

200/0860

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

進行性腎障害に対する進展の抑制に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書 (1/2冊)

主任研究者 林 松彦

平成14年(2002年)4月

## 目次

I. 総括研究報告書	
進行性腎障害に対する進展の抑制に関する研究.....	1
林 松彦	
II. 分担研究報告書	
1. 骨髄由来間葉系未分化幹細胞の培養・分化誘導に関する研究.....	8
福田 恵一	
2. 骨髄幹細胞を用いた腎臓再生法の確立.....	13
川村 哲也	
3. 尿細管細胞幹細胞の分化誘導に関する研究.....	16
佐々木 成	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	20
IV. 研究成果の刊行物・別冊.....	23

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

進行性腎障害に対する進展の抑制に関する研究  
—腎系球体および尿細管細胞再生の腎疾患治療への応用—

主任研究者 林 松彦 慶應義塾大学医学部助教授

研究要旨

本研究は、進行性腎障害ならびに末期腎不全患者の腎機能回復を目指して、腎臓を再生することを目的として立案された。本年度は、腎臓再生に使用可能な腎臓由来の幹細胞取得を試みた。細胞分離装置を用いて、いわゆる side population cell を取得し、培養したところ、多分化能を有することが示され、今後の腎再生への応用の可能性が示唆された。また、in situ での腎細胞再生を目指して、アデノウイルスベクターを用いて、炎症性 cytokine により活性化される細胞内情報伝達物質である NF $\kappa$ B を抑制しうる変異 I $\kappa$ B 遺伝子移入を試みた。アデノウイルスによるこの遺伝子の近位尿細管への遺伝子移入は、進行性腎障害モデル動物の腎障害進行を軽度ではあるが抑制傾向を示し、今後の治療への応用の可能性が示唆された。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設  
における職名

猿田享男 慶應義塾大学医学部教授  
福田恵一 慶應義塾大学医学部講師  
佐々木成 東京医科歯科大学助教授  
川村哲也 東京慈恵会医科大学助教授

不全治療、そして原疾患の治療の開発は急務である。現在、これらの疾患の治療法としては、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、あるいはステロイドホルモン等が用いられているが、根本治療とはいいがたく、進行の遅延がみられる程度か、あるいは治療可能であったとしても薬剤自体の副作用が大きな問題となっている。また、末期腎不全にいたった場合、血液透析、腹膜透析、腎移植が治療の選択枝となるが、患者の生活の質、代謝面等、腎移植が最も優れているものの、腎提供者は極めて限られており、また、移植後の免疫抑制薬による副作用などの問題も発生する。そこで、理想的には、原疾患の根絶と廃絶した腎機能の再生が最善の治療法となるが、今日まで実用化されていない。現実のものとなった高齢社会を

A.研究目的

本邦における透析患者数は20万人に達しようとしており、新規導入患者の30%が糖尿病、30%が慢性糸球体腎炎となっている。この2大原疾患は、発症後5年から20年にわたり進行性に腎機能が低下し、やがて機能廃絶にいたることを特色としている。今後の人口の老齢化を考慮すると、これらの疾患に加え、腎硬化症による末期腎不全も増加することが想定され、末期腎

迎え、増加し続ける腎不全の根治は厚生行政の面からも重要課題であり、また、保険財政の面からも急務となっている。本研究では、これらの問題を踏まえて、腎臓の再生の可能性を検討し、実用化をはかるために立案された。

## B. 研究方法

本研究では、腎機能再生を目標として、in vivo および in vitro の検討を行った。

### 【腎臓からの幹細胞採取の試み】

腎機能の基本は糸球体濾過とその後の濾過液中のイオン、水をはじめとする種々の物質の再吸収、分泌である。この機能の最小単位はネフロンと呼ばれ、糸球体に始まり、近位曲尿細管から内髄質集合管にいたる尿細管から構成される。進行性腎障害では、糸球体硬化と、尿細管萎縮の進行により、次第に機能廃絶にいたる。一方、急性腎不全においては、一時廃絶した腎機能が、尿細管細胞の再生とともに回復し正常化することが知られている。この経過は腎臓内または腎臓外に幹細胞が存在する可能性を示し、本年度は、その同定を試みた。

マウスの腎臓を、コラゲナーゼ含有緩衝液で灌流後、細断し、30分間37℃でIncubationした。その後、28G注射針を通すことにより、個々の細胞にまで分離させ、Hoechst33342と30分から2時間反応させた。細胞がこの色素を十分取り込んだ時点で、fluorescence activated cell sorter (FACS) を用いて、生細胞分画で、かつ、Hoechst33342陰性の細胞、いわゆるside population (SP) 細胞を取得した。得られた細胞を、20%牛胎児血清存在下で培養し、4~7日後に形態を観察すると

もに、抗vimentin抗体で染色を行った。

### 【慢性腎障害モデル動物における間質線維化修復の試み】

平成12年度の検討により、変異I $\kappa$ B組み込みアデノウイルス (Adex I $\kappa$ B $\Delta$ N) により、近位尿細管に変異I $\kappa$ Bを発現させると、アルブミン負荷による蛋白尿モデルの間質障害が抑制されることが明らかとされた。そこで、本年度は、慢性腎障害モデルで同様の検討を行った。

### 慢性腎障害動物モデル

慢性腎障害動物モデルとしては、片腎摘後抗Thy1.1抗体投与ラットを用いた。6週齢雌WistarラットをCharles River Japanから購入し、代謝ケージで飼育した。飼料は高蛋白食 (CA-1、日本クレア) を与え、自由飲水とした。片腎摘出後1週間で、新潟大学清水教授より供与された、抗Thy1.1モノクローナル抗体を尾静脈から投与した。この抗体投与後4週間経過した時点で、開腹し、残存腎の一部を生検した。その後、後述の変異I $\kappa$ B組み込みアデノウイルス (Adex I $\kappa$ B $\Delta$ N)、LacZ組み込みアデノウイルス (AdexLacZ)、CTLA4-Ig組み込みアデノウイルス

