

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590946

研究課題名（和文）腎幹細胞システムを利用した腎再生医学の確立

研究課題名（英文）

Establishment of regenerative medicine for the kidney using renal stem cell.

研究代表者

前嶋 明人 (MAESHIMA AKITO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：70431707

研究成果の概要（和文）：腎障害後の尿細管再生過程で label-retaining cells (LRCs) は再生細胞の Origin として機能する (JASN 2003)。今回 LRCs 数と血管内皮の関連について検討したところ、加齢に伴い LRCs 数および Peritubular capillary (PTC) 面積は有意に減少していた。BrdU ラベルした尿細管を 3 次元ゲル培養しヒト血管内皮細胞と共培養すると、尿細管 LRCs 数は有意に増加したことから、その数は血管内皮由来因子により制御されている可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Label-retaining cells (LRCs) have been shown to act as the origin of proliferating cells after kidney injury. In the present study, we demonstrated that the number of LRCs as well as the area of the capillary network declined with aging. When renal tubules isolated from rats treated with BrdU label were co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), the number of LRCs significantly increased compared to tubules cultured without HUVEC, suggesting that the size of LRC pool might be regulated by the surrounding peritubular capillary network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：再生医学

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：幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

腎臓は様々な障害を受けても自然に回復する能力を有している。尿細管壊死に陥っても、反応性に周囲の正常な尿細管細胞が増殖・遊走・分化し、新たな尿細管が再構築される。我々はBrdUラベリング法を用いて、組織幹細胞に共通する「分裂速度の非常に遅い」という性質を持つ細胞、いわゆるSlow-cycling Cellが成体腎に存在することを確認し、さらに腎障害後の再生過程でその細胞が増殖・分化し尿細管再構築に大きく貢献する、腎幹細胞的な役割を果たすこと (J Am Soc Nephrol 14: 3138-3146, 2003, J Am Soc Nephrol 17: 188-98, 2006)、さらに管腔形成能や多分化能を有した非常に興味深い細胞集団であること (J Am Soc Nephrol 17:188-98, 2006) を明らかにしてきた。一方、加齢に伴い腎障害のリスクは上昇するが、その原因は十分に明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

腎幹細胞に焦点を当てて、加齢に伴う腎機能低下と腎幹細胞数の相関および血管内皮細胞の関与を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 様々な週齢のラットに虚血再灌流障害を誘導し、組織学的変化、細胞増殖について比較した。Osmoticポンプを用いて同ラットにBrdU labeling (1w) & chase (2w) を行い、腎幹細胞 (LRCs) をBrdU標識後に腎臓を摘出。各週齢間でのLRCs数を比較した。さらに上記ラットに虚血・再灌流障害急性腎不全モデルを作成し、障害後観察される増殖細胞 (再生細胞) の数を比較した。同時に内皮細胞マーカーであるRECA-1染色を行い、各週齢間でのPeritubular capillary (PTC) 面積を定量した。また、7週齢のラットから尿細管を分離し3次元ゲル培養を行い、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) との共培養の効果を調べた。

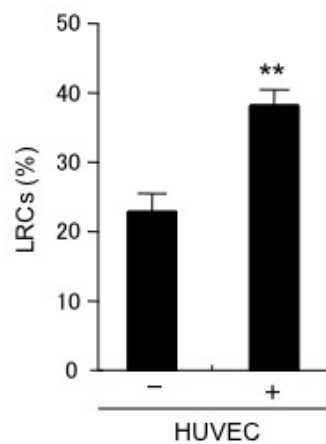
(2) 尿細管再生機序を細胞レベルで解析するため、ヒトの近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) を3次元ゲル培養し、様々な増殖因子を添加して管腔形成の有無を評価した。これにより *in vitro* の尿細管形成モデルを確立し、HUVECと共培養することにより血管内皮細胞由来因子の尿細管形成に対する影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 加齢と腎幹細胞

