

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17272

研究課題名（和文）尿中落下細胞に含まれる多能性幹細胞の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of pluripotent stem cells contained in urine fallen cells

研究代表者

内田 奈生 (Uchida, Nao)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30771670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：小児腎臓病患者の尿中に障害された腎組織を再生する幹細胞が含まれるという仮説をたて検証を試みた。小児腎臓病患者から尿検体の提供を受け、尿中落下細胞を培養した。接着細胞上にES細胞様のClusterが形成された。これらのClusterは未分化・幹細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ陽性の細胞が含まれ、また多能性幹細胞（Muse細胞）のマーカーであるSSEA-3陽性細胞が含まれた。上記の結果から尿中落下細胞に幹細胞が含まれると考え、患者の腎生検標本上でSSEA-3染色を行った。一部の患者検体で糸球体を構成する細胞にSSEA-3陽性を認め、この幹細胞が糸球体を修復している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓病は罹患頻度の高い疾患であり、末期腎不全患者は維持透析や腎移植が必要になる。これらの治療法は高い医療費や移植臓器の不足といった問題を抱えている。今回の研究は障害された腎臓を再生する幹細胞の存在、同定に迫るものであり、現在の腎不全治療の問題を再生医療によって解決する方法につながるものである。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that the urine of pediatric kidney disease patients contains stem cells that regenerate damaged kidney tissue. Urine specimens were provided by pediatric kidney disease patients, and cells fallen in the urine (Urine cells; UC) were cultured. ES cell-like clusters were formed on the adherent cells. These clusters contained cells positive for alkaline phosphatase, a marker for undifferentiated/stem cells, and cells positive for SSEA-3, a marker for pluripotent stem cells (Muse cells). Based on the above results, we assumed that stem cells were included in UC. Next, we performed SSEA-3 staining on the patient's kidney biopsy specimen. In some patient samples, cells that make up the glomerulus were positive for SSEA-3, suggesting that these stem cells may be repairing the glomerulus.

研究分野：腎臓学、小児科学

キーワード：慢性腎臓病 再生医療 尿中落下細胞 幹細胞 Muse細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は人口の 10%程度が罹患する罹患頻度の高い疾患であり、進行し末期腎不全に至ると、維持透析あるいは腎移植が必要になるが、両者とも高い医療費や移植臓器の不足などの問題を抱えている。iPS 細胞などをはじめとした多能性幹細胞による腎臓の再生医療に注目が集まっている。

当研究室では小児の腎臓病患者の尿から尿中落下細胞を分離培養する技術を確立し、診断への応用などについて研究されていた (Morimoto T et al. *Pediatr Nephrol.* 2001)。この細胞は患者腎組織に由来すると考えられ、足細胞や尿細管由来細胞が混在している。また、培養を継続すると一部の細胞が骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に自然に分化する現象を認めたことから、間葉系幹細胞が含まれる可能性が高いと考えた。

研究者は骨髄間葉細胞 (MSC) に含まれる多能性幹細胞である Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞を用いて、慢性腎臓病の再生医療研究を行った経験があり (Uchida N et al. *J Am Soc Nephrol* 2017.)。尿中落下細胞には腎臓病によって障害された腎組織を修復する多能性幹細胞が含まれるという仮説を立てた。

本研究では、尿中落下細胞に間葉系幹細胞が含まれることの生物学的意義を探究し、診断・治療応用を検討した。

2. 研究の目的

尿中落下細胞に含まれる幹細胞 (以下、尿幹細胞) を同定・単離し、その性質を探究する。

3. 研究の方法

各種腎疾患 (慢性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、アルポート症候群) の患者尿検体から尿中落下細胞を培養し、細胞表面マーカーにより尿幹細胞を同定・分離する。分離された尿幹細胞が間葉系幹細胞および多能性幹細胞としての性質を有するか確認する。

尿幹細胞のマーカーとして適当な抗原を決定し、患者腎組織内での局在を探る。

4. 研究成果

、 について各種腎疾患 (紫斑病腎炎、感染関連腎炎、アルポート症候群、IgA腎症) の患者尿検体から尿中落下細胞を培養した。Muse細胞はStage-Specific Embryonic Antigen-3 (SSEA-3) 陽性細胞として単離されるため、尿中落下細胞のFACSを試みた。細胞の接着性やheterogeneityの強い細胞集団であるためうまく単離することができなかった。そこで接着培養のまま、幹細胞マーカーによる免疫染色を行い幹細胞の検出を試みた。また培養の過程で、尿中落下細胞の培養を進めると培養皿に接着した細胞の上に立体的な細胞塊が形成される現象が認められた (図1)。これらはES細胞の細胞塊やMuse細胞のCluster様であり、この細胞塊 (以下、Cluster) に幹細胞が含まれる可能性を考えました。



