

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790966

研究課題名 (和文) ヒト尿中からのヒト腎臓組織幹細胞の単離培養と同細胞の分化・器官形成能の検討

研究課題名 (英文) Isolation of human renal stem cells from urine of pediatric patients with nephropathy

研究代表者

熊谷 直憲 (KUMAGAI NAONORI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40400329

研究成果の概要 (和文)：

各種小児腎疾患患者尿からの培養細胞中には、腎臓に存在する組織幹細胞と考えられる CD24 陽性 CD133 陽性 Podocalyxin (PDX) 陰性細胞、CD133 陰性 CD146 陽性細胞、side population cell が存在し分離培養可能であり、これらの細胞は多分化能を持つことが示唆された。

腎疾患患者の尿からは腎臓の再生医療に有用と考えられる腎臓由来の幹細胞を入手できるため、同細胞を用いた再生医療への応用が強く期待できる。

研究成果の概要 (英文)：

Renal stem cells such as CD24+CD133+podocalyxin+ cells, CD133-CD146+ cells, and side population cells were cultured from the urine of pediatric patients with nephropathy. These cells showed the ability to differentiate into various types of renal cells. Urine may be a useful tool for regenerative medicine for kidney disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：尿中落下細胞、腎臓組織幹細胞、腎臓間葉系幹細胞、再生医療、side population cell、小児、腎疾患、フローサイトメーター

1. 研究開始当初の背景

すべての腎疾患は進行すると終末像である末期腎不全に至り、血液浄化療法すなわち人工透析が唯一の治療法となる。人工透析は患者の生命予後を改善した一方、患者の生活の質を低下させ、かつ多額の医療費を必要とする。近年、糖尿病患者の増加に伴い糖尿病

腎症から末期腎不全に至り人工透析が導入される患者が増大し、透析医療費の増大が問題になっている（渡辺誠ら 腎と透析 62:1013-18, 2007）。

近年、各分野において再生医療が注目を浴びている。ヒトには胚性幹細胞や骨髄幹細胞などの多能性幹細胞や組織特異的な組織幹

細胞が存在し、これらの細胞を用いて臓器や臓器の機能を再生し臨床応用を目指すのが再生医療である。末期腎不全においても再生医療が可能となり腎機能の回復が図れば人工透析からの離脱が可能となり、人工透析患者への福音となるのみならず医療費の削減に大いに寄与することとなる。

ヒト腎臓においては急性尿細管壊死の際に尿細管細胞が分裂増殖し完全な回復が得られることが知られており、尿細管細胞における幹細胞の存在を示唆するものと考えられていた。近年ヒトにおいて腎臓の間質に存在する CD133 陽性細胞 (Bussolati B et al. *Am J Pathol* 2005 Feb 166(2):545-55) や、Bowman 嚢に存在する CD24、CD133 両陽性細胞 (Sagrinati C et al. *J Am Soc Nephrol* 17:2443-2456, 2006) が腎臓における組織幹細胞の一つである可能性が示された。

これらの細胞は、*in vitro* において自己複製能と糸球体内皮細胞や尿細管細胞等に分化するなどの多分化能を有し、免疫学的マウスに接種されるとその体内で尿管を形成し、腎障害を生じさせた実験動物に接種すると腎機能回復を促進する働きがあることが示されている。

また、骨髄由来のヒト間葉系幹細胞を胎児ラット内で培養後、ラットの大網内に接種すると、ラットの大網内にて糸球体様組織を含むヒト腎臓様組織を形成する (Takahashi Y et al. *J Am Soc Nephrol* 17:1026-34, 2006) ため、同細胞を用いて異種動物の体内におけるヒト腎臓の器官培養が試みられ、臨床応用が期待されている。

しかしながらこれらの研究において、幹細胞はヒト腎臓やヒト骨髄から採取されるため幹細胞の採取には侵襲的な手技が必要でかつ効率良く大量の幹細胞を採取することは困難であり、また同細胞から形成された腎臓組織の詳細な機能解析は行われていないなど臨床応用にいたるまでの問題点も多い。

ヒト尿中には腎臓を構成する各種の細胞が含まれており、本研究代表者の所属する東北大学小児科腎疾患研究チームは本邦ではじめてヒト尿中よりこれらの細胞を効率よく培養することに成功した (Inoue CN et al. *Clin Nephrol.* 53(2):90-8, 2000 尿中落下細胞培養系の確立)。

この尿中落下細胞培養系では近位尿細管細胞や遠位尿細管細胞、ポドサイト、エリスロポエチン産生細胞、また未発表のデータではあるがメサンギウム細胞、糸球体内皮細胞など腎臓を構成する主要な細胞が培養され、かつそれぞれの細胞の機能が高度に保たれている (Inoue CN et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 39(8-9):364-7, 2003、本研究代表者 Kumagai N et al. *Clin Sci.* 99(6):561-7, 2000、本研究代表者 第 50 回日本腎臓学会発表)。

本研究代表者は現在この尿中落下細胞培養系を用いてヒト尿中からヒト腎臓の組織幹細胞の同定及び分離培養を試みている。予備実験の段階ではあるが、尿中落下細胞培養系を用いて各種腎疾患患者尿から培養した細胞中では RT-PCR 法による検討で、幹細胞に特異的とされる Oct3/4、Nanog、Bmi-1、CD133 遺伝子の発現と腎臓組織幹細胞のマーカーと考えられる CD24、CD133 遺伝子の発現が認められた。

以上の結果から、尿中には腎臓を構成する主要な細胞へと分化可能な腎臓の組織幹細胞が存在し、尿中落下細胞培養系は同細胞を効率よく培養していると考えられる。

以上の背景から、本研究は、ヒト尿中より尿中落下細胞培養系を用いて腎臓の組織幹細胞の同定と単離培養を行い、同細胞を利用した腎臓の再生医療を目標とした基礎研究を行うものである。

2. 研究の目的

本研究課題は以上の背景から、

(1) ヒト尿中から尿中落下細胞培養系を用いた腎臓の組織幹細胞の同定及び同細胞の単離培養。

(2) 同細胞の *in vitro* における培養条件、分化増殖能の検討。
を目標とする。

これらの目標を達成することにより、ヒト尿中より腎臓の組織幹細胞の同定と単離培養が可能となり、同細胞を利用した腎臓の再生医療を目標とした基礎研究が可能になるものである。ヒト尿中から腎臓の組織幹細胞の同定と単離培養が可能となれば、組織幹細胞採取に適した方法となるのみならず、同細胞

胞の分化増殖能を解明することにより自己の組織幹細胞を利用した腎臓の再生医療の実現に向けての幅広い検討や研究が可能になるものである。

具体的には、

(1) 再生医療に必要とされる幹細胞は骨髄や各臓器内に存在するとされ、その採取のためにはこれまで侵襲的な手段が必要であり限られた量しか採取できなかつた。尿中から腎臓の組織幹細胞の単離培養が可能となれば、尿は毎日大量に生体内で生成され体外に排出されるため全く非侵襲的に繰り返し必要なだけ自己の幹細胞を採取できるため再生医療への応用に非常に適した存在となり得る。

(2) 尿中落下細胞培養系で培養される腎臓の組織幹細胞は、これまでに想定されている組織幹細胞に比べより幅広くかつ高度な分化能を有していると考えられる。従って同細胞の単離培養が可能となりその分化増殖能を解明できれば、同細胞を用いた *in vitro* における腎臓の器官培養や腎臓内に存在する同細胞を活性化させる *in vivo* における再生医療などの腎臓の再生医療の実現に向けての幅広い検討や研究が可能になることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) ヒト尿中から尿中落下細胞培養系を用いた腎臓の組織幹細胞の培養

ヒト尿中より尿中落下細胞培養系を用いて細胞培養を行い、予備実験の結果や実験動物やヒトで確立された幹細胞や組織幹細胞同定の研究方法を基に腎臓由来の組織幹細胞が培養可能かどうか検討する。

具体的には、腎臓の組織幹細胞と考えられる予備実験の結果から判明している培養細胞中に発現が認められた幹細胞や組織幹細胞のマーカーである CD24、CD133、Podocalyxin (PDX)、CD146 などの遺伝子の発現を RT-PCR 法にて行う。また、幹細胞の性質を利用し Hoechst 色素-FACS 法を用いた side population cell (SP 細胞) の同定などから幹細胞の候補を絞り込む。

また、これらの細胞が、細胞が由来する疾患により得られる細胞の違いがあるかどうかあわせて検討する。

(2) ヒト尿中から尿中落下細胞培養系を用いた腎臓の組織幹細胞の分離培養

培養された組織幹細胞をその細胞のマーカーを基に FACS 法を用いて培養細胞中から単離し培養を行う。単離培養した細胞を用いて、これまでに知られている腎臓発生上重要なまたは組織幹細胞特異的な遺伝子やタンパク質の発現を RT-PCR 法や免疫染色法、免疫沈降法、タンパク質電気泳動法などにより検討し、同細胞の形質解析を行う。

(3) *In vitro* における組織幹細胞の分化増殖能の検討

組織幹細胞は培養条件を変更することにより各種細胞へ分化することが知られている。そこで各種分化増殖制御因子を単因子または多因子で組み合わせ、またコラーゲン等の各種細胞外基質を変更し (Hishikawa K et al. BBRC 328:288-91, 2005) 単離培養された組織幹細胞を培養し、同細胞がどのような培養条件下でどのような細胞へ分化するのか、また同時にどのような遺伝子が分化に関与しているのかを RT-PCR 法や蛍光染色などの免疫染色法、タンパク質電気泳動法、免疫沈降法などを用いて各種遺伝子やタンパク質の発現、細胞形態の変化などから検討する。