LRCs数を各週齢間で比較したところ、加齢に伴い腎幹細胞数は減少することが判明した。

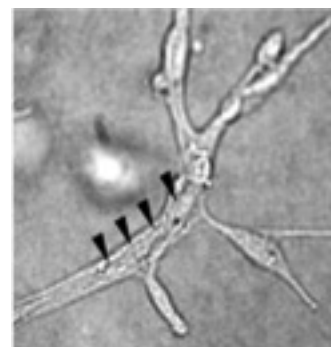
さらに上記ラットに虚血・再灌流障害急性腎不全モデルを作成したところ、障害後観察される増殖細胞 (再生細胞) の数は加齢に伴い減少していることが判明した (PCNA染色)。LRCs数は障害後はどの週齢でも有意に増加したが、個々のLRCの分裂能は週齢間で差がなかった。一方、加齢に伴い尿細管周囲の毛細血管網の減少も観察され、腎幹細胞の数は血管内皮細胞由来因子により制御されている可能性が高いことが判明した。BrdU labeling & chaseした尿細管を3次元ゲル培養したところ、HUVECとの共培養により、尿細管LRCsの数は有意に増加した (図1)。



(図1)

#### (2) 尿細管再生の *In vitro* modelの確立

RPTECをゲル内で3次元培養し、様々な増殖因子を添加したところ、尿細管再生促進因子である肝細胞増殖因子 (HGF) により極性を持った尿細管様構造が誘導された (図2)。



(図2)

この尿細管再生の *In vitro* モデルを利用してHUVECを共培養したところ、HGFによる管腔形成能が著明に促進されることが確認できた。

以上のことから、加齢に伴う尿細管再生能の低下は、加齢により動脈硬化など血管障害が生じ、血管内皮由来因子が減少してLRCs数を維持できなくなることがその要因の一つと考えられた。この腎幹細胞の数を増やすこ

とができる治療薬の開発が将来、腎不全患者を減らす最短の道かも知れない。

#### 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 15 件)

① Miya M, Maeshima A, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Yokoo H, Nojima Y: Enhancement of In Vitro Human Tubulogenesis by Endothelial Cell-derived Factors: Implications for In Vivo Tubular Regeneration after Injury. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2011 (In press)、査読あり

② Takahashi S, Hiromura K, Sakurai N, Matsumoto T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nojima Y: Efficacy and safety of tacrolimus for induction therapy in patients with active lupus nephritis. **Mod Rheumatol**. 2011 (In press)、査読あり

③ Sakairi T, Hiromura K, Takahashi S, Hamatani H, Takeuchi S, Tomioka M, Maeshima A, Kuroiwa T, Nojima Y: Effects of proteasome inhibitors on rat renal fibrosis in vitro and in vivo. **Nephrology (Carlton)** 16:76-86, 2011、査読あり

④ Yoshida Y, Fukuda N, Maeshima A, Yamamoto C, Matsumoto T, Ueno T, Nojima Y, Matsumoto K, Soma M: Treatment with valsartan stimulates endothelial progenitor cells and renal label-retaining cells in hypertensive rats. **J Hypertens** 29: 91-101, 2011、査読あり

⑤ Sakurai N, Kuroiwa T, Kayakabe K, Matsumoto T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y: Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 is expressed in rheumatoid synovium and regulates synovial fibroblast proliferation. **Mod Rheumatol** 21: 63-72, 2010、査読あり

⑥ Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T, Nojima Y: Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. **Nephrology (Carlton)** 15: 568-74, 2010、査読あり

⑦ Takeuchi S, Hiromura K, Tomioka M, Takahashi S, Sakairi T, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nojima Y: The immunosuppressive drug mizoribine directly prevents podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephrosis.

**Nephron Exp Nephrol** 116:e3-10, 2010、査読あり

⑧ Sakurai N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Hiramatsu N, Takeuchi S, Tomioka M, Shigehara T, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Kopp JB, Nojima Y: Fluvastatin prevents podocyte injury in a murine model of HIV-associated nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**. 24: 2378-83, 2009、査読あり

⑨ 前嶋明人: 尿細管再生に関する最近の知見 Annual Review 腎臓 2009、43-49, 2009、査読なし

⑩ Sakurai N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Hiramatsu N, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Expression of IL-19 and its receptors in RA: potential role for synovial hyperplasia formation. **Rheumatology (Oxford)** 47: 815-20, 2008、査読あり

⑪ Hiramatsu N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y: Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. **Rheumatology (Oxford)** 47:702-7, 2008、査読あり

