

特別講演

iPS 細胞を用いた腎疾患と糖尿病に対する再生医療の開発に向けて

京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門教授 長船健二

要 約

無限の増殖能と全身の臓器の構成細胞への多分化能を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) から作製した細胞種を移植することによって臓器の機能不全の回復を図る再生医療の開発研究が進捗している。そして、すでに本邦において網膜、角膜、神経変性疾患などの患者に iPS 細胞由来の細胞種の移植を行う臨床試験が開始されている。他の臓器と比べ遅れを取っていたが、近年、iPS 細胞から腎臓と膵臓系譜への分化誘導法開発も著しく進展し、腎臓様組織 (オルガノイド) や機能的な膵島様組織が作製可能となっている。著者らは、iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞、エリスロポエチン産生細胞、膵島様組織を用いて、それぞれ急性腎障害 (acute kidney injury; AKI)、腎性貧血、糖尿病モデルマウスにおいて細胞療法の治療効果を見出した。今後、iPS 細胞由来の腎細胞や膵細胞を用いた細胞療法の実現によって、腎疾患やその合併症および糖尿病に関わる医学的問題と医療経済的問題の解決が期待される。

KEY WORDS iPS 細胞, 再生医療, 慢性腎臓病, 糖尿病

はじめに

2008 年に京都大学の山中伸弥教授と米国のトムソン教授がヒト iPS 細胞 (人工多能性幹細胞; induced pluripotent stem cell) を樹立して、10 年少しが経過した^{1, 2)}。iPS 細胞は、体細胞に OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC などの初期化因子である転写因子の組み合わせを導入することで樹立され、無限の増殖能と全身の臓器の構成細胞種へ分化する多分化能を有する。その 2 つの特長を活用し、iPS 細胞から作製した細胞を用いて、細胞療法 (cell therapy, 狭義の再生医療)、疾患モデル作製 (disease modeling)、治療薬探索 (drug discovery)、薬剤毒性評価 (toxicology) などの臨床応用と実用化を目指した研究が精力的に行わ

れている³⁾。そして、近年、本邦において網膜、角膜、神経変性疾患の患者に対する iPS 細胞由来の細胞種の移植がすでに実施され、難治性疾患の患者体細胞から樹立された iPS 細胞を用いた疾患モデルを用いて同定された治療薬候補の治験も開始されている。

