

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390229

研究課題名（和文） 再生医療技術を応用した腎尿細管の再生・修復による急性腎不全の新規治療法の開発

研究課題名（英文） Therapeutic approach for kidney diseases by regenerative medicine

研究代表者

寺田 典生（TERADA YOSHIO）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：30251531

研究成果の概要（和文）：現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で30万人を越え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化も加わり、さらに透析療法導入患者の増加が予想される。急性腎不全は、発症頻度は年々高まっており、全入院患者の5-10%、IUC入院患者の20%で発症するといわれている。申請者らは腎尿細管の分化に重要な意義を持つDelta-1, Notch-Hes system について検討を加え、このシステムが腎胎生期に発現することと、急性腎不全の回復期に近位尿細管で再発現することを学会誌あるいはアメリカ腎臓学会などで発表した。

研究成果の概要（英文）：The patients of chronic renal failure increase up-to 300,000 in Japan. However the therapeutic methods are still limited. We tried novel regenerative methodology to develop new therapies to kidney diseases. Our result shows that Delta/Notch/Hes pathway is activated after ischemic acute kidney injury and plays a role in the proliferation of renal tubules. To regulate embryonic genes could provide a renewable source of cells for use in regenerative therapy for renal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：腎臓・再生医学・急性腎不全・尿細管

1. 研究開始当初の背景

現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で25万人を越え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化も加わり、さらに透析療法導入患者の増加が予想される。透析医療費だけで、一兆円を越え社会的な医療費の面からも、これらの疾患に対する抜本的対策が急務である。腎疾患に対する新規の再生医療を考える上で、腎組織の再生が理論上最適ではあるが、その臓器全体の再生は極めて困難と考えられている。進行性

腎障害の特徴である荒廃してゆく腎組織を回復させるためには、腎細胞の再生をはかることにより、腎組織と腎機能の回復を期待することができる。特に急性腎不全は、患者の高齢化などの要因も加わり、発症頻度は年々高まっており、全入院患者の5-10%、IUC入院患者の20%で発症するといわれている。

本研究では、腎ネフロンの中で、その機能の重要性が注目されてきている尿細管細胞の再生を検討することにより、腎機能の回復を目標とする。

2. 研究の目的

本研究では、腎ネフロンの中で、その機能の重要性が注目されてきている尿細管細胞の再生を検討することにより、腎機能の回復を目標とする。尿細管細胞の再生に関しては、申請者らを含めて3つの方向性の研究がなされている。一つは内因性の腎幹細胞の同定、第二には、腎再生因子(遺伝子)の研究、そして第三にはES細胞を用いた腎尿細管細胞への分化誘導である。これらの研究は密接に連係しており、申請者らのグループは多くの研究成果をあげているが、いまだ臨床の場へのフィードバックには至っていない。今回の研究でこれらの研究を更に総合的に突きすすめ、臨床へのフィードバックも視野に入れながら、尿細管の再生と腎機能の回復を目的としたい。

3. 研究の方法

内因性の腎尿細管細胞の同定のため、腎尿細管幹細胞のマーカーを胎生期の遺伝子を中心に検索を行ない、急性腎不全の回復期あるいは、胎生期での発現を検討する。それと平行して、Wnt4の遺伝子座に蛍光タンパク質GFPを導入したマウスを作製してゆく。具体的には、マウスWnt4遺伝子の上流域16kbを単離し、GFP遺伝子に結合させ、マウスES細胞に遺伝子導入をし、トランスジェニックマウスを作成し、胎生後期あるいは、出生後に急性虚血等の回復期に、Wnt4の発現する細胞を検出し、単離することができる。現在幹細胞のマーカーといわれているslow cycling cellの特徴に加え、新規のマーカーを導入した遺伝子改変マウスの導入により、内因性の腎尿細管細胞の同定を目指す。

