

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08596

研究課題名(和文)腎幹細胞を起点とする尿細管再生システムを利用した加齢腎再生の試み

研究課題名(英文) Attempt to Regenerate Aging Kidneys Using a Renal Tubule Regeneration System Utilizing Renal Stem Cells

研究代表者

前嶋 明人(MAESHIMA, AKITO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70431707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDoxycycline誘導Histone 2B-GFPマウスを用いて、腎幹細胞の増殖・分化様式を解析した。分裂速度の非常に遅い腎幹細胞をGFP標識したところ、GFP陽性尿細管細胞の数がDoxycycline投与期間に比例して増加し、一方、追跡期間に反比例して減少することがわかった。以上の結果から、腎障害後に活発に増殖(再生)する尿細管細胞は、正常状態でもゆっくり分裂していることが判明した。このマウスを用いて、腎幹細胞の増殖・分化様式がさらに明らかになれば、「腎幹細胞を起点とする尿細管再生システム」を活用した腎再生医療の実現が可能になるとと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は「腎幹細胞を起点とする尿細管再生システム」を利用した「腎再生医療」の確立に大きく貢献するものと思われる。内在する腎幹細胞を活性化し、腎臓が本来有している再生能力を最大限発揮させることにより、腎疾患の原因によらず腎機能が低下した症例に対して、「腎幹細胞を起点とする尿細管再生システム」を基盤とした「腎再生医療」が可能になる。また、加齢により失われた腎幹細胞を増加させて、尿細管再生システムを再び活性化することができれば、高齢者腎不全あるいは透析導入患者数の減少につながる事が期待できると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the proliferation and differentiation patterns of renal stem cells using Doxycycline-induced Histone 2B-GFP mice. By labeling the slowly dividing renal stem cells with GFP, we found that the number of GFP-positive tubular cells increased proportionally during the Doxycycline administration period, while it decreased inversely during the follow-up period. Based on these results, it was revealed that tubular cells that actively proliferate (regenerate) after renal injury also undergo slow division under normal conditions. By further elucidating the proliferation and differentiation patterns of renal stem cells using this mouse model, it is believed that the realization of renal regenerative medicine utilizing a "urinary tubule regeneration system based on renal stem cells" becomes possible.

研究分野：腎臓内科学

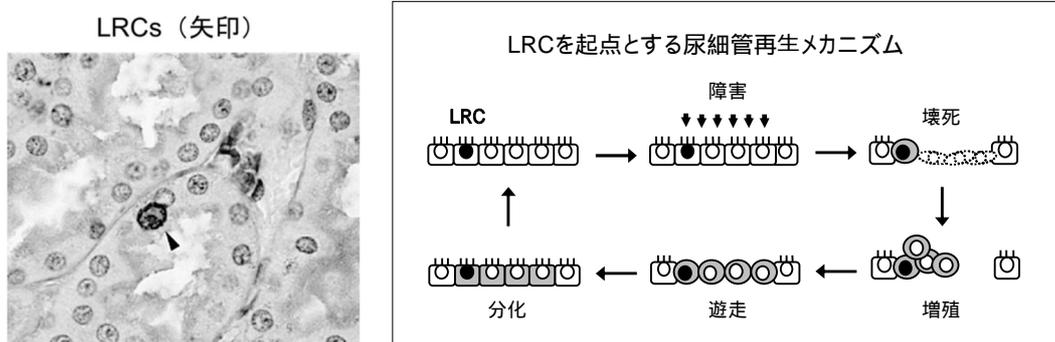
キーワード：尿細管再生 腎幹細胞 急性腎障害

1. 研究開始当初の背景

腎臓の大部分を占める尿細管上皮細胞は、様々なチャネルやトランスポーターを発現し、電解質やアミノ酸、種々の薬剤の再吸収・分泌を司る重要な生理機能を担っている。一方、尿細管細胞は強い障害を受けても、一過性に尿細管壊死に陥るものの、非常に高い再生能力を発揮して元の構造を再構築することができる。臨床的には急性腎障害がこれに相当する。

ところが高齢者では急性腎障害が加わると腎機能の回復が遅い。加齢に伴い尿細管再生能(修復能)が低下するため、腎機能が改善せず慢性腎不全に移行して透析導入に至るケースも少なくない。高齢の腎不全患者や透析導入患者数を減らすためにも、「加齢により低下した尿細管再生能を再活性化するための試み」は、今後の腎疾患診療の向上につながる重要課題と思われる。

