

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09259

研究課題名(和文) エリスロポエチン産生細胞の新規系譜追跡を用いた形質維持機構と可塑性の解明

研究課題名(英文) Novel transgenic mice, Erythropoietin-CreERT2 mice, label unique subpopulations of renal fibroblasts

研究代表者

遠藤 修一郎 (Endo, Shuichiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80533380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(Epo)は腎臓の線維芽細胞によって産生され、慢性腎臓病患者では、腎臓のエリスロポエチン(Epo)産生能が低下することで腎性貧血を発症する。Epo産生細胞が腎臓の線維芽細胞における特殊な細胞集団であるのかは不明のままであった。そこで新規遺伝子組換えマウスを作成し、任意の時点のEpo産生細胞を標識する系を確立した。このマウスを用いた解析から、Epo産生細胞はEpo産生能を長期間維持し、線維化腎では高い増殖能を有する特殊な細胞集団であることが示された。Epo産生細胞の解析が、腎性貧血の新規治療法開発に役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規遺伝子組換えマウスEpo-CreERT2マウスを作製し、任意の時点でEpo産生細胞を標識することに成功した。このマウスを用いて、成体腎におけるEpo産生細胞が線維化腎でmyofibroblastに形質転換することを初めて証明した。さらに特定の細胞が繰り返しEpo産生を担う可能性やEpo産生細胞が他の線維芽細胞と比べて増殖しやすい可能性が示唆され、Epo産生細胞は線維芽細胞における特殊な細胞集団である可能性が示唆された。今後、Epo産生細胞集団の解析を進め、腎性貧血の機序の解明と新規治療法開発に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (Epo) is produced by a small subpopulation of resident fibroblasts in the healthy kidney and renal anemia is one of the complications of chronic kidney disease (CKD). It has not been fully elucidated whether Epo-producing cells are the distinct and specialized subpopulation of resident fibroblasts, or all resident fibroblasts possess the capacity to produce Epo. Here we generated a novel mouse strain, EpoCreERT2/+ mice, which label Epo-producing cells at the desired time points, and examined the behaviors of Epo-producing cells. Utilizing this mouse strain, we showed that Epo-producing cells maintained Epo-producing ability and proliferated during fibrosis, indicating that Epo-producing cells are the distinct population of renal fibroblasts. Further analysis of the Epo-producing cell population will lead to new therapeutic approach to renal anemia.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎線維化 腎性貧血 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) は近年爆発的な増加を続け、我が国で罹患患者が 1300 万人を超える。腎臓は赤血球産生に必須のホルモンであるエリスロポエチン (Epo) を産生する内分泌器官としての側面を持ち、CKD が進行すると腎臓における Epo 産生が不十分になり腎性貧血を呈する。我々は以前の研究で、発生段階に腎臓に移入した神経堤由来細胞が線維芽細胞に分化し、Epo 産生能を獲得すること、その細胞の機能不全が腎性貧血の原因であることを示した。以前の研究では腎線維芽細胞をひとまとめに標識しているため、Epo 産生細胞自体の挙動の観察は難しく、未解明な点が残されていた。例えば、ある時点の腎線維芽細胞に占める Epo 産生細胞は 10% 未満と非常に少数であることが知られているが、少数の特殊な細胞集団が Epo 産生を担っているのか、それとも腎臓の線維芽細胞の全てが Epo 産生能を有し、その時々で少数の線維芽細胞が Epo 産生を行っているのかのどちらであるのは不明であった。Epo 産生細胞自体の性質が未解明であるため、腎性貧血の病態機序研究や治療法開発の障害となっていた。

2. 研究の目的

これまでの研究では、in situ hybridization 法で Epo mRNA 発現を可視化するなどの方法で、Epo 産生自体を手がかりにして Epo 産生細胞を観察していた。そのため、障害され Epo 産生能が低下した腎臓では Epo 産生細胞を観察することが出来ず、Epo 産生細胞の挙動は不明のままであった。また、Epo 産生を休止している Epo 産生細胞の観察も不可能であった。任意の時点の Epo 産生細胞を標識し、Epo 産生細胞を追跡する手法が、これらの問題を解決するために有効と考えられた。

当研究では任意の時点で Epo 産生細胞を標識することを可能とする遺伝子組み換えマウスを作製し、この遺伝子組み換えマウスの有効性を検証した。さらに同マウスを用いて系譜追跡を行い、健康腎と障害腎における、Epo 産生細胞と他の腎線維芽細胞の挙動や性質の違いを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Epo 遺伝子座に Cre^{ERT2} 遺伝子をノックインすることで、Epo 産生細胞を任意の時点で標識する遺伝子組み換えマウス、Epo-Cre^{ERT2} マウスを作製した。まず、Epo-Cre^{ERT2} マウスが Epo 産生細胞を正しく標識しているかの評価を行うため、Epo-Cre^{ERT2} マウスに R26tdTomato マウスを交配し、その仔 (Epo-Cre^{ERT2}:tdTomato マウス) に貧血を惹起しながら tamoxifen を投与して組み換えを誘導した。Tamoxifen 投与 48 時間後にマウス腎臓を回収し評価した。続いて下の 2 つの検討を行った。

(2) 健康な腎臓において、Epo 産生細胞が特殊な細胞であるかの検討

Epo 産生細胞が健康な腎臓で長期間 Epo 産生能を維持する特殊な細胞集団であるかを評価するため、Epo-Cre^{ERT2}:tdTomato マウスに tamoxifen を投与して組換え誘導を行い、5 週間後、16 週間後に貧血を惹起してマウスを回収した。それぞれのタイミングで標識された細胞が Epo 産生能を保持しているかを検討した。

(3) 線維化腎における Epo 産生細胞と他の線維芽細胞の挙動の検討

背景で述べたように、障害腎では Epo 産生能が低下し腎性貧血を発症する。障害腎において Epo 産生細胞が死滅しているのか、それとも Epo 産生細胞は存在しているが Epo 産生できない状態になっているのかも不明のままであった。線維化腎における Epo 産生細胞の挙動を評価するため、Epo-Cre^{ERT2}:tdTomato マウスに tamoxifen による組み換え誘導を行い、5 週間後に一側尿管結紮 (Unilateral Ureteral Obstruction: UUO) による線維化を惹起した。健康腎と線維化腎を回収し、評価を行った。

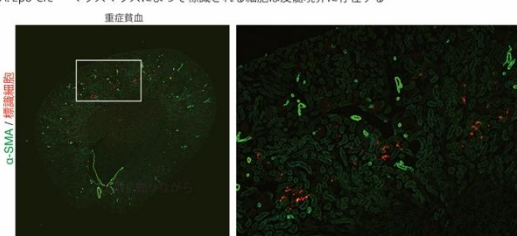
4. 研究成果

(1) Epo-Cre^{ERT2} マウスが Epo 産生細胞を正しく標識するかの検討

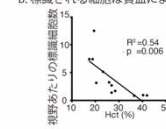
Epo-Cre^{ERT2} マウスに R26tdTomato マウスを交配し、その仔 (Epo-Cre^{ERT2}:tdTomato マウス) に貧血を惹起しながら tamoxifen を投与して組み換えを誘導した。同マウスによって標識される細胞は腎臓の皮髄境界の間質に存在し、PDGFR 及び CD73 を発現する線維芽細胞であった。貧血誘導による Epo 遺伝子発現の活性化によって、同標識細胞は増加した。RNAscope を用いた Double in situ hybridization によって、Cre^{ERT2} mRNA 発現細胞が Epo mRNA を発現していることを確認した。これらの結果から Epo-Cre^{ERT2} マウスが Epo 産生細胞を正しく標識することが示された。

図 1. Epo-Cre^{ERT2} マウスによって、Epo 産生細胞が標識される

A. Epo-Cre^{ERT2} マウスマウスによって標識される細胞は皮髄境界に存在する



B. 標識される細胞は貧血によって増加する



C. 標識細胞は Epo mRNA を産生する

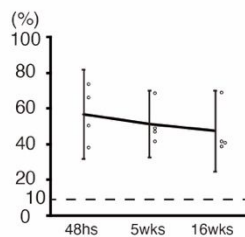


(2) 健康な腎臓において、Epo 産生細胞が特殊な細胞であるかの検討

健康な腎臓における Epo 産生細胞の挙動の評価を行った。組換え誘導直後、組換え誘導から 5 週間後、16 週間後の Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞の約 50%が Epo 産生能を有しており、その割合は低下しなかった。線維芽細胞全体に占める Epo 産生細胞の割合は最高で約 10%と報告されている。線維芽細胞に占める Epo 産生細胞の割合と比較し、Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞に占める Epo 産生細胞の割合は有意に高値であった。

この結果から、Epo 産生細胞は健康な腎臓で繰り返し Epo 産生を担う、線維芽細胞内の特殊な細胞集団である可能性が示唆された。

図 2. Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞に占める Epo 産生細胞の割合



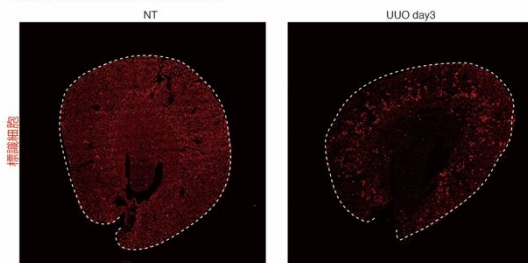
(3) 線維化腎における Epo 産生細胞と他の線維芽細胞の挙動の検討

UUO による線維化を惹起し、線維化腎における Epo 産生細胞の挙動の検討を行った。Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞は線維化腎で myofibroblast に形質転換するとともに増殖した。線維化腎では Epo 産生能が低下し腎性貧血を発症する。今回の結果から線維化腎において Epo 産生細胞は Epo 産生能が低下するが死滅しておらず、形質転換した状態で存在していることが示された。

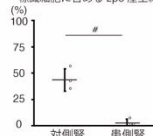
UUO を施行して、さらに貧血を惹起して Epo 産生を活性化して腎臓を回収したが、myofibroblast に形質転換した Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞の Epo 産生能は著しく低下していた。同標識細胞における ki67 陽性細胞の割合は他の線維芽細胞と比較して有意に高かった (Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞 $8.3 \pm 1.7\%$, 線維芽細胞 $12.7 \pm 1.7\%$, $p=0.03$)。腎線維芽細胞に占める同標識細胞の割合は、障害前の 1.9%から UUO3 日後に 9.2%に増加した。この結果から

図 3. 線維化腎での Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞の検討

A. 線維化腎で標識細胞が著しく増加する



B. 線維化腎では、標識細胞の Epo 産生能が著しく低下している
標識細胞に占める Epo 産生細胞の割合



Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞は他の線維芽細胞と比較して増殖が早い細胞集団である可能性が示された。

今回の結果から、Epo 産生細胞は線維化腎で死滅しておらず、myofibroblast に形質転換して存在することが示された。Epo 産生細胞は Epo 産生能を失っていた。Epo 産生細胞は他の線維芽細胞よりも増殖が早く、特殊な細胞集団である可能性が示唆された。

これまでの結果から Epo 産生細胞が特殊な細胞集団である可能性が示唆された。Epo 産生細胞を単離し、遺伝子発現など特徴的な性質を検討することを試みた。しかしながら、Epo-Cre^{ERT2} 標識細胞が線維芽細胞に占める割合が 2%未満と非常に少数であるため、十分な細胞数が得られず、この検討は行えなかった。

新規遺伝子組換えマウス Epo-Cre^{ERT2} マウスを作製し、任意の時点で Epo 産生細胞を標識することに成功した。このマウスを用いて、成体腎における Epo 産生細胞が線維化腎で myofibroblast に形質転換することを初めて証明した。さらに特定の細胞が繰り返し Epo 産生を担う可能性や Epo 産生細胞が他の線維芽細胞と比べて増殖しやすい可能性が示唆され、Epo 産生細胞は線維芽細胞における特殊な細胞集団である可能性が示唆された。今後、Epo 産生細胞集団の解析を進め、腎性貧血の機序の解明と新規治療法開発に繋げたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. A Refractory Case of Secondary Membranous Nephropathy Concurrent with IgG4-related Tubulointerstitial Nephritis.

Arai H, Toda N, Kamimatsuse R, Nishioka K, Endo S, Akiyama S, Maruyama S, Matsubara T, Yokoi H, Yanagita M. Intern Med. 2018

〔学会発表〕(計 3 件)

1. American Society of Nephrology, 2017/11/3
“Lineage tracing study defines erythropoietin-producing cells as the distinct subpopulation of resident fibroblasts with unique behaviors”
Keiichi Kaneko, Misako Asada, Shuichiro Endo, Motoko Yanagita

2. ISN Frontiers meetings, 2018/2/23
“Novel transgenic mice, Erythropoietin-CreERT2 mice, label unique

subpopulations of renal fibroblasts”
Keiichi Kaneko, Misako Asada, Shuichiro
Endo, Motoko Yanagita

3.

第 61 回日本腎臓学会学術総会,
2018/6/10

“ エリスロポエチン産生細胞の特徴的な挙
動の解明 ”

金子 恵一, 浅田 三咲子, 遠藤 修一郎,
柳田 素子

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤修一郎 (Endo Shuichiro)

研究者番号：80533380

京都大学医学研究科 助教

(2)研究分担者

柳田素子 (Yanagita Motoko)

研究者番号：70378769

京都大学医学研究科 教授

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()