(AdexCTLA4-Ig)、生理食塩水を、腎動脈上下で大動脈をクリップにより遮断した後、大動脈内に投与した。投与後3分間血流を遮断した状態としてからクリップを解除した。

各群ラットの尿、血液サンプルを採取し尿中蛋白・クレアチニン排泄量、血中アルブミン、クレアチニン、総コレステロールの定量を行った。また、アデノウイルス投与4週間後、すなわち、抗Thy1.1抗体投与後、8週間後に動物を屠殺して、腎組織

の検討を行った。

(倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki 宣言を遵守し、当学動物実験基準にのっとり研究を行った。

### C. 研究結果

【腎臓からの幹細胞採取の試み】

FACS により、コラゲナーゼ処理した腎細胞から、Hoechst33342 陰性細胞を取得した。施行した場合により異なるが、約 0.7% の細胞が SP 細胞として分離された。1X10<sup>5</sup> 個の SP 細胞を、96 穴のプレートで 4 日から 7 日間培養したところ、一部はメサンギウム様の形態を呈し、一部は神経細胞様の形態を呈する細胞へと分化・増殖が認められた。これらの細胞を抗 vimentin 抗体により染色を行うと、メサンギウム様の形態を示した細胞の少なくとも一部は vimentin 陽性細胞であった。神経細胞様細胞に関しては、現時点でその性質を同定中である。

【慢性腎障害モデル動物における間質線維化修復の試み】

尿中蛋白量は生食群、AdexLacZ 群の間で有意差を認めず、また、AdexLacZ + AdexCTLA4-Ig 群と AdexI $\kappa$ B $\Delta$ N + AdexCTLA4-Ig 群で有意差を認めなかった。また、血清クレアチニン、24 時間内因性クレアチニークリアランス、尿蛋白量ともにこれらの 4 群間で有意差を認めなかった。

顕微鏡所見は、これまでの報告と一致して、4 週後の時点で、糸球体領域におけるメサ

ンギウム細胞の増殖、基質の増加を認め、間質への細胞浸潤を認めた。さらに、生検 4 週後の時点では、最初の生検時に比べ、糸球体硬化の進展、尿細管萎縮をはじめとする間質障害の進展が対照群で明らかに認められた。AdexLacZ 投与群では対照群に比べ、やや高度な変化を認め、この変化は AdexCTLA4-Ig の同時投与群でもほぼ同様であった。これに対し、AdexI $\kappa$ B $\Delta$ N + AdexCTLA4-Ig 群では、間質細胞浸潤の減少、尿細管萎縮の軽減が認められたが、その改善傾向は、以前の研究において用いたアルブミン負荷ラットに比べ、顕著ではなかった。現在 CTLA4-Ig の発現効率を検討中である。

### D. 考察

マウスの腎臓から、腎再生のための尿細管、および糸球体構成細胞の幹細胞取得を目標として Hoechst33342 染色を指標に用い、FACS により SP 細胞を分離した。他の臓器同様に、腎臓からも全体の細胞数に対する SP 細胞の比率は小さいものの、1% 未満程度存在することが明らかとなった。さらに、この細胞を培養したところ、形態的には、神経細胞様の細胞と、メサンギウム様細胞に分化増殖した。免疫組織的にもこれらメサンギウム様細胞は vimentin 陽性であり、メサンギウム細胞あるいは上皮細胞である可能性が高いと考えられた。一方、尿細管細胞は、これら SP 細胞を用いても未だに分化誘導させることに成功していない。現在、三次元培養系において培養を行うことと、種々の分化誘導因子を加えることで、なお、尿細管細胞の取得に努力しているが、腎臓再生の要であ

る、近位尿細管の再生は今後も検討を要すると考えられた。

一方、in situ での、腎機能再生を目指して、アデノウィルスを用いた変異 I $\kappa$ B 遺伝子導入を慢性腎障害モデル動物で試みた。アデノウィルスは、昨年の検討から、腎動脈に投与した場合近位尿細管に選択的に遺伝子発現を行うことが確認されており、この特性を利用して本研究に応用した。近位尿細管は、近年、進行性腎障害の病変の場として、糸球体と同様に重要視されており、間質の硬化は特に、IgA 腎症では、その予後を規定するものとして知られている。この組織障害進展因子として、種々の cytokine による NF $\kappa$ B が重要な役割を果たしているとの認識から、その抑制因子である I $\kappa$ B の変異型の遺伝子導入を試みた。昨年度の検討で、アルブミン負荷モデルでの間質障害を完全に予防したことから、今年度は慢性腎障害モデルで検討を行った。NF $\kappa$ B は、一般には、p65、p50、I $\kappa$ B の三種の蛋白質が形成する三量体を指すが、この三量体は、cytokine あるいは free radical などの刺激が加わると、先ず I $\kappa$ B がリン酸化され、遊離する。この I $\kappa$ B は引き続き ubiquitination を受け、代謝酵素により分解される。一方、p65、p50 は遊離して核内に移行し、転写領域にある NF $\kappa$ B consensus sequence の部分に結合して転写促進を行う。この NF $\kappa$ B により転写調節される蛋白としては代表的なものは interleukin 6、あるいは NF $\kappa$ B 自身がある。本研究で導入を試みた変異 I $\kappa$ B は、NF $\kappa$ B 活性化の最初の段階であるリン酸化を受ける部分のアミノ酸を欠失したものであり、したがってリン酸化を受けず、p65、

p50 は遊離できない。この変異 I $\kappa$ B の遺伝子を組み込んだアデノウィルスを、腎動脈内に投与した場合、その mRNA が腎内に発現することを確認している。本研究では、アデノウィルスによる治療効果を確認する目的で、片腎摘後抗 Thy1.1 抗体投与ラットを用いた。これまで、片腎摘後抗 Thy1.1 抗体投与ラットでは、進行性に糸球体、間質障害をきたすことが報告されている。抗体投与4週後に腎障害の存在を確認するとともに、変異 I $\kappa$ B 組み込みアデノウィルス、または LacZ 組み込みアデノウィルスを投与した。このウィルス投与後4週で、腎障害の進行度を検討したところ、対照群に比べ、軽度の進行抑制が認められたが、アルブミン負荷モデルに比べ、その効果は弱いものであった。今回、アデノウィルスの免疫反応による排除を遅延させることが知られる CTLA4-Ig の発現ウィルスも同時投与しているが、アデノウィルスによるタンパク発現期間が十分長くなかった可能性はあり、現在検討中である。いずれにせよ、慢性モデルでも効果があることが示唆され、今後の展開が望まれる。

