

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790816

 研究課題名（和文） 再生医療技術を応用した腎尿細管の再生・修復による急性腎不全の
新規治療薬の開発

研究課題名（英文） Therapeutic approach for kidney diseases by regenerative medicine

研究代表者

井上 紘輔（INOUE KOSUKE）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：00403907

研究成果の概要（和文）：現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で2012年にはついに30万人を越え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化も加わり、さらに透析療法導入患者の増加が予想される。慢性腎臓病での末期腎不全の増加に加え、急性腎不全の発症頻度は年々高まっており、全入院患者の5-10%、ICU入院患者の20%で発症するといわれている。この現況で急性腎不全の病態解明は重要な意味をもつ。研究代表者らは腎尿細管の分化に重要な意義を持つDelta-1, Notch-Hes systemについて検討を加え、このシステムが腎胎生期に発現することと、急性腎不全の回復期に近位尿細管で再発現することを学会誌あるいはアメリカ腎臓学会などで発表した。

研究成果の概要（英文）：The patients of ESKD (End Stage of Kidney Disease) increase up to 300,000 in Japan. However the therapeutic methods are still limited. We tried novel regenerative methodology to develop new therapies to kidney diseases. Our result shows that Delta/Notch/Hes pathway is activated after ischemic acute kidney injury and plays a role in the proliferation of renal tubules. To regulate embryonic genes could provide a renewable source of cells for use in regenerative therapy for renal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：腎臓・再生医学・急性腎不全・尿細管障害

1. 研究開始当初の背景

現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で27万人を超え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化も加わり、さらに透析療法導入患者の増加が予想され

る。透析医療費だけで、一兆円を超え社会的な医療費の面からも、これらの疾患に対する抜本的対策が急務である。腎疾患に対する新規の再生医療を考える上で、腎組織の再生が理論上最適ではあるが、その臓器全体の

再生は極めて困難と考えられている。進行性腎障害の特徴である荒廃してゆく腎組織を回復させるためには、腎細胞の再生をはかることにより、腎組織と腎機能の回復を期待することができる。特に急性腎不全は、患者の高齢化などの要因も加わり、発症頻度は年々高まっており、全入院患者の 5-10%、ICU 入院患者の 20%で発症するとされる。研究では、腎ネフロンの中で、その機能の重要性が注目されている尿細管細胞の再生を検討することにより、腎機能の回復を目標とする。

2. 研究の目的

本研究では、腎ネフロンの中で、その機能の重要性が注目されている尿細管細胞の再生を検討することにより、腎機能の回復を目標とする。尿細管細胞の再生に関しては、研究代表者の教室の寺田を含めて3つの方向性の研究がなされている。一つは内因性の腎幹細胞の同定、第二には、腎再生因子（遺伝子）の研究、そして第三には ES 細胞を用いた腎尿細管細胞への分化誘導である。これらの研究は密接に連係しており、平成 12 年のこの分野での科学研究費獲得以来、研究代表者の教室の寺田らのグループは多くの研究成果をあげているが、いまだ臨床の場へのフィードバックには至っていない。今回の申請でこれらの研究を更に総合的に突きすすめ、臨床へのフィードバックも視野に入れながら、尿細管の再生と腎機能の回復を目的としたい。

3. 研究の方法

内因性の腎尿細管細胞の同定のため、腎尿細管幹細胞のマーカーを胎生期の遺伝子を中心に検索を行ない、急性腎不全の回復期あるいは、胎生期での発現を検討する。それと平行して、Wnt4 の遺伝子座に蛍光タンパク質 GFP を導入したマウスを作製してゆく。具体的には、マウス Wnt4 遺伝子の上流域 16kb を単離し、GFP 遺伝子に結合させ、マウス ES 細胞に遺伝子導入をし、トランスジェニックマウスを作成し、胎生後期あるいは、出生後に急性虚血等の回復期に、Wnt4 の発現する細胞を検出し、単離することができる。現在幹細胞のマーカーといわれている slow cycling cell の特徴に加え、新規のマーカーを導入した遺伝子改変マウスの導入により、内因性の腎尿細管細胞の同定を目指す。

再生医学での柱の一つである増殖因子を用いた腎再生の試みは、in vitro, in vivo の両面において動物実験レベルでは多くの研究があるが、臨床的に有意な確立をできたものはない。尿細管細胞が、再生し増殖、修

復できる微小環境(Microenvironment)あるいは再生の場 (Niche) の解明が重要であると考えられる。そこで平成 19 年度に再生に適切な微小環境あるいはNiche の解明を行った。平成 20 年以降には、尿細管細胞の再生に重要な新規の遺伝子を、アデノウイルスなどを用いた局所への遺伝子導入により、再生に最適な Niche を作り出す事により、新規の治療法につながる検討をした。

4. 研究成果

研究代表者らの教室の寺田は、急性腎不全の回復期に腎胎生期に発現する遺伝子、Wnt4 および Ets1 が尿細管細胞に再発現し、胎生期の幹細胞的な性格をもつ、増殖能が高い細胞が近位尿細管に発現することを世界に先駆けて見だし、尿細管の『dedifferentiation』という概念を提唱した。