再生医学での柱の一つである増殖因子を用いた腎再生の試みは、in vitro, in vivoの両面において動物実験レベルでは多くの研究があるが、臨床的に優位な確立できたものはない。尿細管細胞が、再生し増殖、修復できる微小環境(Microenvironment)あるいは再生の場(Niche)の解明が重要であると考える。そこで平成19年度に再生に適切な微小環境あるいはNicheの解明をおこなう。平成20年以降には、尿細管細胞の再生に重要な新規の遺伝子を、アデノウイルスなどを用いた局所への遺伝子導入により、再生に最適なNicheを作り出す事により、新規の治療法につながる検討をする。

4. 研究成果

申請者らは、急性腎不全の回復期に腎胎生期に発現する遺伝子、Wnt4およびEts1が尿細管細胞に再発現し、胎生期の幹細胞的な性格をもつ、増殖能が高い細胞が近位尿細管に発現することを世界に先駆けて見だし、尿細管の『dedifferentiation』という概念を提

唱した(文献1, 5)。

申請者は腎胎生期のKey Moleculeの候補として、Wnt4, Ets1を遺伝子導入した場合、尿細管細胞が高い増殖能を呈することを報告したが(文献1, 5)、腎臓の発生、再生のKey Moleculeの絞り込みができれば、その遺伝子を腎尿細管に遺伝子導入して再生に最適な場(Niche)を作り出し、in vivoでの尿細管の再生に発展できる可能性がある。申請者らは腎尿細管の分化に重要な意義を持つDelta-1, Notch-Hes systemについて検討を加えた。このシステムは神経系と血液系で発生、分化に重要な役割を持つことが知られているが、申請者らは、これらのDelta-1, Notch-Hesが、腎胎生期に発現することと、急性腎不全の回復期に近位尿細管で再発現することを報告した(文献4)尿細管細胞が、再生し増殖、修復できる微小環境(Microenvironment)あるいは再生の場(Niche)を作り出す事により、新規の治療法につながる可能性があり、非常に独創的な研究結果である。

さらに急性腎障害に関わるマクロオートファジーに関連した蛋白質のLC3等の動向を腎疾患モデル動物や培養細胞系を用い、Western blotや組織学的検索を通じて検討した(文献1, 4, 35)。LC3蛋白にGFPを融合したトランスジェニックマウスやLC3プロモーターにGFPを結合したプラスミドを安定導入した、腎尿細管細胞を樹立し、これらの実験系を用いてin vivo及びin vitroでの慢性腎障害モデルやネフローゼモデルマウスでのマクロオートファジー及びシャペロン介在性オートファジーの働きを検討した。

また申請者は、既にPI3Kgammaが欠損したPI3K-Akt pathwayが抑制されたノックアウトマウスとLC3蛋白にGFPを融合したトランスジェニックマウスを交配させる事より、Akt pathwayの抑制がある場合とない場合で、慢性腎障害モデルあるいは、急性腎障害モデルでのオートファジーの関与をGFP-LC3を用いて検出できるin vivoのシステムを作成し、下記の論文で発表した(文献1, 4, 35)。

現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で30万人を越え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化も加わり、さらに透析療法導入患者の増加が予想される。透析医療費だけで、一兆円を越え社会医学的な医療費の面からも、これらの疾患に対する抜本的対策が急務である。また急性腎不全は、患者の高齢化などの要因も加わり、発症頻度は年々高まっており、全入院患者の5-10%、IUC入院患者の20%で発症するといわれている。本研究の成果を学会誌あるいは日本腎臓学会などで発表し、腎疾患の新規の治療法の可能性、成果を社会に発信した。

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 52 件)

