様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19591858
研究課題名（和文）　尿細管上皮の増殖、構造・機能分化に与える脂肪組織の影響の解析および再生機構の解明
研究課題名（英文）　The interaction between adipose tissue and tubular epithelium on their proliferation, polarization and differentiation

研究代表者
魚住　二郎（UOZUMI JIRO）
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：30223514

研究成果の概要（和文）：

間質細胞である脂肪細胞が、増殖因子（アディポサイトカインと総称）を産生し、生体内で様々な影響を及ぼすことを示唆する報告が増加している。我々は、尿細管上皮細胞（MDCK）と腎周囲に豊富に存在する脂肪組織の混合培養し、MDCK細胞の分化を誘導することを、組織学的、生化学的に、あるいは微細構造の変化にて確認した。一方、MDCKとの混合培養で、脂肪細胞も未分化な間葉細胞が減少し、アディポネクチン（アディポサイトカインの一つ）が増加した。このことから、腎周囲の脂肪組織は尿細管上皮の増殖・分化に影響を与えるだけでなく、尿細管上皮の発育における、周囲の脂肪組織の分化・間葉系幹細胞の制御への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Adipokine-producing fatty tissues, composed of preadipocytes, adipocytes, and mesenchymal stem cells, surround the kidney. To study the interaction between renal tubular cells and adipose tissue, we cocultured adipose tissue fragments and MDCK cells. MDCK cells in the coculture showed fine differentiation than that seen in MDCK cell monoculture. The adipose tissue-induced change in morphology was replicated when we added leptin to MDCK cells cultured alone. Our study shows that adipose tissue fragments promote the hypertrophy, polarization, and differentiation of MDCK cells by attenuating their growth and apoptosis through opposing endocrine or paracrine effects of leptin and adiponectin. Further, MDCK cells inhibit the regeneration of preadipocytes and mesenchymal stem cells in adipose tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
19 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21 年度	700,000	210,000	910,000
総　計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：　医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学
キーワード：尿細管上皮、再生医学、脂肪細胞、間葉系幹細胞、細胞増殖・分化

１．研究開始当初の背景

腎臓に関する再生医療は、精力的に研究がおこなわれているが、現時点では明確な治療戦略は確立されていない。その理由として、尿細管上皮細胞の増殖能が低く、また、再生後の機能分化が悪いことが挙げられる。特に広範囲に急性尿細管壊死が生じた場合には、腎不全に至る可能性が高く、積極的な治療法も存在しない。

解剖学的に腎臓はその周囲を豊富な脂肪組織で覆われている臓器である。また腎盂周囲にも脂肪組織が存在する。脂肪組織は従来エネルギー貯蔵組織として認識されてきたが、近年では、内分泌器官として認知された。それ故に、他臓器や他の細胞機能、および再生に関して、脂肪組織に由来する生理活性物質のパラクライン効果やエンドクライン効果が重要と考えられる。

我々はこの点に着目し、単離成熟脂肪細胞と腎尿細管上皮細胞とのコラーゲン･ゲル三次元混合培養系にて、腎尿細管上皮細胞の尿細管再生が促進されることを報告した（Shimazu K et al. Morphogenesis of MDCK cells in a collagen gel matrix culture under stromal adipocytes-epithelial cell interaction. Kidney Int. 60:568-578, 2001.）。この結果は、脂肪細胞が尿細管上皮細胞の構造分化を促進することを示す。我々が構築した上記モデルは、尿細管上皮再生の形態学的な解析が容易であり、かつ、尿細管上皮細胞の機能的評価、再生機構の解析への応用が可能である。

一方、脂肪組織は、成熟脂肪細胞、前脂肪細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞（Zuk PA et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7:211-28, 2001.）などから構成されており、細胞生物学的な活性はそれぞれの細胞種で異なると考えられる。そこで、我々は、成熟脂肪細胞のみならず、複合細胞集団である脂肪組織片を用いて、尿細管の増殖、分化ならびに再生に関する脂肪組織の関与を、分子細胞生物学的に解明することを着想した。すなわち、脂肪組織－尿細管上皮の相互作用による尿細管上皮細胞の増殖、構造分化、機能分化を解明する。この研究により、尿細管再生治療における新規治療法の確立が期待できる。

２．研究の目的

本研究では、成熟脂肪細胞、前脂肪細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞などを含む脂肪組織片と腎尿細管上皮細胞の混合培養を行い、脂肪組織誘導性の尿細管上皮細胞の増殖、構造分化および機能分化を解明する。さらに、脂肪組織由来のどのような因子がこれらの機能に関与するかを明らかにする。

尿細管上皮細胞株（MDCK）とラットの脂肪組織片との混合培養において、尿細管上皮細胞に形態分化が現れることを確認する。

機能評価として、水分子輸送チャネルタンパクやイオン交換タンパクの発現を比較検討する。さらに、尿細管上皮の増殖・構造分化・機能分化に関与する因子を明らかにする。

３．研究の方法

1）材料

ⅰ）尿細管上皮細胞として犬由来の腎尿細管上皮細胞株（MDCK）をもちいた。

ⅱ）脂肪組織として、生後１週のWistar ratから採取した皮下脂肪組織をもちいた。

2）培養システム

①尿細管上皮の二次元培養

6穴の培養皿（直径35 mm）に、採取した上記脂肪組織片を細切し、コラーゲン・ゲル（typeⅠ collagen）1.5 mlに混入して脂肪層を作る（三次元コラーゲン･ゲル培養法）。その上に腎尿細管上皮細胞株を播種した。コントロールとして、脂肪組織片を混和しないコラーゲン・ゲル層を作りその上に尿細管上皮細胞株を播種した。培養液を5 mlずつ加えて培養した。（図1）

②尿細管上皮の三次元培養

6穴の培養皿に、採取した上記脂肪組織片を細切し、尿細管上皮細胞株とともにコラーゲン・ゲル 1.5 mlに混入した。コントロールとして、腎尿細管上皮細胞のみを混和したコラーゲン・ゲル層をつくり、培養液を5 mlずつ加えて培養した。

③尿細管上皮細胞のmRNAおよびタンパク発現の解析や脂肪細胞由来の液性因子の解明のために、培養後に尿細管上皮細胞と脂肪組織層を分離する必要があるため、セルイン

サートを使用した培養系を用いた。培養終了後に、セルインサートの上下を分離し、ウエスタンブロットやRT-PCRでの解析に用いる。

3）腎尿細管上皮細胞の増殖と分化の評価

１～２週間培養した後、標本を作製し以下の項目を比較検討した。

①ＨＥ標本による形態学的評価

②増殖能：ブロモデオキシウリジン(BrdU)の24時間標識にて評価した。

③アポトーシス：シングルストランドDNA(ssDNA)の免疫染色にて評価した。

④微細構造：透過型電子顕微鏡を用いて、尿細管上皮細胞の微細構造の検討を行う。細胞間接着、微絨毛、細胞内小器官の発達の有無を比較した。

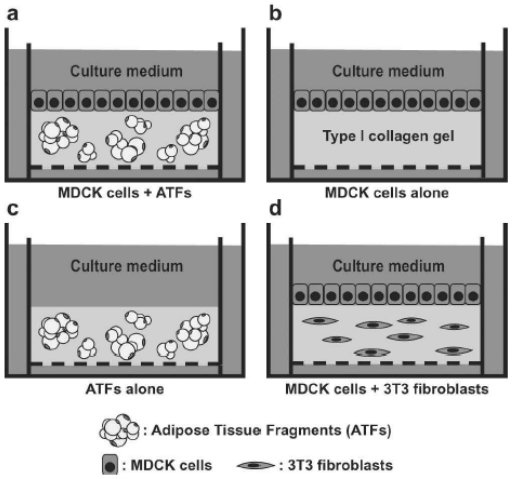
以上より、脂肪組織誘導性の腎尿細管上皮細胞の増殖・構造分化について比較、検討した。

４．研究成果

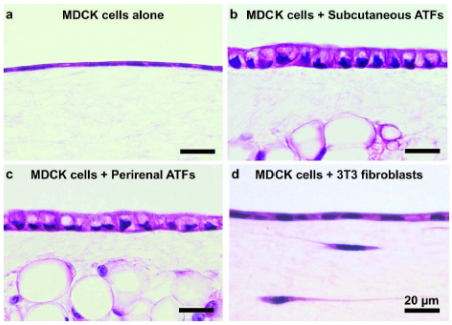
MDCKの変化：脂肪組織片との混合培養で、HEの観察では、MCDK細胞は高円柱状となり、核は基底層に並んで極性を示した。（図2）ウリジンの取り込み、すなわちMDCKの増殖が抑制された。ssDNAの形成が抑制され、アポトーシスも抑制されることを確認した。（図3）電子顕微鏡による微細構造の観察では、混合培養により、微絨毛や基底膜の形成を確認できた。（図4）chloride/iodine transporter(細胞膜局在イオン輸送分子)であるペンドリン、タイトジャンクション構成分子ZO-1、atypical Protein Kinase C, Cdc42の発現は亢進したが、PAR3やPTENの発現には影響はなかった。（図5、6）

MDCKが脂肪組織に与える影響の解析：混合培養により脂肪組織preadipocyteとCD44+/CD105+の間葉系幹細胞は減少し、アディポネクチンの産生は増加した。（図7、8）

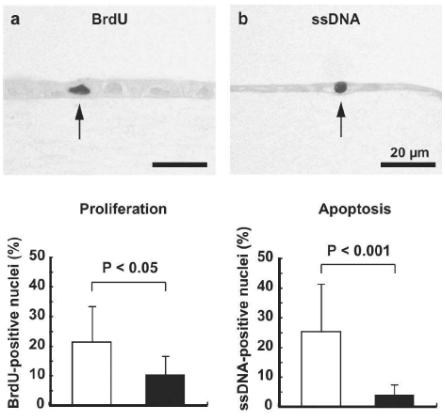
以上の結果から、腎周囲の脂肪組織は尿細管上皮の増殖・分化に影響を与えるだけでなく、尿細管上皮の発育が、周囲の脂肪組織の分化・間葉系幹細胞の制御に関与していることが示唆された。



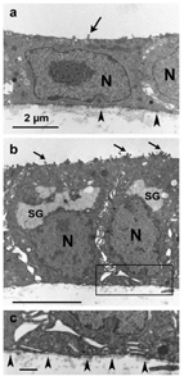
(図1)



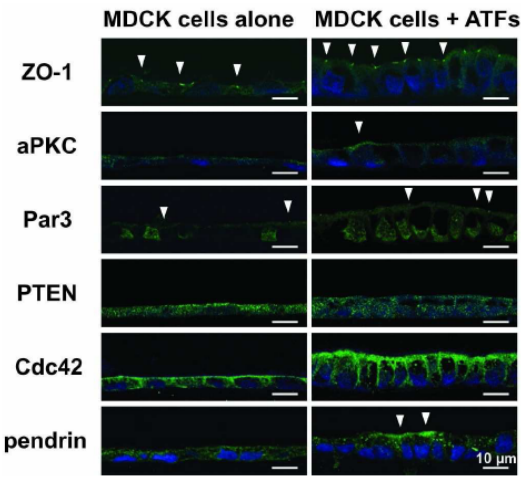
(図2)



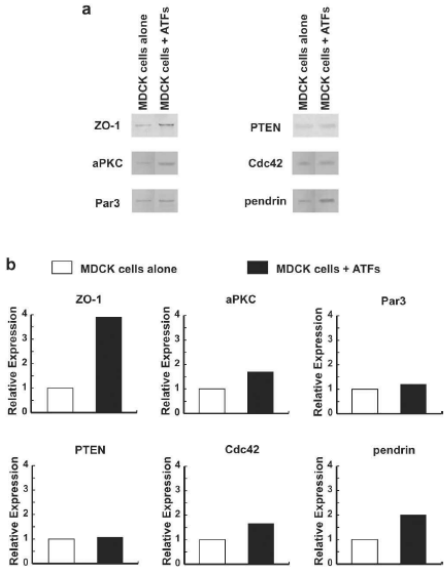
(図3)



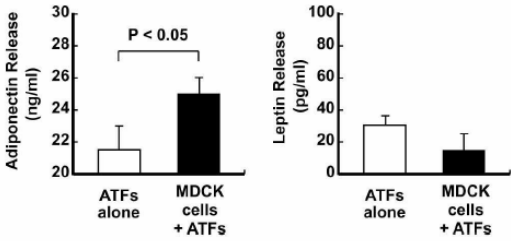
(図4)



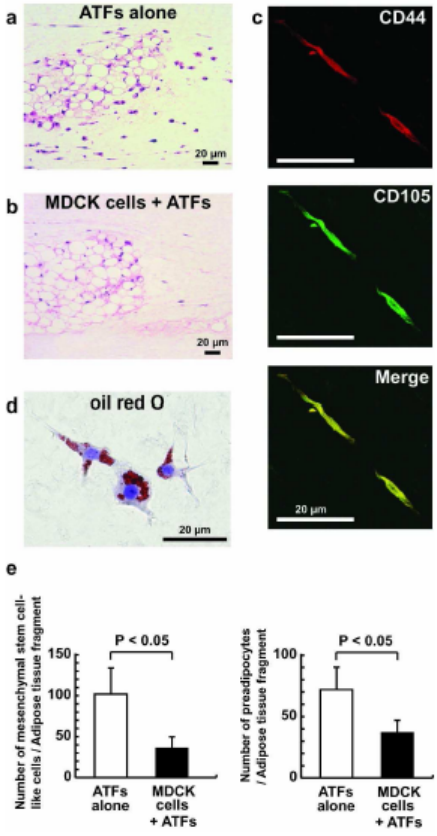
（図5）



（図6）



（図7）



（図 8）

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）

Kazuma Udo, Shigehisa Aoki, Kazuyoshi Uchihashi, Maki Kawasaki, Aki Matsunobu, Yuji Tokuda, Akifumi Ootani, Shuji Toda and Jiro Uozumi. Adipose tissue explants and MDCK cells reciprocally regulate their morphogenesis in coculture. Kidney Int. 2010 (in press). 査読有り

〔学会発表〕（計　2 件）

①有働和馬　脂肪組織は尿細管上皮の構造・機能分化を促進する　第 51 回日本腎臓学会学術総会　2008/05/30　福岡

②有働和馬　尿細管上皮の増殖、分化に与える脂肪組織の影響　第 96 回日本泌尿器科学会総会 2008/04/25　横浜

６．研究組織

(1) 研究代表者
魚住　二郎（UOZUMI JIRO ）
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：30223514

(2)研究分担者
戸田　修二（TODA SHUJI）
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80188755

徳田　雄治（TOKUDA YUJI）
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：90315200

(3)研究協力者
有働　和馬（UDO KAZUMA）
佐賀大学・医学系研究科・大学院生