

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14年度～16年度 総合研究報告書 (1/2冊)

主任研究者 林 松彦

平成17年(2005年)4月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

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、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 NF κ B 活性化に関連する幾つかの物質を同定し、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すとともに、糖尿病腎症の進展にプロレニンとその受容体が中心的役割を果たすことを証明した。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、ES 細胞と骨髄由来内皮前駆細胞の有用性を、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。また、骨髄由来内皮前駆細胞は急性腎炎モデル動物の腎障害回復を促進することが示され、細胞療法への有用性が示唆された。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、Sall 1、LIF、Wnt-4、Ets 1 など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

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、代謝面等で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

詳細な臨床表現型、すなわち腎生検病理組織所見と臨床経過データが記録された症例について、下記のような倫理的配慮のもと、末梢血白血球からゲノミック DNA を抽出し、保存

した。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、3 年間にわたり継続的に症例数を追加した。

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, Fc α receptor, Transferin receptor など) の遺伝子多型を解析した。また、欧米の家族性 IgA 腎症で連鎖が報告された 6 番染色体長腕 22-23 領域についてマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析を行った。

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

IgA 腎症の進行に関しては、IgA 腎症の腎機能の予後と、血管作動性物質、サイトカイン・ケモカイン、食塩感受性に関与する遺伝子群との関連を解析した。

2 腎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。

これまでの研究で、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、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 週間で後述の変異 I κ B 組み込みアデノウィルス (Adex I 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+Adex I 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。

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。

これまでの検討で、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、さらに培養ヒト近位尿細管上皮細胞 (PTEC) 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 A (SR-A) 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、尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化について、動物モデル及び PTEC の初代培養系を用いた解析を以下のごとく行った。

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、RT-PCR 法にて解析した。市販のヒト腎由来の PTEC は Clontics 社から購入した。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。ラット糸球体足細胞由来のマクロファージ様細胞に対するモノクローナル抗体 OS-3 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

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。

対象動物として C57B6、ddY、HIGA(IgA 腎症モデル)、ICR、ICGN (ネフローゼモデル) を用いた。腎臓 SP 細胞調整は各マウスモデルをエーテル麻酔後、マウス腎臓を取り出し、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、コラゲネース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。また、ブタでの解析はマウスと組織硬度等が異なる為、hoechst の濃度は、1、2、5、7.5 μ 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。

腎臓 SP 細胞マイクロアレイ解析には分取した SP 細胞より RNA 抽出後、cRNA 増幅法を用い、cy3, cy5 でラベル後、3800 遺伝子の合成オリゴを配置したガラスアレイと

hybridize させ、GenePIX4000 にて解析した。

腎臓 SP 細胞培養は TypeI collagen gel および ES 細胞用調整済み培地 (大日本) にて 21 日間 3 次元培養した。腎臓 SP 細胞を FACS 分離直後、TypeI collagen gel に分散し、1 時間 CO₂ incubator 内で 37°C に保ち、ゲル化を確認後、ES 細胞用調整済み培地を添加した。培地は隔日に交換した。

免疫組織染色には組織切片を 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°C、2 μg/ml の goat anti-mouse myosin/MyoR polyclonal antibody (Kamitya) で overnight 処理を行い、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。

Real time PC は ready made TaqMan probe および ABI PRISM7000 を用いた。慢性腎不全モデルを作成するためアジュバンド投与に引き続き、抗 GBM 抗体を投与した。また、TrichostatinA 投与は DMSO に溶解し、21 日連続皮下注射を行った。

