

- Noda M, Koike M, Uchiyama Y, Marumo F, Kominami E, Sasaki S. CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells*. 7: 597-605, 2002
11. Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, Imai M. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim Biophys Acta* 1576: 335-40, 2002
12. 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; 282(3): F451-7.
13. Ota T, Kuwahara M, Terada Y, Akiba T, Sasaki S, Marumo F. Expression of aquaporin-1 in the peritoneal tissues: localization and regulation by hyperosmolality. *Perit Dial Int* 2002; 22:307-15.
14. Terada Y, Okado T, Inoshita S, Hanada S, Kuwahara M, Sasaki S, Yamamoto T, Marumo F. Glucocorticoids stimulate p21CIP1 and arrest cell cycle in vitro and in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int* 59:1706-1716, 2001.
15. Hanada S, Terada Y, Inoshita S, Lormann SM, Sasaki S, Marumo F. Cyclic GMP using adenovirus inhibits Cyclin E transcription and mesangial cell cycle. *Am J Physiol* 280: F851-F859, 2001
16. 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. *Kidney Int* 60:553-567, 2001
17. Terada Y, Tanaka H, Okadado T, Inoshita S, Kuwahara M, Akiba T, Sasaki S, Marumo F. Ligand-dependent-regulated erythropoietin production by naked plasmid injection and in vivo electroporation. *American Journal of Kidney Disease* 38:S50-S53, 2001.
18. Kuwahara M, Iwai K, Ooeda T, Igasashi T, Ogawa E, Katsushima Y, Shimbo I, Uchida S, Terada Y, Arthus M, Lonergan M, Fujiwara T, Bichet D, Marumo F, Sasaki S. Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidud caused by Aquaporin-2 mutation in the C-terminus. *American Journal of Human Genetics* 69, 738-748, 2001.
19. Yamashita Y. Tanase T. Terada Y. Tamura H. Akiba T. Inoue H. Ida T. Sasaki S. Marumo F. Nakamoto Y. Glomerulonephritis after methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection resulting in end-stage renal failure. *Internal Medicine*. 40(5):424-7, 2001
20. Asai T, Kuwahara M, Sato K, Terada Y, Kurihara S, Yomeshima H, Akiba T, Marumo F. Collagen type 1 α 1 collagen polymorphism may be associated with the rate of bone mineral density decrease in female hemodialysed patients. *Clin Exp Nephrolo* 5:234-239, 2001
21. Akizuki N, Uchida S, Sasaki S, Marumo F: Impaired solute accumulation in inner medulla of *Clcnk1*^{-/-} mice kidney. *Am J Physiol*. 2001; 280: F79-F87, 2001

22. Ishibashi K, Suzuki M, Sasaki S, Imai M: Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and β subunit of the high-affinity IgE receptor. *Gene* 264: 87-93, 2001
23. Kageyama Y, Ishibashi K, Hayashi T, Xia G, Sasaki S, Kihara K: Expression of aquaporins 7 and 8 in the developing rat testis. *Andrologia*. 33: 165-169, 2001
24. Kida Y, Uchida S, Miyazaki H, Sasaki S, Marumo F: Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Histochem Cell Biol*. 115: 189-194, 2001
25. Liu W, Morimoto T, Kondo Y, Iinuma K, Uchida S, Imai M: "Avian-type" renal medullary tubule organization causes immaturity of urine-concentrating ability in neonates. *Kidney Int*. 60: 680-693, 2001
26. Saito T, Higashiyama M, Nagasaka S, Sasaki S, Saito T, Ishikawa S: Role of aquaporin-2 gene expression in hyponatremic rats with chronic vasopressin-induced antidiuresis. *Kidney Int*. 60: 1266-1276, 2001
27. Takemura T, Hino S, Kawajima H, Yanagida H, Okada M, Nagata M, Sasaki S, Barash J, Harris RC, Yoshioka K: Induction of collecting duct morphogenesis in vitro by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Am Soc Nephrol*. 12: 964-972, 2001
28. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F: Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol*. 116: 49-56, 2001
29. Kobayashi K, Uchida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F: Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*. 12: 1327-1334, 2001
2. 学会発表
1. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. Hepatocyte growth factor gene therapy prevents renal fibrosis and dysfunction in rat chronic renal disease model. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, October 2002.
2. Kuwahara M, Asai T, Terada Y, Sasaki S. C-terminal tail determines apical trafficking of aquaporin-2 (AQP2). 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, October 2002.
3. Kuwahara M, Ota T, Gu Y, Terada Y, Akiba T, Sasaki S, Marumo F. Renal expression of metallothionein (MT) in rats treated with cadmium. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, October 2002.
4. Hayama A, Uchida S, Rai T, Sasaki S. Barttin Physically Interacts with CLC-K2 and Makes It Translocate from ER to Plasma Membranes. 35th Annual Meetings of the American Society of Nephrology, Philadelphia, November 2002.
5. Shimamura H, Terada Y, Tanaka H, Okado T, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. Increment of Apoptosis and Decreased Renal Function by Cisplatin-Induced Acute Renal Failure in PI3K Knockout Mouse. American

- Society of Nephrology Renal Week 2002,
Philadelphia, November 2002.
6. 浅井友基, 桑原道雄, 栗原秀剛, 坂井建雄, 寺田典生, 佐々木成, 丸茂文昭. 常染色体優性腎性尿崩症を引き起こす異常アควアポリン 2(AQP2)の細胞内局在. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 7. 石川雅子, 田村博之, 田島真人, 石下晃子, 桑原道雄, 佐々木成, 丸茂文昭. CAPD患者の二次性副甲状腺機能亢進症に対するビタミンD静注パルス療法の有効性. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 8. 石橋賢一, 桑原道雄, 森永伴法, 佐々木成, 今井正. 水/グリセリン/尿素をとおす新規水チャネル(AQP10)のクローニング. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 9. 井田隆, 山下裕美, 安藤亮一, 千田佳子, 周立民, 佐々木成, 丸茂文昭. ウサギ血清病腎炎における細胞増殖に関する因子の検討. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 10. 岡戸丈和, 寺田典生, 田中啓之, 島村治子, 井下聖司, 桑原道雄, 一条秀憲, 佐々木成. ASK1 遺伝子欠損マウスの片側尿管結紮(UUO)腎症におけるアポトーシスならびに線維化抑制効果とその検討. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 11. 島村治子, 寺田典生, 井下聖司, 岡戸丈和, 田中啓之, 桑原道雄, 佐々木成. シスプラチン急性腎不全モデルにおけるPI3kinase-Akt pathway の役割—PI3 knockout mouse を用いて. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 12. 寺田典生, 田中啓之, 岡戸友和, 島村治子, 井下聖司, 桑原道雄, 佐々木成. HGF 遺伝子の筋肉への in vivo エレクトロポレーションによる慢性腎不全ラットへの遺伝子治療の試み. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
 13. 早麻淳, 内田信一, 佐々木成. CLC-K2 クロライドチャネルはプロテアソームアクトベーターPA28 alpha と相互作用を有する. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 2002年5月.
- 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

骨髄幹細胞を用いた腎臓再生へのアプローチ

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

研究協力者：横尾 隆 東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科 助手

研究要旨

我々は、腎臓再生にはその構成細胞の幹細胞（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研究をすすめている。ひとつは骨髄細胞由来の幹細胞が流血中に存在し、臓器障害により動員され、臓器を再構築するという考え(stem cell in bone marrow theory)であり、もう一つは、臓器内には幹細胞が個体発生時にすでに取り込まれており、何らかの刺激により、分化誘導が起こり、臓器の再生を促すという考え(stem cell in situ theory)である。本年度の研究により、骨髄細胞を移植することにより一部の腎臓構成細胞、特に尿細管細胞が、ドナー細胞に置き換わることを確認した。一方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。現在これらを用い実際に腎疾患に再生医療が可能であるか検討している。

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剤の長期服用の必要のため一般的な治療法とはいえない。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。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。残念ながら腎臓構成細胞の幹細胞がどこに存在するか充分明らかになっていないが、これまでの他の肝幹細胞や消化管上皮幹細胞に対する知見より個々の臓器幹細胞は成体内、骨髄内の両者に存在し、必要に応じて供給されることが示唆されている。そこで我々は腎臓再生をめざし2通りのアプローチを試みた。まず腎臓

構成細胞が置き換わることが可能か骨髄移植手法を用いて検討した。一方で腎臓再生因子の同定の研究が世界的に展開されていることより、この腎臓再生因子を腎臓障害部位に高発現させることにより腎臓再生をさらに促進させることが可能か検討している。

B. 研究方法

まず我々は過去に骨髄移植により IgA 腎症が治癒しうるということが明らかとなったため、骨髄移植後の腎臓治癒機転に骨髄由来細胞による糸球体構成細胞の再構築（再生）が関与した可能性を考え、green fluorescent protein (GFP) transgenic マウス(green mouse)を用いた骨髄移植実験を行なった。つまり、GFP 陽性骨髄幹細胞が移植後に腎臓構成細胞に分化した場合、その細胞は GFP 陽性のため、レシピエントの細胞と区別することが可能であるので、移植後経時的に腎臓組織に GFP 陽性細胞が存在するか検討した。またこれらの細胞は糸球体内浸潤細胞でなく、糸球体構成細胞であることを組織免疫染色あるいは共焦点レーザー顕微鏡にて確認し、検出された GFP 陽性細胞を単離しその細胞特性を検討した。さらに骨髄細胞中どの分画が局所再生に貢献しているか検討するためマウス骨髄より間葉系幹細胞を採取しこれにレトロウイルスを用いて LacZ 遺伝子を導入しこれを移植した。このキメラマウスの腎臓を経時的に β gal 染色し、細胞が置き換わっているか検討した。一方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

ステムの開発した。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。効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 ヶ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。これらにより骨髄改変による長期的遺伝子導入が可能であることを確認後、さらに患者負担の軽減した再生法を目指し、造血幹細胞の起源として自己骨髄細胞でなく臍帯血を利用してできないか検討した。実際にはインフォームドコンセントを得たうえで供与された臍帯血より CD34 陽性細胞をマグネットビーズ法を用いて得たうえ、レトロウイルスを用いてマーカー遺伝子として human β -glucuronidase (HBG) を導入後 NOD/SCID マウスに移植した。8 週後このマウスの骨髄がヒト由来のドナー細胞に置き換わっていることを確認し LPS を連日 7 日間投与を続け糸球体に ICAM-1 の発現を誘導した。免疫組織化学、HBG bioassay 法、Western blot 法により移植した細胞が糸球体局所で単核球系細胞に分化し導入した外来遺伝子を分泌しているか確認した。
(倫理面への配慮)

臍帯血の供与に当たっては慈恵医大倫理委員会の承認を得、正常妊娠中の妊婦とその家族よりインフォームドコンセントを得た上で供与を受けた。分娩後の臍帯より採血するため、母体、新生児の健康状態への直接的影響はないが、精神的負担を十分考慮して行った。

C. 研究結果

Green mouse の骨髄を crude のまま移植後、糸球体内に時間経過とともに GFP 陽性細胞が出現し、骨髄移植 6 ヶ月後において、GFP 陽性細胞の一部が糸球体メサンギウム領域にあり、以降その細胞数が増加していくのが確認された。そこでこの糸球体を単離し *in vitro* で培養したところ GFP 陽性細胞の一部は desmin 陽性であり、またこの細胞はアンジオテンシンにより収縮することが確認されたため糸球体内 GFP 陽性細胞がメサンギウム細胞であることが示唆された。そこで次にマウス骨髄より間葉系幹細胞を採取しレトロウイルスを用いて LacZ 遺伝子を導入後同じ遺伝背景のマウスに前処置なしで移植した。予想に反し LacZ 陽性細胞は 1 週間後より一部の尿細管細胞、および間質細胞に認められることが確認された。そこでさらに虚血再還流により尿細管障害をさらに誘導したところこの LacZ 陽性細胞数の増加が認められた。

