

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。

ラットの左腎動脈を一時間虚血再灌流後のWnt-4の発現をWestern blotおよびreal-time PCR法にて検出したところ、Wnt4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、E2F1、cyclin D1、cyclin Aの発現は12~24時間とWnt4の発現より遅いphaseで起った。またWnt-4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、Wnt-4は発現しないが、再灌流12時間後では、

Cortexで、尿細管にWnt-4の発現が認められた。Wnt4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Wnt-4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Wnt4が発現していることがわかった。またWnt-4発現細胞が、分裂細胞であるかどうか、PCNAとの二重染色も行った。Wnt-4の発現細胞は、PCNAも発現しており、Wnt-4発現細胞が細胞分裂を起こしていることがわかった。

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ーであるGP130との強拡大での二重染色も行ったところ、染色部位は、一致しており、分泌蛋白であるWnt-4は、ゴルジ装置に局在することが分かった、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ところ、Wnt-4, beta-catenin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ところ、Wnt-4を強制発現するとcyclinD1のpromoter活性は2.5倍に上昇し、さらにbeta-catenin, TCFを共発現させると、相加的にpromoter活性は上昇した。従って、Wnt-4-beta-catenin pathwayは、TCFを介してcyclin D1、Aの転写亢進をおこすと考えられた。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。

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 phase で起った。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。Control rat では Cortex、Medulla ともに、Ets-1 は発現しないが、再灌流 12 時間後では、Cortex 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、近位尿細管のマーカである 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 と Wnt-4 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 を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 cyclinD1 の promoter 活性は 3.6 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。

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こ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・誘導因子の検索

Differential display 法により PKC 活性化により後腎組織に誘導される遺伝子が 4 種同定された。この中で、未知のものは 1 種であり、この遺伝子について解析を進めた。まず、こ

の遺伝子は251のアミノ酸からなる蛋白をコードしており、Northren blottingにより、腎臓の他、心筋、脳、肝臓、精巣に多く発現していることが示された。特異的プライマーを用いて、各発達段階にある腎臓から採取したRNAにおいてRT-PCR法によりこの遺伝子のRNA発現を検討したところ、胎生12日以降の後腎組織で多く発現し、成体では減少することが示された。さらに、PKC活性化により後腎組織で誘導されることも確認された。この蛋白をMTF-1 (metanephros derived tubulogenic factor-1) と命名したが、MTF-1に対するアンチセンス導入により、後腎組織発達が著しく抑制されることが示された。一方、reticulocyte系で合成したMTF-1により後腎組織の尿管芽の発育、尿管の発育ともに促進されることが明らかとなった。この発育促進作用は、Tunnel法による検討ではapoptosisの抑制によるものではないことが明らかとなり、thymidine取り込み率の検討から細胞増殖の亢進によるものであることが示された。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給餌し、もう一方のグループは明期のみ給餌した。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。

新生ラット腎臓の被膜直下に存在するネフロン新生層から、高品質のRNAを再現性高く抽出する方法を開発し、Tornado Extraction法と命名し、報告した (具体的内容は方法の項に記載)。ラット腎臓の発達途上ネフロンおよび未分化組織から選択的にmRNA群を精製する方法を確立し、ネフロン発生に関与する可能性のある遺伝子候補を複数同定した。その中から、レチノイン酸合成酵素RALDH2に着目し、糸球体上皮細胞の修復への関与を検討した。この酵素に着目した理由は、胎児・胎仔期のビタミンA欠損が腎臓の発生異常や低形成を生じさせるため、ネフロンの再生に関しても重要な機能を担っているのではないか

と考えたからである。実際、puromycin aminonucleoside 腎症において、糸球体上皮細胞傷害の程度が最大となり尿蛋白排泄がピークとなる病後5日目を中心に、RALDH2が糸球体上皮細胞において著明に発現誘導されることが明らかとなった。これは、その産物であるレチノイン酸濃度も上昇していることを示唆する。そこで、レチノイン酸を皮下投与したところ、糸球体上皮細胞の修復が促進され、尿蛋白減少が促進されることが明らかとなった。すなわち、この動物モデルにおいては、Puromycinにより傷害を受けた糸球体上皮細胞が自己修復を行うが、それに先立ってRALDH2の発現が亢進すること、RALDH2の産物であるレチノイン酸が、糸球体上皮細胞の修復に関与することを意味する。

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。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接着部位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た。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。関連遺伝子であるSall2、3、4のノックアウトマウスを作成し検討を加えた。Sall2ノックアウトには異常はみられず、Sall1/2二重ノックアウトもSall1 KOと同様の症状であった。Sall4のノックアウトは予想外に胎生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、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 倍以上高いという事実と考え合わせると、重要な所見である。

