

令和元年6月4日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10641

研究課題名(和文)腎組織幹細胞における病的ストレス制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of pathological stress control mechanism in kidney tissue stem cells

研究代表者

荒木 元朗 (Araki, Moto)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90467746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は既にヒト細胞では「腎機能を担う腎小体・尿細管の再生につながる腎組織幹細胞」を樹立している。今回腎組織幹細胞における病的ストレス制御機構の解明を目指した。病的ストレスには腎移植・急性腎不全における腎虚血再灌流障害を選択した。「我々が独自に開発した2つの新技術：「逆行性幹細胞誘導法」および「組織特異的幹細胞分離法」に基づき誘導・分離するマウスの「腎組織幹細胞」の戦略を練っている。またヒトの「腎組織幹細胞」を用いた研究を先行する方が適切と考えられin vitroの研究戦略を練っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は既にヒト細胞では「腎機能を担う腎小体・尿細管の再生につながる腎組織幹細胞」を樹立している。しかしながら現時点でこの細胞治療が腎不全の根治的治療となるのは困難である。よって今回その技術を腎虚血再灌流障害という病的ストレスにおける腎臓再生能力の研究を行っている。腎虚血再灌流は腎移植・急性腎不全における主たる病的ストレスである。よってこの研究は新たな治療に結びつく可能性が高くその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have established "Renal tissue stem cells that lead to regeneration of kidney corpuscle and tubules responsible for kidney function" in human cells. In this study, we aimed to elucidate the pathological stress control mechanism of kidney tissue stem cells. We selected renal ischemia and reperfusion injury in renal transplantation and acute renal failure as pathological stress. We established "renal tissue stem cells" derived and separated from mice based on two new technologies we developed independently: "retrograde stem cell induction method" and "tissue specific stem cell separation method". We will establish "Renal tissue stem cells" in mouse cells. We are doing experiment using human renal tissue stem cells as well.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

京都大学の山中伸弥博士らによると人工多能性幹(iPS)細胞の樹立後、今後いかにこの発見を再生医薬品開発・臨床応用につなげるかが喫緊の課題となっている。岡山大学の我々のグループでは、現在までに、膀胱平滑筋細胞や尿路上皮細胞等の再生研究で成果を挙げてきた。従来の腎再生研究では、ES・iPS細胞からの順行性分化誘導法を利用され、ヒトiPS細胞から中間中胚葉細胞の分化誘導が既に報告されている。しかしながら、腎発生過程に沿って目的の腎組織幹細胞(腎機能再生に必要な自己増殖能を持つ幹細胞)を一つ一つ発生順を追って作成し応用する手法には大きな困難が伴う。我々は既にヒト細胞では「腎機能を担う腎小体・尿管の再生につながる腎組織幹細胞」を樹立している。しかしながら現時点でこの細胞治療が腎不全の根治的治療となるのは困難である。よって今回その技術を腎虚血再灌流障害という病的ストレスにおける腎臓再生能力の研究を行う。腎虚血再灌流は腎移植・急性腎不全における主たる病的ストレスである。よってこの研究は新たな治療に結びつく可能性が高くその意義は計り知れない。

腎移植においては日本では透析患者約30万人に対して2012年の一年間で合計1610例の腎移植しか行われていない。よって少ない腎提供を最大限に生かす工夫が必要である。腎虚血再灌流障害は移植腎機能遅延、急性/慢性拒絶反応の発現増加に關与する(C.D. Bryan et al. *Transplantation* 2001, D. Dragun, et al. *Kidney Int* 60 2001)。酸素化は組織の生存には不可欠だが、再灌流によって反応性に産生される酸素派生物質が重大な組織障害を引き起こす(MA Daemen et al. *J Clin Invest* 1999, S Nogue et al. *J Am Soc Nephrol* 1998)。この病態は急性腎不全の病態と同じであり、腎虚血再灌流障害における組織再生の本研究により腎移植・急性腎不全の新しい治療を目指す。

### 腎再生研究の現状と課題、今、何が必要か？

中間中胚葉から後腎間葉と尿管芽が発生、腎臓となる。現在、京都大学の長船健二博士らにより、ヒトiPS細胞から中間中胚葉細胞の分化誘導までが既に報告。今後、これらの中間中胚葉細胞から、腎前駆細胞を得ることが期待される。しかしながら、得られた腎前駆細胞が、糸球体幹細胞および尿管幹細胞として実際に腎機能を担う腎小体・尿管の再生につながるかどうかは、全くの未知数である。

OSR1陽性(発現)の中間中胚葉細胞の誘導

腎機能の再生研究では、最小単位:「機能的腎小体」の再生に直結する新技術の確立が、不可欠である。

**腎組織幹細胞** 永遠の自己複製能を検証(50世代まで確認) 生体内に移植し腎小体への分化を検証 自律性をもって増殖、腎機能を長期に渡り改善

岡山大学における泌尿器科組織の再生研究の取り組み

膀胱再生の為の平滑筋細胞・尿路上皮細胞の作成 [投稿準備中の論文データより]

現在樹立中 ヒト膀胱平滑筋幹細胞

既に誘導に成功した ヒト膀胱平滑筋細胞

既に誘導に成功した ヒト尿路上皮細胞

1. iPS cells  
2. with RA (7days)  
3. Feeder cells

尿管平滑筋へ Uroplakin-IIIa

尿路上皮へ

SMA, MY-HC, Calponin1, Desmin

2. 研究の目的

腎機能再生を目指したiPS細胞からの順行性の腎組織幹細胞の獲得には限界があると考えられ、さらに腎組織幹細胞の分離法の確立も不可避の課題である。腎機能再生では、腎組織幹細胞の生体内移植により、その最小単位「機能的腎小体」の再生に直結させる新技術が不可欠であると判断される。その為、本申請研究では生体分子イメージングを併用し、マウスの「腎組織幹細胞の誘導・分離に基づく腎再生研究基盤の確立」を行う。この手法により我々はすでにヒトの「腎組織幹細胞」を樹立しており、

今回はマウスの「腎組織幹細胞」を樹立を目指す。そしてこのヒト及びマウスの「腎組織幹細胞」を用いて腎移植における組織障害の最初期段階かつ急性腎不全の主病態である虚血再灌流障害における「腎組織幹細胞の腎臓再生能力の研究」を行う。

### 3. 研究の方法

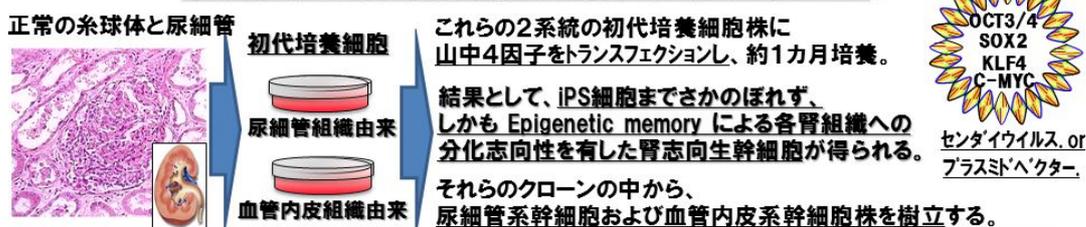
我々は既にヒト細胞では「腎機能を担う腎小体・尿細管の再生につながる腎組織幹細胞」を樹立している。我々の初代培養細胞を用いた研究により、山中4因子により逆行性に誘導された幹細胞の Epigenetic memory による各由来組織への分化志向性が明らかとなっており、Bar-Nur O ら報告の Cell Stem Cell.9(1):17-23,2011.等の論文も、我々の研究成果を追試、補強している。図上に示すように、研究協力者の野口 洋文 博士により、「逆行性幹細胞誘導法」に基づき膵臓組織および肝臓組織幹細胞が既に樹立され、米国での特許も成立しており、これに基づき我々はすでに新たに腎組織幹細胞の逆行性誘導法を確立した。さらに図下に示すように、我々はすでに研究分担者の渡部らが独自開発に成功した「組織幹細胞特異的に、強力に遺伝子発現を可能にする特許技術」に基づく「組織特異的幹細胞分離法」を駆使して、腎組織幹細胞に特異的な分離法を確立した。この特許技術の本態である Advanced TSTA(Ad-TSTA)システムは、従来の遺伝子発現 TSTA システム(Sadowski I ら、Nature.335:563-4,1988)に、Gerber HP らが報告の知見(Science.263:808-11,1994)を組み込んで、独自に改良したものである(具体的には、グルコルチコイドレセプターとポリグルタミンを組み合わせたモチーフを TSTA 遺伝子発現システム内部に挿入することで、機能的に重要であるにもかかわらず転写活性が弱い多くの特異的プロモーター群において、転写活性を飛躍的に高めることに成功)。本技術については、海外の著名な再生医療の研究者を含む多くの科学者からの問い合わせが来ており、世界的注目を浴びている。Ad-TSTA システムを用いて、腎組織幹細胞に特異的な2種類の OSR-1 および hTERT プロモーター活性により分化の各段階の幹細胞群をハサミ打ちして薬剤耐性遺伝子により選別することで、効率的な腎組織幹細胞の分離法を確立している。

