

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：83301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19449

研究課題名(和文) 糖尿病における心・腎線維化機序に関わる新規骨髄由来細胞の同定と解析

研究課題名(英文) Identification of new myeloid-derived fibrosis-inducing cells accounting for cardiorenal connection in diabetic nephropathy

研究代表者

相良 明宏 (Sagara, Akihiro)

独立行政法人国立病院機構(金沢医療センター臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：00707060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身GFP発現マウスの骨髄を野生型B6マウスに移植し、一側尿管結紮(UUO)を行うことで腎線維化モデルを作成した。心、腎に浸潤したGFP+CD45+Sca1+細胞に着目し、Fibroblastsとの共培養やCOL-GFPマウスを用いた骨髄移植による検討にて、CD45+Sca1+細胞の線維化誘導能とコラーゲン産生能を確認した。またCD45+Sca1+細胞よりRNAを抽出し、Genechipによる遺伝子発現解析を行った。共培養とフローサイトメトリーによる検証を経て、CD45+Sca1+細胞の中に更なる亜集団が存在することを示した。この細胞群はヒト末梢血にも存在し、腎機能の増悪に伴って増加した。

研究成果の概要(英文)：To chase and identify fibrosis-related cell types, we used unilateral ureteral obstruction model mice, which showed renal and heart fibrosis, in combination with GFP-based tracing systems such as bone-marrow transplantation (BMT). We found BM-derived mononuclear cell cluster of CD45+Sca1+ cells mobilized and accumulated in the fibrotic lesions of kidney and heart using flow cytometry (FCM). The CD45+Sca1+ cells had an activating potential for collagen production of cultured fibroblasts and also produced type 1 collagen by themselves. Genechip analyses and FCM revealed the subpopulation of CD45+Sca1+ cells, which were related to chemotaxis and innate immunity. These cells were also detected in human peripheral blood and increased in proportion to kidney dysfunction. In this study, we succeeded to identify a new myeloid-derived fibrosis-inducing cells, which could provide a new avenue in fibrosis.

研究分野：腎臓内科

キーワード：骨髄由来細胞 繊維化 心腎連関

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は世界的に増加しており、日本では40歳以上の3~4人に1人が糖尿病、もしくはその予備軍であると推測されている。糖尿病の合併症の1つに糖尿病性腎症が挙げられる。糖尿病性腎症により新規に透析導入される患者数は、2013年の1年間で約1万7千人であり、透析に至らない糖尿病性腎症の患者も相当数いることが予想される。このことから、糖尿病性腎症が、患者のQOLや生命予後、あるいは医療経済に与える影響は大きい。さらに糖尿病性腎症では、腎障害の進行と共に心血管死のリスクも高まる。しかしながら、腎障害の進行に伴い心血管リスクが増加する、いわゆる心腎連関の分子機序は不明な点が多い。

2. 研究の目的

骨髄由来細胞の観点から、心腎連関機序における細胞分子基盤の解明を行う。

3. 研究の方法

2種類のGFPマウス(全身GFP発現マウス、I型コラーゲン遺伝子プロモーターの下流にGFP遺伝子をつないで過剰発現させたトランスジェニックマウス(COL-LUCマウス))の骨髄移植(BMT)モデルを用いて、新規骨髄由来細胞の同定と心腎連関機序における細胞分子基盤の解明を行う。その手法として、多重染色によるフローサイトメトリー(FCM)を用いて、腎および心に浸潤したGFP陽性細胞の表面マーカーを詳細に検討する。得られた結果を元にソーティングした細胞からRNAを抽出し、genechipを用いて遺伝子発現解析を行い、特徴的かつ特異的な遺伝子を検索する。さらに、I型コラーゲン遺伝子プロモーターの下流にluciferase遺伝子をつないで過剰発現させたトランスジェニックマウス(COL-LUCマウス)より樹立したmouse embryonic fibroblasts(MEFs)と、ソーティングにて得られた細胞群を共培養し、線維化誘導能の評価を行う。またCOL-GFPマウスを用いたBMTによる検討にて、コラーゲン産生能の評価も行う。さらにFCMによる検証も行い、新規骨髄由来細胞を同定するマウスにて得られた結果をもとにヒトにて検証を行い、新規骨髄由来細胞を介した心腎連関機序の解明を目指す。

