

20020736

厚生労働科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

進行性腎障害に対する腎機能維持・回復療法に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 松彦

平成15年（2003年）4月

## 目次

I. 総括研究報告書	
進行性腎障害に対する腎機能維持・回復療法に関する研究	1
林 松彦	
II. 分担研究報告書	
1. IgA 腎症に対する分子遺伝学的解析に基づいた早期診断と、個別治療戦略の開発	8
下条 文武	
2. 腎細胞再生の腎疾患治療への試み	15
佐々木 成	
3. 骨髄幹細胞を用いた腎臓再生へのアプローチ	22
川村 哲也	
4. 進行性腎障害に対する腎機能維持・回復療法に関する研究	27
今井 圓裕	
5. 尿細管障害の抑制による腎障害進展阻止及び機能回復	35
名取 泰博	
6. 進行性腎障害に対する腎機能維持・回復療法に関する研究	39
西中村 隆一	
7. 進行性腎障害に対する腎機能維持・回復療法に関する研究	41
菱川 慶一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別冊	45

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腎機能維持・回復療法に関する研究

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、進行性腎障害の進行抑止と腎機能維持ならびに末期腎不全患者の腎機能回復のための腎機能再生の可能性を検討することを目的として立案された。本年度は、進行性腎障害の進行抑止を目的として、その進行性および抑制因子の同定を試みた。また、腎機能再生の可能性を検討するため、腎臓の分化・誘導因子の同定を試みた。腎障害進行因子・抑制因子を同定するために、尿蛋白腎間質障害モデル動物に対し変異 I $\kappa$ B 組み込みアデノウイルスにより遺伝子治療を行ったラット腎とリポータージーンを投与したラットの間で、microarray を用いて発現遺伝子の差異を検討した。複数の進行促進・抑制因子の可能性のある遺伝子候補が同定され、現在、その詳細な役割を検討中である。Protein kinase C 活性化により誘導される腎臓の分化誘導因子を、後腎組織からクローニングすることに成功し、MTF-1 と命名した。この MTF-1 は、後腎組織の尿管芽分枝を促進しネフロン数増加を来すことが示され、腎臓再生への応用を検討中である。

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  
下条文武 新潟大学医学部教授  
佐々木成 東京医科歯科大学教授  
川村哲也 東京慈恵会医科大学助教授  
今井圓裕 大阪大学医学部講師  
名取泰博 国立国際医療センター研究所部  
長  
西中村隆一 東京大学医科学研究所客員助  
教授  
菱川慶一 東京大学医学部客員助教授

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

A.研究目的

本邦における透析患者数は20万人を超え、新規導入患者の36%が糖尿病、32%が

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、原疾患の根治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迎え、増加し続ける腎不全の治療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、進行性腎障害進行促進・抑制因子同定による治療法の開発と、腎機能再生の可能性を検討するために立案された。

## B. 研究方法

本研究では、進行性腎障害の進行促進・抑制因子の同定、腎臓再生療法の可能性の検討の2点より検討を行った。

### 【腎障害進行促進・抑制因子の同定】

慢性糸球体腎炎、糖尿病腎症では原疾患自体の障害機序に加えて、結果として生じた蛋白尿が近位尿細管で再吸収される際に細胞障害を生じることが知られている。また、進行性腎障害の腎機能低下と間質障害、尿細管細胞障害はよく相関することが知られており、糸球体とともに、尿細管・間質が重要な病変の場と想定されている。

前年度までの研究で、間質障害動物モデルとしては、アルブミン負荷ラットを用い、変異 I $\kappa$ B 組み込みアデノウイルスを用いた遺伝子治療により、その間質障害が完全に抑制されることを示した。一方、片腎摘後抗 Thy1.1 抗体投与慢性腎炎モデルラットでは、同様の治療が効果を示さなかった。

慢性モデルで治療効果を示さなかった要因として、変異 I $\kappa$ B による尿細管での NF $\kappa$ B 抑制が間質障害進展抑制を示すとともにその修復過程も阻害した可能性が考慮されたことから、本研究では、より特異的な間質障害進展因子あるいは抑制因子を同定する目的で以下の検討を行った。

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)、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。

本研究においては、種々 cytokine、あるいは free radical などの細胞内情報伝達物質として中心的役割を果たす Nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) を、腎間質障害において中心的役割を果たすと考えられる近位尿細管細胞で特異的に阻害するために、adenovirus を用いて遺伝子移入を行った。NF $\kappa$ B は、p65、p50、I $\kappa$ B の 3 分子から構成され、I $\kappa$ B がリン酸化されることにより活性化される。そこで、本研究では、この I $\kappa$ B のリン酸化部位である N 末端のアミノ酸を欠失する変異 I $\kappa$ B (I $\kappa$ B  $\Delta$ N) の DNA を、腎動脈から投与すると近位尿細管で遺伝子発現を行うことができることが示されているアデノウイルスに組み込むことにより、尿細管での特異的な NF $\kappa$ B 抑制を行った。

間質障害モデルとして、牛血清アルブミン (BSA) 投与モデルを用いた。アデノウ

ウイルスを投与した後1週間後から、2gのBSAを連日腹腔内に投与した。両処置群間における遺伝子発現の差異を検討するために、アデノウイルスまたは生理食塩水投与後、7、14日目で腎臓を採取し、totalRNAを抽出した。

#### Microarrayによる遺伝子発現量差異の検討

Clontech社のmicroarrayを購入し、前述のRNAを用いてrandom primerによる逆転写による標識後、同社の推奨する方法にしたがい解析を行った。このarrayには1090のラット既知遺伝子を解析可能であった。片腎摘のみ行ったラットを対照として、BSA+Adex LacZ投与ラット、BSA+IκBΔN投与ラットの各ラットでの発現RNA量の増減を比較検討した。