#### E. 結論

マウス腎臓から、腎臓の幹細胞を取得すべく、FACS により Hoechst33342 陰性細胞 (SP 細胞) を収集し、培養した。マウス腎臓内には SP 細胞が 1%未満の頻度で存在し、メサングウム細胞様、および神経細胞様細胞に分化することが示された。一方、in situ での障害腎の回復を目的として、アデノウィルスによる変異 I $\kappa$ B の近位尿細管での発現による慢性腎障害モデルでの腎障害改善の可能性を検討した。そ

の障害進展をある程度抑制する可能性が示されたが、その効果は軽度であった。今後アデノウィルスの発現期間延長も含め検討する必要が示された。

#### F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hirota N, Ichihara A, Koura Y, Hayashi M, Saruta T. Phospholipase D contributes to transmural pressure control of prorenin processing in juxtaglomerular cell. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):363-7.
2. Araki T, Hayashi M, Watanabe N, Kanuka H, Yoshino J, Miura M, Saruta T. Down-regulation of Mcl-1 by inhibition of the PI3-K/Akt pathway is required for cell shrinkage-dependent cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Feb 1;290(4):1275-81.
3. Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Mifune M, Nakaya H, Kuroda M, Hayashi M, Saruta T. Regulation of vascular proteoglycan synthesis by angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Dec;12(12):2609-15.
4. Chikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Hayashi M, Saruta T. Tranilast inhibits interleukin-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. *Eur J Pharmacol*. 2001 Sep 14;427(2):151-8.

5. Yoshida T, Yoshida N, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Dietary phosphorus deprivation induces 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha-hydroxylase gene expression. *Endocrinology*. 2001 May;142(5):1720-6.
  6. Nakaya H, Sasamura H, Hayashi M, Saruta T. Temporary treatment of prepubescent rats with angiotensin inhibitors suppresses the development of hypertensive nephrosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Apr;12(4):659-66.
- ##### 2. 学会発表
1. 「脳卒中易発症製高血圧自然発症ラット (SHRSP/ISM) における腎臓プロテオグリカン発現および AT1 受容体拮抗薬投与の影響」篠村裕之、中谷英章、清水良子、三船瑞夫、林松彦、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
  2. 「Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が腎線維芽細胞のプロテオグリカン産生に与える影響の検討」三船瑞夫、篠村裕之、清水良子、黒田真理、中谷英章、林松彦、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
  3. 「カルシトニンの 25-水酸化ビタミン D3 1 $\alpha$ -水酸化酵素遺伝子発現に対する影響」吉田理、林松彦、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
  4. 「アデノウィルスベクターを用いた安定型 I $\kappa$ B $\alpha$  の過剰発現による尿細管間質障害の抑制」高瀬敦、平橋

- 淳一、高柳 淳、力石昭弘、丸茂丈史、林 松彦、清水信義、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
5. 「部分腎摘腎障害ラットにおけるインスリン抵抗性の検討」加藤喜之、大野洋一、林 松彦、須沢大知、佐々木隆幸、柴垣圭吾、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
  6. 「腎臓の形態形成期の細胞死における PKC の役割」荒木崇志、林 松彦、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
  7. 「アンジオテンシン II (Ang II) は EGFR チロシンキナーゼを介してプロテオグリカン産生を亢進させる」清水良子、篠村裕之、三船瑞夫、黒田真理、中谷英章、林 松彦、猿田享男、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年
  8. 「慢性圧負荷による傍糸球体細胞内レニン活性化抑制は phospholipase D に依存する」広田展久、市原淳弘、林 松彦、猿田享男、第 74 回日本内分泌学会学術総会、2001 年
  9. 「リン制限食による 25-水酸化ビタミン D<sub>3</sub>1 $\alpha$ -水酸化酵素遺伝子の発現誘導」吉田 理、林 松彦、猿田享男、第 74 回日本内分泌学会学術総会、2001 年
  10. 「アンジオテンシン関連ペプチドが血管平滑筋プロテオグリカンサブタイプ発現に与える影響の検討」清水良子、篠村裕之、三船瑞夫、黒田真理、中谷英章、林 松彦、猿田享男、第 74 回日本内分泌学会学術総会、2001 年
  11. "Transmural Pressure Control of Prorenin Processing and Secretion in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." Hirota N, Ichihara A, Koura Y, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  12. "Mechanisms of Regulation of Proteoglycan Synthesis by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in Renal Fibroblasts." Mifune M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Nakaya H, Kuroda M, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  13. "Tranilast Inhibits Influx of Monocytes in Anti-Thy-1 Glomerulonephritis Via Suppression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression." Chikaraishi A, Marumo T, Hirahashi J, Takase O, Hiahikawa K, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  14. "Anti-Apoptotic Effect of Anion Exchanger Blocker Via Mcl-1 Up-Regulation." Araki T, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  15. "Dexamethasone Regulates Glycosaminoglycan Synthesis and Proteoglycan Core Protein Gene Expression in Rat and Human Mesangial Cells." Kuroda M, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Nakaya H, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta M, the 34th Annual Meeting of the American



