

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17707

研究課題名(和文) 近位尿細管再生を担う細胞群の探索

研究課題名(英文) Exploration of the cell population that repairs damaged proximal tubules

研究代表者

北井 悠一郎 (Kitai, Yuichiro)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：90839771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管は障害後、近位尿細管細胞自体の増殖により修復されるが、障害度により修復機構が異なるかは不明である。重度および中等度の虚血障害を惹起後、近位尿細管表層では重度障害でのみ強い増殖を認めた。最近Runx1+24mCNE (eR1) が造血幹細胞および胃幹細胞のマーカーとして同定された。eR1活性の可視化マウスを用いて、近位尿細管のeR1活性を観察することとした。非障害時や中等度の虚血後にはeR1活性が高い近位尿細管上皮細胞はほとんど認めなかったが、重度障害後には強いeR1活性を有する近位尿細管上皮細胞を連なりをもって認めた。網羅的遺伝子解析ではeR1活性の上昇した細胞は強い増殖能を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近位尿細管は腎臓全体の約6割を占め、急性腎障害の際に強く障害される。近位尿細管障害後、近位尿細管は近位尿細管細胞の増殖によって修復されることが知られているが、修復の主体となる細胞群は明らかにされていない。障害時に優先的に修復に関わる細胞群が同定できれば、腎臓の再生修復の分野の発展に寄与できる可能性がある。当研究で得られた、重度障害でのみ強く増殖する一群がいるという結果は、新しい視点から尿細管修復機構を追究できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Injured proximal tubules (PT) are restored by the proliferation of PT cells, but the influence of injury severity is uncertain. First, we showed highly proliferative capacity of superficial PT cells, after severe ischemia than in moderate ischemia. Recently, A Runx1 enhancer, Runx1+24mCNE (eR1) was identified as a marker of adult hematopoietic and gastric stem cells. We traced eR1-activated PT cells, using mice that can visualize eR1 activity. In uninjured kidneys and moderately injured kidneys, eR1-activated PT cells were almost absent. However, many PT cells with clonal expansion showed high eR1 activity only after severely injured kidneys. RNA-seq data showed a highly proliferative capacity of eR1-activated PT cells. In severe injury, clonal expansion of eR1-activated proximal tubular cells contributes to the regeneration of superficial proximal tubules.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎修復 近位尿細管 障害度 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

急性腎障害は、日単位で急激に腎機能低下をきたす病態であり、高齢化や慢性腎臓病の増加などを背景に近年その発症頻度は上昇しており、対策が急務となっている。急性腎障害を発症するとその後慢性腎臓病や末期腎不全への進展の危険性が増加することが疫学研究で示されているが、急性腎障害の病態生理には不明な点が多く、有効な治療介入がなされていない。腎臓には内因性の自己修復能力が備わっていることが知られている。急性腎障害で最も障害されやすい部位は近位尿細管であるが、動物モデルでの検討により近位尿細管は障害後、近位尿細管上皮細胞自身が増殖することで修復を行うことが示されてきた。しかしながらこの修復が特殊な細胞群の増殖によって行われるのか、あるいはあらゆる近位尿細管上皮細胞のランダムな増殖によって行われるのかは明らかにされていない。過去には近位尿細管上皮の修復は、BrdU-retaining cell が存在する腎乳頭部の線維芽細胞や尿細管上皮細胞の増殖によって行われるのではないかという説や、近位尿細管上皮細胞自身の増殖によって行われるのではないかという説が主として唱えられてきた。最近、近位尿細管を標識する *Ndr51^{CreERT2}* マウスを作成し、レポーターマウスと交配させ系譜追跡実験を行い、種々の障害モデルにおいて、近位尿細管は近位尿細管上皮細胞自身の増殖により修復を行っていることを報告した (Endo T, et al. J Pathol 2015)。ただ、本研究では、成熟近位尿細管上皮細胞がランダムに増殖し障害近位尿細管を修復するのか、近位尿細管上皮内に優先的に修復に関与する特殊な細胞群が存在するかに関する追究ができておらず、依然、国際的議論が続いている (Kramann R, et al. Nephrol Dial Transplant 2015)。

