

200500170A

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

慢性腎障害の重症化防止を目的とした  
幹細胞移植による残存腎機能再構築

(H17-再生-010)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大島 伸一

平成18 (2006) 年3月

# 目 次

I. 総括研究報告	
慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残存腎機能再構築	1
大島伸一	
(資料) 新聞掲載記事	
II. 分担研究報告	
1. ヒト腎臓由来幹細胞採取、培養方法の標準化に関する検討	19
篠崎尚史, 菅谷健, 谷口英樹	
2. 骨髄幹細胞及び骨髄由来間葉系細胞移植の小動物における検討	28
室原豊明	
3. 腎虚血再灌流直後の尿中落下細胞から尿細管上皮前駆細胞の同定、培養とイヌ単腎虚血再灌流障害モデルにおける尿細管上皮前駆細胞治療に関する試み	31
小野佳成, 山本徳則	
4. 体性幹細胞を用いた新たな腎再生医療の開発に関する研究	34
松尾清一	
5. 組織特異的幹細胞移植に関する研究	53
槇野博史	
6. マウス組織特異的幹細胞移植に関する研究	61
野入英世	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷	70

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

慢性腎障害の重症化防止を目的とした  
幹細胞移植による残存腎機能再構築

総括研究報告書

大 島 伸 一

国立長寿医療センター総長

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残存腎機能再構築

主任研究者：大島 伸一 国立長寿医療センター総長  
分担研究者：篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院角膜センター長  
菅谷 健 東京歯科大学市川総合病院角膜センター客員講師  
室原 豊明 名古屋大学大学院医学系研究科器官制御内科学教授  
小野 佳成 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学助教授  
松尾 清一 名古屋大学大学院医学系研究科免疫応答内科学教授  
山本 徳則 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学助手  
槇野 博史 岡山大学医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学教授  
野入 英世 東京大学医学部附属病院腎臓内科学講師  
谷口 英樹 横浜市立大学大学院医学研究科臓器再生学教授

研究要旨

本研究は、幹細胞移植により残存腎機能を再構築し、腎障害の重症化防止を目指す実用化研究である。近年、実用化段階の再生医療には、角膜移植と同等のプロセスバリデーションの適応が求められる。本研究班では移植細胞の分担別に 1) 骨髄末梢血幹細胞チームと 2) 組織特異的幹細胞チームとが、3) それら細胞の単離培養法と細胞移植法について標準化検討を行うセルプロセッシングチームと連携を図って研究を進めている。

初年度 1) 骨髄末梢血幹細胞チームはラット Cisplatin 腎症への細胞移植法の最適化検討を行い G-CSF との相乗的な治療効果を確認した。さらに重症化モデルとして高食塩負荷 Doxorubicin 腎症を作製した。2) 組織特異的幹細胞チームはラット腎幹細胞を急性腎不全モデルに移植、腎組織への広範囲の生着を確認し報告した (FASEB J, 2005)。また、マウス腎幹細胞について致死性の Cisplatin 腎症に対し、細胞移植による 50%以上の生存率向上を達成した。3) セルプロセッシングチームは、マウス腎幹細胞をセルソーターにより単離、SP 分画を継代維持する培養方法の標準化に成功した。またイヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、自家移植により急性腎不全に対する治療を開始した。さらに、ヒト腎疾患患者尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、異種移植により腎組織への生着を確認した。

本研究班にて開発された腎幹/前駆細胞の単離、培養、移植方法により、腎疾患に対する再生医療の工程管理が可能となると考えられる。

A. 研究目的

我が国の透析患者数は 25 万人を突破し、1 兆円を超える透析医療費を含む慢性腎不全治療が我が国の医療財政に与える影響は多大なものとなっている。現在有効な治療薬のない末期腎不全に対し、自家細胞移植による再生医療への期待が高まっている。

本研究は、幹細胞移植により残存腎機能を再構築し、腎障害の重症化防止を目指す実用化研究である。近年、腎障害の再生過程に骨髄末梢血幹細胞や組織特異的幹細胞の関与が示唆されているが、これらの細胞を腎疾患患者本人から効率的に採取できれば、腎疾患に対する自家細胞移植によるオ

