

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19624

研究課題名(和文)尿中落下細胞に含まれる間葉系幹細胞の研究

研究課題名(英文)a study of mesenchymal stem cells in urine samples of kidney disease patients

研究代表者

内田 奈生(Uchida, Nao)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30771670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：数種類の腎臓病(紫斑病腎炎、微小変化型ネフローゼ症候群、IgA腎症、二次性巣状分節性糸球体硬化症、感染関連腎炎、閉塞性腎症、薬剤性腎障害、アルポート症候群)の患者尿から、尿中落下細胞を培養した。この細胞群から幹細胞を単離するべく、幹細胞マーカーを用いたFACSを行ったが、技術的な問題が解決できず単離に至らなかった。

幹細胞で発現が上昇するアルカリフォスファターゼの染色を行い、一部が陽性になることを紫斑病腎炎、アルポート症候群、感染関連腎炎の尿中落下細胞で確認した。また、アルカリフォスファターゼ陽性細胞がspheroid様の構造をとる現象が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の国民の8人に1人が慢性腎臓病に罹患しており、腎機能が低下するリスクを負っている。今回の研究では様々な種類の腎臓病患者の尿の中に、未分化な幹細胞が含まれることが示唆された。腎臓は高度に分化した多種類の細胞によって構成される臓器であり、腎臓病患者の尿に含まれる未分化な幹細胞は、障害を受けた腎臓の修復に関与している可能性がある。この幹細胞を効率よく利用することができれば、腎臓の再生医療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：urine samples from various kind of renal diseases were obtained; purpura nephritis, frequently relapsed nephrotic syndrome (minimal changed, FRNS), IgA nephropathy, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), infection-related glomerulonephritis, obstructive nephropathy, drug-induced renal injury and Alport syndrome. Cells derived from the urinary system proliferated well in most of diseases but FRNS and FSGS. Cultured cells were heterogeneous. To distinguish stem cells from other population, Alkaline Phosphatase staining was done. Small number of cells were alkaline phosphatase positive, and interestingly, formed spheroid-like three-dimensional structures on two-dimensional cultured cells, which might be important to keep stemness.

研究分野：小児腎臓

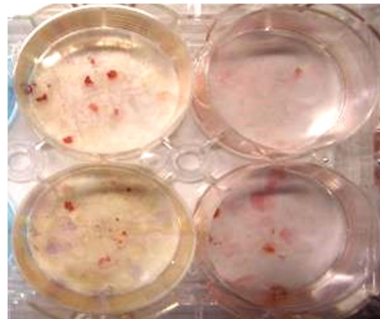
キーワード：尿中落下細胞 腎臓病 再生医療 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は人口の 10% 程度が罹患する頻度の高い疾患であり、継続的に腎機能が低下する。腎機能低下が進行し、末期腎不全に至れば、維持透析あるいは腎移植が必要になる。しかし、維持透析では高額の治療費や長い治療時間、食事・水分制限などによる生活の質の低下、腎移植では移植臓器の不足や生体ドナーにおける片腎提供後の腎機能低下などの問題を抱えている。一旦、低下した腎機能を回復させる治療法は現時点ではなく、CKD に対する治療は進行抑制に留まっている。そのため、近年、iPS 細胞や ES 細胞といった多能性幹細胞を用いた人工腎臓の作成や再生医療が注目されている。iPS 細胞では遺伝子導入を行うことによる安全性の問題が、ES 細胞では同様に安全性および倫理的問題が指摘されている。それらの問題を回避できるように、患者本人から得られ、遺伝子導入などの操作をしなくても腎臓を構成する細胞に分化しうる幹細胞が、再生医療の細胞材料としては理想的である。当研究室では腎疾患の患者尿の中に含まれる、腎尿路から脱落してきた細胞 (以下、尿中落下細胞) の培養を以前から行っており、その中で、培養細胞の一部が脂肪細胞、骨細胞に自然に分化する現象が認められた (未発表データ; 図 1)。この 2 種の細胞は間葉系に属する細胞であり、尿中落下細胞の中に間葉系幹細胞が存在することが示唆された。

