

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）（一般）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590945
 研究課題名（和文）尿細管再生における前駆様細胞と浸潤マクロファージの役割と再生療法への応用
 研究課題名（英文） Roles of progenitor-like cells and infiltrative macrophages on renal tubular regeneration and their application on cell therapy
 研究代表者
 藤垣 嘉秀（FUJIGAKI YOSHIHIDE）
 浜松医科大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：20283351

研究成果の概要：

急性腎不全における尿細管障害後の尿細管再生に近位尿細管の遠位端に存在する細胞群（標的細胞）が重要な役割を担っているとの仮説を立て、治療への応用を目指し標的細胞の特性の解明を行った。標的細胞は尿細管内に局在し、盛んな増殖能を有する前駆様細胞の性質を持つ。また、増殖に際し他の近位尿細管細胞とは異なり、比較的未分化な細胞形質となり増殖を開始することが示された。前駆様細胞としてのさらなる特性の解明と細胞療法への応用を目指している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：急性腎不全、尿細管、近位尿細管細胞、再生、前駆様細胞、修復

1. 研究開始当初の背景

我々は、腎毒性急性腎不全モデルラットの近位尿細管 S3 セグメント修復動態を検討してきた。この中で、多くの近位尿細管細胞が死滅する極めて強い傷害下では、近位尿細管 S3 セグメント遠位端に集積する細胞群が S3 セグメントの広範な修復を担うことを見いだした。注目すべきは、これら細胞群は初期増殖細胞として出現し、³H-thymidine 標識後の追跡にて slow cycling cell の可能性が推察され、前駆様細胞の可能性があるのである（Fujigaki Y, et al. Kinetics and characterization of initially regenerating proximal

tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. Nephrol Dial Transplant. 21:41-50, 2006）。

一方、我々は近位尿細管修復（再生）を制御する因子の検討の中で、創傷治癒において必須の細胞性因子であるマクロファージおよびミオフィブロブラストの尿細管再生時に一致した一過性間質浸潤が、急性腎不全後の尿細管再生においても重要な因子であることを報告している（Sun DF, Fujigaki Y, et al. Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced

interstitial cellular response. Am J Pathol 161:217-27,2002)。マクロファージおよびミオフィブロブラストはrenotropic factorの供給源になり得ること、また、マクロファージによる障害尿細管の貪食処理や抗原提示作用(Fujigaki Y, et al. Temporary changes in macrophages and MHC class-II molecule expressing cells in the tubulointerstitium in response to uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. Virchows Arch. 443(2):206-16,2003)やミオフィブロブラストの障害ネフロン構築保持などの役割の可能性(Fujigaki Y, et al. Transient myofibroblast differentiation of interstitial fibroblastic cells relevant to tubular dilatation in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats. Virchows Arch. 446(2):164-76,2005)も報告した。

これらの結果から、急性腎不全からの尿細管細胞回復は創傷治癒の一形態として捉えることができ、近位尿細管 S3 セグメント遠位端に前駆様細胞(標的細胞)が存在し間質浸潤マクロファージからの液性因子により制御されるのではないか、という仮説をたてた。また、標的細胞を移植する細胞療法や、それに加え間質浸潤マクロファージ増幅により標的細胞を活性化することで致死急性腎不全の予後の改善が可能ではないか、とする着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)我々が前駆様細胞の特性を有すると考えている近位尿細管 S3 セグメント遠位端細胞(標的細胞)を単離・培養し、その前駆細胞としての特性を検討すること、(2)この標的細胞の活性化への浸潤マクロファージの関与を明らかにすること、(3)培養した標的細胞を急性腎不全を起こした腎に移植し、急性腎不全からの回復過程に及ぼす効果を検討すること、などとした。

3. 研究の方法

(1)急性腎不全はSD ラットに酢酸ウラニウムを静注して惹起し、2-3 日後に出現する標的細胞(初期増殖細胞)を³H-thymidine あるいは bromodeoxyuridin(BrdU)標識後に追跡し、標識動態や細胞形質などを免疫組織学的に検討した。また、標的細胞を BrdU 陽性細胞として免疫電顕にて超微形態を検討した。さらに急性腎不全惹起後に 5-fluorouracil(5-FU)を投与した後の標的細胞の動態も観察した。

(2)急性腎不全に出現する標的細胞を BrdU にてパルス標識し、標的細胞を含む腎領域を採取し細胞を単離し、単離細胞を培養。BrdU 陽性標的細胞の選別のため、Hoechst33342 dye でインキュベート後、BrdU 陽性細胞(標的細胞)を FACS にて Hoechst33342 low staining 細胞分画として選別した。細胞分裂回数と細胞分裂継代後に標識保持細胞(slow cycling)の性質を有するかを確認、細胞形態・構築(tubulogenesis など)の観察により、標的細胞の特性、特に前駆細胞特性を有するかを検討する。

ラット腹腔浸潤マクロファージを採取し conditioned medium を採取。標的細胞を conditioned medium と各種成長因子で培養し、標的細胞の増殖活性・細胞形質を検討する。

4. 研究成果

(1)標的細胞の急性腎不全後の腎内での特性として以下の点を見いだした。① S3 セグメント修復を担当する娘細胞を供給する。② 少なくとも 40 週後まで標識保持細胞として slow cycling の性質を有し、かつ近位尿細管マーカーのビメンチン陰性の未分化形質を保持する細胞が含まれる(図1)③ 造血幹細胞と類似し 5-FU に抵抗性かつ 5-FU 中止後に増殖・分化能を示す。④ 超微形態的に脱分化/未分化尿細管細胞の形態を有する。⑤腎発生に重要な転写因子 Pax-2 が細胞分裂時に発現する(図 2)。⑥間葉系細胞への形質転換をするか、或いは形質転換と同時に細胞分裂を開始し、他の近位尿細管細胞が形質転換せずに増殖を開始する能力を有するのとは異なり、比較的未分化な細胞形質となり増殖を開始することが示唆された。

以上 in vivo の検討より、S3 セグメント遠位端の細胞群は、前駆様細胞の可能性が示唆され、標的細胞に対する化学的介入が近位尿細管障害からの回復促進に貢献できると考えられた。

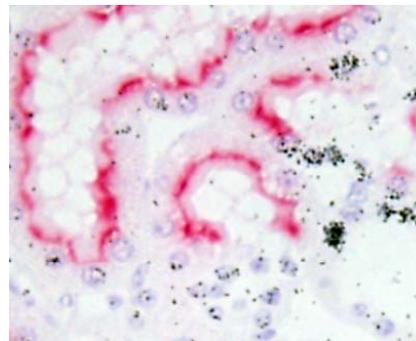


図1.急性腎不全惹起10週後の³H-thymidine 標識細胞(標的細胞)とメガリン陽性(赤)細胞

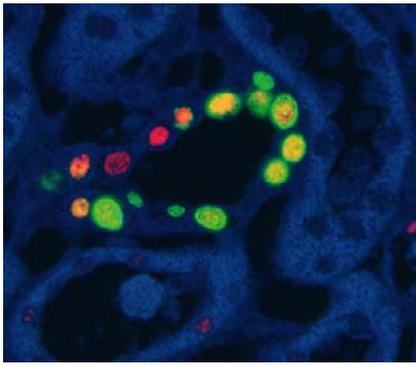


図 2.急性腎不全惹起 3 日後の BrdU 陽性細胞 (緑)、Pax-2 陽性細胞 (赤)、BrdU/ Pax-2 二重陽性細胞 (黄)

(2)少数の BrdU 陽性細胞(標的細胞)をフローサイトメーターにて Hoechst33342 低染色細胞分画として選別した。現在、標的細胞の回収率の増加と単離細胞での前駆様細胞特性を検討している。また、急性腎不全早期に尿細管間質に浸潤するマクロファージの標的細胞に対する増殖活性の有無の検討を実施中である。

標的細胞の特性を明らかにした後に急性腎不全惹起後の尿細管障害回復における標的細胞による細胞療法への応用を検討する。

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 6 件)

①Fujigaki Y, Sakakima M, Sun Y, Fujikura T, Tsuji T, Yasuda H, Hishida A. Cell division and phenotype regression of proximal tubular cells in response to uranyl acetate insult in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2009 Apr 25. [Epub ahead of print]査読有

②Tsuji T, Yasuda H, Fujigaki Y(8番目)(他7名) The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins. *Toxicol Appl Pharmacol.* 234:202-208, 2009査読有

③ Sakakima M, Fujigaki Y, Yamamoto T, Hishida A. A distinct population of tubular cells in the distal S3 segment contributes to S3 segment regeneration in rats following acute renal failure induced by uranyl acetate. *Nephron Exp Nephrol.* 109:57-70, 2008査読有

④Luo J, Tsuji T, Yasuda H, Sun Y, Fujigaki Y,

Hishida A. The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant* 23:2198-205, 2008査読有

⑤藤垣嘉秀:急性尿細管障害に対する近位尿細管再生. *Annual Review 腎臓* 2007, 89-95, 2007査読無

⑥Fujigaki Y, Sakakima M, Sun Y, Goto T, Fukasawa H, Tsuji T, Yamamoto T, Hishida A. Immunohistochemical study on caveolin-1 in regenerating process tubular cells in gentamicin-induced acute tubular injury in rats. *Virchows Arch* 450:671-681, 2007査読有

[学会発表] (計 5 件)

①藤垣嘉秀(代表)、孫媛、榊間昌哲、辻孝之、戸川証、安田日出夫、鈴木洋行、菱田明 酢酸ウラニウム誘発ラット急性尿細管障害における細胞生存とHSP27/FAK発現. 第51回日本腎臓学会学術総会. 平成20年6月1日. 福岡市

②Yasuda H, Kato A, Fujigaki Y, Hishida A. The Prevalence and Outcome of Acute Kidney Injury Requiring Renal Replacement Therapy - A Japanese Population-Based Multicenter Prospective Survey. American society of nephrology renal week 2007 1-4 November, 2007. San Francisco, USA

③菱田明, 藤垣嘉秀 慢性腎臓病対策からみた薬剤性腎障害対策の課題. シンポジウム1 薬剤性腎障害の発症機序と防御 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 平成19年6月27日東京

④Fujigaki Y, Sakakima M, Sun Y, Sakao Y, Tsuji T, Yamamoto T, Hishida A. Cell division and phenotype regression of proximal tubular cells in response to uranyl acetate insult in rats. 44th Congress of European Dialysis and Transplant Association. 21-24 June, 2007 Barcelona, Spain

⑤藤垣嘉秀、榊間昌哲、菱田明:正常および障害後の近位尿細管細胞再生現象. ワークショップ 3 腎の発生と再生ーその分子機構と臨床応用に向けてー 第50回日本腎臓学会学術総会. 平成19年5月26日. 浜松市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤垣 嘉秀(FUJIGAKI YOSHIHIDE)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20283351

(2) 研究分担者

安田 日出夫(YASUDA HIDEO)
浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号:60432209
榊間 昌哲(SAKAKIMA MASANORI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号:60402351

(3) 研究協力者

菱田 明(HISHIDA AKIRA)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号:70111812
孫 媛(SUN YUEN)
浜松医科大学・医学部・
リサーチアシスタント
研究者番号:90402346
藤倉 知行(FUJIKURA TOMOYUKI)
浜松医科大学・医学部
リサーチアシスタント
研究者番号:00444349