4. 研究成果

トレプトゾトシン腹腔内投与および一側尿管結紮(UUO)による糖尿病性腎症モデルを作成する前段階として、UUOモデルでの解析を行った。その結果、線維化に関連する重要な細胞群が同定されたため、研究を継続した。

(1) 全身GFP発現マウスの骨髄を野生型B6マウスに移植し、UUOを行うことで骨髄移植(BMT)+腎線維化モデルを作成した。

次に、免疫染色にてGFP陽性細胞の心、腎浸潤を確認した。抗CD31抗体を用いた二重染色にて、GFP陽性細胞が、血管内ではなく組織に浸潤していることを確認した。さらに、心、腎に浸潤したGFP陽性細胞の表面マーカーをFCMにて解析した。GFPにてゲーティングを行い、成熟した白血球マーカーであるCD45と、Mouse stem cell antigen-1(Sca1)の二次元で展開した。CD45陽性かつSca1も陽性となる細胞群(CD45⁺Sca1⁺細胞)が心、腎線維化に伴い増加しており、以後、CD45⁺Sca1⁺細胞に着目して検討を進めた。

(2) CD45⁺Sca1⁺細胞の線維化誘導能およびコラーゲン産生能の評価を行った。COL-LUCマウスより樹立したMEFsと、ソーティングにて得られたCD45⁺Sca1⁺細胞を共培養した。対照群として、CD45⁺Sca1⁺細胞およびCD45⁺Sca1⁻細胞を用いた。Luciferase assayによる評価を行ったところ、CD45⁺Sca1⁺細胞に線維化誘導能があることが判明した(図1)。次に、CD45⁺Sca1⁺細胞自身のコラーゲン産生能を評価すべく、COL-GFPマウスの骨髄を野生型B6マウスに移植し、UUOモデルを作成した。FCMによる検討にて、CD45⁺Sca1⁺細胞にCOL-GFPの発現を認めた。よってCD45⁺Sca1⁺細胞には、線維化誘導能のみならず、コラーゲン産生能もあることが示された(図2)。

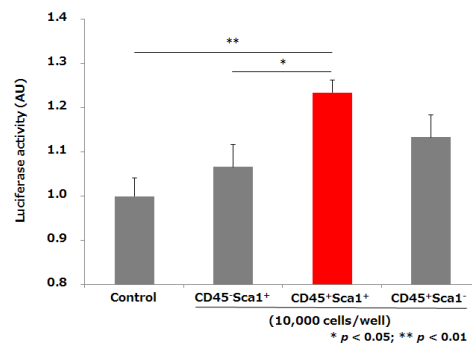


図1 共培養による線維化誘導能の評価

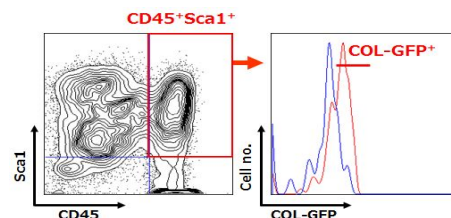


図2 FCM (腎臓)

(3) CD45⁺Sca1⁺細胞よりRNAを抽出し、Genechipによる遺伝子発現解析を行った。対照群として、CD45⁺Sca1⁺細胞を用いた。候補遺伝子を同定したのち、ソーティングにて目標細胞群を抽出し、MEFsとの共培養とFCMによる検証を経て、CD45⁺Sca1⁺細胞の中に更なる亜集団が存在することを示した。この細胞群は、線維化の進行に伴って血液、心および腎にて増加することを確認

した。

(4) マウスで得られた知見をもとに、ヒト末梢血での検討を行った。健康者および慢性腎不全症例より EDTA 採血を行い、FCMにて検討を行った。マウスで同定した亜集団は、ヒト末梢血にても存在し、腎機能の増悪に伴って増加した(図3)。

