

20030823

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 松彦

平成 16 年（2004 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. ヒト間葉系幹細胞を用いた腎臓遺伝子治療法の開発	27
川村 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別冊	33

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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。この目的を達成するため、本年度も引き続き、①進行性腎障害の進行抑止を目的とする進行および抑制因子の同定、②腎機能回復・再生のための幹細胞同定と分化誘導・再生因子探索を行なった。進行性腎障害進行促進・抑制因子の同定では、先ず、遺伝因子解析を行い、IgA腎症に関連する遺伝子座位を決定するとともに、幾つかの関連遺伝子を明らかとした。また、腎障害の進行因子として、尿細管細胞NFκB活性化に関連する幾つかの物質を同定するとともに、尿細管細胞のマクロファージ様細胞への形質変換が重要であることを示した。腎機能回復・再生のための幹細胞として、骨髄間葉系幹細胞、腎に内在するSP細胞と、ES細胞の可能性を、各々検討した。骨髄間葉系幹細胞は、胎児腎に注入すると、後腎まで発達し、組み込んだ遺伝子を発現することが確認され、幹細胞による遺伝性腎疾患治療への道が示された。SP細胞が幹細胞関連遺伝子を発現し、その腎臓内投与はある種の急性腎不全モデルの回復を早めることを明らかとし、また、ES細胞は、その培養条件により、尿細管、糸球体特異遺伝子を発現し、尿細管様構造を形成することが示された。さらに、腎機能回復・再生のための分化誘導・再生因子として、MTF-1、の有用性と、Sall1、LIF、Ets1がいずれも重要な因子であることが示された。

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
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

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肢となるが、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】

1 IgA 腎症進行における遺伝因子の同定
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、下記の倫理的配慮のもと、末梢血白血球からゲノム DNA を抽出し、保存した。本年度は、IgA 腎症 370 例を含む約 1,300 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; Fc α R、Fca 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および約 30 個の一塩基多型 (SNP、single nucleotide polymorphism) の解析を行った。

2 間質障害進行因子の同定

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である、アルブミン負荷ラットでは、変異 I κ B 組み込みアデノウィ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 κ B による尿細管での NF κ 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、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、前年度に引き続き、以下の検討を行なった。

本研究においては、細胞内情報伝達物質として中心的役割を果たす Nuclear factor κ B (NF κ 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 κ Bは、p65、p50、I κ Bの3分子から構成され、I κ 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 κ 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 κ B (I κ B Δ 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ィルスに組み込むことにより、尿細管での特異的なNF κ B抑制を行った。

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 κ B組み込みアデノウィルス (AdexI κ B Δ N)、LacZ組み込みアデノウィルス (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。

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。アデノウィルスを投与した後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・蛋白発現の差異を検討するために、アデノウィルスまたは生理食塩水投与後、7日目で腎臓を採取し、totalRNA、皮質蛋白を採取した。昨年度、Clontech社のmicroarrayを用いた検討でclusterinが間質障害防御因子として想定されたことから、この蛋白・mRNA発現の変化について、検討を加えた。

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+AdexI κ B Δ N 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。また、同様のモデル動物において、腎障害進行において重要な役割を果たすことが知られているレニン・アンジオテンシン系の役割を明らかにするため、その各因子、レニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、アンジオテンシン変換酵素、アンジオテンシン変換酵素2型の各因子発現を検討した。

間質障害において、尿細管細胞のマクロファージ様細胞への形質変換がその進行に関わることから、この形質変換機序を解明した。正常ラット腎より近位尿細管を無菌的に単離し、0.5%ウシ胎児血清添加DMEM/F12培地に様々な濃度の正常ラット血清を添加して培養した。各種抗原の発現は免疫染色、Western blotting、RT-PCR法にて解析した。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、各種抗原の発現は直接または間接蛍光抗体法により観察した。

【腎機能回復・再生のための幹細胞同定と分化誘導・再生因子探索】

I 腎機能回復・再生のための幹細胞同定

1 腎SP細胞の同定と腎再生への応用

Side population (SP)細胞は種々の臓器に存在し、血球系を始めとして種々の細胞に分化する多分化能を有することが示されている。そこで、腎におけるSP細胞の臓器再生における有用性を検証するため以下の実験を行なった。腎臓組織を細断後、コラゲナーゼ処理にて細胞分散液を作成した。その後、Hoechst33342で90分間ラベルし、

UV laser FACS により SP 細胞を分取し、同細胞より RNA 抽出を行った。その後、cRNA 増幅法を用い、cy3、cy5 にラベリングを施し、3800 遺伝子の合成オリゴを配置したガラスアレイと hybridization を行い、GenePIX4000 にて解析を行った。3次元培養は type I collagen ゲルを用い、低濃度の LIF(10ng/ml)存在下で21日培養後、マイクロアレイ解析により多系譜への分化を検討した。

2 ES 細胞の腎臓への分化誘導

マウス ES 細胞を用いての腎細胞の再生分化を目標としている。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、上皮細胞の分化誘導を目指した。マウス ES 細胞を hanging drop 法で、EB(embryoid 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 Nephronin、Podocin、Podocalyxin、Podoplanin を発現することを検討した。次いで、尿細管細胞への分化の可能性を検討した。腎胎生期に発現する Wnt-4 を ES 細胞に発現し、HGF と Activin を EB 細胞の培養液中に添加した。尿細管細胞のマーカーである aquaporin1、KAP(kidney androgen binding protein)、Tamm Horsfall protein の mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて、検討した。また3次元ゲルを用いた培養法にて尿細管様の構造物の形成を検討した。

3 骨髄間葉系幹細胞を用いた腎臓再生と、腎臓への遺伝子移入法の開発

これまでの検討から、単に幹細胞を腎内に投与した場合の腎臓再生は非常に限定された範囲に留まることから、何らかの分化

誘導因子を同時に腎内で発現させる必要がある。一方、哺乳動物の腎臓は後腎組織より発達するが、発生段階において中腎管周囲の間葉系幹細胞が凝縮し、中腎管から発芽する尿管芽と相互に働き合うことにより後腎組織が形成され、この相互作用には時間的空間的にプログラムされた多種多様の増殖因子や転写因子が関与している。しかしすべての因子がどのタイミングで作用しているか明らかになっていないわけではなく、少なくとも現時点では *in vitro* において間葉系幹細胞から腎臓まで分化させることは不可能である。そこで、外来の間葉系幹細胞を中腎管の発芽する部位に注入することで、発生段階と全く同じ環境下に置くことを試み、間葉系幹細胞の分化能を検証した。

この研究を展開するにあたり、犬やサルなどの大動物では数的経済的に難しく、また腎臓の発生過程が詳細に分かっている大動物がないため、まずラット及びマウスでの実験系の確立が必要となる。しかしこれらの動物では尿管芽の発芽の時期（それぞれ E11.5、E9.5）に間葉系幹細胞注入のために子宮を開いて胎児を取り出した場合、再度子宮にもどして妊娠を継続させることは不可能である。したがってまず体外で子宮内と同様の環境を作り出し発育を継続させるシステムの開発を行った。プログラミングされた高濃度の酸素を持続的に試験管内に供給できる特殊培養装置を導入し、E11.5 で取り出したラット胎児を試験管内で全胎培養を行った。条件設定を適正化することにより、後腎原器が形成される時期まで、子宮外で胎児を成長させることが可能か検証した。この胎児より後腎原器を取り出し引き続き器官培養を6日間行い、さ

らに腎臓を成熟させることが可能か確認を行った。このリレーカルチャー法により、尿管芽が発芽する前の stage から、細かく branching し tubulogenesis が完成された成熟腎臓を形成するまで子宮外で維持できることを c-ret を用いた in situ hybridization 及び組織染色にて確認した。

尿管芽が発芽する直前より周囲の間葉系幹細胞は Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) を発現し、そのレセプター (c-ret) を発現する尿管芽を引き込むことが後腎発生の重要なステップであることが明らかとなっているため、注入する細胞に一過性に GDNF を発現させる目的で GDNF 発現アデノウイルスの作成を行った。このアデノウイルスは間葉系幹細胞に一過性に GDNF を強発現させることをウエスタンブロット法にて確認した。

ヒト間葉系幹細胞に作成したアデノウイルスを用いて GDNF を強発現させた。さらに注入した間葉系幹細胞が分化した後もレシピエントの細胞と区別できるようにレトロウイルスを用いて LacZ 遺伝子を持続発現させた。また注入した細胞動態を生きのまま確認する目的で Dil を用いた蛍光染色を行った。この遺伝子改変間葉系幹細胞を mouth pipette を用いて E11.5 で取り出したラット胎児の尿管芽発芽部位に microinjection 行った。(尿管芽発芽部位はこれまで c-ret を用いた whole mount in situ hybridization によって確認済みである。) 胎児は直ちに全胎培養器にて 4 8 時間培養し、成長した胎児より後腎原器を取り出し引き続き 6 日間器官培養を行った。臓器培養中は経時的に蛍光顕微鏡下にて、Dil で染色された注入後のドナー細胞の移動、分裂の経

過を観察した。リレーカルチャーが終了したら X-gal assay を行い、注入した間葉系幹細胞が腎臓構成細胞 (糸球体上皮細胞、尿管上皮細胞、間質細胞) に分化しているか確認した。また WT-1 と β -galactosidase の蛍光 2 重染色を行い、糸球体上皮細胞の同定を行った。さらに連続切片を解析することにより、それぞれのドナー細胞由来腎臓構成細胞がネフロンを形成した形で分化しているか確認した。

骨髄由来血管内皮前駆細胞の腎障害修復効果を検討した。ラット骨髄より骨髄細胞を採取後、単球を分離し、VEGF などの分化誘導因子を含有する培地で 7 日間培養した。得られた細胞を、抗 Thy1.1 抗体一回投与急性腎炎モデル動物の腎動脈より注入し、その回復過程に及ぼす効果を腎組織にて検討した。

II 腎機能回復・再生のための分化誘導・再生因子探索

1 急性腎不全回復に関与する分化・誘導因子の検索

急性腎不全では、一度廃絶した腎機能が回復をみせ、実際に尿管細胞が再生すると考えられている。そこで、急性腎不全回復に必要な因子を、幹細胞による腎臓再生療法に補助的に用いるため、ラットの虚血再灌流モデルにおいて種々の分化・発達因子の変化を検討した。

Sprague-Dawley rat を用い、開腹後、両側腎動脈を 45 分間クランプした後開放、経時的に屠殺して、腎臓を採取、免疫組織学的検討および蛋白、mRNA 発現量の変化を検討した。

2 腎臓発生に関与する分化・誘導因子の検索

昨年度の検討より、後腎組織の分化促進因子として MTF-1 を同定した。本年度は、この蛋白の活性部位を同定すべく以下の検討を行った。。

MTF-1 の N 末端から、10、20、40 のアミノ酸残基を欠損する変異蛋白をコードする発現ベクターを各々作成し、reticulo lysate 系により蛋白を合成した。得られた蛋白を用いて、胎生 12 日のマウス胎仔後腎を摘出し既報のごとく組織培養を行った。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。

日本 SLC より野生型 Sprague-Dawley (SD) ラットを購入し、SPF 環境で飼育した。飲水は自由、食餌は自由摂取または時間制限給餌とし、朝 8 時に点灯、夜 8 時に消灯するサイクルにおいて飼育した。その後、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。

ネフロン発生領域からの RNA を調製するために、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 (Trizol™) 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、DNA

chip 法により発現遺伝子を包括的に同定した。

puromycin aminonucleoside 腎症モデルを作成し RNA を採取するために以下の検討を行った。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。篩法により糸球体を単離し、RNA 抽出バッファ (Trizol™) を用いて RNA を抽出した。調製した RNA と同年齢の正常ラットから得た糸球体由来の RNA を用いて、DNA chip 法により発現遺伝子を包括的に同定した。

上記によって得た遺伝子プロフィールにおいて、それぞれのセットで対照に比較して 2 倍以上の差異発現を示した遺伝子を選択し、腎発生時および糸球体傷害回復過程の両方で変動を示した遺伝子を抽出した。

また、以前より検討を続けている、Sall1 についてもさらにその上流に存在する遺伝子同定を行った。胎生期腎臓において、Sall1 は間葉細胞や S 字体、尿細管、糸球体など間葉系由来の組織に強く発現している。新規腎間葉系遺伝子を探索するために、Sall1 の遺伝子座に GFP をノックインした Sall1-GFP ノックインマウスを作製し、FACS を用いてその胎生期腎臓より GFP 陽性な細胞集団を単離した。この RNA を用いてマイクロアレイで 36000 個の遺伝子について網羅的検索を行った。

(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。

臨床検体に関しては、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 文部科学省・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、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

【腎障害進行促進・抑制因子の同定】

1 IgA 腎症進行における遺伝因子の同定

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 (Fc α R)、アジアロ糖蛋白受容体 (ASGPR; asialoglycoprotein receptor) の 3 種が、従来から知られていた。これらの遺伝子のうち、その多型が IgA 腎症の発症と関連するものは、pIgR のみであることは既に報告したが、他施設からの症例を解析したゲノムワイドな SNP による関連解析でも同様に pIgR に本症との関連が見られた。

最近、第 4 の IgA 分子受容体として、トランスフェリン受容体 (TfR; Transferrin receptor) が同定され、その発現が IgA 腎症患者の糸球体で亢進し、しかもそれが病的な IgA 免疫複合体の受容体として機能している可能性が報告されている (Moura et al. J

Exp Med, 2001; Monteiro et al. Trend Mol Med 2002 他)。そこで、TfR の発現に影響すると考えられる 5' 上流プロモーター領域に 3 カ所の遺伝子多型を同定し、IgA 腎症と、非 IgA 腎症で遺伝子型頻度に差があるか否かを検討したが、差を認めなかった。

東京大学医科学研究所 (中村祐輔教授ら) を中心としたプロジェクト (JSNP; <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>) に関し、同意が得られた IgA 腎症症例の DNA を提供した。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、HLA-DRA 遺伝子、および前述の pIgR が、IgA 腎症の候補遺伝子として同定された。

Lifton らが報告した家族性 IgA 腎症責任候補遺伝子領域 (IGAN1, 6q22-23; Nature Genet, 26:354, 2000) は、その後の追試や機能的な解析がなく、日本人での検討もないことから、日本人の孤発例を含む集団で、同じマーカを用いて関連解析を行った。結果、Lifton らの報告と全く同じマイクロサテライトマーカ (D6S1040) に患者群と健常人の差のピークを認めた。しかも、IgA の沈着が無いことを確認した非 IgA 腎炎の群を対照とした解析でも同様の結果であった。

この周辺にさらに詳細な間隔でマーカを設定して解析したが、有意な差を認めるマーカは同定できなかった。また前述の JSNP でもこの領域に関しては有用な SNP 情報はない。そこでこの D6S1040 を挟む約 1000Kb の領域に 30 個の SNP を設定し、IgA 腎症 358 名と健常人 351 名でこの領域のハプロタイプ解析を行った。結果、日本人ではこの領域には約 5 個の連鎖不平衡を示す領域 (ハプロタイプブロック) を含むこと、

これらのうち、最もセントロメア側に位置するブロックに有意な関連を認めた。この位置には機能未知の遺伝子があり、現在のこの遺伝子の発現と機能を解析している。

2 間質障害進行因子の同定

腹腔内アルブミン負荷ラットにおいて、*dominant negative type* の $I\kappa B$ を adenovirus により発現した腎臓と、対照として、Lac Z を発現する adenovirus を投与した腎臓を用いて、microarray により発現遺伝子の差異を検討した。その結果、 $NF\kappa B$ を阻害した腎臓において、対照の腎臓に比べ増加している遺伝子、すなわち、防御因子として働くと考えられる遺伝子として *clusterin* を同定した。この *clusterin* は、腹腔内アルブミン投与により増加を示し、さらに、 $NF\kappa B$ 阻害によりさらに増加することを、腎臓より採取した RNA を用いた RT-PCR 法により確認した。この増加は、蛋白レベルでも認められた。*Clusterin* は apoptosis 抑制作用を持つことから、腎の apoptosis を検討したところ、 $NF\kappa B$ の阻害を行った腎では、有意の apoptosis 減少が認められた。

一方、腎障害進行において重要な役割を果たすことが知られているレニン・アンジオテンシン系の役割を明らかとするため、その各因子、レニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン I、アンジオテンシン II、アンジオテンシン変換酵素、アンジオテンシン変換酵素 2 型の各因子発現を検討した。その結果、腹腔内アルブミン投与により、腎でのアンジオテンシノーゲン発現が有意に増加し、蛋白レベルでは、アンジオテンシノーゲンに加え、アンジオテンシン I、II ともに増加することが示された。さらに、 $NF\kappa B$ 阻害はこれらの増加を

抑制していた。また、アルブミン負荷対照ラットでは、無処置の対照に比べ、アンジオテンシン I、II を代謝するアンジオテンシン変換酵素 2 型が減少し、 $NF\kappa B$ 阻害はこの減少を防ぐことが示された。

間質障害において、尿細管細胞のマクロファージ様細胞への形質変換がその進行に関わることから、この形質変換機序を解明した。まず、PTEC のマクロファージ様細胞への変化を観察するマーカーとして、ED-1 モノクローナル抗体 (抗 CD68 抗体) 以外にスカベンジャー受容体 A (SR-A) に対する抗体に対する反応性について、腎炎動物モデルを用いて検討した。その結果、正常ラット腎では抗 SR-A 抗体は間質にわずかに存在するマクロファージに反応するのみであるのに対し、腎炎モデルラットでは間質に多数浸潤したマクロファージに加え、*peritubular capillary* 及び PTEC の一部に反応することがわかった。また腎炎モデルにおいて、SR-A 陽性の PTEC は ED-1 陽性 PTEC よりその数が多かった。

ラット腎より単離した近位尿細管は管状の構造を有し、*megalin*、*cubilin* を高発現していた。これを 37℃ にて培養すると、尿細管がシャーレに付着し、敷石状の形態を示す細胞の *outgrowth* が観察された。これらの細胞は PTEC 刷子縁膜の酵素であるジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) 陽性であり、PTEC 由来であることが確認された。

培養初日から 5% ラット血清を添加すると、ほとんど全ての細胞に *oil red-O* 染色で陽性の脂質の蓄積が観察された。またその一部はマクロファージのマーカー抗体である ED-1 (抗 CD68 抗体) や抗スカベンジャー受容体 A (SR-A) 抗体により染色された。

両者を比較すると、SR-A 陽性細胞の方が多く観察され、動物モデルの結果と一致した。ラット血清を添加しない場合にも CD68 や SR-A の発現が見られたが、その数は血清添加に比べて少なかった。

そこで次に、これらの細胞が尿細管上皮細胞由来であるかどうかを調べるために、上皮細胞のマーカであるサイトケラチンに対する抗体との二重染色を行った。その結果、SR-A 陽性の細胞を含めたほとんど全ての細胞がサイトケラチン陽性であったことから、上皮細胞が培養中に SR-A や CD68 陽性と変化することが確認された。但し、SR-A 陽性の細胞の一部は抗サイトケラチン抗体での染色が弱く、また同様の現象は、DPPIV に対する抗体を用いた場合にも認められたことから、同細胞がマクロファージ抗原を発現するように変化する過程で、上皮細胞のマーカ発現が低下することが示唆された。

この培養を1週間程度続けると、細胞の一部が培養液に浮遊することが観察された。そこでこれらの細胞を集めて免疫染色を行ったところ、その多くが SR-A 陽性であり、またその一部は ED-1 陽性であることがわかった。またこれらの細胞にも oil red-O で染色される脂質の蓄積が観察された。これらの結果から、培養系で観察されたこの浮遊細胞は、in vivo において尿細管管腔内や尿中に観察される oil red-O 陽性、CD68 陽性の細胞に対応するものと考えられた。

最後に、これらの現象が mRNA レベルでも見られるかどうかを調べるために、付着細胞及び浮遊した細胞からそれぞれ RNA 画分を調製し、CD68 及び SR-A の mRNA レベルを測定した。その結果、両細胞画分

においてこれら二種の mRNA レベルの発現増加が観察され、特に浮遊細胞で顕著であった。また培養液中のラット血清濃度を 0%、2%、5% と変化させると両 mRNA レベルがラット血清濃度依存的に増加したことから、これらの発現増加がラット血清によって誘導されることが確認された。一方、上皮細胞のマーカである E-cadherin の発現は、付着細胞では若干増加し、浮遊細胞は培養前とほぼ同レベルであった。

【腎機能回復・再生のための幹細胞同定と分化誘導・再生因子探索】

I 腎機能回復・再生のための幹細胞同定

1 腎 SP 細胞の同定と腎再生への応用

腎内に内在する幹細胞として、SP 細胞に注目した。コントロールとしての ddY、ICR 系統成熟マウス、IgA 腎症モデル (HIGA マウス)、ネフローゼモデル (ICGN マウス) での検討により、以下の結果が確認された。慢性腎不全において腎臓 SP 細胞は減少するものの、骨髄等他の臓器に比してその比率は、多く存在している。腎不全における腎臓 SP 細胞において、腎臓発生関連、幹細胞関連遺伝子のみならず包括的遺伝子発現レベルが亢進しており、SP 細胞は腎不全により形質は変化していないことが示された。

さらに、3 次元培養を行ったところ、形態的にも機能的にも、腎臓 SP 細胞は多系譜へ分化することが明らかとなった。一方、腎臓 SP 細胞には *musculin*、CD63 が特異的に高発現していることが示された。

そこで、細胞療法の可能性を検討するため、*cisplatin* による急性腎不全モデルラットに、FACS により採取した SP 細胞を投与した。その結果、SP 細胞投与ラットでは、有意の急性腎不全からの回復促進が見られ、

細胞療法の有用性を示唆する結果であった。

2 ES細胞の腎臓への分化誘導

マウス ES 細胞を出発点として、糸球体上皮細胞の分化誘導を行った。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、上皮細胞のマーカーである nephrin、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、nephrin、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、nephrin、podocin が Western blot で陽性となった。また共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析でも EB 細胞由来の上皮様細胞に nephrin、podocin、podocalyxine、podoplanin の染色が確認された。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。次に尿細管細胞への分化の可能性を検討した。腎胎生期に発現する Wnt-4 を ES 細胞に発現し、HGF と activin を EB 細胞の培養中添加したところ、遠位尿細管細胞のマーカーである aquaporin2 発現が RT-PCR 法と Western blot にて確認された。また 3 次元ゲルを用いた培養法にて尿細管様の構造物の形成を認め、aquaporin2 の mRNA が発現していた。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。

3 骨髄間葉系幹細胞を用いた腎臓再生と、腎臓への遺伝子移入法の開発

E11.5 妊娠ラットから取り出した胎児を、全胎培養機中の培養ボトル内で 48 時間培養したところ、E13 ラットとほぼ同程度まで成長しうることが確認された。この時期には尿管芽の発芽が始まっているため、この胎児より腎臓原器を採取しさらに 6 日間後腎器官培養を続けた。培養後の後腎組織は H-E 染色により tubulogenesis の完成が確認され、また c-ret を用いた in situ hybridization によってこの連続培養の間に尿管芽が細かく branching を繰り返していることが確認された。これらの所見は後腎の器官形成が進行したことを示す。そこで前述のように遺伝子改変したヒト間葉系幹細胞を E11.5 ラットの発芽部位に microinjection を行い連続培養を行った。器官培養中の移植細胞の動態を蛍光顕微鏡にて確認したところ、移植細胞は腎臓原器の中央方向に移動しながら分裂を繰り返していることが確認された。この細胞が腎臓細胞に分化していることを確認するため、X-gal assay 後、組織学的に検討したところ、lacZ 陽性細胞が腎臓原器内に広く散在し、形態的に一部が尿管上皮細胞、糸球体上皮細胞、間質細胞に分化しており、WT-1 を用いた蛍光二重染色によってこれらの一部は podocyte であることが確認された。連続切片を細かく解析することにより、これらのそれぞれの腎臓構成細胞はネフロンの一部を形成していることが確認された。

骨髄由来血管内皮前駆細胞を腎動脈より投与したところ、糸球体内に生着した。抗 Thy1.1 抗体投与腎炎ラットにおいて腎組織を経時的に検討したところ、骨髄由来血管内皮前駆細胞投与側で糸球体障害の回復促進効果が認められた。生着した骨髄由来血

管内皮前駆細胞は、1系球体あたり数個と少なく、細胞自体が修復に関与したというよりは、投与した細胞から分泌される成長因子などが有効であった可能性があり、その点について検討中である。

II 腎機能回復・再生のための分化誘導・再生因子探索

1 急性腎不全回復に関与する分化・誘導因子の検索

虚血・再灌流後、1日目の腎臓から抽出したRNAを用いて、腎臓などの臓器の分化・発生に重要と考えられている幾つかの遺伝子について、PCR法により検討を加えた。これまでに急性腎不全回復に関与することが示されているPax-2、Wnt-4などに加え、leukemia inhibitory factor (LIF)が著増することが示された。そこで、この蛋白に着目して、さらに、免疫組織学的検討を行い、生体腎では、集合管に発現し、その受容体も同様に集合管に発現していることが示された。急性腎不全では、LIFのmRNAは虚血・再灌流後1日目から増加するのに対し、LIF受容体は4日目から増加を示し、両者に時相のずれがあることが示された。さらに、免疫組織では、正常腎と異なり、近位尿細管、特に急性腎不全において障害を受けるS3部に強く両者の発現が認められた。培養細胞において、ATP欠乏を起こすと、細胞障害を生じ、この障害は急性腎不全における虚血による障害と近似するが、この状態でもLIF発現は亢進し、細胞障害からの回復に何らかの役割を果たすことが示された。

また、虚血・再灌流後、Ets-1も増加することが示された。このEts-1の発現をWestern blotおよびreal-time PCR法にて検出

したところ、Ets-1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、cyclin D1およびcyclin Aの発現は12~24時間とEts-1の発現より遅い時相で生じた。またEts-1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。対照ラットでは皮質、髄質ともに、Ets-1は発現しないが、再灌流12時間後では、皮質で、尿細管にEts-1の発現が認められた。Ets-1の発現する細胞の同定を行うために、近位尿細管の指標であるaquaporin1とEts-1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Ets-1が発現していることがわかった。またEts-1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。Ets-1の発現細胞は、PCNAも発現しており、Ets-1発現細胞が細胞分裂を起こしていることがわかった。さらにEts-1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Ets-1とアデノウイルス法にて、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、Ets-1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Ets-1を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、Ets-1を強制発現するとcyclin D1のpromoter活性は2.5倍に上昇した。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。

2 腎臓発生に関与する分化・誘導因子の検索

MTF-1 の N 末 10、20 アミノ酸を各々欠損した蛋白は、正常の MTF-1 と同様の後腎組織における分化誘導能を示した。一方、N 末 40 アミノ酸を欠損した MTF-1 変異蛋白はもはや分化誘導能を示さず、この N 末から 20~40 アミノ酸の間に活性中心が存在することが示唆された。

7 日令の SD ラットを 12 時間明期・12 時間暗期で飼育し、一方のグループは朝 8 時に、もう一方のグループは夜 8 時に BrdU の腹腔内投与により増殖細胞をラベルした。4 週間後に腎臓組織を用いて BrdU の存在を免疫染色により同定した。朝 8 時にラベルした群では、腎皮質および皮髄境界部分に位置する多くの尿細管上皮細胞が取り込み陽性であったが、夜 8 時にラベルした群では、取り込み細胞はほとんど観察されなかった。糸球体細胞では、ラベル時間によらず取り込みが認められた。これは、ネフロンの特定の部位は、同期して細胞増殖を行っていることを意味する。

3 週令 SD ラットを同様に 12 時間明期・12 時間暗期で飼育し、11 日間、一方のグループは暗期のみで給餌し、もう一方のグループは明期のみで給餌した。それぞれのグループのラットをさらに 4 群にわけ、それぞれ朝 8 時、昼 2 時、夜 8 時、夜 2 時に BrdU の腹腔内投与を行った (total 8 groups)。明期に給餌したラットでは BrdU 取り込みの日内変動は消失した。時計遺伝子 *Per1*、*Per2* の発現量をノザンプロットにより検討したところ、糸球体および尿細管上皮ともに概日リズムにしたがって発現変動を示し、暗期給餌では夜 8 時に最大発現を示すことが明らかとなった。一方、明期給餌では発現の明らかなピークが認められなかった。す

なわち、時計遺伝子の時間変動と尿細管上皮細胞が同調して細胞増殖する特性とは並列的なものであることが明らかとなった。

成熟したネフロンよりも発生過程のネフロンに高発現し、かつ PAN 腎症 5 日目に発現量が亢進している分子を調べたところ、46 個の既知遺伝子と 51 個の未同定 EST クローンが得られた。さらに個々の分子について検討を行い、受容体、増殖因子およびその関連分子を中心に現在解析中である。また、本法を通じて、癌転移に関与することが知られている新しい細胞接着因子、*Necl* (Nectin like)-2 が、発生初期の尿細管上皮細胞の細胞間部分に発現していること、虚血尿細管上皮細胞傷害の回復過程において発現上昇すること、を見いだしている。これらのうち一部の分子については、抗体を作成しヒト組織においてもラット同様の発現を示していることを確認した。

また、*Sall1*-GFP ノックインマウスのマイクロアレイ解析から得られた候補遺伝子について *in situ hybridization* を用いて胎生期腎臓におけるその発現パターンを解析した。その結果 *Sall1* や *GDNF*、*Pax8*、*FoxD1* など腎臓発生に必須な既知の遺伝子や、*Raldh2*、*Unc4.1*、*Six2*、*Osr2*、*PDGFC* などの間葉系遺伝子を多数検出し、今まで間葉系遺伝子として知られていなかった遺伝子が胎生期腎臓間葉に発現していることも明らかにした。また、いくつかの未知の遺伝子も新たに間葉系遺伝子として同定することができた。

D. 考察

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ため、本

年度も引き続き、①進行性腎障害の進行抑止を目的とする進行性および抑制因子の同定、②腎機能回復・再生のための幹細胞同定と分化誘導・再生因子探索を行なった。

【腎障害進行促進・抑制因子の同定】

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。これまでの調査でも、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 (IGAN1 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ことを期待される。

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 (RAS) 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。

本年度の結果からアンジオテンシノーゲンや ACE 遺伝子の多型は、単に IgA 腎症の長期予後に影響するだけでなく、腎疾患治療薬として期待されている RAS 阻害薬の腎保護効果にも影響する可能性が示された。

前年度までの結果も考え合わせ、性差、血圧、尿蛋白量などの簡単な臨床所見が、

PPAR γ 、UTG 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を示されたが、これらは腎炎に対する個別治療を構築する上で、有用な情報となる。

さらにこれらの結果は、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。また、将来の細胞治療、遺伝子治療あるいは創薬などの新規の治療戦略を臨床応用する上で、重要な情報を提供することも期待される。

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 κ B の尿細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 κ 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、特に clusterin は、BSA 負荷でも増加するが、NF κ 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。本年度は、この clusterin の mRNA および蛋白発現に付いて検討を加え、昨年度の microarray による解析結果と一致して、BSA 負荷によ

り増加し、NF κ B 抑制によりそれがさらに増加すること、apoptosis 抑制に関与する可能性が示唆され、進行性腎障害治療への有用性が考慮された。また、本年度はさらに腎内レニン・アンジオテンシン系の変化にも着目し検討したが、NF κ B 活性化による腎内レニン・アンジオテンシン系の賦活化、特にアンジオテンシノーゲンの発現増強と、アンジオテンシンの代謝酵素であるアンジオテンシン変換酵素 2 型の発現低下が示された。今後、このアンジオテンシン変換酵素 2 型の活性化が進行性腎障害治療に応用できる可能性が示された。

糸球体腎炎の進展に伴って起きる尿細管間質病変は、通常の慢性炎症の経過と同じく炎症反応が先行し、その後次第に線維化が進む。炎症反応においては血球由来の炎症性細胞の間質への浸潤が顕著であるが、近年、尿細管上皮細胞も免疫、炎症反応に深く関与することが示唆されている。すなわち、腎炎の動物モデルや臨床例を用いた研究から、尿細管上皮細胞が抗原提示能を有すること、TNF α などマクロファージが発現する様々な炎症性サイトカインを産生すること、などが示されている。一方、腎疾患の進展過程において、尿細管上皮細胞の一部が線維芽細胞様に変化 (EMT) して間質に移動することが報告され、同細胞が免疫・炎症反応のみならず、直接に線維化の過程にも関与することが示されている。

これまで、臨床検体を用いた研究から、進行性の腎障害において PTEC が脂質を蓄積してマクロファージのマーカートを発現するようになり、その一部が脱落して尿中に現れることが示唆されていた。本研究成果から、単離近位尿細管上皮を血清とともに

培養することにより、確かに PTEC の一部が脂質の蓄積に伴って種々のマクロファージマーカートを発現するように変化することが明らかとなった。また免疫染色による cytokeratin や DPPIV の発現解析から、この変化に伴ってこれらの上皮細胞マーカートの発現が低下したことから、EMT と同様に、この場合にも上皮細胞の形質を失いつつマクロファージ様細胞へと変化することが示唆された。但し、上皮細胞の別のマーカートである E-cadherin の発現低下は見られなかったことから、上皮細胞の形質に関する変化は一様に起きるのではないと考えられる。EMT においては E-cadherin の発現が低下すると報告されており、上皮細胞としての形質の喪失についても EMT とマクロファージ様細胞への変化とは異なる可能性が考慮された。以上の検討結果から、進行性腎障害治療の標的として、EMT 阻害の有用性が示唆される結果であった。

【腎機能回復・再生のための幹細胞同定と分化誘導・再生因子探索】

腎機能回復・再生のための幹細胞として、腎に内在する SP 細胞、ES 細胞、骨髄間葉系幹細胞について検討を加えた。まず、SP 細胞は、他臓器に見られた多分化能を有する SP 細胞と同様の遺伝子発現プロフィールを示し、さらに、慢性腎不全モデル動物である HIGA、ICGN マウスなどでも数の減少は見られるものの同様の性質を有する SP 細胞が存在することが示された。さらに、急性腎不全モデルでも SP 細胞による細胞療法がその回復を早める効果があることが示された。これらの結果を総合すると、腎不全、進行性腎障害では、幹細胞が機能不全に陥り、組織の再生が起こりにくい状況

となっていることが推察され、今後、臨床応用に向け、この機能不全の要因と、さらに人の腎臓にも SP 細胞が存在するかを検証していくことが必要であると考えられた。

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。腎胎生期に発現する Wnt-4 を ES 細胞に発現し、HGF と Activin を EB 細胞の培養中添加したところ、遠位尿細管細胞のマーカーである aquaporin2 の発現が RT-PCR 法と Western blot にて確認された。また 3 次元ゲルを用いた培養法にて尿細管様の構造物の形成を認め、aquaporin2 の mRNA が発現していた。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が、臨床応用を考えると、ES 細胞に関しては、多くの克服すべき問題が残っていると考えられる。

骨髄間葉系幹細胞の可能性について、新たにリレーカルチャー法を考案し、検証した。この方法は、尿管芽が発育する直前の状態で、ヒトの骨髄間葉系幹細胞を注入し、その分化状況を後腎組織となった時点で組織培養として観察していくものである。この方法により、骨髄間葉系幹細胞は後腎組織に組み込まれ、尿管芽として発育していくことが確認された。この結果は、ヒトの骨髄間葉系幹細胞が、適切な場を与えられれば、かなり臓器の発生・分化が進行した時点でも腎臓へと分化することを示したものであり、骨髄細胞の腎臓再生への応用に大きな進歩といえる。また、骨髄由来血管

内皮細胞の腎障害修復における有用性も明らかとなりつつあり、細胞療法への応用が期待される。

後腎組織分化誘導因子として MTF-1 の活性中心を検討し、N 末端 40 アミノ酸中にその存在が示唆された。この部位が活性を有するか否か現在検討中であるが、比較的小分子の蛋白であり、治療薬としての可能性が期待される結果である。

また、腎臓再生・発生因子に関わる因子として、LIF、Ets-1、時計遺伝子、Sall 1 遺伝子下流の未同定遺伝子など、多くの因子を見出すことに成功した。これらの因子単独では、腎臓再生に結びつけることは困難が予想され、今後は、これら因子を複合的に作用させることでどのような効果が挙げられるかをモデル動物において同定していくとともに、臨床応用を考える時、実際の臨床検体において、これらの蛋白がどのように発現しているかの検証が必要となるであろう。

E. 結論

腎障害進行促進・抑制因子を同定するために、遺伝子解析、およびモデル動物での検討を行い、幾つかの候補遺伝子を特定することに成功した。また、腎臓再生の原基として、SP 細胞、骨髄間葉系幹細胞、ES 細胞のいずれも可能性があることが示されたが、実用性を考えると、やはり骨髄間葉系幹細胞の応用が最も将来性が期待される。一方、分化・再生因子も多くの因子の関与が示唆されるが、この中での絞込みを今後行っていくべきであろう。

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. Kuroda M, Sasamura H, Kobayashi E, Shimizu-Hirota R, Nakazato Y, Hayashi M, Saruta T. Glomerular expression of biglycan and decorin and urinary levels of decorin in primary glomerular disease. *Clin Nephrol.* 2004, 61(1):7-16.
2. Ichihara A, Hayashi M, Hirota N, Okada H, Koura Y, Tada Y, Kaneshiro Y, Tsuganezawa H, Saruta T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits prorenin processing in juxtaglomerular cells. *Hypertens Res.* 2003, 26(11):915-21.
3. Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Hayashi M, Saruta T. Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003, 14(12):3090-101.
4. Araki T, Hayashi M, Saruta T. Cloning and characterization of a novel gene promoting ureteric bud branching in the metanephros. *Kidney Int.* 2003, 64(6):1968-77.
5. Ichihara A, Hayashi M, Koura Y, Tada Y, Hirota N, Saruta T. Long-term effects of intensive blood-pressure lowering on arterial wall stiffness in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2003, 16(11 Pt 1):959-65.
6. Kobayashi E, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Kuroda M, Hayashi M, Saruta T. Hepatocyte growth factor regulates proteoglycan synthesis in interstitial fibroblasts. *Kidney Int.* 2003, 64(4):1179-88.
7. Iino Y, Hayashi M, Kawamura T, Shiigai T, Tomino Y, Yamada K, Kitajima T, Ideura T, Koyama A, Sugisaki T, Suzuki H, Umemura S, Kawaguchi Y, Uchida S, Kuwahara M, Yamazaki T; Japanese Losartan Therapy Intended for the Global Renal Protection in Hypertensive Patients (JLIGHT) Study Investigators. Interim evidence of the renoprotective effect of the angiotensin II receptor antagonist losartan versus the calcium channel blocker amlodipine in patients with chronic kidney disease and hypertension: a report of the Japanese Losartan Therapy Intended for Global Renal Protection in Hypertensive Patients (JLIGHT) Study. *Clin Exp Nephrol.* 2003, 7(3):221-30.
8. Hirota N, Ichihara A, Koura Y, Tada Y, Hayashi M, Saruta T. Transmural pressure control of prorenin processing and secretion in diabetic rat juxtaglomerular cells. *Hypertens Res.* 2003, 26(6):493-501.
9. Asai T, Kuwahara M, Kurihara H, Sakai T, Terada Y, Marumo F, Sasaki S. Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus by aquaporin-2 C-terminus mutations. *Kidney Int* 2003; 64: 2-10.
10. Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the BSND gene. *Histochem Cell Biol* 2003, 119:485-493.
11. Hinoshita F, Ogura Y, Suzuki Y, Hara S, Yamada A, Tanaka N, Yamashita A, Marumo F. Effect of orally administered Shao-Yao-Gan-Cao-Tang (Shakuyaku-kanzo-to) on muscle cramps in maintenance hemodialysis patients. *Am J Chin Med* 2003; 31: 445-453.
12. Maehara H, Okamura H, Kobayashi K,

- Uchida S, Sasaki S, Kitamura K. Expression of CLC-KB gene promoter in the mouse cochlea. *NeuroReport* 2003; 14: 1571-1573.
13. Michimata M, Fujita S, Araki T, Mizukami K, Kazama I, Muramatsu Y, Suzuki M, Kimura T, Sasaki S, Imai Y, Matsubara M. Reverse pharmacological effect of loop diuretics and altered rBSC1 expression in rats with lithium nephropathy. *Kidney Int* 2003; 63: 165-171.
14. Michimata M, Mizukami K, Suzuki M, Kazama I, Nakamura Y, Suzuki K, Yanagisawa T, Imai Y, Sasaki S, Matsubara M. Vasopressin-independent renal urinary concentration: Increased rBSC1 and enhanced countercurrent multiplication. *Kidney Int* 2003, 64: 933-938.
15. Miyakoshi M, Kamoi K, Uchida S, Sasaki S. A case of a novel mutant vasopressin receptor-dependent nephrogenic diabetes insipidus with bilateral non-obstructive hydronephrosis in a middle aged man - Differentiation from aquaporin-dependent nephrogenic diabetes insipidus by the response of factor VIII and von Willebrand factor to 1-deamino-8-D-arginine vasopressin administration. *Endocrine J* 2003, 50: 809-814.
16. Mizuno H, Fujimoto S, Sugiyama Y, Kobayashi M, Ohro Y, Uchida S, Sasaki S, Togari H. Successful treatment of partial nephrogenic diabetes insipidus with thiazide and desmopressin. *Horm Res* 2003, 59: 297-300.
17. Ohashi T, Uchida K, Uchida S, Sasaki S, Nihei H. Intracellular mislocalization of mutant podocin and correction by chemical chaperones. *Histochem Cell Biol* 2003, 119: 257-264.
18. 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-kB and Bad. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14: 1427-1434.
19. 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* 2003, 14: 1223-1233.
20. T. Yokoo, K. Sakurai, T. Ohashi, and T. Kawamura: Stem cell gene therapy for chronic renal failure. *Current Gene Therapy* 2003, 3: 387-394.
21. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Hamano T, Iwatani H, Sugaya T, Ito T, Hori M, Imai E. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin. *J Am Soc Nephrol*. 2004, 15(2):276-85.
22. Kitamura H, Matsui I, Itoh N, Fujii T, Aizawa M, Yamamoto R, Okuno A, Okazaki Y, Fujita Y, Kuwayama Y, Imai E, Fujii M. Tranexamic acid-induced visual impairment in a hemodialysis patient. *Clin Exp Nephrol*. 2003, 7(4):311-4.
23. Suzuki A, Iwatani H, Ito T, Imai E, Okabe M, Nakamura H, Isaka Y, Yamato M, Hori M. Platelet-derived growth factor plays a critical role to convert bone marrow cells into glomerular mesangial-like cells. *Kidney Int*. 2004, 65(1):15-24.
24. Imai E, Kaminaga T, Kawasaki K, Yokokawa T, Furui S. The usefulness of ^{99m}Tc-hexamethylpropyleneamineoxime white blood cell scintigraphy in a patient with

- eosinophilic gastroenteritis. *Ann Nucl Med.* 2003, 17(7):601-3.
25. Yokoyama S, Koyama A, Nemoto A, Honda H, Imai E, Hatori K, Matsuno K. Amplification of diverse catalytic properties of evolving molecules in a simulated hydrothermal environment. *Orig Life Evol Biosph.* 2003, 33(6):589-95.
26. Imai E, Takenaka M, Isaka Y, Moriyama T, Akagi Y, Kakuchi J, Fujii T, Ito T, Hori M, Horio M, Syoji T, Tsubakihara Y. Carbonic adsorbent AST-120 retards progression of renal failure by additive effect with ACEI and protein restriction diet. *Clin Exp Nephrol.* 2003, 7(2):113-9.
27. Tanaka T, Kyo M, Kokado Y, Takahara S, Hatori M, Suzuki K, Hasumi M, Toki K, Ichimaru N, Yazawa K, Hanafusa T, Namba Y, Oka K, Moriyama T, Imai E, Okuyama A, Yamanaka H. Correlation between the Banff 97 classification of renal allograft biopsies and clinical outcome. *Transpl Int.* 2004, 17(2):59-64.
28. Oseto S, Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, Takeji M, Ando A, Yamamoto T, Imai E, Hori M. Therapeutic effect of all-trans retinoic acid on rats with anti-GBM antibody glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2003, 64(4):1241-52.
29. Daniel C, Takabatake Y, Mizui M, Isaka Y, Kawashi H, Rupprecht H, Imai E, Hugo C. Antisense oligonucleotides against thrombospondin-1 inhibit activation of tgf-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Am J Pathol.* 2003, 163(3):1185-92.
30. Sakamaki J, Honda H, Imai E, Hatori K, Shimada K, Matsuno K. Enhancement of the sliding velocity of actin filaments in the presence of ATP analogue: AMP-PNP. *Biophys Chem.* 2003, 105(1):59-66.
31. Choi J, Imai E, Mihara M, Oderaotoshi Y, Minakata S, Komatsu M. 1,4-silatropy of S-alpha-silylbenzyl thioesters: a convenient route to silyl enol and dienol ethers accompanied by C-C bond formation via thiocarbonyl ylides. *J Org Chem.* 2003, 68(16):6164-71.
32. Miyakawa H, Kawashima Y, Kitazawa E, Kawaguchi N, Kato T, Kikuchi K, Imai E, Fujikawa H, Hashimoto E, Schlumberger W. Low frequency of anti-SLA/LP autoantibody in Japanese adult patients with autoimmune liver diseases: analysis with recombinant antigen assay. *J Autoimmun.* 2003, 21(1):77-82.
33. Kobayashi S, Dono K, Takahara S, Isaka Y, Imai E, Zhenhui L, Nagano H, Tomoaki K, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Electroporation-mediated ex vivo gene transfer into graft not requiring injection pressure in orthotopic liver transplantation. *J Gene Med.* 2003, 5(6):510-7.
34. Kaimori JY, Takenaka M, Nakajima H, Hamano T, Horio M, Sugaya T, Ito T, Hori M, Okubo K, Imai E. Induction of glia maturation factor-beta in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury through the p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities. *J Biol Chem.* 2003, 278(35):33519-27.
35. Imai E. Gene therapy for renal diseases: its potential and limitation. *J Am Soc Nephrol.* 2003, 14(4):1102-4.
36. Suzuki A, Ito T, Imai E, Yamato M, Iwatani H, Kawachi H, Hori M. Retinoids regulate the repairing process of the podocytes in puromycin