本稿においては、本邦における iPS 細胞を用いた再生医療全般と著者が行っている腎臓、膵臓領域における iPS 細胞研究の現状と今後の展望について述べてみたい。

1. iPS 細胞を用いた再生医療の現状

iPS 細胞の開発当初、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターなどゲノムに組み込ま

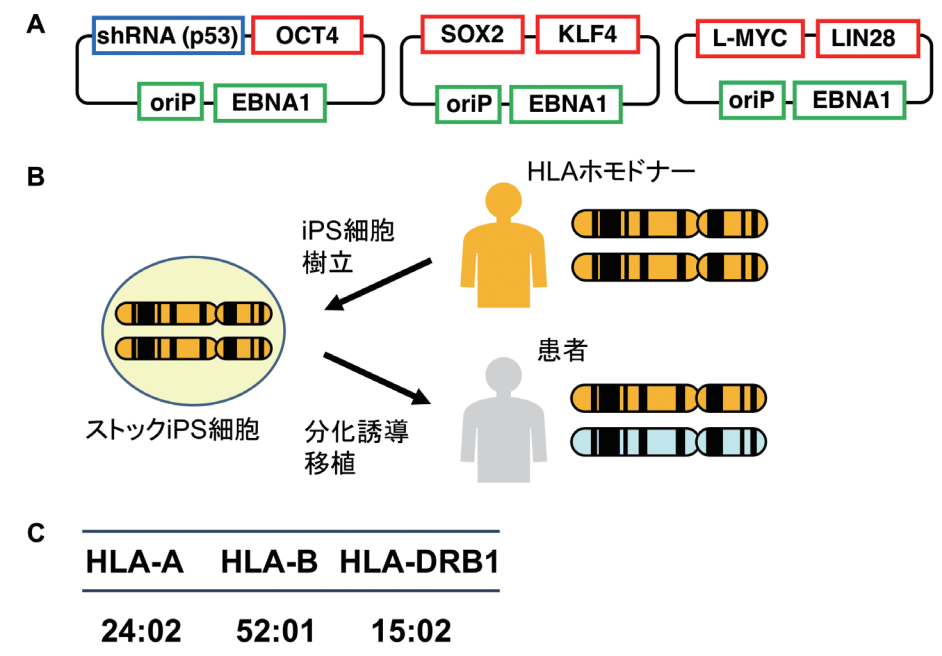


図 1 iPS 細胞を用いた細胞療法の実現に向けた技術開発

(A) エピゾーマルベクターを用いた OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, shp53 の 6 因子導入による iPS 細胞樹立法。
(B) HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 遺伝子座がホモの健康人ドナーからの再生医療用ストック iPS 細胞株の樹立。
(C) 日本人に最も頻度の高い HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 遺伝子座。文献 4) より改変し引用。

れるベクターを用いた初期化因子の導入が行われていたため、それらのベクターが、がん遺伝子の近傍に組み込まれ活性化することによるがん化の危険性が危惧されていた。この課題の克服に向けて、ゲノムを傷つけない、がん化の危険性のない iPS 細胞の樹立方法の開発が世界的に競争となり、初期化因子の mRNA を直接細胞内に導入する方法や低分子化合物処理など多く方法が報告されたが、どの方法も iPS 細胞の樹立効率と再現性が低いことが問題であった。

近年、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) では、Epstein-Barr (EB) ウイルス由来の配列を用いたエピゾーマルベクターによる OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, shp53 の 6 因子を導入する iPS 細胞の樹立方法が開発された (図 1A)^{4, 5)}。本方法では、エピゾーマルベクターが核内のゲノムへの組み込みを必要とせず、細胞質内で初期化因子を発現するため、上述のがん化の危険性がなく

なる。また、オリジナルのレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いた方法と同等かそれ以上の効率で確実に iPS 細胞を樹立できる優れた方法である。

iPS 細胞は、患者本人の体細胞から樹立可能であるため自家移植を行うことで拒絶反応の問題を回避可能とするが、現時点の技術レベルでは、個々の患者の iPS 細胞を樹立し自家移植を行うとコストが高額となり、また移植までに時間がかかることが問題となる。この問題の解決に向けて CiRA では再生医療用の iPS 細胞ストックの整備を進めている。この目的のために拒絶反応に関連の深い HLA 遺伝子座である HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 がホモである健康人ドナーから iPS 細胞ストックが樹立されている (図 1B, C)^{4, 5)}。移植を受ける患者におけるこの 3 つの遺伝子座の片側が一致しているストック株から分化誘導した細胞を使用する。現在、国内の再生医療の臨床試験を検

討している研究施設への分配が進められており、すでに 2017 年に神戸の先端医療センターにおいてストック iPS 細胞株を用いた他家移植が滲出型加齢黄斑変性症の患者に実施された。

2014 年秋の世界初の iPS 細胞を用いた臨床試験である滲出型加齢黄斑変性症に対する細胞療法に続き、本邦において 2018 年にパーキンソン病、2019 年には角膜幹細胞疲弊症に対する細胞療法の手術が実施された。さらに、脊髄損傷、重症心不全、先天性代謝異常症、軟骨疾患、1 型糖尿病に対する細胞療法や、iPS 細胞由来血小板の輸血療法や iPS 細胞由来免疫細胞の輸注によるがん治療などの臨床試験が実施に向けて準備が進められている。