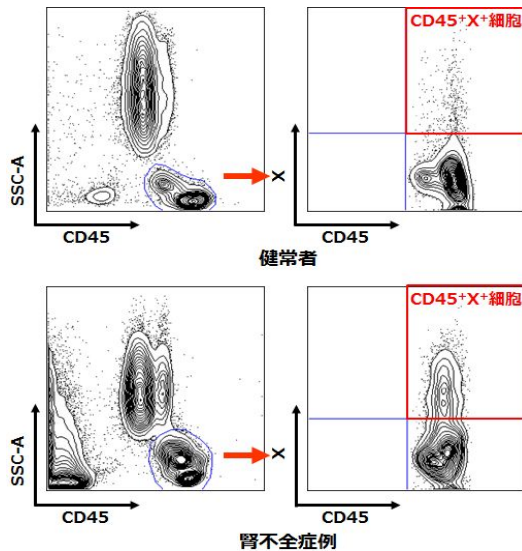


図3 FCM (ヒト末梢血)

本研究にて、線維化に関連する新規骨髄由来細胞の同定に成功した。線維化メカニズムの新たな視点として今後も研究を推進する。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Oshima M, Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Hara A, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Umeda E, Kaneko S, Arai S, Miyazaki T, Wada T
Association of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression with urinary protein and kidney dysfunction
Clin Exp Nephrol. 2017 Feb;21(1):35-42.
doi: 10.1007/s10157-016-1240-5. 査読有。

Kitagawa K, Furuichi K, Sagara A, Shinozaki Y, Kitajima S, Toyama T, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T
Risk factors associated with relapse or infectious complications in Japanese patients with microscopic polyangiitis.
Clin Exp Nephrol. 2016 Oct;20(5):703-711.
doi:10.1007/s10157-015-1199-7. 査読有。

Kitajima S, Iwata Y, Furuichi K, Sagara

A, Shinozaki Y, Toyama T, Sakai N, Shimizu M, Sakurai T, Kaneko S, Wada T
Messenger RNA expression profile of sleep-related genes in peripheral blood cells in patients with chronic kidney disease.

Clin Exp Nephrol. 2016 Apr;20(2):218-25.
doi: 10.1007/s10157-015-1150-y. 査読有。

[学会発表](計 5 件)

相良 明宏, 坂井 宣彦, 岩田 恭宜, 古市賢吾, 山本 靖彦, 和田 隆志
骨髄由来細胞による心腎連関機序
第 59 回日本腎臓学会学術総会。2016 年 6 月 17 日。パシフィコ横浜, 横浜

大島 恵, 小林 拓, 越野 瑛久, 中川 詩織, 山村 雄太, 相良 明宏, 篠崎 康之, 北島 信治, 原 章規, 岩田 恭宜, 坂井 宣彦, 清水 美保, 古市 賢吾, 和田 隆志
腎疾患における Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM)発現の意義
第 59 回日本腎臓学会学術総会。2016 年 6 月 17 日。パシフィコ横浜, 横浜

中村 美貴, 坂井 宣彦, 上川 康貴, 相良明宏, 篠崎 康之, 北島 信治, 原 章規, 岩田 恭宜, 清水 美保, 古市 賢吾, 和田 隆志
腎線維化機序におけるオートタキシンの意義
第 59 回日本腎臓学会学術総会。2016 年 6 月 18 日。パシフィコ横浜, 横浜

宮川 太郎, 相良 明宏, 篠崎 康之, 北島 信治, 遠山 直志, 原 章規, 岩田 恭宜, 坂井 宣彦, 清水 美保, 古市 賢吾, 山本 靖彦, 和田 隆志
尿細管障害における RAGE 分子種の機能的役割
第 59 回日本腎臓学会学術総会。2016 年 6 月 19 日。パシフィコ横浜, 横浜

Akihiro Sagara, Norihiko Sakai, Yasunori Iwata, Kengo Furuichi, Yasuhiko Yamamoto, Takashi Wada
Identification of Myeloid-Derived Fibrosis-Inducing Cells Presumably Accounting for Cardiorenal Connection in Chronic Kidney Disease
ASN Kidney Week 2016. 11.17, Chicago, USA

[図書](計 0 件)

[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

相良 明宏 (Sagara Akihiro)
独立行政法人国立病院機構 金沢医療セン
ター・臨床研究部・研究員
研究者番号：00707060

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

和田 隆志 (Takashi Wada)
金沢大学大学院 腎病態統御学・
腎臓内科学・教授
研究者番号：40334784

(4) 研究協力者

()