- Society of Nephrology, 2001
16. “Expression of Renal Proteoglycans in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive (SHRSP/Izm) at Kidneys and Their Modulation by Angiotensin Receptor Blockade.” Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Nakaya H, Mifune M, Kuroda M, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  17. “Angiotensin II Type 2 (AT2) Receptors Regulate Extracellular Matrix Proteoglycan Synthesis by  $\alpha$ i/o-Dependent Mechanisms.” Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Mifune M, Nakaya H, Kuroda M, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  18. Effects of Prepubertal Pretreatment with Angiotensin Receptor Blocker (ARB) on Hypertension and End-Organ Damage in Adult Dahl Salt-Sensitive (S) Rats.” Nakaya H, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Kuroda M, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T, the 34th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2001
  19. 「若年性遺伝性高血圧におけるインスリン抵抗性関連遺伝子の追究－不  
死化リンパ芽球を用いた細胞レベルのインスリン抵抗性－」森居俊行、大野洋一、広瀬 寛、緒方 勤、江口 高、菅野義彦、河邊博史、斎藤郁夫、林 松彦、猿田享男、第 24 回日本高血圧学会、2001 年
  20. 「圧によるレニン産生分泌調節」廣田展久、市原淳弘、小浦優佳子、林 松彦、猿田享男、第 24 回日本高血圧学会、2001 年
  21. Caspases in renal development. Hayashi M & Araki T, The 3rd Japanese-European Nephrology Forum “Developmental nephrology and renal engineering” 2001, in Hakone
  22. 「NF $\kappa$ B を標的とした腎硬化症の遺伝子治療」林 松彦、第 74 回日本薬理学会年会、2001 年 3 月
  23. 「腎糸球体および尿細管細胞再生の腎疾患治療への応用」林 松彦、佐々木成、川村哲也、第 44 回日本腎臓学会学術総会、2001 年 5 月
- H. 知的所有権の取得状況  
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

骨髄由来間葉系未分化幹細胞の培養・分化誘導に関する研究

分担研究者 福田 恵一 慶應義塾大学心臓病先進治療学 講師

研究要旨

本研究は骨髄間質細胞中に含まれる間葉系幹細胞を用いることにより再生心筋細胞を作製し、心筋細胞移植のドナー細胞を開発することを目的としている。本研究プロジェクトでは心筋細胞に分化した CMG 細胞がカテコラミン受容体を発現し、シグナル伝達機能を有していること、心筋細胞特異的イオンチャネルを発現していることを明らかにした。また、間葉系幹細胞から心筋細胞に分化した CMG 細胞を単離する技術を開発し、再生心筋細胞の移植実験を行った。

A.目的

特発性拡張型心筋症や重症心筋梗塞等を原因とする難治性心不全に対してこれまで様々な治療法が考案されてきたが、心臓移植以外には有効な治療は見出されていない。臓器移植法の施行に伴い本邦においても心臓移植の道が開かれたが、脳死判定の問題や国民性から見て臓器提供者が多数出現し、現実的な治療法として普及するには多くの問題が山積している。これに対し、近年動物実験レベルではあるが心筋細胞移植により心不全を治療する方法が報告され注目をあびている。心筋細胞移植はこれまで胎仔あるいは新生仔の心筋細胞を用いて行われてきたが、ヒトへの応用を考えた場合ドナーとなる細胞の問題で行き詰まっていた。一方、分子生物学の発達により再生医学の研究が発達し、様々な臓器で組織再生が試みられている。心筋細胞の再生は神経と並んで最も難しいとされてきた。本研究では

骨髄間質細胞を分化誘導することにより心筋細胞を作製し、心不全治療に応用しうるレベルに至るまでの基礎研究を目的としている。心筋細胞にはカテコラミン受容体、アセチルコリン受容体が多数存在し、心拍数・心収縮力の調節、心肥大の促進等の重要な心機能の調節に関与している。本研究では骨髄由来の心筋細胞（CMG 細胞）の性質を明らかとするため、その機能解析を行った。さらに、さまざまに分化した細胞中より心筋細胞のみを単離する方法を開発した。

B.方法

CMG細胞のイオンチャネルの発現

CMG細胞に最終分化誘導を行う前後でRNAを採取した。心筋細胞に発現することが知られているイオンチャネル $I_{Ca,L}$ 、 $I_f$ 、 $I_{K1}$ 、 $I_{K,Ach}$ 、 $I_{K,ATP}$ 、 $I_{to}$ 、 $I_{Ks}$ 、 $I_{Kr}$ を形成するサブユニットの発現をRT-PCR法を用いて観察し

た。具体的には  $I_{K1}$  (IRK1, IRK2)、 $I_{Kr}$  (MERC)、 $I_{Ks}$  (KvLQT1, minK)、 $I_{to}$  (KV1.2, KV1.4, KV2.1, KV4.2, KV4.3)、 $I_{K,ATP}$  (KIR6.1, KIR6.2, SUR2A, SUR2B)、 $I_{K,Ach}$  (GIRK1, GIRK4)、 $I_f$  (HCN1, HCN2, HCN3, HCN4)の発現を解析した。同時にCMG細胞にパッチクランプ法と活動電位を記録することにより遺伝子発現と機能の相関を検討した。

### CMG細胞の移植

ミオシン軽鎖-2vのプロモーターにGFPを組み換えた遺伝子を発現させたCMG細胞に分化誘導を行い、心筋細胞のみをFACSにて単離した。単離した細胞をマウス心臓に移植し、移植心を解析した。移植細胞のマーカにはGFPだけでなく、アデノウイルスにlacZを組み込んだ遺伝子改変ウイルスを感染させ、lacZを発現させた。

#### (倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki宣言を遵守し、当学動物実験基準にのっとり研究を行った。

### C.研究結果

CMG細胞では5-アザシチジンによる最終分化誘導をかける前よりIRK1とMERCの発現が観察された。これは最終分化誘導をかける以前に静止膜電位を呈することが示唆された。洞結節型の活動電位を呈する分化誘導後2週頃よりHCN4、 $Ca\alpha 1c$ 、KV1.4の発現が観察された。これはこの時期にペースメーカー電位を生じる $I_f$ 電流と $I_{Ca,L}$ 電流が記録されることを示唆していた。心室筋細胞型を呈する4週以後には

HCN1, KV2.1, KV4.2, IRK2, KIR6.1, KIR6.2, SUR2Aの発現が観察された。これはCMG細胞が $I_{K,ATP}$ 、 $I_{to}$ 電流を発現することを示し、この時期に心室筋細胞型活動電位を呈することを説明し得る現象と考えられた。分化誘導後6週までの時点ではKV1.2, KV4.3, KvLQT1, minK, GIRK1, GIRK4の発現は認められなかった。これはCMG細胞が $I_{Ks}$ 、 $I_{K,Ach}$ を発現しないことを示し、CMG細胞が心房筋の表現型を取らないことと一致する所見と考えられた。

CMG細胞をマウス心臓に移植すると、移植された細胞はレシピエントの心筋細胞と平行した走向を示した。移植細胞は最低3カ月はレシピエントに生着することが観察された。

### D.考察

心筋梗塞症などにより局所的に心筋が壊死に陥った場合、壊死領域では線維芽細胞の増生により癒痕領域が形成され、心全体としていわゆるリモデリングがなされる。癒痕領域は収縮に寄与しないばかりか時に心室瘤を形成し心臓の収縮拡張機能を著しく損なう。これに対し壊死領域に細胞移植を行うことにより左室のリモデリングや収縮能の改善を行うのが心筋細胞移植の考え方である。

これまで動物実験レベルでは心臓に対する細胞移植は様々な形で行われてきた。研究の初期の段階ではラットあるいはウサギに心筋梗塞を作製し平滑筋細胞や骨格筋細胞を移植するというものであった。平滑筋、骨格筋細胞の場合にはもちろん心筋細胞と同期して収縮することはないが、心筋梗塞後の心室リモデリングの改善に有用であっ

た。心筋細胞移植についてはこれまでに 20 を越える報告がなされているが、心筋細胞の場合初代培養を行ってある程度の生きた細胞が得られるのは胎仔あるいは新生仔の心筋細胞に限られる。これまでに行われた心筋細胞移植では胎仔細胞が用いられてきた。胎児心筋細胞の心臓への移植の結果、移植した心筋細胞は心臓の線維化された組織中に生着できること、移植したドナー細胞とホストの心筋細胞が介在板を介して電気的に連結した結合を取りうるということが報告された。さらに胎児心筋細胞の移植により心収縮、拡張能が改善することが報告され、心筋細胞移植の将来的な臨床応用への期待が集まることとなった。

心筋細胞移植の最大の問題点はドナー細胞の確保である。ヒトを対象とした場合には胎児の細胞を用いることは倫理的に不可能である。心筋細胞の再生は現在 ES 細胞および骨髄間葉系幹細胞を材料として分化誘導する方法が試みられている。自己骨髄より骨髄間葉系幹細胞を単離し、*in vitro* で増幅した後に心筋細胞に誘導出来れば移植の拒絶反応の問題も解決できる。現在我々は最終分化した骨髄細胞から心筋細胞に分化した細胞の単離法の開発や細胞移植に関する研究を行っている。今後のプラクティカルな問題として移植細胞がホストに長期間安定して生着するか否か、不整脈源とならないか、ヒト骨髄細胞より心筋細胞が作製できるか否かなどがあり、今後解決しなければならない課題と考えている。

#### E. 結論

骨髄細胞由来の心筋細胞は *in vivo* の心筋細胞と同様にイオンチャネルを発現し、

かつ経時的に発現が変化することが明らかとなった。このイオンチャネルの変化が活動電位の変化をもたらすものと考えられた。再生心筋細胞は移植された後、レシピエントの心筋細胞と連結し、長期間生体心に生着することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

本年度はヒトの細胞を用いた実験やヒトに対する移植実験は行っておらず、健康上問題となる点は存在しない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, Hakuno D, Sato T, Manabe T, Konishi F, Ogawa S. Role of EGF Receptor and Pyk2 in Endothelin-1-induced ERK Activation in Rat Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Feb;34(2):139-50.
2. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* 2002 Jan 22;105(3):380-6.
3. Tahara S, Fukuda K, Kodama H, Kato T, Miyoshi S, Ogawa S. Potassium channel blocker activates extracellular signal-regulated kinases through Pyk2 and epidermal growth factor receptor in rat cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Nov 1;38(5):1554-63.

4. Baba A, Yoshikawa T, Chino M, Murayama A, Mitani K, Nakagawa S, Fujii I, Shimada M, Akaishi M, Iwanaga S, Asakura Y, Fukuda K, Mitamura H, Ogawa S. Characterization of anti-myocardial autoantibodies in Japanese patients with dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J.* 2001 Oct;65(10):867-73.
  5. Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H, Suematsu M, Matsuda S, Koyasu S, Matsui H, Yamauchi-Takahara K, Harada M, Saito Y, Ogawa S. ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 2001 Oct 12;89(8):661-9.
  6. Keiichi Fukuda. Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and its application to cell transplantation therapy. *Stem cell therapy* 2002 (in press)
2. 学会発表
1. Keiichi Fukuda. Development of regenerated cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. International Workshop in muscular dystrophy. Development of New Therapy for Muscular Dystrophy: - Progress in Basic Research. Tokyo. 2002.1.17 (招請講演)
  2. Keiichi Fukuda. Bone marrow derived cardiomyocyte. European Science Foundation Workshop. Symposium: Cardiovascular Genomics: New pathophysiological Concept. Maastricht, Netherlands. 2001.12.1 (招請講演)
  3. Keiichi Fukuda. The 13<sup>th</sup> world congress of international society for artificial organs. Osaka, Japan. 2001.11.6. (招請講演)
  4. Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda. Leukemia inhibitory factor activates cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels: ERK1/2 is a putative  $\alpha 1$  subunit kinase. The 18<sup>th</sup> International symposium for heart research. Symposium. 2001.9.30. Akita, Japan
  5. Keiichi Fukuda. Autologous bone marrow for cardiomyocyte transplantation. European Society of Cardiology. Symposium: Cell therapy. Stockholm, Sweden. 2001.9.3 (招請講演)
  6. Keiichi Fukuda. Use of adult mesenchymal stem for regeneration of cardiomyocytes and its application to cell transplantation. Tokai University International Symposium: New frontier in cell therapy and regenerative medicine. Keio Plaza Hotel. Tokyo, Japan. 2001.8.28 (招請講演)
  7. 日本心脈管作動物質学会 シンポジウム心血管領域における再生医学と組織工学の最前線『成体幹細胞を用いた心筋再生と細胞移植による心血管 tissue engineering』平成 14 年 2 月 2 日於東京医科歯科大学 福田恵一
  8. 第 24 回 日本分子生物学会 シンポジウム 『再生工学と細胞核の再プログラム化』福田恵一 成体幹細胞の再プログラム化による心筋分化。平成 13 年 12 月 10 日 福田恵一
  9. 第 5 回日本心不全学会 プレナリーセ

- セッション 1 :New strategy for the treatment of severe heart failure 『Development of regenerated cardiomyocyte for cardiovascular tissue engineering』平成 13 年 10 月 25 日 福田恵一
10. 第 38 回 日本臨床生理学会 『心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発』シンポジウム 平成 13 年 9 月 28 日 福田恵一
  11. 第 49 回 日本心臓病学会教育講演 平成 13 年 9 月 23 日 福田恵一。
  12. ACCP 日本部会 日本部会賞特別講演 平成 13 年 9 月 8 日 福田恵一
  13. 第 41 回 日本先天異常学会 シンポジウム 福田恵一：間葉系幹細胞と再プログラム化による心筋分化 平成 13 年 7 月 4 日 パシフィコ横浜
  14. 第 60 回 東京矯正歯科学会 福田恵一。特別講演 平成 13 年 7 月 12 日 東京有楽町
  15. 第 5 回東京国際臍帯血移植シンポジウム 特別講演 『Development of regenerated cardiomyocytes for the cardiovascular tissue engineering』平成 13 年 6 月 23 日 東京大学医科学研究所
  16. 第 33 回 日本結合組織学会 シンポジウム『再生医学とマトリックス』：心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発、 福田恵一：平成 13 年 6 月 7 日 東京国際フォーラム
  17. 第 49 回 日本輸血学会 ミレニアムシンポジウム『輸血医学と再生医学』：心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発、 福田恵一：平成 13 年 6 月 1 日 東京京王プラザホテル
  18. 第 5 回 日本適応医学会 シンポジウム『適応限界を超えた重症臓器不全に対する治療戦略』：心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発、 福田恵一：平成 13 年 6 月 1 日 グランキューブ大阪
  19. 第 101 回 日本外科学会 特別企画シンポジウム『Regeneration and Surgery』 福田恵一：平成 13 年 4 月 12 日 仙台 宮城県民会館 『心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発』
  20. 木村謙介、福田恵一、佐野元昭、家田真樹、佐藤敏彦、伯野大彦、川口治子、久下康代、竹下栄子、山崎一人、二宮真一、黒沢裕之、井上実、岡野栄之、小川聡。肥大心における neurocrine rosstalk の破綻。第 24 回心筋代謝研究会。大分県別府市。平成 13 年 12 月 8 日
  21. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Takahiro Kato, Kensuke Kimura, Toshihiko Sato, Daihiko Hakuno, Satoko Tahara, Yuichi Tomita, Tomohiro Manabe, Yusuke Suzuki, Satoshi Ogawa: Redox sensitive signaling pathways and transcription factors in IL-6 gene expression by abgiotensin II. 第 4 回日本心不全学会。平成 13 年 10 月 10 日 神戸
- H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況
- 特許出願番号： 11-372826  
 特許出願日： 平成 11 年 12 月 28 日  
 特許出願タイトル： 心筋形成能を有する生体骨髄由来細胞

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

骨髄幹細胞を用いた腎臓再生法の確立に関する研究

分担研究者：川村哲也

東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科 助教授

研究要旨

腎臓内に尿細管細胞の幹細胞がすでに存在することが示唆されており、活性化因子を障害局所に送り込むことで腎再生を促すことが可能であると考えられる。そこでレトロウイルスを用いた骨髄改変により、障害部位に効率よく外来遺伝子を送り込むシステムの開発を行なった。これより抗炎症性サイトカインを糸球体に導入し、実験腎炎進展を抑制することが確認された。

A. 研究目的

腎臓は臓器障害にともなう機能低下に対し、人工透析による代償が可能な臓器であるが、医療費の高騰を伴い、また患者のQOLの真の改善には必ずしも結びつかないのが現状である。また腎臓は移植も可能な臓器であるが、慢性的なドナー不足や免疫抑制薬の長期服用が必要なことから一般的な治療法とは言い難い。その中で自己の腎臓あるいは腎機能の再生を目指した治療法の開発に期待が寄せられる。臓器再生には腎臓構成細胞の幹細胞（または前駆細胞）の存在部位により2つのアプローチがあると考えられる。ひとつは骨髄細胞由来の幹細胞が流血中に存在し、腎臓障害に伴って未分化のまま腎臓にたどり着き、そこで増殖分化することで腎臓を再構築するという考えである。もうひとつはこれらの幹細胞が個体発生時にすでに腎臓に取り込まれ、分化しない状態で静止期のまま腎臓内に存在する場合であり、ある刺激によってこの

幹細胞の分化を誘導することにより、腎臓の再生を促すという考えである。本年度は分化誘導因子を障害部位に高発現させることにより、腎臓再生を促進させることが可能か検討するため骨髄幹細胞を用いて障害部位に持続的に遺伝子を導入するシステムの開発を試みた。

B. 研究方法

造血幹細胞を自己複製、分化能を維持したままレトロウイルスを用いて外来遺伝子を導入し、これを移植することにより骨髄を改変し担体細胞を持続的に供給するシステムを開発した。5-FUにて前処置した雄マウス(DBA/2j)の骨髄を採取し、IL-3, IL-6, Stem cell factor 存在下で48時間 pre-incubation した後、IL-1 receptor antagonist(IL-1Ra)および mock 遺伝子(human GC)をレトロウイルスを用いて3日間感染させた。高率に感染したことは Southern blotting 法、Western blotting

