

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04186

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞特異的マーカーを利用した糸球体腎炎の病態解明と新規細胞治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the role of mesenchymal stem cell marker Meflin in glomerulonephritis

研究代表者

丸山 彰一 (maruyama, shoichi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10362253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)： 私たちはMesenchymal stem cell(MSC)を未分化な状態に保つ働きがある分子Meflinに着目し、MeflinがMSCに特異的に発現することを見出した。本課題ではMeflinに着目し糸球体腎炎発症時のMSCの病態を解明し新規治療開発につなげることを目的とした。正常腎や腎炎をおこした病腎におけるMeflinの発現量と局在を検討した。正常腎でもMeflinの発現は間質や糸球体門部に見られるが、炎症をおこした後は糸球体周囲にもMeflinの発現が上昇していることを確認した。またMeflinレポーターマウスを用いて糸球体腎炎の発症過程におけるMeflin陽性細胞の挙動を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は特異的マーカー分子を用いてMSCの体内動態を解明する点に学術的な意義があると考えられる。また、未分化状態を保つはたらきがある分子Meflinに着目して検討を進める点に独創性もある。本研究では糸球体腎炎における各種MSCの動態および作用について検討するが、将来的には他の臓器障害にも一般化できる可能性が高い。本研究で得られたMeflinの糸球体腎炎発症時の挙動は非常にユニークであり、今後の腎炎発症メカニズムの解明のみならず、腎炎治療ひいては炎症性疾患全般における治療戦略の足掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We previously report that a cell surface and secreted protein, Meflin, is expressed in cultured MSCs, fibroblasts and pericytes, but not other types of cells including epithelial, endothelial and smooth muscle cells. We also found Meflin is a potential marker for cultured MSCs and focused on manner of Meflin with the onset of glomerulonephritis.

We discovered that Meflin express in intersitium and around the vascular pole of glomerulus. And its' expression increases when glomerular inflammation and fibrosis progresses.

We also investigated the manner of Meflin positive cells with Meflin reporter mice generated in our lab.

研究分野： 間葉系幹細胞

キーワード： 間葉系幹細胞 糸球体腎炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (**Mesenchymal Stem Cell; MSC**) を用いた細胞治療が世界中で進められているなか、我々は治療効果の高い脂肪由来 **MSC** の新規培養法を開発し(特許第 5240715 号)、臨床試験へ向け準備中であった。また我々は間葉系幹細胞 (**Mesenchymal stromal/stem cell; 以下 MSC**) を規定する分子マーカーを探索する中で、**MSC** に特異的に発現する分子 **Meflin** (特願 2015-153712) に辿り着いた。

2. 研究の目的

本課題では **Meflin** に着目し糸球体腎炎発症時の **MSC** の病態を解明し新規治療開発につなげることを目的とし、

腎炎発症時の骨髄、脂肪、腎臓に存在する **Meflin** 陽性細胞の体内での動きと機能の解明
Meflin を制御することにより **MSC** の機能を高める方法の同定

実際に **Meflin** を介した治療法の開発

以上を研究の目的とした。

3. 研究の方法

in situ hybridization 法や組織免疫染色を用いて正常腎または糸球体腎炎発症時の **Meflin** の発現部位の確認を行う。

Meflin の遺伝子座に Cre-ERT を挿入したノックインマウスを作成し細胞系譜解析を行う。**Meflin**-CreERT マウスに *Rosa* 遺伝子座にレポーター遺伝子(tdTomato)を組み込んだマウスを掛け合わせレポーターマウスを作成する。抗 GBM 抗体により糸球体腎炎を起こしたレポーターマウスにタモキシフェンを投与すると、**Meflin** 陽性細胞(赤)の系譜を特異的に追跡することが可能となる。マウスの抗 GBM 抗体型腎炎、ラット抗 GBM 抗体型腎炎モデルおよびラット葉酸腎症 AKI モデル等の腎疾患モデルを用いて、各細胞の有効性を検証する。

4. 研究成果

まずは、正常腎あるいは腎炎を惹起した腎臓における **Meflin** の発現量と局在を検討している。in situ hybridization 法を用いて **Meflin** の mRNA の発現を検討したところ、正常腎でも **Meflin** は発現するが、各種腎炎モデルを惹起すると炎症部位において **Meflin** 陽性細胞の発現が上昇していることを見出した(図 1)。糸球体周囲の炎症細胞浸潤部位にも **Meflin** 陽性細胞が発現していることが確認できた(図 2)。

