

特集1

腎臓再生医療への扉を開く

発生メカニズムをたどり、iPS細胞から立体的な腎臓組織を作成

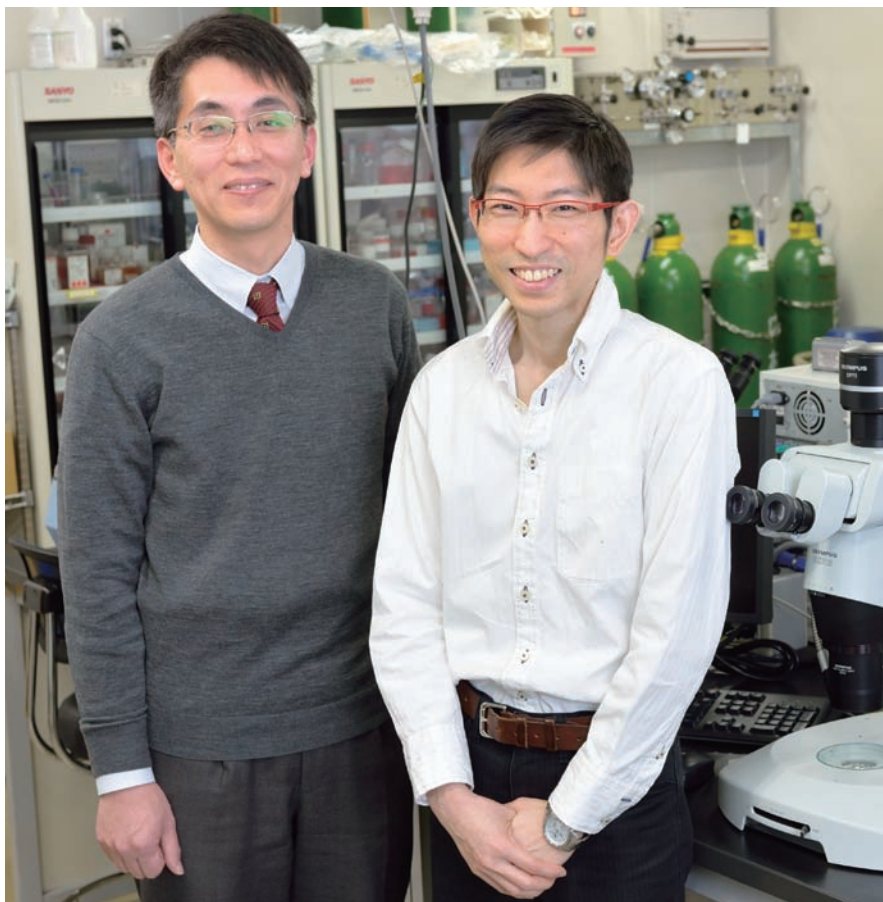
腎臓病は進行すると回復が難しく、重症化すると人工透析か臓器移植をするしかない。日本では透析患者が毎年約1万人のペースで増え、不自由な生活を余儀なくされている。他の臓器の再生医療研究は進んでいるものの、腎臓は再生のカギを握る前駆細胞（臓器を構成する細胞のもとになる細胞）をつくる見通しすら立たず、実現は極めて困難といわれていた。そのような状況の中、熊本大学発生医学研究所の西中村隆一教授と太口敦博助教らは、胎児の腎臓が形づくられるメカニズムを解き明かすことから研究に取り組み、ついに世界で初めてマウスES細胞やヒトiPS細胞からシャーレ（培養皿）での立体腎臓組織の作成に成功した。

患者を救いたい 一心から研究へ

腎臓は腰の少し上あたり、背骨の左右に1つずつある。血液をろ過して必要なものを再吸収し、老廃物や毒素、水分から尿をつくることにより、体液のバランスを一定に保ち血圧を整えるなど重要な役割を果たしている。腎臓の機能が低下すると、老廃物や毒素が体の外へ排出されず、疲労感、嘔吐、睡眠障害などを引き起こし、機能が失われると生命に危険を及ぼす。一度低下した機能が元に戻ることはなく、症状が進むと最終的には人工透析を続けるか、数少ないドナーを待って腎臓移植をするしか治療の道がなくなる。しかも近年、腎不全患者は急速に増え続け、人工透析を受ける患者数は、2012年には国内で31万人にも上っている。

「治療で病気の進行を遅らせることはできても、腎臓の機能を回復させることはできません。腎臓内科医だったころは、いつも無力感にさいなまれていました」と、西中村さんは臨床医時代を思い出す。医師として7年間、腎臓病患者の過酷さを嫌というほど目にしたことから、腎臓再生の研究に取り組んだ。「移植できる腎臓をつくるといっても、当時はまだ何もわかっていない状態でした。ですから、まずは腎臓が胎児の中でどのようにしてできるのかを調べる発生学に取り組むことにしました」と話す。

腎臓は、機能の異なる多くの組織からつくられている複雑な臓器だ（p.4図）。血液から尿になる成分をろ過する糸球



西中村さん（左）と太口さん。研究室で。

体、ろ過された成分から体に必要な塩分や糖、水分などを再び吸収する尿細管、尿細管と膀胱をつなぐ尿管、そして糸球体にろ過する血液を運ぶ毛細血管と、主なものでもこれだけある。これらを構成する細胞が適切に組み合わさって初めて、尿をつくり出す機能が生まれる。

腎臓を再生するには、必要な細胞がどのようにつくられ、成長していくのか、その仕組みを明らかにするのが近道に違いない。しかし、構成要素と機能の複雑さ

ゆえ、それすら難しいとも考えられていた。実際、2012年に発表されたiPS細胞研究のロードマップでも、腎臓の再生は最後に位置付けられている。

成長過程を 1日ずつさかのぼる

西中村さんは再生医療への応用を見据えて、1996年から腎臓発生の研究をスタートさせた。当時、腎臓ができあがる仕組みに取り組んでいた研究者は世界でも

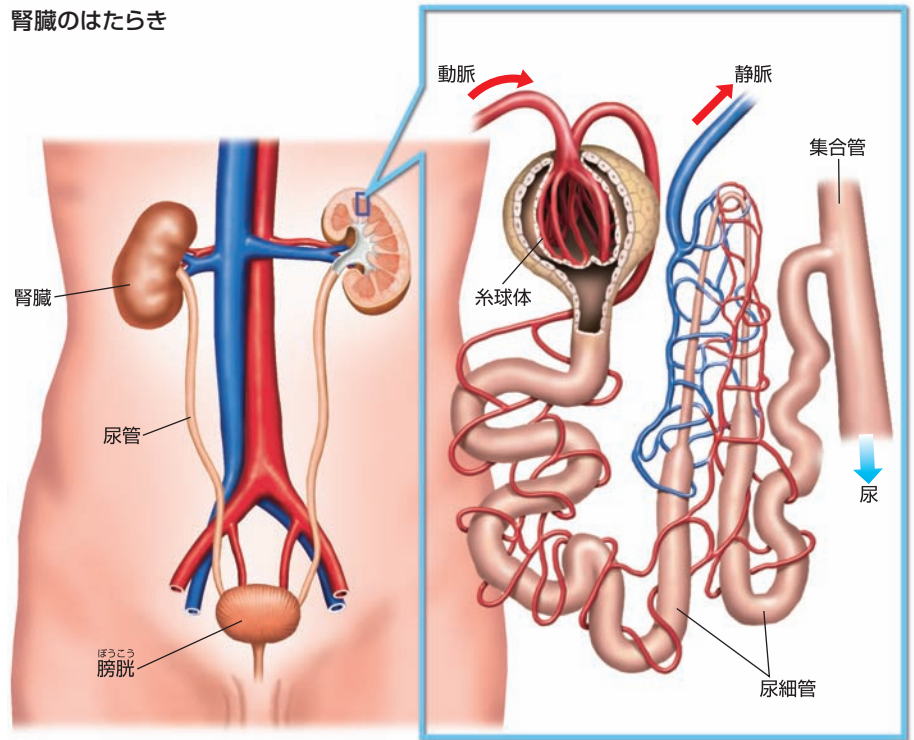
ほとんどおらず、「腎臓を試験管内でつくられるわけがない。それは本当にサイエンスとして成立するのか」などと言われながらも、コツコツと研究を積み重ねてきた。

