

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591181

研究課題名(和文) 血管内皮由来因子による腎幹細胞数の制御

研究課題名(英文) Regulation of Renal Stem Cell Number by Endothelial Cell-derived Factors

研究代表者

前嶋 明人(MAESHIMA, AKITO)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70431707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腎幹細胞の増殖・分化における血管内皮の役割を検討した。BrdUラベリング法を用いて、分裂の遅い腎幹細胞をBrdU標識して解析した結果、加齢に伴い腎幹細胞数および腎間質周囲の毛細血管網が減少していた。分離したBrdU陽性腎幹細胞をHUVECと共培養すると、その数は有意に増加した。ヒト培養近位尿細管細胞を3次元ゲル培養し、HGFを添加すると微絨毛を有する管腔構造が誘導された。さらにHUVECと共培養すると、管腔形成が有意に促進され、複数のチロシンキナーゼ型受容体のリン酸化が確認された。以上の結果から、血管内皮由来因子の中には腎幹細胞活性化因子が存在することが強く示唆される。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of endothelial cell-derived factors in growth and differentiation of renal stem cell. Using BrdU labeling method, renal stem cells could be detected as BrdU-positive cells. The number of renal stem cells as well as the interstitial peritubular capillary area decreased with aging. When isolated renal stem cells were co-cultured with HUVEC, the number of renal stem cells significantly increased. HGF induced tube formation in human RPTEC. When RPTEC were co-cultured with HUVEC, tube formation was significantly enhanced. Multiple receptor tyrosine kinases were phosphorylated in RPTEC during tube formation. Collectively, these data suggest the presence of stem cell activators in the endothelial cell-derived factors.

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：腎幹細胞 尿細管再生 血管内皮由来因子

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備えている。臨床的には急性腎不全がその一例である。障害後一過性に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と考えられている。しかし、尿細管再生を担う主要な細胞、いわゆる再生細胞の起源は明らかになっていない。そこで研究代表者は組織幹細胞に共通した「細胞の分裂速度が非常に遅い」という性質に注目した。これは細胞分裂の際に起こりうる DNA 変異を最小限にするための仕組みと考えられている。このような性質を持つ細胞、いわゆる Slow-Cycling 細胞は各臓器で同定されていたが、腎臓では我々が初めてその同定に成功した (J Am Soc Nephrol 14: 3138-3146, 2003)。この細胞はラット成体腎の尿細管に存在すること、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が明らかになった。この細胞を選択的に分離し In vitro で解析した結果、腎臓を構成する様々な細胞に分化する、つまり多分化能を有することも明らかになっている (J Am Soc Nephrol 17:188-98, 2006)。したがって、この腎幹細胞の増殖・分化様式、その活性化機構の解明することは、腎再生促進因子の探索や治療薬の開発など腎再生医療のさらなる発展に大きく寄与するものと思われる。

2. 研究の目的

本研究では、腎間質に存在する血管内皮が腎幹細胞の増殖・分化に与える影響を調べる。BrdU ラベリング法を用いて腎幹細胞を BrdU 標識する。その後尿細管を分離してゲル内で 3 次元培養し、血管内皮細胞との共培養による腎幹細胞数の変化を調べる。さらに血管内皮細胞が分泌する因子をスクリーニングし、腎幹細胞を増やす因子を探索する。候補因子が絞られたら、最近我々が確立した「障害後の尿細管再生過程を再現する In vitro tubulogenesis model」における管腔形成能を指標にして、活性化の有無を判定する。最終的には、この活性化因子の腎臓における局在や腎再生促進効果の有無を腎障害モデルで検討する。

3. 研究の方法

(1)腎幹細胞数に対する加齢の影響

組織幹細胞の数は加齢とともに変化すると考えられており、組織の老化現象との関連も示唆されている。そこでまず、我々が同定した腎幹細胞数と加齢の関連について検討する。様々な週齢 (7 週、7 ヶ月、12 ヶ月) のラットに対して、浸透圧ポンプを用いて BrdU を 1 週間ラベルし、その後 2 週間の観察期間において腎臓を摘出する。ホルマリン固定後、パラ

