

奨励金No.1541

CKD に対する新規腎臓組織幹細胞を用いた腎修復療法の開発

荒岡 利和

京都大学 iPS 細胞研究所 助教

Development of kidney self-repairing therapy using novel adult kidney stem cells for CKD

Toshikazu Araoka,

Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Assistant Professor



慢性腎臓病（CKD）において、画期的な治療法は未開発であるため、腎障害の進行した腎臓は治ることはなく、患者数は増加し続けている。本研究では、腎臓にもともと存在する腎臓の障害部位を自己修復可能な新規の腎臓組織幹細胞（AKSC）を発見し、その特徴を明らかにした。さらに、我々は、mTOR 阻害剤が、CKD によって惹起される AKSC の老化を除去し、AKSC の増殖を促進することによって、腎障害の進行を緩徐にする可能性を示した。

In chronic kidney disease (CKD), the number of patients with advanced kidney damage is not cured and continues to increase because “silver bullet drugs” have not been developed. In this study, we found and characterized a new type of adult kidney stem cells (AKSCs) that is capable of self-repairing damaged kidney, which is originally present in the kidney. Furthermore, we demonstrated that mTOR inhibitors promote the proliferation of AKSCs in addition to eliminating CKD-induced AKSC senescence, potentially slowing down the progression of kidney injury.

1. 研究内容

1.1 目的

慢性腎臓病（chronic kidney disease; CKD）において、腎障害の進行を抑制しうる治療薬は未開発であるため、血液浄化療法を必要とする患者数は全世界で増加し続けている。さらに、腎障害の進行の抑制だけでなく、障害を受けた腎臓を元の正常な状態に戻す画期的な方法も報告されていない。我々はマウスにおいて、ホストの腎臓に取り込まれ新たな腎組織となり、腎障害に対して治療効果を発揮する新規の腎臓組織幹細胞（adult kidney stem cell; AKSC）を同定した。さらに、CKD において、同細胞に老化シグナルが特異的に発現することを見出した。本研究の目的は、AKSC の特徴を解析し、老化によって低下した AKSC の腎臓修復能を再活性化することで、病気腎の内部から腎

臓を自己修復する新たな治療法及び活性化した AKSC を用いた細胞療法を開発し、CKD を克服した未来を創ることである。

1.2 結果

1.2.1 新規 AKSC は胎仔期の細胞マーカーを発現し腎臓へ分化する

我々は、虚血再灌流（ischemia-reperfusion injury; IRI）急性腎障害（acute kidney injury; AKI）モデル（IRI-AKI）マウス及び一側尿管結紮 CKD モデル（unilateral ureteral obstruction; UUO）（UUO-CKD）マウスの腎臓の詳細な解析から、両疾患モデルの腎障害を受けた腎臓の内部で新規 AKSC が著しく増加していることを明らかにした。さらに、我々は、IRI-AKI マウスから抽出した新規 AKSC を cisplatin 誘発性 AKI モデル（cisplatin-induced AKI;

cis-AKI) マウスに細胞移植したところ、治療効果を発揮するとともに、ホストの腎臓に取り込まれ、腎組織の一部になることを明らかにした（図1、2）。また、我々は、UUO-CKD マウスの腎臓において、老化シグナルが新規 AKSC で特異的に活性化していることを、世界に先駆けて明らかにし（図3）、UUO-CKD マウス由来の新規 AKSC を cis-AKI マウスに細胞移植したところ、治療効果が失