研究者は、これまで「腎臓の再生機序」、特に腎幹細胞に焦点を当てて以下の研究を行ってきた。まず、急性腎障害の回復過程で観察される増殖細胞(再生細胞)の起源を調べるため、腎幹細胞の同定を試みた。その結果、組織幹細胞に共通した「細胞の分裂速度が非常に遅い」細胞、いわゆる Label-retaining 細胞(LRCs)がラット成体腎の尿細管に存在することを確認した(下の写真)。さらに、虚血・再灌流障害の回復過程のごく初期から細胞分裂を開始し、その後増殖を繰り返して、最終的には成熟した尿細管上皮へ分化する、という腎幹細胞的な役割を果たす細胞集団であることを世界に先駆けて報告した(Maeshima A, et al. *J Am Soc Nephrol* 14: 3138-3146, 2003)(下図)。



その後、この細胞は腎線維化の過程で形質転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) を起こして間質に移動し、筋線維芽細胞へと形質転換すること (Yamashita S, Maeshima A, et al. *J Am Soc Nephrol* 16: 2044-2051, 2005) やその機序に N 型 Ca チャネルが関与していること (Mishima K, Maeshima A, et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F665-673, 2013) が明らかになった。

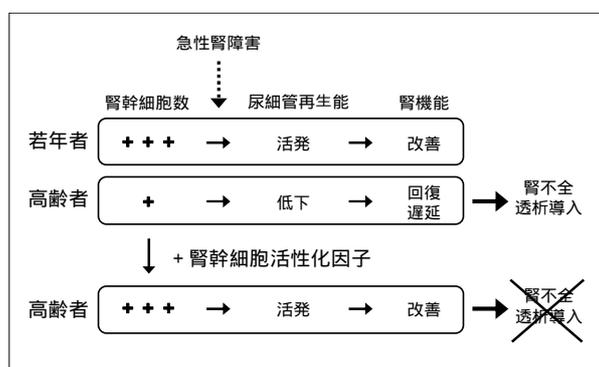
また、In vitro で解析した結果、LRCs には様々な腎臓構成細胞に分化する能力(多分化能)が備わっていることも判明している (Maeshima A, et al. *J Am Soc Nephrol* 17: 188-198, 2006)。興味深いことに、加齢とともに LRCs の数は減少していた (Miya M, Maeshima A, et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F694-702, 2012)。

本研究では上記研究成果をさらに発展させて、腎幹細胞(LRC)の増殖・分化様式、活性化因子を明らかにする。腎幹細胞を起点とする尿細管再生システムの活性化を通じて、加齢腎に対する腎再生医療の進歩に必要な本質的知見を得ることを目指している。

2. 研究の目的

本研究の目的は「腎幹細胞の増殖・分化様式を明らかにすること」である。内在する腎幹細胞を活性化し、腎臓が本来有している再生能力を最大限発揮させることにより、「腎幹細胞(LRC)を起点とする尿細管再生システム」を基盤とした「加齢腎に対する再生医療」の確立を目指している。

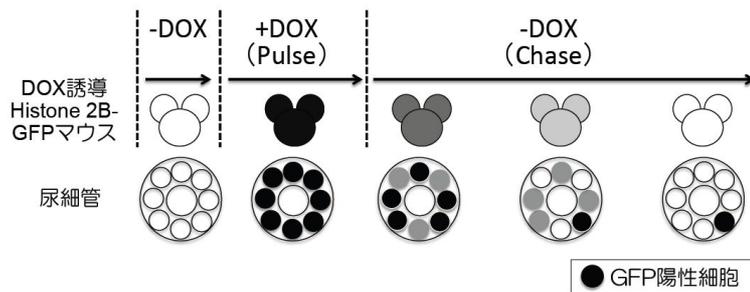
加齢により失われた腎幹細胞を増加させて、尿細管再生システムを再び活性化することができれば、高齢者腎不全あるいは透析導入患者数の減少につながることを期待できる(右図)



3. 研究の方法

本研究では、Doxycycline 誘導 Histone 2B-GFP (TetOP-H2B-GFP) マウスを用いて GFP 標識腎幹細胞を分離し、腎幹細胞の増殖・分化様式を明らかにすることにより「腎幹細胞を起点とする尿細管再生システム」を応用した「加齢腎に対する再生医療」の確立を目指している。