図 1

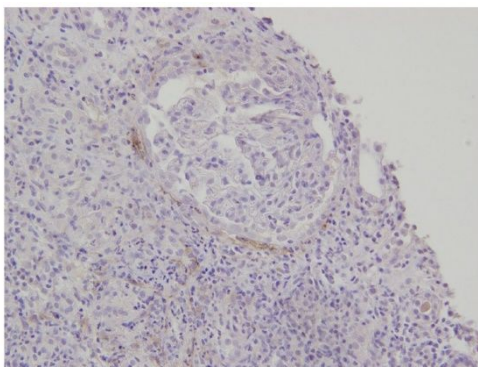
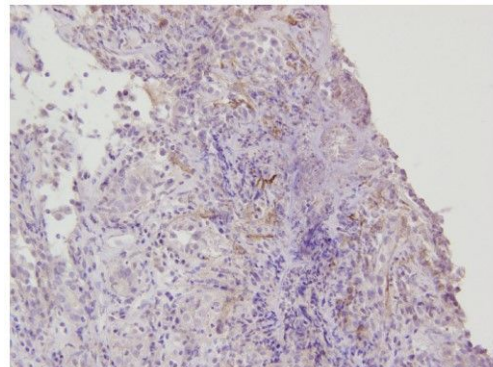


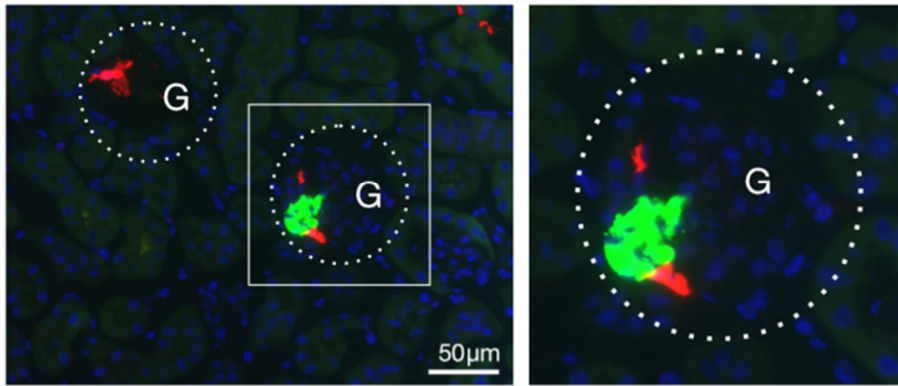
図 2



また腎臓における **Meflin** の働きにつき、作成した **Meflin** ノックアウトマウスを用いて検討している。ノックアウトマウス並びに野生型マウスにそれぞれ各種腎炎を惹起して、腎炎の進展具合や予後などの比較を組織学的ならびに定量的に評価している。

更にはより明確に腎臓における **Meflin** の発現を確認するために、**Meflin** 発現レポーターマウス(tdTomato)を作成した。**Meflin** 陽性細胞が Tomato で強烈に光るマウスの作成に成功している。このマウスを用いて、腎炎における更なる **Meflin** の役割を解明し、ひいては **Meflin** を用いた腎炎治療の開発を行っていく予定であった。

図 3 tdTomato / Renin / DAPI



このレポーターマウスを用いて Meflin の発現を確認したところ、in situ hybridization 法で確認したのと同様に、Meflin の発現が糸球体周囲、特に糸球体門部に特異的に集まっている事が確認された (図 3)。

今後、これらマウスに腎疾患モデルを惹起して、Meflin の発現を明らかにする予定であるが、遺伝子改変マウスの出生数が少なく、研究に必要な動物数を確保する事が困難であり、予想通り実験計画が進まなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 湊口 俊
2. 発表標題 Meflin is a potential marker of activated fibroblasts in kidney
3. 学会等名 The 9th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	榎本 篤 (Enomoto Atsushi) (20432255)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	秋山 真一 (Shinichi Akiyama) (20500010)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	坪井 直毅 (Naotake Tsuboi) (50566958)	藤田医科大学・医学部・准教授 (33916)	
研究分担者	勝野 敬之 (Takayuki Katsuno) (60642337)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	