#### 【腎臓再生・発生因子に関わる因子の同定】

これまでの検討では、骨髄間葉系幹細胞などからの効率良い腎構成細胞誘導には成功していない。既知の因子のみでは腎臓再生は困難と考え、発生途上にある腎組織から、新たな分化誘導因子同定を試みた。

胎生12日のマウス胎仔後腎を摘出し組織培養を行った。摘出した後腎をpolycarbonate filter上で培養すると、4日間は体外で分化が進行することから、この体外での腎臓の分化に関わる因子の同定を行った。この過程にはhepatic growth factorをはじめ、幾つかの成長因子が関与することが知られているが、これまで我々を始めとして後腎組織の分化・発生にはprotein kinase C (PKC) 活性化が必要とされることが判明しており、そのprotein kinase Cの下流にある蛋白の同定を試みた。培養後腎組織にPKC阻害薬としてC2 ceramideを、PKC活性化薬としてphorbol 12-myristate 13-acetate

(PMA)を各々72時間作用させた後RNAを抽出し、differential display法によりPMA処置により誘導される遺伝子同定を行った。

尿管芽の発育は抗pancytokeratinを用いた免疫染色で、尿細管形成の評価は、FITC標識lotus tetragonolobus (LT) lectinによる蛍光染色により各々評価した。Recombinant蛋白はreticulocyte lysate systemにより作成し、apoptosisはTUNEL法をにより、細胞増殖は放射性thymidine取り込み量の測定により、各々評価した。

#### (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

##### 【腎障害進行促進・抑制因子の同定】

対照ラットに対して、BSA+Adex LacZ投与ラット、BSA+IκBΔN投与ラットの各治療群でのRNA発現量をmicroarrayで解析し、各々1.5倍以上に増加したものの、ないしは2/3に減少したものを有意とした。BSA+Adex LacZ投与ラットで増加を示し、BSA+IκBΔN投与ラットで減少したものが進行因子と想定すると、interferon-induced protein、glucose-6-phosphate dehydrogenase、COUP-TFI transcription factor、fibroblast growth factor receptor-activating protein 1などの14の遺伝子が同定された。一方、BSA+Adex LacZ投与ラットで減少を示し、BSA+IκBΔN投与ラットで増加したものが改善因子と想定すると、cathepsin Eなどの5種の遺伝子が同定された。さらに、

BSA+Adex LacZ 投与ラットで増加を示し、BSA+I $\kappa$ B $\Delta$ N 投与ラットでさらに増加したのも改善因子と想定すると、clusterin のみが現時点では同定されている。これら各遺伝子に関しては、現在 Northern blotting などによりその変化を確認するとともに、その腎臓における役割を検討中である。

#### 【腎臓再生・発生因子に関わる因子の同定】

Differential display 法により PKC 活性化により後腎組織に誘導される遺伝子が 4 種同定された。この中で、未知のものは 1 種であり、この遺伝子について解析を進めた。まず、この遺伝子は 251 のアミノ酸からなる蛋白をコードしており、Northern blotting により、腎臓の他、心筋、脳、肝臓、精巣に多く発現していることが示された。特異的プライマーを用いて、各発達段階にある腎臓から採取した RNA において RT-PCR 法によりこの遺伝子の RNA 発現を検討したところ、胎生 12 日以降の後腎組織で多く発現し、成体では減少することが示された。さらに、PKC 活性化により後腎組織で誘導されることも確認された。この蛋白を MTF-1 (metanephros derived tubulogenic factor-1) と命名したが、MTF-1 に対するアンチセンス導入により、後腎組織発達が著しく抑制されることが示された。一方、reticulocyte 系で合成した MTF-1 により後腎組織の尿管芽の発育、尿管の発育ともに促進されることが明らかとなった。この発育促進作用は、Tunnel 法による検討では apoptosis の抑制によるものではなく、細胞増殖の亢進によるものであることが、thymidine 取り込み率の検討から示された。現在、活性部位を決定するための検討と、諸疾患モデルでの変動を検討中である。

#### D. 考察

平成 13 年度までの研究により炎症の発症・維持に重要な役割を果たす細胞内情報伝達物質であり、転写調節因子である NF $\kappa$ B の尿管での抑制が腎間質障害進展を阻止しうることを証明した。しかしながら、慢性腎炎モデルでの効果は十分でなく、NF $\kappa$ B 活性を抑制することにより、反対に修復機転も抑制している可能性も示唆されたことから、本研究では、より特異的な進行性腎障害治療標的を特定する目的で、microarray を用いた網羅的遺伝子検索を行った。その結果、腎障害進行に関与する可能性のある遺伝子が 14、防御因子の可能性のある遺伝子が 5、障害時に拮抗的に働き、防御因子の可能性のある遺伝子が 1、同定された。これら遺伝子中で、特に clusterin は、BSA 負荷でも増加するが、NF $\kappa$ B の抑制によりさらに増加を示し、積極的に障害抑制因子として作用している可能性が示された。この clusterin は細胞周期、apoptosis、組織リモデリングなど多くの作用に関連する分泌型蛋白である。これまで、嚢胞腎や尿管結紮モデルで増加するといった報告はあるが、その重要性は明かとなっていない。本研究においても、現時点ではその病態生理におよぼす影響に関しては検討中であり、組織修復における役割は今後の検討を要する。

腎臓再生・発生因子に関わる因子として、新規遺伝子である MTF-1 のクローニングに成功した。合成 MTF-1 によりその発達が促進することが *in vitro* で示され、この蛋白が後腎組織の発達に極めて重要と考えられた。現時点ではこの蛋白が分泌型であるのか、

あるいは構造蛋白であるのか、未解明であるものの、最近、そのヒトでの homologue がミトコンドリアのリボゾーム蛋白である可能性が報告されている。もし、それが正しいとすれば、構造蛋白であり、本研究で証明された作用の発現機序は全く不明となる。この点は現在、活性部位を見い出すべく、deletion mutant を用いた検討を行っている。