法にて確認した。この IL-1Ra, GC 産生骨髄細胞を、放射線照射した雌マウスに4日間にわたって移植した。これらのキメラマウスに抗糸球体基底膜抗体誘導腎炎を惹起させた。Donor 細胞の局在は Y probe を用いた fluorescent in situ hybridization(FISH)で確認した。さらに長期間有効に遺伝子を導入できることを確認するため骨髄移植後3ヵ月後に再度抗糸球体基底膜抗体を投与し、生存率の差を比較した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験は動物福祉の立場からの要請や法的規制に十分従い、個体に最も負担の少ない実験手技を用いた。

#### C. 研究結果

持続的遺伝子導入システムの開発研究では IL-1Ra キメラは Mock キメラに比し28日後の BUN, クレアチニンの上昇が有意に抑制されたことが確認された。さらに組織学的検討でも腎炎誘導による糸球体障害が有意に抑制された。FISH では抗糸球体基底膜抗体投与後3日目には donor 細胞の糸球体への集簇が確認され、また同時期の単離糸球体の培養上清を用いた Western blot 法により IL-1Ra 蛋白の分泌が IL-1Ra キメラにおいて有意に上昇していることが確認されたため、この治療効果は糸球体局所に集簇した IL-1Ra 分泌 donor 細胞によるものであることが示唆された。さらに腎炎惹起28日目に再度抗体を投与したところ、IL-1Ra キメラでは Mock キメラに比し明らかな生存率の延長が認められた。これらにより、骨髄改変により抗炎症性サイトカインを持った細胞が

糸球体の炎症局所に持続的に供給されることにより4ヶ月という長期に渡り糸球体障害の進展を抑制することが可能であることが示された。そこで現在腎再生因子と考えられている HGF を持続的に障害部位に発現させることにより、腎不全自然発症マウスの腎機能の改善が可能か検討をはじめた。

#### D. 考察

今回用いた骨髄移植を用いたアプローチにより興味深い知見が得られた。IL-1Ra 分泌細胞を移植することにより、腎臓局所での炎症進展を抑制しうることが示された。このことは、慢性腎不全の保存期のように持続的組織特異的に腎再生因子(例えば HGF)を供給することにより間質尿細管の再生が期待できるような病態においては、腎再生因子を導入した造血幹細胞移植を行なうことで腎機能改善が見込まれると考えられた。つまり病態に応じた tailor made の再生医療が腎疾患には必要と判断し、現在さらに研究を展開している。

#### E. 結論

現在本邦における末期腎不全患者数は21万人に至り国庫負担も1兆円を超え、さらに年間1万人以上の増加が予想されている。我々の造血幹細胞を用いた腎炎治療法は臨床応用にはまだまだ程遠く、多くの超えなければならない問題点を抱えているが、本研究は急性、慢性腎炎における障害部位の再生の可能性を示唆し、今後腎臓病学研究の新しい方向性を示す研究結果と思われる。

#### F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象としていないので、



健康危険情報は該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表 :

1. Tsuboi N, Utsunomiya Y, Kawamura T, Kawano T, Hosoya T, Ohno T, Yamada H. Ganglioside as an endogenous growth suppressor for glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 2001 60(4):1378-85
2. Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Shen JS, Hisada Y, Eto Y, Kawamura T, Hosoya T: Genetically modified-bone marrow continuously supplies anti-inflammatory cells and suppresses renal injury in mouse Goodpasture syndrome. *Blood* 98(10): 57-64, 2001
3. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, Maruyama N, Hosoya T, Ohno T: The potential of bone marrow-derived cells to

differentiate to glomerular mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(7): 1401-1409, 2001.

4. Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Shiba H, Shen JS, Hisada Y, Eto Y, Kawamura T, Hosoya T: Inflamed glomeruli-specific gene activation using recombinant adenovirus with Cre/loxP system. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(11): 2330-2337, 2001.

2. 学会発表

1. Takashi Yokoo: Bone marrow reconstitution for the treatment of glomerulonephritis. 2<sup>nd</sup> seminar on transplantation and vascular biology. 2002 March, Hannover, Germany.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

尿細管細胞幹細胞の分化誘導に関する研究

分担研究者 佐々木 成 東京医科歯科大学大学院医学部体内環境調節学（腎臓内科）助教授

研究要旨

平成12年度において、尿細管細胞の再生のメカニズムをいくつかのアプローチで探究し、特に Wnt-4, beta-catenine が遺伝子が、急性腎不全での近位尿細管細胞の再生、増殖の時期に亢進すること、および Wnt-4, beta-catenine の遺伝子導入により、培養尿細管細胞の細胞周期が亢進し、細胞増殖が起こることを報告した。今年度はさら Wnt4 の発現を組織学的に詳細に検討し、近位尿細管細胞で E2F1, PCNA と同じ細胞で発現していることを見出した。また急性腎不全での近位尿細管細胞の再生、増殖の時期に転写因子 E2F1 が近位尿細管が劇的に発現亢進することを、ラットの虚血性急性腎不全モデルにおいて我々は、はじめて確認した。そこで急性腎不全における E2F1 の働きをより明確にするため、E2F1 ノックアウトマウスを用いて急性腎不全を作成し検討したところ、このマウスでは野生型に比べ、明らかに急性腎不全の回復がおくることが示された。また E2F1 のアデノウイルスを腎内で発現させると急性腎不全後の腎機能の回復が早いことを見出した。

A.研究目的

進行性腎障害による末期腎不全患者の根本的治療は、これまでに開発されておらず、透析療法に頼っている。わが国における透析患者数は、増加の一途を辿り、20万人を越え、医療経済的にも大きな問題である。一度荒廃した腎組織は回復が難しく再生は困難である。本研究では、尿細管細胞の再生のメカニズムをいくつかの approach で探究し、腎機能不全に陥りつつある腎機能の再生をめざす。

B.研究方法

平成12年度において、急性腎不全(ARF)での近位尿細管細胞の再生、増殖の時期に、

E2F1 が近位尿細管が劇的に発現亢進することを、ラットの虚血性急性腎不全モデルにおいて我々は、はじめて確認したが、平成13年度には、ARF における E2F1 の働きをより明確にするため、E2F1 ノックアウトマウスを用いて ARF を作成し検討した。また E2F1 をアデノウイルスを用いてラットの尾静脈より注入すると肝臓及び腎臓において発現した。アデノウイルスを注入後、ラット両側腎動脈を45分間結紮し、腎機能を観察した。また平成12年度に胎生期にのみ腎に発現し、尿細管細胞の発生、分化に関与する Wnt4 が ARF の回復初期に発現することを検討したが、今年度は、Wnt4 の発現する細胞の同定を組織

