

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461206

研究課題名(和文)腎臓発生研究成果を臨床医療に応用するための基盤研究 - 腎疾患モデルと臓器再生モデル

研究課題名(英文)Basic research from kidney developmental biology to clinical nephrology: Organ regeneration and disease models

研究代表者

白井 丈一 (Usui, Joichi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70447340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はES・iPS細胞由来キメラ腎臓・脾臓の作成に成功し評価を得ている。腎臓発生メカニズムを応用し複数の腎臓研究課題(腎疾患の病態解明、腎臓再生を目的とした)。A：腎発生のKey転写因子であるTcf21の腎疾患・蛋白尿制御への関与を、ヒト・ラット腎疾患モデル腎組織、糸球体培養細胞を用いて確認した。B：腎臓発生に寄与する血管新生分子VEGFと腎臓病との関連性の検討：抗VEGF阻害薬関連腎障害を臨床病理学的に検討し、糸球体機能維持・障害への関与を確認した。C：In vitroアッセイ法の応用による腎臓再生：マウス胎仔腎臓の前駆細胞分画の純化法の検討を継続している。

研究成果の概要(英文)：My research about organogenesis using ES, iPS cells has already been published. The present nephrology research included some issues (Tcf21, VEGF and kidney progenitors). A. Tcf21 expression and functional mechanism in glomerular podocytes of various kidney diseases: Tcf21 expression increased in podocytes of human and rat nephrotic syndrome, and then Tcf21 functionally influenced some cellular phenotypes in murine podocyte cell line. B. Clinicopathology in VEGF inhibitor-associated kidney diseases: VEGF inhibitors act to maintain glomerular capillaries, and the failure of this construction induced final glomerular damage. C. In vitro assays for murine nephrogenesis: The establishment of nephrogenesis assay system was continued, then some candidate tools were confirmed.

研究分野：内科学

キーワード：内科 腎臓病学 再生医学 発生・分化 病理学

### 1. 研究開始当初の背景

発生メカニズムの解明は 1990 年代より発生工学の技術開発、再生医学への着眼・展開により急速に進歩を遂げている。腎臓発生も同様に、数多くの Key 分子や pathway の関与が報告され、腎疾患での病態メカニズムや再生医学研究などへ展開されている。申請者は、再生医学研究プロジェクトにおいて ES 細胞・iPS 細胞由来キメラ腎臓・膵臓の作成に成功し、国内外で大きな反響・評価を得ている (Cell 2010、Am J Pathol 2012、朝日新聞他新聞各紙 H20 年 3 月 12 日、読売新聞 H21 年 3 月 9 日)。末期腎不全患者の発症数の推移に近年鈍化がみられているものの、糖尿病性腎症や高齢者の増加に伴い依然として行政上 (医療費) も重点課題に挙げられ、更なる予防・治療対策が検討されている。すなわち腎疾患の病態解明・治療法開発は腎臓領域の重点課題であり、末期腎不全患者数の抑制に努力する必要が求められている。また、本邦では献腎ドナーからの腎臓提供数は十分でなく、全世界的にも慢性的なドナー不足のため末期腎不全に陥ってから腎移植施行までの期間はむしろ延長しつつある。将来的な末期腎不全患者の増加に伴う施設や医療費などの医療環境に対応するためには十分量のドナー腎臓の確保は解決すべき深刻な問題であり、腎臓再生医療に求められる課題である。今回のプロジェクトでは、腎臓分化プロセスへの幹細胞システムの評価のための *in vivo* モデル (キメラ腎臓) 以外に主にクローナルな *in vitro* 腎臓分化アッセイ系の開発を目指す。

同時に、腎臓発生・再生の知見を元に、ヒト腎疾患のメカニズムを解明する試みがなされている。例えば、Basic helix-loop-helix 型転写因子 Tcf21 (Pod1、Capsulin、Epicardin) は腎臓、肺、心臓、脾臓、生殖細胞などの発生・分化に必須な分子である。特に上皮-間葉転換 (EMT) に関与し、腎臓発生では後腎間葉に高発現し、KO マウスを用いた解析から腎臓形成に必須であることが証明されている (Development 1999、PLOS One 2012)。一方、成体では糸球体ポドサイトに高発現しているものの、腎疾患や蛋白尿制御への関与は未解明である。そのため、ヒト腎疾患、小動物腎疾患モデルを用いた成体の糸球体ポドサイトにおける Tcf21 の機能解析を進めることとした。同様に、血管内皮成長因子 (VEGF) - VEGF 受容体系は腎臓発生、特に糸球体毛細血管を含む血管形成を司る主分子群である。糸球体前駆体では糸球体ポドサイト前駆細胞に発現し、糸球体内皮細胞を誘導し、糸球体毛細血管の形成を完了する。その後、成体腎臓の糸球体においても糸球体ポドサイトに VEGF の高発現は維持され、糸球体毛細血管の構造維持に機能していることが推察されている。近年、抗がん治療薬として VEGF-VEGF 受容体系の阻害薬が開発、広く普及してきている。この

VEGF 阻害薬は、その副作用として蛋白尿、腎機能障害を呈することが報告されており、ヒトの糸球体毛細血管の機能・構造の維持への関与が示唆されているが、その詳細機序に関しては更なる検討の価値があるものと思われる。その他、各種 Key 分子の知見を元にヒト腎疾患のメカニズムの検討が進められている。

### 2. 研究の目的

2 つの腎臓領域の主たる課題、腎疾患の病態解明・治療法開発、ドナー腎臓の作成を目的とし、申請者の経験やこれまでの研究成果を活用することが可能な腎臓発生メカニズムを応用することで、新規的な数多くの成果を挙げるべく研究を行う。

具体的には、腎疾患の病態解明・治療法開発として、プロジェクト A: 腎臓の Key 転写因子である Tcf21 の腎疾患・蛋白尿制御への関与の検討を、途中で追加プロジェクトとして、プロジェクト B: 腎臓血管形成のキー成長因子である血管内皮成長因子 (VEGF) の阻害薬に関連した腎障害の臨床病理学的解析を行った。ドナー腎臓の作成として、プロジェクト C: *In vivo* (blastocyst complementation を用いたマウス腎臓作成) および *in vitro* アッセイ法の応用による腎臓再生医療モデルを前年より継続して進めた。

### 3. 研究の方法

プロジェクト A: Tcf21 の腎疾患・蛋白尿制御への関与、途中で追加したプロジェクト B: VEGF 阻害薬に関連した腎障害の臨床病理学的解析、継続したプロジェクト C: *in vitro* 実験法の応用による腎臓再生医療モデルの各検討を行った。

プロジェクト A. ヒト腎炎・腎炎モデル組織 (*in vivo*)、糸球体ポドサイト培養細胞 (*in vitro*) における Tcf21 の発現解析、糸球体ポドサイト培養細胞強制発現系での Tcf21 の機能解析 (*in vitro* 実験系) を行なった。

(1) 微小変化糸球体、IgA 腎症、微小変化型ネフローゼ症候群、膜性腎症患者の腎生検組織を使用し、抗 Tcf21 抗体を用いた免疫組織化学を実施し、糸球体ポドサイトでの発現量を判定量評価した。

(2) ラットネフローゼ症候群モデル (PAN 腎症のネフローゼ症候群極期および寛解期) の腎組織を使用し、抗 Tcf21 抗体を用いた免疫組織化学を実施し、糸球体ポドサイトでの発現量を評価した。

(3) マウス糸球体ポドサイト培養細胞を入手し、抗 Tcf21 抗体を用いた免疫組織化学、ウエスタンブロット (蛋白レベル)、RT-PCR (mRNA レベル) を実施し、糸球体ポドサイトでの Tcf21 の発現量を評価した。

(4) Tcf21 強制発現糸球体ポドサイト培養細胞での Tcf21 の機能解析 (*in vitro* 実験系): マウス糸球体ポドサイト培養細胞にマウス

Tcf21 遺伝子導入を行い、高発現細胞株を作成し、in vitro 環境での Tcf21 の分子機能を検討する。

プロジェクト B.腎臓血管形成のキー成長因子である VEGF の阻害薬に関連した腎障害の腎病理組織解析、尿中ポドサイト検査を行った。

(1)抗 VEGF 阻害薬投与による腎障害を呈した担癌患者 5 例の、臨床所見、病理組織所見、治療経過や予後を検討した。この検討は米国 Weil Cornell Medical College 病理学教室との共同研究である。

(2)抗 VEGF 阻害薬投与による腎障害を呈した担癌患者 5 例の臨床所見と尿中落下ポドサイト検査を検討し、糸球体ポドサイト脱落に起因する糸球体障害進展メカニズムを考察した。

プロジェクト C. *In vitro* マウス腎臓分化アッセイ系の開発と腎臓幹細胞の純化法の確立に継続して取り組んだ。

・Wnt4 発現フィーダー細胞上でのマウス胎仔腎臓前駆細胞の分化アッセイは当研究室で確立している。自己作成した抗胎仔腎臓抗体を含む細胞表面抗原に対する抗体を用いマウス胎仔腎臓細胞の発現パターンは解析済みであり、幹細胞・前駆細胞分画の純化法、最適環境のメカニズム(幹細胞ニッチ)の解明を進めた。

#### 4. 研究成果

プロジェクト A. Tcf21 の腎疾患・蛋白尿制御への関与(論文未発表であり成果の記載は制限している。)

(1)ヒト腎炎・ネフローゼ症候群腎組織を用いた糸球体ポドサイトでの発現解析(*in vivo* 研究): 各種ヒト腎疾患組織での定性的発現解析により、ネフローゼ症候群を呈するヒト腎疾患の糸球体ポドサイトでの Tcf21 発現の増強を観察した(微小変化<IgA 腎症<各ネフローゼ症候群(膜性腎症、微小変化型ネフローゼ症候群))。

(2)腎炎モデル腎組織での発現解析(*in vivo* 研究): ラットネフローゼ症候群モデル(PAN 腎症)での定性的発現解析により、ネフローゼ症候群を呈する小動物モデルのポドサイトでの Tcf21 発現の増強を観察した。また、PAN 腎症は自然寛解するが、その寛解期の糸球体ポドサイトでの Tcf21 発現は減弱しており、糸球体ポドサイトの Tcf21 発現は蛋白尿量に依存していることが示唆された。

(3)糸球体ポドサイト培養細胞(*in vitro* 研究)における Tcf21 の発現解析: マウス糸球体ポドサイト培養細胞(Dr Mundel P 提供)では Tcf21 蛋白及び mRNA が発現していないことを確認した(*in vivo* との乖離)。

(4)Tcf21 強制発現糸球体ポドサイト培養細胞での Tcf21 の機能解析(*in vitro* 実験系): 外部委託にてマウス糸球体ポドサイト培養細胞

にマウス Tcf21 遺伝子導入を行い、高発現細胞株を作成した。細胞機能評価の結果、Tcf21 発現が細胞増殖能及び移動能に影響していることを観察した。他、細胞サイズ、形態変化、突起形成、細胞死、細胞骨格変化への影響の確認を検討している。

プロジェクト B. VEGF 阻害薬による腎障害 (1)抗 VEGF 阻害薬投与による腎障害の臨床病理学的検討(米国 Weil Cornell Medical College 病理学教室との共同研究)

症例 5 症例を集積し、臨床病理学的特徴を明らかにした。臨床症候に関して、高度なものは急性腎障害やネフローゼ症候群を呈していたが、尿異常のみの軽微な症例も含まれていた。高度な症例では典型的な血拴性微小血管障害の組織像が観察された。臨床症候の軽微な症例も含め、全例で糸球体血管内皮障害を認めること、他の薬剤性尿細管障害など複合的な腎障害を呈することを確認した。この成果を国際学会で発表し、Hum Pathol に論文公表した。

(2) 抗 VEGF 阻害薬投与による腎障害での尿中落下ポドサイトの検討

VEGF 阻害薬による腎障害の急性期に尿中落下ポドサイトが出現することを確認した。糸球体ポドサイト障害の終末像である糸球体係蹄からの剥離 尿中落下の存在を確認したことから、糸球体内皮細胞障害に起因し、その内皮障害の程度が急激かつ高度な場合には糸球体基底膜を介して糸球体外側に位置する糸球体ポドサイト障害へ進展することを示唆しており、抗 VEGF 阻害薬による腎障害が糸球体障害の共通メカニズムを介して糸球体硬化に至ることを確認した。この成果は Clin Lab に論文公表した。

プロジェクト C. マウス腎臓分化アッセイ系の開発と腎臓幹細胞の純化法の確立(*in vitro* 実験): 幹細胞・前駆細胞活性のある細胞群を判定する *in vitro* アッセイ系の再現にも成功した。低密度平面培養によるコロニー形成の確認がなされ、後腎間葉細胞群の中にこのアッセイ系に反応する細胞が存在していた。これまでに一部の細胞群を選別可能な接着分子等の表面マーカーを 6 ケ同定している。この解析成果を元に多重染色により組み合わせる細胞画分の選別を行い、幹細胞・前駆細胞活性のある細胞集団の判定作業を継続しているが、大きな成果の進展はなかった。

#### 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 6 件)

(1) Usui J, et al. The detection of urinary podocytes from drug-induced glomerular thrombotic microangiopathy in advanced

cancer patients. Clin Lab 2016: 62; 2413-2417, 査読有

DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160525

(2) 臼井丈一、腎臓発生研究成果を臨床医療に応用するための基盤研究 - 臓器再生モデルと腎疾患モデル、BIO Clinica、Vol.31、2016、pp.62 - 65、査読無

(3) Nakauchi Y,...Usui J et al. Effective treatment against severe graft-versus-host disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized mouse model. Exp Hematol 2015: 43; 79-88, 査読有  
DOI: 10.1016/j.exphem.2014.10.008

(4) Usui J et al. Clinicopathological spectrum of kidney diseases in cancer patients treated with vascular endothelial growth factor inhibitors: a report of 5 cases and review of literature. Hum Pathol 2014: 45; 1918-1927, 査読有  
DOI: 10.1016/j.humpath.2014.05.015

(5) 臼井丈一、中内啓光、胚盤胞補完法による腎再生、腎と透析、Vol.75、2013、pp.835 - 838、査読無

(6) 臼井丈一、長田道夫、糸球体係蹄の構造異常からみたネフローゼ症候群、内科、Vol.112、2013、pp.761 - 766、査読無

〔学会発表〕(計2件)

(1) 臼井丈一、山縣邦弘：抗癌化学療法、VEGF 阻害薬関連腎障害の臨床病理学的検討、第57回日本腎臓学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2014年7月5日

(2) Usui J et al. Pathological spectrum of kidney diseases in patients treated with vascular endothelial growth factor inhibitor. The 14<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology, Tokyo, Shinagawa Prince Hotel, 16<sup>th</sup> May 2014

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称：BLASTOCYST COMPLEMENTATION を利用した臓器再生法

発明者：中内啓光，小林俊寛，李允秀，臼井丈一

権利者：国立大学法人東京大学

種類：日本特開

番号：2014-121329, 2015-61525

出願年月日：2008年8月28日

国内外の別：国内出願

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学腎臓内科学研究紹介 HP

<http://www.tsukuba-igaku-kidney.com/up/index.php?mode=s&cate=3&seq=40>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井 丈一 (USUI JOICHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70447340