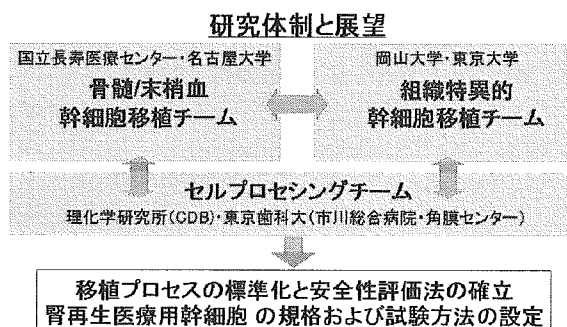
ーダーメイド医療の開発に応用できると考えられる。

そこで初年度の本分担研究グループでは以下の移植細胞種別に目標を設定した。

(1) ヒト腎疾患患者尿からの腎組織特異的幹/前駆細胞の単離と、培養条件の標準化。(2) イヌ尿中細胞の単離培養と自家細胞移植。(3) ラット骨髄末梢血幹細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療。

(4) ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養。(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療。(6) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療。

なお本研究は以下の流れ図に示す3つの研究チームの連携により進められている。



## B. 研究方法

### (1) ヒト腎組織特異的幹/前駆細胞

#### (1-1) ヒト尿中落下細胞の培養

名古屋大学泌尿器科および社会保険中央病院にて施行された生体腎移植14例、死体腎移植4例、腎部分切除術4例から同意を得て無菌的に尿検体を採取した。

術後直ちに、尿検体をセルプロセッシング施設である神戸理研に冷蔵輸送し、48時間以内に採取された患者尿から尿中落下細胞を分離し、初代培養に供した。

患者尿10mlを遠心分離し、上清を

除去した後、10% FBS (Fetal Bovine Serum) を含有するDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) で懸濁し、再度遠心分離して上清を除去して細胞を分離した。さらに、この懸濁、遠心分離、上清除去による細胞洗浄の操作を4回繰り返した。このようにして分離された細胞を、10% FBSを含有するDMEM/F12培地に終濃度として5mg/ml インスリン、5mg/ml トランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2.5mg/ml ニコチナマイド、 $10^{-8}M$  デキサメタゾンを追加した培地と、マウス間葉系細胞を10% FBSを含有するDMEMで培養した際の培養上清とを1:1で混合した培地で懸濁し、ゼラチンコーティングを行った細胞培養皿にて培養した。

#### (1-2) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

次に、分離した尿中落下細胞における遺伝子発現を確認した。

詳細には、上述のようにして初代培養を5週間続けた細胞 $1.5 \times 10^6$ 個から得られたtotal RNAをサンプルとして、遺伝子チップ (Human Genome U133 Plus 2.0 Array Gene Chip, Affymetrix) を用いて遺伝子発現解析を行った。

#### (1-3) 尿中落下細胞からの腎臓幹/前駆細胞の分離

尿中落下細胞においても他の臓器で知られているようなside population(SP)細胞が存在し、腎臓幹/前駆細胞として機能している可能性が考えられるため、尿中落下細胞からのSP細胞の分離を試みた。

詳細には、上述のように初代培養を3週間続けた尿中落下細胞を $1 \times 10^6$ 個/

m l に調製しヘキスト 3 3 3 4 2 (Morecular Probe) を 5 m g / m l となるように添加した。その後、細胞を 3 7 ° C で 1 時間、振盪培養した後、蛍光活性化セルソーター (BD FACS Aria、Beckton Dickinson) を用いて S P 細胞の解析、分離を行った。

#### (1-4) 腎臓幹/前駆細胞の腎臓への生着

次に、分離した腎臓幹/前駆細胞が成体腎臓に生着し、機能する形質を有しているか否かを確認するため、成体腎臓に障害を与え、腎臓が再生する過程においてこの細胞が生着するか否かを検討した。

分離した S P 細胞をさらに 5 週間培養し、ヒト腎臓幹/前駆細胞を異種移植した。レシピエントとして、拒絶反応を起しにくい実験的免疫不全マウスである NOG マウスを使用し、虚血性急性腎不全モデルを製作した。SP 細胞を虚血解除した直後の腎皮膜下経路により注射器にて細胞移植を行った。3 日後に剖検して腎臓を摘出し、凍結切片を作成、免疫組織化学的な解析を行った。