本研究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。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することを証明した。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。この clusterin の mRNA および蛋白発現に付いて検討を加え、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、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。

さらに糖尿病腎症にレニン・アンジオテンシ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。

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

1995年に Neilson らのグループが、尿細管上皮細胞が線維芽細胞様の形質を獲得し得ることを報告して以来、*in vitro* 及び *in vivo* におけるこの変化 (epithelial-mesenchymal transdifferentiation あるいは epithelial-mesenchymal transition, EMT) に関する多くの論文が報告されている。また最近、遺伝子操作を用いた巧みな実験により、マウス腎症モデルにおいて確かに EMT が起きることが証明された。一方、尿細管上皮細胞が

マクロファージマーカーを発現するようになることが、ヒト腎症の腎生検サンプルにより示され、また前述のように、新潟大の清水らによってラット糸球体上皮細胞が *in vitro* の培養系においてマクロファージ様に変化することも報告され、腎の上皮細胞が EMT とは異なる分化転換をする可能性が指摘されている。

本研究において、ヒト培養 PTEC を用いて、マクロファージ様細胞への変化と EMT とを比較検討した。その結果、EGF 刺激による PTEC のマクロファージ様細胞への形質変化は、TGF- β による EMT と一部重なるものの、異なる変化であることが示唆された。従って、生体内における病的な状況においても、尿細管上皮細胞は異なる 2 種類の形質変化を行い得る可能性が示され、尿細管間質における炎症や線維化の過程において両者を区別して PTEC の関与を調べる必要があると考えられた。

本研究では、ヒト腎症で示唆された PTEC のマクロファージ様細胞への形質変化が、動物モデルでも起きるかについても検討した。この目的のために WKY ラットを用いた馬杉腎炎を利用した。抗糸球体基底膜抗体を WKY ラットに投与すると激しい半月体形成性腎炎が惹起されて約 1 週間後までに尿蛋白の上昇が起き、その後次第に腎機能が低下して、動物は慢性腎不全から死に至る。これまでの実験から抗糸球体基底膜抗体投与後 2 週目には既に間質の線維化も起き始め、糸球体病変の進展に伴って尿細管間質の変化が進むことがわかっている。そこでこのモデルについて経時的に組織学的検討を加えた結果、ヒトで観察されたような尿細管上皮細胞内の脂質の蓄積及び CD68 や SR-A の発現が見られ、その程度は経過を追って激しくなることがわかった。

ヒト腎症において、尿管管腔内に脂質を蓄積した大型のマクロファージが出現し、その数は腎機能低下の程度と相関することが明らかとなっているが、同じ現象が動物モデルにおいても見られることが確認された。

PTEC がマクロファージ様細胞に変化し得ることを確かめるために、ラット腎より単離した近位尿管から outgrowth する PTEC を用いた実験を行った。これは市販のヒト PTEC を含め、たとえ初代培養の PTEC であっても、数代の継代を行うことで megalin、cubilin、DPPIV などの PTEC の再吸収の機能と密接に関連した蛋白質の発現が非常に低下しているために、これらの細胞は病態時における PTEC の状態を反映していないと考えたためである。実際、ラット近位尿管から outgrowth した PTEC は数日の培養により、これらの蛋白質の遺伝子発現が急速に減少することが観察された。一方、このラット PTEC によるマクロファージマーカーの発現の程度は、これまでヒト PTEC で観察したマクロファージマーカーの発現の程度より遥かに強かった。そこで本研究では、この系を用いてマクロファージ様細胞への形質変化をさらに調べた。

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。本研究結果から、単離近位尿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のかも知れない。

脂質を蓄積したマクロファージが疾患に関与する例として、動脈硬化における泡沫細胞が良く知られている。泡沫細胞は血管壁に入り込んだマクロファージが脂質を多量に蓄積することで形成され、様々な炎症性サイトカインを産生するとともにリンパ球などの相互作用を持ちながら炎症反応を進めると考えられている。本研究で示された PTEC の形質変化は、動脈硬化における泡沫細胞との類似が考えられ、また間質にはリンパ球浸潤も見られることから、動脈硬化における病変と類似した分子機構がある可能性があると考えている。

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、PTEC 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。すなわち、OS-3 抗原の発現が起きる細胞の一部に CD68 や SR-A の発現亢進が起きることがわかった。後者の発現が時間的に遅れるだけなのか、あるいは細胞によって後者の発現が起きない場合があ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もなって広範に起こる現象であり、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未だに不明であるが、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。