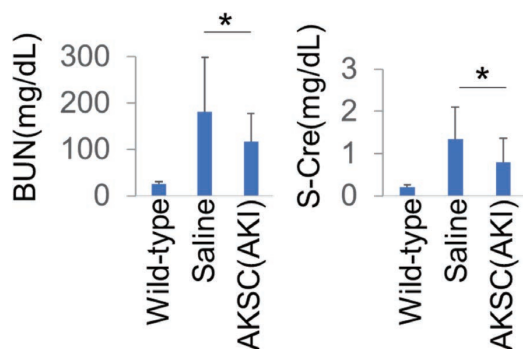


図1. IRI-AKI 由来新規 AKSC の cis-AKI に対する治療効果

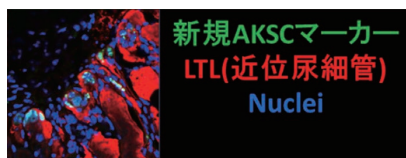
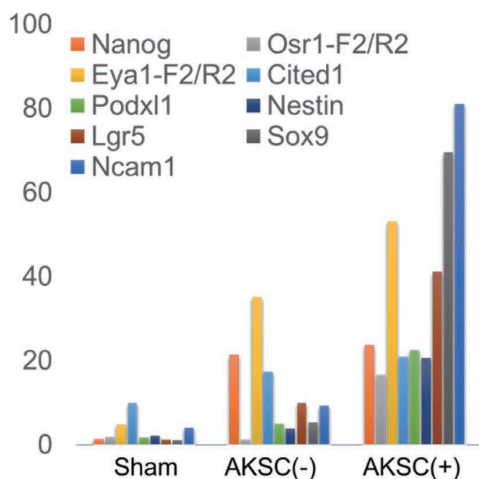


図2. GFP 全身恒常発現マウス由来新規 AKSC のホスト腎臓への取り込み



われることを実証した（図4）。次に、我々は、フローサイトメトリーを用いて抽出した新規 AKSC の遺伝子発現パターンを検証したところ、未分化マーカーや幹細胞マーカー、ネフロン前駆細胞マーカーが強く発現していることを見出した（図5）。さらに、我々は、マウス胎仔のネフロン前駆