#### (2) イヌ腎臓組織特異的幹/前駆細胞

##### (2-1) イヌ尿中落下細胞の培養

ヒト尿中落下細胞の自家移植による腎疾患治療というコンセプトを、げっ歯類よりも大型の動物で検証するため、名古屋大泌尿器科によりイヌ尿中落下細胞の自家移植が 8 例実施された。

左腎虚血 5 0 分直後から 1 時間、左腎中部尿管からチューブを腎盂に留置し無菌的に採尿した。イヌ尿中落下細胞はヒトの場合と全く同様に初代培養された。4 週間培養後、細胞を蛍光標識し、自家移植に供

した。

##### (2-2) イヌ尿中落下細胞の自家移植

4 週間後、細胞採取した同じイヌについて、右腎動脈を露出し 5 0 分クランプし右単腎症腎虚血再灌流障害を作成した。血流再開直後に蛍光標識された  $10^7$  個の細胞を腎中央に 1 カ所または、上極、中央、下極の 3 カ所に 3 分割して局所注入した。

細胞移植後 4 週間または 8 週間で剖検して腎臓を摘出し、ホルマリン固定、免疫組織化学的な解析を行った。

#### (3) ラット骨髄末梢血幹細胞

##### (3-1) Cisplatin 腎症ラット

急性腎不全モデルである Cisplatin 腎症ラットにおいて、骨髄幹細胞より培養した EPC による効果を検討した。

7 週令の Wistar ラット次のように 4 群にわけ検討を行った。1) Control 群、2) Cisplatin 群、3) EPC 群、4) Cisplatin と EPC 群。Cisplatin は 7mg/kg を腹腔内投与した。EPC は、骨髄細胞を以前より報告された方法 (CirRes 2002;90:E80) で培養した。Cisplatin 投与 1 週間後に EPC を投与しその後 2 週間飼育して評価を行った。EPC の細胞数は、 $10^7$ /ml とした。尿は 1 週間毎にメタボリックゲージにて 24 時間尿を採取し蛋白尿などの評価を行った。また腎臓を取り出し組織学的な検討も行った。

##### (3-2) Doxorubicin 腎症ラット

慢性腎不全モデルである Doxorubicin 腎症ラットにおいて、骨髄幹細胞より培養した間葉系幹細胞による効果を検討した。今後、塩分負荷における血圧の変化に対する効果についても検討する予定である。

7 週令の Wistar ラット次のように 4 群に

わけ検討を行った。1)Control 群、2)Doxorubicin 群、3) 間葉系幹細胞投与群、4)Doxorubicin と間葉系幹細胞投与群。Doxorubicin は、5mg/kg を経静脈的に投与した。間葉系幹細胞は Doxorubicin 投与当日と 1 週間後に経静脈的に投与した。骨髓細胞の培養は以前に報告されていたように行った (Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:4857)。間葉系幹細胞数は、当初は、10<sup>8</sup>/ml を目標としていたが、必要数が培養から得られなかったため、10<sup>7</sup>/ml とした。Doxorubicin 投与後、4 週間飼育し評価を行った。現在のところ塩分負荷については行っていないため血圧については評価していない。Cisplatin 腎症ラットと同様に 24 時間尿の採取と腎臓の組織学的検討を行う。

(3-3)Cisplatin 腎症に対する G-CSF、骨髓単核球細胞併用療法の効果の検討

7 週齢の Lewis ラットに cisplatin 6 mg/kg を腹腔内投与し、骨髓単核球細胞単独群、G-CSF 単独群、G-CSF + 骨髓単核球細胞群、コントロール群の 4 群に分けた。骨髓単核球細胞単独群では、cisplatin 投与 24 時間後に他の Lewis ラットから採取した骨髓単核球細胞 2.5×10<sup>7</sup> 個を尾静脈より投与した。G-CSF 単独群では cisplatin 投与時、6 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に G-CSF 50 μg/kg を皮下投与した。G-CSF + 骨髓単核球細胞群では、G-CSF 単独群と同様の G-CSF 投与に加え、cisplatin 投与 6 時間後に他の Lewis ラットから採取した骨髓単核球細胞 2.0×10<sup>7</sup> 個を尾静脈より投与した。コントロール群では cisplatin 投与時、6 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に同量の生理食塩水を皮下投与した。4 群とも day0、day1、