#### E. 結論

腎障害進行促進・抑制因子を同定するために、microarray 法により候補遺伝子を検索した。現在、得られたクローンに関して検討中である。一方、腎臓再生・発生因子に関わる因子の同定を行い、MTF-4 のクローニングに成功した。後腎組織の発達に極めて重要な役割を果たすことが判明し、今後、疾患モデルなどによりその腎障害への有用性を検討していく。

#### 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. Takase O, Hirahashi J, Takayanagi A, Chikaraishi A, Marumo T, Ozawa Y, Hayashi M, Shimizu N, Saruta T. Gene transfer of truncated  $\kappa$ B prevents tubulointerstitial injury. *Kidney Int* 2003, 63(2); 501-13.
2. Ichihara A, Hayashi M, Koura Y, Tada Y, Sugaya T, Hirota N, Saruta T. Blunted tubuloglomerular feedback by absence of

angiotensin type 1A receptor involves neuronal NOS. *Hypertension*. 2002, 40(6):934-9.

3. Kuroda M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Mifune M, Nakaya H, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T. Glucocorticoid regulation of proteoglycan synthesis in mesangial cells. *Kidney Int*. 2002, 62(3):780-9.
4. Ichihara A, Hayashi M, Ryuzaki M, Handa M, Furukawa T, Saruta T. Fluvastatin prevents development of arterial stiffness in haemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2002, 17(8):1513-7.
5. Nakaya H, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Kuroda M, Hayashi M, Saruta T. Prepubertal treatment with angiotensin receptor blocker causes partial attenuation of hypertension and renal damage in adult Dahl salt-sensitive rats. *Nephron*. 2002, 91(4):710-8.
6. Nakazato Y, Yamaji Y, Oshima N, Hayashi M, Saruta T. Calcification and osteopontin localization in the peritoneum of patients on long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Jul;17(7):1293-303.
7. Yoshida T, Yoshino J, Hayashi M, Saruta T. Identification of a renal proximal tubular cell-specific enhancer in the mouse 25-hydroxyvitamin d 1alpha-hydroxylase gene. *J Am Soc Nephrol*. 2002, 13(6):1455-63.

## 2. 学会発表

1. 「肝細胞増殖因子(HGF)が腎間質線維芽細胞のプロテオグリカン産生に与える影響とその機序の検討」小林絵美、篠村裕之、三船瑞夫、清水良子、黒田真理、中谷英章、林 松彦、猿田享男、第45回日本腎臓学会総会、2002年
2. 「アンジオテンシンタイプ1a受容体欠損マウスにおいて神経型一酸化窒素合成酵素が輸入細動脈径に及ぼす影響」市原淳弘、林 松彦、小浦優佳子、多田由布子、廣田展久、猿田享男、第45回日本腎臓学会総会、2002年
3. 「アンジオテンシンII (Ang II) タイプ2受容体はG $\alpha$ i/o系を介してプロテオグリカン産生を調節する」清水良子、篠村裕之、三船瑞夫、中谷英章、黒田真理、小林絵美、林 松彦、猿田享男、第45回日本腎臓学会総会、2002年
4. 「保存期腎不全患者におけるAII受容体拮抗薬ロサルタンの抗蛋白尿効果」飯野靖彦、出浦照国、梅村 敏、川村哲也、北島武之、小山哲夫、椎貝達夫、杉崎徹三、鈴木洋通、富野康日己、林松彦、山田研一、川口良人、桑原道雄、内田俊也、山崎 力、第45回日本腎臓学会総会、2002年
5. 「傍糸球体細胞における圧依存性プロレニン産生・分泌調節に対し培地糖濃度が及ぼす影響」廣田展久、市原淳弘、小浦優香子、多田由布子、林 松彦、猿田享男、第75回日本内分泌学会総会、2002年
6. 「肝細胞増殖因子(HGF)によるパイグリカン遺伝子発現調節機構の検討」小林絵美、篠村裕之、三船瑞夫、清水良子、黒田真理、石黒貴美子、林 松彦、猿田享男、第25回日本高血圧学会総会、2002年10月
7. 「アンジオテンシン1型受容体欠損マウスの減弱化した尿細管糸球体フィードバック依存性輸入細動脈収縮反応における神経型一酸化窒素合成酵素の関与」市原淳弘、林 松彦、廣田展久、小浦優佳子、多田由布子、猿田享男、第25回日本高血圧学会総会、2002年10月
8. 「糖尿病ラット由来傍糸球体細胞において圧はphospholipase D経路を介して細胞内プロレニンプロセッシングを抑制する」廣田展久、市原淳弘、小浦優佳子、多田由布子、林 松彦、猿田享男、第25回日本高血圧学会総会、2002年10月
9. 「若年男性正常血圧者におけるアンジオテンシン変換酵素遺伝子欠失多型とインスリン抵抗性との関連」江口 高、大野洋一、森居俊行、丸山達也、広瀬寛、大塚恵一、林 松彦、河邊博史、斎藤郁夫、猿田享男、第25回日本高血圧学会総会、2002年10月
10. "Afferent and efferent arteriolar responses to anandamide." Ichihara A, Hayashi M, Koura Y, Tada Y, Saruta T. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
11. "Anion Exchanger type 4 is not only present on the apical membrane but also on the basolateral membrane of  $\beta$ -intercalated cells." Tsuganezawa H, Hayashi M, Yamaji Y, Yoshino J, Sato S, Saruta T. The 35th Annual
12. J, Sato S, Saruta T. The 35th Annual

- Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
13. "p42/44 mitogen-activated protein kinase is required for calcitonin-induced 25-hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase gene expression." Yoshino J, Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
  14. "Microarray analysis of podocyte differentiation." Monkawa T, Hayashi M, Saruta T, Mundel P, Couser WG, Shankland SJ. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
  15. "In vitro and in vivo effects of glucocorticoids on biglycan gene expression in mesangial cells and isolated glomeruli." Kuroda K, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Kobayashi E, Ishiguro K, Nakaya H, Mifune M, Hayashi M, Saruta T. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
  16. "Induction to cyclooxygenase-2 in thick ascending limb cells by ovariectomy." Tada Y, Ichihara A, Koura Y, Okada H, Hayashi M, Saruta T. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
  17. "Renal Hemodynamic effects of anandamide." Koura Y, Ichihara A, Tada Y, Hirota N, Hayashi M, Saruta T. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002
  18. "Phospholipase D contributes to transmural pressure control of prorenin

processing in diabetic juxtaglomerular cells." Hirota N, Ichihara A, Tada Y, Koura Y, Hayashi M, Saruta T. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2002

#### H. 知的所有権の取得状況

特許（特願 2002-261853）

「新規スクリーニング方法」

発明者：林 松彦、荒木 崇志

出願年月日：平成 14 年 9 月 6 日

特許出願人：武田薬品工業株式会社

（分担）研究報告書

進行性腎障害に対する腎機能維持・回復療法に関する研究

IgA 腎症に対する分子遺伝学的解析に基づいた早期診断と、個別治療戦略の開発

分担研究者 下条文武 新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究協力者 成田一衛、坂爪 実、後藤 眞、斉藤徳子、近藤大介

研究要旨 本研究は IgA 腎症をはじめとする慢性糸球体腎炎を対象として、腎不全への進行に関わる共通の、あるいは各々の疾患に特異的な遺伝的背景を解明し、疾患および患者個人に特異的かつ有効な治療法を開発することを目的とするものである。本研究は各々の腎疾患の発症と進展機序に関わる遺伝的背景を、同時に網羅的に解析することで、各々の疾患に特異な進行因子や、逆に共通の因子を同定する。従来の遺伝子解析では、殆どが腎炎患者と健常者を比較したものであったが、各腎疾患で特異的な（もしくは共通の）遺伝的背景を明らかにするため、腎生検法で表現型を病理組織学的に評価し得たすべての症例を解析する。これにより、各腎疾患に特異的な、あるいは共通する要因を特定できる。本年度は、最も症例数が多く、未だに特異的な治療法のない IgA 腎症について、発症と進行に関連する可能性のある遺伝的背景を探索し、下記に報告する複数の遺伝子を同定した。今後、これらの候補遺伝子の機能解析を進めつつ、治療に対する反応性に関連する遺伝子の探索、他の腎炎での解析、他の候補遺伝子の解析などをさらに進めることにより、進行性腎障害に対する早期診断・個別治療戦略の開発に寄与することが期待できる。

A. 研究目的

本研究は、本邦で最も多い原発性糸球体腎炎であり、慢性腎不全の主な原疾患でもある IgA 腎症の発症・進行機序を明らかにし、有効で特異的な治療のターゲットを特定することを目的として開始された。

IgA 腎症は、孤発例が大半を占めるが、家族の尿検査を含めて詳細な家族調査を行っていないことが多く、肉親に軽微な尿異常などがあっても見過ごしている可能性も

ある。事実、IgA 腎症が原因で腎移植を受ける症例の両親や同胞には、明らかに血尿や蛋白尿を認める頻度が高い。また、本症は日本人を含むアジア系人種に多く、アフリカ系人種には少ないなど、明らかに人種差があることが知られている。私共の施設での過去 9 年間の腎生検の動向では、4,330 例の腎生検例中、IgA 腎症は 908 例であった。その家族歴を調査した結果、家系内に血尿例を有する率が 8.3%、腎炎は 10.5%、

透析症例がある割合は4.6%であった。このことから、少なくともIgANの約10%近い症例は潜在的に遺伝性であることが示唆される。その遺伝的な背景、すなわち疾患感受性遺伝子が同定されれば、IgA腎症の発症メカニズムの解明が進むばかりでなく、有効な治療法、予防法の開発の糸口になると考えられる。

以上より、私共はこのIgA腎症の発症と進展に関する遺伝的背景を明らかにすることを、最初の目的として、本研究を開始した。

## B. 研究方法

まず、詳細な臨床表現型、すなわち腎生検病理組織所見と臨床経過データが記録された症例について、下記のような倫理的配慮のもと、末梢血白血球からゲノミックDNAを抽出し、保存した。本年度は、IgA腎症350例を含む約1,200症例のDNAと、それらの臨床データからなるデータベースを作成した。

IgA腎症の発症に関しては、IgA分子に対する受容体をコードする遺伝子群（pIgR, polymeric immunoglobulin receptor; FcαR, Fcα receptor など）の遺伝子多型を解析した。また、欧米の家族性IgA腎症で連鎖が報告された6番染色体長腕22-23領域についてマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析を行った。

ゲノムワイドな一塩基多型（SNP, single nucleotide polymorphism）による関連解析では、東京大学医科学研究所中村祐輔教授との共同研究を行った。

IgA腎症の進行に関しては、IgA腎症の腎機能の予後と、血管作動性物質、サイトカ

イン・ケモカイン、食塩感受性に関する遺伝子群との関連を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究全般にわたり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守する。十分なインフォームドコンセントを行った上で文書にて同意を得、末梢血からDNAを抽出し、保存する。これらのヒト由来試料や臨床データに関する個人識別情報は、連結可能匿名化を行い、大学内で定められた個人識別情報管理者が厳重に管理する。本研究全般に関して、新潟大学遺伝子研究倫理委員会で審査を受け、承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. IgA分子受容体および処理機構をコードする遺伝子群について

糸球体メサンギウム領域への免疫グロブリンA(IgA)沈着を特徴とするIgA腎症の発症は、食物抗原、細菌菌体外膜抗原、ウイルス抗原などの環境因子とともに、何らかの遺伝的背景の関与が想定されているが、その詳細は未だに不明である。IgA腎症では半数以上の症例で血清IgA値が上昇しており、IgA分子の産生・代謝に異常があることが知られている。IgA分子の代謝・処理に関わる分子は、多価免疫グロブリン受容体(pIgR; polymeric immunoglobulin receptor)、IgA Fc部分に対する受容体(FcαR)、アジア口糖蛋白受容体(ASGPR; asyalo-glycoprotein receptor)の3種が、従来から知られていた。IgA分子は40mg/KgBWと他のどの免疫グロブリンよりも多量に産生され、粘膜上皮細胞を越えて消化管、気

