

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890082

研究課題名（和文） ケモカインによる腎再生への検討

研究課題名（英文） Roles of chemokines in renal regeneration.

研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI KENGO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：50432125

研究成果の概要：

ケモカインの果たす腎再生への役割を明らかにする目的で、腎虚血再還流モデルに、抗 IP-10 中和抗体投与した検討を行ったところ、尿細管上皮細胞増殖は抗 IP-10 中和抗体投により促進されたことから、IP-10 が尿細管細胞の増殖に対して抑制的に働いている事が示唆された。また培養尿細管上皮細胞による検討でも抗 IP-10 中和抗体は細胞増殖に促進的に作用した。以上より IP-10 が腎再生に関与している事が示唆された。

一方、腎原基腹膜移植の研究も順調に進み、腎原基の取り出しのタイミングと、腹膜および腸間膜への投与方法が確立した。腹腔内で成長した腎原基は水腎症を呈する事から、尿管の処理が本治療法の重要なポイントである事が判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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：腎再生，ケモカイン，IP-10，急性腎不全，虚血再還流，

1. 研究開始当初の背景

日本における血液透析を受けている末期腎不全患者の総数は 26 万人を超えており、この数は 20 年以上の間、年間約 1 万人の割合で増え続けている。これらの症例に必要な医療費も膨大で年間 1 兆円を超える医療費が透

析療法に対して費やされている。このような背景のもと、末期腎不全に至らせないための研究とともに、腎臓の機能を取り戻すための根本的な治療法である腎再生の研究は不可欠な研究である。しかしながら、この点に関しては現在のところ十分な検討はなされていない状況であった。

我々はこれまでに腎虚血再還流後の腎組織障害の進展に interleukin(IL)-1 β をはじめとしたサイトカインや (Furuichi, et al, *Critical care medicine*, 34:2447-55, 2006), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2, fractalkine/CX3CR1 といったケモカイン (Furuichi, et al, *J Am Soc Nephrol* 14:1066-1071, 2003, Furuichi, et al, *J Am Soc Nephrol* 14:2503-2515, 2003, Furuichi, et al, *Am J Pathol.* 169:372-87, 2006), さらにはこれらサイトカイン, ケモカインの産生に重要な細胞内シグナル伝達因子 p38 mitogenactivated protein kinase (MAPK) が重要である事を示してきた (Furuichi, et al, *Nephrol Dial Transplant* 17:399-407, 2002). 近年このようなサイトカイン, ケモカインが炎症の進展だけでなく, 幹細胞の分化, 増殖, ホーミングなどにも関与している事が示されてきている (Croitoru-Lamoury, et al, *J Interferon Cytokine Res*, 27, 53-64, 2007, Ringe, et al, *J Cell Biochem.* 101, 135-146, 2007). また, 最近腎発生の段階においていくつかのケモカイン, ケモカイン受容体が発現している事が示されており, 発生段階におけるこれら因子の関与が推測されている. 発生に関与する因子は再生に関与している事が多く, 多くの研究がなされている. 我々は, このサイトカイン, ケモカインが幹細胞の分化, 増殖にも関与している事に着目し, 特に腎発生段階の尿細管上皮細胞に発現している IP-10/ CXCR3 に着目して腎再生に果たす役割を検討するという着想に至った.

2. 研究の目的

我々のこれまでの検討から, 腎局所に浸潤する炎症細胞及びそれに関連する因子の一部は, 炎症の増悪のみならず再生にも関与していることが推測された. 従って, 我々は炎症の先に組織再生があると言う独自の観点から研究を進めた. これまでの腎の発生および腸上皮に対する検討結果から, IP-10/CXCR3 は炎症と再生をつなぐ一つの候補因子と考えられた. 腸上皮からの類推では IP-10/CXCR3 は増殖抑制として働く事が推測される. この事が確認されれば, 的確な時期の的確な炎症のコントロールが組織障害の進展抑制だけでなく組織再生にも重要である事が示され, これまでとは異なる炎症治療の概念から, 再生までも視野に入れたより有効な治療を行える可能性が生まれると考え

た.

また, 腎原基を腹腔内に移植する事により, 大きく, かつ十分な腎機能を持った腎臓をレシピエントの腹腔内で成長させたいと考えた. このような治療法は全く新しい観点に立った治療法であり, 将来的な新たな治療法になり得ると考えた.

以上の点をふまえ, ケモカイン特に IP-10/ CXCR3 の腎再生に果たす役割を明らかにするとともに, 新たな腎再生療法に向けた基礎的検討を進める事を目指した.