最初に用いたのはカエルであった。いきなり哺乳類で研究するのは難しいと考えていた。カエルの遺伝子の中から腎臓をつくるために重要と思われるものを1つ1つ見つけ出しては、マウスでそれらに相当する遺伝子の働きを調べた。

2001年にマウスで腎臓をつくるために重要な働きを担う遺伝子Sall1を発見し、2006年にはこの遺伝子をもとに、腎臓へと成長する前駆細胞を見つけることに成功した。その前駆細胞から腎臓の中心部分となる糸球体と尿管がつくられることも確認した。

西中村さんは、発生の過程を逆にたどる手法をとってきた。マウスの胎児で腎臓の糸球体や尿管ができてくるのが受精から15日目（p.5上図）。腎臓前駆細胞が形成されるのは、その前の10日目。この糸球体と尿管のもとになる細胞は、8日目や9日目どの細胞から発達するのか。その過程でどんな成長因子（細胞の増殖などを促すたんぱく質）が必要な

腎臓のはたらき



腎臓は血液をろ過し、尿をつくる器官。インゲンマメに似た形の外側の部分（右図に拡大）には、丸い糸玉のような「糸球体」が約100万個あり、それぞれに「尿管」がつながっている。糸球体では毛細血管から老廃物などを含む水分がこし取られ、尿管で塩分やブドウ糖などの栄養分だけが水分とともに血管に再吸収される。できた濃い尿は尿管を通して膀胱へ送られる。

か。1日ずつさかのぼって調べていく。それには、各段階のカギとなる遺伝子が発現している細胞が光るように、蛍光を出させる遺伝子を組み込んだマウスをつくるなどの地道な検証作業が必要となった。

腎臓前駆細胞を発見したのと同じ時期に、この前駆細胞で発現していた遺伝子Osr1が、マウス胎児の「中間中胚葉」でも発現しているという報告を見つけた。中間中胚葉は、発生の初期段階、腎臓前駆細胞ができる2日ほど前に存在している細胞群で、泌尿器や生殖器がつくられる部分と考えられていた。泌尿器の一部である腎臓も、中間中胚葉からできるという見方が大勢を占めていた。西中村さんをはじめ、

世界中の研究者が、多能性幹細胞からまず中間中胚葉をつくり、糸球体と尿管のもとになる腎臓前駆細胞を作り出そうと躍起になって研究を進めた。しかし、この実験を成功させることは、誰にもできなかった。

腎臓再生を目指す新人

この行き詰まりを打ち破ったのが、2009年に博士課程の大学院生として研究室に入ってきた太口さんだった。もともと研究者を目指していたが、恩師から「せっかく医学部を卒業したのだから、何年かは臨床医を経験してもよいのではないか」とのアドバイスを受け、3年間診療に携わった経歴も持つ。2年を研修医として過ごしてから選んだ腎臓内科