道、尿中などに分泌されている。多価 IgA は必ず粘膜上皮細胞上で pIgR に結合し、この C 末端側が切断されて分泌成分 (secretory component) となって分泌される。私たちは粘膜免疫において重要な役割を果たす pIgR の遺伝子多型について検討し、pIgR exon4 の転写開始点から 161 塩基対上流に T/G の SNP があり、IgA 腎症で他の腎炎や健康人に比較して有意に G (A2) アリルが多いことを報告した[1]。現在、その機序を検討中である。IgA 処理機構には他に、FcαR があるが、私たちは FcαR 遺伝子のプロモータ領域を含む 5' 上流領域に 3 箇所の SNP があることを見だし、IgA 腎症との関連を解析したが他の腎炎患者との差を認めなかった[2]。免疫グロブリン heavy chain や、IgA constant region promoter 領域の遺伝子多型と本疾患の関連は既に報告されているが、その後追試した報告はなされていない。IgA 腎症症例の約半数に血清 IgA 値の上昇が見られ、IgA の過剰産生がその主な原因と考えられており、その機序を説明する手がかりになりうる。今後さらに多数例で検討する必要がある。

## 2. ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の同定

東京大学医科学研究所(中村祐輔教授ら)を中心として、さまざまな形質(病気)に影響する可能性のある SNP を主体とした遺伝子多型を、ゲノムワイドにすべて同定するプロジェクト(JSNP; <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)が進行している。私たちも、この研究に同意が得られた IgA 腎症症例の DNA を提供し、協力した。この成果の一部として、細胞間接着分子のセレクチン(L-selectin, E-selectin)遺伝子多型、お

よび HLA-DRA 遺伝子が、IgA 腎症の候補遺伝子として同定された[3, 4]。この研究では、症例-対照研究(case-control study)でそれぞれの遺伝子型頻度に統計学的有意差がみられたことを報告しているが、これらの遺伝子の多型が何故 IgA 腎症の発症と関連するのかについては、今後解析する必要がある。また、家族性 IgA 腎症でさえも、複数の原因遺伝子座の存在が疑われており、当然複数の他の候補遺伝子が、今後も同定される可能性が高い。JSNP などのデータを有効に活用した大規模な遺伝子解析を、さらに進める必要があると考えられる。

## 3. ウテログロビン遺伝子多型と IgA 腎症の進行の関連

ウテログロビン(UTG; Uteroglobin)分子はフィブロネクチン(fibronectin)と IgA の結合を抑制し、IgA の糸球体メサンギウム沈着を抑制することが、マウスで証明されており、そのうえ、抗炎症性サイトカインとしての機能も有している。ヒト UTG 遺伝子にはエクソン(exon)1の5'非翻訳領域に A38G の SNP があり、私共はこの遺伝子型と IgA 腎症の発症について解析した。結果、IgA 腎症の発症には関連がなかったが、腎生検時高血圧を有する群と 2g/day 以上の高度蛋白尿を有する群においては UTG A38G GG 型で腎機能予後が不良であった。つまり、同じ遺伝子多型であっても、それに対する感受性には個体差があり、それは比較的単純な臨床データで推定できることが示された[5]。

## 4. IgA 腎症の進行に影響する遺伝的背景 前述の UTG のように、IgA 腎症の発症の

みでなく、進行にも遺伝的な背景が関与していると考えられる。特に、レニン-アンジオテンシン系遺伝子については従来から多数の報告があり、未だに一致した結論は得られていない。

日本人ではアンジオテンシノーゲン遺伝子 (AGT) 235T のアレル頻度が 80%以上と白人に比べて著しく高いため、日本人集団での大規模な解析も今後必要である。私たちは、AGTA-20C 多型が AGT の転写活性に直接影響することに着目し、この SNP と IgA 腎症の予後との関連を解析した。その結果、少なくとも日本人集団においては、AGT M235T 多型よりは、この AGT A-20C 多型が予後 (腎機能生存率) に影響することを報告した[6]。私たちの後ろ向き調査による成績では、腎生検時に腎機能が保たれていて 2 年以上の経過が明らかであった IgA 腎症 137 例の、腎生検時の臨床所見のうち、腎死の発生に対する Cox 比例ハザードモデルで有意差が検出されたものは、尿蛋白(1g/day 以上)、高血圧の合併とともに、AGT-20 の C アレル、であった。つまり、AGT-20 の位置に一つでも C アレルを有する症例は、AA 遺伝子型の症例に比較して 3.6 倍 (95%信頼区間 1.5-8.7、 $P = 0.004$ ) 腎不全発生の危険性が高いという結果であった。

## 5. その他

Sa 遺伝子は高血圧自然発症ラットの腎臓から同定され、近位尿細管などのミトコンドリアにおけるエネルギー代謝に関わることが分かっている。ヒトで、この遺伝子多型と高血圧との関連が示唆されているが、否定的な報告もあり、詳細は不明であった。

私たちは、この遺伝子多型は健常人では血圧に影響しないが、腎炎症例では関連があり、予後に影響する可能性もあることを報告した[7]。

アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 遺伝子多型と IgA 腎症の腎機能の予後を検討し、男性では予後に影響しないが、女性では大きな影響を及ぼす可能性があることを報告した[8]。