1. Terada Y, Inoshita S, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Ichijo H, Sasaki S. Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemic acute kidney injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有, 364: 1043-1049, 2007 (IF 2.855)
2. Kuwahara M, Inoshita S, Nakao Y, Terada Y, Takano Y, Sasaki S: Expression of bone type 1 PTH receptor in rats with chronic renal failure. *Clinical and Experimental Nephrology*. 査読有, 11:34-40, 2007
3. Fujii H, Mori Y, Kayamori K, Igari T, Ito E, Akashi T, Noguchi Y, Kitamura K, Okado T, Terada Y, Kanda E, Rai T, Uchida S, Sasaki S. A familial case of mitochondrial disease resembling Alport syndrome. *Clin. Exp. Nephrol.* 査読有, 12:159-63, 2008.
4. Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, Tanaka H, Okado T, Kuwahara M, Tohda S, Sakano S, Sasaki S. Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury. *Kidney Int.* 査読有, 73:1240-50, 2008. (IF:4.922)
5. Kuwana H, Terada Y, Kobayashi T, Okado T, Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Sasaki S. The phosphoinositide-3 kinase gamma-Akt pathway mediates renal tubular injury in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 査読有, 73:430-445, 2008. (IF:4.922)
6. Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Suzuki N, Yoshimoto T, Hirata Y, Sasaki S. Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium. *J. Am. Soc. Nephrol.* 査読有, 19:298-309, 2008 (IF:7.111)
7. Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Shinahara M, Taniguchi Y, Kambayashi M, Nishiyama A, Gomez-Sanchez CE, Terada Y, Hashimoto K. Glucocorticoid receptor plays an indispensable role in mineralocorticoid receptor-dependent transcription in GR-deficient BE(2)C and T84 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 302: 18-25, 2009
8. Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Asai M, Yoshida M, Kambayashi M, Terada Y, Hashimoto K. Insulin exhibits short-term anti-inflammatory but long-term proinflammatory effects in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 査読有, 298:25-32, 2009
9. Shinahara M, Nishiyama M, Iwasaki Y, Nakayama S, Noguchi T, Kambayashi M, Okada Y, Tuda M, Stenzel-Poore MP, Hashimoto K, Terada Y. Plasma adiponectin level is increased despite insulin resistance in corticotropin-releasing hormone transgenic mice, an animal model of Cushing syndrome. *Endocr J.* 査読有, 56: 879-886, 2009
10. Wang Z, Iwasaki Y, Zhao LF, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y. Hormonal regulation of glycolytic enzyme gene and pyruvate dehydrogenase dinase/phosphatase gene transcription. *Endocr J.* 査読有, 56: 1019-1030, 2009
11. Ariei K, Suehiro T, Ikeda Y, Kumon Y, Osaki F, Inoue M, Inada S, Ogami N, Takada H, Hashimoto K, Terada Y: Pitavastatin induces PON1 expression through P44/42 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in Huh7 cells. *Atherosclerosis*. 査読有, 202:439-445, 2009.
12. Makino S, Fujiwara M, Suzukawa K, Handa H, Fujie T, Ohtaka Y, Komatsu Y, Aoki Y, Maruyama H, Terada Y, Hashimoto K, Sugimoto T: Visceral obesity is associated with the metabolic syndrome and elevated plasma retinol binding protein-4 level in obstructive sleep apnea syndrome. *Horm metab res.* 査読有, 41:221-226, 2009
13. Takao T, Horino T, Kagawa T, Matsumoto R, Inoue K, Taguchi T, Morita T, Iwasaki Y, Hashimoto K, Terada Y: Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on albumin-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Nephrol*. 査読有, 29:102-108, 2009
14. Kuwahara M, Inoshita S, Terada Y, and