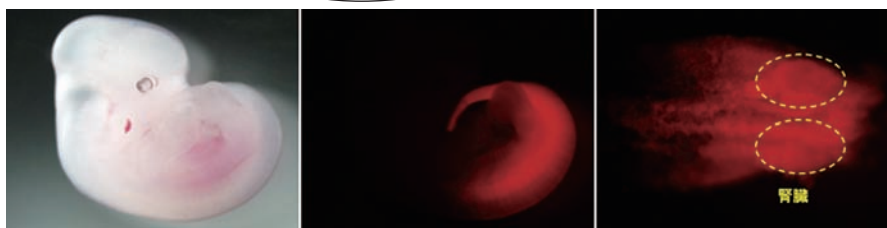
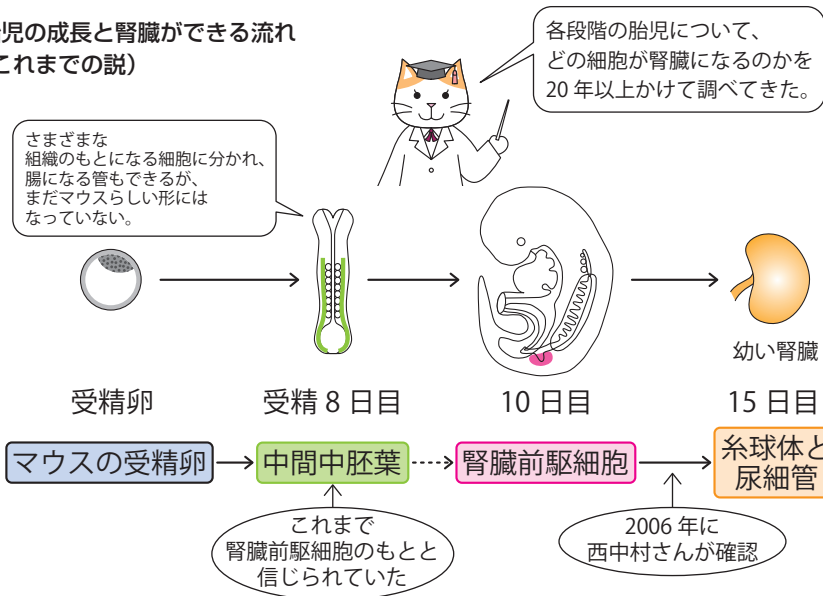


西中村 隆一 にしなかむら・りゅういち
熊本大学発生医学研究所 腎臓発生分野 教授

1987年に東京大学医学部を卒業し、同大学医学部付属病院、自治医科大学付属病院などで腎臓内科医として4年間勤務。91年に東京大学医科学研究所分子生物学研究部研究生、93年より米国DNAX研究所客員研究員。96年に東京大学大学院医学系研究科博士課程を修了し、東京大学医科学研究所幹細胞シグナル分子制御研究分野助手。2000年より客員助教授。04年より熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野教授、東京大学医科学研究所客員教授。09年より現職。10年より同研究所副所長を兼任。02年よりさきがけ研究者（～05年）、09年よりCREST研究課題「iPS細胞を用いた組織幹細胞誘導の確立と分子基盤の解明」（研究代表者：江良沢実教授、熊本大学）のグループリーダー。



胎児の成長と腎臓ができる流れ
(これまでの説)



左は体軸幹細胞を含む領域が赤く示されるようにした遺伝子改変マウス(受精から12日目の胎児)。腎臓をつくる腎臓前駆細胞が、下半身を形成する体軸幹細胞から発生することが明らかになった(中・右)。右は開腹した様子。

では、苦しむ患者の実態を目の当たりにし、やがて「腎臓再生の研究に賭けよう」との思いに駆られて第一人者である西中村さんの門をたたいた。

太口さんに与えられたテーマは、「マウスのES細胞から腎臓前駆細胞をつくり出す」ことだった。受精卵からつくられた万能細胞をシャーレで目的のものに育てるこのテーマは、研究室で何人もの学生や研究員がギブアップしていた。念願の新たな挑戦者の到来に、西中村さんは一も二もなくこの研究を任せることにした。「初心者には厳しいテーマでしたが、太口君は年上の研究員にも物怖じせずに意見を言えるタイプで、センスもよいと感じました。私からあれこれうるさく言わず、自由にやらせてみました」と当時の思いを語る。

