

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09696

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞に着目した腎間質線維化の機序解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the role of mesenchymal stem cell marker Meflin in kidney fibrosis

研究代表者

齋藤 尚二 (Saito, Shoji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00635609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腎線維化に深く関与する細胞の一つとして間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; 以下MSC)があるが、私達は最近MSC特異的マーカーMeflinを同定した。本研究ではMeflinと腎線維化の関係に着目し、腎線維化におけるMeflinの発現部位の確認、腎線維化におけるMeflinの細胞系譜解析を検証した。正常腎や腎炎をおこした病腎におけるMeflinの発現量と局在を検討した。正常腎でもMeflinの発現は間質に見られるが、炎症をおこした後には間質の線維化部位にもMeflinの発現が上昇していることを確認した。更に間質線維化におけるMeflin陽性細胞の挙動を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCは近年、細胞治療や再生医療の分野で注目される細胞である。MSCは炎症集積性を有する細胞であり、さらには筋線維芽細胞のソースであることから、線維化疾患の理解においてMSCの理解は必須である。Meflinは私達が知る限り未分化MSCの最も特異的なマーカーであり、MSCの研究において今後非常に有用なマーカーとなると推察される。

Meflinの機能解析を基軸にして、腎線維化の機序解明をする研究である。線維化は慢性腎臓病のみならず、心不全、肝硬変、肺線維症、癌と多様な疾患の病態理解に必須であることから、その医学への貢献は高く評価されるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is a key regulator of organ damage. myofibroblast is essential for rise of fibrosis, and it is said that MSC is one of the origin. We previously report that a cell surface and secreted protein, Meflin, is expressed in cultured MSCs, fibroblasts and pericytes, but not other types of cells including epithelial, endothelial and smooth muscle cells. We also found Meflin is a potential marker for cultured MSCs and focused on the mechanism of fibrosis by investigating Meflin.

We discovered that Meflin expresses in intersitium and around the vascular pole of glomerulus. And its' expression increases when glomerular inflammation and fibrosis progresses. We also investigated the manner of Meflin positive cells with Meflin reporter mice generated in our lab. In vitro study also suggested that Meflin is positively regulating kidney fibrosis.

研究分野：腎線維化

キーワード：腎線維化 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器線維化は創傷治癒における一つの転帰であり、あらゆる臓器の慢性疾患や老化による機能不全状態において普遍的に認められる組織変化である。腎臓においてはステージの進行した慢性腎臓病における腎線維化がそれに当たる。線維化とは「平滑筋アクチン (α -SMA)陽性筋線維芽細胞の増生とそれに伴う細胞外基質の沈着」と説明されるが、実は筋線維芽細胞の本態や起源は未確定で諸説あり、尿細管上皮細胞・末梢血前駆細胞・骨髄幹細胞・血管内皮細胞・周皮細胞など複数の報告がある。実験的確認(細胞系譜解析)が示されているものの一つとしては間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell; 以下 MSC)がある。MSCの最大の特徴は炎症部位集積性や腫瘍集積性を有し、さらに炎症鎮静化作用を発揮するという点である。しかしながら、炎症や腫瘍に集積したMSCは「諸刃の剣」であり、問題は集積したMSCが時間経過とともに α -SMA陽性筋線維芽細胞に分化し線維化をもたらすことである。

研究代表者はドイツで Goettingen Medical Center の Michael Zeisberg 教授の研究室にて長らく腎線維化の研究に携わってきた。中でも Wnt シグナルとの関係性に着目し、Wnt シグナルが腎線維化に大きな役割を果たす事を報告してきており (Saito et al, Fibrogenesis Tissue Repair, 2015) 更に腎間質の線維化の原因となる筋線維芽細胞の起源を探索してきた。そんな中、研究代表者らは最近もっともMSCに特異的なマーカー分子として Meflin (メフリン) を同定した (特願 2015-153712、Maeda et al, Sci Rep, 2016)。Meflin はこれまでのMSCマーカーと異なり、造血幹細胞、血球、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、神経細胞、癌細胞には発現しない。更に研究代表者らは予備的検証としてマウス心筋梗塞モデルの梗塞部位に Meflin 陽性細胞が高度に集積すること、また Meflin ノックアウトマウスでは梗塞後心臓破裂による死亡率が高いことを明らかにした。このことは炎症の早期に集積する Meflin 陽性MSCが組織の修復に重要であることを示唆している。しかしながら前述の通り、問題はこの炎症部位に集積した Meflin 陽性MSCが時間経過とともに α -SMA陽性筋線維芽細胞に分化し、組織の線維化を引き起こすことである。

そこで研究代表者らは「Meflin 陽性MSCは炎症部位に集積し修復に寄与するが、病態の経過とともに Meflin 陰性・ α -SMA陽性筋線維芽細胞へ分化し、腎間質の線維化に関与している。」という仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

臓器線維化は全身臓器において慢性的な組織障害に付随してくる共通した病態であり、その重症度が予後を規定することが報告されている。線維化に深く関与する筋線維芽細胞のソースの一つとして間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell; 以下 MSC) の重要性を見出し、研究代表者らは最近 MSC 特異的マーカー Meflin (特願 2015-153712) を同定した。本研究では Meflin と腎線維化の関係に着目し、腎線維化における MSC の詳細な細胞系譜解析と、Meflin 発現性レンチウイルスを産生する MSC の投与によって腎臓の線維化が可逆的に修復できるかを検証し、線維化疾患の病因・病態解明を行い、新規治療の開発を目指した。

3. 研究の方法

- (1) マウスやヒトの正常腎などの検体を用いて免疫染色や ISH を行い、発現部位を解析する。
- (2) マウス腎線維化モデル・ヒト病理組織検体や腎生検検体などを用いて免疫染色や ISH を行い、発現部位を解析する。
- (3) 腎線維化の進行における Meflin 陽性 MSC の意義を、レポーターマウスを用いた細胞系譜解析 (lineage tracing) を用いて解析する。

4. 研究成果

正常腎あるいは線維化した腎臓における Meflin の発現量と局在を検討している。尿管結紮モデル(UUO;Unilateral Ureteral Obstruction)、アデニン腎症モデルに加え、抗糸球体基底膜腎炎モデルなどの各種疾患モデルを惹起した後に経時的に腎組織を採取し、間質や糸球体周囲の線維化の進展具合を Real time PCR 法にて Meflin の発現量を、また組織学的には in situ hybridization 法を用いて Meflin の mRNA の発現分布を検討した。正常腎あるいは線維化した腎臓における Meflin の局在を検討し、腎間質や糸球体門部や血管の一部に分布することを明らかにした(図1、2)。またマウスにおいて各種腎線維化モデルを惹起すると、経時的に Meflin の発現量が上がっていくことが分かった。

図1

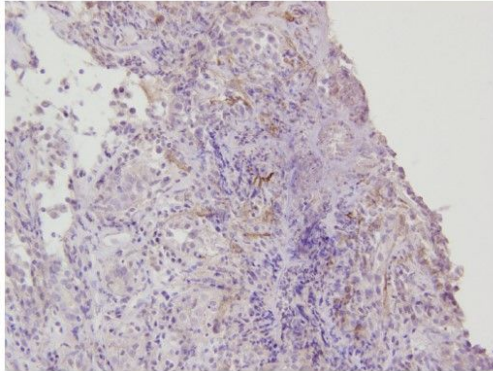
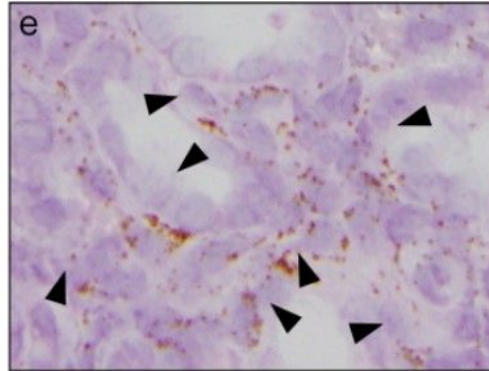
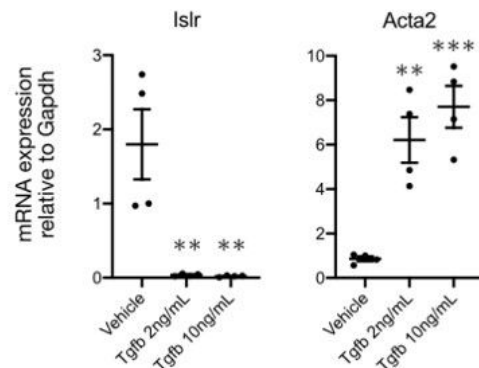


図2

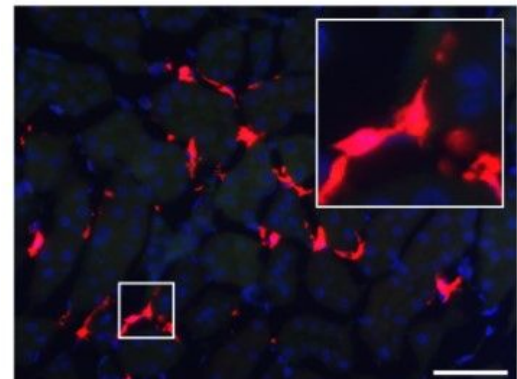


また Meflin ノックアウトマウスを用いて上記と同様な種々の腎疾患マウスを作成し、それぞれ経時的に組織の線維化の進展具合を検討し、野生型と比較している。

各種腎臓由来の細胞株や初代培養細胞を用いた in vitro の系でも Meflin の発現を検討しているが、これらの系において低酸素や TGFbeta などを用いて線維化を誘導した場合の Meflin の発現量の変化を確認している。更にこれらの細胞に低酸素や TGFbeta 刺激を用いて線維化を誘導し、細胞形態の変化、Meflin の発現量、線維化に関するマーカーの変化も検討している。これらの実験に加え、作成した Meflin ノックアウトマウスの腎臓より線維芽細胞を分離し、同じく野生型マウスの腎臓より分離した線維芽細胞との形態や各種線維化にかかわるマーカーの分布の違いを比較検討している。これらの実験からは Meflin が線維化を抑制する可能性が示された。



更にはより明確に腎臓における Meflin の発現を確認するために、Meflin 発現レポーターマウス(tdTomato)を作成した。Meflin 陽性細胞が Tomato で強烈に光るマウスの作成に成功している。このマウスを用いて解析を行ったところ、in situ hybridization 法で解析したのと同様に間質における線維化部位において Meflin の発現が確認できた。



今後、これらの遺伝子改変マウスを用いて、更なる Meflin の発現や動態を明らかにする予定であったが、遺伝子改変マウスの出生数が少なく、研究に必要な動物数を確保する事が困難であり、予想通り実験計画が進まなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara A, Kobayashi H, Asai N, Saito S, Higuchi T, Kato K, Okumura T, Bando YK, Takefuji M, Mizutani Y, Miyai Y, Saito S, Maruyama S, Maeda K, Ouchi N, Nagasaka A, Miyata T, Mii S, Kioka N, Worthley DL, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 125
2. 論文標題 Role of the Mesenchymal stromal/stem Cell Marker Meflin in Cardiac Tissue Repair and the Development of Diastolic Dysfunction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 414-430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.314806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 湊口 俊, 齋藤 尚二
2. 発表標題 Meflin is a potential marker of activated fibroblasts in kidney
3. 学会等名 9th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学医学系研究科 病態内科学 腎臓内科 再生・免疫グループの研究内容
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/kidney/research/regeneration.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸山 彰一 (Maruyama Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	榎本 篤 (Enomoto Atsushi) (20432255)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	坪井 直毅 (Tsuboi Naotake) (50566958)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	