day4、day5、day7、day11、day29 に血液を採取し、腎機能を比較検討した。

(4) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞

(4-1) ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養

①開腹もしくは腹腔鏡下手術を受けられる患者に十分に説明し同意を得た上で内臓脂肪および皮下脂肪組織を採取する。採取された脂肪はメスで裁断する。

②皮下脂肪吸引手術を受けられる患者からも同様に皮下脂肪を含む吸引液を採取する。大型遠心器を用いて吸引液を遠心し、上層から脂肪組織を採取する。

③ 上記で得られた脂肪組織をコラゲナーゼ消化する。

④ 1200 回転で 5 分間遠心分離し SVF (stromal vascular fraction) を採取する。

⑤ 一部はこの時点で凍結保存し、残りの SVF を以下の方法⑥⑦で培養する。

⑥ 北川らの開発した低血清培養法で間葉系幹細胞を選択的に分離増殖させる。

具体的には 2%血清と bFGF を用いて SVF 中の細胞を培養する。3-6 代培養した時点で、脂肪・骨・軟骨への誘導条件で培養し、それぞれの分化度を中性脂肪含有量、カルシウム含有量、alcian blue 染色で多分化能の評価を行う。残りは凍結保存する。

⑦ 脂肪提供者の臨床背景 (年齢、性別、基礎疾患など) と脂肪由来幹細胞の量および質との関連を検討する。

⑧脂肪由来幹細胞を各種動物モデルに投与し治療効果を判定する。

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

(5-1) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

株 rKS56 細胞の標識細胞の作製

投与した rKS56 細胞を追跡するため、シスプラチン誘導急性腎不全モデルへの細胞投与実験では、LacZ plasmid 導入 rKS56 細胞 (rKS56-LacZ 細胞) を作成し、細胞移植に用いた。IV 型コラーゲンでコートした 6-well plate に rKS56 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well にて撒き、1 日後に Fugene-6 (Roche Diagnostic) を用い pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ plasmid を細胞内に導入した。

(5-2) 虚血再灌流ラット急性腎不全モデルへの rKS56 細胞投与

100-150g 体重の雄性 SD ラット (Clea Japan Inc.) の右腎動脈を結紮し、左腎を摘出した。予備実験では、虚血再灌流モデルでの腎障害は第 3-4 病日がピークで、第 7 病日には腎機能・腎組織変化が改善した。

投与した rKS56 細胞を追跡するため、虚血再灌流モデルへの投与実験では、Vybrant Di-0 solution にて標識した rKS56 細胞を Vybrant Di-0 solution を含む無血清培地内で 10 分間 incubate し標識した後無血清培地で 2 回洗浄し細胞投与を行った。

40 分後に結紮を解除し、400  $\mu$ l の墨汁を加えた PBS で懸濁し、Di-0 標識した rKS56 細胞 ( $1.6 \times 10^7$  個) を、右腎臓の皮質内に 4 ヶ所注入した。①対照非疾患群 ( $n = 6$ )、②虚血再灌流非治療群 ( $n = 7$ )、③虚血再灌流 rKS56 細胞投与群 ( $n = 6$ ) の 3 群を作成した。第 4, 7 病日に屠殺し、腎機能評価及び腎組織学的検討を行った。

(5-3) シスプラチン惹起急性腎不全ラットモデルへの rKS56 細胞投与

200-250g 体重の雄性 SD ラットの腹腔内に、生食で溶解したシスプラチン (sigma) を 6 mg/kg 単回投与した。既報にてシスプ

ラチン投与後、5 日目に BUN/Cr 増悪がピークとなり、9 日目に改善することが報告されている。シスプラチン投与 2 日後に rKS56 - LacZ 細胞を左腎被膜下もしくは経左腎動脈的に投与した。被膜下投与群では、 $1.0 \times 10^6$  個の rKS56 - LacZ 細胞 (生食 300  $\mu$ l) を腎被膜下に被膜が膨隆するように 27G 針を用いて投与した。また経左腎動脈の投与群では、下行大動脈の腎動脈分岐部の上下と右腎動脈の計 3 ヶ所を阻血し、左腎動脈分岐部に 27G 針を穿刺し、 $1.0 \times 10^6$  個の rKS56 - LacZ 細胞 (生食 300  $\mu$ l) を投与した。穿刺部の止血を確認後、3 ヶ所の阻血を解除した。実験は①腎被膜下・rKS56 - LacZ 細胞投与群 ( $n = 5$ )、②経腎動脈・rKS56 - LacZ 細胞投与群 ( $n = 5$ )、③腎被膜下・生食投与群 ( $n = 5$ )、④経腎動脈・生食投与群 ( $n = 4$ ) の計 4 群で検討した。シスプラチン投与後第 5, 9 病日に屠殺し、両側腎臓を摘出した。血清 BUN・Cr・総蛋白、AST・ALT による肝機能の評価、尿蛋白と尿中クレアチニン、尿中 NAG 定量を行った。