「とにかく実験を重ねるしかない」と何度も細胞培養を繰り返したものの、初めのうちはなかなか結果が出せず、試行錯誤の連続だったと太口さんは言う。「他の臓器の再生のように、多能性のES細胞にいろいろな成長因子を加え、腎臓をつくる上で最適な成長因子の組み合わせを探そうと考えていました。しかし、続けるうちに、この方法ではらちがあ

かないと思うようになったのです。そして、発生過程を逆にたどる方法が一番の近道ではないかと考えるようになりました。」

捨てていた細胞が突破口に

太口さんも、他の研究者が取り組んだように、中間中胚葉から腎臓前駆細胞をつくり出そうとした。実際、9日目のマウス胎児からOsr1遺伝子が働いて光っている細胞だけを集めて、必要な成長因子を与えると目的の前駆細胞に育つことは確かめられた。しかし、その1日前にOsr1が発現している中間中胚葉からの過程が一向にうまくいかない。大学院での研究

生活も3年目の終わりを迎え、そろそろ博士論文をまとめる時期に入っていた。

「どちらかというとな楽観的な性格ですが、さすがに博士論文に響きそうになると焦りが出ました。少しでも糸口をつかもうと、今まで捨てていた光っていない方の細胞も『1回くらい試してみようか』と、ふと思ったのです」。

そのちょっとした思いつきが事態を大きく進展させた。1回くらいという思いで試した受精8日目の中間中胚葉以外の部分の細胞から、今まで誰もつくれなかった腎臓前駆細胞ができたのだ。生物学の教科書に合わない結果でもある。「このときは、さすがに自分でも驚きました」。

さまざまな文献を検討した結果、もともなった細胞は初期の胎児の尾部に存在する「体軸幹細胞」と呼ばれる細胞群の一部ではないかと考えた(p.6図)。最近の研究で、胎児は上半身が先に形づくられ、その後体軸幹細胞から下半身ができることがわかりつつある。太口さんは、この体軸幹細胞から腎臓前駆細胞ができるのであれば、実験結果ともつじつまが合うと考えた。

それが正しいかどうかを確かめるに

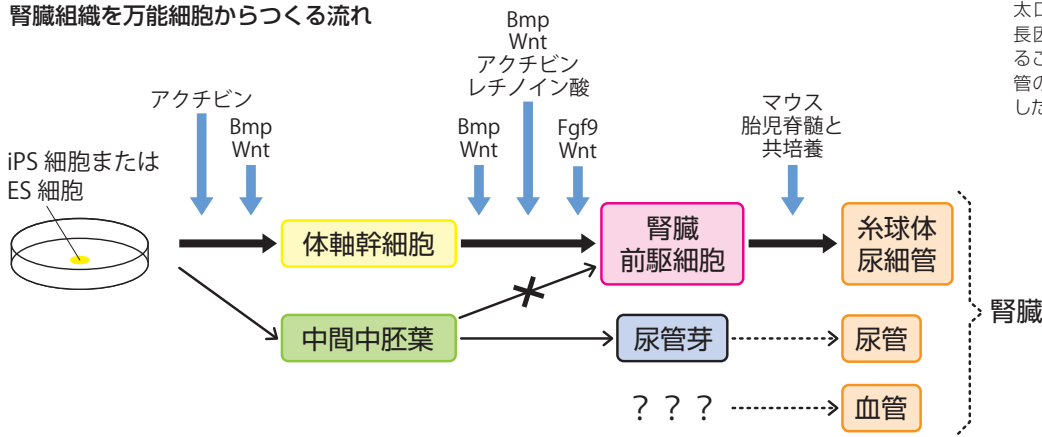


太口 敦博 たぐち・あつひる

熊本大学発生医学研究所
腎臓発生分野 助教

2006年に九州大学医学部を卒業後、京都大学病院での研修医を経て、順天堂大学で1年間腎臓内科医として勤務。2014年3月に熊本大学大学院医学教育部博士課程を修了。同年4月より現職。