近年、複数の臓器では、障害時の修復に関与する特殊な細胞群に関する研究結果が報告されてきているが、興味深い点は、障害度に応じて修復に関与する細胞群が異なることである。例えば肝臓では、軽度の障害では分化した肝細胞が増殖して修復を行うのに対し、重度の障害では *Lgr5* 陽性の肝胆移行領域に存在する細胞が、増殖することが報告された (図1)。また、肺では軽度障害では成熟肺胞上皮細胞が増殖し、障害肺胞上皮を修復する一方、重度障害では、*Krt5* 陽性の気管上皮の基底側に存在する細胞群が増殖し、障害肺胞上皮を修復することも最近報告された。このように障害度に応じて修復に関与するメカニズムが異なり、重度障害において特殊な細胞群が増殖する事象は腎臓でも起こっている可能性がある。

これらを踏まえ申請者は、腎臓でも重度障害の際に特殊な細胞群が主として増殖し、近位尿細管修復に関与しているのではないかと仮説を立て、検証を行うこととした。障害時に優先的に増加する細胞群の同定、およびその増殖のメカニズムの解明が出来れば、急性腎障害の治療介入に応用できる可能性が期待できる。

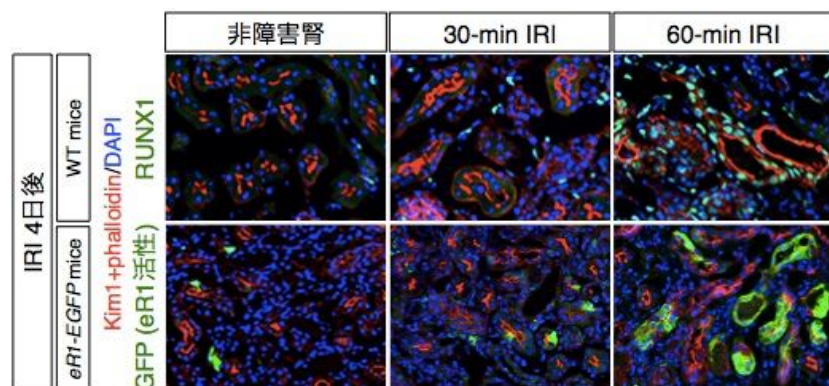
【図1】肝臓では重度障害時 *Lgr5* 陽性の特殊な一群が増加する



2. 研究の目的

まず、重度障害のみで増殖する特殊な細胞群が近位尿細管内に存在するのではないかと仮説を立て、軽度障害として 30 分間の虚血再灌流障害 (30-min IRI) を惹起し、重度障害として 60 分間の虚血再灌流障害 (60-min IRI) を惹起した。まず、Ki67 染色、BrdU 取り込みで評価すると、軽度障害と比較して重度障害では、皮質表層の近位尿細管上皮細胞の強い増殖を認めた。

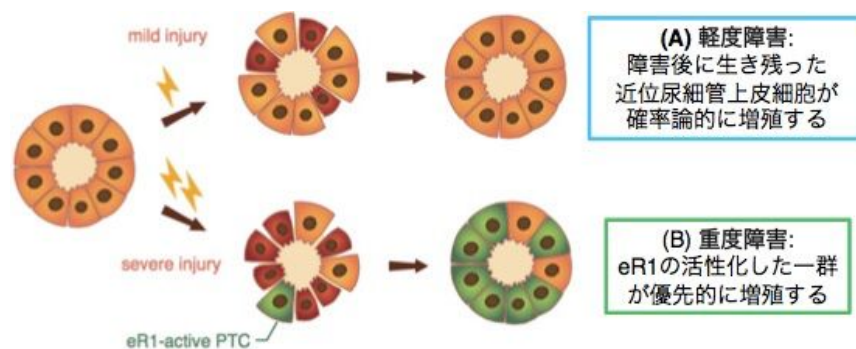
次に、軽度および重度障害における腎臓の遺伝子発現解析で、重度障害で強い発現上昇を認める Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) に着目をした。軽度障害では、皮質表層の近位尿細管上皮細胞にわずかな RUNX1 の発現を認めるのみであるのに対し、重度障害では、強い増殖を行う皮質表層の近位尿細管上皮細胞に一致して RUNX1 陽性細胞の集団を多く認めた (図 2)。また最近、RUNX1 のエンハンサー領域として RUNX1+24mCNE (eR1) が同定され、造血幹細胞のより特異的なマーカーとなることが報告された (Ng CE, et al. Stem Cells 2010)。さらに、eR1 は胃体部幹細胞を標識することも報告されている (Matsuo J, et al. Gastroenterology 2017)。eR1 活性のレポーターマウスである eR1-EGFP マウスを用いた検討を行うと、非障害腎や軽度障害が加えられた腎臓では近位尿細管上皮細胞に eR1 活性の上昇はほとんど認めないのに対して、重度障害では、