(6) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞

(6-1) マウス腎臓幹/前駆細胞の培養方法の標準化

培養方法の標準化を行う段階で、ヒト尿中落下細胞を用いる際考慮すべき個体差を回避するため、初年度は組織特異的幹細胞が局在すると考えられている近位尿細管 S3 セグメントから樹立され長期間継代培養したマウス近位尿細管細胞株 (mProx24 細胞) を用いた。

まず mProx24 細胞を用いてフローサイトメトリーによる single cell sorting を行い、幹細胞が存在すると考えられている SP



fraction と、比較対象の main population (MP)、non-SP fraction、それぞれからソートした 1 個ずつの細胞についてクローナルな培養を行った。また、得られた SP 細胞について凍結融解による影響を検討した。

次に、こうして得られたクローナルな培養細胞を増殖後、再度フローサイトメトリーにより 1 回目と同様に分画し、再度培養に供した。このような操作を 4 回繰り返し、腎臓幹/前駆細胞の自己複製能について数値化した。

さらに、この自己複製能、多分化能、高増殖能を維持するために必要なマウス間葉系細胞上清の効果を確認するため、上清を添加して維持してきた腎臓幹/前駆細胞をマウス間葉系細胞上清を加えずに培養し、上清添加群と比較した。

(6-2) 致死性シスプラチン誘発急性腎不全マウスへの細胞移植

予備検討においてシスプラチン 15mg/kg の腹腔内投与により 1 週間以内に致死的な急性腎不全が発症することを確認し、C57BL/6J 雄、野生型にシスプラチン 15mg/kg (溶液総量 60ml/kg) を腹腔内投与した。24 時間後に左背部を切開し、 $5.0 \times 10^5$  個に調整した CMFDA 蛍光標識 mProx SP、または non SP を左腎被膜下に投与後 (投与総量  $100 \mu\text{l}$ )、穿刺部をアロンアルファ A(三共)で塞ぎ、閉腹した。陽性対照群には DMEM/ F-12 HAM を被膜下投与し、陰性対照群には生理食塩水 60ml/kg の腹腔内投与 24 時間後、同様に DMEM/F-12 HAM を左腎に被膜下投与した。3 日目 (Day3)、5 日目 (Day5) に経時的に尾静脈より採血し 7 日目に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

(6-3) 腎虚血再灌流障害マウスへの細胞

移植とバイオマーカーによる治療効果の評価

げっ歯類における細胞移植の治療効果をヒトに敷衍する場合、臨床的に測定可能なバイオマーカーを用いて評価することが望ましい。ヒトの急性腎不全において、腎近位尿細管に発現する L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) が腎臓の微小循環血流の低下に伴い遺伝子誘導され、速やかに尿中に排出される。このため、尿中 L-FABP は血中クレアチニンや NAG などの従来の指標よりも鋭敏な腎障害のバイオマーカーとして、種々の腎疾患で報告が相次いでいる。

そこで、ヒト型 L-FABP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (L-FABP-Tg) を用い、腎虚血再灌流障害モデルを作製した。本マウスはヒト L-FABP 発現調節領域を含む染色体遺伝子が導入されているため、ヒトと同様の L-FABP 誘導機構により腎障害時には尿中 L-FABP が著明に増大する。尿中ヒト型 L-FABP は臨床検査で用いられている ELISA キットにより定量し、細胞移植の治療効果を評価した。