2. 腎臓の再生

解剖学的構造や発生過程が複雑であるなどの理由により、他の臓器と比べ遅れをとっていたが、近年、iPS 細胞を用いた腎臓の再生研究が著しく進展している。著者らは、ヒト iPS 細胞から腎臓を派生させる胎生初期の組織である中間中胚葉の細胞を高効率で分化誘導する方法を確立し、中間中胚葉細胞を経由してヒト iPS 細胞から初めて腎細胞と腎組織を作製することに成功した⁶⁾。著者らの報告に続いて、ヒト iPS 細胞とヒト ES 細胞 (embryonic stem cell；胚性幹細胞) から中間中胚葉を経て、糸球体と尿細管を派生させる胎生期のネフロン前駆細胞を選択的に分化誘導する報告が続いた。太口らは、マウスを用いた系譜解析により中間中胚葉が前方と後方の 2 つのドメインに分かれており、前方中間中胚葉より集合管から膀胱の一部までの下部尿路上皮を派生させる前駆細胞である尿管芽が発生し、後方中間中胚葉よりネフロン前駆細胞が分化することを示した⁷⁾。さらに太口らは、マウスの ES 細胞とヒト iPS 細胞の両者から後方中間中胚葉を経て選択的にネフロン前駆細胞を分化誘導し、その誘導されたネフロン前駆細胞から糸球体と尿細管を含む腎組織を初めて作製することに成功した。

ヒト iPS 細胞から尿管芽組織の分化誘導も太口

らと著者らの 2 グループから報告されている^{8,9)}。また、太口らはマウス ES 細胞から分化誘導したネフロン前駆細胞と尿管芽細胞に加え、マウス胎仔由来の腎間質前駆細胞を組み合わせることで糸球体、尿細管、集合管を含む 3 次元の腎組織の作製に成功した⁸⁾。今後、ヒト iPS 細胞から糸球体と尿細管に加え集合管を含む腎組織の作製が期待される。

3. 腎疾患に対する細胞療法

著者らは、ヒト iPS 細胞からの 3 次元の腎臓の再構築と並行して、ヒト iPS 細胞由来の腎細胞を用いた急性腎障害 (acute kidney injury；AKI) の症状軽減や慢性腎臓病 (chronic kidney disease；CKD) の進行抑制を図る細胞療法の開発を目指している。著者らは、ヒト iPS 細胞から腎前駆細胞マーカーである核内転写因子 OSR1 と SIX2 両陽性のネフロン前駆細胞を分化誘導する独自の方法を開発し、虚血再灌流障害による AKI モデルマウスの腎被膜下に移植することによって腎障害が軽減する治療効果があることを見出した¹⁰⁾。ホストマウスの血中尿素窒素 (blood urea nitrogen；BUN) 値や血清クレアチニン値などの血液腎機能検査値の上昇が有意に抑えられ (図 2A)、さらに組織学的にも尿細管壊死や円柱形成などの AKI の典型的な腎組織障害の所見や慢性化の指標である間質線維化が有意に軽減していることを明らかにした (図 2B)。腎被膜下に移植したネフロン前駆細胞は、ホスト腎実質に移動することなく AKI に対する治療効果を発揮したため、治療効果の主な機序として、腎栄養因子を分泌することによるパラクライン効果が考えられた。そして、実際にヒト iPS 細胞由来のネフロン前駆細胞が、HGF (hepatocyte growth factor；肝細胞増殖因子)、ANG-1 (angiopoietin-1)、VEGF (vascular endothelial growth factor；血管内皮細胞増殖因子) などの代表的な腎栄養因子を分泌することを確認した¹⁰⁾。現在、著者らは、この治療効果の主体となっている因子の同定と治療効果の機序解明、さらに CKD マウスモデルに対する本

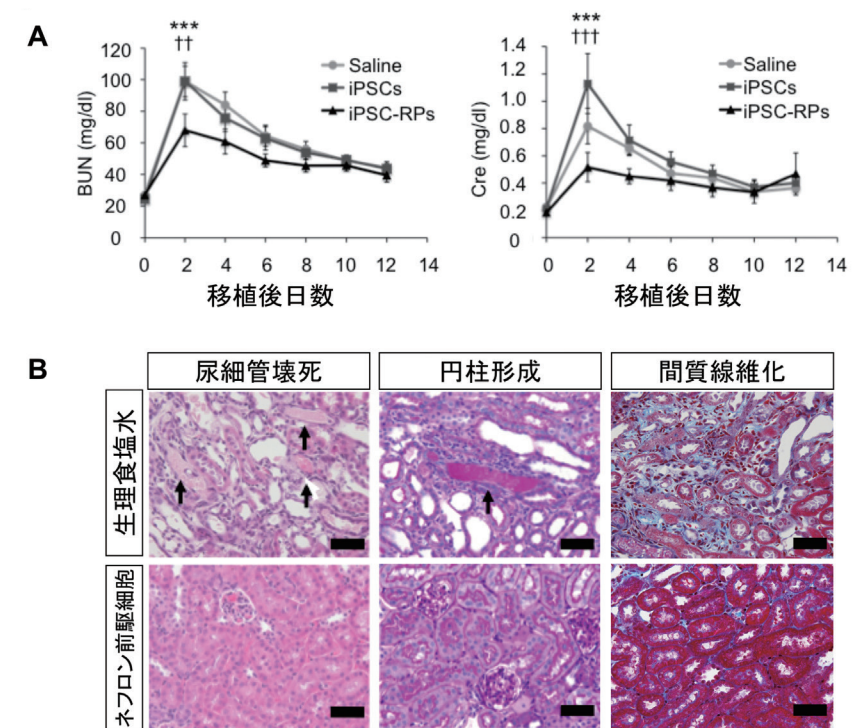


図2 iPS 細胞を用いた腎疾患に対する細胞療法の開発

- (A) 虚血再灌流による急性腎障害 (acute kidney injury；AKI) モデルマウスに移植を行い腎機能の推移を評価した。左のグラフは血中尿素窒素 (blood urea nitrogen；BUN) 値、右は血清クレアチニン (Creatinine；Cre) 値。●：生理食塩水を投与したマウス群、■：未分化 iPS 細胞を移植したマウス群、▲：iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞を移植したマウス群。***p<0.001, ++p<0.01, +++p<0.001。
- (B) ホストマウスの腎組織像。生理食塩水投与群 (上段) に比べ、ヒト iPS 細胞由来ネフロン前駆細胞移植群 (下段) では、尿細管壊死 (Hematoxylin Eosin (HE) 染色)、円柱形成 (Periodic Acid Schiff (PAS) 染色) などの AKI の組織所見、および、慢性化の指標である間質線維化 (Masson trichrome (MT) 染色) が有意に軽減されていた。スケールバーは 20mm。文献 10) より改変し引用。

細胞療法の治療効果を検証している。今後、これらの研究を進め、CKD の進行を抑制する細胞療法の実現を目指している。

4. 腎性貧血に対する細胞療法

著者らは、iPS 細胞技術を用いて腎疾患に加えてその合併症の問題の解決も目指している。CKD が進行すると腎臓からの造血ホルモンであるエリスロポエチン (erythropoietin；EPO) の産生と分泌が低下するため腎性貧血が合併する。ヒト遺伝子組換え EPO 製剤の治療が効果を発揮しているが、間欠的な EPO 投与では貧血の生理

的コントロールが困難であり、EPO 製剤の医療費も高額となっている。

この問題の解決に向けて、著者らはヒト iPS 細胞から EPO 産生細胞の作製を行った。EPO は成体では腎臓で産生されるが、胎児期や成体でも重症の貧血時や腎不全患者では肝臓でも産生されることに着目した。そして、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法を改良し、EPO 産生細胞を作製することに成功した (図 3A)¹¹⁾。

ヒト iPS 細胞から作製された EPO 産生細胞は、生体内のものと同様に低酸素素に反応し EPO の産生と分泌を増加させた (図 3B)。加えて、低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor；HIF) の分

