

再生医療技術を応用した腎尿細管の再生・修復による 急性腎不全の新規治療法の開発

高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
教授 寺田 典生 (てらだ よしお)

はじめに

急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は、2005 年の AKI ネットワーク (AKIN) により定義された用語であり、現在、欧米を中心に急性腎不全 (acute renal failure: ARF) に代わる用語として一般的になってきている。AKI の診断や治療に関する検討は RIFLE 分類や AKIN による AKI 分類をもとに行われる方向となり、知識の集積が期待される。また尿細管の再生のメカニズムについても多くの基礎的研究の集積がなされている。AKI における尿細管の障害と回復のメカニズムを申請者らの知見を中心に再生医学的見地から纏めてみたい。

I) 尿細管障害と再生医学

再生医療には、従来の医療では治療することのできなかつた高度の機能の障害を回復させ得る“夢の治療”として大きな期待が寄せられている。特に臓器移植が極めて限定されている我が国では、再生医療への期待は大きい。神経、肝臓、膵臓、心臓などにおいては、再生医療分野に関する報告が多く見受けられる。その細胞の起源としては、iPS 細胞、ES 細胞、骨髄幹細胞、組織幹細胞、臍帯血などの候補があり、それぞれの特性を生かした研究がなされている。

一方腎臓は再生医学という点でやや出遅れている臓器といった印象を与えがちであるが、それは血液透析や腹膜透析の治療法が広く普及し、慢性腎不全の治療法が透析療法という点では完成度が高く、治療成績が良いことに起因していると思われる。しかし急性尿細管壊死などの急性腎不全において、機能が回復する病態も存在することもよく知られている。急性尿細管壊死では、脱落した尿細管細胞を補うべく新規に尿細管細胞が再生されているのだが、どの細胞を起源として尿細管細胞が再生されるのか、またどのような因子が再生を決定づけるのかという問題は未だに解明されていない。現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で 28 万人を越え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化に伴う腎硬化症が増加し、さらに透析療法導入患者の増加が予想され、社会医学的な医療費の面からも、抜本的対策が急務である。進行性腎障害

の特徴である荒廃してゆく腎組織を、何らかの方法で回復させることが必要である。その一つの可能性として腎尿細管細胞あるいは、腎糸球体の再生をはかることにより、腎組織と腎機能の回復を期待することができるかもしれない。

II) 尿細管細胞障害の病態生理

AKI の病理所見として AKI の回復期に入ると、扁平な尿細管上皮細胞が尿細管基底膜に沿って増殖を始める。徐々に細胞丈は回復し、正常な尿細管上皮細胞に近づく。腎機能が可逆性の場合はこのような過程を示すが、不可逆性の場合には尿細管萎縮と間質の線維化へ向かう。尿細管障害の原因は虚血、薬剤など原因は様々であるは、多くの場合、尿細管細胞内の ATP の枯渇という直接的な障害と、尿細管そのものあるいは血管、白血球から誘導される炎症性サイトカインや酸化ストレスの亢進による炎症が起こり、それに引き続く尿細管のアポトーシスあるいはネクローシスが、尿細管の脱落を起こす。しかしながら AKI の症例の約 3 割が尿細管細胞が再生し、腎機能は回復することが知られており、そのメカニズムが近年明らかになってきた。

III) 尿細管細胞再生のメカニズム

この尿細管細胞の再生のメカニズムについては、近年多くの研究があり、尿細管 S3 セグメントに存在する幹細胞が再生に重要とする考え方と、元々ある尿細管細胞が形質転換 (Defirrentiation) する説がある。

a. 腎細胞再生に関わる骨髄由来の細胞

雌マウスの雄マウスの骨髄を移植する実験において、尿細管上皮細胞、間質細胞、糸球体上皮細胞の核に Y 染色体が検出され、少なくともそれらの細胞の一部は骨髄細胞に由来することが判明した (1)。また同様に糸球体メサンギウム細胞の一部も骨髄細胞に由来することが、明らかになった (2, 3)。ヒトにおいても女性ドナーの腎を男性に移植した場合、尿細管上皮細胞や糸球体に Y 染色体陽性細胞が検出された。ただ最近細胞融合をいう現象が注目され、単に Y 染色体が陽性ということから、骨髄細胞が腎細胞に分化誘導したとは、結論し得ないという考えもある。このように腎臓の細胞の一部は骨髄由来幹細胞に由来すると考えられることから、そのような幹細胞を同定し、分化の機序を明らかにすることができれば、障害を受けた腎細胞を再生する細胞療法を開発するため