今回腎組織幹細胞における病的ストレス制御機構の解明を目指した。病的ストレスには腎移植・急性腎不全における腎虚血再灌流障害を選択した。

## 腎組織幹細胞の誘導・分離に基づく腎再生研究基盤の確立 ①

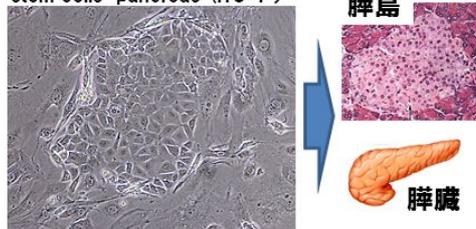
iPS・ES細胞からの順行性の腎組織幹細胞分化誘導には技術的な限界がある。

**本申請では、腎組織幹細胞の逆行性誘導法を確立する。**

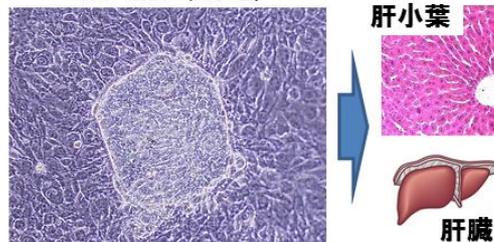


**独自に確立したこの逆行性幹細胞誘導技術(以下:成功例)を、今回、腎組織に応用する。**

既に樹立に成功: 膵臓組織幹細胞  
induced tissue specific  
stem cells-pancreas (ITS-P)



既に樹立に成功: 肝臓組織幹細胞  
ITS-liver (ITS-L)



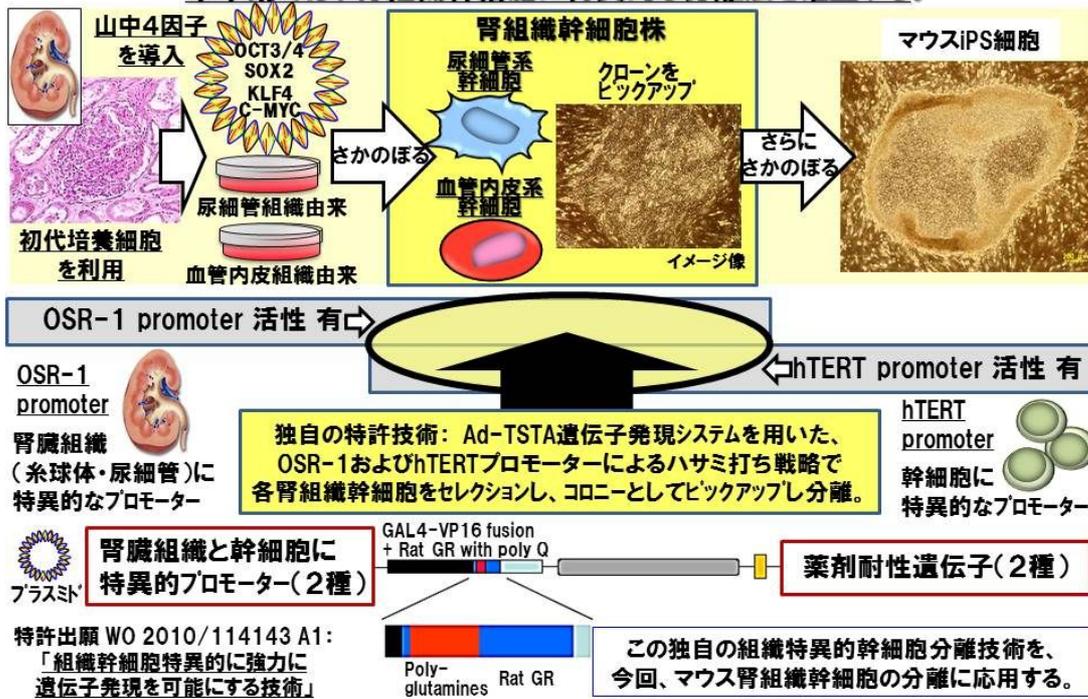
**分担協力者の野口らにより、世界初となる、マウス膵幹細胞と肝幹細胞の人工的樹立に成功!**

既に、アメリカで特許を取得済みで、現在、論文投稿準備中のデータより引用。

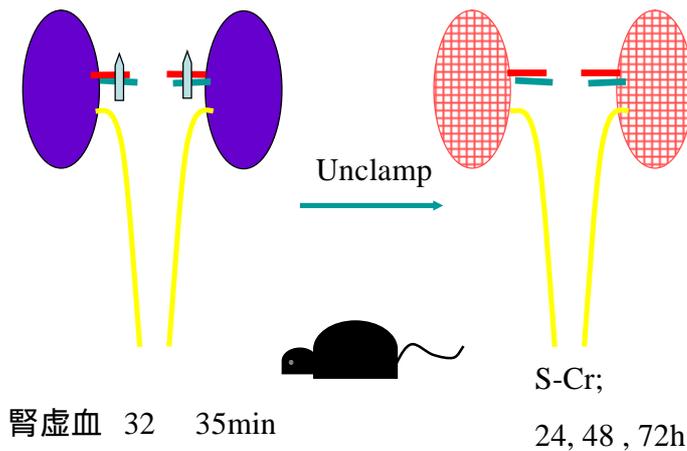
(それぞれの組織特異的幹細胞において、各組織・細胞への分化誘導は確認済み。)

## 腎組織幹細胞の誘導・分離に基づく腎再生研究基盤の確立 ②

腎組織幹細胞を選別・分離するためのツールが必要であり、  
本申請では、腎組織幹細胞に特異的な分離法を確立する。



## 手術—マウス腎虚血再還流モデル



#### 4. 研究成果

腎虚血再灌流モデルとしては8-12週の雄性C57BL/6マウスを麻酔下に開腹し、腎動静脈を一括クランプした。電灯・heatpadを用いてマウスの腹腔内温度を32℃に保ち、35分後に腎動静脈を開放(unclamp)した。これは予備実験でえた最適な腎虚血再灌流モデルの条件である。すでに確立したヒト腎組織幹細胞を虚血再灌流時のマウスの腎被膜下に投与した。

腎機能の評価は24時間後に血清クレアチンを測定し腎障害の程度を確認した。また腎組織の評価は再灌流24時間後でマウスをsacrificeし、腎標本を保存した。

腎臓のパラフィン切片をHE染色し、腎組織幹細胞投与群とコントロール群の腎の組織障害の違いを判定した。特に腎虚血再灌流障害の中心となる近位尿細管に注目した。また腎臓の凍結切片をAntimouse Ly-6G monoclonal antibody (RB6-8C5)を用いて好中球を免疫染色し、腎組織幹細胞投与群とコントロール群の間で好中球の浸潤の程度に差があるか検討した。

また我々が独自に開発した2つの新技術:「逆行性幹細胞誘導法」および「組織特異的幹細胞分離法」に基づき誘導・分離するマウスの「腎組織幹細胞」の研究の戦略を練っている。またヒトの「腎組織幹細胞」を用いた研究を先行する方が適切と考えられ in vitro の研究戦略を練っている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名:渡部 昌実

ローマ字氏名:Watanabe Masami

所属研究機関名:岡山大学

部局名:大学病院

職名:教授

研究者番号(8桁):70444677

研究分担者氏名:定平 卓也

ローマ字氏名:Sadahira Takuya

所属研究機関名: 岡山大学  
部局名: 大学病院  
職名: 助教  
研究者番号(8桁): 20733322

研究分担者氏名: 植木 英雄  
ローマ字氏名: Ueki Hideo  
所属研究機関名: 岡山大学  
部局名: 医学部  
職名: 技術専門職員  
研究者番号(8桁): 90537218

(2)研究協力者  
研究協力者氏名:  
ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。