さらに、採取した SP 細胞 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。また、SP 細胞の in vitro におけるメサンギウム細胞への分化能の有無を検討するために培養実験を行った。すなわち、EGFP トランスジェニックラット腎臓の SP 細胞を調製する 1 日前に、野生型ラット骨髄より骨髄細胞を調製し、DMEM/10% FCS/10%

horse serum/0.5% chick embryo extract/4% penicillin-streptomycin と共に、1 型 collagen をコートしたディッシュに播き、37° C、5% CO₂ 環境で 24 時間培養を行った。接着しなかった細胞を回収し、EGFP ラット腎臓から調製したばかりの SP 細胞と混合し、4 型 collagen をコートしたディッシュに播いて、37° C、5% CO₂ で培養を行った。48 時間後、メディウムを分化用培地 (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) に交換した。6 日後、細胞を冷メタノールにて 5 分間固定し、mouse anti-Thy1 antibody、rabbit anti-desmin antibody で染色した。

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、メサンギウム細胞と上皮細胞の分化誘導を目的とした。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 を添加して、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 を発現することを確認した。さらに、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を加えた。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。尿細管細胞の指標である aquaporin1、KAP (kidney androgen binding protein)、Tamms-Holl 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。さらに腎細

胞への分化条件を検討しながら、in vivo で Lac-Z 遺伝子を組み込んだ ES 細胞を腎内に注入し、腎細胞への分化誘導を目指した。

3 骨髄細胞の腎構成細胞への分化誘導と生体における役割

ドナーラット (4-6 週齢 SD ラット) を深麻酔下に屠殺し、大腿骨・脛骨・腓骨の内腔を Medium-199/2% FCS を用いてフラッシュすることにより、骨髄細胞を採取した。その後、全身 X 線照射 (5- 10 Gy/個体) を施したレシピエントラットの尾静脈より骨髄細胞を投与し、骨髄移植とした。

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 μ m のポリエチレンテレフタレート製不織布を積層充填したものである。エチレンオキシ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 5×10^6 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。骨髄細胞を採取した後、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、24 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 24 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。また、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。

4 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くわけではなく、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 発現アデノウィルスの作成を行った。このアデノウィルスは間葉系幹細胞に一過性に GDNF を発現させ得ることをウェスタンブロット法にて確認した。

作成したアデノウィルスを用いてヒト間葉系幹細胞に GDNF を強制発現させた。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ィルスを用いて 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た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 48 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。

5 骨髄由来血管内皮前駆細胞による細胞療法の可能性の検討

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。ルイスラット骨髄単核細胞を、既報の内皮系分化方法に従い培養し注入実験に用いた。抗 Thy-1 抗体を投与して腎炎を惹起し、1 日後に蛍光色素 CM-Dil でラベルした培養骨髄細胞 1.0×10^6 個を左腎動脈内に注入した。7 日後に糸球体変化、メサングウム活性化(α SMA 発現)、糸球体内皮密度、マクロファージ浸潤を評価した。

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・発達因子の変化を以下のごとく検討した。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。虚血再灌流後の回復における Wnt-4 の役割を明らかにするため、その発現を Western blot、real-time PCR 法、共焦点レーザー顕微鏡を用い検討を行った。Wnt-4 の発現する細胞の同定を行うために、近位尿細管のマーカである aquaporin1 と Wnt-4 の二重染色を行った。また Wnt-4 発現細胞が、分裂細胞であるかどうか、PCNA との二重染色を行った。次に Wnt-4 の細胞内局在を調べるために、ゴルジ装置のマーカである GP130 との二重染色を行った。さらに Wnt-4 と beta-catenin の細胞増殖への機能を解析するために、培養尿細管細胞である LLC-PK1 細胞に Wnt-4 と beta-catenin を electroporation 法にて強制発現をした時の細胞増殖を、FACS と 3H-thymidine の取り込みで検討した。さらに Wnt-4 と beta-catenin 強制発現をした時の cyclin D1 の promoter 活性と蛋白発現の変化を検討した。Ets-1 についても検討を加えた。上記の実験と同様に、ラットの左腎動脈を一時間虚血再灌流後の Ets-1 の発現を Western blot および real-time PCR 法にて検出した。また Ets-1 の発現を組織学的に検討を行った。Ets-1 の発現する細胞の同定を行うために、近位尿細管のマーカである aquaporin1 と Ets-1 の二重染色を行った。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。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 をアデノウィルスを用いて強制発現をした時の細胞増殖を、FACS と 3H-thymidine の取り込みで検討した。さらに Ets-1 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。また、Jagged-1、Notch、Hes1 の発現を Western blot、real-time PCR 法および共焦点レーザー顕微鏡を用い検討を行った。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

