

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461212

研究課題名(和文)腎幹細胞の自己複製能と老化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of self-replication and aging in renal stem cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDoxycycline(DOX)誘導Histone 2B-GFPマウスを用いて腎幹細胞をGFP標識し、その増殖・分化様式を解析した。その結果、BrdUラベリング法よりも高感度にGFP票性腎幹細胞を検出することが可能であった。また、急性腎不全の回復過程において、このGFP陽性腎幹細胞は尿細管再生に大きく貢献する細胞集団であることが判明した。蛍光強度の不均衡分配から、腎幹細胞は非対称的に分裂することが示唆された。また、加齢マウスでは有意に腎幹細胞数が減少していた。以上の結果から、腎幹細胞の活性化は腎再生医療において有力なアプローチと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using doxycycline (DOX)-induced Histone 2B-GFP mice, we here investigated the role of GFP-labeled renal stem cells in regeneration processes of the kidneys after injury. We could detect GFP-labeled renal stem cells in the kidneys of these mice after a short DOX pulse and a long chase period. GFP-labeled renal stem cells actively contributed to the tubular regeneration of the kidneys after injury. In this process, renal stem cells showed uneven cell division, which is one of the characteristics of adult tissue stem cells. In aging mice, the number of GFP-labeled renal stem cells significantly decreased compared to that in young mice. These data suggest that the activation of renal stem cells is an effective and promising strategy to enhance the regeneration process of the kidney after a variety of insults.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎幹細胞 尿細管再生

1. 研究開始当初の背景

腎臓は生体内の恒常性を維持する上で必要な臓器であり、その異常は全身に影響する。間質の線維化や糸球体硬化が進行し一旦腎不全に陥ると、その進行を抑える有効な手段は今のところない。

この問題を克服するために、申請者はこれまで「腎臓の再生機序」特に腎幹細胞に関して多角的に研究を行ってきた。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。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 et al. J Am Soc Nephrol, 2003)。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, Maeshima et al. J Am Soc Nephrol, 2005) やその機序に N 型 Ca チャネルが関与していること (Mishima, Maeshima et al. Am J Physiol Renal Physiol, 2013) が明らかになった。また、Invitro 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 (Maeshima et al. J Am Soc Nephrol, 2006) や、加齢とともにその数が減少することも判明している (Miya, Maeshima et al. Am J Physiol Renal Physiol, 2012)。

本研究では、上記研究成果をさらに発展させて、腎幹細胞の自己複製機構、細胞周期、老化との関わりを明らかにし、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

本研究では、Doxycycline 誘導 Histone 2B-GFP マウスを用いて、GFP 標識腎幹細胞を同定・分離・培養し、「腎幹細胞の増殖・分化・老化メカニズム」を明らかにする。細胞分裂の非常に遅い腎幹細胞を GFP 標識し、腎尿細管再生における GFP 標識腎幹細胞の増殖・分化様式、加齢に伴う腎幹細胞の数と局在の変化を調べて老化との関連を探索する。さらに GFP 標識腎幹細胞の分離・培養法を確立し、活性化因子や特異的マーカーを探索する。これにより、腎幹細胞の自己複製機構、細胞周期、老化との関わりを明らかにし、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。

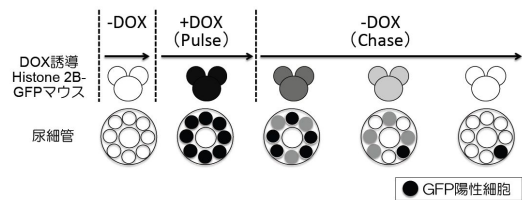
3. 研究の方法

(1) 腎幹細胞を GFP 標識する遺伝子改変マウスの解析

申請者は以前に BrdU ラベリング法を用いて、組織幹細胞に共通した「分裂速度の非常に遅

い」という性質を持つ細胞、いわゆる Label-retaining 細胞 (LRCs) が腎尿細管に存在し、腎障害後の尿細管再生に大きく貢献する腎幹細胞様細胞であることを明らかにした (Maeshima et al. J Am Soc Nephrol, 2003)。しかし、この BrdU ラベリング法には、技術的に限界がある。まず核内に取り込まれた BrdU は、細胞分裂のたびに希釈されるため、BrdU 陽性細胞の長期追跡は困難である。さらに、この BrdU 陽性腎幹細胞に特異的な表面マーカーは同定されておらず、FACS や MACS による選択的な分離・培養が不可能である。