フィン切片を作成し BrdU 染色を行う。この方法により理論上、増殖の活発な細胞は観察期間に分裂を繰り返し、取り込まれた BrdU は希釈され、分裂の遅い Slow-cycling な腎幹細胞のみが BrdU 陽性細胞として検出可能となる。

(2) 加齢に伴う腎間質毛細血管網の減少
組織幹細胞の増殖・分化は、その周囲の環境 (Niche) により規定されることが最近分かってきた。したがって、腎幹細胞の増殖・分化もその周囲の間質、特に毛細血管網により規定されている可能性が高い。そこで様々な週齢のラット腎間質毛細血管網の面積を免疫染色により比較する。血管内皮マーカー (RECA-1) を用いて間質の血管内皮を染色し、その面積を画像解析ソフト (Image J) を用いて定量化する。他の血管内皮マーカーである PECAM-1、Tie-2、Factor VIII などについても同様に検討する。さらに血管内皮と腎幹細胞の局在を血管内皮マーカーと BrdU の 2 重染色により検討し、それぞれの位置関係に何らかの法則が見出せるか検討する。

(3) 腎幹細胞の増殖・分化における血管内皮細胞の関与

次に腎幹細胞の増殖・分化に対する血管内皮細胞の影響を調べる。上記 BrdU ラベリング法でラット腎幹細胞を BrdU 標識し、尿細管を分離する。Transwell フィルターを用いて、分離した尿細管を 3 次元ゲル培養し、さらにヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) と共培養する。一定期間培養後、ホルマリン固定し、パラフィン切片を作成。BrdU 陽性腎幹細胞数を比較する。

(4) 腎幹細胞活性化因子のスクリーニング

最近我々が開発した尿細管再生の In vitro モデルを利用して、3 次元尿細管構造を効率よく誘導する因子やその情報伝達経路を明らかにする。具体的には、ヒト培養近位尿細管細胞 (RPTEC) を基底膜構成成分であるマトリゲルと I 型コラーゲンを混合したもので 3 次元培養し、In vivo に類似した環境を作る。ここに様々な既知の腎再生因子を添加し、尿細管構造の有無を調べた結果、HGF 刺激により極性を持った Microvilli を有する尿細管様管腔構造が誘導されることを確認している。これを HUVEC と共培養し、血管内皮由来因子の管腔形成能に対する影響を調べる。既知の血管内皮由来因子 (VEGF、PDGF、bFGF など) の作用を検討し、さらに未知の腎再生因子を探索するため、Protein array を用いて検討する。

4. 研究成果

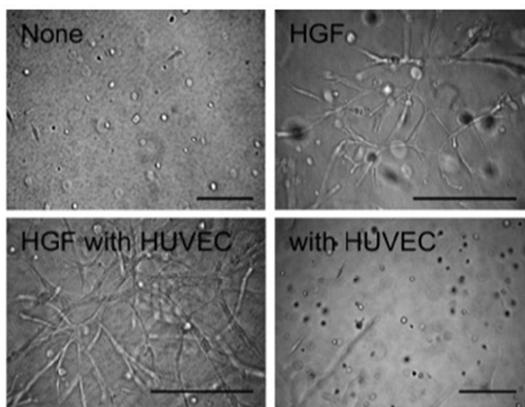
(1) 上記検討の結果、まず加齢に伴い腎幹細胞数は減少することが明らかになった。7 週齢ラットと比較し、20 週齢ラットでは有意に腎幹細胞数が減少していた。

(2) 加齢に伴い腎間質周囲の毛細血管網が減少することも判明した。血管内皮マーカー染

色により毛細血管網の面積を比較した結果、加齢とともにその面積が減少することが判明した。

(3) 上記 BrdU ラベリング法でラット腎幹細胞を BrdU 標識し尿細管を分離後、HUVEC と共培養した結果、BrdU 陽性細胞数は HUVEC 存在下で明らかに増加していた。以上の結果は、血管内皮由来因子の中に腎幹細胞活性化因子が存在することを示唆していると考えられる。