本研究で用いる TetOP-H2B-GFP マウスは、Doxycycline (DOX) 処理により、Histone 2B を発現している細胞(細胞分裂している細胞)が GFP 標識される。したがって、Doxycycline による On (Pulse) と Off (Chase) を行うことにより、BrdU ラベリング法と同様、細胞分裂の非常に遅い腎幹細胞を GFP 標識することが可能となる(下図)。そこで、若年(7週齢)マウスおよび高齢(20ヶ月齢)マウスにおける GFP 標識腎幹細胞の数および局在を調べる。個々の GFP 標識腎幹細胞の性質や特徴を明らかにし、尿細管の Turnover メカニズムを解析する。

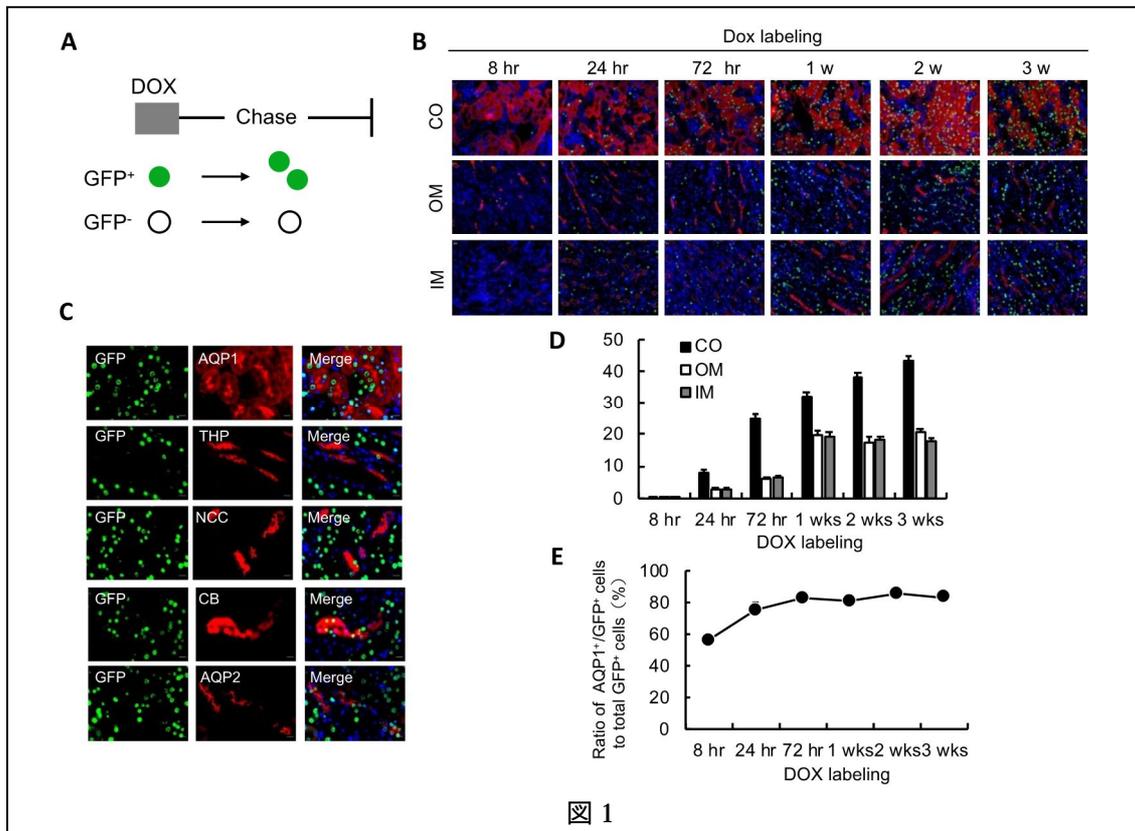


4. 研究成果

DOX 標識後の TetOP-H2B-GFP マウスの正常な腎臓における GFP 陽性細胞の存在

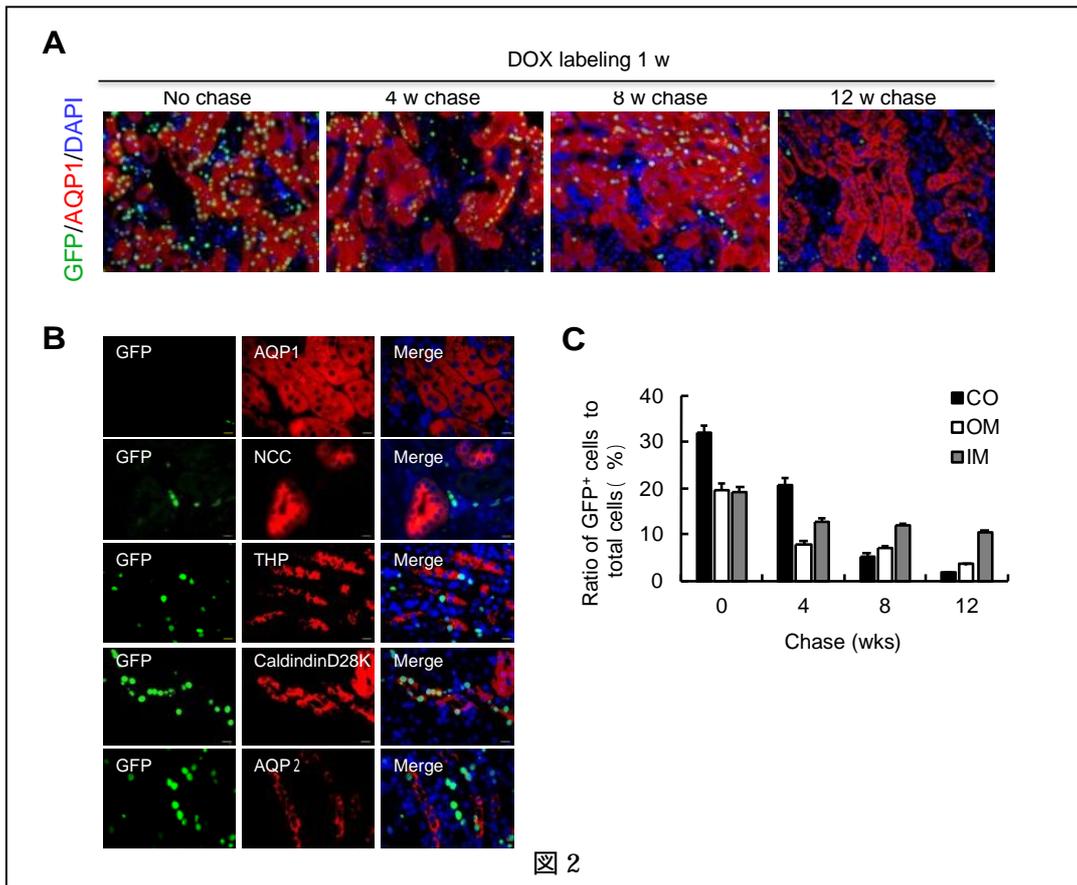
TetOP-H2B-GFP マウスでは、DOX パルス後に GFP 陽性細胞として増殖細胞を検出し、追跡期間後に GFP 陽性細胞の細胞分裂を観察することが可能である(図 1A)。

まず、TetOP-H2B-GFP マウスの正常な腎臓において GFP 陽性細胞が検出可能かどうかを調べた。DOX で標識された TetOP-H2B-GFP マウスを一定期間標識した。免疫染色により、腎臓の GFP 陽性細胞の局在を調べた。その結果、GFP 陽性細胞は主に TetOP-H2B-GFP マウスの腎皮質に局在していた(図 1B)。ほとんどの GFP 陽性細胞は AQP1 陽性であり、一部の GFP 陽性細胞は NCC 陽性または AQP2 陽性であった(図 1C)。定量的解析では、GFP 陽性細胞数は DOX パルスの期間に応じて増加した(図 1D)。皮質の GFP 陽性細胞の約 80% が AQP1 陽性であり、近位尿細管細胞が正常状態で分裂していることが示唆された(図 1E)。



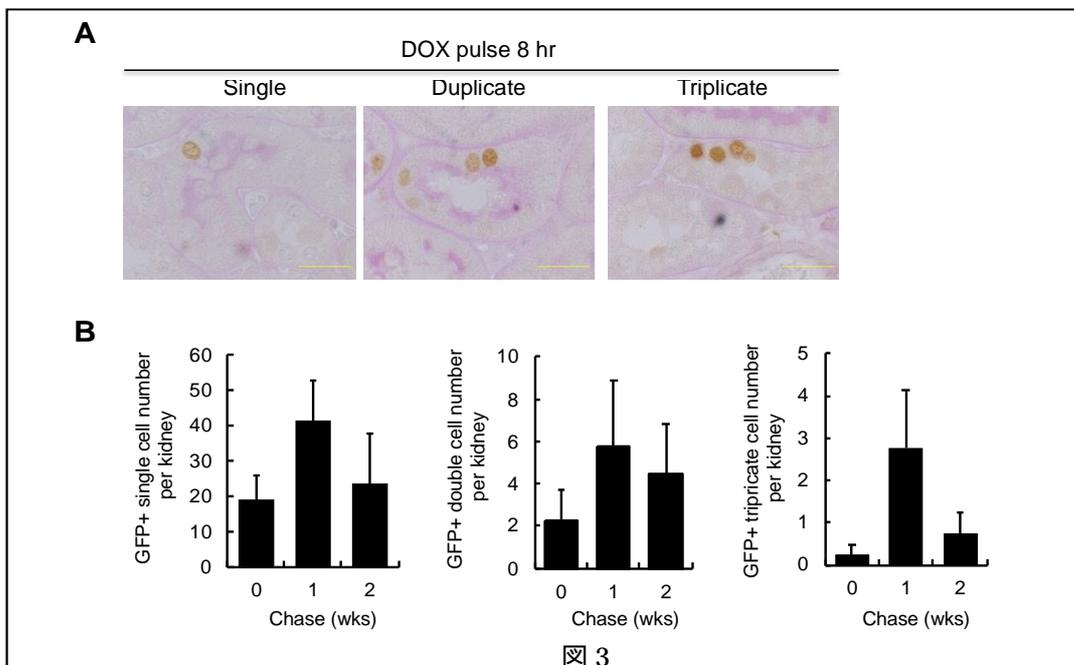
追跡期間に伴う GFP 陽性尿細管細胞の数の減少

次に、DOX を 1 週間投与した TetOP-H2B-GFP マウスの腎臓における GFP 陽性細胞の数を調べた。4 週間、8 週間、12 週間の追跡期間後の TetOP-H2B-GFP マウスの腎臓を観察すると、AQP1 陽性の GFP 陽性細胞は減少した (図 2A)。12 週間の追跡期間後、GFP 陽性細胞は THP 陽性の細い尿細管や calbindin 陽性または AQP2 陽性の集合管に主に局在していた (図 2B)。定量的解析では、皮質の GFP 陽性細胞の数は追跡期間に応じて有意に減少した (図 2C)。



短時間の DOX パルスおよび追跡後の GFP 陽性クラスターの存在

次に、TetOP-H2B-GFP マウスの腎臓における GFP 陽性細胞の追跡を行った。TetOP-H2B-GFP マウスに DOX を 8 時間投与し、一定期間追跡後、腎臓を取り出して組織学的検討を行った。短時間の DOX パルス後、GFP 陽性細胞は単一の細胞として存在していた。一方、1 週間の追跡期間後、いくつかの GFP 陽性細胞は 2~3 個の細胞のクラスターとして観察された (図 3A)。1 週間の追跡期間後に GFP 陽性クラスターの数が増加していたことから (図 3B)、GFP 陽性尿細管細胞は正常な状態でゆっくりと分裂していることが示唆された。



老化腎臓における GFP 陽性細胞の数の減少

最後に、TetOP-H2B-GFP マウスの老化腎臓における GFP 陽性細胞の数を調べた。8 週齢、12 か月齢、または 18 か月齢の TetOP-H2B-GFP マウスに 1 週間 DOX を投与し、GFP 陽性細胞数を定量的に調べた。その結果、いずれの年齢でも DOX 標識後に GFP 陽性細胞が検出された (図 4A)。しかし、年齢とともに GFP 陽性細胞の数は有意に減少した (図 4B)。ほとんどの GFP 陽性細胞は AQP1 陽性の尿細管細胞であり、一部の GFP 陽性細胞は 12 か月齢マウスの細い尿細管および集合管に局在しており、これは 8 週齢マウスの GFP 陽性細胞の位置と類似していた。若いマウスと老化したマウスの腎臓における GFP 陽性細胞の局在に明らかな差はなかった (図 4C)。