図 1. 尿中落下細胞 初代培養。  
左; AlizarineRed, 右; OilRedO  
染色像を示す。それぞれ、骨細胞、脂肪細胞に分化したことを示す。



## 2. 研究の目的

前述のように尿中落下細胞には間葉系幹細胞が含まれる可能性が示唆された。これが CKD に対する細胞治療の材料となりうるか、またこの間葉系幹細胞が腎・尿路に存在することの生物学的意義を探究することを目的とした。

## 3. 研究の方法

当初、下記の から の方法を設定した。

①各種腎疾患 (慢性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、アルポート症候群等) の患者尿から、尿中落下細胞を分離培養し、fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて幹細胞表面マーカーにより尿幹細胞を同定・分離する

分離された尿幹細胞が間葉系幹細胞としての性質を有するか、数種類の間葉系細胞に分化誘導を行い、免疫染色・PCR などの手法を用いて確認する

尿幹細胞のマーカーとして適当な抗原を決定し、腎生検標本上で患者腎組織内での局在を探る

細胞治療に関連した尿幹細胞の特性を検討する; 分泌する液性因子の検索、分化誘導に応じて再び腎臓構成細胞へ分化しうるか

しかし、 の FACS による分離について技術的な問題が解決できず、その後の研究に大きく支障を来した。尿中落下細胞内の幹細胞の検索の代替手段として、未分化な幹細胞で高発現するアルカリフォスファターゼの染色を行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 各種腎疾患からの尿中落下細胞の培養

紫斑病腎炎 3 名、感染関連腎炎 2 名、微小変化型ネフローゼ症候群 1 名、巣状分節性糸球体硬化症 (以下、FSGS。二次性疑い) 1 名、IgA 腎症 1 名、Alport 症候群 1 名、薬剤性腎障害 1 名、閉塞性腎症 1 名、化学放射線療法後腎障害 1 名から、尿検体の提供を受け、尿中落下細胞の培養を行った (表 1)。培地の組成は既報から試薬の量を改変したものを用いた (Inoue CN. Clin Nephrol. 2000)。3 の微小変化型ネフローゼ症候群と 4 の精神運動発達遅滞を合併し、ミトコンドリア病など二次性を疑われている FSGS では尿中落下細胞の増殖が得られなかった。その他の患者尿検体からは、病変の首座が糸球体 (紫斑病腎炎、感染関連腎炎、IgA 腎症、Alport 症候群、紫斑病腎炎) であっても、尿管 (閉塞性腎障害、薬剤性腎障害) であっても、良好な細胞増殖が得られた。3 と 4 の症例は腎生検上も炎症所見に乏しく、当研究室の培養条件下では、炎症性の腎疾患で脱落してくる細胞の増殖がよいことが推測された。

	疾患	細胞増殖	腎生検
1	紫斑病腎炎	あり	あり
2	感染関連腎炎	あり	あり
3	微小変化型ネフローゼ症候群	なし	あり
4	FSGS (二次性疑い)	なし	あり
5	IgA 腎症	あり	あり
6	閉塞性腎症	あり	なし
7	Alport 症候群	あり	あり
8	感染関連腎炎	あり	あり
9	紫斑病腎炎	あり	あり
10	紫斑病腎炎	あり	あり
11	薬剤性腎障害	あり	あり

表 1 . 原疾患と尿中落下細胞培養結果

また、培養した尿中落下細胞を FACS によって解析しようとしたが、尿中落下細胞が腎臓や尿路を構成する多種の細胞を含む集団であり、細胞の大きさや性質が異なるためか、解析を安定的に進めることができなかった。