上記の問題を克服するため本研究では、Doxycycline 誘導 Histone 2B-GFP マウス (Foudi et al. Nat Biotech, 2009) (Jackson 研究所より購入) を用いて検討を行う。このマウスは、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)。



そこでまず、GFP 標識腎幹細胞を効率よく検出できる条件 (Doxycycline の容量、Pulse 期間、Chase 期間など) を検討する。その後、各種ネフロンマーカーとの 2 重染色を行い、GFP 陽性腎幹細胞の局在を調べる。

(2) 腎尿細管再生における GFP 標識腎幹細胞の増殖・分化様式

上記マウスに Doxycycline の Pulse/Chase 処理を行った後、虚血・再灌流障害を誘導する。経時的に腎臓を摘出し、GFP 陽性腎幹細胞の数と局在を検証する。尿細管再生過程で観察される増殖細胞 (PCNA 陽性細胞または Ki67 陽性細胞) と GFP 陽性細胞の相関を調べ、腎幹細胞がどの程度尿細管再生に貢献しているかを検証する。さらに、分裂途中または分裂直後の 2 つの GFP 陽性細胞を観察して、GFP 蛍光の分配様式 (均等でまたは不均等) を調べ、幹細胞に特徴的な非対称性分裂の有無を検証する。

(3) GFP 標識腎幹細胞特異的マーカーの探索

上記マウスに Doxycycline の Pulse/Chase 処理後、FACS を用いて GFP 標識腎幹細胞を選択的に分離し、特異的に発現している遺伝子や蛋白を検索する。具体的には、RNA や蛋白を抽出し、Superarray または Proteinarray を用いて腎幹細胞が特異的に発現している遺

伝子や過剰に分泌している蛋白をスクリーニングする。対照コントロールには GFP 陰性細胞を用いる。Superarray の結果は、リアルタイム PCR、ノーザンプロット、ウェスタンプロットなどにより再確認する。さらに、その遺伝子が腎幹細胞特異的に発現していることを免疫染色や in situ hybridization を利用して組織学的に評価する。この腎幹細胞に特異的なマーカーが同定できれば、その利用価値は非常に高いと思われる。

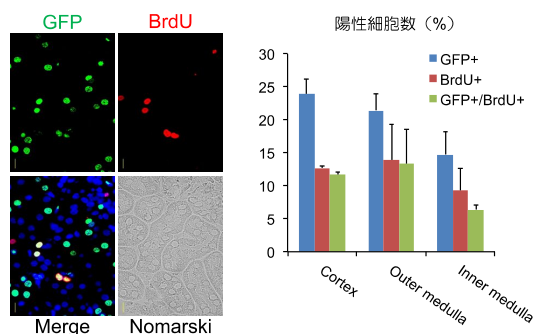
(4) GFP 標識腎幹細胞と老化の関連

これまでの予備実験の結果、7 週齢正常マウスに 4 週間 BrdU 標識すると、近位尿細管の約 90% が BrdU 陽性になるが、20 ヶ月齢マウスでは有意にその数が減少している（未発表データ）。これは近位尿細管に存在する腎幹細胞の自己複製能が、老化とともに低下していることを示唆している。これを検証するため、7 週齢と 20 ヶ月齢の Doxycycline 誘導 Histone 2B-GFP マウスに Doxycycline の Pulse/Chase を行い、GFP 陽性細胞の数と局在を比較する。さらに、それぞれの週齢のマウスから GFP 陽性腎幹細胞を FACS で分離し、Superarray を用いて発現量に差のある遺伝子をスクリーニングする。これにより、腎幹細胞の老化に関与する因子を明らかにすることできると思われる。