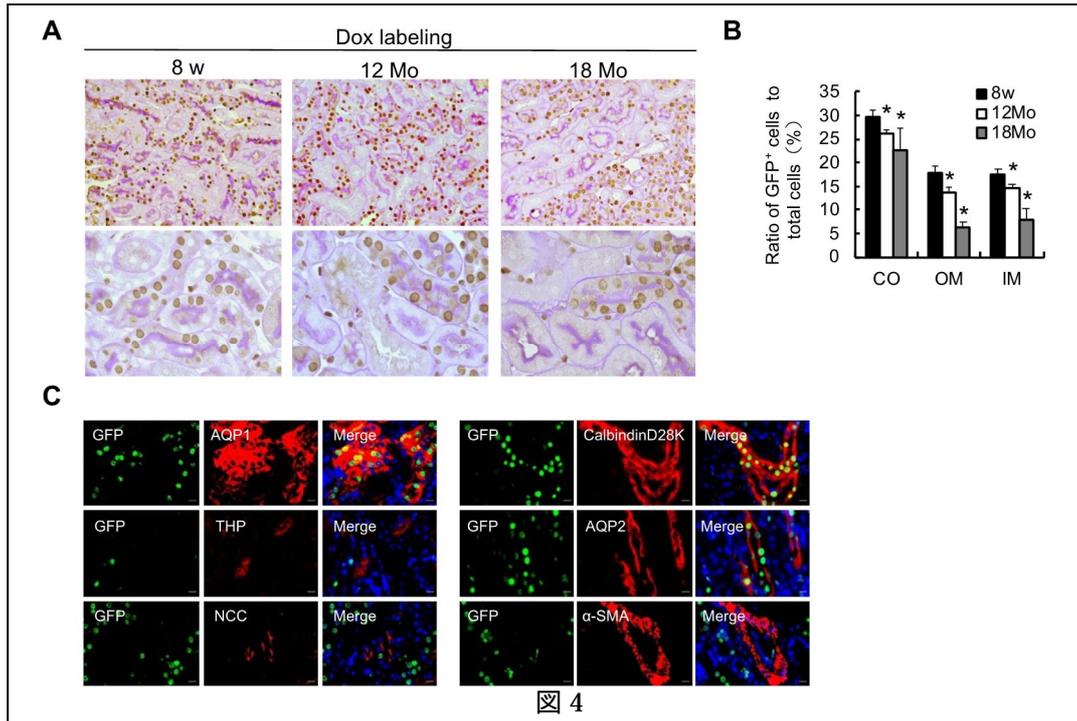


図 4

本研究の結果から、TetOP-H2B-GFP マウスを用いて腎幹細胞を GFP 標識することが可能であり、このマウスは尿細管細胞の Turnover を解析する上で有用と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagayama Izumi, Takayanagi Kaori, Hasegawa Hajime, Maeshima Akito	4. 巻 12
2. 論文標題 Tubule-Derived Follistatin Is Increased in the Urine of Rats with Renal Ischemia and Reflects the Severity of Acute Tubular Damage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 801 ~ 801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12050801	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 -
1. 著者名 Shimizu Sayaka, et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Initiation of renin-angiotensin system inhibitors and first complete remission in patients with primary nephrotic syndrome: a nationwide cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 480 ~ 489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-023-02331-3	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 -
1. 著者名 Yamamoto Ryohei, et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Time to remission of proteinuria and incidence of relapse in patients with steroid-sensitive minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: the Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40620-022-01279-z	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 -
1. 著者名 Nagayama Izumi, Maeshima Akito, Nagata Daisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Urinary Activin A: A Novel Biomarker for Human Acute Kidney Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 661 ~ 661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12030661	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩下山連, 永山泉, 大野和寿, 長田太助, 長谷川元, 前嶋明人
2. 発表標題 尿中Uromodulin: 急性腎障害の回復を反映する新規バイオマーカー
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤田衣里香, 河合雄一郎, 佐藤真理子, 清水泰輔, 田山陽資, 小川智也, 前嶋明人, 長谷川元
2. 発表標題 症候性の低K血症、低Mg血症、低Ca血症を呈した慢性アルコール多飲患者の一例
3. 学会等名 第52回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池内秀和, 前嶋明人, 諏訪絢也, 渡辺光治, 中里見征央, 浜谷博子, 坂入徹, 金子和光, 廣村桂樹
2. 発表標題 IgA腎症の長期予後予測因子としての尿中アクチビンの有用性の検討
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------