強い増殖を行う皮質表層の近位尿細管上皮細胞に一致して強い eR1 活性を有する細胞の集団を多く認めることを見出した (図 2)。

【図 2】 障害度に応じた腎臓での RUNX1 発現および eR1 活性

そこで、以下のような仮説を立てた (図 3)。軽度障害では、生き残った近位尿細管上皮細胞がランダムに増殖するのに対して、重度障害では eR1 活性が上昇した細胞群が優先的に増殖するというものである。その仮説を検証することを当研究の主要な目的とした。



【図 3】 障害度に応じた腎臓での修復様式に関する仮説

3. 研究の方法

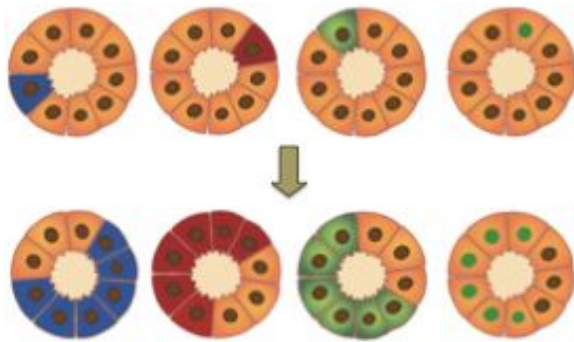
今後の研究方法として、第一に、eR1 (RUNX1 のエンハンサー) の下流に CreERT2 をつないだマウス eR1^{CreERT2} マウスと蛍光タンパクを発現する R26-tdTomato マウスを交配させ、障害時の eR1 活性化細胞の挙動を観察する。

第二に、eR1^{CreERT2} マウスと多色蛍光標識レポーターマウス R26-Confetti マウスを交配させ、障

害時に一連の連なりをもって認められた eR1 活性が上昇した細胞群が一細胞に由来するのかどうかを評価予定としている（図 4）。また、近位尿細管上皮細胞全体の 1-2% を占める定常状態で eR1 活性が上昇した細胞が、障害時にどのように増加するかも合わせて評価予定である。

第三に、eR1^{CreERT2} マウスおよび成熟近位尿細管全てを標識する Ndr^{g1}CreERT2 マウスと R26-tdTomato マウスを交配した仔マウスを用いて、FACS により近位尿細管上皮細胞を単離し、RNA-seq を行うことで、定常状態および障害腎で eR1 活性が上昇した細胞の細胞群により特異的なマーカーや形質はないかを網羅的に探索する予定としている。

第四に、腎障害時に RUNX1 の発現が上昇するが、eR1^{CreERT2} マウスおよび Ndr^{g1}CreERT2 マウスと RUNX1 floxed マウスを交配させ腎障害を惹起することで、RUNX1 が腎障害時にどのような機能的役割を果たしているかを検討することとする。