図1. 細胞塊 (Cluster)

1) アルカリフォスファターゼ染色

未分化な細胞に発現し、幹細胞マーカーとして広く用いられているアルカリフォスファターゼ（ALP）でClusterを染色したところCluster上にALP陽性細胞を認めた（図2）。

2) SSEA-3染色

同様にClusterをMuse細胞のマーカーであるSSEA-3で染色したところ、Cluster上にSSEA-3陽性細胞を検出した（図3）。

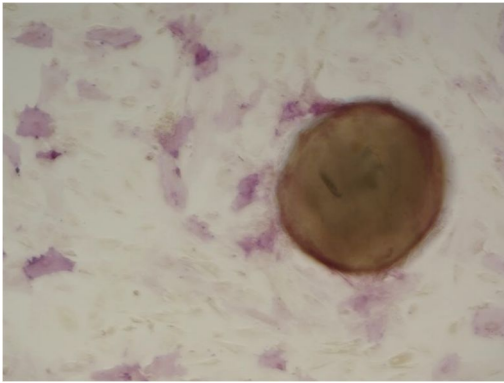


図2 ClusterのALP染色

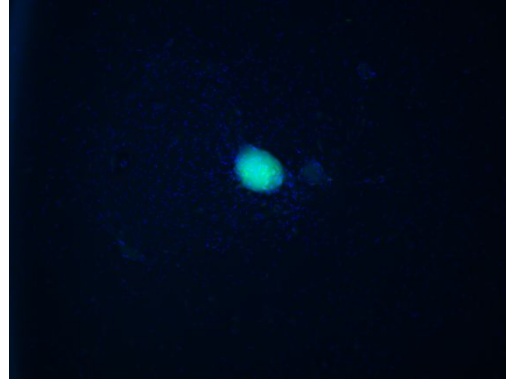


図3 ClusterのSSEA-3染色

上記結果から、SSEA-3を尿中落下細胞内の幹細胞のマーカーとして用いると考えた。Clusterを取りだし、Oct3/4等の幹細胞マーカーについてqPCRを施行したが、技術的問題で検出できなかった。

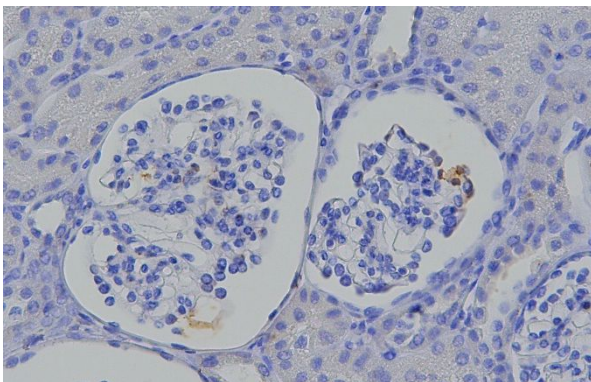


図4 . 腎臓病患者腎組織内のSSEA-3陽性細胞

について腎臓病患者の腎生検組織上でSSEA-3染色を行った。一部の患者検体上でSSEA-3陽性細胞を糸球体内に認めた（図4）。局在部位からは足細胞やメサンギウム細胞と関耐えられた。陽性細胞の検出の有無は、蛋白尿や血尿の程度と関連は見いだせなかった。

今回の研究期間で尿中落下細胞の中にSSEA-3陽性の幹細胞が含まれる可能性が示され、またSSEA-3陽性細胞は実際に腎臓病患者の糸球体内に検出された。上記の結果から、尿中落下細胞に多能性幹細胞が含まれ、腎組織の修復に関与しているという仮説の可能性が示されたが、検証が不十分である。今後、検体数を増やし仮説の検証を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Suzuki Norio, Iwamura Yuma, Kato Koichiro, Ishioka Hirotaka, Kōta Yusuke, Sato Koji, Uchida Nao, Kōda Nao, Sekine Hiroki, Tanaka Tetsuhiro, Kumagai Naonori, Nakai Taku	4. 巻 74
2. 論文標題 Crosstalk between oxygen signaling and iron metabolism in renal interstitial fibroblasts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 179 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.24-8	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sai Miyu, Uchida Nao.
2. 発表標題 The genetic background of persistent hypogammaglobulinemia after rituximab treatment in refractory nephrotic syndrome.
3. 学会等名 American Society of Nephrology. Kidney Week 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------