4. 研究成果

(1) 腎幹細胞を GFP 標識する遺伝子改変マウスの解析

Doxycycline 誘導 Histone 2B-GFP マウスに対して Doxycycline による On (Pulse) と Off (Chase) を行うことにより、腎幹細胞を GFP 標識することに成功した。BrdU ラベリング法と比較し、より高感度に腎幹細胞を検出可能であることが分かった（下図）。



(2) 腎尿細管再生における GFP 標識腎幹細胞の増殖・分化様式

上記マウスに Doxycycline の Pulse/Chase 処理を行った後、虚血・再灌流障害を誘導した。経時的に腎臓を摘出し、GFP 陽性腎幹細胞の数と局在を検証した結果、GFP 陽性腎幹細胞は尿細管再生に大きく貢献する細胞集団であることが判明した。さらに、分裂途中または分裂直後の 2 つの GFP 陽性細胞を観察したところ、GFP 蛍光が不均等に分配されており、

幹細胞に特徴的な非対称性分裂を行っていることが判明した。

(3) GFP 標識腎幹細胞特異的マーカーの探索
上記マウスに Doxycycline の Pulse/Chase 処理後、FACS を用いて GFP 標識腎幹細胞を選択的に分離し、特異的に発現している遺伝子や蛋白を検索したところ、複数の候補因子が同定された。詳細については、現在解析中である。

(4) GFP 標識腎幹細胞と老化の関連

7 週齢と 20 ヶ月齢の Doxycycline 誘導 Histone 2B-GFP マウスに Doxycycline の Pulse/Chase を行い、GFP 陽性細胞の数と局在を比較したところ、7 週齢と比較し、20 ヶ月齢では有意に腎幹細胞数が減少していた。興味深いことに、腎幹細胞の多いネフロンを少ないネフロンが混在しており、ネフロン単位の老化の存在が示唆された。

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 12 件)

Ikeuchi H, Hiromura K, Kayakabe K, Tshilela KA, Uchiyama K, Hamatani H, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Nojima Y. Renal outcomes in mixed proliferative and membranous lupus nephritis (Class III/IV + V): A long-term observational study. *Mod Rheumatol* 26:1-6, 2016 査読有

Sakairi T, Hiromura K, Kaneko Y, Maeshima A, Hirato J, Nojima Y. Histological findings in the spleen affected by adult-onset Still's disease: a report of three cases. *Clin Exp Rheumatol* 34:566-7, 2016 査読有

Tshilela KA, Ikeuchi H, Matsumoto T, Kuroiwa T, Sakurai N, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Hiromura K, Nojima Y. Glomerular cytokine expression in murine lupus nephritis. *Clin Exp Nephrol* 20:23-9, 2016 査読有

Nakasatomi M, Maeshima A, Mishima K, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y. Novel approach for the detection of tubular cell migration into the interstitium during renal fibrosis in rats. *Fibrogenesis Tissue Repair* 8: 12. 2015 査読有

Bussolati B, Maeshima A, Peti-Peterdi J, Yokoo T, Lasagni L. *Renal Stem Cells*,

Tissue Regeneration, and Stem Cell Therapies for Renal Diseases. *Stem Cells Int.* 2015: 302792. 査読無

Maeshima A, Takahashi S, Nakasatomi M, Nojima Y. (Review) Diverse Cell Populations Involved in Regeneration of Renal Tubular Epithelium Following Acute Kidney Injury. *Stem Cells Int* 2015: 964849. 査読有

Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y. (Review) Regenerative Medicine for the Kidney: Renotropic factors, renal stem/progenitor cells, and stem cell therapy. *Biomed Res Int.* 2014: 595493. 査読有