これまでの検討では、骨髄間葉系幹細胞などからの効率良い腎構成細胞誘導には成功していない。既知の因子のみでは腎臓再生は困難と考え、発生途上にある腎組織から、新たな分化誘導因子同定を試みた。胎生12日のマウス胎仔後腎を摘出し組織培養を行った。摘出した後腎を polycarbonate filter 上で培養すると、4日間は体外で分化が進行することから、この体外での腎臓の分化に関わる因子の同定を行った。この過程には hepatic growth factor をはじめ、幾つかの成長因子が関与することが知られているが、これまで我々を始めとして後腎組織の分化・発生には protein kinase C (PKC) 活性化が必要とされることが判明し

ており、その protein kinase C の下流にある蛋白の同定を試みた。培養後腎組織に PKC 阻害薬として C2 ceramide を、PKC 活性化薬として phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を各々 72 時間作用させた後 RNA を抽出し、differential display 法により PMA 処置により誘導される遺伝子同定を行った。

尿管芽の発育は抗pancytokeratinを用いた免疫染色で、尿細管形成の評価は、FITC 標識 lotus tetragonolobus (LT) lectin による蛍光染色により各々評価した。Recombinant 蛋白は reticulocyte lysate system により作成し、apoptosis は TUNEL 法により、細胞増殖は放射性 thymidine 取り込み量の測定により、各々評価した。この研究により後腎組織の分化促進因子として MTF-1 を同定したことから、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。

腎細胞の増殖分裂の日内変動を観察するため日本 SLC より野生型 Sprague-Dawley (SD) ラットを購入し、SPF 環境で以下のごとく飼育した。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、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。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。治療群では、10 mg/kg または 20 mg/kg のレチノイン酸を皮下投与し、その効

果を組織学的、生化学的に評価した。

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。また、Sall ファミリーの 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体に迫った。

(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、当学動物実験基準ののっとりて研究を行った。

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 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守した。IgA 腎症の遺伝子解析では、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 IgA 分子受容体および処理機構をコードする遺伝子群について

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)、アシアロ糖蛋白受容体 (ASGPR; asyalo-glycoprotein receptor)の 3 種が、従来から知られていた。IgA 分子は 40mg/KgBW と他のどの免疫グロブリンよりも多量に産生され、粘膜上皮細胞を越えて消化管、気道、尿中などに分泌されている。多価 IgA は必ず粘膜上皮細胞上で pIgR に結合し、この C 末端側が切断されて分泌成分 (secretory component) となって分泌される。そこで、粘膜免疫において重要な役割を果たす pIgR の遺伝子多型について検討し、pIgR exon4 の転写開始点から 161 塩基対上流に T/G の SNP があり、IgA 腎症で他の腎炎や健常人に比較して有意に G アリルが多いことを見出した。その後、興味深いことに、pIgR ノックアウトマウスでは、著しい高 IgA 血症を呈するが、明らかな糸球体病変は生じないことが報告された。したがって、観察された pIgR 遺伝子との関連は、IgA 腎症ではなく、高 IgA 血症との間に成立している可能性が高い。

IgA 処理機構には他に、Fc α R があるが、Fc α R 遺伝子のプロモータ領域を含む 5' 上流領域に 3 箇所の SNP があることを見だし、IgA 腎症との関連を解析したが他の腎炎患者との差を認めなかった。免疫グロブリン heavy chain や、IgA constant region promoter 領域の遺伝子多型と本疾患の関連は既に報告されて