- Sasaki S : Effect of Sevelamer Hydrochloride on Bone in Experimental Uremic Rats. Therapeutic Apheresis and Dialysis. 査読有, 13(1):42-48. 2009
15. Horino T, Okazaki M, Nishikawa H, Takao T, Taniguchi Y, Morita T and Terada Y : A case with spontaneous bladder rupture mimicking acute kidney injury. Clinical Nephrology . 査読有, 72:391-393. 2009
 16. Taniguchi Y, Horino T, Terada Y. Cutaneous amyloidosis associated with amyopathic dermatomyositis. J Rheumatol. 査読有, 36:1088-1089, 2009
 17. Taguchi T, Sano S, Iwasaki Y, Terada Y : Symmetric giant xanthogranulomas in Erdheim-Chester disease. Eur Nucl Med Mol Imaging . 査読有, 36 : 1198. 2009
 18. Takao T, Horino T, Kagawa T, Matsumoto R, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Morita T, Terada Y. : Possible involvement of intracellular angiotensin II receptor in high-glucose-induced damage in renal proximal tubular cells. J Nephrol. 査読有, 15: 309-315 , 2010. (IF: 1.252)
 19. Noguchi T, Makino S, Matsumoto R, Nakayama S, Nishiyama M, Terada Y, Hashimoto K. : Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. Endocrinology. 査読有, 151: 4344-4355, 2010. (IF: 4.752)
 20. Ishibashi A, Ikeda Y, Ohguro T, Kumon Y, Yamanaka S, Takata H, Inoue M, Suehiro T, Terada Y. : Serum fetuin-A is an independent marker of insulin resistance in Japanese men. J Atheroscler Thromb. 査読有, 17: 925-933 , 2010. (IF: 3.048)
 21. Taniguchi Y, Iwasaki Y, Tsugita M, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y. : Glucocorticoid receptor- β and receptor- γ exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. Endocrinology. 査読有, 151: 3204-3213 , 2010. (IF: 4.752)
 22. Taguchi T, Mizobuchi M, Terada Y. : Coincidental double erythema caused by *Vibrio vulnificus*. J Infect. 査読有, 61: 95-96, 2010. (IF: 3.060)
 23. Taguchi T, Takao T, Iwasaki Y, Pooh K, Okazaki M, Hashimoto K, Terada Y. : Rapid recurrence of craniopharyngioma following recombinant human growth hormone replacement. J Neurooncol. 査読有, 100: 321-322, 2010. (IF: 2.752)
 24. Taguchi T, Mizobuchi M, Terada Y. : Hypoglycemic encephalopathy as a result of an attempted suicide. Clin Neurol Neurosurg. 査読有, 112: 455-456 , 2010. (IF: 1.303)
 25. Okazaki M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y. : PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. Endocr J. 査読有, 57:403-413 , 2010. (IF: 1.806)
 26. Zhao LF, Iwasaki Y, Zhe W, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y. : Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase isoenzyme gene transcription. Endocr J. 査読有, 57:317-324, 2010. (IF: 1.806)
 27. Taniguchi Y, Horino T, Terada Y, Jinnouchi Y. : The activity of carotidynia syndrome is correlated with the soluble intracellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) level. South Med J. 査読有, 103: 277-278, 2010. (IF: 0.924)
 28. Horino T, Takao T, Terada Y. : IgA nephropathy in a patient with systemic lupus erythematosus. Lupus. 査読有, 19: 650-654, 2010. (IF: 2.586)
 29. Taniguchi Y, Kumon Y, Arii K, Tsugita M, Fukumoto M, Ohnishi T, Kobayashi S, Terada Y. : Clinical implication of 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT in monitoring disease activity in spondyloarthritis. Rheumatology (Oxford) . 査読有, 49: 829, 2010. (IF: 4.236)
 30. Taniguchi Y, Horino T, Kato T, Terada Y. : Acute pulmonary arterial hypertension associated with anti-synthetase syndrome. Scand J Rheumatol. 査読有, 39: 179-180, 2010. (IF: 2.507)
 31. Arii K, Suehiro T, Ikeda Y, Kumon Y, Inoue M, Inada S, Takata H, Ishibashi A, Hashimoto K, Terada Y. : Role of protein kinase C in pitavastatin-