Kanasaki K, Maeshima A, Taduri G, Revuelta I: Combating kidney fibrosis. *Biomed Res Int* 2014:679154. 査読無

Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahashi S, Watanabe M, 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. *Am J Physiol Renal Physiol* 307:F708-17, 2014 査読有

Motohashi R, Ikeuchi H, Hiromura K, Ohishi Y, Sakurai N, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Nojima Y. Two cases of ulcerative colitis developing in rheumatoid arthritis patients during abatacept therapy. *Scand J Gastroenterol* 49: 1270-1, 2014 査読有

Maeshima A, Mishima K, Yamashita S, Nakasatomi M, Miya M, Sakurai N, Sakairi T, Ikeuchi H, Hiromura K, Hasegawa Y, Kojima I, Nojima Y: Follistatin, an activin antagonist, ameliorates renal interstitial fibrosis in a rat model of unilateral ureteral obstruction. *Biomed Res Int.* 2014: 376191 査読有

Ikeuchi H, Hiromura K, Takahashi S, Mishima K, Sakurai N, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Kuroiwa T, Nojima Y. Efficacy and safety of multi-target therapy using a combination of tacrolimus, mycophenolate mofetil and a steroid in patients with active lupus nephritis. *Mod Rheumatol* 24:618-25, 2014 査読有

[学会発表](計13件)

Takei Y, Maeshima A, Takahashi S, Nakasatomi M, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Urinary Activin A: a Novel Biomarker Reflecting the Severity of Tubular Damage in IgA Nephropathy. 49th American Society of Nephrology, 2016.11.15-20, Chicago, USA

Takahashi S, Maeshima A, Takei Y, Nakasatomi M, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Urinary Activin A: a Novel Urinary Biomarker for Acute Kidney Injury. 49th American Society of Nephrology, 2016.11.15-20, Chicago, USA

Maeshima A, Kadiombo AT, Kayakabe K, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Urinary Activin A as a Valuable Biomarker Reflecting the Activity of Various kidney Diseases. 49th American Society of Nephrology, 2016.11.15-20, Chicago, USA

前嶋明人:腎再生医学に関する最近の知見 しもつけ腎セミナー、栃木、2016

前嶋明人:慢性腎臓病におけるN型Caチャネルの役割 栃木N型Caチャネル研究会、栃木、2016

前嶋明人:私の研究歴「アクチビンと再生」北関東腎臓病フロンティア、栃木、2016

Nakasatomi M, Maeshima A, Takahashi S, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Enhancement of HGF-induced Tubulogenesis by Endothelial cell-derived GDNF. 48th American Society of Nephrology, 2015.11.3-8, San Diego, USA

Takahashi S, Maeshima A, Nakasatomi M, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Identification of Slow-cycling cells in the Kidney using TetOP-H2B-GFP mice. 48th American Society of Nephrology, 2015.11.3-8, San Diego, USA

前嶋明人:腎線維化におけるN型Caチャネルの役割 群馬N型Caチャネル研究会、群馬、2015

前嶋明人:慢性腎臓病におけるN型Caチャネルの役割 第4回宇都宮Kidneyカンファレンス、宇都宮、2015

Kadiombo AT, Maeshima A, Sakurai N, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Identification of Activin A as a Novel Urinary Biomarker for Lupus Nephritis in MRL/lpr mice. 47th American Society of Nephrology, 2014.11.11-16, Philadelphia, USA

Nakasatomi M, Maeshima A, Sakurai N,

Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Hiromura K, Nojima Y: Enhanced Phosphorylation of Multiple Receptor Tyrosine Kinases by Endothelial-cell derived Factor(s) in Renal Tubular Structures Cultured in Gels. 47th American Society of Nephrology, 2014.11.11-16, Philadelphia, USA

前嶋明人:腎再生医療の可能性と方向性
第17回Yokohama Research Conference、
横浜、2014

〔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：

(4) 研究協力者

()