IgA 腎症における扁桃摘出術の長期的な治療効果を解析し、予後良好群 (軽症例) では扁桃摘出術が予後を改善することを証明した[9]。

## D. 考察

Lifton らが報告したように (Nature Genet, 26:354, 2000)、家族性 IgA 腎症 30 家系での連鎖解析では、6q22-23 に関連が認められたのは 60%であった。つまり、家族性 IgA 腎症でさえも、単一の遺伝子が原因ではない可能性が高いことを示唆している。私たちの本年度の調査でも、IgA 腎症発症に責任が疑われる遺伝子は、少なくとも 4 カ所 (6q22-23 の他、pIgR, L-selectin, HLA-DRA) はあるという結果であった。今後、これらの候補遺伝子の機能解析と、IgA 腎症発症との関連の機序を解析することにより、本症の病因がより明確に理解され、根本的な治療や予防法の開発につながるものと考えられる。

一方、IgA 腎症の進行についても、複数の遺伝的な背景が関連することが明らかとなった。特にレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系をコードする遺伝子の多型が腎機能の予後に影響することは、腎実質でのアンジオテンシン II 濃度が、他臓器

や循環血液中に比較して約 100 倍高いという事実と考え合わせると、重要な所見である。

さらに、性差、血圧、尿蛋白量などの簡単な臨床所見が、UTG 遺伝子や CYP11B2 遺伝子の多型に対する感受性を推定する有用なマーカーとなりうることが示されたが、これらは腎炎に対する個別治療を構築する上で、興味深い結果である。

今後は治療に対する反応性に影響する遺伝子も探索し、より詳細な個別治療戦略を開発する必要がある。これらの結果は、IgA 腎症に限らず、他の原発性糸球体腎炎や糖尿病性腎症などの二次性腎疾患においても共通の進行機序が想定されていることから、腎疾患全般に応用できる可能性が高い。

#### E. 結論

複数の遺伝的背景が IgA 腎症の発症と進展に関与している。今後、これらの候補遺伝子が何故 IgA 腎症の発症に関連するのかを解析する必要がある。

比較的簡便な臨床所見により遺伝子多型に対する感受性を推定することが可能である。これは、個別治療戦略を構築する上で、示唆を与える。今後はさらに症例を重ね、IgA 腎症以外の腎疾患での解析や、治療に対する反応性を解析する必要がある。

#### F. 健康危険情報

IgA 腎症の発症に関連する可能性が高い遺伝子として、下記のものと同定された。

Polymeric Immunoglobulin receptor (pIgR)

L-selectin

HLA-DRA

6q22-23 領域 (未知の遺伝子)

IgA 腎症の進行に関連する遺伝子として下記のものと同定された。

Angiotensinogen (AGT)

Uteoglobin (UTG) 高血圧、尿蛋白 2g/day 以上の症例

Aldosterone synthase (CYP11B2)女性

Sa

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Narita I, Kondo D, Goto S, Saito N, Watanabe Y, Yamazaki H, Sakatsume M, Saito A, Gejyo F: Association of gene polymorphism of polymeric immunoglobulin receptor and IgA nephropathy. *Intern Med* 40:867-872, 2001

2) Narita I, Goto S, Saito N, Sakatsume M, Jin S, Omori K, Gejyo F: Genetic polymorphisms in the promoter and 5' UTR region of the Fc alpha receptor (CD89) are not associated with a risk of IgA nephropathy. *J Hum Genet* 46:694-698, 2001

3) Takei T, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Ohnishi Y, Yamada R, Maeda S, Tsunoda T, Takeoka S, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Suzuki Y, Fujioka T, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Narita I, Gejyo F, Nihei H, Nakamura Y: Association between single-nucleotide polymorphisms in selectin genes and immunoglobulin A nephropathy. *Am J Hum Genet* 70:781-786, 2002

4) Akiyama F, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Tsunoda T, Maeda S, Takei T, Obara W, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Nitta K, Yumura W, Nihei H, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Suzuki Y, Fujioka T, Narita I, Gejyo F, Nakamura Y: Single-nucleotide polymorphisms

in the class II region of the major histocompatibility complex in Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *J Hum Genet* 47:532-538, 2002

5) Narita I, Saito N, Goto S, Jin S, Omori K, Sakatsume M, Gejyo F: Role of uteroglobin G38A polymorphism in the progression of IgA nephropathy in Japanese patients. *Kidney Int* 61:1853-1858, 2002

6) Goto S, Narita I, Saito N, Watanabe Y, Yamazaki H, Sakatsume M, Shimada H, Nishi S, Ueno M, Akazawa K, Arakawa M, Gejyo F: A(-20)C polymorphism of the angiotensinogen gene and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int* 62:980-985, 2002

7) Narita I, Saito N, Goto S, Shirasaki A, Morioka Y, Jin S, Omori K, Sakatsume M, Arakawa M, Gejyo F: Role of genetic polymorphism in the SA gene on the blood pressure and prognosis of renal function in patients with IgA nephropathy. *Hypertens Res* 25:831-836, 2002

8) Song J, Narita I, Goto S, Saito N, Omori K, Sato F, Ajiro J, Saga D, Kondo D, Sakatsume M, Gejyo F: Gender Specific Association of Aldosterone Synthase Gene Polymorphism with Renal Survival in Patients with IgA Nephropathy. *J Med Genet* in press, 2003

9) Xie Y, Nishi S, Ueno M, Imai N, Sakatsume M, Narita I, Suzuki Y, Akazawa K, Shimada H, Arakawa M, Gejyo F: The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* in press, 2003

## 2. 学会発表

1) Narita I, Goto S, Noriko S, Shirasaki A, Sakatsume M, Gejyo F: Efficacy of RA system inhibition on renal survival of IgA nephropathy and angiotensin converting enzyme A2350G polymorphism. International Session of 25th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension (Tokyo, Japan) 2002. 10.11-13

2) Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Shirasaki A, Morioka Y, Omori K, Ueno M, Kawachi H, Shimizu F, Sakatsume M, Gejyo F: Genetic polymorphism of NPHS1 G349A modifies the clinical and histological manifestations of IgA nephropathy. 4th International Symposium on Podocyte Biology (Niigata, Japan), 2002. 9.19-20