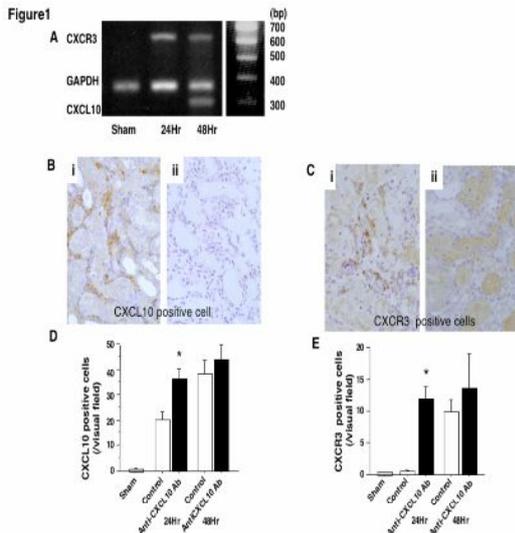
3. 研究の方法

虚血再還流モデルは再還流前, 再還流後 24 時間, 48 時間, 96 時間および 168 時間の 5 つの時系列を作成した. 得られた腎組織, 尿, 血清等の各サンプルから, CXCR3 およびそのリガンドである IP-10 の発現を PCR, ELISA および免疫組織染色にて確認した. また, 腎組織障害の程度の解析に, 画像解析ソフトを用いて壊死の程度, 再生の程度を定量的に評価した. さらに得られたサンプルから, 増殖に関与する因子を見だし, 合わせてその関与も検討した. 尿細管上皮細胞の培養系でも裏付けをとり, 再現性を確認するとともに, 分子機序についての検討も行った. 具体的には抗 IP-10 抗体投与あるいは IP-10 投与による尿細管上皮細胞の細胞増殖与える影響を直接評価するとともに, vivo の実験で推測された, IP-10 と細胞増殖の間に介在する分子について, 培養系で実際に機能しているかどうかの確認をした.

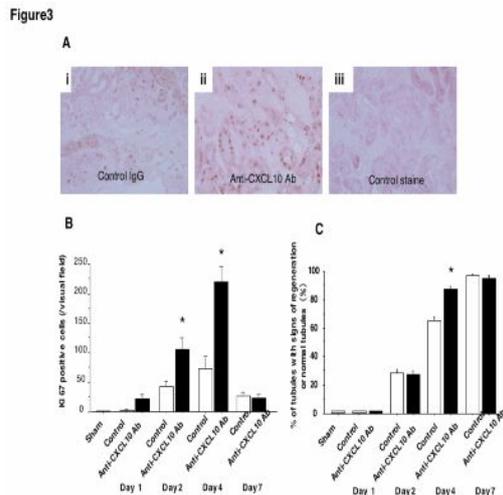
腎原基を用いた実験では, 腎原基をマウス腹腔内に移植すると腎原基はレシピエントの腹膜の血管から血流を得て成長するとともに, 尿を生成するようになる. この試みは, “新たな腎臓を作り出す” という新しい概念を持った治療法としての可能性を秘めている. しかしながら, この腎臓は実際の生体腎機能の代替えになる程までには至っていなかった. その理由はいくつかあるが, 腎原基から成長する腎の成長が一定の大きさで止まってしまうのも, 一つの理由であった. 虚血再還流障害および器官培養で得られた所見からレシピエントマウスに抗体を投与して, 移植腎原基の成長を促進させる試みは, この問題を打開する可能性を秘めていると考えられる. 本研究では其の基礎実験として, 成長を促進させる方法として, とくに移植のタイミングと移植場所 (腹膜, 腸間膜など) の検討を行った.

4. 研究成果

腎虚血再還流における尿細管上皮細胞の再生に果たすIP-10/CXCR3の役割については順調に解析が進み、期待される成果があげられた。まず、虚血再還流後の腎組織にはIP-10 (Figure 1A, B, D)/CXCR3 (Figure 1A, C, E) が発現している事を確認した。