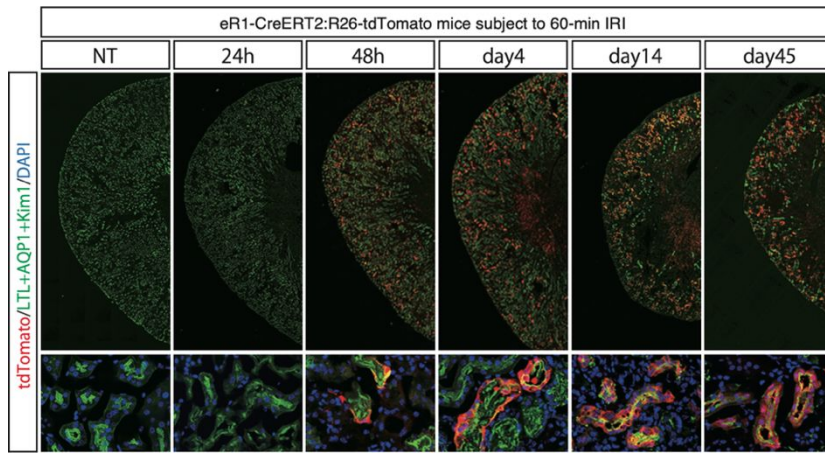


【図 4】 R26-Confetti マウスを用いた clonogenic analysis では一細胞から増加した場合、同色の細胞の連なりが観察される

4. 研究成果

(1) eR1 活性のレポーターマウスである eR1-EGFP マウスを用いてまず、検討した。非障害腎や軽度障害を加えられた腎臓では、近位尿細管上皮細胞に eR1 活性の上昇をほとんど認めないのに対し、重度障害では、皮質表層の近位尿細管上皮細胞の約 20% に一連の連なりをもって強い eR1 活性の上昇を認めた（前述）。

(2) eR1-Cre^{ERT2} 標識細胞の系譜追跡実験を行うため、eR1-Cre^{ERT2} マウスと R26-tdTomato マウスを交配し、その仔マウスにタモキシフェン投与を行い washout 後、重度の虚血再灌流障害を惹起した。トマト陽性細胞は、障害後 48 時間後に増加し始め、障害 14 日後には、近位尿細管細胞全体の 20% を占めた。次に、eR1-Cre^{ERT2} マウスと R26-tdTomato マウスを交配し、その仔マウスにタモキシフェンを投与せずに、重度障害を惹起した。予想外にもタモキシフェンを投与した際と同様に、eR1-Cre^{ERT2} 標識細胞は、近位尿細管細胞全体の 20% を占めるに至った（図 5）。次に、トリプルトランスジェニックマウスである、eR1-EGFP:eR1-Cre^{ERT2}:R26-tdTomato マウスを作成した。同マウスに重度の虚血再灌流障害を惹起すると、障害急性期には、EGFP 陽性の近位尿細管細胞とトマト陽性細胞の大部分が一致した（慢性期には eR1 活性は陰性化した）。これは、eR1-Cre^{ERT2} マウスが、タモキシフェン投与なしでも急性期に eR1 活性が上昇する細胞の系譜追跡に使用できることを示唆していた。

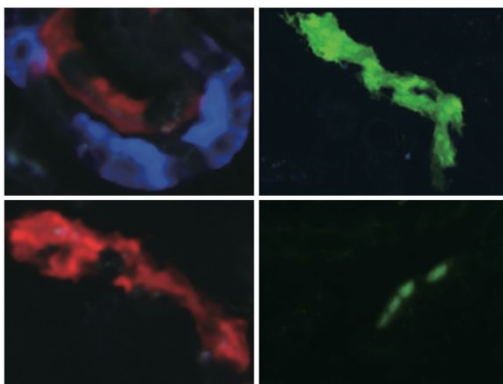


【図5】急性期に eR1 活性が上昇した近位尿細管上皮細胞は近位尿細管全体の 20% を占める

(3) 次に、重度障害後の eR1^{CreERT2} 標識細胞で障害時や障害修復期の挙動を検討した。障害後に eR1^{CreERT2} で標識される細胞は、障害後に強い増殖を示した。また、eR1^{CreERT2} で標識される細胞は、虚血再灌流後 4 日後（急性期）には、Kim-1 や vimentin といった近位尿細管上皮細胞の障害および脱分化マーカーを高発現しており、非障害腎で近位尿細管の刷子縁に発現している LTL の発現は消失していた。虚血再灌流後 45 日後（慢性期）には、eR1^{CreERT2} で標識される細胞での Kim-1 や vimentin の発現を発現する割合は、eR1 で標識されない細胞におけるその割合と、同程度にまで落ちていた。また eR1 で標識される細胞には、急性期に認めなくなっていた、分化マーカーである LTL の発現を復していた。

(4) FACS で eR1^{CreERT2} 標識細胞を回収し、どのような遺伝子プロファイルがあるかを評価した。その結果、障害後 eR1^{CreERT2} で標識される細胞は、近位尿細管上皮細胞全てを一様に標識する NdrG1^{CreERT2} 標識細胞と比較して、細胞周期、DNA 複製、蛋白合成に関する遺伝子を高発現することが判明した。

(5) 最後に eR1^{CreERT2} マウスと多色蛍光標識レポーターマウス R26-Confetti マウスを交配させ、障害時に一連の連なりをもって認めた、eR1 活性の上昇した細胞群が一細胞に由来するのかどうかを評価した。評価にあたっては、近位尿細管すべてを一様に標識することができる NdrG1^{CreERT2} マウスと R26-Confetti マウスを交配し、その仔マウスを利用した。NdrG1^{CreERT2}:R26-Confetti マウスは、近位尿細管の数%を標識できるようにタモキシフェンの投与量を調節した。その結果、重度障害後、eR1^{CreERT2} 標識細胞は、単一の NdrG1^{CreERT2} 標識細胞と比較して、clonal な増殖をすることが示された（図 6）。



これらの結果より、障害後、eR1 活性が上昇した近位尿細管上皮細胞が clonal な増殖を行い、皮質表層の近位尿細管を修復すると結論づけた。現在、腎障害時に RUNX1 の発現が上昇するが、eR1^{CreERT2} マウスおよび NdrG1^{CreERT2} マウスと RUNX1 floxed マウスを交配させ腎障害を惹起することで、RUNX1 が腎障害時にどのような機能的役割を果たしているかの検討も行っている。

【図 6】 eR1-CreERT2:R26-Confetti マウスを用い

た clonogenic analysis では障害後、同色の細胞の連なりが観察される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nakamura J, Sato Y, Kitai Y, Wajima S, Yamamoto S, Oguchi A, Yamada R, Kaneko K, Kondo M, Uchino E, Tsuchida J, Hirano K, Sharma K, Kohno K, Yanagita M | 4. 巻 95 |
| 2. 論文標題 Myofibroblasts acquire retinoic acid-producing ability during fibroblast-to-myofibroblast transition following kidney injury | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Kidney Int | 6. 最初と最後の頁 526-39 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2018.10.017 | 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 |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kitai Y, Nangaku M, Yanagita M. | 4. 巻 199 |
| 2. 論文標題 Aging-related kidney diseases | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Contributions to Nephrology | 6. 最初と最後の頁 266-273 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000517708 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 北井悠一朗、佐藤有紀、小口綾貴子、柳田素子 |
| 2. 発表標題 腎臓の機能成熟と障害抵抗性のパラドックス |
| 3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kitai Y, Yanagita M |
| 2. 発表標題 Transiently Dedifferentiated eR1-Active Proximal Tubule Cells Clonally Expand and Repair Proximal Tubules in Severe Injury |
| 3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北井悠一朗、大里元美、柳田素子 |
| 2. 発表標題 重度の腎障害では、RUNX1エンハンサー eR1が活性化した近位尿管細胞が強く増殖し、近位尿管を修復する |
| 3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 北井悠一朗、佐藤有紀、小口綾貴子、村川泰裕、柳田素子 |
| 2. 発表標題 腎臓の機能成熟と障害抵抗性のパラドックス |
| 3. 学会等名 第62回日本腎臓学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北井悠一朗、柳田素子 |
| 2. 発表標題 重度障害では、RUNX1エンハンサー_eR1が活性化した近位尿管上皮細胞が強く増殖し、近位尿管を修復する |
| 3. 学会等名 第61回日本腎臓学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kitai Y, Yanagita M | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Springer Singapore | 5. 総ページ数 6 |
| 3. 書名 Acute kidney injury and regenerative medicine | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|