L-FABP-Tg (C57BL/6 系雄) 背部正中を切開し、両腎を露出した。両側腎基部に血管鉗子をかけ、 $37^\circ\text{C}$  に保ったインキュベーターに入れた。30 分後に血管鉗子をはずし、 $5.0 \times 10^5$  個に調整した蛍光標識 mProx SP を両腎被膜下に投与後 (投与総量  $100 \mu\text{l}$ )、穿刺部をアロンアルファ A(三共)で塞ぎ、虚血腎の再灌流を肉眼的に確認し閉腹した。陽性対照群には DMEM/ F-12 HAM を被膜下投与し、陰性対照群には擬手術後、同様に DMEM/F-12 HAM を両腎に被膜下投与した。24 時間ごとの採尿のほか、虚血再灌流 24 時間後、48 時間後、72 時間後に尾静脈より

採血し 5 日目 (Day5) に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

(倫理面への配慮)

ヒト生体試料の採取と個人情報の取り扱いに関しては、理化学研究所、名古屋大学医学部附属病院および社会保険中京病院における倫理委員会に諮り承認を得た。この際に、個人情報管理者は別におき、個人情報が漏れることがないように最大限の注意を払う。本研究の目的以外には細胞を用いないこと、研究終了後には廃棄処分することを厳守する。

動物実験については、動物倫理に照らして実験動物に対する負荷を低減するよう留意し、各大学、研究機関の動物実験施設における規定に準じて行った。

## C. 研究結果

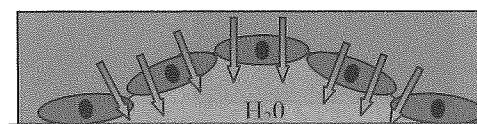
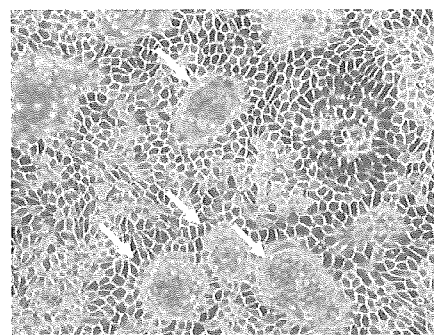
### (1) ヒト腎組織特異的幹／前駆細胞

#### (1-1) 尿中落下細胞の培養

名古屋大学泌尿器科および社会保険中京病院にて施行された生体腎移植 14 例中 11 例、死体腎移植 4 例中 1 例、腎部分切除術 4 例中 3 例から初代培養細胞が樹立できた。

細胞を経時的に顕微鏡観察した結果、培養開始後 2 4 時間以内に培養皿上に生着し、以後 1 2 ~ 2 4 時間毎に細胞分裂を行い、培養開始から 2 週間後には約  $5 \times 10^6$  個程度の細胞数にまで増殖した。このことから、この培養方法により、増殖能を有する細胞が得られることが確認された。

また、これらの増殖能を有する細胞群の中には、敷石状形態を示す尿細管上皮細胞様の細胞からなるコロニーが観察され、下図に示すように、経上皮輸送能を示唆する細胞ドームの形成も確認された。



これらの結果より、生体腎移植手術直後の患者の尿から分離した尿中落下細胞を培養することにより、尿細管細胞様の細胞を効率よく取得、培養可能であることが示された。

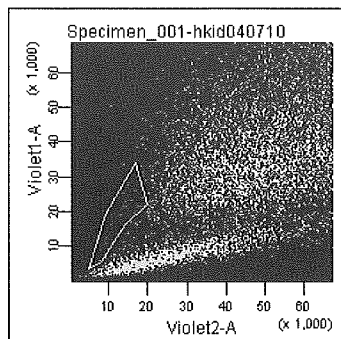
#### (1-2) 尿中落下細胞の遺伝子発現解析

遺伝子発現解析の結果、尿中落下細胞においては、アクアポリン 1、 $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  共輸送体 (KCC3a)、N-カドヘリンなど、近位尿細管特異的な遺伝子の発現が確認された。また、近位尿細管及びヘンレループで発現する  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送体 (SLC4A4)、K-カドヘリン、ヘンレループ及び遠位尿細管で発現する  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送体 (SLC4A7)、遠位尿細管で特異的に発現するカルビンジン D28K などの遺伝子発現も確認された。また、胎児における発生期の腎臓で発現する Pax2 や Pax8 などの遺伝子の発現が確認された。