- induced human paraoxonase I expression in Huh7 cells. *Metabolism*. 査読有, 59 : 1287-1293, 2010. (IF: 2.588)
32. Horino T, Takao T, Terada Y. : A case of post-streptococcal reactive arthritis in which lesions were detected with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-CT imaging and magnetic resonance imaging. *Mod Rheumatol*. 査読有, 20: 287-290, 2010.
33. Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, Ogata K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T, Morita T, Sasaki S, Mizushima N, Terada Y. : Cisplatin-induced macroautophagy occurs prior to apoptosis in proximal tubules in vivo. *Clin Exp Nephrol*. 査読有, 14: 112-122, 2010.
34. Taniguchi Y, Ariei K, Kumon Y, Fukumoto M, Ohnishi T, Horino T, Kagawa T, Kobayashi S, Ogawa Y, Terada Y. : Positron emission tomography/computed tomography: a clinical tool for evaluation of enthesitis in patients with spondyloarthritides. *Rheumatology (Oxford)*. 査読有, 49: 348-354., 2010. (IF: 4.236)
35. Horino T, Nakayama S, Takao T, Terada Y. : HLA-B51-related seronegative spondyloarthropathy associated with membranous nephropathy. *Rheumatology (Oxford)*. 査読有, 49 : 394-396., 2010. (IF: 4.236)
36. Taguchi T, Takao T, Iwasaki Y, Oyama K, Yamada S, Inoue M, Terada Y. : Diagnostic value of 18F-dihydroxyphenylalanine positron emission tomography for growth hormone-producing pituitary adenoma. *Pituitary*. 査読有, 13: 78-79, 2010 (IF: 2.021)
37. Taniguchi Y, Kumon Y, Nakayama S, Ariei K, Ohnishi T, Ogawa Y, Kobayashi S, Terada Y. : F-18 FDG PET/CT provides the earliest findings of enthesitis in reactive arthritis. *Clin Nucl Med*. 査読有, 36: 121-123, 2011. (IF: 3.915)
38. 森田達仁, 寺田典生 : 酸塩基平衡 (産生量, 肺・腎での調節, 腎のトランスポーターなど). *総合臨牀*. 査読無, 58 : p780-784, 2009
39. 堀野太郎, 寺田典生. ネフローゼ症候群: 診断と治療の進歩. II. 一次性ネフローゼ症候群の病態・診断・治療. 5. メサンギウム増殖性糸球体腎炎, 管内増殖性糸球体腎炎, 半月体形成性糸球体腎炎. *日本内科学会雑誌*. 査読無, 98:1036-1041, 2009.
40. 堀野太郎, 寺田典生. 急性腎障害とは (特集 腎疾患 - 最近の進展). 査読無, セフイーロ 9:23-26, 2009.
41. 次田誠, 寺田典生 : 食塩の吸収・調節と排泄, その異常. 成人病と生活習慣病. 査読無, 第39巻 第3号別刷, 233-237, 2009.

[学会発表] (計 25 件)

- ① Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, Ogata K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T, Morita T, Ikeda Y, Sasaki S, and Terada Y. : Cisplatin-Induced Macroautophagy Occurs Prior to Apoptosis in Proximal Tubules *In Vivo*. The American society of Nephrology, Renal week, October 27 -31, 2009. San Diego

[図書] (計 15 件)

- ① 堀野太郎, 寺田典生. 電解質異常. 高・低 Na 血症, 高・低 Cl 血症. 専門医のための腎臓病学 第 2 版 pp115-121, 内山 聖, 富野康日己, 今井裕一編. 医学書院 2009.
- ② 堀野太郎, 寺田典生. 電解質異常. 高ナトリウム血症. 輸液療法パーフェクト. pp105-109, 飯野靖彦編. 羊土社 2009
- ③ 香川 亨, 寺田典生. Bartter 症候群. 内分泌代謝専門医ガイドブック. pp236-238, 成瀬光栄, 平田結喜緒, 島津章編. 診断と治療社 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 典生 (TERADA YOSHIO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号 : 30251531

(2) 研究協力者

井下 聖司 (INOSHITA SEIJI)
東京医科歯科大学 医学部附属病院・助手
研究者番号 : 00345307