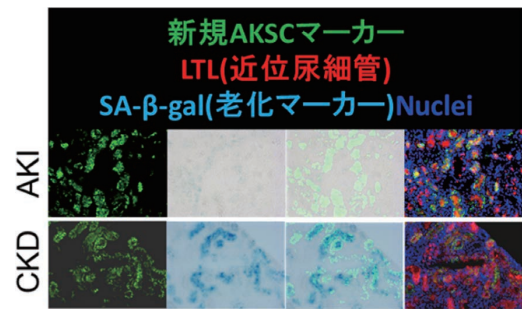


図3. AKI および CKD における新規 AKSC の出現と老化マーカーの発現

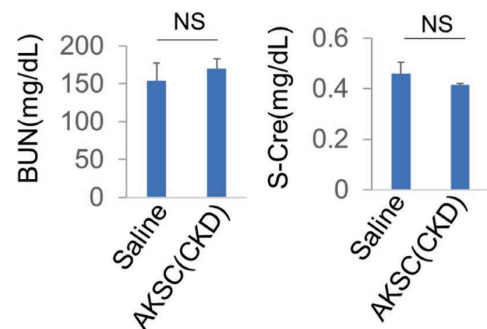


図4. UUO-CKD 由来新規 AKSC の cis-AKI に対する治療効果

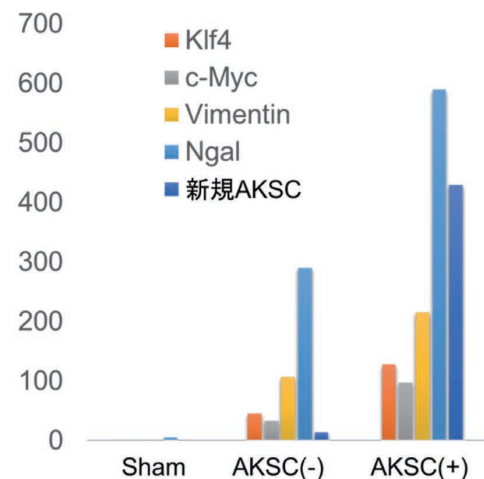


図5. 新規 AKSC に特徴的な遺伝子発現

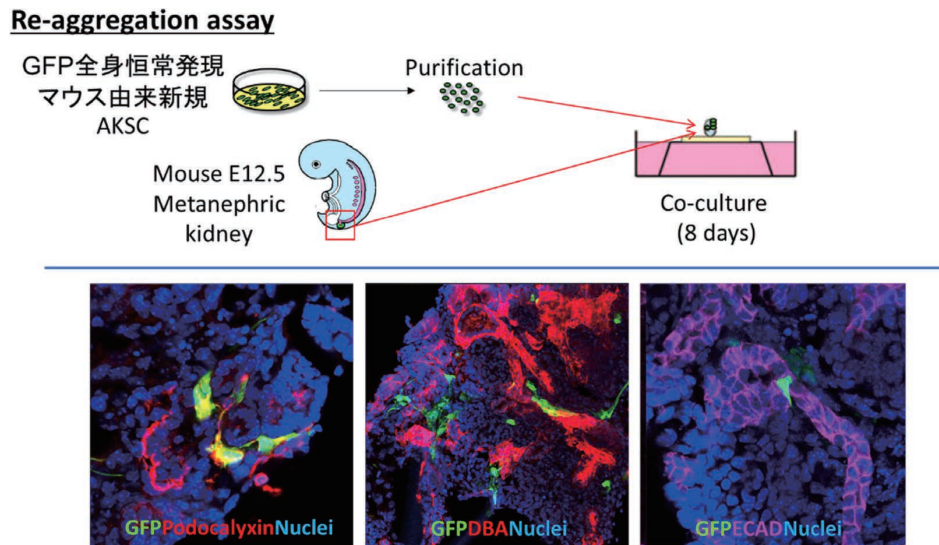


図 6. 新規 AKSC (GFP) の腎臓への分化能の評価

細胞を気相液相培養すると、腎臓構造が再構築されることから、マウス胎仔のネフロン前駆細胞と、新規 AKSCs を混合し、気相液相培養を行ったところ、新規 AKSCs が、糸球体や尿細管細胞に分化し、マウス胎仔由来の腎臓組織に取り込まれることを明らかにした (図 6)。

1.2.2 mTOR 阻害剤は新規 AKSC の老化を除去し、増殖を促進することで腎障害の進行を緩徐にする

AKI において、障害を受けた腎臓は、時間経過とともに、修復されるが、CKD においては、修復されないことが知られている。我々は、UUO-CKD マウスにおいて、特異的に新規 AKSCs の老化が認められることから、CKD の腎臓が修復されないのは、腎臓の内部に存在する新規 AKSCs の老化が関与していると考え、文献上、UUO-CKD に対して治療効果を示す薬剤が、新規 AKSCs に対して効果を呈するのではないかと考えた。複数の文献から、mTOR 阻害剤である Rapamycin (Rapa) が、UUO-CKD マウスの腎線維化及び老化を抑制するといった報告があるため (Cell Cycle, 2009; PLoS One, 2021)、我々は、Rapamycin を中心として、複数の mTOR 阻害剤を UUO-CKD マウスに投

与し、老化マーカーの発現を指標にしてスクリーニングを実施した。予想に反して、Rapamycin を投与したマウスの UUO 側の腎臓において、SA- β -GAL (senescence-associated β -galactosidase) の発現は抑制されていなかったが、PP242 (Torkinib) および Azathioprine (AZA) を投与した群においては、SA- β -GAL の発現は抑制されており、さらに、PP242 を投与した群においては、新規 AKSC の発

