

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

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 西中村 隆一 東京大学医科学研究所客員助教授

研究要旨

カエル及びマウスの系を使って核内因子 Sall1 を単離し、これが腎臓形成に必須であることを示した。海外のグループから Sall1 が腎臓発生異常を呈するヒト疾患の原因遺伝子であることも報告されている。さらに Sall2 の欠失マウスも作成したが腎臓に異常は認められなかった。また Sall1 を指標に腎臓前駆細胞に発現する遺伝子群を系統的に単離しつつある。

A. 研究目的

我々は核内因子 Sall1 を単離しこれが腎臓形成に必須であることを示した。この分子機構を探るとともに Sall1 を指標に腎臓前駆細胞に発現する遺伝子群を系統的に単離する。

B. 研究方法

ノックアウトマウス及び GFP ノックインマウスを作成し、腎臓発生の分子機構を解析すると同時に腎臓前駆細胞を単離する。  
(倫理面への配慮)

ヒトサンプルは当面使用しない。動物実験は東京大学医科学研究所の規定に従って行った。

C. 研究結果

Sall2 ノックアウトマウスを作成したが腎臓症状はなかった。また Sall1 の 遺伝子座に GFP をノックインしたマウスから腎臓間葉細胞を単離しマイクロアレイによる解析を行った。現在これらの候補から発現パター

ンで絞り込みを行っている。

D. 考察

Sall ファミリーによる代償の可能性があり、Sall3, 4 のノックアウトの作成及び交配が必要である。GFP マウスとマイクロアレイの組み合わせは予想以上に有効であった。

E. 結論

Sall1 は腎臓形成に必須であり、その分子機構を解明することが必要である。また遺伝子改変マウスを使って新たな候補遺伝子の単離が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., Nishinakamura, R. Zinc-finger protein Sall2 is not essential

for embryonic and kidney development.

Mol. Cell Biol. 23, 62-69, 2003

2. Osafune, K., Nishinakamura, R.,  
Komazaki, S., Asashima, M. In vitro  
induction of the pronephric duct in  
Xenopus explants. Dev. Growth Differ. 44,  
161-167, 2002

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 菱川慶一 東京大学大学院医学系研究科助教授

研究要旨

平成14年度は腎臓由来体生幹細胞の候補であるいわゆる SP 細胞を成熟マウス腎臓から分離し、さらに各種腎不全モデルマウスでの検討を行った。これまで骨格筋や骨髄で SP 細胞の存在が報告されているが、腎臓での明確な報告はなく、腎不全モデルでの検討は全く存在しない。SP 細胞の多分化能および腎不全モデルマウス SP 細胞の機能解析は DNA マイクロアレイを用いて、包括的に行った。今後はアレイ数を 3800 から 15000 に増やし、より包括的な情報を集める予定である。

A.研究目的

本年度の第一の目的は成熟マウスの SP 細胞の機能をマイクロアレイにより包括的に解析することにある。さらに SP 細胞はヘテロな細胞集団として分離されているが、今後は細かい分画での検討、クロナールな検討を進める。これにより、腎臓由来 SP 細胞が腎臓再生へ向けた体性幹細胞としての可能性があるか、検証可能となる。SP 細胞の腎臓再生への可能性が明らかとなれば、腎不全患者自身から採取可能であり、臨床応用への端緒が開かれることになる。

B.研究方法

腎臓組織を細かく刻み、コラゲナーゼ処理にて細胞分散液を作成する。その後、Hoechst33342 で 90 分間ラベルし、UV laesr FACS により SP 細胞を分取する。分取した SP 細胞より RNA 抽出後、cRNA 増幅法を

用い、cy3, cy5 にラベリングを施す。ラベル後、3800 遺伝子の合成オリゴを配置したガラスアレイとハイブリさせ、GenePIX4000 にて解析を行った。（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。

C. 研究結果

これまでコントロールとしての ddY、ICR 系統の成熟マウス腎臓より SP 細胞を分離する方法を確立した。さらに IgA 腎症モデル(HIGA マウス)、ネフローゼモデル(ICGN マウス)での検討では、コントロール同様の population を持っており、腎不全状態においても SP 細胞が欠失していない事が示唆された。またマイクロアレイ解析では、

これまで SP 細胞の特徴として報告されている BCRP1 が高発現している他、10 数の遺伝子が腎臓組織全体と比較して高発現している事が確認された。

#### D 考察

これまでのマイクロアレイ解析で SP 細胞に特徴的な遺伝子発現パターンが明らかとなり、BCRP1 以外にも SP 細胞の性質を規定する遺伝子の存在が考えられた。また、HIGA や ICGN でも SP 細胞が存在している事より、SP 細胞が腎不全状態で機能不全に陥っている可能性が示唆された。

#### E. 結論

腎内には他の臓器で幹細胞と考えられているいわゆる SP 細胞が存在し、腎不全状態ではこの細胞が存在はするが、機能不全となっている可能性が示唆された。

#### 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、熱可逆性ハイドロゲルを用いた腎臓再生の可能性

第25回 日本高血圧学会総会、2002  
東京

2、腎臓由来体性幹細胞による腎臓再生

第25回 日本高血圧学会総会、2002  
東京

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Journal of the American Society of Nephrology	13 (6)	1455-63	2002
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	91 (4)	710-8	2002
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	40 (6)	934-9	2002
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.	American Journal of Human Genetics	70 (3)	781-6	2002
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 International	61 (S1)	S94-8	2002
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.	Journal of Human Genetics	47 (10)	532-8	2002
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 International	61 (5)	1853-8	2002
Ito T, Suzuki A, Imai E, Horimoto N, Ohnishi T, Daikuhara Y, Hori M	Tornado extraction: a method to enrich and purify RNA from the nephrogenic zone of the neonatal rat kidney	Kidney International	62 (3)	763-9	2002
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 International	62 (3)	780-9	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 International	62 (3)	980-5	2002
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.	Hypertension Research	25	831-6	2002
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.	Journal of the American Society of Nephrology	13 (8)	1992-8	2002
Okado T, Terada Y, Tanaka H, Inoshita S, Nakao A, Sasaki S.	Smad7 mediates transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis in mesangial cells.	Kidney International	62 (4)	1178-86	2002
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 International	62 (6)	1966-76	2002
Imai E, Ito T	Can bone marrow differentiate into renal cells?	Pediatrics Nephrology	17 (10)	790-4	2002
Z. L. Ou, O. Hotta, Yu. Natori, H. Sugai, Y. Taguma, Y. Natori	Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in progressive IgA nephropathy	Nephron	91 (2)	262-9	2002
Osafune, K., Nishinakamura, R., Komazaki, S., Asashima, M	In vitro induction of the pronephric duct in Xenopus explants.	Development Growth and Differentiation	44 (2)	161-7	2002
Imasawa T, Utsunomiya Y	Stem cells in renal biology: bone marrow transplantation for the treatment of IgA nephropathy.	Experimental Nephrology	10 (1)	51-8	2002
Takase O, Hirahashi J, Takayanagi A, Chikaraishi A, Marumo T, Ozawa Y, Hayashi M, Shimizu N, Saruta T	Gene transfer of truncated I $\kappa$ B prevents tubulointerstitial injury.	Kidney International	63 (2)	501-13	2003
Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., Nishinakamura, R.	Zinc-finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development.	Molecular and Cellular Biology	23 (1)	62-9	2003

20020736

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.43- P.44の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。