

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08589

研究課題名（和文）特異的な間葉系幹細胞マーカーMeflinを介した腎線維化の機序解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of function and novel therapy of mesenchymal mesenchymal stem cell marker Meflin

研究代表者

齋藤 尚二（Saito, Shoji）

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：00635609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：正常マウスならびにMeflinノックアウトマウス、Meflin-CreERT2; Rosa26-LSL-tdtomatoマウスを用いて、解析した。またMeflin-ZsGreen-DTR-Creマウスを用いてMeflin陽性細胞を消去し、その役割を解明した。これらの手法を用いる事により、Meflinは抗線維化作用を持つ分子であり、腎臓におけるPMCの新規サブグループのマーカーになりうること、また腎障害時にはMeflin陽性細胞が増殖・分化し腎臓の線維化、組織修復に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎線維化に関する研究は熾烈を極めており、様々な視点に基づいたアプローチが成されている。腎線維化には主に腎間質の間葉系細胞が関与するが、近年の研究ではPericyteを含む血管周囲間葉系細胞（Perivascular mesenchymal cell: PMC）がMyofibroblastに分化し、線維化の中心的な役割を担っていることが報告されている。今回我々は、Meflinは抗線維化作用を持つ分子であり、腎臓におけるPMCの新規サブグループのマーカーになりうること、また腎障害時にはMeflin陽性細胞が増殖・分化し腎臓の線維化、組織修復に寄与する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Analysis was performed using normal mice, Meflin knockout mice, and Meflin-CreERT2;Rosa26-LSL-tdtomato mice.

We also analysed Meflin-positive cells by using Meflin-ZsGreen-DTR-Cre mice and clarified its role. By using these methods, we found out that Meflin is could be a molecule with anti-fibrotic effects and can be a marker for a new subgroup of perivascular mesenchymal cells in the kidney, and also was suggested to contribute to tissue repair.

研究分野：腎線維化

キーワード：腎線維化 間葉系幹細胞 血管周囲間葉系細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

臓器線維化は創傷治癒における一つの転帰であり、あらゆる臓器の慢性疾患や老化による機能不全状態において普遍的に認められる組織変化である。腎臓においてはステージの進行した慢性腎臓病における腎線維化がそれに当たる。線維化とは「平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) 陽性筋線維芽細胞の増生とそれに伴う細胞外基質の沈着」と説明されるが、実は筋線維芽細胞の本態や起源は未確定で諸説あり、尿細管上皮細胞・末梢血前駆細胞・骨髄幹細胞・血管内皮細胞・周皮細胞など複数の報告がある。実験的検証(細胞系譜解析)が示されているものの一つとしては間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell; 以下 MSC) がある。MSC の最大の特徴は炎症部位集積性や腫瘍集積性を有し、さらに炎症鎮静化作用を発揮するという点である。しかしながら、炎症や腫瘍に集積した MSC は「諸刃の剣」であり、問題は集積した MSC が時間経過とともに  $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞に分化し線維化をもたらすことである。

研究代表者はドイツで Goettingen Medical Center の Michael Zeisberg 教授の研究室にて長らく腎線維化の研究に携わってきた。中でも Wnt シグナルとの関係性に着目し、Wnt シグナルが腎線維化に大きな役割を果たす事を報告してきており (Saito et al, Fibrogenesis Tissue Repair, 2015) 更に腎間質の線維化の原因となる筋線維芽細胞の起源を探索してきた。そんな中、私達は最近もっとも MSC に特異的なマーカー分子として Meflin (メフリン) を同定した (特願 2015-153712、Maeda et al, Sci Rep, 2016)。Meflin はこれまでの MSC マーカーと異なり、造血幹細胞、血球、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、神経細胞、癌細胞には発現しない。更に私達は予備的検証としてマウス心筋梗塞モデルの梗塞部位に Meflin 陽性細胞が高度に集積すること、また Meflin ノックアウトマウスでは梗塞後心臓破裂による死亡率が高いことを明らかにした。このことは炎症の早期に集積する Meflin 陽性 MSC が組織の修復に重要であることを示唆している。しかしながら前述の通り、問題はこの炎症部位に集積した Meflin 陽性 MSC が時間経過とともに  $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞に分化し、組織の線維化を引き起こすことである。

そこで私たちは「Meflin 陽性 MSC は炎症部位に集積し修復に寄与するが、病態の経過とともに Meflin 陰性・ $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞へ分化し、腎間質の線維化に関与している。」という仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

Meflin の腎臓における予備実験結果や他臓器における知見をあわせて、我々は腎臓においても Meflin、または Meflin 陽性細胞が腎線維化を抑制するという仮説を考えている。この研究を通じて腎線維化の機序の解明と臓器不全に対する治療法を開発することを目指している。