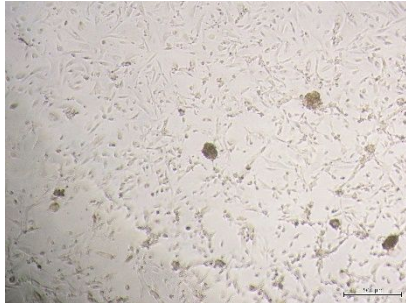
##### ( 2 ) アルカリフォスファターゼ染色による幹細胞の同定

FACS による幹細胞同定の代替として、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行った。未分化で自己複製能を有した状態の ES 細胞や iPS 細胞で、ALP が高レベルで発現することが知られ、ALP は幹細胞に共通した未分化状態のマーカーとして広く用いられている。

Alport 症候群、感染関連腎炎、紫斑病腎炎の患者尿検体から得られた尿中落下細胞に対して、StemTAG Alkaline Phosphatase Staining Kit を用いて、ALP 染色を行った。代表的な像として、Alport 症候群の尿中落下細胞の写真を以下に示す (図 2)。

## 図2 . ALP 染色

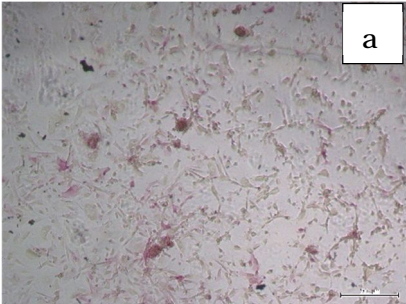
### < 染色前 >



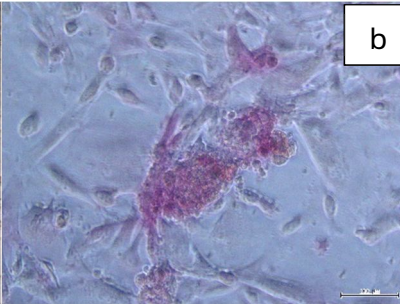
< 染色前 > 様々な形態の尿中落下細胞が混在し、増殖する中で spheroid 様の構造体が出現した。

Bar =500  $\mu$  m

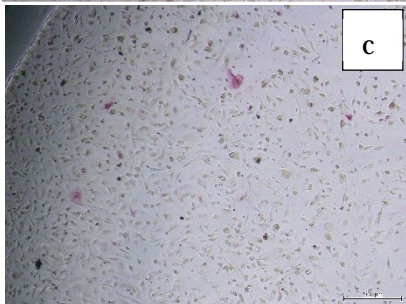
### < 染色後 >



a



b



c

< 染色後 > ALP 陽性細胞が同一 dish 上でも部位によって様々な頻度で認められた(a-c)。

Spheroid 様の構造体が ALP 染色陽性であり、未分化幹細胞の性質を持つことが示唆された(a, b)。

平面に増殖している細胞中にも、ALP 陽性細胞が散在した(c)。Bars =500  $\mu$  m (a, c), 100  $\mu$  m(b)

3 種類の疾患の尿中落下細胞中に、ALP 陽性細胞が存在することを確認できた。

また、この未分化幹細胞が、尿中落下細胞にもともと含まれているものなのか、培養条件によってもたらされたものなのかを検討するために、培養開始後から 1 週間ごとに ALP 染色を行った。培養開始直後は細胞数が少ないため、ALP 染色で検討することはできなかった。培養 1 週間時点から少数ではあるが ALP 陽性細胞を認め、2-4 週間まで確認された。尿中落下細胞が heterogeneous な細胞集団であり、背景の細胞密度が一定しないため、二次元培養した細胞を ALP 染色する今回の方法では、陽性細胞の割合を算出することはできなかった。しかし、4 週間培養すると、細胞が分化傾向を示し、ALP 陽性細胞が少なくなる印象があり、ALP 陽性幹細胞を採取するには 2-3 週時点が適当と推測された。

ALP 陽性細胞の一部が spheroid 様構造をとる現象が認められたため、細胞塊三次元培養マイクロプレート TASCL(cymss-bio)を用いて細胞塊の作成を試みたが、幹細胞の比率が低いいためか、明らかな細胞塊を形成することができなかった。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----