

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15689

研究課題名(和文)腎組織幹細胞を用いた機能的腎小体の再生

研究課題名(英文)Regeneration strategy of the functional renal corpuscle using renal stem cells

研究代表者

渡部 昌実(Watanabe, Masami)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：70444677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医療の根本的課題ともいえる組織立体構造の構築および臓器レベルでの組織再生といった課題を改めて認識した。我々が樹立した腎組織幹細胞株に基づき、これら幹細胞のin vivoでの分化を目指した局所注入技術についての基盤研究を行った。すなわち組織内への細胞移植の観点から、In situ permeation技術を用いて様々な溶媒について、様々な組織において組織内注入・拡散に関する実験を実施した。また、血管内皮系幹細胞株に関わる幹細胞として間葉系幹細胞の有用性について着目し、当該幹細胞に関する分離、培養、また細胞機能に関する基盤研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内における慢性腎不全患者の増加に伴い、腎臓再生、腎機能再生に大きな期待が寄せられている。ES(胚性幹)・iPS(人工多能性幹)細胞等の分化万能性幹細胞を用いた腎再生研究において、腎機能を担う腎小体・尿細管等の再生を目指した報告も存在する。一方で、様々な腎組織幹細胞群が樹立されれば、例えばそれら幹細胞を腎臓内に局所移植するなど、腎臓機能の再生に一步近づくことができると考えられる。このような学術的・社会的観点から本研究を実施し、一定の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we recognized the difficulty of the construction of three-dimensional structure and organ volume-regeneration. We performed basic studies based on our originally developed renal stem cells derived from human primary kidney cells by transfecting iPS four factors. In order to establish the focal injection, diffusion, transplantation technique of the stem cells, we used the In situ permeation system. We also performed basic studies in terms of the mesenchymal stem cells which is relevant to the renal stem cells derived from the glomerular endothelial cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎臓 幹細胞 再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本国内における慢性腎不全患者の増加に伴い、腎臓再生、腎機能再生に大きな期待が寄せられている。ES (胚性幹)・iPS (人工多能性幹)細胞等の分化万能性幹細胞を用いた腎再生研究において、腎機能を担う腎小体・尿管等の再生を目指した報告も存在する。一方で、様々な腎組織幹細胞群が樹立されれば、例えばそれら幹細胞を腎臓内に局所移植するなど、腎臓機能の再生に一步近づけることができると考えられる。本研究の前段研究で腎組織幹細胞(腎機能再生に必要な自己増殖能を持つ幹細胞)の候補株を複数樹立しており、本研究ではこれらの背景を基に、腎機能再生に係る基盤研究を実施した。

2. 研究の目的

既報告の分化万能性幹細胞を経ることなく、開発した独自技術:「逆行性幹細胞誘導法」に基づき腎組織幹細胞を誘導・分離する手法を確立し、検証する。さらに誘導・分離した尿管系および血管内皮系幹細胞の *in vitro* および *in vivo* での機能的腎小体への分化能を検証する為の研究手技を確立し、腎再生研究の基盤を整える。

3. 研究の方法

in vitro 実験として、正常腎臓由来の初代培養細胞(尿管系と血管内皮系に分けて培養)に山中4因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)をトランスフェクションして、直接的に尿管系および血管内皮系幹細胞を誘導・分離した。これらの2種類の腎組織幹細胞の樹立過程において、逆行性幹細胞誘導法を用い、各種幹細胞マーカーについて検証を加えた。また、同様に我々の開発した「組織特異的幹細胞分離法」を用いて腎組織幹細胞を分離する条件についても検討を加えた。また、*in vivo* 実験において小動物に尿管系および血管内皮系腎組織幹細胞を混合して局所移植・注入する実験を実施するにあたり、それぞれの実験条件での機能的腎小体の再生を検証する為の研究手技の確立に関する実験を実施した。その中で、組織局所での幹細胞の浸透・拡散を達成する為に我々が開発した技術:「In situ permeation システム」を用いた条件検討を行った。

4. 研究成果

泌尿器科領域においては腎臓再生、腎機能再生に大きな期待が寄せられている。ES (胚性幹)・iPS (人工多能性幹)細胞等の分化万能性幹細胞を用いた腎再生研究において、腎機能を担う腎小体・尿管等の再生を目指した報告も存在する。一方で、様々な腎組織幹細胞群が樹立されれば、これらの幹細胞を組み合わせて使用することにより、*in vivo*組織としての腎臓の再生に一步近づけることができると考えられ、本研究においてそれらの樹立・検証を行った。さらに本研究では、我々が樹立した腎組織幹細胞株に基づき、腎再生手法の基盤を確立することを目的として各種研究を実施した。また、再生医療の根本的課題ともいえる組織立体構造の構築および臓器レベルでの組織再生といった課題を改めて認識した。現状、腎組織幹細胞株から成るスキャフォールドを用いた腎機能組織の作成は困難と考えられ、これらの幹細胞の *in vivo*での分化を目指した局所注入技術についての研究を行った。より具体的には、組織内への細胞移植の観点から、In situ permeation法を用いて様々な溶媒について、様々な組織において組織内注入実験を実施した。本研究により一定の成果が得られたが、生体内に各種溶液、細胞を拡散、浸透させる為の局所注入技術の改良に関する研究を継続する予定である。また本研究では、血管内皮系幹細胞株に関わる幹細胞として間葉系幹細胞の有用性について着目し、当該幹細胞に関する分離、培養、また細胞機能に関する基盤研究を実施した。血管内皮系幹細胞株と間葉系幹細胞を比較することにより、各細胞の表現型や各種Key遺伝子の発現パターンについての解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5件)

Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based

Proteomic Analysis of Primary Cultured Cells and Subcultured Cells Using Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2019 Jan 10;2019:7274057. doi: 10.1155/2019/7274057. 査読有.

Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease. *World J Stem Cells.* 2018 Nov 26;10(11):146-159. doi: 10.4252/wjsc.v10.i11.146. 査読有.

Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. A Comparison of Proteins Expressed between Human and Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by a Proteome Analysis through Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 6;19(11). pii: E3497. doi: 10.3390/ijms19113497. 査読有.

Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Kitamura S, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Induction of Expandable Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Aged Mesenchymal Stem Cells by a Synthetic Self-Replicating RNA. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 6;19(11). pii: E3489. doi: 10.3390/ijms19113489. 査読有.

Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. A Comparison of the Preservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the University of Wisconsin Solution and Hank's Balanced Salt Solution. *Stem Cells Int.* 2018 Sep 6;2018:1625464. doi: 10.1155/2018/1625464. 査読有.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野口 洋文

ローマ字氏名：(NOGUCHI HIROFUMI)

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：50378733

研究分担者氏名：定平 卓也

ローマ字氏名：(SADAHIRA TAKUYA)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 20733322

(2)研究協力者

研究協力者氏名：那須 保友

ローマ字氏名：(NASU YASUTOMO)

研究協力者氏名：植木 英雄

ローマ字氏名：(UEKI HIDEO)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。