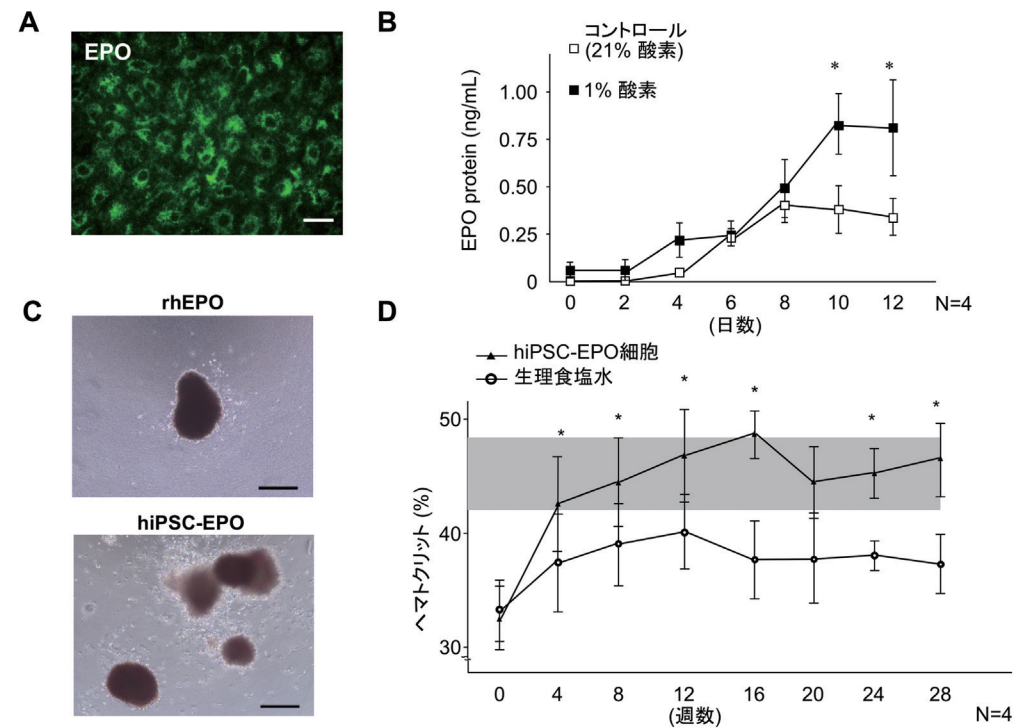


図3 iPS細胞を用いた腎性貧血に対する細胞療法の開発

- (A) ヒト iPS 細胞由来のエリスロポエチン (erythropoietin; EPO) 産生細胞. EPO に対する免疫染色像.
 (B) ヒト iPS 細胞由来 EPO 産生細胞は低酸素培養条件 (1%) に反応して EPO 分泌量を増加した.
 (C) CD34 陽性ヒト臍帯血造血前駆細胞を用いたコロニーアッセイ法において、遺伝子組換えヒト EPO 製剤 (rhEPO; 上図) およびヒト iPS 細胞由来 EPO 細胞が産生した EPO 蛋白質 (下図) によって誘導された赤芽球系コロニー.
 (D) アデニン投与により腎性貧血を惹起させた免疫不全マウスの腎被膜下にヒト iPS 細胞由来 EPO 産生細胞を移植し、移植後 28 週までホストマウスのヘマトクリット値の推移を評価した. 灰色は、ホストマウスのヘマトクリット値正常域.
 * $P < 0.05$. スケールバーは (A) 40mm, (C) 200mm. 文献 11) より改変して引用.