⑫ 前嶋明人: 尿細管の再生療法への道 医学のあゆみ、225 巻 4 号、317-320, 2008、査読なし

⑬ 宮政明、前嶋明人: 「尿細管細胞の再生機構」 **Nephrology Frontier** 7 巻 2 号、148-152, 2008、査読なし

⑭ 池内秀和、廣村桂樹、坂入徹、山下眞、岡上準、富澤健史、田村茂生、前嶋明人、金子和光、黒岩卓、植木嘉衛、塚田義人、河合弘進、若松良二、野島美久: 「IgA 腎症に対するステロイドパルス療法の有効性 腎機能低下症例における検討」 **日本腎臓学会誌** 50 巻 2 号、114-121, 2008、査読あり

⑮ 三島敬一郎、前嶋明人: 「腎再生医学に関する最近の知見」 第 92 回東京腎生理集談会 腎と透析 64 巻 3 号 417-421, 2008、査読なし

[学会発表] (計 25 件)

① Akito Maeshima: Symposium: Involvement of Renal Stem/Progenitor Cells in the Regeneration Process of the Kidney. 3<sup>rd</sup> Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell

2010.12.5-7, Shanghai, China

② Maeshima A, Miya M, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y: Label-Retaining Cells Which Contribute to Tubular Regeneration after Renal Ischemia Are Not a Specific Minor Cell Population in the Kidney. 43th American Society of Nephrology 2010.11.18-21, Denver, USA

③ Takahashi S, Hiromura K, Hamatani H, Sakurai N, Ikeuchi H, Maeshima A, Kuroiwa T, Nojima Y: Efficacy of Low-Dose Tacrolimus (TAC) in Induction Therapy of Lupus Nephritis (LN). 43th American Society of Nephrology 2010.11.18-21, Denver, USA

④ Mishima K, Maeshima A, Miya M, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y: Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) during Renal Fibrosis by an N-Type Calcium Channel Blocker, Cilnidipine. 43th American Society of Nephrology 2010.11.18-21, Denver, USA

⑤ Takahashi S, Hiromura K, Hamatani H, Kato-Tomioka M, Maeshima A, Kuroiwa T, Ohnishi H, Matozaki T, Aoki T, Nojima Y: The Role of SIRP-alpha (SHPS-1) in Experimental Diabetic Nephropathy. 43th American Society of Nephrology 2010.11.18-21, Denver, USA

⑥ 前嶋明人: シンポジウム「臨床応用へ向けた腎臓の再生」内在する尿細管前駆細胞 第53回日本腎臓学会総会 2010.6.16-18、神戸

⑦ 三島敬一郎、前嶋明人、宮政明、松本孝之、黒岩卓、廣村桂樹、野島美久: カルシウム拮抗薬の Epithelial-mesenchymal transition (EMT) に対する作用 第53回日本腎臓学会総会 2010.6.16-18、神戸

⑧ 富岡麻衣、廣村桂樹、高橋哲史、前嶋明人、黒岩卓、青木武生、高田邦昭、大西浩史、的崎尚、野島美久: SIRP-alpha は糸球体上皮細胞の形態と蛋白尿制御に関与する 第53回日本腎臓学会総会 2010.6.16-18、神戸

⑨ 富岡麻衣、廣村桂樹、高橋哲史、松本孝之、前嶋明人、黒岩卓、野島美久: IgA 腎症における尿細管間質の nestin 発現と腎予後に関する検討 第53回日本腎臓学会総会

2010.6.16-18、神戸

⑩ 宮政明、前嶋明人、三島敬一郎、松本孝之、黒岩卓、廣村桂樹、野島美久: 血管内皮由来因子による腎尿細管前駆細胞数の制御 第53回日本腎臓学会総会 2010.6.16-18、神戸

⑪ 宮政明、前嶋明人、三島敬一郎、松本孝之、黒岩卓、廣村桂樹、野島美久: 腎障害後の尿細管再生における血管内皮由来因子の関与 第53回日本腎臓学会総会 2010.6.16-18、神戸

⑫ Miya M, Maeshima A, Mishima K, Matsumoto T, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y: The Role of Endothelial-cell derived Factor(s) in the Regeneration Process of Renal Tubules after Injury. ISN Nexus Symposium 2010.4.15-18, Kyoto, Japan

⑬ Mishima K, Maeshima A, Miya M, Matsumoto T, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y: Reduction of Renal Fibrosis by Calcium Channel Blockers, Cilnidipine and Amlodipine, via Multiple Mechanisms. ISN Nexus Symposium 2010.4.15-18, Kyoto, Japan

