

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30日現在

機関番号：16401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790793
 研究課題名（和文） 再生医学による急性腎障害での尿細管再生への新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of the new therapy for renal tubule regeneration by the acute kidney injury by regenerative medicine
 研究代表者
 緒方 巧二（OGATA KOJI）
 高知大学・医学部附属病院・特任助教
 研究者番号：30527586

研究成果の概要（和文）：虚血再灌流後の急性腎障害時における尿細管細胞再生に、腎や肝臓に発現する転写因子である HNF-1β が関与している可能性が考えられた。そのため我々は近位尿細管細胞を用いた様々な研究を行い、その結果を American Journal of Physiology(in press)2012 に論文として報告し、また国際学会でも発表を行った。

研究成果の概要（英文）：A possibility that HNF-1beta which is a transcription factor revealed to a kidney or liver was participating in the renal tubular cell reproduction at the time of the acute kidney injury after ischemia re-perfusion was able to be considered. Therefore, we did various researches which used the proximal tubular cell, and reported the result to American Journal of Physiology(303:F689-F699, 2012) as a thesis, and announced also at the international society.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：再生医療、尿中バイオマーカー、尿細管細胞

1. 研究開始当初の背景

透析療法に至っている患者数は、2012年に全国で30万人を超え抜本的対策が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、腎ネフロンの中で、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典生を含めて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iPS(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、研究代表者の教室の寺田らは多くの研究成果をあげているが、いまだ臨床へのフィ

ードバックには至っていない。今回の研究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ている。

3. 研究の方法

内因性の腎尿細管細胞の同定は、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した。また、それと平行して、Wnt4 の遺伝子座に蛍光タンパク質 GFP を導入したマウスの作製をおこなった。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、単離した。さらに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した。そして、腎幹細胞を同定した後、どのような条件や刺激で幹細胞が分裂、増殖し、PCNA 陽性になってゆくのかを検討した。さらに、通常の状態では、増殖をしていない幹細胞が Ets1, Wnt4, Delta-1 などの遺伝子発現をおこし、強い増殖性を持つに至るメカニズムを解明することとした。幹細胞を分離し、Ets1, Wnt4, Delta-1 などの遺伝子発現を ON にするプロモーターに結合する転写因子を DNA array 法、あるいは Yeast-two-hybrid システムを用いて検討し、また Wnt4 遺伝子の上流域に GFP 遺伝子に結合させたトランスジェニックマウスを作成した後、胎生期あるいは急性腎不全回復期の GFP 発現細胞の検出をおこなった。この結果、GFP がマーカーとして使用できれば、FACS 等を用いた腎幹細胞の同定にも極めて有力であると考えられた。

腎再生因子（遺伝子）を用いた腎再生の研究では、尿細管細胞が、再生し増殖、修復できる微小環境あるいは再生の場（Niche）の解明が重要であると考え、まず再生に適切な微小環境あるいは Niche の解明をおこなった。次に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遺伝子導入し再生に最適な Niche を作り出す事により、新規の治療法につながる検討をおこなった。尿細管が再生する時の微小環境（Microenvironment）あるいは Niche が解明した場合、腎幹細胞を HGF, EGF, LIF, Wnt4 などの添加や培養条件を検討して、各ネフロンセグメントごとの尿細管への分化誘導をはかった。また、上記の微小環境（Microenvironment）の解析が十分でない場

合は、マウス胎生腎組織を腎幹細胞の co-culture の系を用いて検討した。この培養系について技術的に問題はなかった（Yokoo T., Pro Natl Aca Sci USA 2005）。

iPS (ES) 細胞から腎尿細管細胞への分化、誘導については、研究代表者のグループが世界に先駆けて報告している（BBRC, 2005）。3次元培養で尿細管様の構造物が認められ、かつ、その管腔様構造は AQP2 を発現していた。In vivo の系では、teratoma の形成がおこるため、本研究では、研究代表者の所属教室の研究実績をふまえて AQP2 遺伝子のプロモーターに GFP などのマーカー遺伝子をつなぎ iPS (ES) 細胞に遺伝子導入して、腎細胞に分化する EB 細胞のみを選択し、teratoma を形成しない腎尿細管細胞への分化をはかった。マウス iPS 細胞は理研細胞バンクより購入した。申請者らは ES 細胞の実験の経験があり、技術的に問題はなく実験をおこなうことができた。

4. 研究成果

研究代表者の所属する研究室は腎における情報伝達系の研究を平成 13 年以降継続して行い、世界に先駆けた実績をあげており、また本研究に密接に関連したアポトーシスに関係する科学研究費も平成 15 年以来拝受し、多くの実績を上げている。特に、Akt pathway に関する尿細管細胞の再生分化誘導は世界にさきがけての実績である。また、急性腎障害時における尿細管細胞再生に HNF-1 β が関与している可能性について、近位尿細管細胞を用いた研究を行い、American Journal of Physiology (303:F689-F699, 2012)に論文として報告した。

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 4 件）

- ① Ogata K, Shimamura Y, Hamada K, Hisa M, Bun M, Okada N, Inoue K, Taniguchi Y, Ishihara M, Kagawa T, Horino T, Fujimoto S, Terada Y : Upregulation of HNF-1 β during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration. American Journal of Physiology 303: F689-F699, 2012 (IF 3.682)
- ② Terada Y, Ueda S, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T : Aldosterone Stimulates NF-kB Activity and Transcription of ICAM-1 and CTGF

in Rat Mesangial Cells via SGK(Serum and Glucocorticoid-inducible Protein Kinase)-1. Clinical and Experimental Nephrology 16:81-88, 2012(IF 1.369)

- ③ 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(03): 218-224, 2011. (IF 1.654)
- ④ Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, Ogata K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Morita T, Mizushima N, Terada Y : Cisplatin-induced macroautophagy occurs prior to apoptosis in proximal tubules in vivo . Clinical and experimental Nephrology 14 : 112-122. 2010. (IF 1.369)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 緒方巧二, 石原正行, 久雅之, 文勝徹, 島村芳子, 濱田佳寿, 平野世紀, 井上紘輔, 香川 亨, 寺田典生 : BNIP3 は急性腎障害において誘導され近位尿細管細胞の Autophagy と Mitophagy を調整する. 第 55 回日本腎臓学会学術総会. 6 月 1-3 日, 2012. 横浜.
- ② 緒方巧二, 江間宏樹, 島村芳子, 井上紘輔, 高田浩史, 次田誠, 香川 亨, 寺田典生 : たこつぼ型心筋症を合併した強皮症腎クリーゼの一例. 第 42 回日本腎臓学会西部学術大会. 10 月 26-27 日, 2012. 宜野湾.
- ③ Ogata K, Shimamura Y, Inoue K, Kagawa T, Nishiyama A, Terada Y : Activated Prorenin and (Pro)renin Receptor Are Up-Regulated in Glomeruli of Diabetic Nephropathy and IgA Nephropathy Using Renal Biopsy Specimen. ASN(American Society of Nephrology) Kidney week 2011. November 8-13, 2011. Philadelphia USA.
- ④ 緒方巧二, 濱田佳寿, 江間宏樹, 島村芳子, 井上紘輔, 谷口義典, 香川 亨, 寺田典生 : HNF-1 β , SOCS3, STAT3 の情報伝達系は急性腎障害での尿細管再生と形成に重要な役割を果たす. 第 54 回日本腎臓学会学術総会. 6 月 15-17 日, 2011. 横浜.
- ⑤ Ogata K, Ueda S, Shimamura Y, Inoue K, Taniguchi Y, Ishihara M, Kagawa T, Horino T, Takao T, Terada Y : Up-Regulated HNF-1 β during Experimental Acute Kidney Injury

Plays a Crucial Role in Renal Tubular Regeneration. American Society of Nephrology 43th Annual Meeting and Scientific Exposition. November 16-21, 2010. Denver in USA.

- ⑥ 緒方巧二, 島村芳子, 井上紘輔, 谷口義典, 香川 亨, 堀野太郎, 高尾俊弘, 森田達仁, 寺田典生 : 「急性腎障害での尿細管再生・増殖における HNF-1 β , SOCS3, STAT3 系の役割」. 第 53 回日本腎臓学会学術総会. 6 月 16-18 日, 2010. 神戸.
- ⑦ 緒方巧二, 堀野太郎, 田口崇文, 島村芳子, 谷口義典, 井上紘輔, 香川 亨, 森田達仁, 寺田典生 : 「MPO-ANCA 関連血管炎による肥厚生硬膜炎の一例」. 第 54 回日本リウマチ学会総会学術集会. 4 月 22-25 日, 2010. 神戸.
- ⑧ Ogata K, Shimamura Y, Inoue K, Taniguchi Y, Kagawa T, Horino T, Takao T, Morita T, Terada Y : HNF-1 β , SOCS3, and STAT3 are regulated during experimental acute kidney injury in vivo and affect renal tubular proliferation in vitro. ISN NEXUS Symposium. April 15-18, 2010. Kyoto.

[図書] (計 6 件)

- ① 緒方巧二, 松本竜季, 濱田佳寿, 谷口義典, 寺田典生 : AKI の病態, 管理と予後. 医薬ジャーナル 11 月号 48(11):164-166, 2012.
- ② 緒方巧二, 島村芳子, 井上紘輔, 香川 亨, 寺田典生 : 管内増殖性糸球体腎炎. 別冊 日本臨牀社 腎臓症候群 No17:60-61, 2012
- ③ 緒方巧二, 寺田典生 : AKI の予後と再生療法. AKI 急性腎障害のすべて 基礎から臨床までの最新知見, Part I 臨床総論 86-92. 南江堂 2012.
- ④ 緒方巧二, 濱田佳寿, 上田訓子, 島村芳子, 井上紘輔, 谷口義典, 香川 亨, 寺田典生 : 巣状糸球体硬化症 一病因から治療まで. 臨牀と研究 第 88 巻第 4 号 : 491-496, 2011.
- ⑤ 緒方巧二, 島村芳子, 井上紘輔, 香川 亨, 寺田典生 : 炭酸脱水酵素阻害薬、浸透圧利尿薬、バソプレッシン拮抗薬 (臨床医が知っておくべきこと、将来性を含めて). Modern Physician Vol.31 (6) : 731-733, 2011.
- ⑥ 緒方巧二, 上田訓子, 島村芳子, 井上紘輔, 香川 亨, 寺田典生 : 多発性骨髄腫と腎障害. 総合臨牀 vol.60 (6) : 1421-1424, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 巧二 (OGATA KOJI)

高知大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30527586