suppl.1) : 368.
- 6) 山中修一郎, 横尾 隆. 【再生医療の最新の進歩(前篇) 次世代再生医療に向けた基盤研究】 3次元組織・臓器を創る 生体足場を用いた機能的臓器再生. *最新医* 2014 ; 69(3月増刊) : 671-6.
- 7) 松本 啓, 横尾 隆. 【再生医療と腎】 腎臓の幹細胞を用いた三次元的再生. *腎と透析* 2013 ; 75(6) : 839-43.

## III. 学会発表

- 1) Yamanaka S, Yokote S, Izuhara L, Katsuoka Y, Yamada A, Matsumoto K, Fukui A, Ogura M, Yokoo T. Evaluation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for regeneration in long-term dialysis patients. *ISN (International Society of Nephrology) Forefronts Symposium 2013*. Florence, Sept.
- 2) Fukui A, Matsumoto K, Yokoo T. Differentiation of human mesenchymal stem cells into the ureteric bud in chicken embryos. *ISN (International Society of Nephrology) Forefronts Symposium 2013*. Florence, Sept.
- 3) Yokote S, Yamada A, Yamanaka S, Izuhara L, Katsuoka Y, Matsumoto K, Yokoo T. Comparison of multipotency for differentiation of MSCs from CKD rats. *ISN (International Society of Nephrology) Forefronts Symposium 2013*. Florence, Sept.
- 4) Yamanaka S, Yokote S, Izuhara L, Katsuoka Y, Yamada A, Matsumoto K, Fukui A, Ogura M, Yokoo T. Evaluation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for regeneration in long-term dialysis pa-

tients. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Atlanta, Nov.

- 5) 横尾 隆. (教育講演 EL-9) 臨床応用に向けた腎臓再生研究. 第58回日本透析医学会学術集会・総会. 福岡, 6月.
- 6) 横尾 隆. (シンポジウム SY-10: 腎性貧血を標的とした新しい創薬に向けて) 成体幹細胞由来EPO産生細胞による貧血再生療法の開発. 第58回日本透析医学会学術集会・総会. 福岡, 6月.

## IV. 著 書

- 1) 山中修一郎, 横尾 隆. C. 分子生物学 6. 機能的腎臓再生法の開発の現況. 富野康日己(順天堂大), 柏原直樹(川崎医科大学), 成田一衛(新潟大) 編. *Annual Review 腎臓* 2014. 東京: 中外医学社, 2014. p.112-6.

## V. その他

- 1) 横尾 隆. 臓器再生医療の実現化に向けて~iPS細胞の光と影~. 第48回 NEPHRON FORUM. 岡山, 9月.
- 2) 横尾 隆. 臓器再生研究の最前線~iPS細胞の光と影~. 第9回東京CKDフォーラム. 東京, 9月.
- 3) 横尾 隆. 胎生組織ニッチ法による自己骨髄細胞由来エリスロポエチン誘導法の開発. 第6回慢性腎臓病CKD病態研究会. 東京, 7月.
- 4) 横尾 隆. 間葉系幹細胞を用いた腎臓再生法の開発研究. *FRONT-J* 第4回学術集会. 東京, 8月.
- 5) 横尾 隆. 成体幹細胞由来臓器再生法の開発「再生: いかにあるべき心臓再生を実現するか」. 第4回 Molecular Cardiovascular Conference II. 小樽, 9月.