(4) 最近我々が開発した「尿細管再生 In vitro モデル」を利用して3次元尿細管構造を効率よく誘導する因子およびその情報伝達経路を探索した。RPTEC を基底膜構成成分であるマトリゲル(IV型コラーゲン、ラミニン)とI型コラーゲンを混合(1:1)したもので3次元培養し In vivo に類似した環境を作成した。この培養系に強力な腎再生促進因子である HGF を添加すると、極性を形成し管腔側に微絨毛を有する管腔構造が誘導された。HUVEC と共培養したところ、管腔形成が有意に促進されることが判明した(図1)。既知の血管内皮由来因子(VEGF, PDGF, basic FGF など)を添加しても HUVEC の管腔形成促進効果は再現できなかった。



(図1)

さらに管腔構造形成過程で活性化している受容体を探索するため、レセプターチロシンキナーゼ型受容体のリン酸化をプロテインアレイを用いてスクリーニングした。その結果、HGF 受容体以外にもリン酸化されている受容体が複数同定された。現在、それぞれの活性化受容体が虚血・再灌流障害急性腎不全モデルの腎組織において活性化しているかを確認し、尿細管再生における役割を解析している。

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 21 件)

Mishima K, Maeshima A, Miya M, Sakurai N, Ikeuchi H, Hiromura K, Nojima Y. Involvement of N-type Ca (2+) channels

in the fibrotic process of the kidney in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 304(6): F665-73, 2013 (査読あり)

Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. SIRP-alpha signaling regulates podocyte structure and function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305(6): F861-70, 2013 (査読あり)

Takahashi S, Hiromura K, Tsukida M, Ohishi Y, Hamatani H, Sakurai N, Sakairi T, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Kuroiwa T, Yokoo H, Aoki T, Nagata M, Nojima Y. Nephrotic Syndrome Caused by Immune-Mediated Acquired LCAT Deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 24: 1305-1312, 2013 (査読あり)

前嶋明人: ワンポイントアドバイス「蛋白尿・血尿 -腎臓専門医に紹介するタイミング-」 *Medical Practice* 30巻6号1098, 2013、査読なし

前嶋明人、野島美久: 血液疾患と腎障害内科学(第10版) 1475-1476, 2013、査読なし

前嶋明人、野島美久: 溶血性尿毒症症候群 内科学(第10版) 1476-1477, 2013、査読なし

前嶋明人、野島美久: 早期診断と治療「全身性エリテマトーデス」 *内科* 112巻1号 33-37, 2013、査読なし

Maeshima A, Nakasatomi M, Henmi D, Yamashita S, Kaneko Y, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y. Efficacy of tocilizumab, a humanized neutralizing antibody against interleukin-6 receptor, in progressive renal injury associated with Castleman's disease. *CEN Case Reports* 1(1): 7-11, 2012 (査読あり)

Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y. Interleukin-1 measurement in stimulated whole blood cultures is useful to predict response to anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51(9): 1639-43, 2012 (査読あり)

Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, Matsumoto T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51(9): 1571-9, 2012 (査読あり)

Umemoto A, Ikeuchi H, Hiromura K, Hamatani H, Sakurai N, Sakairi T, Matsumoto T, Maeshima A, Kuroiwa T,

Nojima Y. Hydronephrosis caused by a relapse of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Mod Rheumatol.* 22(4):616-20, 2012 (査読あり)

Miya M, Maeshima A, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y. Age-related decline in label-retaining tubular cells: implication for reduced regenerative capacity after injury in the aging kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 302(6): F694-702, 2012 (査読あり)

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.* 301(2): F387-95, 2012 (査読あり)

前嶋明人: 実地医家のための臨床検査のすすめがた・評価のしかた「腎・泌尿器疾患 I. 症候から診断へ」*Medical Practice* 2012年臨時増刊号, 78-84, 2012, 査読なし

前嶋明人、野島美久: 各種病態にみられる腎障害「血栓性血小板減少性紫斑病」別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ No.18 腎臓症候群(第2版) 405-408, 2012, 査読なし

前嶋明人、野島美久: 腎・透析診療最新ガイドライン「アミロイド腎」41-44, 2012, 査読なし

前嶋明人、野島美久: ループス腎炎の治療と予後 *リウマチ科* 47巻5号 481-487, 2012, 査読なし

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.* 21(3):282-9, 2011 (査読あり)

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(1):76-86, 2011 (査読あり)

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(1):91-101, 2011 (査読あり)

② 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(1):63-72, 2011 (査読あり)

[学会発表](計 17 件)