いるが、その後追試した報告はなされていない。IgA 腎症症例の約半数に血清 IgA 値の上昇が見られ、IgA の過剰産生がその主な原因と考えられており、その機序を説明する手がかりになりうる。今後さらに多数例で検討する必要がある。

ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の同定

東京大学医科学研究所(中村祐輔教授ら)を中心として、さまざまな形質(病気)に影響する可能性のある SNP を主体とした遺伝子多型を、ゲノムワイドにすべて同定するプロジェクト(JSNP; <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)が進行している。この研究に同意が得られた IgA 腎症症例の DNA を提供し、協力した。この成果の一部として、細胞間接着分子のセレクチン(L-selectin, E-selectin)遺伝子多型、HLA-DRA 遺伝子、前述の pIgR 遺伝子、そして Immunoglobulin mu binding protein 2 遺伝子が現在までに同定されている。この研究では、症例-対照研究(case-control study)でそれぞれの遺伝子型頻度に統計学的有意差がみられたことを報告しているが、これらの遺伝子の多型が何故 IgA 腎症の発症と関連するのかについては、今後解析する必要がある。また、家族性 IgA 腎症でさえも、複数の原因遺伝子座の存在が疑われており、当然複数の他の候補遺伝子が、今後も同定される可能性が高い。JSNP などのデータを有効に活用した大規模な遺伝子解析を、さらに進める必要があると考えられる。

ウテログロビン遺伝子多型と IgA 腎症の進行の関連

ウテログロビン(UTG; Uteroglobin)分子はフィブロネクチン(fibronectin)と IgA の結合を抑制し、IgA の糸球体メサンギウム沈着を

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

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。そこで、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

イブブロック)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中である。

IgA 腎症の進行に影響する遺伝的背景 (レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系)

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

日本人では Angiotensinogen 遺伝子 (AGT) 235T のアレル頻度が 80%以上と白人に比べて著しく高いため、日本人集団での独自の解析が必要である。AGT A-20C 多型が AGT の転写活性に直接影響し得ることに着目し、この SNP と IgA 腎症の予後との関連を解析した。結果、少なくとも日本人においては、AGT M235T 多型よりは、この AGT A-20C 多型が予後 (腎機能生存率) に影響することを報告した。腎生検時に腎機能が保たれていて 2 年以上の経過が明らかであった IgA 腎症 137 例の、腎生検時の臨床所見のうち、腎死の発生に対する Cox 比例ハザードモデルで有意差が検出されたものは、尿蛋白 (1g/day 以上)、高血圧の合併とともに、AGT-20 の C アレル、であった。つまり、AGT-20 の位置の一つでも C アレルを有する症例は、AA 遺伝子型の症例に比較して 3.6 倍 (95%信頼区間 1.5-8.7、 $P=0.004$) 腎不全発生の危険性が高いという結果であった。

さらに、ACEI や ARB などのいわゆる RAS 阻害薬の腎保護効果に対して、この遺伝子の

多型が影響するかどうかを検討した。結果、最もアンジオテンシノーゲン発現活性が低いとされる A-20&M235 型ハプロタイプを一つでも有する約 1/3 の症例では、RAS 阻害薬の腎保護効果が有意ではなかった。一方、それ以外の約 2/3 の症例においては、明らかに長期的な RAS 阻害薬の腎機能保護効果を認めた。

同様に、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子の多型についても解析し、従来報告の多かったイントロン 16 の挿入/欠失多型では影響が無いが、エクソン 17 の A2350G 多型が、IgA 腎症の長期予後と、RAS 阻害薬の腎保護効果に関連することを報告した。

さらに、塩分感受性に影響することが知られている α -adducin 遺伝子多型は、単独では IgA 腎症の予後に有意な影響はないが、日本人で多い ACE 遺伝子 II 型の群では有意に腎機能の予後と関連することも報告した。