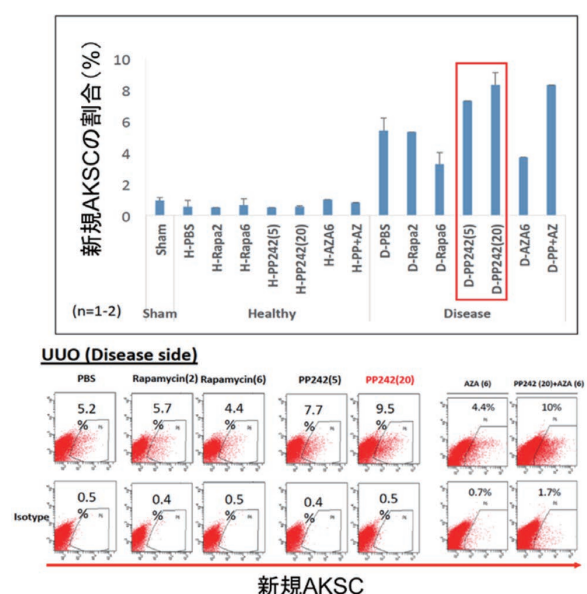


図 7. フローサイトメトリーによる UUO-CKD マウスに対する mTOR 阻害剤の効果の検証

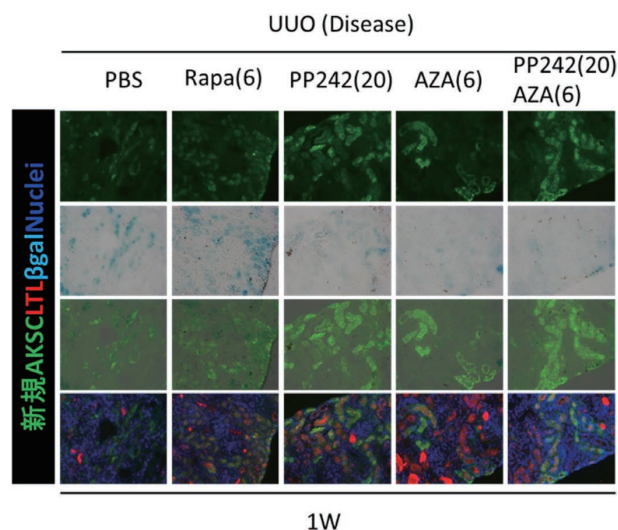


図8. 免疫染色による UUO-CKD マウスに対する mTOR 阻害剤の効果の検証

現が増加していた（図7、8）。

1.3 考察

CKD に対する治療法については、食事療法をはじめ、レニン-アンギオテンシン系阻害剤による腎線維化の抑制及び糸球体内圧の低下作用や、近年、注目を集めている SGLT-2 阻害剤などによる、尿細管糸球体フィードバック機構の正常化による糸球体負荷の軽減などが報告されている。しかし、失われた腎機能を取り戻す治療法については未開発であり、腎臓再生療法に期待が寄せられている。腎臓再生療法については、大きく分けて、3つの方向性が考えられている。1, iPS 細胞などの多能性幹細胞を腎臓組織に分化すること、2, 特定の遺伝子を強制発現することによって腎臓細胞を生み出す Direct conversion、3, 腎臓にもともと存在する腎臓組織幹細胞を活性化することである。iPS 細胞については、最も盛んに研究がされているものの、腎臓オルガノイドの成熟度が胎児期の腎臓に一致するため、未熟な組織であることから、機能的な問題点が指摘されている（Nature, 2016; Cell Rep., 2020）。また、移植した iPS 細胞由来の腎臓系譜細胞がホストの腎臓に取り込まれ、腎臓として機能する例は報告されていない。次に、Direct

conversion については、腎臓系譜細胞を作成するための遺伝子の組み合わせが、完全に解明されておらず、腎臓への遺伝子発現ベクターの高効率な送達方法も確立していないため課題は多い。一方、腎臓組織幹細胞については、もともと腎臓に存在する成熟化した細胞腫であることから、オフターゲット細胞は存在せず、安全に腎臓の修復が可能な理想的な細胞腫である。しかし、これまで、slow-cycling cell (Maeshima A., JASN., 2003) をはじめとして、様々な細胞腫が報告されたが、AKSC の特徴や機能は明確にされておらず、腎臓への分化能のみが評価されており、腎臓に対する腎臓修復機能についても検証されていない。つまり、本研究において実施した、AKSC の移植による腎臓の治療は、AKSC が腎臓再生医療の発展に大きく貢献できることを実証した成果である。また、AKI で障害を受けた腎臓は修復されるが、CKD では修復されない機序として、AKSC の老化の関与を明らかにし、さらに、mTOR 阻害剤によって、AKSC の老化を除去することで、AKSC の増殖が促進できることを突き止めた。しかしながら、本研究では、AKSC が新しい腎臓に分化し、障害部位を補完して機能しているかについては十分に検証できておらず、今後、lineage-tracing などの手法を用いて詳細に検討する必要がある。

2. 発表（研究成果の発表）

【学会発表】

- 1, Araoka T, Ryosaka M, Toyohara K, Inui C, Watanabe A, Osafune K. DEVELOPMENT OF NOVEL CELL THERAPEUTIC STRATEGIES FOR AKI AND CKD USING HUMAN iPSC-DERIVED NEPHRONS PROGENITOR CELLS, 21st International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Boston, USA
- 2, 荒岡利和、ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞を用いた AKI および CKD に対する新規細胞療法の開発、第 53 回日本腎臓学会西部学術大会、シ

ンポジウム 3「線維化と腎再生の最前線」、岡山
3, 荒岡利和、兩坂誠、豊原光佑、乾ちひろ、長船
健二、AKI および CKD に対するヒト iPS 細胞
由来ネフロン前駆細胞を用いた新規細胞療法の
開発、第 66 回日本腎臓学会総会、横浜