## 3. 研究の方法

- 1) Meflin の正常腎ならびに疾患モデルマウスにおける発現を正常マウスならびに Meflin ノックアウトマウスを用いて解析する
- 2) Meflin 陽性細胞の腎線維化に関する役割を Meflin-CreERT2; Rosa26-LSL-tdtomato マウスを用いて経時的・空間的に系譜追跡し解明する
- 3) Meflin-ZsGreen-DTR-Cre マウスを用いて Meflin 陽性細胞を消去し、その役割を解明する
- 4) Meflin の発現を誘導することにより、腎線維化進展や臓器不全の予防につながる治療法を開発する

#### 4 . 研究成果

近年の腎線維化の研究ではPericyteを含む血管周囲間葉系細胞( Perivascular mesenchymal cell: PMC )が Myofibroblast に分化し、線維化の中心的な役割を担っていることが報告されている。

我々は、Meflin が正常な腎臓において Pericyte を含む血管周囲間葉系細胞 ( Perivascular mesenchymal cell: PMC ) のマーカー分子であることを同定した。

野生型マウス腎、ヒト腎生検検体に対する In situ hybridization、および Meflin レポーターマウス ( Meflin-CreERT2;Rosa26-LSL-tdTomato マウス ) を使用した腎組織の解析により、Meflin が主に腎臓の血管周囲に存在することを見出した。また、マウス腎の透明手法を用いて Meflin 陽性細胞が特に糸球体血管極周囲に局在していることも明らかにした。ジフテリア毒素により正常腎における Meflin 陽性細胞を除去したところ、血管壁の著明な菲薄化および  $\alpha$ -SMA、Colla1 の増加を認めたことから、Meflin 陽性細胞が構造的にも機能的にも PMC の中でも重要な細胞集団であることが示唆された。

さらに、UUO モデルを用いて腎障害時における Meflin の挙動を解析したところ、Meflin は障害早期から著明な増加を認め、Meflin 陽性細胞は正常時に巻き付いていた血管から離脱し間質で増殖していくことを発見した。増殖した Meflin の分布は、筋線維芽細胞マーカーとして知られる  $\alpha$ -SMA とは異なる分布を示しており、Meflin 陽性細胞が従来の線維化促進性の線維芽細胞とは異なる細胞集団であることを示唆していた。ヒト腎生検検体を用いた解析においても、Meflin の発現量は腎線維化と有意に相関しており、長期的な腎予後とも有意な関連を認めた。また、腎障害後にジフテリア毒素による Meflin 陽性細胞除去を誘導したマウスでは、腎組織における  $\alpha$ -SMA 陽性像の低下、および Colla1 mRNA の発現低下を認めた。Meflin 分子を強制発現させた腎線維芽細胞株においては、TGF- $\beta$  刺激に対する線維化マーカーの反応が抑制され、 $\alpha$ -SMA および Vimentin の上昇が抑えられた。

以上の結果より、Meflin は抗線維化作用を持つ分子であり、腎臓における PMC の新規サブグループのマーカーになりうること、また腎障害時には Meflin 陽性細胞が増殖・分化し腎臓の線維化、組織修復に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minatoguchi Shun, Saito Shoji, Furuhashi Kazuhiro, Tsuboi Naotake, Esaki Nobutoshi, Matsuyama Makoto, Shiraki Yukihiro, Kobayashi Hiroki, Asai Naoya, Enomoto Atsushi, Maruyama Shoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel renal perivascular mesenchymal cell subset gives rise to fibroblasts distinct from classic myofibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09331-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3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、齋藤尚二、榎本篤、丸山彰一
2. 発表標題 A novel renal perivascular mesenchymal cell subset that expresses mesenchymal stem cell marker Mefflin (Islr) and gives rise to fibroblasts distinct from classic myofibroblasts
3. 学会等名 Japan Kidney Council
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湊口俊、齋藤尚二、榎本篤、丸山彰一
2. 発表標題 腎血管周囲間葉系細胞（Perivascular mesenchymal cell）の新しいサブグループの同定
3. 学会等名 分子腎フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湊口俊、齋藤尚二、丸山彰一
2. 発表標題 The mesenchymal stem cell marker Mefflin defines a novel subset of renal fibroblasts and counteracts the action of TGF
3. 学会等名 American Society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学 腎臓内科 研究について  
<https://www.nagoya-kidney.jp/regeneration>  
名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学 腎臓内科  
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/kidney/research/regeneration.html>

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	丸山 彰一  (Maruyama Shoichi)  (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	
研究分担者	古橋 和拡  (Furuhashi Kazuhiro)  (50835121)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師   (13901)	
研究分担者	榎本 篤  (Enomoto Atsushi)  (20432255)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------