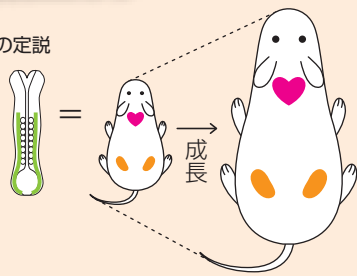
腎臓組織を万能細胞からつくる流れ



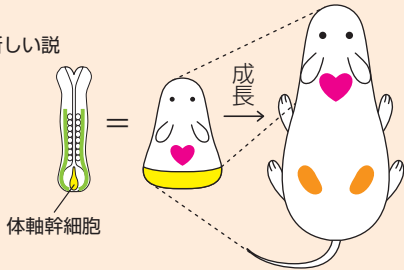
太口さんは各段階で幾種類もの成長因子（青矢印）を与えながら培養することで、万能細胞から糸球体と尿管の立体組織をつくり出すことに成功した。今後は点線部分が課題となる。

体軸幹細胞とは…

教科書の定説



新しい説



定説の三胚葉モデルでは、受精後の早い時期に外胚葉（初期の胎児の外側部分）には皮膚や神経、内胚葉に消化管や肺、その間の中胚葉に血管系や骨、泌尿器などになる細胞がひと通り揃うとされた（上図）。1920～1930年代の両生類での研究から生まれた説だが、それでは説明がつかない報告も当時から一部あった。

近年、広く認められるようになったのが「体軸幹細胞」の働きだ。上半身になる細胞がある程度揃った段階でも、下半身のもとはこの一群の細胞のままなのだ。この体軸幹細胞から、さまざまな機能を持つ細胞が作られていく（下図）。

管芽が集まって巧妙に形成されている（上図）。それが、何よりの驚きであった。

ヒトiPS細胞でも確認せよ

ここまで来たら、当初の目標である「マウスのES細胞から腎臓前駆細胞をつくる」ところまであと一歩。「同じマウスの細胞でも、ES細胞から目的の細胞をつくるには、さらに高いハードルを越えなければなりません。そこをうまく越えることができるかが次の課題でした」と西中村さん。しかしそんな心配をよそに、太口さんは半年ほどでマウスのES細胞から確実に腎臓前駆細胞をつくり出す条件を探し当て、さらに糸球体と尿管の立体的な組織をつくり出すことに成功した。

「肉眼や実体顕微鏡で確認したら管ができていたので大丈夫だとは思っていましたが、組織をスライスして顕微鏡で確認すると、構造がしっかりつながっていて、とても感動しました。成功を知らせようと、すぐに太口さん呼びました」と先に結果を確認した西中村さんは話す（p.7上図）。「自信はありましたが、西中村先生から『できているよ』と呼ばれたときは、自分でも改めて本当にビックリしました」と太口さんも笑顔で話す。