一方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 キメラにおいて優位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。そこで次にヒト臍帯血由来の造血幹細胞で同様な遺伝子導入が可能か確認した。ヒト臍帯血からマグネットビーズ法を用いて CD34 陽性細胞を採取しレトロウイルスを用いて HBG 遺伝子を導入した。Clonogenic Assay では BFU-E, CFU-E, CFU-G のそれぞれの lineage に有意差なく遺伝子が導入されていることが示され、レトロウイルスを用いて未分化な状態のまま遺伝子を導入することが可能であることが示された。そこでこの細胞を NOD/SCID マウスに移植し、ヒト由来の造血組織を持ったキメラマウスを作成した。キメラ状態が確立されたことは骨髄の Clonogenic Assay を用いて行った。このキメラマウスに LPS を投与し糸球体に接着因子の発現を誘導したところ、ヒト由来の単核球系細胞が糸球体に動員され一部の細胞から導入した HBG が分泌されていることが確認された。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につき検討をはじめた。

D. 考察

これまでの我々の研究結果から骨髄細胞を採取後すぐに移植した場合、その一部がメサンギウム細胞に置き換わるが、一方で骨髄採取後 IL-3、IL-6、stem cell factor 存在下で 72 時間培養し造血幹細胞に commit した後に移植した場合、糸球体の再構築は起こらず血液細胞のみが置き換わることが示され、骨髄幹細胞中の間葉系幹細胞がメサンギウム細胞の再構築に深く関与していることが示唆された。このことはメサンギウム細胞が中胚葉由来であるという報告と矛盾しない。そこで今回骨髄細胞より間葉系幹細胞を採取した後にマーカー遺伝子を導入して移植したが、予想に反し少なくとも短期間の観察結果では尿細管の一部に置き換わることが示された。このデータは約 8% の尿細管上皮細胞が障害のない正常の新陳代謝のサイクルの中で置き換わっていくという報告と矛盾しない。さらにこの現象は虚血再還流により尿細管に障害を与えることによりさらに増加することが明らかとなった。このことは尿細管を障害する病態において外部から間葉系幹細胞を補足することにより障害尿細管を renewal させて腎障害を治癒に向かわせる可能性を示唆するものと考えられる。そこで現在 Sly 病等の先天性代謝疾患などで尿細管に特定酵素遺伝子欠損のため尿細管にリソゾームが蓄積する病態において障害尿細管を wild type に置き換えることにより腎機能改善が可能か検討している。

一方、腎臓再生因子を障害局所に送り込み、

組織幹細胞の分化誘導を行うことにより腎臓再生につなげる試みとしては、我々が報告した骨髄改変による遺伝子導入法を用いて腎不全モデルへの HGF の導入実験を開始している。しかし、HGF の持つ多彩な性格のためか、現在のところ腎機能改善に直接結びつくような知見は得られていない。今後各方面で腎臓再生因子の開発が精力的に行われており、それらを導入することにより腎臓特異的な再生法の確立を目指したい。

以上のように糸球体構成細胞の再構築により治療効果が期待される疾患に対しては、間葉系幹細胞を移植することにより障害細胞の入れ替えを行い、一方では腎臓再生因子を供給することにより組織幹細胞を分化誘導し再生が期待できるような病態においては腎臓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、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く予定である。

E. 結論

現在本邦における末期腎不全患者数は 20 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。我々の骨髄幹細胞を用いた腎臓再生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、本研究は腎炎、腎不全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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Okamoto A, Suzuki T, Shen JS, Tanaka T, Kawamura T, Hosoya T: Gene delivery using human cord blood-derived CD34+ cells into inflamed glomeruli in NOD/SCID mice. *Kidney Int.* 2003 (in press)
- 2) Yokoo T, Kawamura T: Gene therapy for glomerulonephritis using bone marrow stem cells. *Clin. Exp. Nephrol.* 6: 190-194, 2002
- 3) Imasawa T, Utsunomiya Y: Stem cells in renal biology: bone marrow transplantation for the treatment of IgA nephropathy. *Exp. Nephrol.* 10: 51-58, 2002.

2. 学会発表

- 1) Takashi Y, Utsunomiya Y, Suzuki T, Shen JS, Kawamura T, Hosoya T.: Gene delivery using human cord blood-derived CD34+ cells into inflamed glomeruli in NOD/SCID mice. 7th Research Forum on Progressive Renal Diseases 2003 Nagoya Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 今井圓裕 大阪大学大学院・医学系研究科・病態情報内科学 講師

研究要旨

ラット骨髄細胞を、メサンギウム細胞様の細胞に転換できる方法を確立した。また、骨髄細胞からメサンギウム細胞の前駆体となりうる細胞を簡便に精製する方法を樹立した。成熟ラットの腎実質より SP 細胞を単離し、多分化能を有することを証明したが、腎臓に特化した幹細胞ではないことが判明した。ラット腎臓の発達途上ネフロンおよび未分化組織から選択的に mRNA 群を精製する方法を確立し、ネフロン発生に関与する遺伝子の検討を行った。その中から、糸球体上皮細胞の修復に関与する重要な分子・機構を解明した。

A.研究目的

現在の先進国医療水準をもってしても、進行性腎疾患を完治あるいは寛解させることは不可能であり、日欧米ともに、透析患者総数は、今後も継続的に増加すると予想されている。日本透析医学会の統計によれば、平成13年末におけるわが国の慢性透析患者数は20万人を大きく上回り、この数は、実に10年前の2倍以上である。過去数年来の新規透析導入患者数は、3万人超/年のレベルであり、死亡患者数を差し引いても、毎年1万人以上の透析患者が増加する状況となっている。現在、30万人の透析患者を抱える米国においても、増加率は6%前後で推移しており、2010年までには60万人規模に到達するであろうと、National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney

Diseases (NIDDK)によって予測されている。患者数の増加のみならず、患者内訳の変化も著しい。わが国において、新規導入患者の平均年齢は、昭和61年末で55歳であったが、現在では62-63歳（最高齢は99歳）となっており、日本人平均寿命の伸び幅を考慮しても、著明な高齢化である。さらに、透析患者では、血管合併症や感染症の合併率が非透析者に比して高いが、高齢化や透析導入の主要原因疾患である糖尿病性腎症患者の増加など、と相まって、その重症度は高まる一方である。