これらの結果から、尿中落下細胞の初代培養細胞中には、発生期の腎臓に存在する腎臓幹／前駆細胞のような未分化細胞や、近位尿細管 > ヘンレループ > 遠位尿細管と続く腎ネフロンの尿細管細胞様に分化した細胞が存在することが示唆された。

### (1-3) 尿中落下細胞からの腎臓幹／前駆細胞の分離

S P細胞の解析結果を下図に示す。



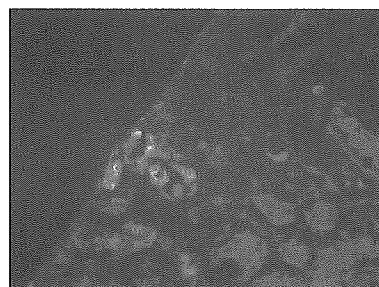
図中、実線で囲んだ領域がヘキスト33342弱陽性である。この画分は、レセルピンを添加した陰性コントロールでは完全に消失するため、この画分がS P細胞画分であることが確認された。なお、尿中落下細胞中には平均で0.33% (n=6) のS P細胞が存在した。

このS P細胞を分離・取得した後、初代培養時と同じ方法で培養を行った。培養を行うと、高増殖能を持ち、且つ近位尿細管上皮細胞様の敷石状形態を有する上皮細胞コロニーが得られ、さらに培養を続けたところ、22日経過後には細胞ドームの形成が確認された。一方、S P細胞画分以外の細胞を同様の方法で培養しても、細胞ドームの形成は確認されなかった。

これらの結果から、初代培養した尿中落下細胞からヘキスト33342弱陽性のS P細胞を分離することにより、尿細管上皮細胞に分化し得る腎臓幹／前駆細胞を分離・取得できることが示された。

(1-4) 腎臓幹／前駆細胞の腎臓への生着  
ヒト特異的HLA抗体（緑色蛍光標識）による免疫染色と、尿細管特異的アクアポリン1受容体に対する抗体（赤色蛍光標識）

による免疫染色との2重染色を行った結果を下図に示す。



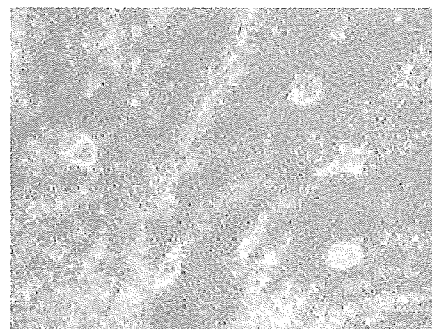
図中、黄色を呈した部位は、移植細胞が尿細管様の管腔構造を形成した共陽性の部位である。虚血性急性腎不全モデルに異種移植を実施したにもかかわらず、生命予後の悪化は観察されなかった。

これらの結果から、分離した腎臓幹／前駆細胞は成体腎臓に生着し、尿細管特異的な機能を有するタンパクを発現する形質を有していることが示された。したがって、この腎臓幹／前駆細胞を腎疾患患者に移植することで、腎疾患を治療することができると考えられる。

### (2) イヌ腎組織特異的幹／前駆細胞

#### (2-1) イヌ尿中落下細胞の培養

腎臓50分虚血、再灌流後60分腎盂に留置したチューブを介して尿中落下細胞から、尿細管上皮前駆細胞としてのドーム形成する細胞を primary culture により100%(8/8)培養することに成功した(下図)。



SP fraction は0.1%の比率にて、増殖能

力の高い細胞として回収された。

### (2-2) イヌ尿中落下細胞の自家移植

右単腎症に4週間適応させた後、右腎動脈を露出し50分クランプし腎虚血再灌流障害を作製した。再灌流後、蛍光でラベリングした尿細管上皮前駆細胞を腎局所注入した。その4週間後では、蛍光ラベリングされた尿細管前駆細胞が、腎臓被膜下の細胞注入部位に集塊を形成、さらに皮髄境界にかけて散在性に存在する像を確認した。

8週間後では、蛍光ラベリングされた尿細管前駆細胞を確認できなかったが、正常腎臓とかかわらないマクロの所見であった。病理組織学的には、細胞注入部にPCNA陽性の再生を示唆する細胞増殖所見が見られた。細胞の代わりに生食を打ち込んだ腎虚血再灌流障害コントロールイヌ1例では、著明な尿細管壊死を伴う急性腎不全像を呈して術後9日にて死亡した。現在、血液生化学的な解析を行っている。