3) 坂爪実、芝紀代子、大森健太郎、森岡良夫、後藤眞、成田一衛、下条文武：糸球体腎炎の尿プロテオミクスと尿免疫細胞の病的意義、第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002.5.23-5.25

4) 金子佳賢、坂爪実、謝院生、黒田毅、成田一衛、下条文武：ラット抗糸球体基底膜抗体腎炎における GeneChip による発現遺伝子の解析、第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002.5.23-5.25

5) 宋進、坂爪実、成田一衛、後藤眞、斉藤徳子、大森健太郎、上野光博、下条文武：IgA 腎症における Peroxisome Proliferator-Activated Receptor g (PPARg) C161T 遺伝子多型と予後との関連、第45回日本腎臓学会学術総会（大阪）2002.5.23-5.25

6) 後藤眞、成田一衛、斉藤徳子、坂爪実、大森健太郎、宋進、西慎一、上野光博、今井直史、下条文武：IgA 腎症における Nephin 遺伝子 G349A 多型の検討、第45回日本腎

臓学会学術総会（大阪）2002.5.23-5.25

7) 斉藤徳子、成田一衛、後藤眞、坂爪実、  
大森健太郎、宋進、上野光博、西慎一、下

条文武：IgA 腎症における G 蛋白質β3

subunit 遺伝子 (GNB3) 多型の検討、第 45

回日本腎臓学会学術総会（大阪）

2002.5.23-5.25

H. 知的財産権の出願・登録状況

「遺伝子多型解析を用いた IgA 腎症診断お  
よび IgA 腎症診断用キット」

発明者：成田一衛、下条文武

権利者：下条文武、(株)東洋紡ジーンアナ  
リシス

種類：診断法および診断キット

出願年月日：平成14年9月24日

特願：2002-278080、識別番号：502346253

国際特許出願（出願中）

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

腎細胞再生の腎疾患治療への試み。

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 と beta-catenine 遺伝子発現が、急性腎不全後の近位尿細管細胞の再生、増殖に関与することを報告した。さらに腎尿細管および糸球体の再生を目指し、multipotent な細胞であるマウス ES 細胞を用いて、腎尿細管細胞および糸球体構成細胞である上皮細胞、メサンギウム細胞の分化、再生を試み、腎疾患治療への応用を検討し、ES 細胞から、podocyte 様の性格を持った細胞が、分化誘導できることが示された。

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、腎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。糸球体上皮細胞の再生により、ネフローゼ症候群の、尿細管細胞の再生により、急性腎不全および慢性腎不全の新規の治療法が開発できる可能性がある。

B.研究方法

(実験 1)

ラットの左腎動脈を一時間虚血再環流後の Wnt-4 の発現を Western blot および real-time PCR 法にて検出した。また Wnt-4 の発現を

共焦点レーザー顕微鏡を用い組織学的検討を行った。Wnt-4 の発現する細胞の同定を行うために、近位尿細管のマーカーである aquaporin1 と Wnt-4 の二重染色を行った。また Wnt-4 発現細胞が、分裂細胞であるかどうか、PCNA との二重染色も行った。次に Wnt-4 の細胞内局在を調べるために、ゴルジ装置のマーカーである GP130 との強拡大での二重染色も行った。さらに Wnt-4 と beta-catenin の細胞増殖への機能を解析するために、培養尿細管細胞である LLC-PK1 細胞に Wnt-4 と beta-catenin を electroporation 法にて、強制発現をした時の細胞増殖を FACS と 3H-thymidine の取り込みで検討した、さらに Wnt-4 と beta-catenin 強制発現をした時の cyclin D1 の promoter 活性と蛋白発現の変化を検討した。

(実験 2)

マウス ES 細胞を用いての腎細胞の再生分化を目指す。まず糸球体再生に関わる研究

としては、ES 細胞を出発点として、メサンギウム細胞と上皮細胞の分化誘導を目指す。マウス ES 細胞を hanging drop 法で、EB(embrioid body)細胞へ分化させ、EB 細胞の培養液中に HGF および bFGF を添加させ、21 日間培養し、RNA および蛋白を抽出した。RNA より、RT-PCR 法にて、上皮細胞のマーカーである Nephritin、Podocin、Podocalyxin、Podoplanin を発現することを確認する。申請者らは、種々の培養条件を検討し、次ぎに尿細管細胞への分化の可能性を検討する。また糸球体再生に関わる研究としては、ES 細胞を出発点として、メサンギウム細胞への分化誘導を目指す。また上皮細胞のマーカーである Nephritin、Podocin、Podocalyxin、Podoplanin の蛋白の発現を組織学的な染色をすることを確認する。今後さらに腎細胞への分化条件を検討しながら、in vivo で Lac-Z 遺伝子を組み込んだ ES 細胞を腎内に注入し、腎細胞への分化誘導をめざす。

(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、当学動物実験基準ののっとりて研究を行う(承認番号 0010277)

### C. 研究結果

(実験 1)

ラットの左腎動脈を一時間虚血再環流後の Wnt-4 の発現を Western blot および real-time PCR 法にて検出したところ、Wnt4 は control では、ほとんど発現がないが、虚血/再灌流後 6-24 時間で発現が亢進した。一方細胞周期調整遺伝子である、E2F1, cyclin D1, cyclin A の発現は 12-24 時間と Wnt4 の

発現より遅い phase で起った。また Wnt-4 の発現を共焦点レーザー顕微鏡を用い組織学的検討を行った。Control rat では Cortex, Medulla とともに、Wnt-4 は発現しないが、再灌流 12 時間後では、Cortex で、尿細管に Wnt-4 の発現が認められた。Wnt4 の発現する細胞の同定を行うために、近位尿細管のマーカーである aquaporin1 と Wnt-4 の二重染色を行ったところ、発現部位は一致しており、近位尿細管で Wnt4 が発現していることがわかった。また Wnt-4 発現細胞が、分裂細胞であるかどうか、PCNA との二重染色も行った。Wnt-4 の発現細胞は、PCNA も発現しており、Wnt-4 発現細胞が細胞分裂を起こしていることがわかった。

