

その後ラットを屠殺し腎組織および血液を採取し、病理組織所見およびBUN, S-Crにつき比較検討した。

(実験2) 12週齢のSDラットに右腎摘出を行い、1週間後に左腎動脈より腎臓内に塩酸olprinone 0.2 mg/kg または同量の生食をそれぞれ充填したのち腎動脈を45分間クランプした。再還流後24時間後にCCDカメラにて腎尿細管周囲毛細血管の血流を測定した。その後ラットを屠殺し腎組織および血液を採取し、病理組織所見およびBUN, S-Crにつき比較検討した。

(6) 腎虚血再還流障害に対するGeranylgeranylacetoneの効果の検討

(動物実験)

8週齢の雄性SDラットを使用した。

(1)GGA投与によるHsp70発現量の変化をWestern blot法を用い解析した。

(2)術前24および1時間前にGGA(400mg/kg)投与(GGA群)またはプラセボ投与(対照群)のうへ、両側腎動脈を30分間クリッピングし、虚血再灌流した。術後24時間の組織所見、腎機能、apoptosisを評価した。

(細胞実験)

ラット培養尿細管細胞を用いて以下につき検討した。

(1)GGA投与によるHsp70発現量をWestern blot法を用い解析した。

(2)過酸化水素負荷および虚血刺激下におけるアポトーシスに対するGGAの投与の効果につきTUNEL法を用いて解析した。

(7) 腎障害マウスに対する多機能成長因子midkineの役割の検討

実験1：アンチセンスによるミッドカイン

抑制の腎虚血再還流障害に対する効果を検討した。

129SVマウスの右腎を摘出し7日後に左腎動脈を30分または90分クランプし、腎虚血再還流モデルを作成した。障害作成1日前あるいは1日後にミッドカインアンチセンスオリゴヌクレオチド1mg/kgを尾静脈より投与し、1, 2, 3, 7日後に血液および腎組織を採取し、血清学的、組織学的に腎機能を評価した。

実験2：ミッドカインの糖尿病性腎症における関与を検討した。

ミッドカインノックアウトマウス(Mdk^{-/-}mice)とワイルドタイプマウス(Mdk^{+/+}mice)にStreptozotocin(STZ)140mg/kgを腹腔内投与し糖尿病を作成し、2, 4, 6ヶ月で血液、尿、腎組織を採取し、腎障害を比較検討した。

(8) 尿管芽の発芽、進展に関わる新規分子(GZF1)の機能解明

ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、腎臓と神経の発生に不可欠な役割を担っているGDNF-RETの下流で作用する新規腎発生関連分子であるGDNF-inducible zinc finger protein 1 (GZF1)が同定された。GZF1が尿管芽の発芽、進展に関わることが示された。本研究ではCASTing法を用いて、GZF1が結合するDNA配列を決定した。そしてデータベース上で検索しそのDNA配列をもつ遺伝子を同定した。実際にその遺伝子の発現調整領域に結合するか否かをelectrophoretic mobility shift assayおよびChromatin immunoprecipitation (ChIP) assaysを用いて検討した。さらに実際の発現調節に関わっているかどうかを

Transfection and luciferase assay を用いて検討した。

(9) Polycystic Kidney disease メダカモデルを用いた腎尿細管発生に関わる分子の検討

高頻度突然変異誘発実験系を用いて突然変異型 Polycystic Kidney disease メダカモデル (pc メダカ) を樹立した。このメダカを若松らが開発した透明メダカと交配させ、透明 pc メダカモデルを樹立した。透明であるため、生きたままの腎臓観察が可能となった。

1) 4-6ヶ月齢の成体のメダカの肝、腎の重量を測定する。経時的に臓器を採取し、形態学的、組織学的、超微細構造学的に腎臓を詳細に観察した。

2) ポジショナルクローニングの手法を用いて新規分子を同定する。同定された分子に関しては *in vitro* および *in vivo* の系で機能解析を進める。

(倫理面への配慮)

臍帯血や脂肪由来幹細胞を用いた研究に関しては名古屋大学倫理委員会に申請し承認を得ている。臍帯血や脂肪組織を提供して頂く際には十分な説明の上にご本人に文書で同意を得ている。またすべての検体は匿名化して扱い、個人情報漏洩することがないように最大限の注意を払っている。

動物を用いた研究に関しては名古屋大学に動物実験計画書を提出し承認を得ている。実験を実施する際には動物愛護の精神の通り、動物の苦痛を最小限するべく常に努力している。

C. 研究結果

(1) 臍帯血由来内皮前駆細胞の糖尿病神経障害に対する治療効果の検討

糖尿病では MNCV が低下し (図(1)-1B)、臍帯血由来の内皮前駆細胞 (EPCs) 投与群ではコントロール群に比べ有意に MNCV が改善した (図(1)-1A)。同様に EPCs 投与により SNBF に改善が認められた (図(1)-2)。組織学的検討では EPCs 治療群の方がコントロール群に比べ有意に毛細血管密度の増加が認められた (図(1)-3)。

(2) Cisplatin 腎症に対する G-CSF、骨髄単核球細胞併用療法の効果の検討

骨髄単核球細胞単独群ではコントロール群に比べ腎機能の改善効果は認められなかった (図(2)-1)。G-CSF 単独群ではコントロール群に比べ有意に腎機能の悪化を抑制していた (図(2)-2)。G-CSF + 骨髄単核球細胞群では G-CSF 単独群に比べ腎機能悪化の抑制効果が強かった (図(2)-3)。

(3) ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養と動物モデルにおける治療効果の検討

手術で得られた内臓脂肪、皮下脂肪および吸引で得られた皮下脂肪のいずれからも間葉系幹細胞を得ることができた (図(3)-1)。骨、軟骨、脂肪への分化も確認された (図(3)-2)。高齢者からも十分量の幹細胞が得られた。

脂肪由来幹細胞を動物疾患モデルに投与したところ、その治療効果が確認された (特許出願準備中)。

(4) 腎虚血再還流障害に対する

thrombomodulin の効果の検討

HRS-TM 投与群では生食投与群に比べ有意に再還流 24 時間後の腎尿細管周囲毛細血管の血流の改善および腎機能障害の軽減が認められた。argatroban 投与群では腎障害の有意な軽減は認められなかった (図(4)-1)。再還流 24 時間後の腎組織の検討では、HRS-TM 投与群では生食投与群に比べ有意に ATN score の改善を認めた (図(4)-2)。腎組織の ED-1 染色では HRS-TM 投与群では生食投与群に比べ有意に ED-1 陽性細胞数の減少が認められ、マクロファージの浸潤が抑制されていた (図(4)-4)。また、腎組織の TUNEL 染色では、HRS-TM 投与群ではコントロール群に比べ有意に TUNEL 陽性細胞数の減少を認めた (図(4)-3)。培養ラット尿細管上皮細胞における TUNEL 染色でも同様に HRS-TM 投与群ではコントロール群に比べ有意に TUNEL 陽性細胞数の減少を認めた。

(5) 腎虚血再還流障害に対する塩酸 olprinone の効果の検討

実験 1、実験 2 共に塩酸 olprinone 投与群ではコントロール群に比べ有意に再還流 24 時間後の腎機能障害の軽減 (図(5)-1)、および腎尿細管周囲毛細血管の血流の改善が認められた (図(5)-2)。再還流 24 時間後の腎組織の検討では、塩酸 olprinone 投与群ではコントロール群に比べ有意に ATN score の改善を認めた。

(6) 腎虚血再還流障害に対する Geranylgeranylacetone の効果の検討

(1)GGA 群でのみ Hsp70 は増加し、24 時間後にピークがみられ 48 時間後には低下した。24 時間後に再投薬した所、48 時間後も 24

時間後と同等の Hsp70 を認めた。GGA 投与 24 時間後の Hsp70 は容量依存的で 400mg/kg でプラトーに達した。

(2)組織障害(尿細管上皮脱落、空胞変性)は GGA 群で有意に軽く (図(6)-1)、BUN、s-Cr も有意に低値で(対照群対 GGA 群;BUN: 56.0 ± 10.8 対 22.2 ± 2.2, s-Cr: 1.1 ± 0.2 対 0.6 ± 0.1 (平均値 ± 標準誤差) (図(6)-2)、TUNEL 陽性細胞も有意に少なかった。これらの効果は Hsp 誘導阻害剤でキャンセルされた。

(3)細胞実験でも GGA の投与が Hsp70 発現を選択的に増強し、過酸化水素や虚血刺激によって惹起されるアポトーシスを抑制した。

(7) 腎障害マウスに対する多機能成長因子 midkine の役割の検討

実験 1 : アンチセンスによるミッドカイン抑制の腎虚血再還流障害に対する効果

ミッドカインアンチセンスオリゴヌクレオチドは近位尿細管細胞に速やかに取り込まれ、ミッドカイン合成を阻害し、炎症細胞浸潤を抑制した。ミッドカインアンチセンス投与群ではコントロール群に比べ、2 日後の腎障害が血清学的 (図(7)-1)、組織学的に有意に改善した。障害前と後のミッドカインアンチセンス投与には、ミッドカインの発現および腎機能に有意な差は認められなかった。

実験 2 : ミッドカインの糖尿病性腎症における関与

Mdk^{-/-} mice では Mdk^{+/+} mice に比べ 4 ヶ月、6 ヶ月目の腎機能障害が有意に軽減していた。また、2、4、6 ヶ月目の尿蛋白も有意に少なかった (図(7)-2)。また組織学的には Mdk^{-/-} mice の方が 2、4、6 ヶ

月でメサングウム領域の拡大が有意に軽減していた (図(7)-3, 4)。

尿管細胞の障害も同様に Mdk^{-/-} mice の方が軽度であった。

(8) 尿管芽の発芽、進展に関わる新規分子 (GZF1) の機能解明

CASTing 法を用いて、GZF1 が結合する DNA 配列を決定した。続いてデータベース上で検索したところ、その DNA 配列が *HOXA10* 遺伝子の 5' regulatory region に存在することが判明した。そして実際に GZF1 が *HOXA10* 遺伝子上流の DNA 配列に結合しその発現を制御することを証明した (図(8)-1)。

(9) Polycystic Kidney disease メダカモデルを用いた腎尿管発生に関わる分子の検討

(1) pc メダカの解析

透明 pc メダカの樹立に成功した (図(9)-1)。腎重量は pc mutant メダカでは正常メダカに比べ雄雌共に有意に腎重量が重かった (雄 2.1 ± 1.1 mg vs 95.2 ± 58.4 mg ; $P < 0.05$ 、雌 2.8 ± 1.2 mg vs 113.1 ± 77.3 mg ; $P < 0.005$)。肝重量には差が認められなかった。この pc mutant メダカは生後 2 ヶ月までに性的には正常に発育し、6 ヶ月以内に死亡する。腎は扁平な上皮細胞に覆われた多数の嚢胞で占められていた。嚢胞形成は生後 10 日より前腎から始まり、生後 20 日には中腎にみられた。この透明な pc mutant メダカは生きた状態で疾患を観察するのに非常に有用であった。

(2) pc 遺伝子の同定

pc メダカの原因遺伝子を同定することに成

功した。

D. 考察

下肢の動脈閉塞性疾患に骨髄幹細胞の局所注入が有効であることが示されて以来、骨髄由来幹細胞が再生医療における細胞ソースとして注目されてきた。腎臓再生に関しても骨髄細胞が関与していることが報告されている。また腎障害に対する G-CSF 投与の有効性も報告されていた。我々はまず臍帯血から分離・培養した内皮前駆細胞の局所投与が糖尿病モデルラットの下肢筋肉内に局所投与した。これにより、神経障害が軽減することを見出した。本研究は幹細胞療法の新たな可能性を示した点で意義深い研究となったと考える。ただし、臍帯血の採取・培養は必ずしも容易でない。さらに臨床応用を考えた場合、自家移植の系を確立する必要があると考える。そこで次に骨髄由来幹細胞の自家移植療法を試みた。これまでの報告で下肢虚血に対しては培養した内皮前駆細胞投与よりも培養を介さない骨髄単核球成分の投与が有効であることがわかっていた。我々は骨髄単核球成分を単独もしくは G-CSF との併用でラットのシスプラチン腎症モデルに投与しその効果を検討した。当初の予想に反し骨髄単核球単独では十分な治療効果が得られなかった。一方、G-CSF 単独は有効であり、骨髄単核球と G-CSF の併用ではさらなる治療効果の増強が確認された。臨床応用を実現する際、この結果の持つ意味は大きいと考える。すなわち、幹細胞単独での投与という治療法に固執することなく幹細胞の作用を最大限に引き出す因子の併用も含めあらゆる可能性を検討する必要があると考えている。

我々は G-CSF が骨髄単核球を *in vivo* で刺激し、腎再生促進因子の分泌を増強するという仮説を立て、現在その分子機序を解明するための研究を進めている。

最近、脂肪組織には骨髄と比べ大量の体性幹細胞が存在することが明らかとなってきた。自己の細胞を使用することを考えた場合、脂肪組織の採取は骨髄細胞の採取よりも簡便でかつ安全である点は大きな利点となる。その上、脂肪組織由来の幹細胞は量・質ともに骨髄由来幹細胞を大きく上回る可能性があると考えている。実際、本研究では高齢者の脂肪細胞からも質・量ともに十分な幹細胞を分離・培養することに成功した。高齢者の骨髄中には有効に機能する幹細胞が少ないことが臨床的には問題となっていることを考えると、脂肪組織の利用の意義は大変大きいものと思われる。我々は名古屋大学農学部の北川らが開発した低血清培養法を用いている(特許申請中)。脂肪由来幹細胞を2%血清で培養して間葉系幹細胞を選択的かつ大量に増殖させる方法である。臨床応用を考えた動物由来製剤を使用しないことは大変重要なことである。低血清培養法ではウシ血清でなく自己の血清を用いて治療に必要な分量の幹細胞を得ることができる。この点で、本法は実用化に近い独創性のある技術であると言える。我々はこうして分離培養した脂肪由来幹細胞を動物疾患モデルに投与したところ、その有効性が確認された。今後さらに幹細胞の分離培養法を洗練されたものにすると同時に、脂肪由来幹細胞の治療的効果に関する分子機序を明らかにする研究を進める予定である。

我々は、幹細胞だけでなく腎再生促進因

子の探索・同定・分子機序の解明を目的とする研究が腎再生医療の実現には重要であると考えている。そこで、現在もしくは近い将来に臨床応用可能な薬剤の中から特に腎尿細管細胞の再生を促進する可能性のある薬剤を探索した。数々の予備実験の結果、トロンボモジュリン、ホスホジエステラーゼインヒビター、Geranylgeranylacetone が腎障害モデルに対して治療的効果を示すことを見出した。それぞれの薬剤は、抗凝固剤、血管拡張剤、胃粘膜保護剤として開発されたものであるが、我々の検討では尿細管のアポトーシスを抑制し、腎障害を軽減する作用があることがわかった。この結果はこれらの薬剤が腎再生特に尿細管細胞の再生促進因子として利用できる可能性を示唆するものである。今後は、その分子機序のさらなる解明を進めると共に、これらの薬剤と体性幹細胞との併用療法の治療的効果についても検討を進める予定である。

我々は以前から多機能成長因子である midkine と腎疾患との関連を研究してきた。midkine は特に神経系と腎臓の発生段階で多く発現されることがわかっており、神経と腎臓の再生に関与する可能性が示唆されている。従来の研究で、midkine が腎虚血再灌流における腎障害を悪化させることがわかってきた。今回の研究では、midkine に対するアンチセンス DNA を *in vivo* で投与することで、尿細管障害を軽減することを明らかにした。この結果からは、midkine の制御が特に炎症が関与する腎疾患から腎不全に至る過程を抑える治療法に応用されることが期待される。今後は尿細管細胞再生医療への応用と、さらなる分子機序の解明の両面から研究を進める予定である。さ

らに最近我々は糖尿病性腎症の発症にも *midkine* が深く関与していることを見出した。糖尿病性腎症は末期腎不全の原疾患としてもっとも多いものであり、臨床的な重要性はますます増大している。糖尿病性腎症発症進展に関する分子機序を明らかにすることは、今後より有効な腎再生医療を開発する上で不可欠なものであると考える。*Midkine* の制御が糖尿病性腎症による腎不全に対する再生医療の実現に大きく寄与する可能性が期待される。また、本研究のなかで我々はこれまでにない明確な病理変化を示す新たな糖尿病腎症モデルを作成することに成功した。これまで良い動物モデルがなかったことが、糖尿病性腎症の研究には大きな障壁となっていた。今後はこのモデルを用いて糖尿病性腎症に対する再生医療の治療実験を進めていく予定である。

腎不全に対する再生医療を進める上で、腎発生に関する分子機序に関する基礎的な知見の蓄積は大変重要であると考え。我々は特に尿細管の分化発生に着目し検討を進めてきた。チロシンキナーゼ型受容体である RET とそのリガンドである GDNF は神経と腎臓の発生に関与していることがわかってきた。ノックアウトマウスの表現系などから GDNF-RET は尿管芽の分枝の制御に関わることが示唆されていた。我々は最近 GDNF-RET の下流に位置する新たな分子の同定に成功した。この分子は GDNF-inducible zinc finger protein 1 (GZF1) と命名された。GZF1 の抑制が器官培養の系で尿管芽の分岐を抑制することを証明した。また、GZF1 は zinc-finger を有することから DNA に結合し、遺伝子発現を調節することで腎発生に関わるものと予想された。しかし、

その先の分子機構に関しては不明のままであった。今回の研究では GZF1 の機能解明の第一歩として GZF1 が結合する遺伝子の同定を試みた。CASTing 法を用いた検討で GZF1 が結合する DNA 配列を決定した。続いてデータベース上で検索したところ、その DNA 配列が *HOXA10* 遺伝子の 5' regulatory region に存在することが判明した。そして実際に GZF1 が *HOXA10* 遺伝子上流の DNA 配列に結合しその発現を制御することを証明した。*HOXA10* 遺伝子は発生に大きく関与することがわかっている。GZF1 は *HOXA10* の時間的、空間的な発現を調整することで腎発生を制御することが示唆された。

我々は名古屋大学農学部の若松らとの共同研究でメダカを用いた腎発生・再生関連分子の研究も進めている。メダカの突然変異体を研究する中で巨大な腎臓をもつ個体 *pc* メダカが分離されていた。比較的遅い段階で腎サイズが増大する点で、この変異体はヒトの常染色体優性遺伝型多発性嚢胞腎と類似していた。名古屋大学農学部の若松らは、突然変異メダカを作成する中で透明メダカを開発していた。これにより、腎発生段階から成熟段階まで一貫してメダカの各臓器を容易に観察することができるようになった。*pc* メダカと透明メダカを交配することで *pc* 透明メダカを作成することに成功した。腎の発生段階から嚢胞腎への進展段階への腎形態変化を経時的に観察し、*pc* メダカがヒトの多発性嚢胞腎 (ADPKD) と類似した経過をとることが再確認された。さらに詳細な病理変化の検討でも ADPKD と類似する変化を認めた。その後の研究で、原因遺伝子が同定され、現在はその機能解析へと研究が進んでいる。この遺伝子産物

は尿細管の発生、増殖制御、さらに再生に関与する可能性がある。我々は、これらの基礎的知見を腎再生医療の実現に利用したいと考えている。今後は、これらの分子作用機構を明らかにすると共に、これらのGDNF、GZF1、pc 関連分子を腎再生医療に応用するための細胞実験および動物実験も平行して進めていく予定である。

以上のようにこの一年で腎再生や腎発生に関して大変重要な知見を得ることに成功した。腎再生医療の実用化に向けた研究を進める上で大変有用な研究成果であると考えている。今後はこれらの結果を統合し、さらなる検討を重ねていく予定である。

E. 結論

体性幹細胞が動物モデルにおいて腎再生を促進する可能性を示す動物実験結果が得られた。細胞治療のソースとしては臍帯血や骨髄細胞だけでなく脂肪組織も変有望であることが明らかとなった。骨髄由来幹細胞に関しては G-CSF をはじめとする再生促進分子との併用の有用性も示された。また、臨床で使用可能な薬剤を用いてその腎保護および腎再生促進作用を示すことにも成功した。多機能成長因子である midkine の制御が腎再生医療に応用できる可能性を示唆する研究結果も得られた。さらに腎臓の発生に関わる分子機構を明らかにする基礎的研究でも新規分子 GZF1 の機能解析やメダカの pc 遺伝子の同定など、着実な成果が得られた。今後は、体性幹細胞を用いた細胞治療のさらなる有効性を検討するとともに、尿細管再生促進因子や尿細管保護作用を有する薬剤を複合的に用いてより有効かつ実現可能な腎再生療法の開発を推し進める予

定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuda N, Morinaga T, Matsuo S: GZF1, a new GDNF-inducible gene, is required for renal branching morphogenesis. *Kidney Int* 68(5)1964. 2005.
- 2) Morinaga T, Enomoto A, Shimono Y, Hirose F, Fukuda N, Dambara A, Jijiwa M, Kawai K, Hashimoto K, Ichihara M, Asai N, Murakumo Y, Matsuo S, Takahashi M: GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the HOXA10 gene regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 3:4191-4201. 2005.
- 3) Mochizuki E, Fukuda K, Tada T, Harada T, Watanabe N, Matsuo S, Hashimoto H, Ozato K, Wakamatsu Y.: Fish mesonephric model of polycystic kidney disease in medaka (*Oryzias latipes*) pc mutant. *Kidney Int*68 (1) 23-34. 2005.
- 4) Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J: Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2005. 54:1823-1828.
- 5) Sato W, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Muramatsu T: Midkine

antisense oligodeoxyribonucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion. 2005. *Kidney Int* 67:1330-1339.

- 6) Suzuki S, Maruyama S, Sato W, Morita Y, Sato F, Miki Y, Kato S, Katsuno M, Sobue G, Yuzawa Y, Matsuo S: Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney int* 67: 2210-2220. 2005.
- 7) Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Kawai H, Matsuo S, Takei Y, Muramatsu T and Kadomatsu K: Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 168: 9-19. 2006.

2. 学会発表

- 1) Maruyama S, Ozaki T, Chabouk A, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, and Matsuo S: Renoprotective properties of G-CSF and mononuclear cells derived from bone marrow. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 2) Ozaki T, Chabouk A, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, and Matsuo S: Recombinant human soluble thrombomodulin inhibits apoptosis and attenuates ischemic acute renal failure. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 3) Chabouk A, Ozaki T, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, and Matsuo S: The effects of

olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure, ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.

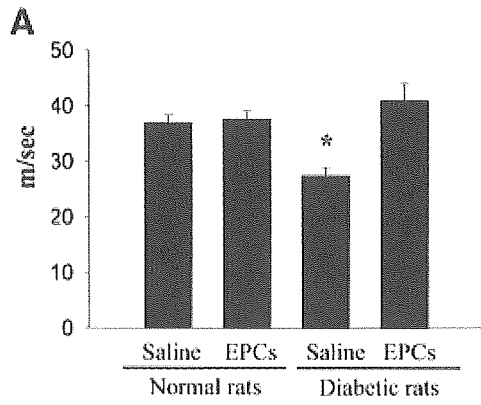
- 4) 松尾清一, 特別企画 慢性腎臓病の克服をめざして - Japan Chronic Kidney Disease Initiative/JCKDI 「日本における慢性腎臓病 (CKD) 対策」 横浜. 6月23-26日 第48回日本腎臓学会学術総会 2005.

G. 知的財産権の出願・登録取得状況 (予定を含む)

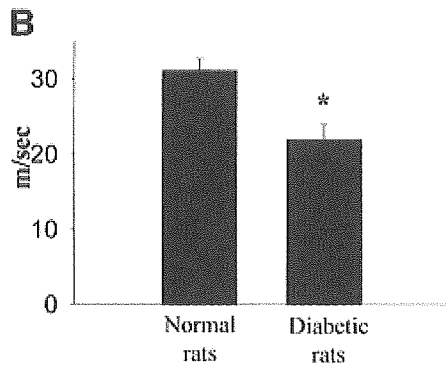
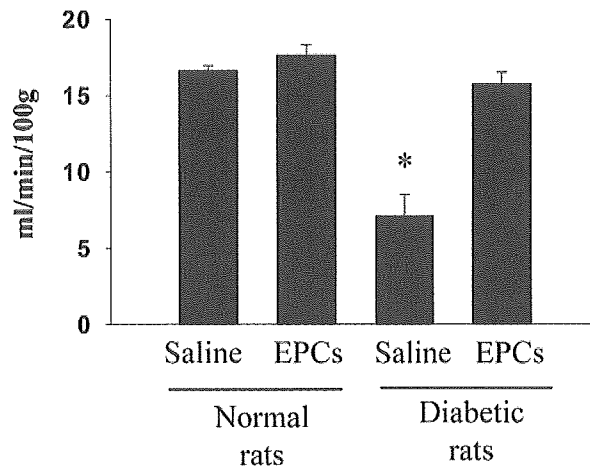
1. 特許

- 1) Geranylgeranylacetone 投与によるラット腎での Hsp 70 の誘導と腎虚血再灌流障害の抑制作用について: 特許出願済み
- 2) 低血清培養法を用いた脂肪由来幹細胞の分離・培養法: 特許出願済み
- 3) 脂肪由来幹細胞を用いた再生医療: 特許申請準備中である。

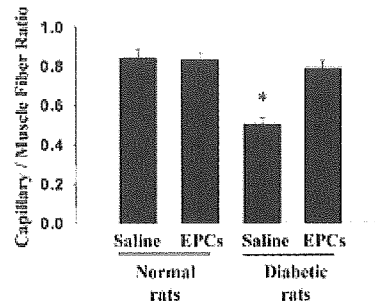
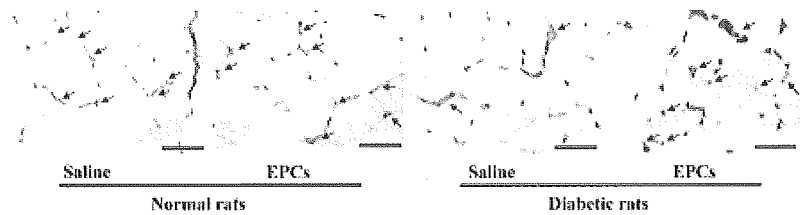
図(1)-1 神経伝導速度



図(1)-2 坐骨神経内膜栄養血流量

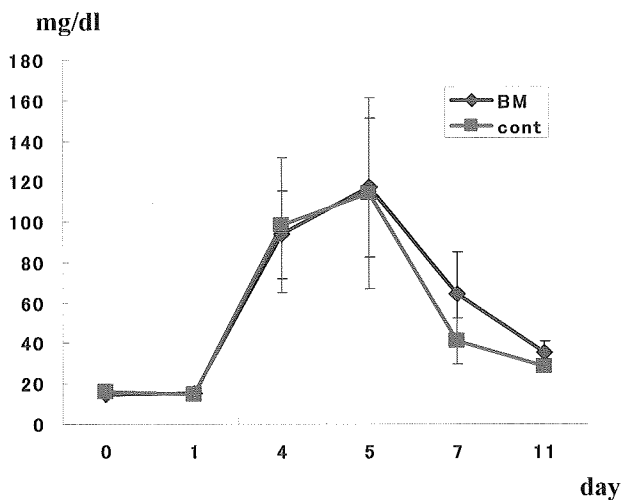


図(1)-3 Capillary/Muscle Fiber Ratio

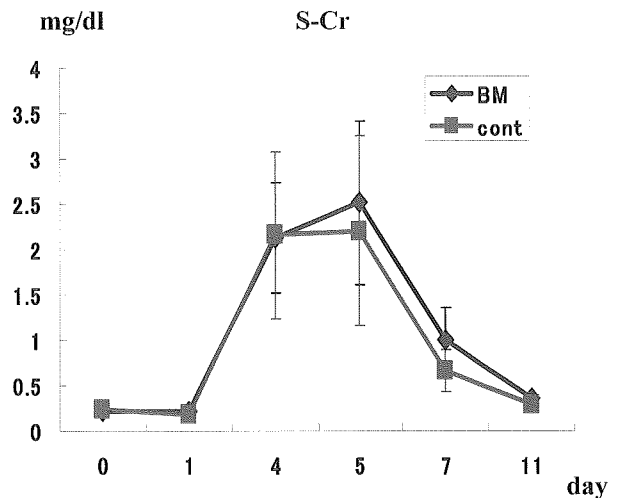


図(2)-1 Cisplatin腎症に対する骨髓単核球細胞治療

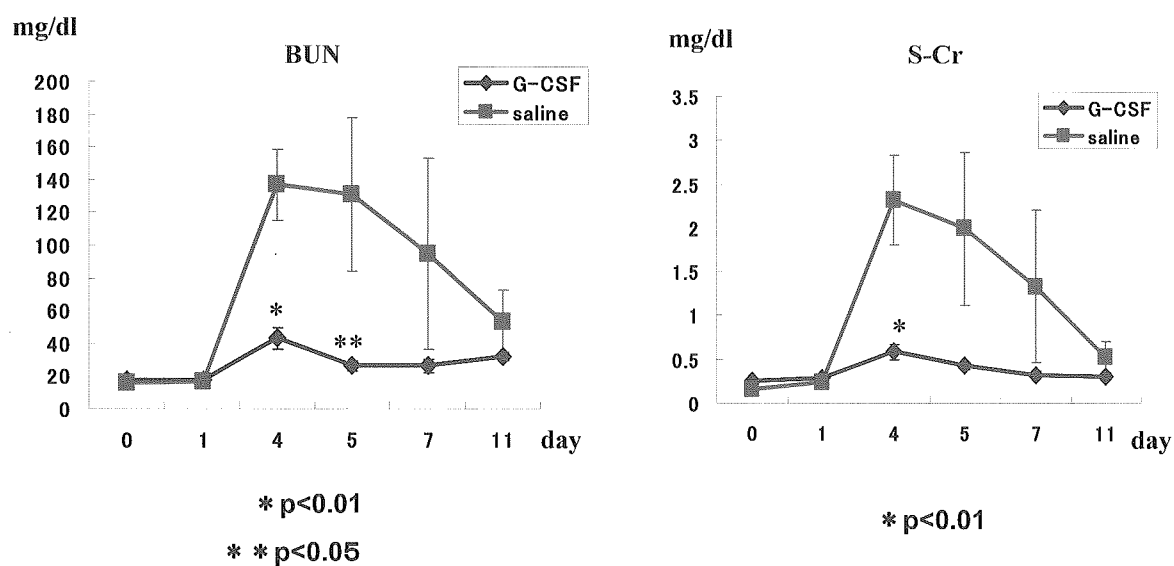
BUN



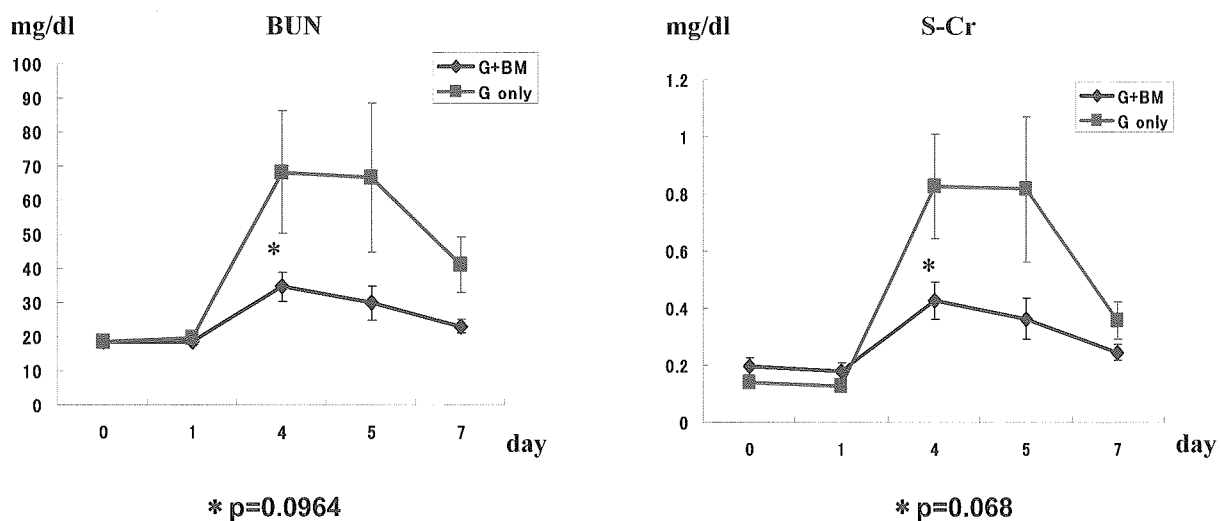
S-Cr



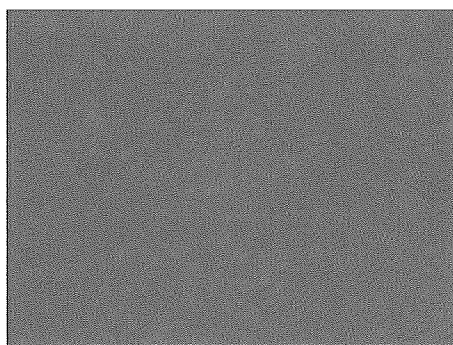
図(2)ー2 Cisplatin腎症に対するG-CSF治療



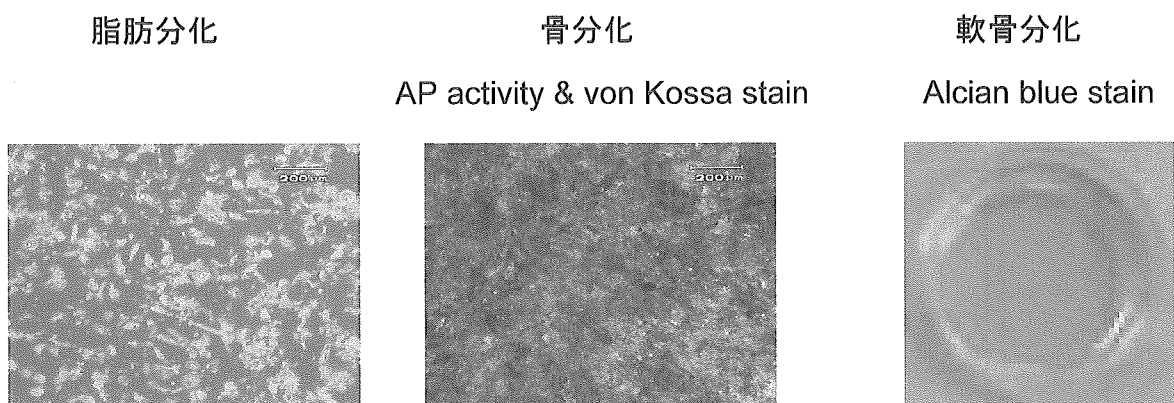
図(2)ー3 Cisplatin腎症に対するG-CSF+骨髓単核球細胞治療



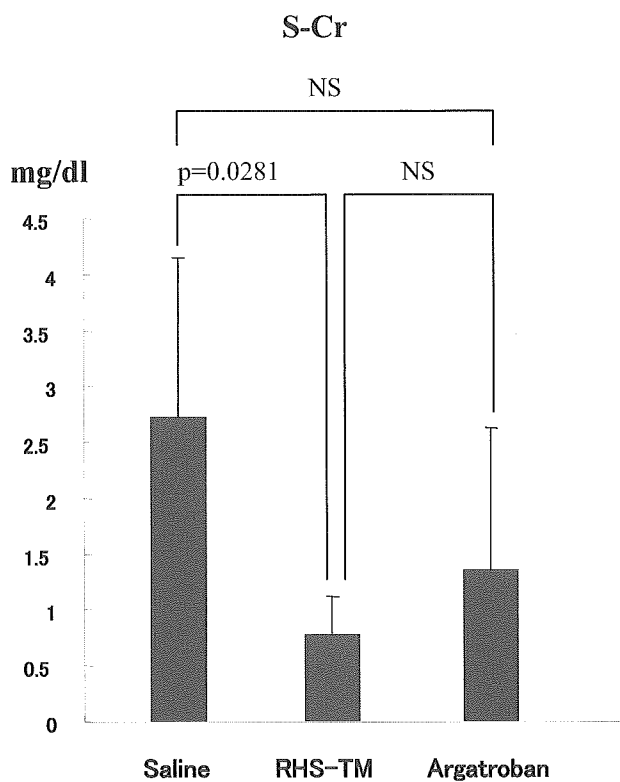
図(3)ー1 低血清培養によるヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離



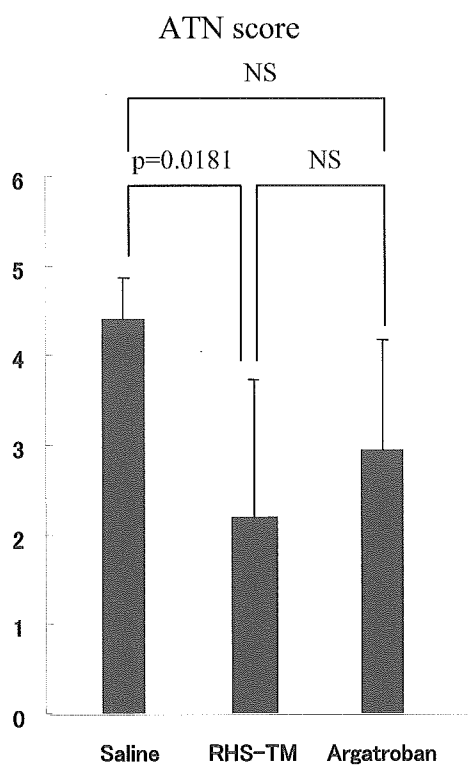
図(3)－2 ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の脂肪、骨、軟骨への分化



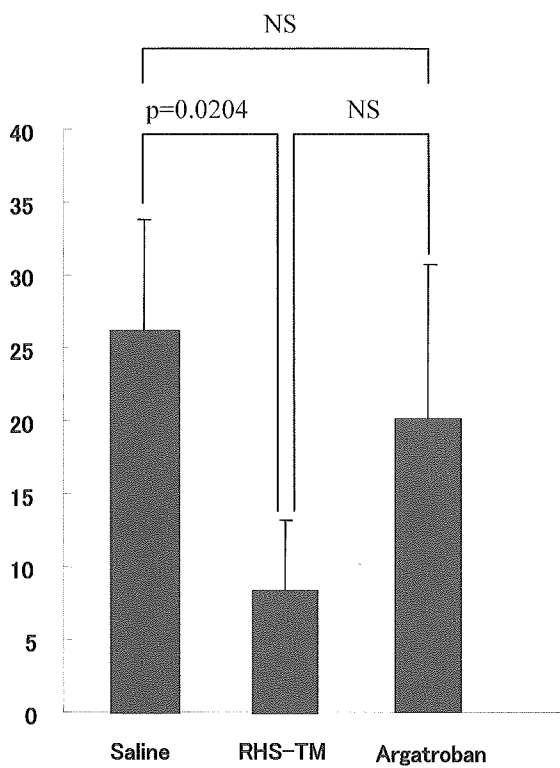
図(4)－1 再還流24時間後の腎機能



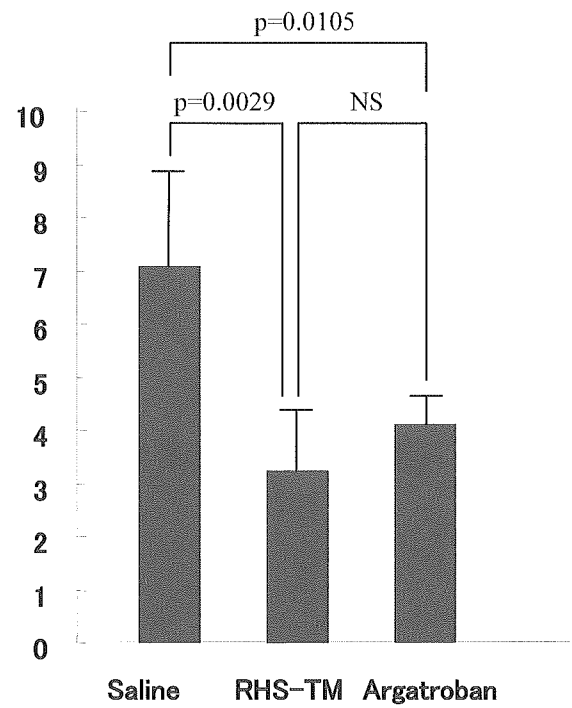
図(4)－2 再還流24時間後の腎組織



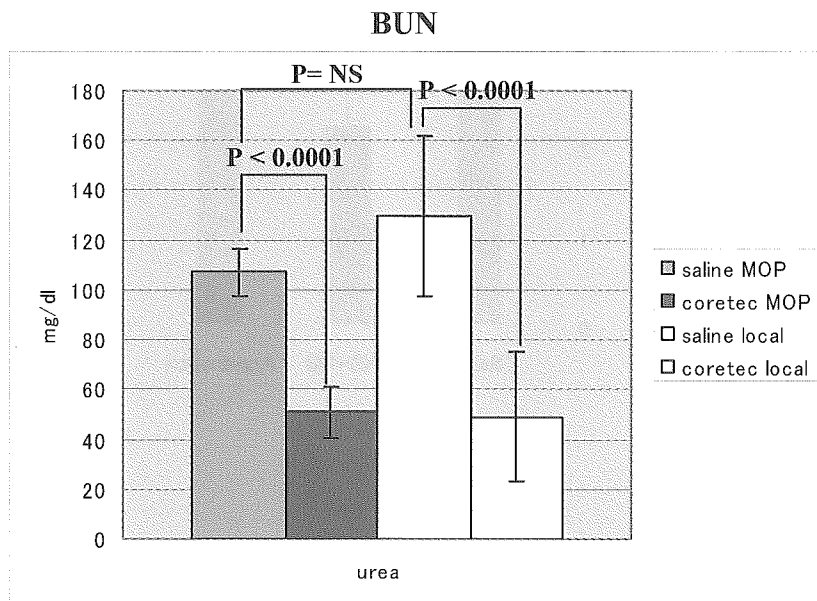
図(4)－3 再還流24時間後のTUNEL陽性細胞数



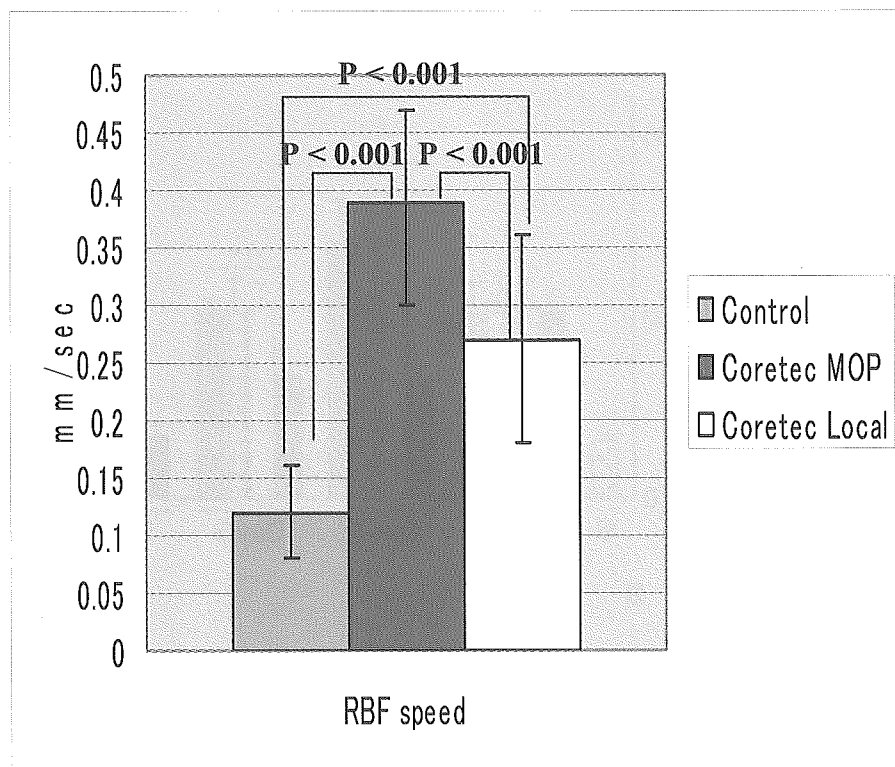
図(4)－4 再還流24時間後のマクロファージ浸潤



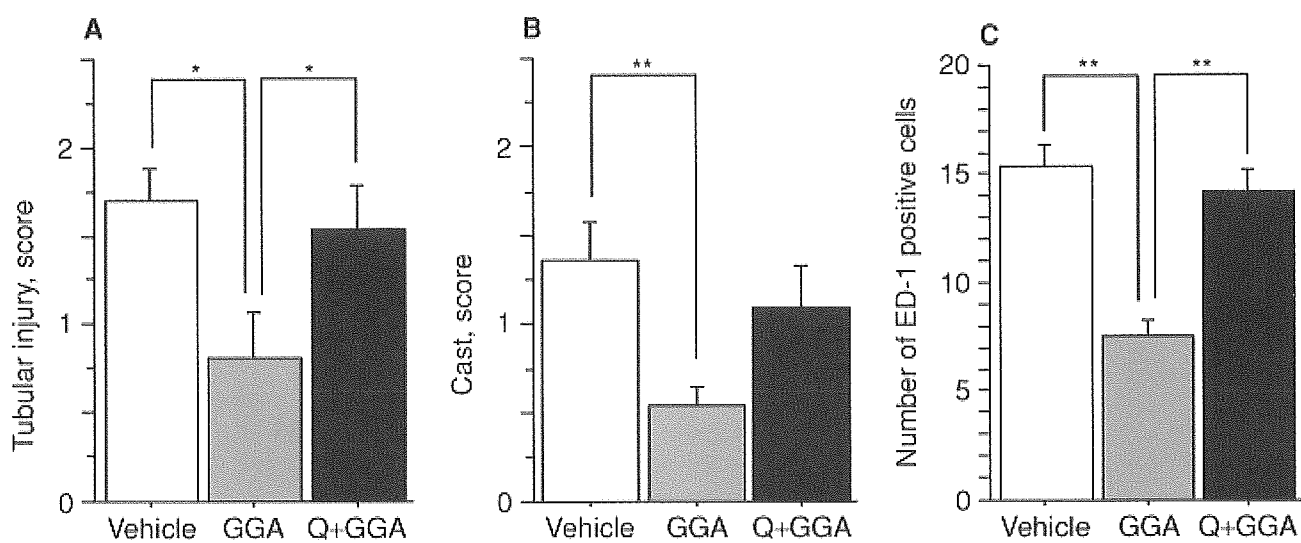
図(5)－1 再還流24時間後の腎機能



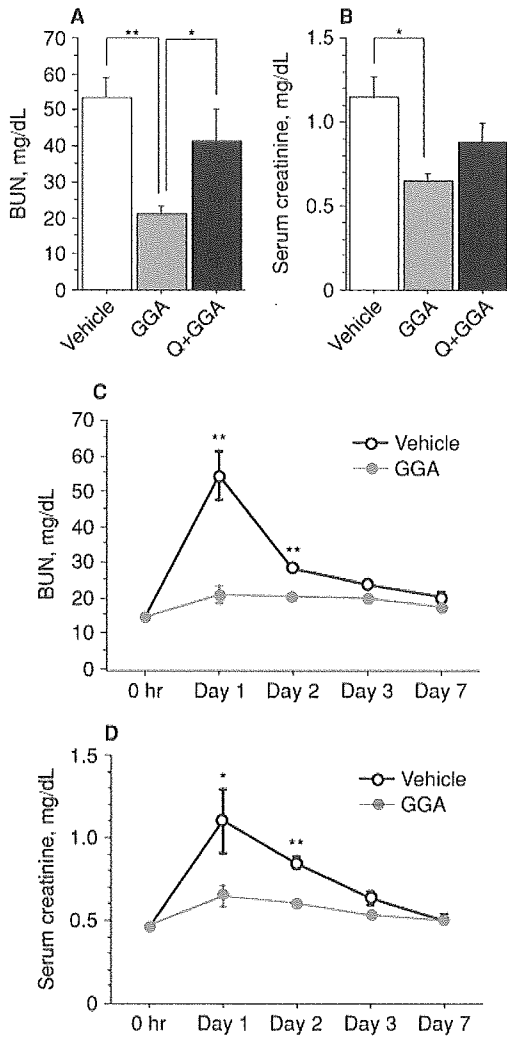
図(5)－2 再還流24時間後の腎尿細管周囲毛細血管血流



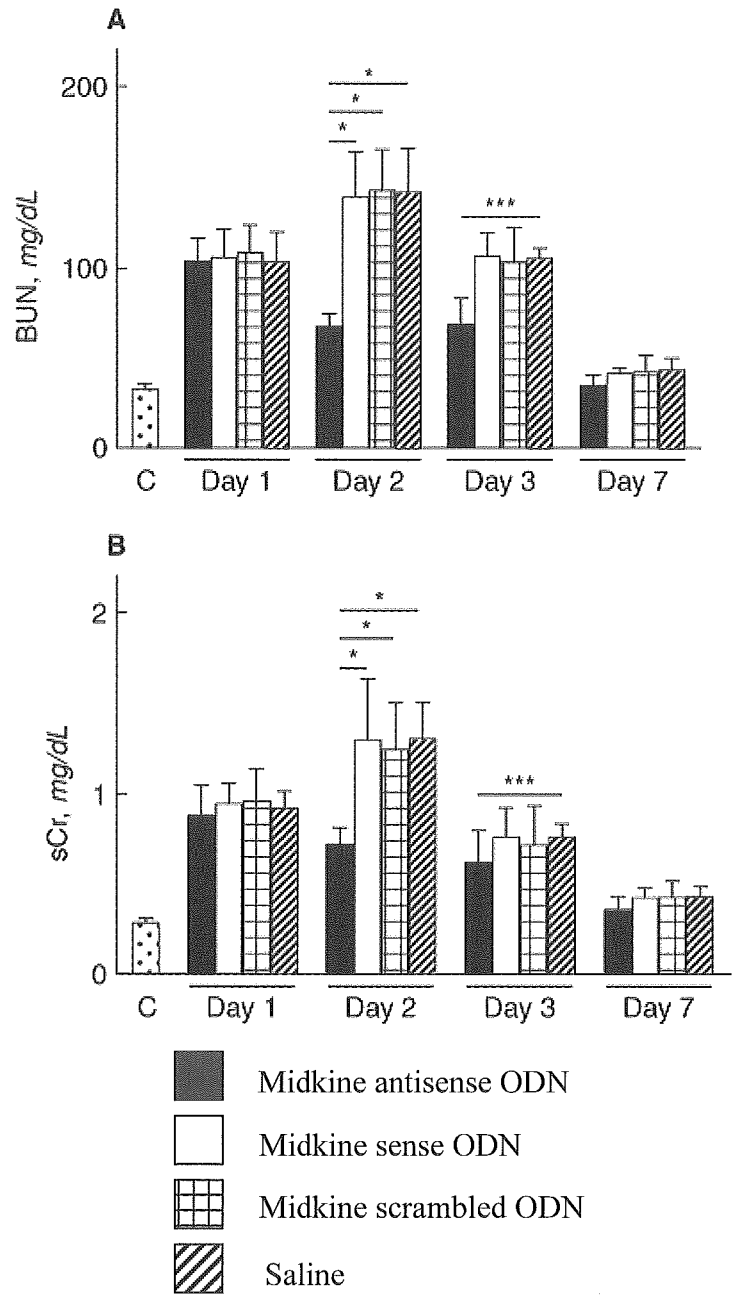
図(6)－1 再還流24時間後の腎組織



図(6)－2 腎機能

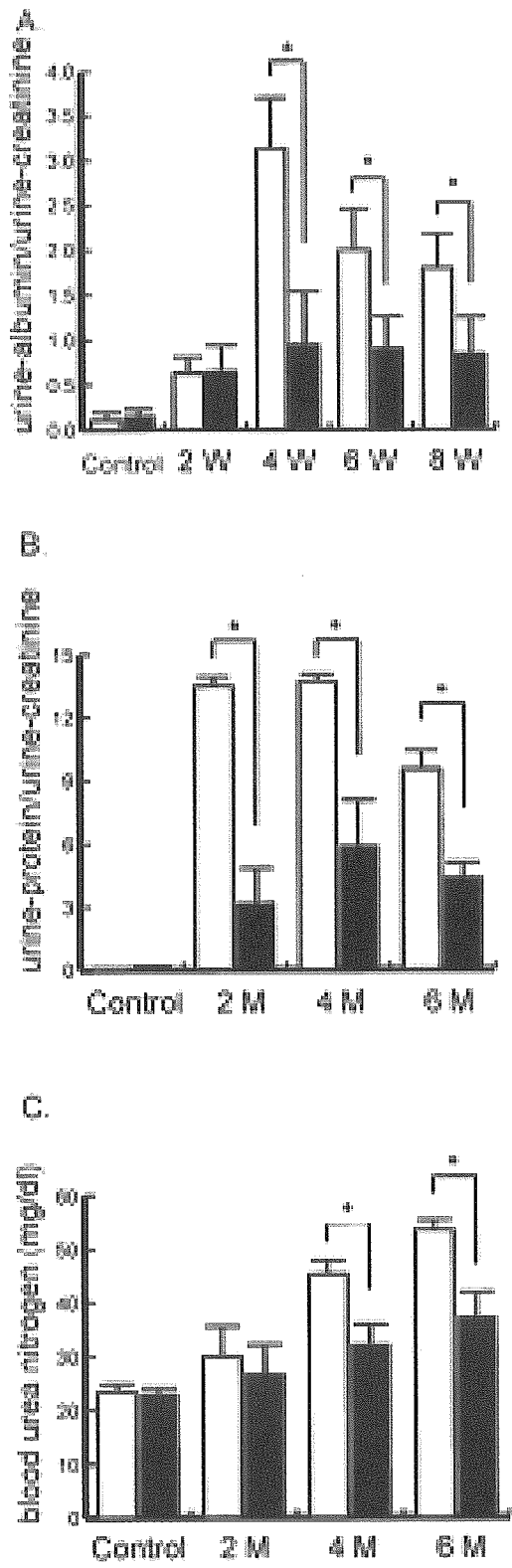


図(7)－1 腎機能

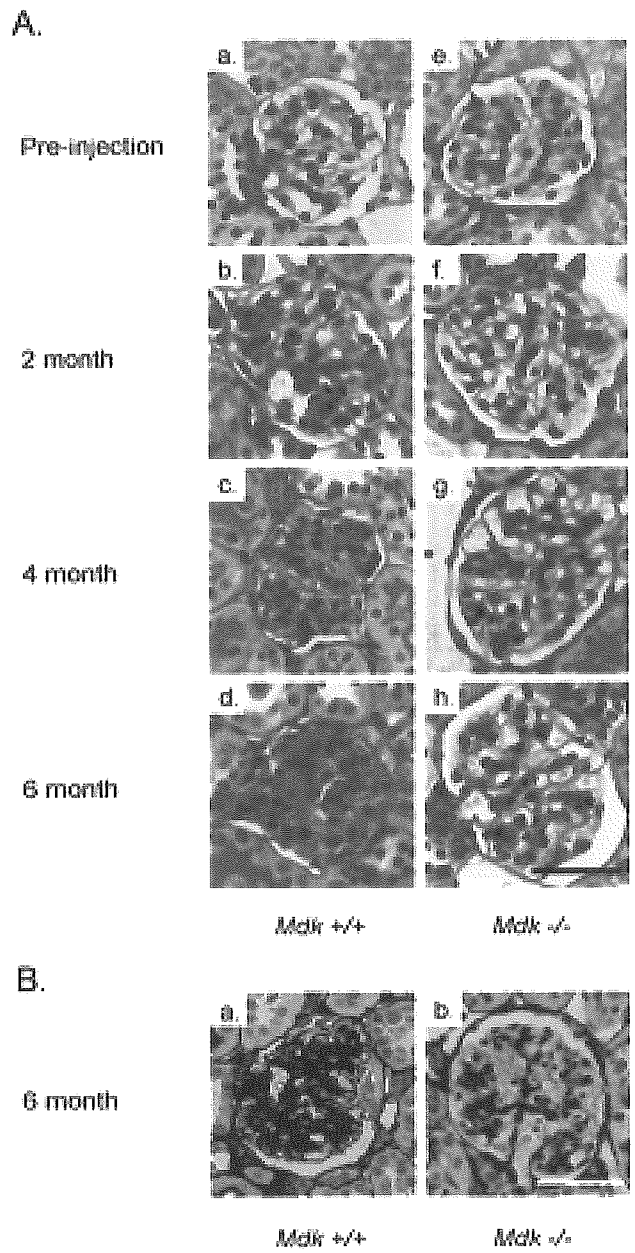


* P < 0.01 , *** P < 0.05

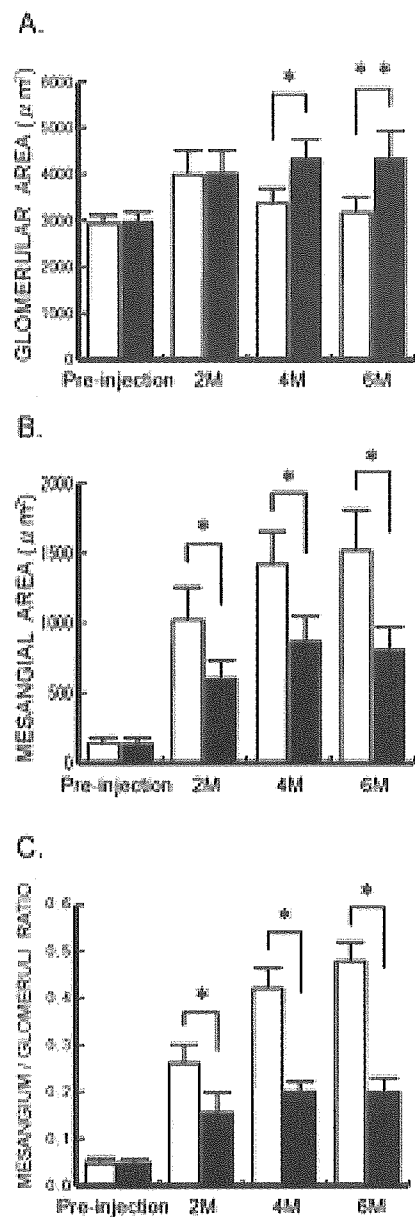
図(7)－2 尿蛋白と腎機能



図(7)－3 腎組織



図(7)－4 腎組織の解析



図(8)－1 GZF1によるHOXA10遺伝子の発現調節

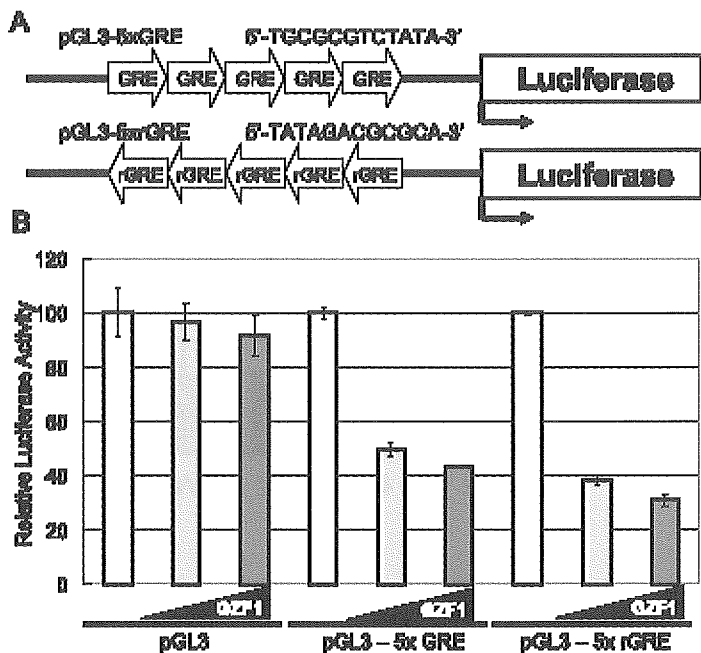
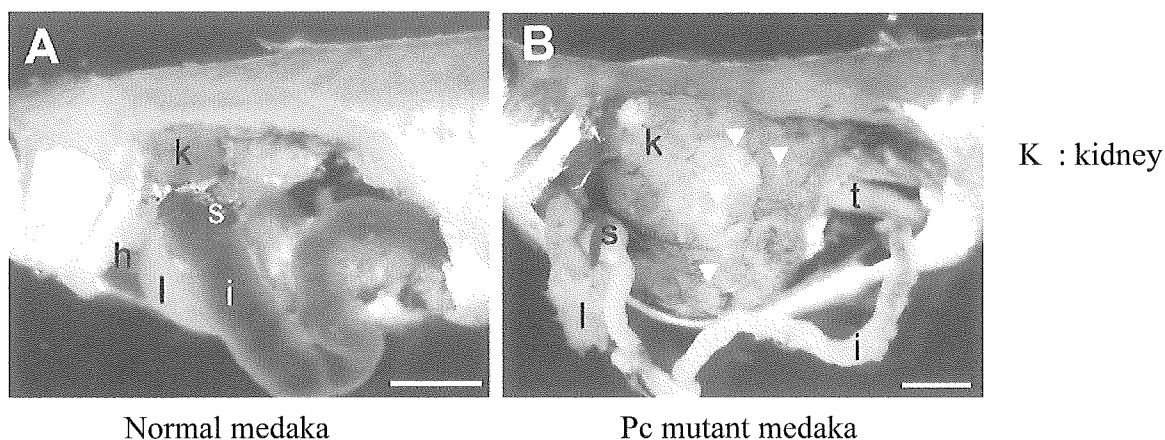


Figure 6. Transcriptional repressive activity of GZF1. (A) Schematic representation of the reporter vectors. Five tandem repeats of GRE were cloned upstream of the luciferase gene in a pGL3-basic reporter vector (designated pGL3-5 × GRE). The reporter vector containing five GREs in the antisense direction was also constructed (pGL3-5 × rGRE). (B) Luciferase assay using the extracts from HEK293T cells transiently co-transfected with increasing amounts (50 and 100 ng) of an expression vector carrying full-length GZF1 cDNA (pSRα-GZF1) and pGL3, pGL3-5 × GRE or pGL3-5 × rGRE.

図(9)－1 Polycystic kidney disease medaka



分担研究者 榎野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 教授
研究協力者 前島 洋平 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 助手
木野村 賢 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 大学院生
喜多村真治 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学

研究要旨

末期腎不全患者の増加を抑制するためには、慢性腎臓病患者における腎障害の進展を阻止する必要があり、その観点から腎再生医療が現在注目されている。腎再生に関する幹細胞の存在部位については、「骨髄由来」「腎組織由来」などの可能性がこれまでに検討されている。我々はラット腎成体由来腎幹前駆細胞様細胞（rKS56 細胞）を樹立した。本研究にて、rKS56 細胞を急性腎尿細管傷害モデルに外因性に投与し、組織修復作用及び腎構成細胞への分化能等に関して検討を行った。

虚血再還流モデル急性腎不全ラットの腎皮質内に rKS56 細胞を投与すると、腎皮髄境界部尿細管に主に生着し、一部は Aquaporin-1 陽性を呈し、近位尿細管上皮細胞への分化が示唆された。また急性尿細管傷害の指標である尿中 NAG の増加は rKS56 細胞治療群にて非治療群に比して有意に抑制された (Kitamura, S., FASEB J, 2005)。一方、シスプラチン誘導急性腎不全ラットモデルにて腎被膜下に rKS56 細胞を投与すると、腎被膜下・一部腎皮質に生着し、一部は Aquaporin-1 陽性で近位尿細管上皮細胞への分化が示唆された。また、rKS56 細胞治療群にて有意の腎機能 (S-Cr) 改善効果を day 5 において認めた。

ラット急性尿細管傷害モデルにおける rKS56 細胞による腎組織修復及び腎機能改善作用が観察され、本細胞治療の急性腎不全における腎再生を介した治療効果が示唆された。

A. 研究目的

種々の原疾患より慢性腎臓病を呈するが、予後不良例では原疾患の如何にかかわらず末期腎不全に至る。末期腎不全患者における腎機能代替治療として血液透析・腹膜透析・腎移植が現在施行されている。近年の医療技術の進歩により、末期腎不全患者の長期生存が可能となっている一方、本邦における透析人口増加・総医療費における透析医療費の割合の増加が問題となっている。また、血液透析・腹膜透析では腎機能を完全には代償し得ず、また長期透析による心血管系等の慢性期の合併症が問題となる。一方、生体腎移植が主体である本邦では腎移植に必要なドナー数が不足している現状である。従って、末期腎不全患者数増加の抑制が腎臓病領域における重要課題である

が、そのためには慢性腎臓病患者における腎障害の進展を阻止する必要があり、腎再生医療が現在注目されている。

腎臓領域での日常臨床の場において、虚血や薬剤に起因する急性腎不全症例がしばしば経験されるが、その多くは一過性の尿細管壊死・腎機能障害に留まり、その後腎組織自然修復がしばしば観察される。

腎急性尿細管壊死・急性腎不全の実験モデルとして、虚血再還流腎障害モデルやシスプラチン腎障害モデルが汎用されている。虚血再還流モデルは腎動脈血流を一過性に遮断した後に再環流させることにより、主として近位尿細管上皮細胞 (S3 セグメント) の壊死・剥離を起こし一過性の急性腎不全を来す。一方、シスプラチンは临床上抗癌剤として使用されるが、同様に近位尿細管

上皮細胞 (S3 セグメント) の壊死・剥離を起し急性腎不全を惹起する。両モデルとも一過性に腎機能・腎組織障害を来すが、自然経過にて改善する可逆性実験モデルである。

このような障害腎修復に寄与する可能性がある腎幹細胞の存在の可能性が示唆されており、これまでに骨髄及び腎組織由来腎幹細胞に関する検討が報告されている。しかし、これまでに成体腎から組織幹細胞を単離・樹立した報告は認めていない。

幹細胞は生理的状態では slow-cycling だが、障害時には細胞周辺の微小環境 (niche) が変化し、増殖能が亢進し組織修復促進に寄与するものと考えられている。当科の喜多村らは、虚血再環流腎尿細管障害モデルラットにて、BrdU 陽性増殖細胞が腎皮髄境界部に多数観察されることに着目し、腎の組織幹細胞の単離を試みた。microdissection 法を用いて腎ネフロン of 各 segment を単離し、それらを培養した後、outgrow した細胞を段階希釈、培養し、皮髄境界部 (S3 segment) 由来細胞より増殖能の高い細胞 (rKS56) を単離した (Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, et al. FASEB J. 19: 1789, 2005)。

rKS56 細胞は増殖能を有し、長期継代培養可能で、敷石状形態を呈し上皮系・間葉系細胞マーカー並びに腎発生に関与する Pax-2・WT-1・Wnt-4 を発現していた。したがって、rKS56 細胞は腎上皮細胞に由来し、未分化な形質を持つことが示唆された。また、異なる培養条件下にて rKS56 細胞の異なるネフロンセグメントへの分化が観察され、多分化能が示唆された。

以上の結果より、rKS56 細胞が腎の幹/前

駆細胞として作用するものと考えられた。

組織幹細胞は、組織に存在し、生理的な細胞の脱落や、臓器が傷害された際の修復・再生に関与する。これまでに、虚血再環流急性腎不全動物モデルにおいて骨髄由来幹細胞の (経静脈的もしくは経腎動脈的投与) 障害腎への生着が報告されている。今回我々は、rKS56 細胞を急性一過性腎障害モデルに外因性に投与し、組織修復促進効果を検討した。さらに、種々の異なる細胞投与経路による、生着分化・腎機能改善作用の差異に関して検討を行った。

B. 研究方法

(1) rKS56 細胞標識

投与した rKS56 細胞を追跡するため、虚血再還流モデルへの投与実験では、Vybrant Di-O solution にて標識した。rKS56 細胞を Vybrant Di-O solution を含む無血清培地内で 10 分間 incubate し標識した後無血清培地で 2 回洗浄し細胞投与を行った。

(2) rKS56-LacZ 細胞の作成

投与した rKS56 細胞を追跡するため、シスプラチン誘導急性腎不全モデルへの細胞投与実験では、LacZ plasmid 導入 rKS56 細胞 (rKS56-LacZ 細胞) を作成し、細胞移植に用いた。IV 型コラーゲンでコートした 6-well plate に rKS56 細胞を 5×10^4 cells/well にて撒き、1 日後に Fugene-6 (Roche Diagnostic) を用い pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ plasmid を細胞内に導入した。Lac-Z を恒性発現した rKS56 細胞を得るために、G418 (Sigma) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有培地で培養し、得られたコロニーを single cell にして再度培養、出現したコロニーを X-gal staining kit (Roche) にて染色し、青色に染まったコロニーを選択して取り出し、そ

の細胞群を G418 (500 µg/ml) 含有培地にてさらに継続培養した。

(3) 虚血再還流ラット急性腎不全モデルへの rKS56 細胞投与

100-150g 体重の雄性 SD ラット (Clea Japan Inc.) の右腎動脈を結紮し、左腎を摘出した。予備実験では、虚血再還流モデルでの腎障害は第 3-4 病日がピークで、第 7 病日には腎機能・腎組織変化が改善した。40 分後に結紮を解除し、400 µl の墨汁を加えた PBS で懸濁し、Di-O 標識した rKS56 細胞 (1.6×10^7 個) を、右腎臓の皮質内に 4 ヶ所注入した。①対照非疾患群 ($n = 6$)、②虚血再還流非治療群 ($n = 7$)、③虚血再還流 rKS56 細胞投与群 ($n = 6$) の 3 群を作成した。第 4, 7 病日に屠殺し、腎機能評価及び腎組織学的検討を行った。

(3) シスプラチン惹起急性腎不全ラットモデルへの rKS56 細胞投与

200-250g 体重の雄性 SD ラットの腹腔内に、生食で溶解したシスプラチン (sigma) を 6 mg/kg 単回投与した。既報にてシスプラチン投与後、5 日目に BUN/Cr 増悪がピークとなり、9 日目に改善することが報告されている。シスプラチン投与 2 日後に rKS56 - LacZ 細胞を左腎被膜下もしくは経左腎動脈的に投与した。被膜下投与群では、 1.0×10^6 個の rKS56 - LacZ 細胞 (生食 300 µl) を腎被膜下に被膜が膨隆するように 27G 針を用いて投与した。また経左腎動脈的投与群では、下行大動脈の腎動脈分岐部の上下と右腎動脈の計 3 ヶ所を阻血し、左腎動脈分岐部に 27G 針を穿刺し、 1.0×10^6 個の rKS56 - LacZ 細胞 (生食 300 µl) を投与した。穿刺部の止血を確認後、3 ヶ所の阻血を解除した。実験は①腎被膜下・rKS56 - LacZ

細胞投与群 ($n = 5$)、②経腎動脈・rKS56 - LacZ 細胞投与群 ($n = 5$)、③腎被膜下・生食投与群 ($n = 5$)、④経腎動脈・生食投与群 ($n = 4$) の計 4 群で検討した。シスプラチン投与後第 5, 9 病日に屠殺し、両側腎・を摘出した。血清 BUN・Cr・総蛋白, AST・ALT による肝機能の評価、尿蛋白と尿中クレアチニン、尿中 NAG 定量を行った。

(4) Bluogal 染色

投与した rKS56-LacZ 細胞の腎への生着を確認する目的で腎組織の Bluogal 染色を行った。すなわち、摘出腎を固定液 (PBS, 2%paraformaldehyde, 0.2%glutaraldehyde, 0.02%Nodidet-P40) に、 $4^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 時間浸漬し、PBS にて洗浄後、1 mg/ml Bluogal (LacZ 基質) 反応液 (3mM potassium ferricyanide, 3mM potassium ferrocyanide, 0.2%sodium deoxycholate, 1.5 mM magnesium sulfate, 0.1% Nonidet P-40) 内に $4^{\circ}\text{C} \cdot 24$ 時間浸漬し、発色させた。その後、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。

(5) 免疫組織化学染色

腎組織における近位尿細管マーカー発現・細胞増殖を検討する目的にて、AQP-1・Ki-67 染色を行った。bluogal 染色後腎組織のパラフィン切片 (4 µm) を用い、10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 内で 10 分間 microwave 処理 (抗原賦活) した。一次抗体として抗 AQP-1 抗体 (Chemicon, 1:400)・抗 Ki-67 抗体 (DAKO, 1:100) を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体 (フナコシ) を用い、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) にて発色させた。

また、尿細管基底膜同定の目的で、IV 型コラーゲンの免疫染色を行った。bluogal 染色後腎組織のパラフィン切片 (4 µm) を

0.1%トリプリン液にて37°C、30分処理した。一次抗体として抗IV型コラーゲン抗体 (LSL, 1:100)、二次抗体としてビオチン標識抗マウス抗体(フナコシ)を用い、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories)にて発色させた。

(倫理面への配慮)

本実験に関しては岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験施設の定める動物実験倫理規定に基づいて施行した。

C. 研究結果

(1) 虚血再還流ラットにおける rKS56 細胞の生着・分化及び組織修復効果

虚血再環流(I/R)モデルラットにDi-0標識した rKS56 細胞を皮質内注入し、7日後に屠殺して腎を観察した。Di-0陽性細胞は腎皮髄境界部の尿細管に主に生着し、上皮細胞マーカーサイトケラチン陽性であった。また一部のDi-0陽性尿細管上皮細胞はAquaporin-1陽性であり、近位尿細管上皮細胞 lineage への分化が考えられた。Di-0陽性細胞は注入部位の周囲だけでなく、穿刺部から離れた皮質・髄質部位にも局在が観察された。

血清学的検討では、BUN・CrはI/R非治療群とrKS56細胞投与I/R群との間に有意差は認めなかった。一方、急性尿細管傷害マーカーである尿中NAGはI/R非治療群に比して、rKS56細胞投与I/R群にて有意に減少していた。

(2) シスプラチン誘発急性腎不全モデルにおける rKS56-LacZ 細胞の生着・分化及び組織修復効果

シスプラチンを腹腔内に投与し、2日後にLacZ遺伝子を導入した rKS56-LacZ 細胞

もしくは生食を腎被膜下もしくは経腎動脈的に投与し、細胞投与後3日及び7日目に屠殺した。各シスプラチン投与群の平均体重は、投与5日目まで減少を認め、その後増加した。rKS56-LacZ細胞腎被膜下投与シスプラチン腎症群にて対照シスプラチン腎症群に比して体重増加が多い傾向を認めた。

rKS56-LacZ細胞腎被膜下投与シスプラチン腎症群では、投与後3日目に、Blue-gal染色陽性(青色に染色)細胞が腎被膜下に散在し、rKS56-LacZ細胞の生着が確認された(図1・A・a)。細胞投与7日目では、肉眼的に腎被膜の肥厚を認め、Blue-gal染色にて腎被膜下及び一部皮髄境界部に管腔様構造を呈する rKS56-LacZ細胞が確認された(図1・A・b-e)。これらの腎被膜下の管腔様構造を呈した rKS56-LacZ細胞はAquaporin-1を発現しており、近位尿細管上皮細胞 lineage への分化が示唆された(図1・B・a)。さらに、細胞投与7日目において、腎被膜下・皮質内の rKS56-LacZ細胞はKi-67陽性で、増殖能を有していた(図1・B・b)。また、管腔様構造を呈した rKS56-LacZ細胞のbasolateral側で、IV型コラーゲン陽性の基底膜形成が観察された(図1・B・c)。一方、rKS56-LacZ細胞経腎動脈投与シスプラチン腎症群では、腎臓内への細胞生着は観察し得なかった。

シスプラチン投与5日目における血清BUN・Crの上昇は rKS56-LacZ細胞腎被膜下投与群にてvehicle腎被膜下投与群に比して有意に抑制された。rKS56-LacZ細胞経腎動脈投与群では、vehicle経腎動脈投与群に比して腎機能改善効果は認められなかった。BUN・Crともシスプラチン投与9日目には、各群にてほぼ正常値まで改善した