解を阻害するプロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain; PHD) 阻害剤に反応して EPO 産生を亢進させることも確認した. また, 本細胞が産生する EPO 蛋白質は代表的な造血細胞のアッセイであるコロニーアッセイによって, 赤血球系の造血を促進する機能を有することも示された (図 3C). さらに, 本細胞をアデニンの経口投与により薬剤性に慢性腎不全と腎性貧血を惹起させた免疫不全マウスに移植したところ, 1 回の移植によって, 本腎性貧血マウスの寿命にほぼ相当する 7 カ月間にわたり貧血を生理的にコントロールすることを明らかにした (図 3D)¹¹⁾. 将来的には, 本研究で開発されたヒト iPS 細胞由来の

EPO 産生細胞を用いて, EPO の産生を制御する薬剤の同定や腎性貧血を生理的にコントロールする細胞療法の開発が期待される.

5. 糖尿病に対する細胞療法

近年, 複数種の新薬の登場により 2 型糖尿病の診療成績は向上しているが, より重症の 1 型糖尿病に関しては, 深刻なドナー不足の問題を抱える膵移植と膵島移植しか根治療法が存在せず, ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞由来の移植用膵組織を用いてドナー不足の問題を解決することが期待されている.

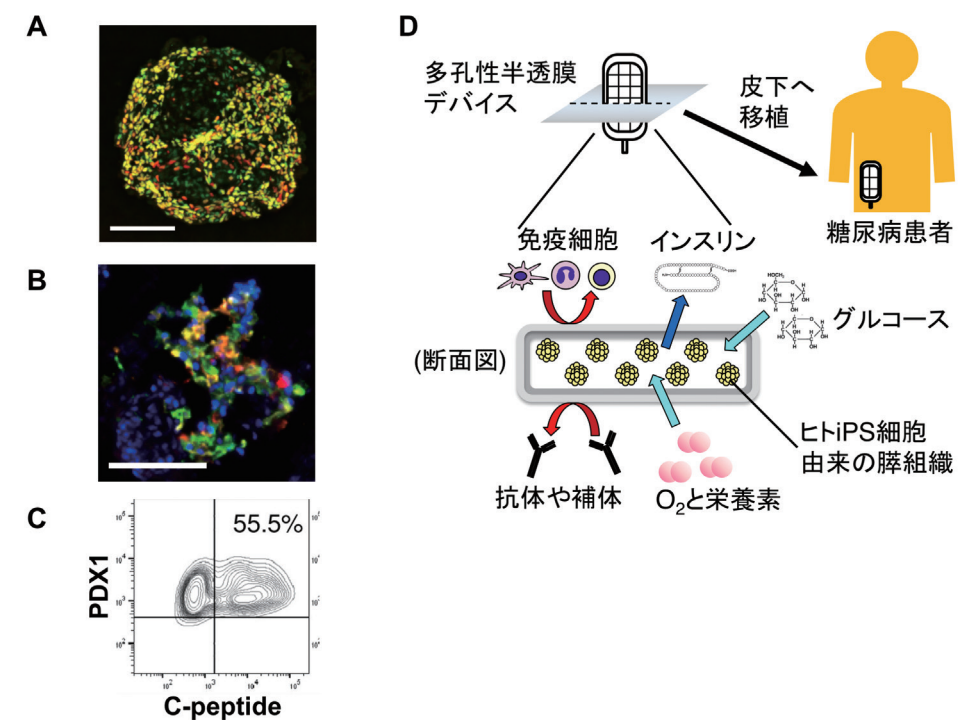


図4 iPS細胞を用いた糖尿病に対する細胞療法の開発

- (A) ヒト iPS 細胞由来の膵前駆細胞の PDX1 (緑) と NXK6.1 (赤) に対する免疫染色像.
 (B, C) ヒト iPS 細胞由来の膵島様組織における C-ペプチド (緑) とグルカゴン (赤) に対する免疫染色像 (B) と PDX1 と C-peptide に対するフローサイトメトリー解析 (C). スケールバーは 100mm.
 (D) 多孔性半透膜から作製された免疫隔離デバイスを用いたヒト iPS 細胞由来の膵島様組織の移植の模式図. (A) は文献 12), (B, C) は文献 15), (D) は文献 17) より改変し引用.