【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。また、腎臓 SP 細胞は多分化能を持ち、腎臓間質に局在し、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 細胞の減少および腎臓機能をも回復させたことから、腎臓 SP 細胞を用いた細胞治療が可能と思われる。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を検証していくことが必要であると考えられた。一方、MyoR/musculin 発現を抑制する HDAC 阻害剤 TSA が慢性腎不全の進行を抑制したことから、新しい治療薬の開発が期待される。

このように SP 細胞による細胞療法の可能性が示唆されたが、経静脈的に移植した腎臓由来 SP 細胞が、骨格筋・肝臓・血液細胞に分

化した条件下にあっても、腎臓には定着しなかったこと、腎構成細胞へは分化しなかったこと、骨髄移植モデルでは尿細管上皮への分化が生じる条件下で SP 細胞は尿細管上皮へ貢献しなかったことなどの結果より、腎臓に存在する SP 細胞自身は腎臓の組織幹細胞ではない可能性が高い。むしろ、非 SP 領域に、メサングウム細胞や尿細管上皮細胞に貢献する細胞が含まれている可能性が推測される。前述の SP 細胞投与による腎機能回復促進のデータと併せて、SP 細胞自身が幹細胞というよりは、幹細胞に働きかけて分化・再生を促す作用を有する可能性が支持される結果といえよう。

ES 細胞の可能性について検討を加えた。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。また我々のもう一つのアプローチである 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、メサングウム細胞の分化への可能性が示された。糸球体自体の再生にはまだ程遠く、多くの、越えなければならない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、培養骨髄細胞の腎臓内注入は糸球体腎炎モデルにおいて内皮障害抑制作用を示し、炎症性変化を抑制した。血管新生細胞療法が糸球体疾患治療として有望であることが示された。

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なが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。

尿管細胞の再生、増殖誘導を引き起こす遺伝子として、Wnt-4、Ets-1、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、Wnt-4、Ets-1、Jagged-1、Notchシステムが近位尿管に劇的に発現亢進することをはじめて確認し発表した。また培養尿管細胞にWnt-4を強制発現した時に、細胞周期調整遺伝子のcyclin D1の転写活性が亢進し、細胞周期が促進することを検討し、尿管細胞の再生のメカニズムを解明した。

Wnt-4さらにbeta-cateninとTCFの遺伝子導入下で、相加的にcyclin D1の転写活性と細胞増殖能がLLCPK1細胞で亢進したという実験結

果は、Wnt-4の遺伝子導入により、尿管細胞は再生、分裂能を獲得し、胎生期の尿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Wnt-4、Ets-1、Jagged1陽性細胞が出現することは、尿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。

さらに、腎臓再生・発生因子に関わる因子として、LIF、時計遺伝子、Sall1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

腎臓再生促進・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、実用性を考えるとき、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. 研究発表

1. 論文発表

1. Osafune K, Nishinakamura R, Komazaki S, Asashima M. In vitro induction of the

- pronephric duct in *Xenopus* explants. *Development Growth and Differentiation* 44(2):161-7,2002
2. Yoshida T, Yoshino J, Hayashi M, Saruta T. Identification of a renal proximal tubular cell-specific enhancer in the mouse 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase gene. *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (6): 1455-63, 2002
 3. Narita I, Saito N, Goto S, Shirasaki A, Morioka Y, Jin S, Omori K, Sakatsume M, Arakawa M, Gejyo F. Role of genetic polymorphism in the SA gene on the blood pressure and prognosis of renal function in patients with IgA nephropathy. *Hypertension Research* 25 (6): 831-836, 2002
 4. Ichikawa Y, Ishikawa T, Takahashi S, Hamaguchi Y, Morita T, Nishizuka I, Yamaguchi S, Endo I, Ike H, Togo S, Oki S, Shimada H, Kadota K, Nakamura S, Goto H, Nitanda H, Satomi S, Sakai T, Narita I, Gejyo F, Tomaru Y, Shimizu K, Hayashizaki Y, Okazaki Y. Identification of genes regulating colorectal carcinogenesis by using the algorithm for diagnosing malignant state method. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (2): 497-506, 2002
 5. Kaimori JY, Takenaka M, Nagasawa Y, Nakajima H, Izumi M, Akagi Y, Imai E, Hori M. Quantitative analyses of osteopontin mRNA expression in human proximal tubules isolated from renal biopsy tissue sections of minimal change nephrotic syndrome and IgA glomerulonephropathy patients. *American Journal of Kidney Diseases* 39 (5): 948-57, 2002
 6. Akiyama F, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Tsunoda T, Maeda S, Takei T, Obara W, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Nitta K, Yumura W, Nihei H, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Suzuki Y, Fujioka T, Narita I, Gejyo F, Nakamura Y. Single-nucleotide polymorphisms in the class II region of the major histocompatibility complex in Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Journal of Human Genetics* 47 (10): 532-538, 2002
 7. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Nagasawa Y, Kosugi A, Kawamoto S, Imai E, Hori M, Okubo K. Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney International* 61 (5): 1577-87, 2002
 8. Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, Takeji M, Oseto S, Murozono T, Ando A, Imai E, Hori M. Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney International* 61 (5): 1684-95, 2002
 9. Narita I, Saito N, Goto S, Jin S, Omori K, Sakatsume M, Gejyo F. Role of uteroglobin G38A polymorphism in the progression of IgA nephropathy in Japanese patients. *Kidney International* 61 (5): 1853-1858, 2002
 10. Ito Y, Kawachi H, Morioka Y, Nakatsue T, Koike H, Ikezumi Y, Oyanagi A, Natori Y, Natori Y, Nakamura T, Gejyo F, Shimizu F. Fractalkine expression and the recruitment

- of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney International* 61 (6): 2044-57, 2002
11. Ito T, Suzuki A, Imai E, Horimoto N, Ohnishi T, Daikuhara Y, Hori M. Tornado extraction: a method to enrich and purify RNA from the nephrogenic zone of the neonatal rat kidney. *Kidney International* 62 (3): 763-9, 2002
 12. Kuroda M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Mifune M, Nakaya H, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T. Glucocorticoid regulation of proteoglycan synthesis in mesangial cells. *Kidney International* 62 (3): 780-9, 2002
 13. Goto S, Narita I, Saito N, Watanabe Y, Yamazaki H, Sakatsume M, Shimada H, Nishi S, Ueno M, Akazawa K, Arakawa M, Gejyo F. A(-20)C polymorphism of the angiotensinogen gene and progression of IgA nephropathy. *Kidney International* 62 (3): 980-985, 2002
 14. Okado T, Terada Y, Tanaka H, Inoshita S, Nakao A, Sasaki S. Smad7 mediates transforming growth factor- β -induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney International* 62 (4): 1178-1186, 2002
 15. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Akiba T, Sasaki S. Ligand-regulatable erythropoietin production by plasmid injection and in vivo electroporation. *Kidney International* 62 (6): 1966-1976, 2002
 16. Takei T, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Ohnishi Y, Yamada R, Maeda S, Tsunoda T, Takeoka S, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Suzuki Y, Fujioka T, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Narita I, Gejyo F, Nihei H, Nakamura Y. Association between single-nucleotide polymorphisms in selectin genes and immunoglobulin A nephropathy. *The American Journal of Human Genetics* 70 (3): 781-786, 2002
 17. Nakamura H, Isaka Y, Tsujie M, Rupprecht HD, Akagi Y, Ueda N, Imai E, Hori M. Introduction of DNA enzyme for Egr-1 into tubulointerstitial fibroblasts by electroporation reduced interstitial α -smooth muscle actin expression and fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats. *Gene Therapy* 9 (8): 495-502, 2002
 18. Ou ZL, Hotta O, Natori Y, Sugai H, Taguma Y, Natori Y. Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in IgA nephropathy. *Nephron* 91 (2): 262-9, 2002
 19. Nakaya H, Sasamura H, Mifune M, Shimizu-Hirota R, Kuroda M, Hayashi M, Saruta T. Prepubertal treatment with Angiotensin receptor blocker causes partial attenuation of hypertension and renal damage in adult dahl salt-sensitive rats. *Nephron* 91 (4): 710-8, 2002
 20. Ohashi T, Uchida K, Uchida S, Sasaki S, Nihei H. Intracellular mislocalization of mutant podocin and correction by chemical chaperones. *Histochemistry and Cell Biology* 119 (3): 257-264, 2003
 21. Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Molecular mechanisms of Bartter syndrome

- caused by mutations in the BSND gene. *Histochemistry and Cell Biology* 119 (6): 485-493, 2003
22. Suzuki A, Ito T, Imai E, Yamato M, Iwatani H, Kawachi H, Hori M. Retinoids regulate the repairing process of the podocytes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (4): 981-91, 2003
 23. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(5):1223-33, 2003
 24. 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- κ B and Bad. *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (6): 1427-1434, 2003
 25. Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Hayashi M, Saruta T. Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure. *Journal of American Society of Nephrology* 14 (12): 3090-101, 2003
 26. Daniel C, Takabatake Y, Mizui M, Isaka Y, Kawashi H, Rupperecht H, Imai E, Hugo C. Antisense oligonucleotides against thrombospondin-I inhibit activation of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *American Journal of Pathology* 163 (3): 1185-92, 2003
 27. Kaneko Y, Sakatsume M, Xie Y, Kuroda T, Igashima M, Narita I, Gejyo F. Macrophage metalloelastase as a major factor for glomerular injury in anti-glomerular basement membrane nephritis. *The Journal of Immunology* 170 (6): 3377-3385, 2003
 28. Sato A, Matsumoto Y, Koide U, Kataoka Y, Yoshida N, Yokota T, Asashima M, Nishinakamura R. Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 62-69, 2003
 29. 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. *Hypertension Research* 26 (6): 493-501, 2003
 30. 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. *Hypertension Research* 26 (11): 915-21, 2003
 31. 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. *Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 33519-27, 2003
 32. Yokoo T, Sakurai K, Ohashi T, Kawamura T. Stem cell gene therapy for chronic

- renal failure. *Current Gene Therapy* 3 (5): 387-394, 2003
33. Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Omori K, Kondo D, Sakatsume M, Gejyo F. Renoprotective efficacy of renin-angiotensin inhibitors in IgA nephropathy is influenced by ACE A2350G polymorphism. *Journal of Medical Genetics* 40 (12): E130, 2003
 34. Song J, Narita I, Goto S, Saito N, Omori K, Sato F, Ajiro J, Saga D, Kondo D, Sakatsume M, Gejyo F. Gender specific association of aldosterone synthase gene polymorphism with renal survival in patients with IgA nephropathy. *Journal of Medical Genetics* 40 (5): 372-376, 2003
 35. Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Ajiro J, Sato F, Saga D, Kondo D, Akazawa K, Sakatsume M, Gejyo F. Interaction between ACE and ADD1 gene polymorphisms in the progression of IgA nephropathy in Japanese patients. *Hypertension* 42 (3): 304-309, 2003
 36. Obara W, Iida A, Suzuki Y, Tanaka T, Akiyama F, Maeda S, Ohnishi Y, Yamada R, Tsunoda T, Takei T, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Yumura W, Ujiie T, Nagane Y, Nitta K, Miyano S, Narita I, Gejyo F, Nihei H, Fujioka T, Nakamura Y. Association of single-nucleotide polymorphisms in the polymeric immunoglobulin receptor gene with immunoglobulin A nephropathy (IgAN) in Japanese patients. *Journal of Human Genetics* 48 (6): 293-299, 2003
 37. Kobayashi S, Dono K, Tanaka T, Takahara S, Isaka Y, Imai E, Nagano H, Tomoaki K, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Gene transfer into the liver by plasmid injection into the portal vein combined with electroporation. *The Journal of Gene Medicine* 5 (3): 201-8, 2003
 38. 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. *The Journal of Gene Medicine* 5 (6): 510-7, 2003
 39. Takase O, Hirahashi J, Takayanagi A, Chikaraishi A, Marumo T, Ozawa Y, Hayashi M, Shimizu N, Saruta T. Gene transfer of truncated IkappaBalpha prevents tubulointerstitial injury. *Kidney International* 63 (2): 501-13, 2003
 40. Tsuboi N, Utsunomiya Y, Kawamura T, Kikuchi T, Hosoya T, Ohno T, Yamada H. Shedding of growth-suppressive gangliosides from glomerular mesangial cells undergoing apoptosis. *Kidney International* 63 (3): 936-946, 2003
 41. Carl M, Akagi Y, Weidner S, Isaka Y, Imai E, Rupperecht HD. Specific inhibition of Egr-1 prevents mesangial cell hypercellularity in experimental nephritis. *Kidney International* 63 (4): 1302-12, 2003
 42. Xie Y, Nishi S, Ueno M, Imai N, Sakatsume M, Narita I, Suzuki Y, Akazawa K, Shimada H, Arakawa M, Gejyo F. The efficacy of tonsillectomy on long-term renal

- survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney International* 63 (5): 1861-1867, 2003
43. 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 International* 64 (1): 2-10, 2003
 44. Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Okamoto A, Suzuki T, Shen J-S, Tanaka T, Kawamura T, Hosoya T. Gene delivery using human cord blood-derived CD34+ cells into inflamed glomeruli in NOD/SCID mice. *Kidney International* 64 (1): 102-109, 2003
 45. Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Omori K, Kondo D, Sakatsume M, Gejyo F. Angiotensinogen gene variation and renoprotective efficacy of renin-angiotensin system blockade in IgA nephropathy. *Kidney International* 64 (3): 1050-1058, 2003
 46. 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 International* 64 (4): 1179-88, 2003
 47. 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 International* 64 (4): 1241-52, 2003
 48. Song J, Sakatsume M, Narita I, Goto S, Omori K, Takada T, Saito N, Ueno M, Gejyo F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161T polymorphisms and survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clinical Genetics* 64 (5): 398-403, 2003
 49. Araki T, Hayashi M, Saruta T. Cloning and characterization of a novel gene promoting ureteric bud branching in the metanephros. *Kidney International* 64 (6): 1968-77, 2003
 50. Narita I, Goto S, Saito N, Song J, Kondo D, Omori K, Kawachi H, Shimizu F, Sakatsume M, Ueno M, Gejyo F. Genetic polymorphism of NPHS1 modifies the clinical manifestations of Ig A nephropathy. *Laboratory Investigation* 83 (8): 1193-1200, 2003
 51. Araki T, Hayashi M, Nakanishi K, Morishima N, Saruta T. Caspase-9 takes part in programmed cell death in developing mouse kidney. *Nephron Experimental Nephrology* 93 (3): E117-24, 2003
 52. 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
 53. 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
54. 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
 55. Nakayama N, Han CY, Cam L, Lee JI, Pretorius J, Fisher S, Rosenfeld R, Scully S, Nishinakamura R, Duryea D, Van G, Bolon B, Yokota T, Zhang K. A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage. *Development* 131 (1): 229-240, 2004
 56. Nakayama K, Natori Y, Sato T, Kimura T, Sugiura A, Sato H, Saito T, Ito S, Natori Y. Altered expression of NDST-1 messenger RNA in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 143 (2): 106-14, 2004
 57. 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. *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (2): 276-85, 2004
 58. Ma J, Matsusaka T, Yang H, Kawachi H, Shimizu F, Isaka Y, Imai E, Kon V, Ichikawa I. Local actions of endogenous angiotensin II in injured glomeruli. *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (5): 1268-76, 2004
 59. Takeji M, Kawada N, Moriyama T, Nagatoya K, Oseto S, Akira S, Hori M, Imai E, Miwa T. CCAAT/Enhancer-binding protein delta contributes to myofibroblast transdifferentiation and renal disease progression. *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (9): 2383-90, 2004
 60. 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
 61. Yazawa K, Isaka Y, Takahara S, Imai E, Ichimaru N, Shi Y, Namba Y, Okuyama A. Direct transfer of hepatocyte growth factor gene into kidney suppresses cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 19 (4): 812-6, 2004
 62. 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

63. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry* 279 (7): 6017-6026, 2004
64. 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
65. 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
66. Wang Y, Iwatani H, Ito T, Horimoto N, Yamato M, Matsui I, Imai E, Hori M. Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 (3): 961-7, 2004
67. 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
68. 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 International* 65 (1): 15-24, 2004
69. 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
70. Iwatani H, Ito T, Imai E, Matsuzaki Y, Suzuki A, Yamato M, Okabe M, Hori M. Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechst(low)/side population cells isolated from adult rat kidney. *Kidney International* 65 (5): 1604-14, 2004
71. Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, Mizuno S, Nakamura T, Ito T, Imai E, Hori M. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney International* 65 (6): 2041-53, 2004
72. 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
73. Isaka Y, Nakamura H, Mizui M, Takabatake Y, Horio M, Kawachi H, Shimizu F, Imai E, Hori M. DNazyme for TGF-beta suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney International* 66 (2): 586-90, 2004
74. Imai E, Nakajima H, Kaimori JY.

- Albumin turns on a vicious spiral of oxidative stress in renal proximal tubules. *Kidney International* 66 (5): 85, 2004
75. 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
76. Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, Sakurai K, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Takahashi M, Terada Y, Eto Y, Kawamura T, Osumi N, Hosoya T. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (9): 3296-300, 2005
77. 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
78. 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
79. 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
80. 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
81. 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
82. Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T, Hori M, Imai E. Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Therapy*, in press, 2005
2. 学会発表
1. 宮澤しのぶ、堀田 修、名取泰博：ヒト培養尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質転換の可能性、第45回日本

- 腎臓学会総会、2002年5月、大阪
2. 坂爪実、芝紀代子、大森健太郎、森岡良夫、後藤眞、成田一衛、下条文武：糸球体腎炎の尿プロテオミクスと尿免疫細胞の病的意義、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 3. 金子佳賢、坂爪 実、謝院生、黒田 毅、成田一衛、下条文武：ラット抗糸球体基底膜抗体腎炎における GeneChip による発現遺伝子の解析、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 4. 宋進、坂爪 実、成田一衛、後藤 眞、斉藤徳子、大森健太郎、上野光博、下条文武：IgA 腎症における Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) C161T 遺伝子多型と予後との関連、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 5. 後藤 眞、成田一衛、斉藤徳子、坂爪 実、大森健太郎、宋進、西 慎一、上野光博、今井直史、下条文武：IgA 腎症における Nephrin 遺伝子 G349A 多型の検討、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 6. 斉藤徳子、成田一衛、後藤眞、坂爪実、大森健太郎、宋進、上野光博、西慎一、下条文武：IgA 腎症における G 蛋白質 β 3 subunit 遺伝子 (GNB3) 多型の検討、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 7. 小林絵美、篠村裕之、三船瑞夫、清水良子、黒田真理、中谷英章、林 松彦、猿田享男：肝細胞増殖因子(HGF)が腎間質線維芽細胞のプロテオグリカン産生に与える影響とその機序の検討、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 8. 清水良子、篠村裕之、三船瑞夫、中谷英章、黒田真理、小林絵美、林 松彦、猿田享男：アンジオテンシンII (Ang II) タイプ2受容体は G α i/o 系を介してプロテオグリカン産生を調節する、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 9. 飯野靖彦、出浦照国、梅村 敏、川村哲也、北島武之、小山哲夫、椎貝達夫、杉崎徹三、鈴木洋通、富野康日己、林 松彦、山田研一、川口良人、桑原道雄、内田俊也、山崎 力：保存期腎不全患者における A II 受容体拮抗薬ロサルタンの抗蛋白尿効果、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 10. 井田 隆、山下裕美、安藤亮一、千田佳子、周立民、佐々木成、丸茂文昭：ウサギ血清病腎炎における細胞増殖に関する因子の検討、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 11. 岡戸丈和、寺田典生、田中啓之、島村治子、井下聖司、桑原道雄、一条秀憲、佐々木成：ASK1 遺伝子欠損マウスの片側尿管結紮(UUO)腎症におけるアポトーシスならびに線維化抑制効果とその検討、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 12. 島村治子、寺田典生、井下聖司、岡戸丈和、田中啓之、桑原道雄、佐々木成：シスプラチン急性腎不全モデルにおける PI3kinase-Akt pathway の役割—PI3 knockout mouse を用いて、第45回日本腎臓学会学術総会、2002年5月、大阪
 13. 寺田典生、田中啓之、岡戸友和、島村治子、井下聖司、桑原道雄、佐々木成、HGF 遺伝子の筋肉への in vivo エレクトロポレーションによる慢性腎不全ラットへの

- 遺伝子治療の試み、第45回日本腎臓学会
学術総会、2002年5月、大阪
14. 早麻 淳、内田信一、佐々木成、CLC-K2
クロライドチャネルはプロテアソームア
クチベーターPA28 alpha と相互作用を有
する、第45回日本腎臓学会学術総会、
2002年5月、大阪
 15. 廣田展久、市原淳弘、小浦優香子、多田
由布子、林 松彦、猿田享男：傍糸球体
細胞における圧依存性プロレニン産生・
分泌調節に対し培地糖濃度が及ぼす影響、
第75回日本内分泌学会総会、2002年6
月、大阪
 16. 小林絵美、篠村裕之、三船瑞夫、清水良
子、黒田真理、石黒貴美子、林 松彦、
猿田享男：肝細胞増殖因子（HGF）によ
るバイグリカン遺伝子発現調節機構の検
討、第25回日本高血圧学会総会、2002
年10月、東京
 17. 市原淳弘、林 松彦、廣田展久、小浦優
佳子、多田由布子、猿田享男：アンジオ
テンシン1型受容体欠損マウスの減弱化
した尿管管系球体フィードバック依存性
輸入細胞収縮反応における神経型一酸
化窒素合成酵素の関与、第25回日本高血
圧学会総会、2002年10月、東京
 18. 廣田展久、市原淳弘、小浦優佳子、多田
由布子、林 松彦、猿田享男：糖尿病ラッ
ト由来傍糸球体細胞において圧は
phospholipase D 経路を介して細胞内プロ
レニンプロセッシングを抑制する、第25
回日本高血圧学会総会、2002年10月、
東京
 19. 菱川慶一、田中かろ、中木敏夫、三浦茂
樹、吉岡浩、森有一：熱可逆性ハイドロ
ゲルを用いた腎臓再生の可能性、第25
回日本高血圧学会、2002年10月、東京
 20. 菱川慶一、田中かろ、中木敏夫、三浦茂
樹、吉岡浩、森有一：腎臓由来体性幹細
胞による腎臓再生、第25回日本高血圧学
会総会、2002年10月、東京
 21. Nishinakamura R. A zinc finger protein Sall1
is essential for ureteric invasion in kidney
development. The 35th Annual Meeting of
the American Society of Nephrology,
October 2002, Philadelphia
 22. Suzuki A, Ito T, Imai E, Yamato M, Iwatani
H, Kawachi H, Hori M. All-trans retinoic
acid enhances nephrin expression in the
repair process of injured podocytes. The
35th Annual Meeting of the American
Society of Nephrology, October 2002,
Philadelphia
 23. Iwatani H, Ito T, Imai E, Suzuki I, Yamato
M, Okabe M, Hori M. Differentiation
potentials of Hoechst(low) cells that are
derived from adult rat kidney. The 35th
Annual Meeting of the American Society of
Nephrology, October 2002, Philadelphia
 24. Yamato M, Ito T, Imai E, Suzuki A, Iwatani
H, Fujii T, Ohnishi T, Daikuhara Y, Hori M.
Tornado extraction: A method to enrich and
purify RNA from the nephrogenic zone of
the neonatal rat kidney. The 35th Annual
Meeting of the American Society of
Nephrology, October 2002, Philadelphia
 25. Oseto S, Moriyama T, Nagatoya K, Takeji M,
Kawada N, Akagi Y, Matsuoka Y,
Yamamoto T, Imai E, Hori M. Therapeutic
effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on
rats with anti-GBM antibody
glomerulonephritis. The 35th Annual

- Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
26. Terada Y, Tanaka H, Okado T, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. Hepatocyte growth factor gene therapy prevents renal fibrosis and dysfunction in rat chronic renal disease model. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
 27. Kuwahara M, Ota T, Gu Y, Terada Y, Akiba T, Sasaki S, Marumo F. Renal expression of metallothionein (MT) in rats treated with cadmium. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
 28. Shimamura H, Terada Y, Tanaka H, Okado T, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. Increment of Apoptosis and Decreased Renal Function by Cisplatin-Induced Acute Renal Failure in PI3K Knockout Mouse. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
 29. Monkawa T, Hayashi M, Saruta T, Mundel P, Couser WG, Shankland SJ. Microarray analysis of podocyte differentiation. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
 30. Kuroda K, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Kobayashi E, Ishiguro K, Nakaya H, Mifune M, Hayashi M, Saruta T. In vitro and in vivo effects of glucocorticoids on biglycan gene expression in mesangial cells and isolated glomeruli. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
 31. Hirota N, Ichihara A, Tada Y, Koura Y, Hayashi M, Saruta T. Phospholipase D contributes to transmural pressure control of prorenin processing in diabetic juxtaglomerular cells. The 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, October 2002, Philadelphia
 32. 菱川慶一、丸茂丈史、三浦茂樹、吉岡浩、森有一、松崎有未、猿田享男、林松彦、岡野栄之、藤田敏郎：腎臓由来体性幹細胞による腎臓再生の可能性、第2回再生医療学会総会、2003年3月、神戸
 33. 田中啓之、寺田典生、岡戸丈和、島村治子、井下聖司、寺岡弘文、河内 裕、佐々木成：マウス ES 細胞から腎構成細胞への分化誘導の試み、第2回再生医療学会、2003年3月、神戸
 34. 宮澤しのぶ、加藤里奈、堀田 修、名取泰博：ヒト培養尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化 - EMT との比較、日本腎臓学会学術総会、2003年5月、東京
 35. 加藤里奈、宮澤しのぶ、名取泰博：ラット馬杉腎炎における近位尿細管上皮細胞のマクロファージ様細胞への形質変化。日本腎臓学会総会、2003年5月、東京
 36. 成田一衛、下条文武：遺伝子多型からみたサイトカイン・ケモカインのヒト IgA 腎症進行における意義 ワークショップ、日本腎臓学会学術総会、2003年5月、東京
 37. 坂爪 実、嗟峨大介、謝院生、金子佳賢、成田一衛、下条文武：ヒト糸球体腎炎エフェクター型免疫細胞と L-selectin(CD62L)の発現、日本腎臓学会学術総会、2003年5月、東京