⑭ Tomioka M, Hiromura K, Takahashi S, Takeuchi S, Maeshima A, Kuroiwa K, Kaneko Y, Saito Y, Ohnishi H, Matozaki T, Aoki T, Takata T, Nojima Y: The role of SIRP-alpha in podocyte structure and function. ISN Nexus Symposium 2010.4.15-18, Kyoto, Japan

⑮ Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kuroiwa T, Kaneko Y, Takeuchi T, Nojima Y: Tubulointerstitial nestin expression as a predictive marker for renal prognosis in IgA nephropathy. ISN Nexus Symposium 2010.4.15-18, Kyoto, Japan

⑯ Tomioka M, Hiromura K, Takahashi S, Takeuchi S, Maeshima A, Kuroiwa K, Kaneko Y, Saito Y, Ohnishi H, Matozaki T, Aoki T, Takata T, Nojima Y: SIRP (SHPS-1) Signaling Pathway Is Involved in Podocyte Structure and Function. 42th American Society of Nephrology 2009.10.29-11.1, San Diego, USA

⑰ Miya M, Maeshima A, Mishima K, Matsumoto T, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y: Capacity of Tubular Regeneration after

Injury Is Reduced in Aging Kidney Due to the Low Number of Renal Progenitor Cells. 42th American Society of Nephrology 2009. 10. 29-11. 1, San Diego, USA

⑱ Miya M, Maeshima A, Mishima K, Matsumoto T, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y: The Role of Endothelial-Cell Derived Factor(s) in Regeneration Process of Renal Tubules after Injury. 42th American Society of Nephrology 2009. 10. 29-11. 1, San Diego, USA

⑲ 吉田好徳、福田昇、岡田一義、前嶋明人、野島美久、松本紘一：腎臓 Label retaining cell に対する組織アンジオテンシン II の役割 第 52 回日本腎臓学会総会 2009. 6. 3-5、横浜

⑳ 高橋哲史、廣村桂樹、富岡麻衣、竹内茂、前嶋明人、黒岩卓、金子和光、大西浩史、的崎尚、野島美久：糖尿病性腎症における SHPS-1 シグナル経路に関する検討第 52 回日本腎臓学会総会 2009. 6. 3-5、横浜

㉑ 宮政明、前嶋明人、三島敬一郎、山下眞、黒岩卓、金子和光、廣村桂樹、野島美久：腎臓の老化における腎尿細管前駆細胞の関与 第 52 回日本腎臓学会総会 2009. 6. 3-5、横浜

㉒ 高橋哲史、廣村桂樹、渡辺光治、逸見大造、倉林和隆、山下眞、前嶋明人、金子和光、黒岩卓、野島美久：ループス腎炎の寛解導入療法におけるタクロリムスの有用性の検討 第 52 回日本腎臓学会総会 2009. 6. 3-5、横浜

㉓ 吉田好徳、福田昇、岡田一義、山元智衣、前嶋明人、松本紘一：腎硬化症における ARB の腎幹細胞 label-retaining cell への作用 第 51 回日本腎臓学会総会 2008. 5. 30-6. 1、福岡

㉔ 松本孝之、桜井則之、平松範行、前嶋明人、金子和光、黒岩卓、廣村桂樹、Kopp Jeffrey、野島美久：糸球体上皮細胞分泌蛋白のプロテオミクス解析による insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 の同定 第 51 回日本腎臓学会総会 2008. 5. 30-6. 1、福岡

㉕ 富岡麻衣、廣村桂樹、竹内茂、坂入徹、奥沢千絵、岡上準、富澤健史、前嶋明人、黒岩卓、金子和光、大西浩史、的崎尚、野島美久：SHPS-1 は糸球体上皮細胞に発現

し、障害時の蛋白尿の制御に關与する 第 51 回日本腎臓学会総会 2008. 5. 30-6. 1、福岡

〔図書〕 (計 1 件)

① Akito Maeshima: Regeneration of the Kidney: Involvement of Intra-and Extra-Renal Stem Cells, *Daughter Cells: Properties, Characteristics and Stem Cells*, Novapublishers 197-220, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前嶋 明人 (MAESHIMA AKITO)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：70431707