数年前までヒト iPS/ES 細胞から in vitro においてグルコース応答性インスリン分泌能を有する機能的な膵 β 細胞を作製することは困難であった. しかし, ヒト iPS/ES 細胞から分化誘導された胎児期の膵前駆細胞をマウス体内に移植することで, 体内環境を用いて膵前駆細胞からグルコース応答性インスリン分泌能を有する β 細胞を含む膵組織に分化と成熟することが示されていた. すなわち, ヒト iPS/ES 細胞から生体内のものと同等の膵前駆細胞を作製することは技術的に可能であった. 著者らも独自のヒト iPS 細胞から膵前駆細胞への高効率の分化誘導法を確立し, その膵前駆細胞を免疫不全マウス体内に移植することによって, 成熟した膵組織を作製し, 糖尿病モデルマウスの血糖値を低下させることに成功した

(図 4A)¹²⁾.

近年, 国外の 2 グループを皮切りに in vitro においてヒト iPS/ES 細胞からグルコース応答性インスリン分泌能を有する機能的な β 細胞を含む膵島様組織の作製が報告されるようになった^{13, 14)}. 著者らも, 独自の分化誘導法を開発し, ヒト iPS 細胞から 55% 以上の割合で β 細胞を含む膵島様組織を作製することに成功した (図 4B, C)¹⁵⁾. また, これらのヒト iPS/ES 細胞由来の膵島様組織は糖尿病モデルマウスに移植後, 少なくとも 4 カ月以上, 血糖値を低下させる治療効果を維持することが報告されている¹⁶⁾.

膵細胞の分化誘導技術に加え, 移植方法の開発も世界的に盛んに行われている. 現行のドナー由来膵島の移植では, カテーテルを用いて門脈内に

投与が行われるが，ヒト iPS/ES 細胞由来の膵組織の移植では安全性を担保した移植方法が検討されている．その 1 つとして，多孔性半透膜で作製されたカプセルに移植用の iPS/ES 細胞由来の膵組織を内包し，患者の皮下などに移植するデバイスの作製が進められている（図 4D）¹⁷⁾．この多孔性膜の穴の大きさを調節することによって，酸素や栄養素，インスリンとグルコースは通り抜けられ，カプセル内の膵組織は生存し，カプセル外のグルコース濃度に反応してインスリンをカプセル外に分泌できる．一方，抗体や補体などの液性免疫因子や免疫細胞は，この穴を通り抜けることができないため，カプセル内の膵組織を拒絶反応や自己免疫などの免疫反応から隔離可能となることが想定されている．本デバイスが完成すると，移植を受けた患者が免疫抑制剤を服用する必要性がなくなるため患者にとってメリットが大きい．また，万が一カプセル内の iPS/ES 細胞由来細胞ががん化などの有害事象を起こした際もカプセル外にがん細胞が出ることはなく，このカプセルごと切除可能であるため，安全性が担保される．著者らもこのようなデバイスを完成させ，数年内に 1 型糖尿病患者へヒト iPS 細胞由来膵島様組織を移植する細胞療法の臨床試験開始に向けて準備を進めている．

おわりに

発生過程が複雑であるなどの理由によって，他の臓器の構成細胞種と比べ分化誘導研究が遅れを取っていたが，近年，ヒト iPS 細胞から腎組織や機能的な膵島様組織が作製可能となっている．ヒト iPS 細胞から完全な 3 次元の臓器としての腎臓と膵臓を再構築して，腎移植や膵移植のドナー不足の問題を解決するまでには，まだまだ技術的な課題が多く時間がかかることが予想される．しかし，現時点で作製可能となっている腎組織や膵島様組織を用いた細胞療法や疾患モデル作製，治療薬探索などによって，腎疾患と糖尿病の患者の QOL 向上と医学的および医療経済的問題の一日も早い解決が期待される．