Nakasatomi M, Maeshima A, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Quantitative evaluation of epithelial-mesenchymal transition during renal fibrosis. *World Congress of Nephrology 2013*, 2013.5.31-6.3, Hongkong

Kayakabe K, Ikeuchi H, Hiromura K, Kadiombo AT, Sakurai N, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Nojima Y: RISK FACTORS FOR MORTALITY IN PATIENTS WITH LUPUS NEPHRITIS: A LONG-TERM STUDY AT A SINGLE CENTER IN JAPAN. *Annual European Congress of Rheumatology 2013*, 2013.6.12-15, Madrid

前嶋明人: (招請講演) 腎線維化におけるN型Caチャンネルの役割 第4回交感神経と高血圧研究会、2013.6.13、群馬

前嶋明人: (招請講演) 腎線維化におけるN型Caチャンネルの役割 群馬N型カルシウムチャンネル研究会、2013.9.10、群馬

前嶋明人: (招請講演) 腎線維化におけるN型カルシウムチャンネルの役割 群馬CKDセミナー、2013.11.21、群馬

Ikeuchi, H, Hiromura K, Takahash S, Mishima K, Sakurai N, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Nojima Y: Mixed Lesion of Membranous (Class V) and Proliferative (Class III/IV) Lupus Nephritis Predicts Poor Renal Prognosis. *45th American Society of Nephrology*, 2012.10.31-11.5, San Diego, USA

Ikeuchi, H, Hiromura K, Takahash S, Mishima K, Sakurai N, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Nojima Y: Efficacy and Safety of Multitarget Therapy by Combination with Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil and Steroid in Patients with Active Lupus Nephritis. *45th American Society of Nephrology*, 2012.10.31-11.5, San Diego, USA

Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahash S, Maeshima A, Ohse T, Pippin JW, Shankland SJ, Nojima Y: Expression of a Novel Stress-Inducible Protein, Sestrin 2, in Rat Glomerular Parietal Epithelial Cells (PECs). *45th American Society of Nephrology*, 2012.10.31-11.5, San Diego, USA

Maeshima A, Miya M, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Majority of Proximal Tubular Cells in the Outer Medulla are Slow-cycling and Equally Contribute to Tubular Regeneration after Renal Ischemia. 10th International Society of Stem Cell Research 2012, 2012.6.13-16, Yokohama

前嶋明人: (招請講演) 腎尿細管の修復・再生メカニズム 第16回腎臓病若手研究会、2012.9.8, 東京

前嶋明人: (招請講演) 腎再生医療の可能性と方向性 第11回腎臓病・再生研究会、2012.7.13, 神戸

前嶋明人: (招請講演) 腎再生医学に関する最近の知見 第16回埼玉腎臓病若手研究会、2012.5.19, さいたま

Takahashi S, Hiromura K, Tsukida M, Ohishi Y, Hamatani H, Sakurai N, Sakairi T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kuroiwa T, Nagata M, Nojima Y: A Novel Case of Nephrotic Syndrome Caused by Immune-Mediated Severe LCAT Deficiency. 44th American Society of Nephrology, 2011.11.10-13, Philadelphia, USA

Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahashi S, Ikeuchi H, Maeshima A, Nojima Y: Transforming Growth Factor (TGF)-1 Induced DNA Methylation of Wilms' Tumor Suppressor Gene (WT1) Promoter in Human Podocytes. 44th American Society of Nephrology, 2011.11.10-13, Philadelphia, USA

Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Anastasie KT, Sakairi T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y: INTERLEUKIN-6 PROMOTES PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS BY MODULATING ANGIOPOIETIN EXPRESSION IN RHEUMATOID ARTHRITIS. Annual European Congress of Rheumatology 2011, 2011.5.25-28, London, UK

Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Anastasie KT, Sakairi T, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y: Pro-Inflammatory Cytokine Measurement in Whole Blood Cultures Stimulated with Lipopolysaccharide Predicts Treatment Outcomes of Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Biologics. 77th American College of Rheumatology, 2011.11.5-9, Chicago, USA

前嶋明人: (ワークショップ) 腎臓の線

維化と再生を担う細胞群を探る「腎尿細管の修復・再生メカニズム」第54回日本腎臓学会総会、2011.6.15-17, 横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前嶋 明人 (MAESHIMA AKITO)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70431707

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: