

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006年～2008年  
 課題番号：18590912  
 研究課題名（和文）腎疾患における低酸素応答機構の解析と血管再生医療の応用について  
 研究課題名（英文）Analysis of the mechanism underlying hypoxic response and application of vascular regenerative medicine in kidney disease.

## 研究代表者

宇都宮 保典 (UTSUNOMIYA YASUNORI)  
 東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：70231181

研究成果の概要：慢性糸球体腎炎、高血圧、および糖尿病の腎障害の進展には血管病変に基づく尿細管間質内の低酸素が重要と考えられている。今回の検討結果で、腎臓内では腎障害が進行する過程で、さまざまな血管障害を促進する因子と防御する因子が産生され、そのバランスが重要であることが示された。また、血管内皮細胞は障害早期から形質の変換を起こし、その発症には加齢や高血圧が重要な役割を果たしていることが明らかになった。現在、慢性腎臓病における血管再生をターゲットとした新たな治療法の開発について基礎研究を継続している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：低酸素、血管新生、再生医療、血管内皮増殖因子、腎間質、慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 末期腎不全に至る原因疾患には慢性糸球体腎炎、高血圧性腎硬化症、糖尿病などさまざまなものがあるが、腎機能障害が進行すると、原疾患とは無関係に不可逆な経過をたどる。腎病理学的解析の結果から、糸球体の変化よりも尿細管間質障害のほうが腎機能の予後とよく相関することがわかっており、この final common pathway は尿細管間質を主体とするものと考えられている。腎臓の尿細管間質は、糸球体輸入細動脈の下流にある傍尿細管毛細血管によって酸素給与を受け

ている。近年、腎不全が進行した場合には、尿細管間質の線維化に伴い傍尿細管毛細血管の数が減少し当該部位が低酸素に陥り、さらに間質の線維化が低酸素状態を助長し悪循環を生み、尿細管間質における慢性低酸素血症状態が尿細管間質障害の進行と腎機能低下に重要であること報告されている。われわれの検討結果においても、進行性 IgA 腎症症例では間質内の傍尿細管毛細血管 (PTC) 数が減少し、管腔幅の小さな PTC を有する症例で腎機能がさらに進行することを報告している (Nephrology 2004)。一方、このよう

な低酸素状態に対し、生体は血管新生、造血、解糖系の促進などによる適応反応を備えている。したがって、慢性腎臓病の進行を抑制する上で低酸素状況に関わる病態や因子を解明すること、および間質微小循環の改善を目的とした間質血管再生に関する研究は新規腎疾患治療の開発には重要と考えられる。

現在、低酸素反応の中心的役割を果たしているのが低酸素誘導性転写因子 (hypoxia inducible factor:HIF) -1 と考えられている。腎臓での HIF は糸球体上皮細胞、尿細管上皮細胞に HIF-1 が、また、間質・血管内皮細胞には HIF-2 が発現しており、腎虚血などの刺激によりその発現は亢進し腎保護的作用を有している可能性が報告されているがいまだ不明な点が多い(Kidney Int 2003;64:874, J Am Soc Nephrol 2002;13:1721)。HIF のノックアウトマウスは胎児期や出生早期に死亡してしまうことが報告されている。そこで実験腎炎モデルおよび培養尿細管上皮細胞において RNA 干渉システムにより HIF 遺伝子の機能を制御し、低酸素刺激に対する尿細管間質細胞における HIF 関連分子の意義を解明する。

(2) 一方、近年、血管新生には VEGF をはじめとする血管新生因子のみならず幹細胞由来の血管内皮前駆細胞の存在が必要であると考えられている。また、われわれをはじめいくつかの研究成果により骨髄幹細胞は血管内皮細胞、メサングウム細胞、尿細管上皮細胞、あるいは間質細胞にも形質転換し、組織障害、あるいはその修復過程に関与していることが報告されている。

そこで、われわれが行っているシステム(J Am Soc Nephrol 12001;2:1401, J Immunol 2001;166:609,2001)を用いて GFP マウスより骨髄幹細胞を分離し、腎障害進行モデルマウスに経静脈性あるいは腎間質内投与にて移植し、進行性腎障害の治療における骨髄幹細胞による血管再生医療の応用の可能性を追求したい。

## 2. 研究の目的

(1) 当科にて腎生検を施行しえた慢性腎炎および糖尿病性腎症の症例を対象に低酸素関連分子や血管内皮細胞増殖因子などの発現を解析し、各種治療による修飾機転や腎障害進展への関与を臨床面からも解析し、本研究の臨床的重要性を明らかにする。

(2) 低酸素反応の中心的役割を果たしていると考えられている低酸素誘導性転写因子 (hypoxia inducible factor:HIF) -1 に注目し、腎虚血、低酸素下における腎障害進展の分子メカニズムを解明するとともに、実験的腎炎モデルマウスにおいて CD34 陽性骨髄幹細胞を(造血幹細胞)を体外より移植し、細動脈および PTC の血管新生を促し間質微小循環ネ

ットワークの改善を行い、障害尿細管上皮細胞の再生能力を向上させ腎障害の進行 (final common pathway) を抑制する治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 慢性腎炎および糖尿病性腎症症例における低酸素誘導分子および腎血管新生に関する検討

現在まで、腎内にさまざまな低酸素誘導分子および腎血管新生が発現していることが報告されているが、その臨床的な意義はいまだ不明である。そこで、腎障害の進展におけるこれらの分子の関与を臨床的に検討する目的で、当科にて腎生検を施行し診断しえた慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症症例を対象とし以下の検討を行う。腎組織内の HIF-1, HIF-2, VEGF, HGF, pVHL, エリスロポエチン、血管増殖因子の蛋白および遺伝子発現と、 $\alpha$ -smooth muscle actin の発現, CD31 陽性細胞、PCNA 陽性細胞、マクロファージ、T 細胞などの細胞浸潤を免疫組織ならびに in situ hybridization 法にて染色し画像解析装置にて組織学的に評価する。また、尿細管間質内のアポトーシス細胞を Caspase-3 染色および Tunnel 染色にて解析する。症例ごと以上の各パラメーターの腎組織内発現と臨床病理所見、薬物療法による修飾や腎機能予後などを比較する。

(2) 進行性腎障害実験モデルにおける低酸素誘導分子に関する検討

C57BL/6 (B6) マウスに片側腎摘後よりアルブミンを腹腔に投与する protein-overloading モデル (Zoja C, et al. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004;13:31)、および片側尿管結紮 (UUO) モデルの腎障害進行モデルを作成する。それぞれのモデルマウスの腎間質組織内の低酸素状態を同定する方法として、pimonidazole(The Hypoxyprobe-1 kit: Chemicon 社) を投与しその存在を確認する。腎組織内の HIF-1, HIF-2, VEGF, HGF, pVHL, エリスロポエチンの蛋白、および遺伝子発現と  $\alpha$ -smooth muscle actin の発現, PECAM 陽性細胞、PCNA 陽性細胞、マクロファージ、T 細胞などの細胞浸潤を免疫組織、ならびに in situ hybridization 法にて染色し画像解析装置にて組織学的に評価する。また尿細管間質内のアポトーシス細胞を Caspase-3 染色および Tunnel 染色にて解析する。

(3) 培養尿細管上皮細胞における検討

近位尿細管上皮細胞には HIF-1 $\alpha$  が存在していることが報告されている (J Biol Chem 2003;278:40296)。そこで低酸素刺激に対する近位尿細管上皮細胞の反応性とその中心的役割を果たすと考えられている HIF-1 $\alpha$  の意

義を明らかにする目的で RNA 干渉システムを用いて、その機能を制御し検討する。

①低酸素刺激に対する近位尿細管上皮細胞の反応性について

ヒト培養近位尿細管上皮細胞 (HK-2:ATCC より購入) を低酸素 (1% O<sub>2</sub>)、または正常酸素圧 (21% O<sub>2</sub>) のもとで培養し、培養細胞の細胞増殖能 (H<sub>3</sub>-thymidine の取り込み率)、形態学的変化 (F-actin 染色など)、細胞壊死 (LDH 活性)、細胞死 (Annexin V 染色)、VEGF、エリスロポエチン、adrenomedullin の蛋白および遺伝子発現レベルを ELISA 法と PCR 法にて測定する。尿細管上皮細胞核内の HIF-1 $\alpha$  は Western Blot 法にてその活性過程を同定する。さらに血管新生能を測定するため、細胞培養上清を in Vitro Angiogenesis Assay Kit (Chemicon 社) にて解析する。

②RNA 干渉(RNAi)による HIF-1 $\alpha$ 遺伝子発現抑制効果について

HIF-1 $\alpha$ 遺伝子の転写活性を抑制するため、HIF-1 $\alpha$  遺伝子に対する small interfering RNA (siRNA) をアデノウイルスベクターにて導入したヒト培養近位尿細管上皮細胞 (HK-2) において、RNAi が十分効果があるか HIF-1 $\alpha$ 遺伝子発現を PCR 法および Western Blot 法にて確認する。HIF-1 $\alpha$ 遺伝子発現抑制による HK-2 細胞の低酸素刺激に対する反応の影響を検討するため、同様に siRNA を導入した HK-2 細胞を低酸素 (1% O<sub>2</sub>)、または正常酸素圧 (21% O<sub>2</sub>) のもとで培養し、培養細胞の細胞増殖能 (H<sub>3</sub>-thymidine の取り込み率)、形態学的変化 (F-actin 染色)、細胞壊死 (LDH 活性)、細胞死 (Annexin V 染色)、および VEGF、エリスロポエチン、adrenomedullin の蛋白および遺伝子発現を ELISA 法と PCR 法にて測定する。さらに HIF-1 $\alpha$ 遺伝子発現抑制による血管新生能への影響を検討するため、細胞培養上清を in Vitro Angiogenesis Assay Kit (Chemicon 社) にて解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 糖尿病性腎症の進展における血管増殖性因子の役割について

当科にて腎生検を施行し 2 型糖尿病性腎症と診断した 93 例のうち臨床病理所見が十分得られた 26 例を対象に腎生検時の血清 G-CSF、GM-CSF、VEGF、およびエリスロポエチン (Epo) 濃度を ELISA と RIA にて測定し、さらに腎間質内 CD31<sup>+</sup>傍尿細管毛細血管 (PTC) (mm<sup>2</sup>) を免疫組織にて同定し臨床病理学的所見とを比較した。すべての血清サイトカン濃度は腎機能や尿蛋白とは有意な相関を示さなかった。臨床症状では網膜症合併例では非合併例に比し血清 G-CSF 濃度は有意に高値を示し、Epo は低値を示した。腎組織では球状硬化率と血清 G-CSF 濃

度のみが有意な正相関を示した。さらに、1 年後の血清 Cr 値の増加率が 50% 未満であった安定群 20 例では、増加率 50% 以上の悪化群 6 例に比し血清 G-CSF 濃度のみが有意に高値であった。糖尿病性腎症例では微小変化症例に比し間質内 CD31<sup>+</sup>PTC 数は有意に高値を示し間質内における血管新生が促進していたが、血清 G-CSF 濃度と間質内 CD31<sup>+</sup>PTC 数とは有意な相関を認めなかった。一方、G-CSF 受容体 (G-CSFR) が尿細管上皮細胞および腎細動脈内に発現を認めた (図 1 と 2) が、腎機能安定群と悪化群の間では、G-CSFR 発現の程度には有意な差は認めなかった。

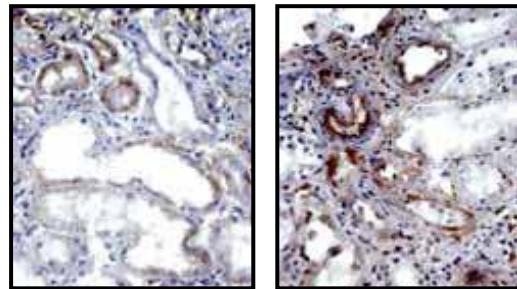


図 1. 尿細管上皮細胞 図 2. 細動脈内における G-CSFR の発現

次に、Tunnel 法を用いて、腎組織内における細胞死を同定し、Tunnel 陽性細胞数と G-CSFR の発現を比較した。その結果、尿細管上皮細胞における Tunnel 陽性細胞数と G-CSFR の発現には有意な相関を認めなかった一方、興味深いことに、腎細動脈においては、Tunnel 陽性 (細胞死) の程度と G-CSFR の発現は有意な負の相関 ( $r=-0.42$ ,  $p<0.05$ ) を示した。

