

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591194

研究課題名(和文)腎尿細管細胞の脱分化・再生の過程におけるDNA修復、細胞周期、細胞死制御の解明

研究課題名(英文)Analysis of DNA repair, cell cycle progression and cell death in dedifferentiation and regeneration of renal tubular cells

研究代表者

平野 世紀(HIRANO, SEIKI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20368616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全から透析に至る患者の増加は社会問題となっており、腎障害および障害の修復、再生の分子メカニズムを解析することにより、急性腎不全/慢性腎不全の予防的治療への方策を検討している。腎尿細管細胞株を利用し、細胞周期(細胞分裂に至る過程)、細胞増殖、細胞死について検討を行い、細胞が障害を受けると、尿細管になる前段階の細胞に近づく現象(脱分化)および、尿細管を形成する様子が観察された。今後、さらなる解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The number of hemodialysis patient is increasing, which is a critical problem in Japan. To analyze repair and regeneration of renal tubular cells after renal failure will contribute the way of preventive therapy of renal disease. I found that renal tubular cells express the markers of dedifferentiation after cell damage and they form tubule when the marker is expressed. I am trying to do further analyses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：分科：内科系臨床医学 細目：腎臓内科学

キーワード：腎尿細管障害

1. 研究開始当初の背景

現在全国で末期腎不全により透析療法を行っている患者は29万人を超えており、今後糖尿病性腎症の増加、高齢化により、その数はさらに増加することが予想されている。

慢性腎不全は不可逆的であり、進行性であるため、今後の患者数の増大および医療経済学的にも、その発症メカニズムを解明することは重要である。

CKD(Chronic Kidney Disease)およびAKI(Acute Kidney Disease)の概念が提唱されて以来、腎不全に対する病態生理の解明が急務であるのは疑いのないところである。しかし、腎臓がヘテロな細胞から成り立っており、かつ、生命の維持に必須の臓器であるがために、現象論的な解析が多くなされており、分子生物学的なアプローチが他の臓器に比較して難しく、その発症メカニズムが詳細に解明されているとは言いがたいところがある。

2. 研究の目的

(1) 腎尿細管細胞の脱分化・再生の過程におけるDNA修復、細胞周期、細胞死制御の解明を行う。

具体的には腎尿細管脱分化細胞の同定、尿細管細胞死におけるDNA修復の重要性の解明について細胞生物学的、分子生物学的解析を行う。

(2) 本研究の目的は、腎尿細管障害、細胞死、細胞の増殖及び組織再生を一連のものとして捉え、その各過程で尿細管細胞にどのような「運命づけ」がなされるかを解明することにある。特に尿細管障害の時に生じるDNA障害の修復と、腎尿細管の脱分化および増殖の関係に注目している。

DNA障害が細胞内に生じると、細胞はゲノム恒常性の維持のために様々な反応を示す。さらに、DNA障害がゲノム中に蓄積することにより細胞は癌、神経変性、老化の原因となる。尿細管細胞においても同様の反応が起こると考えられるが、腎尿細管細胞は最終分化した細胞と考えられており、そのような細胞におけるDNA修復メカニズムはまだ不明な点が多い。

申請者は尿細管の脱分化が生き残った尿細管に生じたDNA障害の修復に必要なかと考えた。

3. 研究の方法

(1) 腎尿細管脱分化細胞の同定

(2) 尿細管細胞死におけるDNA修復の重要性の解明

これらの解析を行うために、FUCCIマウスを利用することとした。細胞周期が可視化できるこのトランスジェニックマウスを利用し、まずはin vivoで腎尿細管障害後の細胞周期進展、DNA障害及び修復の過程を確認する。さらに、FACSソーティングにて特定の細

胞周期にいる細胞のプロフィールを解析することにより、腎尿細管脱分化細胞の同定、DNA修復の重要性について検討する。また、FUCCIマウス由来の尿細管細胞株を樹立し、さらなる解析を行うこととした。

4. 研究成果

研究当初は、研究分担者である寺田と共に、腎尿細管細胞の増殖及び再生についての研究を行った。

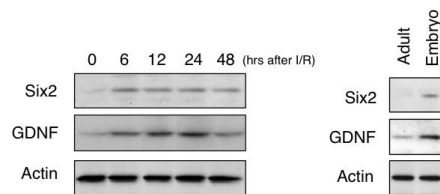
Six2は、腎臓の発生及び腎前駆細胞の維持に必要な転写因子である。また、GDNFは腎の発生に重要な役割を演じている転写因子である。

Six2-GDNF経路は腎臓の発生に重要な経路であると考えられるが、急性腎障害後の腎尿細管の増殖及び再生に寄与しているかは明らかではなかった。

そこで我々は、ラット腎における虚血再灌流実験により以下のことを明らかにした。

(1) Six2およびGDNFは虚血再灌流により腎尿細管で発現が亢進した(図1, 2)。(2) NRK細胞において、HGFやEGF等の細胞増殖因子はSix2およびGDNFの発現を増加させた(図2)。(3) 3D-Gelにおいて、Six2は尿細管細胞の管腔形成を促進した(図3)。

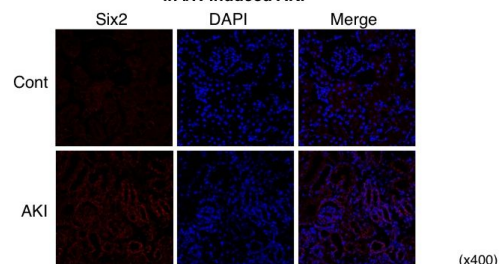
Western blot analysis of protein expression of Six2 and GDNF after ischemic renal failure



The left renal artery was clamped for 60 min and the left kidney was excised at 0, 6, 12, 24, and 48h after reperfusion. Western blot analysis was used to detect the protein levels of Six2, GDNF, and Actin.