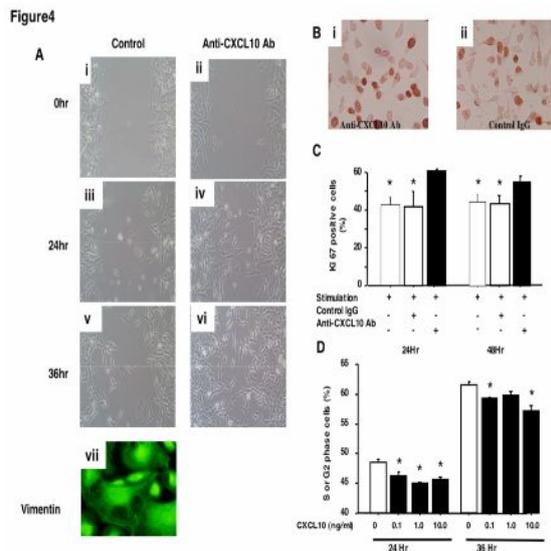


そこで、抗IP-10中和抗体投与の実験をすすめた。腎虚血再還流後の尿細管壊死の程度および炎症細胞浸潤の程度は24-48時間目にかけて著明に増加したが、ケモカインであるIP-10の中和抗体 (抗IP-10抗体) 投与はその尿細管壊死の程度および炎症細胞浸潤の程度を変えなかった。一方、Ki67陽性尿細管上皮細胞数は虚血再還流後増加し尿細管上皮細胞がさかんに分裂し尿細管上皮細胞の再生に参与している事が示された。この再生の程度は、抗IP-10中和抗体投与により促進されたことから (Figure 3A, B), IP-10が尿細管細胞の増殖



に対して抑制的に働いている事が示唆された。

さらに、虚血再還流後の尿細管上皮再生に対して、IP-10/CXCR3が細胞増殖抑制的に働くという所見を、尿細管上皮細胞を用いた培養実験で確認を行った。尿細管上皮細胞をIFN- γ , TNF- α 刺激下で培養し、動物実験で用いたのと同じ抗IP-10中和抗体の作用を検討した。細胞の増殖能はフローサイトメトリーによる細胞増殖期SおよびG2期の細胞の割合 (Figure 4D), および培養細胞を機械的に除去した後の増殖を見るスクラッチテスト (Figure 4A) で確認した。この作用は中和抗体濃度に依存性に細胞増殖抑制効果を示し、観察時間を変えても同様の所見が得られる事が明らかとなった。さらに、増殖細胞のマーカーであるKi67陽性細胞数の検討でも (Figure 4B, C), 中和抗体の増殖促進効果が確認された。尿細管上皮の増殖能は抗IP-10中和抗体投与下で亢進し、動物実験で得られた IP-10が細胞増殖に対して抑制的に作用する と言う点に矛盾しない結果をえた。



一方、腎原基を用いた検討では、腎原基の取り出しのタイミングと、腹膜および腸間膜への投与方法が確立した。順調に生着した場合にはレシピエントマウスの血管がドナー腎に入り、水腎症の様な状態になる事が分かった。水腎症の解除を目的とした処置が更なる大きな腎臓をつくるための重要な点である事が明らかとなった。

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 4 件)

1) Furuichi K, Wada T, Kaneko S, Murphy PM.
(1 番目)

Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury.

Front Biosci, 13, 4021-4028, 2009

査読有

2) Furuichi K, Kaneko S, Wada T. (1 番目)

Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease.

Clin Exp Nephrol, 13, 9-14, 2009

査読有

3) Furuichi K, Gao JL, Horuk R, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. (1 番目)

Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury.

J Immunol. 181, 8670-8676, 2008

査読有

4) Furuichi K, Wada T, Kitajikma S, Toyama T, Okumura T, Hara A, Kawachi H, Shimizu F, Sugaya T, Mukaida N, Narumi S, Matsushima K, Kaneko S. (1 番目)

IFN-inducible protein 10 (CXCL10) regulates tubular cell proliferation in renal ischemia-reperfusion injury.

Nephron Exp Nephrol, 109, C29-38, 2008

査読有

[学会発表] (計 5 件)

1) 古市賢吾

急性腎不全におけるケモカイン・ケモカイン受容体発現の網羅的測定

日本臨床検査医学会

2008 年 11 月 28 日, 名古屋

2) 古市賢吾

Chemokine receptor CCR2-positive macrophage is a key inflammatory cell in acute kidney injury

米国腎臓学会

2008 年 11 月 6 日, 米国, フィラデルフィア

3) 古市賢吾

腎虚血: AKI と CKD をつなぐ炎症機序とその制御

日本腎臓学会

2008 年 5 月 26 日, 福岡

4) 古市賢吾

腎虚血再還流障害における CCR1 の意義

日本臨床免疫学会

2007 年 10 月 19 日, 大阪

5) 古市賢吾

腎虚血再還流障害における CCR1 の意義

日本腎臓学会

2007 年 5 月 25 日, 浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI KENGO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号: 50432125