以上の結果より、糖尿病性腎症において、血清 G-CSF 濃度は、腎予後を予測する上で有用な生物学的指標となることが示された。さらに、G-CSF は、腎内の微小血管新生への影響を介さず、腎細動脈に発現する受容体を介し、抗細胞死効果を示し腎障害の進展を抑制する可能性が示唆された。

なお、本研究は患者ご本人の承諾の上、実施したことである。

(2) 糖尿病性腎症における血管新生と血管内皮細胞の形質転換との関連について

糖尿病性微小血管症の発症・進展には血管内皮細胞の形質転換が関与している。そこで、形質転換の指標として血管内皮細胞 Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) の発現 (図 3) と糖尿病性腎症の糸球体病期との関連について検討した。

当科にて腎生検を施行し 2 型糖尿病性腎症と診断した 93 例のうち臨床病理所見が十分得られた 22 例を対象に、抗 PV-1 抗体

による免疫染色を行い、腎内における PV-1 の発現は画像ソフトを用いて解析した。また、PAS 染色にて糸球体糖尿病性変化の病期 (Grade I~Grade III) を判定し PV-1 発現との関連を解析した。解析しえた糸球体総数は 58 個で、Grade I が 19 個、Grade II が 23 個、Grade III が 16 個であった。PV-1 は血管極部の血管新生、メサンギウム領域内の毛細血管腔、糸球体係蹄に沿って陽性であった。一方、PV-1 陽性の血管極部血管新生は、Grade I を最大として、病期の進展とともに有意に減少した ( $p<0.01$ )。また、PV-1 陽性の糸球体係蹄は Grade I と II の間で有意な差を認めなかった (Yamamoto I.ら, 論文作成中)。

以上より、糖尿病性腎症では、血管極部血管新生、メサンギウム内の毛細血管腔、糸球体係蹄における PV-1 発現が病初期から認められ、これらの血管内皮細胞では、カベオラ形成という内皮細胞の形質変化が生じている可能性が示唆された。現在、さらに、腎内 PV-1 の発現制御に関わる分子機構を解明している。なお、本研究は患者ご本人が承諾の上、実施したことである。

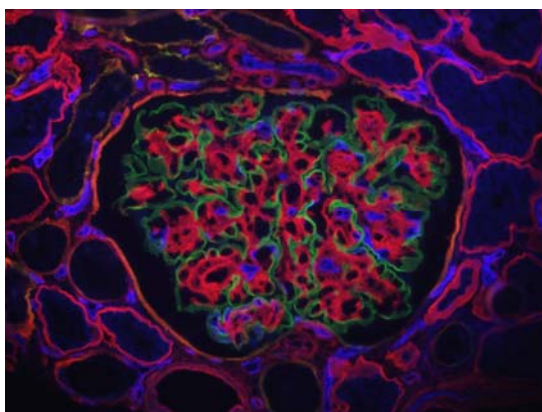


図 3. 腎内における PV-1 発現

赤 : IV 型コラーゲン $\alpha 2$  鎖

緑 : IV 型コラーゲン $\alpha 5$  鎖

青 : PV-1 分子

PV-1 分子は、腎間質内の傍尿細管毛細血管には、正常でも発現を認めるが、糸球体では、障害を起し形質変換を呈した内皮細胞のみ発現している。

### (3) 慢性腎臓病の腎予後における腎血管病変の意義について

慢性腎臓病 (CKD) の腎予後には、糸球体病変および尿細管間質病変が重要と考えられているが、血管病変の関与は十分に明らかにされていない。そこで、今回、CKD の代表である IgA 腎症を対象に、その腎予後と腎血管病変との関連を検討した。当科にて IgA 腎症と診断され、経過中に透析導入あるいは生検後 5 年以上経過を観察しえた 124 例を対象

に、腎病理所見と腎予後 (透析導入) との関連を後ろ向きにロジスティック解析を用いて検討した。

単変量解析では半月体形成、球状硬化、間質線維化、尿細管間質炎、小葉間動脈の線維性肥厚、輸入細動脈硝子化が、いずれも腎予後と有意な相関を認めた。半月体形成、球状硬化で調整した多変量解析では、輸入細動脈病変が、さらに半月体形成および間質線維化で調整した場合には、小葉間動脈病変と輸入細動脈病変が、いずれも腎予後と関連を示した。小葉間動脈病変と輸入細動脈病変に関連する臨床的因子としては、年齢、高血圧、腎機能低下であった。さらに、多変量解析の結果では、小葉間動脈病変には年齢が、輸入細動脈病変には年齢と高血圧が独立した関連因子であった。

以上より、IgA 腎症をはじめ、CKD において腎血管病変は腎予後に関与し、小葉間動脈病変の発症には年齢が、輸入細動脈病変には年齢と高血圧が重要であると考えられた。なお、本研究は本学の倫理審査を受け、患者ご本人が承諾のうえ、実施したことである。

### (4) 進行性腎障害実験モデルおよび培養尿細管上皮細胞における検討

現在、実験モデルとして蛋白負荷モデルおよび片側尿管結紮モデルを作成し、さらに、培養近位尿細管上皮細胞 (HK-2) を用いて、低酸素分子および血管新生の分子機構について解明を継続している。得られた結果は、今後、関連学会および専門誌にて発表を予定している。

### 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 10 件)

① Koike K, Utsunomiya Y, Ito Y, et al. A case of glomerulopathy showing podocytic infolding in association with Sjoren's syndrome and primary biliary cirrhosis. Clin Exp Nephrol;12:489-93, 2008. (査読有)

② Ueda H, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, et al(4, 4 番目). Bmp in podocytes is essential for normal glomerular capillary formation. J Am Soc Nephrol;19:685-94, 2008. (査読有)

③ Kobayashi A, Utsunomiya Y, Kono M, et al. Malakoplakia of the kidney. Am J Kidney Dis;51:326-30, 2008. (査読有)

④ Sugano N, Wakino S, Utsunomiya Y, et al (13, 12 番目). T-type calcium channel

blockade as a therapeutic strategy against renal injury in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int*;73:826-34, 2008. (査読 有)

⑤ Fujimoto K, Sasaki T, Utsunomiya Y, et al(8, 5 番目). In vitro and pathological investigations of MODY5 with the R276X-HNF1beta(TCF2) mutation. *Endocr J*;54:757-64, 2007. (査読 有)

⑥ Komeda M, Yamaguchi Y, Utsunomiya Y, et al (4, 5 番目). Histological investigation of renal pathological changes in MPO-ANCA-related nephritis using repeated renal biopsies. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*;49:438-45, 2007. (査読 有)

⑦ Ishii T, Kawamura T, Utsunomiya Y, et al (3, 5 番目). Prospective trial of combined therapy with heparin/warfarin and rennin-angiotensin system inhibitors in progressive of IgA nephropathy. *Contrib Nephrol*;157:114-9, 2007. (査読 無)

⑧ Yokoo T, Fukui A, Utsunomiya Y, et al (6, 5 番目). Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol*;17:1026-34, 2006. (査読 有)

⑨ Koike K, Utsunomiya Y. Gene therapy for kidney disease: Inflamed site-specific transgenesis using a stem cell. *Nippon Rinsho*;64:667-71, 2006. (査読 無)

⑩ Miyazaki Y, Ueda H, Utsunomiya Y, et al (5, 4 番目). Inhibition of endogenous BMP in the glomerulus leads to mesangial matrix expansion. *Biochem Biophys Res Commun*;340:681-8, 2006. (査読 有)

[学会発表] (計 4 件)

①宇都宮保典. オーバービュー:糖尿病によるネフローゼ症候群の成因と治療. 第38回日本腎臓学会東部学術大会. 2008年10月. 東京.

②宇都宮保典ら. シンポジウム:メタボリックシンドロームによる腎障害の機序と対策. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年6月. 福岡.

③Utsunomiya Y, Tokudome S, Ito H, et al. Clinical impact of endogenous granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the progression of diabetic nephropathy. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology. Nov. 2007. San Francisco.

④宇都宮保典ら. ワークショップ: IgA腎症の基礎的・臨床的問題点の整理;腎組織所見と予後との関連—予後分類の改訂に向けて. 第37回日本腎臓学会東部学術大会. 2007年10月. 大宮.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇都宮 保典 (UTSUNOMIYA YASUNORI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70231181

### (2) 研究分担者: なし

### (3) 連携研究者: なし