太口さんと西中村さんは、この成果を急いで論文にまとめて分野最高峰の学術雑誌に投稿した。だが、マウスのES細胞で成功しただけでは掲載が認められなかった。

「噂には聞いていましたが、本当にヒトの細胞での実験を求められました」と太口さんは苦笑する。幸い、研究室ではい

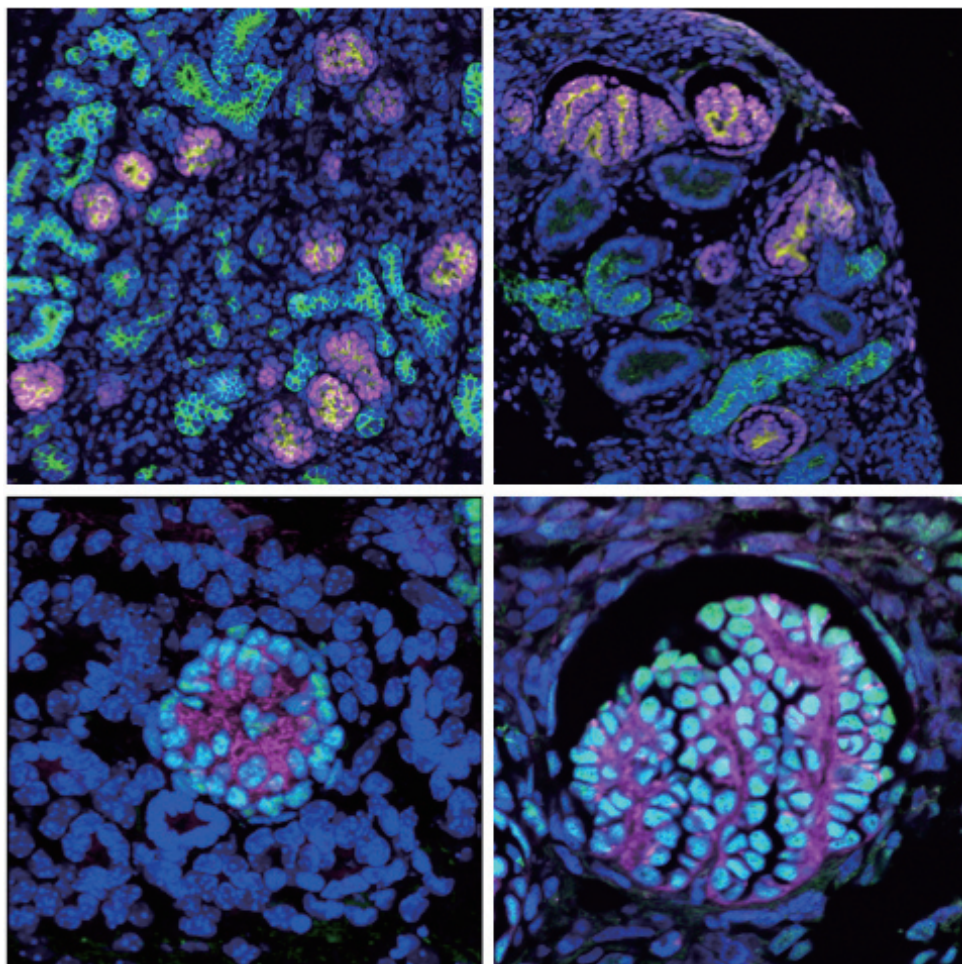
は、発生の過程で体軸幹細胞がどのような細胞や組織に変化していくのかをしっかりと観察する必要がある。そのためには体軸幹細胞特有の遺伝子が働いている細胞だけが光るようにしたマウス（p.5写真）が必要だった。だが、必要な遺伝子を組み込んだマウスを新規につくり出すには2年近い時間がかかってしまう。そのとき、実験に必要なマウスが同じ発生医学研究所内でつくられていることを、西中村さんが見つけ出した。

すぐにそのマウスを譲り受けて実験してみたところ、予想通り光る腎臓前駆細胞が現れた。これで体軸幹細胞を経ればよいという正しい道筋が明らかになった。これまで世界で誰も成功しなかったマウスのES細胞からの腎臓前駆細胞の作成に王手をかけた。

「モデルを立てて、ある程度予想してい

たことなので、体軸幹細胞から腎臓前駆細胞が生まれたこと自体にあまり驚きはありませんでした」と太口さん。それよりも驚いたことは、腎臓前駆細胞とともに腎臓を形成し、集合管や尿管のもととなる尿管芽はこの時期の体軸幹細胞からはできないことだったという。後日談になるが、海外の大学にいる研究者が太口さんの論文の2日後に発表した論文が、中間中胚葉を経て尿管芽様の細胞を誘導できることを報告している。

すなわち、糸球体と尿管をつくる腎臓前駆細胞が体軸幹細胞を経てできるのに対して、尿管芽はこれまで言われてきた中間中胚葉からつくられるという道筋が初めて明らかになったのだ。腎臓では、すべてのパーツが同じ場所で作られるのではなく、発生が進む中、別々の細胞群からつくられた糸球体や尿管、尿



上段は、マウスES細胞（左上）およびヒトiPS細胞（右上）から作成された3次元腎臓組織。ピンク色が糸球体、緑色が尿管。下段はそれぞれの糸球体を拡大した画像（上段とは配色が異なる。明るい部分が糸球体）。

ずれ使うだろうと見越して、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）の扱いを学んで培養しているスタッフがいた。学位論文を仕上げなければいけない時期だったが、急いでiPS細胞を使った実験に取り組みはじめた。

「ここまで研究を進めてくることができたのは、腎臓をつくりたいという強いモチベーションがあったからです。学位論文よりも、まずは自分の納得のいくところまでやりたいという思いがあり、さらなる研究にチャレンジしました」とその時の心境を明かす。

マウスES細胞での知見がそのままヒトの細胞にも使えるのか未知数だったが、実験を進めてみると、iPS細胞からの腎臓組織の作成はほとんど同じ手順で進んだ。「ヒトとマウスは、発生の初期に違いがあることがわかっていたので、そこさえわかれば、あとは成長速度が異なるだけでほしい同じような過程になると考えました」という太口さんは、初期に必要な

成長因子を思いつく限りの組み合わせで試した。「最初のローラー作戦で運良く探し当て、後半はマウス細胞で割り出した成長因子を用いて、投与期間を調整して実験を進めたところ、本当にできました。iPS細胞を扱うのは初めてだったので、不安もありましたが、上手くいって安心しました」と話す。理詰めの研究とローラー作戦とをうまく組み合わせた太口さんのアイデアに、幸運の女神がほほえんだ。

形だけでなく尿もつくれる腎臓を

西中村さんは「20年前から腎臓再生を目指して研究をしていましたが、まさかこれほど早くES細胞やiPS細胞から腎臓の立体組織ができるとは思っていませんでした。自分が一生かけても達成できないかもしれないと考えていたことが現実のものになり、感無量です」と話す。2日違いの尿管芽の成果も研究室の卒業生によるものであり、弟子に恵まれたことを喜ん

でいた。

一方の太口さんは、「研究で大切なのは、どんな小さな変化も見逃さない観察力だと思います。予測と違うところを見つけ出し、次に生かしていくことが大事です。1つ1つの実験からどれだけ多くのヒントを拾い集めるか、それが今回のような成果につながると考えています」と力強く語る。

世界初の画期的な成果となったが、これで終わったわけではない。見通しもなかった腎臓再生研究が、やっと他の臓器と肩を並べるまでになった段階である。糸球体と尿管だけでは、実際に血液から尿をこし取ることはできない。肝臓などは、細胞が血管に接していれば機能するので、今回のような組織の芽でも移植が有望だ。しかし腎臓では、1本の血管が組織にぐっと入り、くるくると糸球体を巻いて、尿管にも寄り添う複雑な構造をつくる（p.4図）。

今回できた立体組織（糸球体と尿管）では、まだ血管がつながっていない。そのまま移植しても毛細血管しか入れないため血流が足らず、尿をつくるどころか2週間ほどで縮んでなくなってしまうという。今後は腎臓の血管がどうやってできているのか、ひとつひとつ解いていかないといけない。

前駆細胞からの過程をより簡便な材料で実現すること、尿管芽から生体と同じ枝分かれのある尿管をつくるのが目下の課題だ。その先に尿管や血管を含む立体構造が織りなす“腎臓機能を発揮する組織”の作成を見据えている。

2人とも「形だけではなく、本当に尿をつくることのできる腎臓そのものをつくりたい」と口をそろえる。それを実現するためには、もともになる細胞をすべてそろえ、腎臓として機能する器官に育つ仕組みを再現しなければならない。西中村さんは「まだまだ大きな壁ですが、教え子たちと力を合わせて乗り越えていきたい」と今後に向けた大きな夢を語ってくれた。