その他

① Sa 遺伝子は高血圧自然発症ラットの腎臓から同定され、近位尿細管などのミトコンドリアにおけるエネルギー代謝に関わることが分かっている。ヒトでも、この遺伝子多型と高血圧との関連が示唆されているが、否定的な報告もあり、詳細は不明であった。この遺伝子多型は健常人では血圧に影響しないが、腎炎症例では関連があり、予後に影響する可能性もあることを見出した。

② アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 遺伝子多型と IgA 腎症の腎機能の予後を検討し、男性では予後に影響しないが、女性では大きな影響を及ぼす可能性があることを報告した。

③ 先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子として同定されたネフリン遺伝子 (NPHS1) は、糸球体上皮細胞足突起に発現しており、蛋白

の透過性を規定する。この NPHS1 に複数の多型が報告されたが、臨床表現型との関連は不明であった。IgA 腎症の尿蛋白と腎機能が、NPHS1 多型に関連することを見出した。

④ PPAR γ は、脂質代謝、インスリン感受性、免疫反応に関与しており、心血管疾患との関連が報告されているが、PPAR γ 多型と腎疾患の関連は不明であった。私共の検討では、高血圧の無い群に限り、腎機能の予後に、PPAR γ C161T 多型が影響することが明らかであった。

⑤ 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。

⑥ 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。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。

2 腎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 κ 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 κ 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、NF κ 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 κ 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 κ 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 κ B 阻害

はこの減少を防ぐことが示された。

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。

これまで、市販のヒト培養 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 刺激では増加しなかった。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、無刺激と比較して 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。正常ラット腎皮質では、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ーである CD68 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、CD68 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 CD68 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、CD68 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、CD68 陽性の細胞数は BUN と良く相関するのに対し、oil red-O 陰性、CD68 陽性の細胞数は BUN と相関しないことがわかった。成熟マクロファージのマーカーであるスカベンジャー受容体 A (SR-A) についても調べたところ、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

CD68 陽性 PTEC よりその数が多かった。

これまで調べたヒト培養 PTEC では、同細胞の脂質取り込みに関与すると考えられている megalin 及び cubilin の発現レベルは極めて低く、またマクロファージ関連抗原の発現誘導のレベルも低いことから、より良い *in vitro* の実験系が必要と考えられた。そこで次に、正常ラット腎より単離した近位尿細管をそのまま培養することにより、megalin、cubilin に依存的な脂質取り込み機構を保持した新たな実験系を構築し、さらにこの系を用いて、PTEC がマクロファージ様細胞へと変化するかを調べた。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°C 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。またその一部は抗 CD68 抗体や抗 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、これらの細胞が確かに尿細管上皮細胞由来であるかどうかを調べるために、上皮細胞のマーカー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、上皮細胞のマーカーの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 CD68 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。

次にこれらの現象が 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増加させると両 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、上皮細胞のマーカーである 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。

新潟大の清水らは、ラット糸球体を培養すると、足細胞の一部からマクロファージの性質を有した細胞が培養液中に浮遊してくること、そのような細胞に対するモノクローナル

抗体 OS-3 はラット腎炎モデルにおける半月体中の細胞と反応することを報告している。そこで我々は、尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化について、この OS-3 抗体を用いて調べた。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 PTEC 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 PTEC 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 PTEC 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 PTEC 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。また、我々が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 SR-A 抗体と OS-3 抗体との二重染色を行った結果、SR-A 陽性となった細胞は OS-3 も陽性であったことから、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 抗体の反応性を報告しているが、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 WKY ラット半月体性腎炎モデルにおける尿細管上皮細胞の OS-3 抗体の反応性を調べた。同モデルの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 陰性であり、2 週目に一部の糸球体で多数の OS-3 陽性細胞が観察されても PTEC は陰性であった。一方、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 PTEC 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 6 週目の腎炎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

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、腎臓 SP 細胞に特異的に発現している転写因子 MyoR/musculin 染色の結果、腎臓 SP 細胞は腎臓間質に存在していることが明らかとなった。また、3 次元培養では、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。

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。また、腎臓 SP 細胞は腎臓保護的因子 (BMP7, HGF, VEGF) を産生し、これら保護的因子の産生は転写因子 MyoR/musculin により制御されていた。HDAC 阻害薬である trichostatinA は MyoR/musculin の発現を抑制し、慢性腎不全の進行を抑制した。臨床への応用を考慮し、中型動物であるブタの腎臓 SP 細胞の有無を検討したが、マウスと同様の特性を持つ SP 細胞はブタでも存在した。

一方、マウス骨髄においては、造血幹細胞は SP 細胞分画に含まれていることが知られている。また、骨格筋から得られる SP 細胞が、放射線照射したマウスの骨髄造血能を回復させることも知られている。そこで、腎臓から得られた SP 細胞と骨髄との関係についても検討を加えた。EGFP ラットの骨髄を移植した野生型ラットの腎由来 SP 細胞には、EGFP 陽性細胞が 10%程度含まれていた。FSC および SSC 値は様々であり、これら腎に存在する骨髄起源 SP 細胞は、均一の細胞集団ではなく、多様な細胞が含まれていることが示唆された。また、腎由来 SP 細胞全体で見ると、白血球系統マーカーである CD45 陽性細胞は、約 1-3% にすぎないことから、骨髄起源と思われる腎

臓 SP 細胞の 7%程度は、CD45 陰性の細胞と考えられた。

腎由来 SP 細胞の *in vivo* における分化能を検討するために、EGFP ラット腎臓から SP 細胞を調製して、5Gy の X 線照射処置を行った野生型ラットに経静脈移植を行った。移植したラットでは、骨髄細胞の約 0.03%が EGFP 陽性であった。これら EGFP 陽性細胞を FACS 上、FSC/SSC で解析した際の分布は、EGFP ラット骨髄を解析した際の分布と同様であることから、腎由来 SP 細胞がレシピエントの骨髄に生着し、さまざまな系統あるいは分化ステージの娘細胞を産生していることが示唆された。レシピエントラットの骨格筋には、明らかに EGFP 陽性の筋線維が認められた。肝細胞においても、EGFP 陽性かつアルブミン陽性の細胞が認められた。すなわち、腎由来 SP 細胞は、生体内において、少なくとも造血系・骨格筋・肝細胞へと分化あるいは貢献することが示された。

以上の結果が得られているにも関わらず、レシピエントラットの腎臓には、EGFP 陽性細胞は観察されなかった。骨髄移植モデルラットに実験腎炎を誘発することによって、骨髄細胞が *in vivo* で糸球体メサンギウム細胞に分化することは後述のように示されている。そこで、腎由来 SP 細胞を移植したラットに、同様の実験腎炎を誘発してみたが、EGFP 陽性の糸球体メサンギウム細胞は認められなかった。EGFP ラット腎臓由来 SP 細胞を移植したレシピエントに、ゲンタマイシン腎症モデルを用いて検討したが、EGFP 陽性の尿細管上皮細胞は観察されなかった。また、骨髄由来細胞を *in vitro* でメサンギウム細胞へ分化させる実験系を、腎由来 SP 細胞に適用して検討したが、共存させた骨髄細胞がメサンギウ

ム細胞へ分化したにも関わらず、腎由来 SP 細胞はメサンギウム細胞へ分化しなかった。SP 細胞を全身投与しても、腎臓への選択的遊走（ホーミング）は認められなかった。

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、メサンギウム細胞と糸球体上皮細胞への分化誘導を行った。マウス ES 細胞を hanging drop 法で、EB(embroid 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 Nephritin、Podocin、Podocalyxine、Podoplanin の発現を検討したところ、EB 細胞への分化後 9 日目において、Nephritin、Podocin、Podocalyxine、Podoplanin の mRNA が RT-PCR 法にて検出された。また培養 12 日目の蛋白発現では、Nephritin、Podocin が Western blot で陽性となった。メサンギウム細胞への分化誘導としては、Megalin は EB 細胞培養 10 日より陽性になり、22 日まで検出された。in vivo で腎へ ES 細胞を注入したところ、teratoma の形成が観察された。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 発現が確認された。in vivo で腎へ ES 細胞を注入したところ、teratoma の形成が観察された。現在 LacZ 遺伝子を組み込んだ分化した EB 細胞を腎内に注入し、腎細胞への分化誘導をめざしている。

3 骨髄細胞の腎構成細胞への分化誘導と生体における役割

ラット骨髄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。EGFP トランスジェニックラットの骨髄を移植した野生型ラットの骨髄細胞は、有核細胞および赤血球がともに EGFP を発現していた。移植した骨髄細胞の貢献度は約 80%程度であった。

移植したラット（キメララット）の腎臓では、間質領域に多数の EGFP 陽性細胞が観察されたが、尿細管上皮細胞には全く EGFP 陽性細胞は認められなかった。腎炎誘発前、発症 7 日後、発症 56 日後の腎組織を検討すると、PAS 染色及び抗 GFP 抗体染色像では、発症 7 日後にメサンギウム増殖像を認めるものの、56 日後では正常に回復していることが明らかであった。CD45 染色を検討すると、7 日後の細胞増殖期には多くの CD45 陽性細胞が糸球体に確認されるものの、56 日後には正常化していることが明らかであった。Thy1 の発現を検討すると、腎炎回復後の 56 日目には、Thy1 陽性の骨髄由来細胞が多数糸球体内に認められた。糸球体内の細胞数変化を見ると、回復後には糸球体細胞数が正常に回復したが、腎炎の発症、治癒に伴い、Thy1 陽性 GFP 陽性細胞数が増加していることが明らかであった。共焦点レーザー顕微鏡で Thy1 陽性 GFP 陽性糸球体細胞を観察すると、糸球体毛細血管を支持する構造をとっていた。以上より、この細胞は骨髄由来のメサンギウム細胞であると結論できた。さらに、骨髄由来細胞が尿細管上皮細胞に分化するという報告が散見されることから、我々も、骨髄移植モデルラットを用いてゲンタマイシン誘発腎症を作成して、再検討を行った。その結果、骨髄移植モデルでは、Tamm-Horsfall 蛋白陰性の尿細管セグメントに EGFP 陽性の尿細管上皮細胞が低頻度

ながら観察されることが明らかとなった。出現頻度は、皮質で0.42%、髄質で0.70%であった。

接着条件・液性因子をコントロールすることにより、骨髄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認した。この遺伝子導入効果は、PDGF中和分子を筋肉に発現させて分泌することで抑制されたことから、PDGF特異的な現象であることが確認された。

4 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。

5 骨髄由来血管内皮前駆細胞による細胞療法の可能性の検討

骨髄単核細胞由来内皮前駆細胞により細胞治療を行った腎臓では、無治療の腎臓に比べ、糸球体増殖性変化(治療 2.0 ± 0.1 vs 無治療 3.0 ± 0.1)、メサンギウム活性化(35.6 ± 2.1 vs $49.4 \pm 3.2\%$)、内皮障害(6.4 ± 1.2 vs 2.1 ± 0.4 個/ 0.001 mm^2)、マクロファージ浸潤(6.2 ± 0.8 vs 8.7 ± 0.9 個/糸球体)は、いずれも軽減された。取り込まれた細胞の20%弱は、RECA-1陽性であり、内皮障害軽減の一部は糸球体内皮への生着分化によると考えられた。骨髄単核細胞のVEGF産生能は培養により著明に増加し、産生される内皮増殖因子も内皮障害抑制に関与していると考えられた。

II 腎機能回復・再生のための分化誘導・再生因子探索