医療経済面からも腎不全医療に関する問題は多い。透析療法は、整備された工学システムと多くの医療看護スタッフを要する1人当たり年間約500万円以上の医療費を要する高コストの医療であり、1万人の透析

患者増加は、年間医療費が500億円増加することを意味する。上記のように、既存透析患者の高齢化、新規導入患者層の高齢層へのシフト、合併症の増加・重症化、など、腎不全医療に関わるコストを押し上げる自然要因的な圧力は大きく、長期的・抜本的に解決策を講じる努力が必要であることは論を待たない。

ところで、平成14年4月1日に(社)日本臓器移植ネットワークに登録されている腎移植希望者数は13013名であったが、平成10年度から13年度にかけての脳死あるいは心停止者からの腎臓移植件数は、例年150件前後、血縁者からの生体腎提供によるものが500-600件であり、ドナー不足が極めて深刻である。この状況は臓器提供例が多い移植先進国の米国においても同様であり、年間移植例は1万件あまりである。今後とも、この状況が改善する見通しはないことから、従来の移植医療が最終的な解決策となりうることは、期待できないと考えられる。

近年、多くの分野において、機能不全に陥った臓器や欠損した組織を、幹細胞を用いた技術によって再生するという試みが行われている。再生医療の研究にとって欠かせない因子は、幹細胞である。幹細胞の源としては、特定の組織内に存在する組織幹細胞と、組織外に存在する幹細胞とが考えられる。組織幹細胞（あるいは体性幹細胞）は、その組織中に存在し、自己複製能と多分化能を合わせ持つ細胞である。基本的には、その組織が傷害を受けた際に修復・再

生をおこなう、あるいは生理的な細胞周期のもとで、正常構築を維持するための細胞回転に関与すると考えられる。このような組織幹細胞は、発生が完了した成体組織においても、組織再生に積極的に利用できるのではないかと期待されている。組織幹細胞は、これまでは、血液系・皮膚・腸上皮などの一部の臓器のみに存在するとされてきたが、中枢神経系・骨格筋・肝臓などにも存在することが明らかとなっている。一方、実質臓器の外に存在する幹細胞としては、骨髄中の造血幹細胞や間葉系幹細胞が代表的である。特に骨髄中の幹細胞に関しては、骨・心筋・肝臓などの修復に利用可能であることが示されている。再生医療により期待できる直接的な効果として、(1)腎疾患患者は、QOLが大幅に低下する透析療法への導入を回避できる、(2)透析導入患者数の減少により、長期的に見て医療費の削減が期待できる、の2点が挙げられる。間接的にも、(3)腎不全が可逆的疾患として認識されることにより、腎疾患を有する患者ならびに家族・周辺社会の精神的・経済的負担が大幅に軽減する、(4)潜在的腎移植必要患者数の減少により、移植に伴う倫理的問題点ならびに医療費上の問題点の負担が軽減される、(5)透析施設への往復に伴う介護上の労力やコストが削減できる、などが挙げられる。より若く合併症の少ない時期に、透析導入の回避を決定づけることが可能となれば、患者の人生設計が建設的になり、社会全体の生産力を向上することも可能であろう。

我々は、現時点の医学では組織的に不可逆的な程度にまで傷害を受けた腎臓の組織に対して、積極的な働きかけを行うことによって、機能の回復を可能とする治療方法の確立を目指して研究を行なっている。平成 14 年度の成果に関して報告する。

B. 研究方法

1. 動物の維持ならびに骨髄移植

日本 SLC より野生型 Sprague-Dawley (SD) ラットを購入し、大阪大学遺伝情報実験施設の岡部勝博士が樹立された

EGFP(enhanced green fluorescent protein)を構成的に発現するトランスジェニック SD ラット (EGFP トランスジェニックラット) と共に、大阪大学医学系研究科動物舎の SPF 環境で飼育した。骨髄移植では、6 週齢オスラットの大腿骨・頸骨より、深麻酔下に Medium-199/2% FCS を用いて骨髄細胞を採取し、7 Gy の全身 X 線照射を行ったメスラットに移植を行った。

2. SP 細胞の精製と移植

ラット腎臓を HBSS/5 mM EGTA にて灌流した後、Collagenase 入りの同バッファで消化した。細胞懸濁液をメッシュ通過、遠心、洗浄した後、5 µg/mL Hoechst 33342 で染色し、FACSVantage によりソートした。蛍光パターンから骨髄あるいは腎臓由来の SP 細胞分画を同定・分取し、1x10⁵ 程度の細胞を、あらかじめ 5 Gy の X 線照射を行った別個体のラットの尾静脈から投与することにより移植とした。

3. 骨髄細胞の精製と細胞移植

旭化成 (株) 中央技術研究所で開発された不織布型細胞分離フィルターを用いて、骨髄細胞液の精製と移植を行った。本フィルターは、2-hydroxyethyl methacrylate・N,N-dimethylaminoethyl methacrylate 共重合体にて親水化した繊維径約 2.3 µm のポリエチレンレフタレート製不織布を積層充填したものである。エチレンオキサイドガスで滅菌したディスポーザブル製品として供給される。この方法で EGFP ラット骨髄より精製した 5x10⁶ 個の細胞を、X 線照射を行っていない野生型ラットの尾静脈から投与することにより移植とした。また、フィルターの精製能力を検討するために、精製前後の骨髄細胞を Hoechst33342 で染色し、SP 細胞の含量を比較した。

4. 実験系球体腎炎モデルの作成

糸球体メサンギウム領域に病変を生じさせるために、ラットメサンギウム細胞の表面抗原である Thy1 に対するマウスモノクローナル抗体を、各種の移植ラットの尾静脈より単回投与し、急性糸球体腎炎を惹起した。発症前ならびに発症後 5 6 日目にラットを屠殺し、組織の解析を行った。

5. 組織処理ならびに免疫組織化学と解析

ラットを深麻酔下に開腹し、腹部大動脈より 200 ml の PBS で灌流した後に、10%ホルマリン/PBS を灌流し、組織を摘出した。さらに 4℃にて 3 時間、浸漬固定を行い、

OCT-compound に包埋した。組織切片を作成した後、必要な抗体を用いて染色を行った。EGFP の蛍光を観察する凍結切片では、2 次抗体には Texas-Red ラベルの抗体を用い、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。細胞核は DAPI により染色した。

6. 細胞培養

骨髓細胞を上記の方法で採取した後、1 型コラーゲンをコートした細胞培養ディッシュ上に、増殖用培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/10% FCS/10% horse serum /0.5% chick embryo extract /4% penicillin-streptomycin)) と共に播き、2 4 時間以内に接着しない細胞を 4 型コラーゲンをコートしたディッシュに移した後、さらに 2 4 時間培養した。非接着細胞を除いた後、分化用培地 (DEME/2% horse serum/4% penicillin-streptomycin /1 mM of all-trans retinoic acid (RA)/200 ng/ml of platelet-derived growth factor (PDGF)-BB) に変更し、7 日間培養を行った。その後、細胞を trypsin/EDTA にて剥がし、chamber slide 上に播きなおして冷メタノールにて 5 分間固定したものを、抗 Thy1 抗体あるいは抗 desmin 抗体にて染色した。あるいは、trypsin/EDTA にて剥がした後、抗 Thy1 抗体あるいは抗 desmin 抗体にて染色し、Flow cytometer により、陽性細胞の比率を測定した。

7. ネフロン発生領域からの RNA 調製

生後 1 ないし 2 日の SD ラット 30 匹から腎臓を摘出し、液体窒素で即時凍結した。全 60 個の腎臓が集まった段階で、50 mL チューブ 1 本にまとめ、室温で液体窒素を蒸発させた。蒸発と同時に RNA 抽出バッファ 30 mL を添加し、ボルテックスをかけることにより被膜直下のネフロン発生領域から特異的に RNA を抽出した。調製した RNA と、同年齢のラット腎臓全体から抽出した RNA を用いて、suppression subtractive hybridization 法により発現差異のある遺伝子を同定した。

8. puromycin aminonucleoside 腎症モデルの作成と糸球体上皮細胞修復機構の解明

6-8 週令 SD ラットの静脈内に puromycin aminonucleoside 0.01 mg/g BW を単回投与することによりネフローゼモデルを作成した。前述の方法に従い、腎臓を灌流固定した後、パラフィン包埋し、切片を常法に従って in situ hybridization 法による解析に供した。

C. 研究結果

ラット骨髓から採取した細胞懸濁液中には、造血幹細胞・間葉系幹細胞を含む多彩な細胞が存在する。過去に行った骨髓全体の移植実験により、我々は、骨髓細胞中のある分画が、in vivo においてメサンギウム細胞に分化しうることを見いだしていたが、その形質変化を in vitro で確認する必要があると考えた。接着条件・液性因子をコントロールすることにより、骨髓細胞全体からメサンギウム様細胞を高率に得ることが可能

であることを確認した。すなわち、IV型コラーゲンに接着性の骨髄細胞を retinoic acid と PDGF-BB の存在下で培養すると、細胞形態は線維芽細胞様から星型細胞へと変化する。この細胞をメサンギウム細胞のマーカーである desmin と Thy1 で染色すると、約14%の細胞が desmin, Thy1 共陽性であり、形態的にもメサンギウム細胞に合致するものであった。実際に、これらの細胞は angiotensin II に反応して収縮することから、メサンギウム細胞と考えられた。現時点では、IV型コラーゲン、PDGF-BB の存在が重要であると考えられ、実際に、in vivo 環境で PDGF-B を糸球体内に高発現させることにより、骨髄由来細胞がメサンギウム細胞として定着することを確立した。

骨髄細胞からメサンギウム細胞の元となる細胞を簡易調製する方法を樹立した。我々が用いた不織布フィルターは、フィルターを通過させて細胞をトラップさせた後、接着性の弱い分画を逆方向洗浄により回収するという方法で使用する。分化した顆粒球系はフィルターに強固に接着するため、回収されない。ヒト臍帯血中の造血幹細胞を短時間で10倍濃縮することが可能であるが、我々はSP細胞分画として判定しても10倍の濃縮能を有することを明らかにした。骨髄細胞液をフィルター処理するのに要した時間は、5〜10分であった。今回、回収液の量は、細胞の回収率を上げる目的から、一つのフィルターセットあたり30 mL の M-199/2% FCS を用いた。そのため、ラット

個体への移植の前には、遠心操作による細胞濃縮が必要であったが、レシピエントのサイズが大きい場合には、濃縮のための遠心操作は不要である。不織布型細胞分離フィルターで分離回収したドナー骨髄細胞は、レシピエント腎間質のみならず糸球体にも生着し、メサンギウム細胞の形質を発現していた。骨髄移植モデルと同様に、糸球体内に存在する骨髄由来メサンギウム細胞の数は、Thy1 腎炎の誘発により増加した。また、骨髄移植モデルの場合と同様、メサンギウム以外の細胞の形質は確認できなかった。骨髄移植モデルとの最も大きな相違は、骨髄移植ではレシピエントの骨髄破壊の目的で全身 X 線照射を施行したが、フィルター精製細胞の移植では全く X 線を照射しなかった点である。

成熟ラットの腎実質より SP 細胞を単離し、別個体に移植することにより、この細胞が、骨格筋・肝細胞・血液系細胞などに分化しうることを確認した。また、少なくともその一部は骨髄由来であることが明らかとなった。しかしながら、全身投与した場合においても、腎臓への選択的遊走（ホーミング）は認められず、また、メサンギウム細胞・尿細管上皮細胞などへの貢献も認められなかったことから、腎臓中の SP 細胞が腎臓内に存在する腎幹細胞である可能性は否定的と考えられた。

ラット腎臓の発達途上ネフロンおよび未分化組織から選択的に mRNA 群を精製する方法を確立し、ネフロン発生に関与する可

能性のある遺伝子を複数同定した。その中から、レチノイン酸合成酵素 RALDH2 に着目し、糸球体上皮細胞の修復への関与を検討した。この酵素に着目した理由は、胎児・胎仔期のビタミンA欠損が腎臓の発生異常や低形成を生じさせるため、ネフロン再生に関しても重要な機能を担っているのではないかと考えたからである。実際、傷害の程度が最大となり尿蛋白排泄もピークとなる病後5日目を中心として糸球体上皮細胞においてRALDH2が著明に発現誘導され、その産物であるレチノイン酸濃度も上昇していることが示された。レチノイン酸を皮下投与することにより、糸球体上皮細胞の修復が促進され、尿蛋白減少も認められた。すなわち、この動物モデルにおいては、Puromycinにより傷害をうけた糸球体上皮細胞が自己修復を行うが、それに先立ってRALDH2の発現が亢進すること、RALDH2の産物であるレチノイン酸が、糸球体上皮細胞の修復に関与すること、が明らかとなった。

D 考察

他の組織と同様、腎臓においても、生理的にあるいは傷害時には細胞の交代が生じているが、その元となる細胞の本態は不明である。我々は腎臓中のSP細胞が特異的にそれをになっている可能性について検討を行ったが、否定的な結果を得た。しかしながら、正常腎臓における細胞交代のメカニズムを解明することは、再生の戦略を考える上でも重要であることから、ひきつづき異

なった方面から検討を行う必要がある。

骨髄由来細胞の応用に関しては、特に血管構築の再生という観点からは、既に臨床レベルで有用性が証明されており、今後、糸球体の毛細血管再生を目標として、細胞の精製と投与方法を検討する。

ネフロン発生に関わる遺伝子の解析については、DNAチップを用いてさらに包括的な解析を開始しており、糸球体構成細胞の修復促進に関する知見を蓄積できるものと考えている。

E. 結論

ラット骨髄細胞を、メサングウム細胞様の細胞に転換できる方法を確立した。また、骨髄細胞からメサングウム細胞の前駆体となりうる細胞を簡便に精製する方法を樹立した。成熟ラットの腎実質よりSP細胞を単離し、多分化能を有することを証明したが、腎臓に特化した幹細胞ではないことが判明した。ラット腎臓の発達途上ネフロンおよび未分化組織から選択的にmRNA群を精製する方法を確立し、ネフロン発生に関与する遺伝子の検討を行った。その中から、糸球体上皮細胞の修復に関与する重要な分子・機構-特にビタミンA系の関与-を解明した。

F. 健康危険情報

本研究においてはラットを用いた研究を施行している。全て、大阪大学大学院医学系研究科動物倫理委員会において、妥当性・倫理適合性に関する厳正な審査を経て、承

認されたプロトコールのみが遂行されている。したがって、動物倫理上の問題は認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai E, Ito T. Can bone marrow differentiate into renal cells? *Pediatr Nephrol.* 17:790-794, 2002
2. Ito T, Suzuki A, Imai E, Horimoto N, Ohinishi T, Daikuhara Y, Hori M. Tornado extraction: a method to enrich and purify RNA from the nephrogenic zone of the neonatal rat kidney *Kidney Int.* 62:763-769, 2002
3. Ito T. Stem cells on the kidney-where are you from? *Nephrol Dial Transplant* 18: 1-4, 2003
4. Suzuki A, Ito T, Imai E, Yamato M, Iwatani H, Kawachi H, Hori M. Retinoids Regulate the Repairing Process of the Podocytes in Puromycin Aminonucleoside-induced Nephrotic Rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* in press
5. 伊藤孝仁、鈴木朗、岩谷博次、今井圓裕、澄田政哉 腎再生細胞移植療法ー不織布フィルターによる腎再生細胞分離の試み 腎と透析 投稿中
6. 鈴木 朗、伊藤孝仁 腎尿路の発生異常-腎尿路発生の分子メカニズム:腎発生に関する主な分子群 「腎と透析」 54, 2003 in press
7. 伊藤孝仁、岩谷博次、今井圓裕 腎と

幹細胞 *Molecular Medicine* 別冊「再生医学」 中山書店 p191-199, 2003

8. 伊藤孝仁 糸球体腎炎の発症・進展機序解明と分子生物学-糸球体再生医学は可能か-幹細胞を用いた腎再生療法の可能性 「*Nephrology Frontier*」 1: 212-215, 2002

2.学会発表

1. Suzuki A, Ito T, Imai E, Yamato M, Iwatani H, Kawachi H, Hori M. All-trans retinoic acid enhances nephrin expression in the repair process of injured podocytes. *American Society of Nephrology 2002, Philadelphia, PA*
2. Iwatani H, Ito T, Imai E, Suzuki A, Yamato M, Okabe M, Hori M. Differentiation potentials of Hoechst (low) cells that are derived from adult rat kidney. *American Society of Nephrology 2002, Philadelphia, PA*
3. Yamato M, Ito T, Imai E, Suzuki A, Iwatani H, Fujii T, Ohnishi T, Daikuhara Y, Hori M. Tornado extraction: a method to enrich and purify RNA from the nephrogenic zone of the neonatal rat kidney. *American Society of Nephrology 2002, Philadelphia, PA*
4. Ito T, Iwatani H, Imai E, Suzuki A. In vitro conversion of bone marrow cells into mesangial cells. *Keystone Symposia2002-Stem Cells, Keystone CO, USA*

5. Ito T, Iwatani H, Imai E, Suzuki A, Yamato M, Imai E. Properties of side population (SP) cells in the adult rat kidney. Japan-Europe Nephrology Forum 2002, Heidelberg, Germany
 6. Ito T. Tornado extraction: a method to purify RNA from the nephrogenic zone. Seattle Conference on Cardiovascular Development, Disease and Genomics, Seattle, WA
 7. Suzuki A, Ito T, Yamato M, Iwatani H, Kawachi H, Shimizu F, Imai E. Retinoids-dependent repair of podocytes in the puromycin aminonucleoside-induced nephrosis rat. International Podocyte Symposium, Niigata, JAPAN
 8. 「ラット腎臓における時間周期的な遺伝子の発現制御」、倭正也、伊藤孝仁、鈴木朗、岩谷博次、赤木良隆、折田義正、今井圓裕、堀正二、第45回日本腎臓学会総会、大阪
 9. 「傷害糸球体上皮細胞の再分化過程におけるレチノイン酸の関与」鈴木朗、伊藤孝仁、岩谷博次、倭正也、松岡泰子、今井圓裕、堀正二、第45回日本腎臓学会総会、大阪
 10. 「成熟ラット腎臓に存在する幹細胞の由来ならびに分化能について」岩谷博次、伊藤孝仁、鈴木朗、倭正也、堀尾勝、今井圓裕、堀正二、第45回日本腎臓学会総会、大阪
 11. 「腎発生・修復に関する遺伝子群」伊藤孝仁、第45回日本腎臓学会シンポジウム、大阪
 12. 「腎再生療法のための細胞分離フィルター開発」伊藤孝仁、鈴木朗、岩谷博次、今井圓裕、澄田政哉、第1回日本再生医療学会、京都
 13. 「In vitro における骨髄細胞からメセンギウム様細胞への分化誘導」岩谷博次、伊藤孝仁、今井圓裕、鈴木朗、堀正二、第39回日本臨床分子医学会、大阪
 14. 「傷害糸球体回復過程におけるレチノイン酸の関与」鈴木朗、伊藤孝仁、今井圓裕、第3回腎不全病態治療研究会、東京
 15. 「骨髄幹細胞を用いた腎再生の可能性」伊藤孝仁、第3回腎とバイオロジー研究会、東京
- 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

尿細管障害の抑制による腎障害進展阻止及び機能回復

分担研究者 名取泰博 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部部長

研究要旨

近年、腎症の進展に伴って尿細管上皮細胞は線維芽細胞様の性質を獲得することが知られているが、一方我々は、同細胞が細胞内への脂質の蓄積に伴ってマクロファージ様細胞にも変化し得ることを見出している。そこで今回我々は上皮細胞のこの二つの分化転換について、ヒト培養 PTEC を用いて比較検討した結果、両変化の性質は一部重なるものの、異なる変化であることを示した。またマクロファージ様細胞への変化の腎症進展における役割を調べるために、動物モデルを用いて組織学的検討を加えた結果、ヒトで観察されたような尿細管上皮細胞内の脂質の蓄積及びマクロファージマーカーである ED1 抗原の発現や、尿細管管腔内に脂質を蓄積した大型のマクロファージの出現が観察されること、これらの変化は腎症の進展（腎機能の低下）の程度と相関することがわかった。これらの結果を踏まえ、今後この動物モデルを用いて、尿細管間質病変や腎症の進展におけるこの変化の重要性について検討を進める予定である。

A.研究目的

慢性糸球体腎炎における尿細管間質病変は、糸球体病変そのものより予後と良く相関することが古くから知られている。また尿細管間質病変は、糸球体腎炎の進展の結果であるばかりでなく増悪因子としても作用すると考えられており、尿細管間質病変の進展阻止及び機能回復は慢性糸球体腎炎における腎不全阻止に有効な手段となり得ることが示唆されている。

昨年度までの厚生労働科学研究において（課題名：白血球浸潤を標的とした進行性腎障害の進展抑制に関する研究、主任研究

者・名取泰博）、種々の慢性糸球体腎炎患者の尿中には脂質を多量に含んだ大型のマクロファージ様細胞が出現し、その数は腎症の進行速度ならびに非選択的蛋白尿の尿中排泄の程度と有意な相関が認められること、同細胞は腎生検標本にも観察され、その形質的特徴などから、この細胞は浸潤した単球由来ではなく尿細管上皮細胞が形質を変えた結果として生じた可能性があることを示し、さらに培養ヒト尿細管上皮細胞を用いて調べた結果、同細胞は種々の刺激により CD68 抗原やスカベンジャー受容体などのマクロファージのマーカーを発現するよ

うになることを報告した。これらのことから腎症の進展過程において尿細管上皮細胞は脂質の蓄積に伴ってマクロファージ様細胞に変化し、それが尿細管間質病変の進展や、ひいては腎症の増悪を促す可能性を示唆した。

これらの結果を踏まえて本研究では、尿細管間質病変の引き金となる尿細管上皮細胞の障害・活性化の機構の解明と、それを阻止することにより進行性腎障害の進展阻止と機能回復をはかる新しい治療戦略の構築を目的とし、尿細管上皮細胞の形質の変化の分子機構と、腎症の進展における役割について明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

培養ヒト近位尿細管上皮細胞 (PTEC) は Clonetics 社より購入したものを継代して用いた。PTEC を無刺激あるいは EGF、TGF- β で刺激し、4 日後の細胞について ELISA、Western blotting、RT-PCR 法で蛋白、mRNA レベルの発現を解析した。

腎炎動物モデルは WKY 系ラットに抗糸球体基底膜抗体を投与して作製した。細胞内脂質の蓄積は oil red-O 染色により、ED-1 抗原及び DPPIV は間接蛍光抗体法により観察した。

C. 研究結果

培養 PTEC はヒト血清や EGF 処理によりマクロファージのマーカである CD68 抗原やスカベンジャー受容体-タイプ A (SR-A) の発現が増加することを昨年までに報告し

た。一方、近年 TGF- β などの刺激による PTEC の線維芽細胞様細胞への形質転換 (EMT) が注目されている。そこで、我々の見出したマクロファージ様細胞への変化と EMT との比較を行った。無刺激と比較して EGF 刺激では CD68 の蛋白発現の増加が認められたが、TGF- β 刺激では増加しなかった。同様に EGF 刺激では CD68、SR-A の mRNA レベルの増加が認められたが、TGF- β 刺激での増加はなかった。一方 EMT のマーカーとして α -SMA の蛋白、mRNA レベルでの発現は、TGF- β 刺激では増加が認められたが、EGF 刺激での増加しなかった。上皮細胞のマーカーとして、タイトジャンクションの構成蛋白質である occludin の蛋白、mRNA レベルの解析を行ったが、無刺激に比較して EGF および TGF- β 刺激で発現の減少が認められた。以上の結果から、ヒト培養 PTEC のマクロファージ様細胞への形質の変化は EMT と一部重なるものの、異なる変化であることが示唆された。

尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質の変化が、慢性糸球体腎炎における尿細管間質病変においてどのような役割を果たすのかを調べるためには、動物モデルの利用が必須である。そこで我々はラットの進行性の腎炎モデルとして、WKY ラットの馬杉腎炎を用いて組織学的検討を行った。正常腎皮質では、尿細管上皮細胞を含め、細胞内脂質はほとんど観察されないが、腎炎モデルにおいては発症後 2 週目で既に尿細管上皮細胞に oil red-O 陽性の脂質の蓄積が見られ、腎症が進展するに従って oil

red-O 陽性細胞数は増加した。またこの時、oil red-O 陽性細胞の一部がマクロファージのマーカである ED-1 抗原（ヒト CD68 のオルソログと言われる）陽性へと変化することが確認された。また尿細管管腔内にも oil red-O 陽性、ED-1 陽性の細胞が観察され、その細胞数は腎症の進展に伴って増加した。一方、尿細管管腔内の oil red-O 陰性で ED-1 陽性の細胞数は 2 週目までに増加したが、その後は変化せず、oil red-O 陽性、ED-1 陽性の細胞数の動きとは異なることがわかった。また同モデルでは進展に伴って腎機能が低下することから、管腔内の oil red-O 陽性、ED-1 陽性の細胞数は BUN と良く相関するのに対し、oil red-O 陰性、ED-1 陽性の細胞数は BUN と相関しないことがわかった。

D. 考案

近年の多くの研究によって、既に分化した細胞が他の細胞の形質を発現するようになる、いわゆる分化転換 (transdifferentiation) が様々な細胞において起きることが知られている。一方、腎は中間中胚葉由来の組織であり、従って尿細管や糸球体の上皮細胞もその由来は中胚葉であるため、物質の再吸収をつかさどる尿細管上皮細胞が、内胚葉由来で食物由来の物質の吸収を行う消化管の上皮細胞と一部類似した蛋白質を発現するとはいえ、両者の基本的な性質が大きく異なることが考えられる。

1995 年に Neilson らのグループが、尿細管上皮細胞が線維芽細胞様の形質を獲得し

得ることを報告して以来、in vitro 及び in vivo におけるこの変化

(epithelial-mesenchymal transdifferentiation あるいは epithelial-mesenchymal transition, EMT) に関する多くの論文が報告されている。また最近、遺伝子操作を用いた巧みな実験により、マウス腎症モデルにおいて確かに EMT が起きることが証明された。一方、尿細管上皮細胞がマクロファージマーカーを発現するようになることが、ヒト腎症の腎生検サンプルにより示され、またラット糸球体上皮細胞が in vitro の培養系においてマクロファージ様に変化することも報告され、腎の上皮細胞が EMT とは異なる分化転換をする可能性が指摘されている。

今回、我々は上皮細胞のこの二つの分化転換について、ヒト培養 PTEC を用いて比較検討した。その結果、EGF 刺激による PTEC のマクロファージ様細胞への形質変化は、TGF- β による EMT と一部重なるものの、異なる変化であることが示唆された。このことから生体内における病的な状況においても、尿細管上皮細胞は異なる 2 種類の分化転換を行い得る可能性が示され、尿細管間質における炎症や線維化の過程において両者を区別して同細胞の関与を調べる必要があると考えられた。

腎症の進展や、尿細管間質病変の進行過程における尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への変化の意義を調べるために、今回は先ず、ヒト腎症で示唆されたこのような現象が、動物モデルでも起きるかについて検討することにした。この目的のため

に我々はWKYラットを用いた馬杉腎炎を利用することにした。抗糸球体基底膜抗体をWKYラットに投与すると激しい半月体形成性腎炎が惹起されて約1週間後までに尿蛋白の上昇が起き、その後次第に腎機能が低下して、動物は慢性腎不全から死に至る。我々のこれまでの実験から抗体投与後2週目には既に間質の線維化も起き始め、糸球体病変の進展に伴って尿細管間質の変化が進むことがわかっている。そこでこのモデルについて経時的に組織学的検討を加えた結果、ヒトで観察されたような尿細管上皮細胞内の脂質の蓄積及びマクロファージマーカーであるED1抗原の発現が見られ、その程度は経過を追って激しくなることがわかった。またヒト腎症において、尿細管腔内に脂質を蓄積した大型のマクロファージが出現し、その数は腎機能低下の程度と相関することが明らかとなっているが、同じ現象が動物モデルにおいても見られることがわかった。これらの結果を踏まえ、今後この動物モデルを用いて、尿細管間質病変や腎症の進展におけるこの変化の重要性について検討を進める予定である。

E. 結論

尿細管上皮細胞は周囲の状況によって、線維芽細胞様に変化するだけでなく、マクロファージ様の形質も獲得することができ、両者は異なる分化転換と考えられる。またこの変化はヒト腎症ばかりでなく、進行性の糸球体腎炎動物モデルにおいても観察さ

れる。この現象が腎症の進展にどう関わるかを明らかにするとともに、腎障害の進展阻止及び機能回復への新しい方策を開発することが今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

- 1 宮澤しのぶ、堀田 修、名取泰博：ヒト培養尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質転換の可能性. 日本腎臓学会総会、2002年5月、大阪。
- 2 宮澤しのぶ、加藤里奈、堀田 修、名取泰博：ヒト培養尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化 - EMT との比較. 日本腎臓学会総会、2003年5月、東京（予定）。
- 3 加藤里奈、宮澤しのぶ、名取泰博：ラット馬杉腎炎における近位尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化. 日本腎臓学会総会、2003年5月、東京（予定）。

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし