

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 松彦

平成 17 年 (2005 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	18
川村 哲也	
2. 胎仔マイクロキメリズムの組織修復への寄与に関する検討	21
今井圓裕、伊藤孝仁	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物・別冊	29

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括・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

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、プロレニン・レニン・アンジオテンシン系の重要性を明らかとし、さら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、腎に内在するSP細胞と、ES細胞の可能性を各々検討した。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、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。一方、骨髄由来内皮前駆細胞が腎臓の内皮障害に対する細胞療法として使用しうる可能性も明らかとなった。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、Sall 1、Sall 4、Jagged-1-Notch系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 熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野教授、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

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。今後の人口の高齢化を考慮すると、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

A. 研究目的

あったとしても薬剤自体の副作用が大きな問題となっている。また、末期腎不全にいたった場合、血液透析、腹膜透析、腎移植が治療の選択枝となるが、患者の生活の質、代謝面等、腎移植が最も優れているものの、腎提供者は極めて限られており、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

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、後述のような倫理的配慮のもと、末梢白血球からゲノミック DNA を抽出し保存した。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、本年度も継続的に症例数を追加した。

前年度までに、複数の発症に関わる遺伝子多型と進行に関連する遺伝子を同定し報告してきたが、本年度はさらに他の機能的候補遺伝子の解析をすすめた。また、特に第 6 染色

体 q22-23 に同定された IGAN1 領域に存在する遺伝子のうち、今までの検討で関連を認められた KIAA1798 のさらに詳細な解析を行った。

新規に同定された mucin protein 20 (MUC20) は、尿細管間質の再生・機能維持に重要と考えられる hepatocyte growth factor のシグナリングを制御していることが報告された。この MUC20 は、IgA 腎症の腎臓で高発現する遺伝子として発見されているが、私共はこの遺伝子に多型があり、MUC20 自体の機能に直接影響する可能性が高いことに注目し、腎生検例での発現を解析し、IgA 腎症の腎機能予後との関連を検討した。

IgA 腎症の早期診断や病態・病勢の把握、治療効果の評価に、血清 IgA の糖鎖修飾不全が応用できる可能性が高い。しかし、従来の一般的な糖鎖解析の方法では、時間とコストがかかるため、多数例の糖鎖異常を、経過を追って解析することは不可能であった。そこで、簡便・迅速に IgA 糖鎖異常を検出する方法を考案し、その有用性を検討した。

#### 2 腎障害進行因子の同定

糖尿病腎症の進展抑制にレニン・アンジオテンシン系の抑制薬が有効であるにも関わらず、血液中、組織中のレニン・アンジオテンシン系濃度はむしろ低下していることが知られている。これに対して、腎内プロレニン濃度は糖尿病腎症において増加していることが知られていたが、その病態への関与は不明であった。近年、プロレニンはその特異的結合蛋白と結合した後、分子量の変化なく活性体となり、アンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に変換するばかりでなく、細胞内 MAP kinase の活性化を生じることが報告され、臓器障害の発症への関与が示されてきた。そこで、このプロレニン分子の中で、特異的結

合蛋白との結合部分の5個のアミノ酸を含み、その前後のアミノ酸配列を加えた10個のアミノ酸からなるデコイ蛋白を作成して streptozotocin 糖尿病ラットに長期間 minipump を用いて投与した。経時的にラットを屠殺して腎組織等の検討を行った。

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 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、7日目、2週目、4週目、6週目に屠殺して腎組織を得た。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。OS-3 抗体は新潟大の清水不二雄教授より供与されたハイブリドーマ培養上清を用いた。

【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

腎臓 SP 細胞は以下のごとく調整した。マウスではエーテル麻酔後、腎臓を取り出し、生理的食塩水にて還流を行い、尖刀にて腎臓皮質を切り出した。腎臓組織は細かく刻み、コラゲナーゼにて細胞分散液を作成した。作成した細胞分散液は Cell-Strainer (Falcon 2350) にかけて、夾雑物を除去した。Cell Strainer 処理した細胞は Hoechst33342 ラベル後、UV laesr FACS により解析・分取した。ブタではマウスと組織硬度等が異なるため、Hoechst の濃度は、1、2、5、7.5、 $\mu$ l/ml の4種類、collagenase 濃度は、0.1-0.5mb/ml の各条件にて検討し、適正化した。遠心分離には、25G 程度の低速を用いた。

幹細胞の指標の一つである muscudin/MyoR の組織内局在を検討するため以下のごとく組織化学的検討を行った。組織切片を PBS に溶かした1%スキムミルク中室温で60分ブロックした。その後4℃、2 $\mu$ g/ml の goat anti-mouse muscudin/MyoR polyclonal antibody で overnight 処理を行った。翌日室温にて、PBS で各5分間、3回洗い、1:200 に希釈した Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (Molecular Probe) で、30分室温で処理をした。その後、PBS で各5分3回洗い、Pro-Long Antifade Kit (Molecular Probes) を用いて、標本を作成した。核染色には TO-PRO-3 (Molecular Probes) を用い、観察には Leica confocal microscope TCS SL を用いた。

SP 細胞による細胞療法の急性腎不全での有効性を検証するため、C57B6 マウスにシスプラチンを腹腔内投与し、急性腎不全モデル動物を作成した。予備実験として、シスプラチンを 10-14mg/kg の範囲で投与し、腎臓機能が可逆的に障害される投与量を検討した。腎臓機能は血清 BUN 値を用いて評価し、12mg/kg のシスプラチンにより投与5日目以降回復期に入る急性腎不全を生じることを確認した。このモデル動物に腎臓 SP 細胞の経静脈的投与を行った。細胞移植は、尾静脈から 5000-10000 個の腎臓 SP 細胞を投与することにより行った。また比較のため、non-SP 分画細胞を同数投与した。

また、アジュバンド投与に引き続き、抗 GBM 抗体を投与し、慢性腎不全モデルを作成した。このモデル動物に、SP 細胞機能を抑制していると考えられる muscudin/MyoR の抑制薬である trichostatinA 投与を DMSO に溶解し、21日連続皮下注射を行った。

### 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指した。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行った。マウス ES 細胞を hanging drop 法で、EB(embrioid body)細胞へ分化させ、さらに EB 細胞の培養液中に HGF および bFGF を添加して、21 日間培養後 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 を発現することを確認した。種々の培養条件を検討し、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-Holl の mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討をする。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 骨髄由来血管内皮前駆細胞による細胞療法の検討

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・誘導因子の探索

急性腎不全では、一度廃絶した腎機能が回復をみせ、実際に尿細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。

ラットの左腎動脈を一時間虚血再灌流後の Jagged-1、Notch、Hes1 の発現を Western blot および real-time PCR 法にて検出した。また Jagged-1、Notch、Hes1 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。

Jagged-1-Notch システム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 Jagged-1、Notch の二重染色を行った。また Jagged-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。さらに Jagged-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 NRK32E 細胞を Jagged-1 を coating した culture dish で培養し細胞数の変化を検討した。

### 2 腎臓発生に関与する分化・誘導因子の探索

以前より検討を続けている Sall1 について、さらにその上流に存在する遺伝子同定を行った。Sall1 が腎臓前駆細胞集団である後腎間葉に発現することを利用し、Sall1 の遺伝子座に GFP を導入したマウスを作製し、腎臓前駆細胞を単離した。また、Sall2、3、4 のノックアウトマウスを作成し、Sall1 のノックアウトマウスと交配することによって、機能の重複を除き、Sall ファミリーの機能の本態の解明を行った。

(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、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）を遵守した。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、末梢血からゲノムDNAを抽出し、保存した。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した。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、承認を得た。

### 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 家族性IgA腎症責任遺伝子領域（6番染色体IGAN1）の関連解析

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。私共は日本人の孤発例を含む集団で、同じマーカー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ー（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ーを設定して解析を試みたが、日本人で有用な多型性を示すマーカー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情報は登録されていない。

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（KIAA1798）があり、現在この遺伝子自体の発現と機能を解析しているところである。さらにこのKIAA1798遺伝子内に、アミノ酸置換（183Asn>Thr）を伴うSNPを同定し、腎生検によりIgANと診断された281例と健常人388例を解析した。結果、KIAA1798 183 AA型では有意に腎機能の予後が不良であったが、遺伝子頻度は健常コントロールと差がなかった。

#### MUC20の発現と腎機能予後への影響

原発性糸球体腎炎を含む腎疾患では、糸球体障害よりも、尿細管間質障害が腎機能の予後を規定することが良く知られている。尿細管障害後の再生・機能回復には様々な成長因子やサイトカインが働いているが、なかでもhepatocyte growth factor (HGF)の重要性については、多くの報告があり、治療に応用できることも実験的に示されている。一方、このHGFのシグナリング制御については、今までほとんど不明であった。最近、IgA腎症の腎臓で高発現するmucin protein 20 (MUC20)が、HGFシグナリングを特異的に制御する分子として、新たに同定された。MUC20の粘液繰り返し構造の多型が、MUC20の機能に直接影響する可能性に着目し、IgA腎症の進展との関連を解析した。結果、繰り返し配列の多い症例は、腎機能の予後が良好であった。

#### 血清IgA1糖鎖異常の簡便・迅速な検出方法の開発

IgA腎症の発症に、血清IgA1分子ヒンジ部分の糖鎖異常が重要であるといわれているが、

この糖鎖異常を測定する方法は、複雑な工程を要するため、多数例の経過をみることは不可能であった。もしこれが臨床レベルで簡便・迅速にできるようになれば、予後の推定、治療効果の判定や、発症リスクの推定に有用である。そこで、IgA の分離と不全糖鎖を同時に簡便に検出する方法を考案し、実際に有用であることを確認した。

#### その他

① ラット糸球体腎炎モデル（抗糸球体基底膜腎炎モデル）の腎臓に高発現する遺伝子を DNA array を用いて網羅的に解析し、macrophage metalloelastase (MME) の発現が最も著しく上昇することを発見した。この MME に対する特異抗体を作成し、同モデルラットに投与したところ、腎組織障害と蛋白尿が明らかに改善した。したがって、MME を新しい腎炎の治療ターゲット分子として応用できる可能性を示した。また、同モデルラットに対して、Bezafibrate の治療効果を証明し、今後臨床応用のための試験を開始する予定である。

② Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  は、糸球体内の基質増加や腎間質の線維化に関与することが良く知られているが、TGF- $\beta$  の遺伝子多型が臨床表現型や腎機能の予後と関連するかどうかは不明であった。私共は TGF- $\beta$  遺伝子内の 2 カ所の SNP を解析し、尿蛋白量とメサンギウム細胞増殖との関連を報告した。

③ 東京大学医科学研究所中村祐輔教授との共同研究で、ゲノムワイド SNP 解析を行ってきた。前年度までに、細胞間接着分子のセレクチン(L-selectin, E-selectin)遺伝子、HLA-DRA 遺伝子、pIgR 遺伝子多型と IgA 腎症の関連を報告してきたが、本年度は新たに immunoglobulin mu binding protein 2 遺伝子との関連を報告した。

## 2 腎障害進行因子の同定

プロレニンのその特異的結合蛋白との結合部位を含むデコイ蛋白が、in vitro の実験でプロレニンの活性化を抑制することが確認された。糖尿病腎症進展における組織プロレニンの役割を調べるため、このデコイ蛋白を streptozotocin 糖尿病ラットに投与したところ、腎障害進行は糖尿病発症後 24 週まで完全に抑制された。このデコイ蛋白投与は血圧、血糖には有意の変化を与えず、組織の活性型プロレニンを明らかに低下させることが示された。

OS-3 抗体は正常ラットの腎糸球体や腎皮質尿細管にほとんど反応しなかった。10% ラット血清を加えて培養した正常ラット腎由来の初代近位尿細管上皮細胞を OS-3 抗体にて免疫染色したところ、多くの細胞が陽性であった。その陽性率を測定するために同じ条件で 3 日間培養した細胞をシャーレから剥がし、FACS 解析を行ったところ、約 70% の細胞が OS-3 陽性であることが確認された。一方これらの細胞は近位尿細管上皮細胞のマーカーであるジペプチジルペプチダーゼ IV 抗体に陽性であることから、これらが近位尿細管上皮細胞由来であることが確認された。またラット血清無添加で培養した近位尿細管上皮細胞は OS-3 陽性細胞数が遙かに少なかったことから、この変化も血清依存的であることがわかった。

次に、これまで注目している変化と OS-3 陽性化との関連を調べるために、培養近位尿細管細胞を用いて SR-A 抗体と OS-3 抗体との二重染色を行った。その結果、SR-A 陽性となった細胞は OS-3 も陽性であることが確認され、これらの変化が共通する現象であることが示唆された。



清水らは、半月体における OS-3 陽性細胞を報告しているが、腎炎における尿細管上皮細胞の OS-3 抗体の反応性は調べていない。そこで、これまで CD68 や SR-A について解析した WKY ラット半月体性腎炎モデルにおける近位尿細管上皮細胞の OS-3 抗体の反応性を調べた。多くの糸球体で半月体形成が見られる腎炎惹起後 7 日目でも、糸球体及び尿細管上皮細胞は OS-3 陰性であったが、2 週目には一部の糸球体で多数の OS-3 陽性細胞が観察された。この時期に近位尿細管上皮細胞は陰性であった。4 週目になると、糸球体の OS-3 陽性細胞はごく少数になるのに対して、尿細管上皮の陽性細胞が増加し、尿細管優位の反応性を示した。6 週目ではこの傾向がさらに顕著になり、多くの尿細管上皮細胞が OS-3 陽性となった。また間質領域における OS-3 陽性細胞はわずかであり、この時期の腎皮質における OS-3 細胞の大部分は尿細管上皮細胞と考えられた。

尿細管上皮細胞のマクロファージ化との関連を調べるために、抗 CD68 抗体と OS-3 との二重染色を行った。その結果、細胞培養の結果と同じく、CD68 陽性の近位尿細管上皮細胞は OS-3 に対しても陽性であり、OS-3 陽性細胞の一部に CD68 が発現してくることが示唆された。

最後に、OS-3 抗体の対応抗原について調べるために、腹腔マクロファージと腎炎 6 週目のラット腎皮質を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、清水らの報告と同じく、両サンプルとも分子量約 43,000 の位置に単一のバンドが観察された。また腹腔マクロファージが OS-3 陽性であることは、免疫染色によっても確認された。

【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

MyoR/musculin 陽性細胞は腎臓間質部分に存在しており、シスプラチン投与による急性腎不全モデルで減少した。また、MyoR/musculin 陽性細胞は核染色との二重染色結果から、非常に小型の細胞であることが明らかとなった。

尾静脈から腎臓 SP 細胞を移植することにより、腎臓機能の回復促進および腎臓間質での MyoR/musculin 陽性細胞の増加が見られたが、non-SP 細胞の投与では腎臓機能の回復促進作用は見られなかった。一方、腎臓皮膜下に腎臓 SP 細胞を移植したが、皮膜下の移植によって腎臓機能回復促進作用は見られなかった。

MyoR/musculin 拮抗薬である trichostatin A 投与により、慢性腎不全モデルでの蛋白尿および血清 BUN の上昇が有意に抑制され、糸球体硬化、腎臓間質の繊維化が抑制された。

腎臓 SP 細胞の培養の結果、SP 細胞は腎臓保護あるいは分化誘導因子 (BMP7、HGF、VEGF) を産生し、これらの産生は転写因子 MyoR/musculin により制御された。

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 骨髄由来血管内皮前駆細胞による細胞療法 法の検討

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 糸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・誘導因子の探索

ラットの左腎動脈を一時間虚血再灌流後の Jagged-1 の発現を Western blot および real-time PCR 法にて検出したところ、Jagged-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 Jagged-1 の発現より遅い phase で起った。また Jagged-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。Control rat では cortex、medulla ともに、Jagged-1 は発現しないが、再灌流 12 時間後では、Cortex で、尿細管に Jagged-1 の発現が認められた。Jagged-1 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 Jagged-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 Jagged-1 が発現していることがわかった。また Jagged-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。Jagged-1 の発現細胞は、PCNA も発現しており、Jagged-1 発現細胞が細胞分裂を起していることがわかった。さらに Jagged-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 NRK32E 細胞を Jagged-1 を coating した culture dish で培養し細胞数の変化を検討した。培養尿細管細胞である NRK32E 細胞を Jagged-1 で刺激した時の細胞増殖で検討したところ、細胞増殖がおこることがわかった。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・誘導因子の探索

Sall1 の遺伝子座に GFP をノックインしたマウスの胎生期腎臓から、FACS を用いて GFP 陽性な細胞集団を単離した。この細胞を Wnt4 を発現するフィーダー上で培養すると、1 個の細胞から多系統に分化するコロニーが形成されることを見いだした。これは多能性の腎臓前駆細胞が発生期腎臓に存在することを示す。関連遺伝子である Sall4 のノックアウトマウスは予想外に胎生 5.5 日という極めて初期に死亡し、かつ胚性幹細胞(ES 細胞)において Sall4 が必須であることが明らかになった。

#### 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。今回の調査でも、IgA 腎症発症に責任が疑われる遺伝子は、少なくとも 5 カ所 (IGAN1 の他、pIgR、L-selectin、HLA-DRA、Immunoglobulin mu binding protein 2) はあるという結果であった。このことは、IgA 腎症の疾患概念自体を変える可能性を秘めている。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。また、複数の遺伝子多型解析の組み合わせにより、より正確な発症リスクの評価が可能となることが期待される。また、尿細管再生・機能維持に重要な HGF の制御系の新たな遺伝子 MUC20 も、治療に応用できる可能性があり、今後の解析をすすめたい。

さらに、これまでの結果は、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。

糖尿病腎症にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制薬が有効であるにも関わらず、組織レニン濃度、あるいは血液中のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系はむしろ糖尿病では抑制されており、この相違が長年の問題であった。本研究では、組織プロレニンがその特異的蛋白との結合により、レニンに変換することなく、立体構造の変化によりアンジオテンシン I 産生が可能となり、さらに細胞内 MAP kinase 系が活性化されるという報告に着目し、プロレニンとその特異的蛋白との結合を阻止するデコイ蛋白の糖尿病腎症に対する効果を検討した。その結果、糖尿病腎症の進行はこのデコイ蛋白投与により完全に抑制され、新たな糖尿病腎症治療薬開発への道を開いたといえる。デコイ蛋白は経口投与ができないという欠点を有しており、今後、新たに薬剤の分子設計を行い、臨床応用への道を探る予定である。

近位尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への変化は in vivo のラット腎炎モデルでも、

in vitro の同細胞の初代培養でも観察されるが、いずれの場合も変化する細胞は全体のごく一部であり、このような変化が近位尿細管上皮細胞の全体で起き得る現象か、あるいはその一部の細胞のみが起こす現象かは明確でなかった。

本研究で用いた OS-3 抗体は、ラット糸球体を培養したときに足細胞の一部から培養液中に浮遊してくるマクロファージ様細胞に対するモノクローナル抗体である。本研究からこの抗体は腹腔マクロファージとも反応すること、近位尿細管上皮細胞を培養すると、その70%程度の細胞がラット血清依存的に OS-3 陽性となり、その一部が CD68 も陽性になることがわかった。これらの結果から、近位尿細管上皮細胞がマクロファージ様細胞へと変化するのには、必ずしも一部の細胞のみの現象ではなく、多くの細胞で起こることであり、CD68 や SR-A 陽性になるのがその一部のみであることが示唆された。OS-3 陽性になることが CD68 や SR-A 陽性になる過程の途中であるのか、あるいは OS-3 陽性のうちの一部の細胞のみが CD68 や SR-A も陽性となるのかは今後の課題である。

腎炎モデルにおける尿細管上皮細胞の OS-3 陽性化は、尿細管間質病変の進展にともなって広範に起こる現象であり、またこの時の OS-3 陽性細胞の大部分が尿細管上皮細胞と考えられた。OS-3 抗体の対応抗原が何かは不明であるが、この抗原が腎炎の進展のマーカーや治療の標的となる可能性が考えられる。また本研究から、我々が注目してきた尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への変化と、清水らの報告した糸球体足細胞の変化とが関連する現象であることが示唆された。これらの変化を促す血清中の因子や、細胞内のシグ

ナル伝達系についても今後明らかにする必要がある。

【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、腎臓 SP 細胞は腎臓間質に存在し、組織再生能力をコントロールしていることが示唆された。経静脈的腎臓 SP 細胞移植が急性腎不全における腎臓 SP 細胞の減少を回復させ、腎臓機能をも回復させたことから、今後腎臓 SP 細胞を用いた細胞治療および SP 細胞機能を制御する MyoR/musculin を対象とした薬物治療も可能と思われた。

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 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。糸球体自体あるいは、ネフロン再生にはまだ程遠く、越えなければならない多くの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。

骨髄由来血管内皮細胞の投与により急性の

内皮障害モデルの腎障害修復における有用性が明らかとなり、細胞療法への応用が期待される結果といえる。

尿細管細胞の再生、増殖誘導を引き起こす遺伝子として、Jagged-1、Notch システムに注目した。急性腎不全後の、再生、増殖の時期に、Jagged-1 が近位尿細管に劇的に発現亢進することをはじめ確認し発表している。また培養尿細管細胞を Jagged-1 で刺激した時、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。

Jagged-1 の刺激下で、細胞増殖能が NRK32E 細胞で亢進したという実験結果は、Jagged-1 刺激により、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 Jagged-1 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。

Sall1 およびそのファミリーの検討から、腎臓前駆細胞を検出する系が開発できたので、これを改善することによって、ES 細胞からの腎臓細胞誘導の検定系としたい。遺伝子操作マウスの作成は、試験管内での実験に比べると結果がでるのは遅いが、極めて信憑性の高い有用な結果が出せていると考えている。

#### E. 結論

腎障害進行促進・抑制因子を同定するために、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、骨髄細胞由来血管内皮前駆細胞、ES 細胞のいずれも可能性があることが示された。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、該当する情報ない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Hayama A, Sasaki S, Uchida S. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13): 4690-4694, 2004
2. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, Koura Y, Nishiyama A, Okada H, Uddin MN, Nabi AH, Ishida Y, Inagami T, Saruta T. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *Journal of Clinical Investigation* 114 (8): 1128-35, 2004
3. Takasato M, Osafune K, Matsumoto Y, Yoshida N, Meguro H, Aburatani H, Asashijima M, Nishinakamura R. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1- GFP knockin mice. *Mechanisms of Development* 121 (6): 547-557, 2004
4. Tanaka H, Terada Y, Kobayashi, Okado T, Inoshita S, Kuwahara M, Seth A, Sato Y, Sasaki S. Expression and function of Ets-1

- during experimental acute renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (12): 3083-3092, 2004
5. Xie Y, Nishi S, Fukase S, Nakamura H, Chen X, Imai N, Sakatsume M, Saito A, Ueno M, Narita I, Yamamoto T, Gejyo F. Different type and localization of CD44 on surface membrane of regenerative renal tubular epithelial cells in vivo. *American Journal of Nephrology* 24 (2): 188-197, 2004
  6. Hishikawa K, Miura S, Marumo T, Yoshioka H, Mori Y, Takato T, Fujita T. Gene expression profile of human mesenchymal stem cells during osteogenesis in three-dimensional thermoreversible gelation polymer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317 (4): 1103-1107, 2004
  7. Sato A, Kishida S, Tanaka T, Kikuchi A, Kodama T, Asashima M, Nishinakamura, R. *Sall1*, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319 (1): 103-113, 2004
  8. Sato F, Narita I, Goto S, Kondo D, Saito N, Ajiro J, Saga D, Ogawa A, Kadomura M, Akiyama F, Kaneko Y, Ueno M, Sakatsume M, Gejyo F. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism modifies the histological and clinical manifestations in Japanese patients with IgA nephropathy. *Tissue Antigens* 64 (1): 35-42, 2004
  9. Xie, Y. Chen, X. Nishi, S. Narita, I. Gejyo, F. Relationship between tonsils and IgA nephropathy as well as indication of tonsillectomy. *Kidney International* 65 (4): 1135-1144, 2004
  10. Miyazawa S, Hotta O, Doi N, Natori Y, Nishikawa K, Natori Y. Role of mast cells in the development of renal fibrosis: use of mast cell-deficient rats. *Kidney International* 65 (6): 2228-37, 2004
  11. Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T. Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation Research* 94 (8): 1067-74, 2004
  12. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Kohike H, Komori T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (1): 288-291, 2005
  13. Ohtsubo S, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Maeda S, Tsunoda T, Takei T, Obara W, Akiyama F, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Yumura W, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Suzuki Y, Narita I, Gejyo F, Fujioka T, Nihei H, Nakamura Y. Association of a single-nucleotide polymorphism in the immunoglobulin mu-binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy. *Journal of Human Genetics* 50 (1): 30-35, 2005
  14. Alchi B, Nishi S, Kondo D, Kaneko Y, Matsuki A, Imai N, Ueno M, Iguchi S, Sakatsume M, Narita I, Yamamoto T Gejyo

- F. Osteopontin expression in acute renal allograft rejection. *Kidney International* 67 (3): 886-96, 2005
15. Saga D, Sakatsume M, Ogawa A, Tsubata Y, Kaneko Y, Kuroda T, Sato F, Ajiro J, Kondo D, Miida T, Narita I, Gejyo F. Bezafibrate suppresses rat anti-glomerular basement membrane crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, in press, 2005
  16. Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, in press, 2005
2. 学会発表
1. 加藤里奈、宇和野幹子、片山幸枝、名取有美子、宮澤しのぶ、名取泰博：近位尿管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化-モデル系を用いた検討-、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  2. 成田一衛：IgA腎症の発症と進展に関わる遺伝的背景の解明：厚生労働省特定疾患対策研究報告、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  3. 秋山史大、成田一衛、下条文武、中村祐輔：IgA腎症関連遺伝子の同定-SNPマーカーによるゲノムワイドスクリーニング、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  4. 近藤大介、成田一衛、佐藤文則、後藤 眞、小川 麻、斎藤徳子、坂爪 実、西慎一、上野光博、今井直史、下条文武：IgA腎症における第6染色体上塩基多型の解析、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  5. 坂爪 実、嵯峨大介、小川 麻、金子佳賢、上野光博、成田一衛、芝紀代子、下条文武：尿の免疫細胞・赤血球および蛋白電気泳動解析による腎病変の予測、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  6. 嵯峨大介、坂爪 実、金子佳賢、小川 麻、黒田 毅、安城淳哉、佐藤文則、近藤大介、成田一衛、下条文武：ラット抗GBM抗体腎炎のBezafibrateによる治療効果、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  7. 田中啓之、寺田典生、岡戸丈和、島村治子、井下聖司、寺岡弘文、佐々木成：マウスES細胞よりpodocyteへのin vitroでの分化誘導の検討、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  8. 寺田典生、田中啓之、岡戸丈和、島村治子、井下聖司、寺岡弘文、佐々木成：マウスWnt4導入ES細胞から腎構成細胞への分化誘導の試み、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  9. 岡戸丈和、寺田典生、田中啓之、島村治子、井下聖司、寺岡弘文、佐々木成：片側尿管結紮(UUO)腎症におけるアポトーシス及び線維化形成とASK1遺伝子の関わり、第47回日本腎臓学会学術総会、2004年5月、宇都宮
  10. 内村英輝、丸茂丈史、高瀬 敦、河内 裕、清水不二雄、菱川慶一、藤田敏郎、林 松彦、猿田享男：培養骨髄細胞の腎臓内投

- 与は、Thy-1 腎炎の糸球体内皮障害を抑制する、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
11. 浅井昌樹、門川俊明、福田誠一、丸茂丈史、河内 裕、清水不二雄、林 松彦、猿田享男：進行性腎炎モデルに対する抗アルドステロン薬の効果、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  12. 小林絵美、篠村裕之、清水良子、荒井香代子、石黒貴美子、林 松彦、猿田享男：バイグリカンの腎間質の線維化抑制作用：過剰発現マウスを用いた検討、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  13. 高瀬 敦、丸茂丈史、菱川慶一、林 松彦、猿田享男：蛋白尿における腎内 NFkappaB 依存性遺伝子の検討、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  14. 菱川慶一、丸茂丈史、中西朝人、三浦茂樹、高瀬 敦、松崎有未、猿田享男、林松彦、岡野栄之、藤田敏郎：腎臓体性幹細胞システムの niche は間質に存在する、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  15. 吉野 純、門川俊明、辻 美保子、林 松彦、猿田享男：腎線維化における転写制御因子 slug/snail の役割、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  16. 市原淳弘、林 松彦、金城 雪、多田由布子、西山 成、猿田享男：糖尿病性腎症進展過程における腎内レニン・アンジオテンシン系、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  17. 辻 美保子、門川俊明、吉野 純、河内裕、清水不二雄、林 松彦、猿田享男：腎線維化における thymosin  $\beta$  4、 $\beta$  10 の役割、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  18. 西中村隆一：Sall ファミリーによる腎臓発生機構、第 47 回日本腎臓学会学術総会、2004 年 5 月、宇都宮
  19. 市原淳弘、林 松彦、金城 雪、多田由布子、西山 成、猿田享男：糖尿病性腎症進展過程における腎臓内レニン・アンジオテンシン系の検討、第 77 回日本内分泌学会学術総会、2004 年 6 月、京都
  20. 丸茂丈史、今井直彦、下澤達雄、菱川慶一、藤田敏郎：アンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬は、尿管間質障害による腎臓 Side Population 細胞の減少を抑制する、第 27 回日本高血圧学会、2004 年 10 月、宇都宮
  21. 成田一衛、坂爪 実、下条文武：IgA 腎症と遺伝子多型。シンポジウム：IgA 腎症の病態展開、第 55 回日本電気泳動学会総会、2004 年 11 月、東京
  22. 西中村隆一：腎臓発生における Wnt シグナル、第 27 回日本分子生物学会、2004 年 12 月、神戸
  23. 長船健二、西中村隆一：新規コロニーアッセイ法を用いた胎生マウス腎臓前駆細胞の単離、第 27 回日本分子生物学会、2004 年 12 月、神戸
  24. Hayashi M. Stem cell therapy and regeneration factor for acute renal failure. The 5th Japan-Europe Nephrology Forum, March 2004, Hakone
  25. Harada M, Nishinakamura R. Generation of metanephric mesenchyme-specific conditional knockout system. The 37th Annual Meeting of the American Society of



- Nephrology, November 2004, St Louis
26. Osafune K, Nishinakamura R. Identification of multipotent renal progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  27. Kato R, Uwano M, Katayama Y, Natori Y, Natori Y. Characterization of Macrophage-like Cells Derived from Proximal Tubular Epithelial Cells in Culture. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  28. Sakatsume M, Kubota R, Ogawa A, Saga D, Narita I, Gejyo F. The prospective study for prediction of renal injury by analyses of immune effector cells, red blood cells and protein profile I urine. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  29. Mori H, Kaneko Y, Narita I, Gejyo F. Renal survival in IgA nephropathy is associated with monocyte chemoattractant protein-1 A-2518G polymorphism. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  30. Kadomura M, Narita I, Omori K, Gejyo F. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism affects on the long-term renal survival in IgA nephropathy. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  31. Terada Y, Tanaka H, Kobayashi T, Kuwahara M, Sasaki S. Aurora Kinases regulate G2/M transition of rat mesangial cells. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  32. Kobayashi T, Terada Y, Tanaka H, Kuwahara M, Sasaki S. Expression of Notch-1 and Its Ligand Jagged-1 in rat acute renal failure. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  33. Tanaka H, Terada Y, Kobayashi T, Kuwahara M, Sasaki S. Induction of renal tubular cells and podocytes from mouse stem cells. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  34. Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Hayashi M, Saruta T. Transcriptional repressor Slug: a new player in tubular epithelial-mesenchymal transition. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  35. Hishikawa K, Marumo T, Matsuzaki Y, Takase O, Hayashi M, Saruta T, Nakauchi H, Nakaki T, Okano H, Fujita T. Localization and functional analysis of adult stem like-cell in kidney. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  36. Asai M, Monkawa T, Marumo T, Fukuda S, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T. Spironolactone in combination with cilazapril ameliorate proteinuria and renal interstitial fibrosis in antiy-Thy-1 irreversible nephritis rat. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology,

- November 2004, St Louis
37. Marumo T, Uchimura H, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Reduction of endothelial injury and mesangial cell activation by entrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells in experimental glomerulonephritis. The 37th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 2004, St Louis
  38. 今井直彦、菱川慶一、松崎有未、丸茂丈史、林 松彦、岡野栄之、藤田敏郎:HDAC 阻害薬は腎臓 SP 細胞活性化を介して慢性糸球体腎炎進展を抑制する、第 4 回日本再生医療学会総会、2005 年 3 月、大阪
  39. 丸茂丈史、内村英輝、高瀬 敦、河内 裕、清水不二雄、林 松彦、猿田享男、菱川慶一、藤田敏郎:糸球体腎炎に対する血管新生細胞療法の有効性、第 4 回日本再生医療学会総会、2005 年 3 月、大阪
  40. Nishinakamura R. Essential roles of Sall family in Kidney development. ISN (International Society of Nephrology) Forefronts in Nephrology “Stem cell and regeneration of the kidney”, January 2005, Karuizawa
  41. Osafune K, Nishinakamura R. Identification of multipotent renal progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. ISN (International Society of Nephrology) Forefronts in Nephrology “Stem cell and regeneration of the kidney”, January 2005, Karuizawa
  42. Takasato M, Nishinakamura R. Identification of kidney mesenchymal genes by a combination of microarray analysis and Sall1-GFP knockin mice. ISN (International Society of Nephrology) Forefronts in Nephrology “Stem cell and regeneration of the kidney”, January 2005, Karuizawa
  43. Monkawa T, Hayashi M. Search for genes expressed during progression and recovery in the diseased kidney. ISN (International Society of Nephrology) Forefronts in Nephrology “Stem cell and regeneration of the kidney”, January 2005, Karuizawa
  44. Hishikawa K, Marumo T, Fujita T. Do we really need “stem” cell for renal regeneration? ISN (International Society of Nephrology) Forefronts in Nephrology “Stem cell and regeneration of the kidney”, January 2005, Karuizawa
  45. Marumo T, Uchimura H, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Angiogenic cell therapy reduces endothelial injury and inflammatory responses in glomerulonephritis. ISN (International Society of Nephrology) Forefronts in Nephrology “Stem cell and regeneration of the kidney”, January 2005, Karuizawa
  46. Sakaki M, Nishinakamura R. Murine homologue of SALL4, a causative gene for Okihiro syndrome, is essential for early embryogenesis and proliferation of embryonic stem cells. Keystone Symposia, February 2005, Banff
3. その他
- 第 17 回腎臓病を考える都民の集い  
「腎臓病予防と治療の最新情報」2005 年 2 月

20日東京

「腎臓病を悪化させない秘訣とは- 透析回避  
のために-」東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内  
科、川村 哲也

「腎臓は再生できるか」東京大学腎臓再生医療  
講座、菱川 慶一

H. 知的所有権の取得状況

「浮遊担体および浮遊・回収方法」

発明者：菱川慶一、三浦茂樹、吉岡浩、森有一

出願年月日：平成15年3月7日

特願：2003-061810

国際特許出願（成立済み）

## 厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

### 分担研究報告書

ヒト間葉系幹細胞を用いた腎臓遺伝子治療法の開発

分担研究者 川村哲也 東京慈恵会医科大学助教授

#### 研究要旨

腎臓再生の臨床応用に向けての大きな問題点は、腎臓という臓器は解剖学的に非常に複雑で、また独自に違った機能を持つ細胞がネットワークを形成して腎機能を発揮していることである。つまり例えばメサンギウム細胞だけ、または尿細管上皮だけ再生しても腎臓として統合的に機能できないことが予想される。そこで我々は腎機能を持った構成単位の再生が可能か検討するために、外来の骨髄由来間葉系幹細胞をラットの中腎管が発芽する部位に注入し、空間的・時間的に発生のプロセスと類似した刺激を与えた。その結果ドナー細胞由来の尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞、間質細胞に分化することが確認され、さらに糸球体上皮細胞は連続性を持って尿細管上皮に移行しており、ネフロンの一部を形成していることが示された。この事象を基に、リソゾーム代謝酵素欠損によって先天性腎障害を生じる Fabry 病の腎臓の一部のネフロンを wild type に入れ替えることにより、異常に蓄積した脂質を低下させることに成功した。

#### A. 研究目的

近年失われた臓器の再生医学は、障害を受けた部位の治療ではなく治癒を目標としており、医学研究のひとつの共通した魅力的な課題として、血管、肝臓、膵臓等をはじめ精力的に研究が進められている。これまで腎臓領域においても進行した腎不全に対し透析によるとりあえずの延命は期待できるものの患者の QOL 向上には結びつかず、また爆発的に増え続ける透析患者による経済負担はひとつの大きな社会問題にまで発展しており、失われた腎機能を再生医療にて蘇らせることは非常に魅力的な治療戦略と期待される。しかし残念ながら臨床応用にはまだまだ遠い道のりが残されている。その一番の問題点は腎臓という臓器は解剖学的に非常に複雑で、また独自に違った機能を持つ細胞がネットワークを形成して腎機能を発揮していることである。し

たがって心筋細胞の再生や膵臓β細胞の再生により心機能、膵機能の再生が期待できると違い、例えばメサンギウム細胞だけ、または尿細管上皮だけ再生しても腎臓として統合的に機能再生できないことが予想される。つまりこの腎臓の持つ疾患の多様性、解剖学的複雑性のため、腎臓再生の臨床応用には機能を持った腎臓構成単位（ネフロンもしくは臓器そのもの）を作り出さなければならない。このためにはこれまでの他臓器で行われてきた再生医療研究とは異にした全く新たなアプローチが必要になると考えられる。

我々の持つ腎臓は後腎組織よりなり、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形成される。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こと