学的検討を用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki 宣言を遵守し、当学動物実験基準にのっとり研究を行う(承認番号 0010277)

### C. 研究結果

平成 12 年度において、急性腎不全(ARF)での近位尿細管細胞は、24-48 時間の間に、再生、増殖し、この時期に、E2F1 が近位尿細管で劇的に発現亢進することを、ラットの虚血性急性腎不全モデルにおいて我々は、はじめて確認したが、平成 13 年度には、E2F1 ノックアウトマウスを用いて検討した。ARF 後の腎機能(クレアチニン値、尿素窒素値)は、E2F1 ノックアウトマウスにおいて、野性型に比べて有意に低下していた。組織学的にも E2F1 ノックアウトマウスでは、野性型に比べて近位尿細管の再生、増殖が低下していた。また E2F1 ノックアウトマウスにおいて急性虚血後に発現する cyclin D1, cyclin A の発現も有意に低下していた。また E2F1 をアデノウイルスを用いてラットの尾静脈より注入すると肝臓及び腎臓において発現した。アデノウイルスを注入後、ラット両側腎動脈を 45 分間結紮し、腎機能を観察したところ、E2F1 の強制発現されたラット腎では、ARF 後の腎機能(クレアチニン値、尿素窒素値)は、コントロールの LacZ-アデノウイルス投与群に比べて有意に改善していた。

また ARF 後に発現する Wnt4 は、共焦点レーザー顕微鏡と組織学的検討の結果、

近位尿細管細胞で E2F1 を発現している細胞と同じ細胞で発現しており、尿細管細胞の増殖、再生との関与が強く示唆された。また細胞増殖のマーカーである PCNA の発現と連続切片で観察したところ、PCNA 発現細胞で Wnt4 が発現していることがわかり、Wnt4 と尿細管細胞の増殖との関連が、in vivo でも示唆された。これらのことから、ARF 後に再生、増殖能が高い、胎生期の幼若な尿細管細胞の性質を持つ細胞が出現する可能性が示唆された。

### D. 考案

今回我々は、尿細管細胞の再生、増殖誘導を引き起こす遺伝子として、Wnt4 と E2F1 に注目した。急性腎不全後の、再生、増殖の時期に、Wnt4 と E2F1 が近位尿細管が劇的に発現亢進することをはじめて確認し、アメリカ腎臓病学会にて発表している。また培養尿細管細胞に Wnt4 及び E2F1 を強制発現した時に、細胞周期調整遺伝子の cyclin D1, A の転写活性が亢進し、細胞周期が促進することを検討し、尿細管細胞の再生のメカニズムを解明した(論文投稿中)。

Wnt4 さらに beta-catenin と TCF の遺伝子導入下で、相加的に cyclin D1, A の転写活性と細胞増殖能が LLC-PK1 細胞で亢進したという実験結果は、Wnt4 の遺伝子導入により、尿細管細胞は再生、分裂能を獲得し、胎生期の尿細管細胞幹細胞の性格を獲得しうる可能性を示唆している。また急性腎不全の回復期において Wnt4 陽性細胞が出現することは、尿細管幹細胞的な性格を持つ細胞が、内因性に出現している可能性が示唆される。

また E2F1 の発現に関しては、E2F1 の発現を亢進させると ARF 後の腎機能回復は促進され、E2F1 の欠損しているノックアウトマウスでは、ARF 後の腎機能回復は遅延した。これらの E2F1 の作用には、cyclin D1, cyclin A が関与している。従って E2F1 の発現が尿細管細胞の再生、増殖の key factor であることをつきとめた。

#### E. 結論

本研究では、尿細管細胞の再生のメカニズムをいくつかの approach で探究し、腎機能不全に陥りつつある腎尿細管細胞の再生をめざした。我々は E2F1, Wnt 4 の遺伝子導入により、尿細管細胞は再生、分裂能を獲得し、胎生期の尿細管細胞幹細胞の性格を獲得しうる可能性を示した。また急性腎不全の回復期において Wnt4, E2F1 陽性細胞が出現することを示し、尿細管幹細胞的な性格を持つ細胞が、内因性に出現している可能性を示唆した。このようなアプローチによる尿細管細胞の再生、増殖が可能になれば、進行性腎障害の特徴である荒廃してゆく腎尿細管組織を回復させること、および腎機能の再生をはかることの基礎的検討ができ、社会的に急務である進行性腎障害による末期腎不全患者の根本的治療の一步となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

本年度は特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Terada Y, Hanada S, Nakao A, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Gene transfer

of Smad7 using electroporation of adenovirus prevents renal fibrosis in post-obstructed kidney. *Kidney Int.* 2002 Jan;61 Suppl 1:94-8.

2. Liu W, Morimoto T, Kondo Y, Iinuma K, Uchida S, Sasaki S, Marumo F, Imai M. Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Mar;282(3):F451-7.
3. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Inoshita S, Kuwahara M, Akiba T, Sasaki S, Marumo F. Efficient and ligand-dependent regulated erythropoietin production by naked dna injection and in vivo electroporation. *Am J Kidney Dis.* 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S50-3.
4. Kuwahara M, Iwai K, Ooeda T, Igarashi T, Ogawa E, Katsushima Y, Shinbo I, Uchida S, Terada Y, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Bichet DG, Marumo F, Sasaki S. Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus. *Am J Hum Genet.* 2001 Oct;69(4):738-48.
5. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F. Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol.* 2001 Jul;116(1):49-56.
6. Terada Y, Inoshita S, Hanada S, Shimamura H, Kuwahara M, Ogawa W, Kasuga M, Sasaki S, Marumo F. Hyperosmolality activates Akt and regulates apoptosis in renal tubular cells.