の手がかりが得られる可能性がある。骨髄由来の細胞がメサンギウム細胞の分化誘導されることは、多くの報告が裏づけているが、それを病態の改善にどう結びつけるかは今後の問題であろう。

一方 LacZ 遺伝子あるいは GFP 遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウスの骨髄を移植し、虚血再還流による急性尿細管障害を作成したモデルマウスでの検討では、マーカー遺伝子が尿細管内で認められた報告と、認められないとする報告がある、すなわち骨髄細胞が尿細管細胞に分化誘導されたという報告とされないという報告があり、尿細管細胞については、次の章で述べる腎に内在する尿細管細胞の関与の方が大きいのではないかという議論が多いのが現状であるが、今後のさらなる検討が必要と考えられる。しかし G-CSF 等で骨髄細胞の遊走を促進すると AKI の予後が動物実験レベルで改善したという報告は散見される(4)。骨髄中の hematopoietic stem cells (HSCs) あるいは mesenchymal stem cells (MSCs) が腎臓に遊走し、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、細胞増殖作用がある液性因子を介して尿細管の再生に関与しているという考え方が有力である(5)。

b. 尿細管の脱分化 [dedifferentiation] による再生

前述したように当初は骨髄細胞が腎に recruit され、尿細管細胞に分化するという考え方が広まったが、現在は分化してもごくわずかな尿細管である、急性腎不全後の再生尿細管の多くは骨髄細胞由来でなく、腎臓の内因性の細胞かあるいは腎内にある幹細胞由来であるという考え方は主流になったと考えられる。その決め手ともなった論文は、尿細管由来の細胞にのみマーカー遺伝子を入れた実験で、AKI 後の再生細胞が生存した元々ある尿細管細胞由来である事を示した Bonventre らの仕事である(6)。彼ら及び我々のデータからは、AKI の病態の過程でダメージを受けた尿細管細胞がアポトーシスあるいはネクローシスを起こして脱落するが、残った細胞が脱分化 [dedifferentiation] し、増殖再生するという考え方が出てきている。我々の実験でも AKI の回復期に腎胎生期に出現する様々な遺伝子(Wnt4, Notch, Ets1)が再発現し、増殖能の高い細胞が出現することを報告している(7-9)。この脱分化がどのようなメカニズムで起こるかは不明であるが、hematopoietic stem cells (HSCs) あるいは mesenchymal stem cells (MSCs) が放出する液性因子の関与などが考えられる。また虚血などの刺激のあと腎内で様々なサイトカインや増殖因子が発現し、尿細管細胞が脱

分化し、増殖能が高い細胞が出現する可能性が示唆されている。

c. 腎尿細管細胞再生に関わる内因性の幹細胞

現在多くの臓器に幹細胞が存在し、再生に関与する事が報告されている。腎臓内の幹細胞に関する研究も多くなされている。Oliver らは腎髄質に幹細胞のマーカーのひとつである slow cycling cell が腎髄質にあり尿細管に分化すると報告をしている(10)。一方前島らは腎皮質に slow cycling cell の存在を報告している(11)。ただ急性腎不全の回復期には、PCNA 陽性細胞は髄質外層部を中心に多くみとめられるが、その分裂細胞すべてがいわゆる幹細胞由来であるとは考えにくい。また虚血などの刺激のあと腎内で様々なサイトカインや増殖因子が発現し、尿細管細胞が脱分化した場合、幹細胞的な細胞が出現する可能性が示唆されており幹細胞と脱分化した細胞の明確な区別は困難である。図に示すように現時点では、尿細管細胞の再生には少なくとも3つの可能性があり、一つは腎内の幹細胞の分化、二つ目は腎内の細胞が何らかの機序で脱分化 (defifferentiation) を起こし分裂能の高い細胞になる、3つ目は骨髄細胞など腎外からの細胞の recruit とその細胞によるサイトカインの関与である。