(図1)

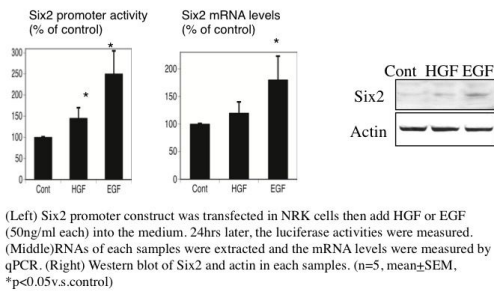
Six2 positive cells are increased in proximal tubules in I/R-induced AKI



Immunofluorescent analyses of Six2 expression in proximal tubules after ischemic injury. Cy3-conjugated antibody was used as a secondary antibody.

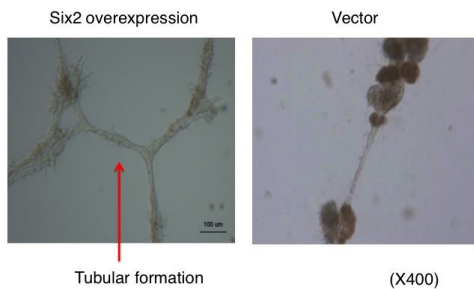
(図2)

**EGF and HGF stimulate Six2 promoter activity and protein expression in NRK cell**



( 図 3 )

**Six2 promotes tubular formation of NRK cells in the presence of low concentration (10ng/ml) of HGF in 3D gels**



( 図 4 )

以上より、Six2-GDNF 経路は急性腎障害後の尿細管細胞増殖及び再生に寄与していると考えられた。この結果は ASN Kidney week 2011 でポスター発表を行った。

以上の研究と共に、さらに現計画の実験を遂行した。

当初の研究計画では、細胞周期を蛍光標識した蛋白により in vivo でモニターできる Fucci マウスを使用し、急性腎障害後の細胞周期および細胞増殖の解析を行う予定であった。また、ラットによる腎虚血再灌流実験により、再灌流後の細胞周期関連蛋白及び脱分化因子の発現の変化は確認されていた。しかしながら、予備実験として通常のマウスによる腎虚血再灌流モデル実験を行い、同様の変化は確認は出来たものの、再現性および実験結果の一貫性に問題があり、信頼性のある結果を得ることが出来なかった。また、当方の問題として、人員不足によりマウス実験の継続が難しくなった。

以上の問題点より、下記の細胞系での実験系構築を目指した。

( 1 ) 腎尿細管細胞 (NRK 細胞) および尿細管と同様に幹細胞 (未分化状態の細胞) において増殖し、その後分化すると考えられる骨格筋細胞 (C2C12 細胞株) をモデルとして、細胞周期マーカーとして蛍光タンパクを発現させる Fucci vector を各細胞内に導入し

て、蛍光標識により細胞周期が確認できる細胞株の樹立を目指す。

骨格筋細胞株 C2C12 は、in vitro で分化誘導が可能であり、この株をコントロールとして使用することにより、細胞増殖過程と細胞の分化および細胞傷害による起こると考えている脱分化の過程を区別できるのではないかと考えている。

( 2 ) 低酸素負荷 (虚血再灌流モデル)、H2O2 等の負荷 (酸化ストレスモデル)、シスプラチン (シスプラチン腎症モデル) による細胞周期の進展を蛍光顕微鏡で観察し、ウェスタンブロットで各サイクリン、CDK の発現パターンを確認する。また DNA 障害および修復過程を、ATR、ATM のリン酸化、53BP1、H2AX、Ku、Rad51、DNAPKcs 等の発現を免疫染色で確認する。

( 3 ) 虚血に対する反応を確認するために、HIF-1 の発現を確認するとともに、細胞の代謝状態を確認するために、ミトコンドリアを細胞内から抽出し、ミトコンドリア DNA の障害の程度などを確認する。

( 4 ) ヒト腎尿細管細胞を用いて、同様の負荷実験を行い、再現性のある結果が得られるかを確認する。

これらの in vitro の実験系を確立することにより、当初に計画していたマウスを用いた実験系に代わる、急性腎不全に対する新しい知見が得られると期待している。

現在のところ残念ながら細胞株の樹立は成功していない。樹立後、上記の実験を進めていくことになるため、当初の 3 年間の計画を計画通りに遂行できなかったことは非常に心苦しく感じている。

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 1 件 )

Seiki Hirano, et al.

Six2-GDNF Pathway Is Activated during Experimental Acute Kidney Injury and Plays a Crucial Role in Renal Tubular Regeneration. American Society of Nephrology Kidney Week 2011 , 2011 年 11 月 12 日, ペンシルベニアコンベンションセンター, フィラデルフィア, USA

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平野 世紀 (HIRANO, SEIKI)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号 : 20368616

(2) 研究分担者

寺田 典生 (TERADA, YOSHIO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：30251531