謝辞

著者らの研究は，日本医療研究開発機構（AMED）の再生医療実現拠点ネットワークプログラム「iPS 細胞研究中核拠点」，「技術開発個別課題」，「疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム」および難治性疾患実用化研究事業により，助成を受けたものである．

◆文 献

1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131 : 861-872, 2007
2) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318 : 1917-1920, 2007
3) Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, et al : Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. Physiol Rev 99 : 79-114, 2019
4) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al : A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods 8 : 409-412, 2011
5) Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al : An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. Stem Cells 31 : 458-466, 2013
6) Mae S, Shono A, Shiota F, et al : Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. Nat Commun 4 : 1367, 2013
7) Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al : Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 14 : 53-67, 2014
8) Taguchi A, Nishinakamura R : Higher-Order Kidney Organogenesis from Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 21 : 730-746, 2017
9) Mae SI, Ryosaka M, Toyoda T, et al : Generation of branching ureteric bud tissues from human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun 495 : 954-961, 2018
10) Toyohara T, Mae S, Sueta S, et al : Cell Therapy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Renal Progenitors Ameliorates Acute Kidney Injury in Mice. Stem Cells Transl Med 4 : 980-992, 2015
11) Hitomi H, Kasahara T, Katagiri N, et al : Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells ameliorate renal anemia in mice. Sci Transl Med 9 (409), 2017. pii : eaaj 2300.
12) Toyoda T, Mae S, Tanaka H, et al : Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. Stem Cell Res 14 : 185-197, 2015
13) Rezaia A, Bruin JE, Arora P, et al : Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 32 : 1121-1133, 2014
14) Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, et al : Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. Cell 159 : 428-439, 2014
15) Kimura A, Toyoda T, Nishi Y, et al : Small molecule AT7867 proliferates PDX1-expressing pancreatic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. Stem Cell Res 24 : 61-68, 2017
16) Vegas AJ, Veisheh O, Gurtler M, et al : Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. Nat Med 22 : 306-311, 2016
17) Kondo Y, Toyoda T, Inagaki N, et al : iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. J Diabetes Investig 9 : 234-243, 2017



◆長船健二略歴

1996 年	京都大学医学部卒業 （京都大学医学部附属病院老年科入局，北 徹教授）
2003 年	東京大学大学院理学系研究科博士課程修了 （理学博士取得，浅島 誠教授）
2005 年 2008 年～	ハーバード幹細胞研究所客員研究員（Douglas A. Melton 教授） 京都大学 iPS 細胞研究センター （現京都大学 iPS 細胞研究所）に所属
2014 年	同研究所教授，現在に至る．

Towards iPS cell technology-based regenerative medicine for kidney diseases and diabetes

Kenji Osafune

Professor, Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University

Recent progress in regenerative medicine researches using human iPS cells, which have the potential to expand forever and differentiate into any cell type in our body, is noteworthy. Clinical trials of cell therapy using human iPS cell-derived somatic cell types against retinal, corneal and neurodegenerative disorders have already been started in Japan. Until recently, the methods to differentiate human iPS cells into kidney and pancreas lineage cells had not been established. However, the directed differentiation researches to induce these lineages has also substantially advanced, which enable to generate the kidney-like tissues (kidney organoids) containing glomeruli and renal tubules and functional pancreatic islet-like tissues with glucose-responsive insulin secretion potential from human iPS cells. Our research group demonstrated that cell therapies using kidney progenitor cells, erythropoietin (EPO)-producing cells and pancreatic tissues differentiated from human iPS cells ameliorate acute kidney injury (AKI), renal anemia and diabetes in mice, respectively. Further studies to realize these regenerative medicine strategies will contribute to solving the medical and medicoeconomical problems associated with kidney diseases and diabetes.

Keyword : iPS cell, regenerative medicine, chronic kidney disease, diabetes

Address for correspondence

53 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Phone : 075-366-7058

Fax : 075-366-7077

E-mail address

osafu@cira.kyoto-u.ac.jp