4. 研究成果

(1) 小児腎疾患患者尿より腎臓組織幹細胞が培養可能かどうかの検討を行った。腎臓組織幹細胞の候補として、1) CD24 陽性 CD133 陽性 PDX 陰性細胞、2) CD133 陰性 CD146 陽性細胞、3) SP 細胞を検討した。

尿中落下細胞培養系を用いて IgA 腎症、Alport 症候群、紫斑病性腎炎、ループス腎炎、急性糸球体腎炎などの各種小児腎疾患患者尿より細胞を培養したところ、尿蛋白や血尿などの腎障害が示唆される尿所見のある患児では高率に培養が可能であった。

次に、RT-PCR 法により培養尿中落下細胞中の CD24、CD133、PDX、CD146 の mRNA の発現を検討した。培養尿中落下細胞中では患児の疾患によらず CD24、CD133、PDX、CD146 の mRNA の発現が認められた。

これらの結果から、培養尿中落下細胞中に

は、細胞が由来する患児の疾患によらず CD24、CD133、PDX、CD144 分子のそれぞれ陽性、陰性細胞が存在すると考えられた。

(2) フローサイトメーター (FCM) を用いて培養尿中落下細胞中より CD24 陽性 CD133 陽性 PDX 陰性細胞、CD133 陰性 CD146 陽性細胞の単離培養を試みた。FCM による解析では、培養尿中落下細胞中には実際に CD24 陽性 CD133 陽性細胞 PDX 陰性細胞と CD133 陰性 CD146 陽性細胞が存在しており、それぞれ単離培養が可能であった。

(3) 単離培養した CD24 陽性 CD133 陽性 PDX 細胞は、定量的 RT-PCR の検討からは培養条件を変更することにより糸球体上皮細胞や尿管細胞へ分化する傾向があることが判明した。

(4) 培養細胞中には特殊染色により骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞の形質を示す細胞が存在することが判明した。これらの細胞の共通の起源として腎臓間葉系幹細胞である CD133 陰性 CD146 陽性細胞を想定し検討した。FCM にて培養尿中落下細胞より単離培養した同細胞は、培養条件を変更することにより骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化する傾向が認められた。

(5) 培養尿中落下細胞中には、Hoechst 色素と反応させると色素の濃度が上昇するにつれて減少する分画が存在することが FCM を用いた解析で判明した。同分画の細胞は Hoechst 色素の存在下で verapamil と反応させると verapamil 濃度が上昇するに従い減少することが判明した。

以上の結果から同分画の細胞は多分化能を持つと考えられる SP 細胞であると考えられた。

以上より小児腎疾患患者尿からは尿中落下細胞培養系を用いることにより、その疾患の種類に関わらず各種細胞へ分化可能な腎臓由来の各種の幹細胞の培養が可能であると考えられた。

尿からは、全く非侵襲的に必要な自己の腎臓由来の幹細胞を採取できるため同細胞を用いた再生医療への応用が強く期待できる。現在これらの細胞を用いた in vitro の腎臓再生医療への応用の検討を行って

いる。

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)

[学会発表] (計 7 件)

1. 熊谷直憲、佐藤美季、中山真紀子、鎌田文頭、森本哲司、稲垣徹史、根東義明、土屋滋 小児腎疾患患者尿からの腎臓間葉系幹細胞の分離培養 第 10 回再生医療学会 2011 年 3 月 11 日 東京

2. Kumagai Naonori et al Isolation of human renal mesenchymal stem cells from urine of pediatric patients with nephropathy IPNA2010 (国際小児腎臓病学会) 2010 年 9 月 1 日 ニューヨーク (米国)

3. 熊谷直憲、佐藤美季、菅原典子、鎌田文頭、森本哲司、稲垣徹史、根東義明 小児腎疾患患者尿からの腎臓間葉系幹細胞の分離培養 第 45 回日本小児腎臓病学会 2010 年 7 月 2 日 大阪

4. 熊谷直憲、菅原典子、鎌田文頭、森本哲司、稲垣徹史、根東義明 小児腎疾患患者尿からの腎臓組織幹細胞の分離培養 第 45 回日本小児腎臓病学会 2010 年 7 月 2 日 大阪

5. 熊谷直憲、菅原典子、鎌田文頭、森本哲司、稲垣徹史、根東義明 小児腎疾患患者尿からの腎臓組織幹細胞の分離培養 第 53 回日本腎臓学会 2010 年 6 月 18 日 神戸

6. 熊谷直憲、菅原典子、鎌田文頭、森本哲司、稲垣徹史、根東義明 小児腎疾患患者尿からの腎臓間葉系幹細胞の分離培養 第 53 回日本腎臓学会 2010 年 6 月 17 日 神戸

7. 熊谷直憲、佐藤美季、菅原典子、鎌田文頭、森本哲司、根東義明、土屋滋 小児腎疾患患者尿からの腎臓組織幹細胞の分離培養 第 9 回再生医療学会 2010 年 3 月 19 日 広島

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 直憲 (KUMAGAI NAONORI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40400329

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：