次ぎに Wnt-4 の細胞内局在を調べるために、ゴルジ装置のマーカーである GP130 との強拡大での二重染色も行ったところ、染色部位は、一致しており、分泌蛋白である Wnt-4 は、ゴルジ装置に局在することが分かった、さらに Wnt-4 と beta-catenin の細胞増殖への機能を解析するために、培養尿細管細胞である LLC-PK1 細胞に Wnt-4 と beta-catenin を electroporation 法にて、強制発現をした時の細胞増殖を FACS と 3H-thymidine の取り込みで検討したところ、Wnt-4, beta-catenin の強制発現により、S 期 G2/M 期の細胞は増加し、3H-thymidine の取り込みは、上昇し細胞増殖がおこることがわかった。さらに Wnt-4 と beta-catenin 強制発現をした時の cyclin D1 の promoter 活性と蛋白発現の変化を検討したところ、Wnt-4 を強制発現すると cyclinD1 の promoter 活性は 2.5 倍に上昇し、さらに beta-catenin, TCF を共発現させると、相加的に promoter 活性は上昇した。従って、Wnt-4-beta-catenin pathway は、TCF

を介して cyclin D1, A の転写亢進をおこすと考えられた。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。

#### (実験 2)

マウス ES 細胞を出発点として、メサンギウム細胞と上皮細胞の分化誘導を目指す。マウス ES 細胞を hanging drop 法で、EB(embrioid body)細胞へ分化させ、EB 細胞の培養液中に HGF および bFGF を添加させ、22 日間培養し、RNA および蛋白を抽出した。RNA より、RT-PCR 法にて、上皮細胞のマーカである Nephritin、Podocin、Podocalyxine、Podoplanin の発現を検討したところ、EB 細胞への分化後 9 日目において、Nephritin、Podocin、Podocalyxine、Podoplanin の mRNA が、RT-PCR 法にて検出された。また培養 12 日目の蛋白発現では、Nephritin、Podocin が Western blot で陽性となった。メサンギウム細胞への分化誘導としては、Megsin は EB 細胞培養 10 日より陽性になり、22 日まで検出された。in vivo で腎へ ES 細胞を注入したところ、teratoma の形成が観察された。現在 LacZ 遺伝子を組み込んだ分化した EB 細胞を腎内に注入し、腎細胞への分化誘導をめざしている。

#### 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、Wnt-4 に注目した。急性腎不全後の、再生、増殖の時期に、Wnt-4 が近位尿細管に劇的に発現亢進することをはじめて確認し発表している(J. Am. Soc. Nephrol in press)。また培養尿細管細胞に Wnt-4 を強制発現した時に、細胞周期

調整遺伝子の cyclin D1 の転写活性が亢進し、細胞周期が促進しすることを検討し、尿細管細胞の再生のメカニズムを解明した。

Wnt-4 さらに beta-catenin と TCF の遺伝子導入下で、相加的に cyclin D1 の転写活性と細胞増殖能が LLCPK1 細胞で亢進したという実験結果は、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唆している。また急性腎不全の回復期において Wnt-4 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。また我々のもう一つのアプローチである ES 細胞を用いた腎再生は、糸球体構成細胞のうち、上皮細胞の性格を持つ細胞への分化の可能性と、メサンギウム細胞の分化への可能性が示された。糸球体自体の再生にはまだ程遠く、多くの超えなければならぬ問題点を抱えているが、これまでの治療法では、根治が不可能とされている慢性腎炎、ネフローゼ症候群および慢性腎不全の新しい治療法の可能性を示唆するものと考えている。

#### 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 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 Wnt-4 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。ES細胞を用いた腎再生は、糸球体構成細胞のうち、上皮細胞の性格を持つ細胞への分化の可能性と、メサンギウム細胞の分化への可能性が示された。このようなアプローチによる腎細胞の再生、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. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. Wnt4 Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* (in press)
2. Shimamura H, Terada Y, Okado T, Tanaka H, Inoshita S, Sasaki S. The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibited apoptosis in vitro via NF- $\kappa$ B and Bad. *J Am Soc Nephrol* (in press)
3. Okado T, Terada Y, Tanaka H, Inoshita S, Nakao A, Sasaki S. Smad7 mediates transforming growth factor- $\alpha$ -induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int* 62:1178-1186, 2002
4. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Akiba T, Sasaki S. Ligand-regulatable erythropoietin production by plasmid injection and in vivo electroporation. *Kidney Int* 62:1966-1976 2002
5. Terada Y, Hanada S, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Gene transfer and expression of SMAD7 using adenovirus combined with in vivo electroporation in unilateral ureteral obstruction in rats. *Kidney Int* 61:S94-98, 2002
6. Lin SH, Bichet DG, Sasaki S, Kuwahara M, Arthus MF, Lonergan M, Lin YF. Two novel aquaporin-2 mutations responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus in Chinese families. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2694-700, 2002
7. Owada M, Kawamura M, Kimura Y, Fujiwara T, Uchida S, Sasaki S, Hiramori K. Water intake and 24-hour blood pressure monitoring in a patient with nephrogenic diabetes insipidus caused by a novel mutation of the vasopressin V2R gene. *Intern Med* 41: 119-23, 2002
8. Miyazaki H, Kaneko T, Uchida S, Sasaki S, Takei Y. Kidney-specific chloride channel, OmClC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 15782-7, 2002
9. Kobayashi K, Uchida S, Okamura HO, Marumo F, Sasaki S. Human CLC-KB gene promoter drives the EGFP expression in the specific distal nephron segments and inner ear. *J Am Soc Nephrol* 13: 1992-8, 2002
10. Yoshikawa M, Uchida S, Ezaki J, Rai T, Hayama A, Kobayashi K, Kida Y,