d. iPS 細胞、ES 細胞からの腎細胞誘導の現状

ES 細胞 (胚性幹細胞) は初期胚から樹立された未分化細胞である。また iPS 細胞も ES 細胞と同じ各種の細胞への分化誘導能があり、しかも倫理的な問題が少ないことから、臨床応用への期待が高まっている。ES 細胞からの腎臓の形成に関する報告としては、Thomson らによるマウス ES 細胞をマウス腎皮膜下に移植すると奇形腫が発生し、その構成はさまざまな胚葉からなるが、その中に腎糸球体も散見されるという *in vivo* の実験報告 (12) や、Schuldiner らによるヒト ES 細胞から胚葉体を形成し、そこにさまざまな成長因子を添加し分化に与える影響を検討した結果、レニンなどのマーカーを発現する細胞を誘導したという *in vitro* の実験報告 (13) があるのみである。この二つの初期の研究は腎臓への分化については詳細な検討はされていない、我々を含めていくつかのグループは、マウス ES 細胞をソースとして用いての尿細管細胞への分化誘導の報告をした(14)。また横尾らは MSC を胎生期の腎内に移植して、腎再生をはかるという独創的な業績も上げている(15)。しかしながら腎臓は 20 種類以上にも及ぶそれぞれが機能分化した細胞集団から構成され、また解剖学上も非常に複雑

な臓器であり、現段階では腎臓そのものの再生にはとても及ばないのが現状であるが、今後 iPS 細胞等を用いた研究の進展が望まれる。

IV) 今後の展望

年々増加し続ける慢性腎不全と透析患者数の現状を改善すべく、我々 Nephrologist は少しでも臨床に結びつく可能性のある研究には前向きに取り組み、全力をあげて考える必要があると思われる。最近では一般の新聞などにも多くの再生医学の記事が載り、多くの腎臓病の患者さんは腎臓の分野での再生医学の進歩を望んでいる。腎臓の分野での再生医学の臨床応用は現状ではまだまだ先のこととなると考えられるが、臨床応用に持つてゆくためには、まず多くの基礎的な検討が必須であり、この分野での研究の発展が望まれる。今後は AKI の診断や治療に関する検討は RIFLE 分類や AKIN による AKI 分類をもとに行われる方向となり、研究者間・施設間の比較検討により疫学、治療などについての知識の集積が期待される。また尿細管の再生のメカニズムについても多くの基礎的研究の集積がなされており、尿中バイオマーカーの開発ともあわせ新規の診断、治療法の開発を目指してさらに研究をすすめてゆきたい。

参考文献

1. Poulosom R, Forbes SJ, Dilke KH et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J. Pathol.* 195:229-236, 2001
2. Itoh T, Suzuki A, Imai E et al: Bone Marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:2625-2635, 2001
3. Imasawa T, Utsunomiya T, Kawamura t et al: The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1401-1409, 2001
4. Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, et al: Mobilization of Bone Marrow Cells by G-CSF Rescues Mice from Cisplatin-Induced Renal Failure, and M-CSF Enhances the Effects of G-CSF. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: 658 - 666.
5. Cantley LG: Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nat Clin Pract* 1:22-32, 2005

6. Benjamin D. Humphreys, M. Todd Valerius², Akio Kobayashi et al, Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury. *Cell Stem Cell* 2:284-291, 2008
7. Tanaka H, Terada Y, T. Okado T et al: Expression and function of Ets-1 during experimental acute renal failure in rats. *Journal of American Society of Nephrology*, 15, 3083-3092, 2004
8. Terada Y, Tanaka H, Okado T et al: Wnt4 Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *Journal of American Society of Nephrology*, 14, 1223-1233, 2003
9. Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, Tanaka H, Okado T, Kuwahara M, Tohda S, Sakano S, Sasaki S. Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury. *Kidney Int.* 73:1240-1250, 2008.
10. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH et al: The renal papilla is niche for adult kidney stem cells. *J. Clin. Invest.* 114:795-804, 2004
11. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of Renal Progenitor-Like Tubular Cells that Participate in the Regeneration Processes of the Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, Dec 2003; 14: 3138 - 3146.
12. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998
13. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, et al: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11307-11312, 2000
14. Kobayashi T, Tanaka H, Kuwana H et al: Wnt4-transformed mouse embryonic stem cells differentiate into renal tubular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 336, 585-595, 2005
15. Yokoo T, T. Ohashi T, JS. Shen JS et al: Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Pro Nat Aca Sci USA*, Vol.102, 3296-3300, 2005