研究代表者らの教室の寺田は腎胎生期の Key Molecule の候補として、Wnt4, Ets1 を遺伝子導入した場合、尿細管細胞が高い増殖能を呈することを報告したが、腎臓の発生、再生の Key Molecule の絞り込みができれば、その遺伝子を腎尿細管に遺伝子導入して再生に最適な場 (Niche) を作り出し、in vivo での尿細管の再生に発展できる可能性がある。研究代表者らの教室の寺田は腎尿細管分化に重要な意義を持つ Delta-1, Notch-Hes system について検討を加えた。このシステムは神経系と血液系で発生、分化に重要な役割を持つことが知られているが、研究代表者らの教室の寺田は、これらの Delta-1, Notch-Hes が、腎胎生期に発現することと、急性腎不全の回復期に近位尿細管で再発現することを報告した。尿細管細胞が、再生し増殖、修復できる微小環境 (Microenvironment) あるいは再生の場 (Niche) を作り出す事により、新規の治療法につながる可能性があり、非常に独創的な研究結果である。

さらに急性腎障害に関わるマクロオートファジーに関連した蛋白質の LC3 等の動向を腎疾患モデル動物や培養細胞系を用い、Western blot や組織学的検索を通じて検討した(雑誌論文⑦)。LC3 蛋白に GFP を融合したトランスジェニックマウスや LC3 プロモーターに GFP を結合したプラスミドを安定導入した、腎尿細管細胞を樹立し、これらの実験系を用いて in vivo 及び in vitro での慢性腎障害モデルやネフローゼモデルマウスでのマクロオートファジー及びシヤペロン介在性オートファジーの働きを検討した。

また研究代表者は、既に PI3Kgamma が欠損した PI3K-Akt pathway が抑制されたノックアウトマウスと LC3 蛋白に GFP を融合したト

ランスジェニックマウスを交配させる事より、Akt pathway の抑制がある場合とない場合で、慢性腎障害モデルあるいは、急性腎障害モデルでのオートファジーの関与を GFP-LC3 を用いて検出できる in vivo のシステムを作成し、下記の論文で発表した（雑誌論文⑦）。

現在、末期腎不全により、透析療法に至っている患者数は、全国で 30 万人を超え、今後、糖尿病性腎症の増加、高齢化も加わり、さらに透析療法導入患者の増加が予想される。透析医療費だけで、一兆円を超え社会医学的な医療費の面からも、これらの疾患に対する抜本的対策が急務である。また急性腎不全は、患者の高齢化などの要因も加わり、発症頻度は年々高まっており、全入院患者の 5-10%、ICU 入院患者の 20%で発症するといわれている。本研究の成果を学会誌あるいは日本腎臓学会などで発表し、腎疾患の新規の治療法の可能性、成果を社会に発信した。

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 9 件）

- ① Terada Y, Ueda S, Hamada, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T. Aldosterone Stimulates nuclear factor-kappa B activity and transcription of intercellular adhesion molecule-1 and connective tissue growth factor in rat mesangial cells via serum-and glucocorticoid-inducible protein kinase-1, . Clin Exp Nephrol(2012) 16:81-88, 2012. 査読あり
- ② Ogata K, Shimamura Y, Hamada K, Hisa M, Bun M, Okada N, Inoue K, Taniguchi Y, Ishinara M, Kagawa T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y. Upregulation of HNF1 during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration. Am J Physiol Renal Physiol 2012 Jul 3. 査読有り
- ③ Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Kagawa T, Inoue M, Fujimoto S, Ikebe M, Yuasa K, Yamanaka S, Sugiura T, Terada Y. Serum levels of soluble secreted α -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis.

Clin Exp Nephrol (2012) 16:722-729 査読有り

- ④ Takao T, Horino T, Kagawa T, Matsumoto R, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Taguchi T, Morita T, Terada Y. Possible involvement of intracellular angiotensin II receptor in high-glucose-induced damage in renal proximal tubular cells. Journal of Nephrology 24(3): 218-224, 2011. 査読有り
- ⑤ 井上紘輔, 緒方巧二, 島村芳子, 香川 亨, 寺田典生: 急性腎障害における尿中バイオマーカーの現状. 腎と透析 vol.70(3): 339-341, 2011. 査読無し
- ⑥ 井上紘輔, 島村芳子, 緒方巧二, 石原正行, 香川 亨, 寺田典生. A K I の新規治療法の開発. 腎臓 vol.34(2): 103-106, 2011. 査読無し
- ⑦ Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, Ogata K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T, Morita T, Sasaki S, Mizushima N, Terada Y. : Cisplatin-induced macroautophagy occurs prior to apoptosis in proximal tubules in vivo. Clin Exp Nephrol. 査読有, 14: 112-122, 2010.
- ⑧ 井上紘輔, 寺田典生: 急性腎不全と慢性腎不全の鑑別. 総合臨床 第59巻第6号 1350-1353, 2010. 査読なし
- ⑨ 井上紘輔, 緒方巧二, 島村芳子, 寺田典生: 薬物によるCKD. 腎と透析vol169増刊号「AKIとCKDのすべて」:p201-203, 2010. 査読なし

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 井上紘輔, 香川 亨, 寺田典生: 腎臓病におけるオートファジーの意義. 第 55 回 日本腎臓学会学術総会ワークショップ. 6/3, 2012. 横浜
- ② Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Urushido M, Okada N, Shimamura Y, Hamada K, Kagawa T, Takao T, Terada Y: Small Heat Shock Protein beta-1 (HSPB1 or HSP27) Is Up-Regulated and Regulates Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Cells in the Acute Kidney Injury In Vitro and In Vivo. KIDNEY WEEK 2012. Oct30-Nov4, 2012 San Diego, USA
- ③ Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, Ogata, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T, Morita T, Ikeda Y, Sasaki S, and Terada Y : Cisplatin-Induced Macroautophagy Occurs Prior to Apoptosis in Proximal Tubules In Vivo. The American society of Nephrology,

Renal week , October 27 -31, 2009. San
Diego, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 紘輔 (INOUE KOSUKE)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号 : 00403907