## (3) ラット骨髄末梢血幹細胞

### (3-1) Cisplatin 腎症ラット

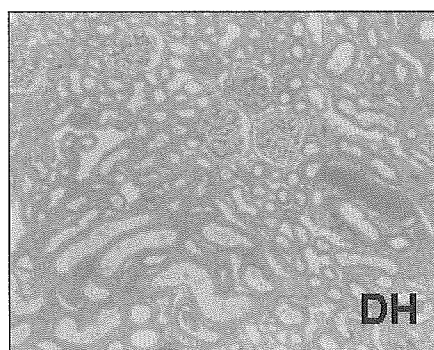
Cisplatin 腎症ラットにおいては、経静脈的にEPCを投与したが、蛋白尿の減少などEPCによる効果は認められなかった。また、腎組織上も明らかな変化を認めない。ただし、EPCを投与したことによる腎障害の悪化なども認めなかった。

### (3-2) Doxorubicin 腎症ラット

Doxorubicin 投与ラットにおいて高塩分負荷により、塩分感受性高血圧を発症し、尿蛋白、腎障害も著明に増大した(下図)。

	DOX(-)	DOX(+)
normal-sodium diet	C	D
high-sodium diet	H	DH

normal-sodium diet,0.4% NaCl; high-sodium diet,4% NaCl  
DOX(+),single dose of 5mg/kgBW iv. DOX(-),saline iv.



今後、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)の細胞移植を行い、治療効果を検討する予定である。

### (3-3) Cisplatin 腎症に対する G-CSF、骨髄単核球細胞併用療法の効果の検討

ラットから骨髄幹細胞を採取し、60匹のCisplatin 腎症ラットに移植した。骨髄単核球細胞単独投与群ではコントロール群に比べ腎機能の改善効果は認められなかった。G-CSF 単独投与群ではコントロール群に比べ有意に腎機能の悪化を抑制していた。さらにG-CSF + 骨髄単核球細胞移植併用療法群ではG-CSF 単独投与群に比べ腎機能悪化の抑制効果が強かった。

## (4) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞

### (4-1) ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養

手術で得られた内臓脂肪、皮下脂肪および吸引で得られた皮下脂肪のいずれからも間葉系幹細胞を得ることができた(下図)。骨、軟骨、脂肪への分化も確認され、高齢者からも十分量の幹細胞が得られた。脂肪

由来間葉系幹細胞を動物疾患モデルに投与したところ、その治療的効果が確認された(特許出願準備中)。

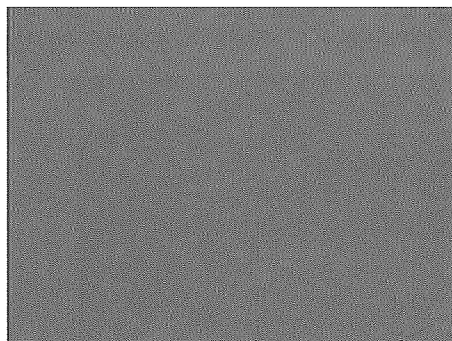
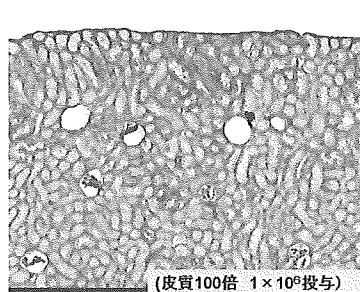
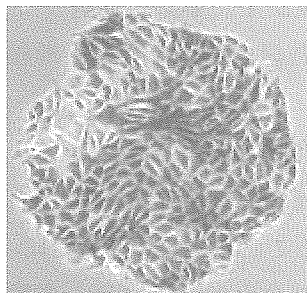


図. 低血清培養によるヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞  
(5-1) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞株 rKS56 細胞の標識細胞の作製

Lac-Z を恒性発現した rKS56 細胞を得るために、G418 (Sigma) 500 µg/ml 含有培地で培養し、得られたコロニーを single cell にして再度培養、出現したコロニーを X-gal staining kit (Roche) にて染色し、青色に染まったコロニーを選択して取り出し、その細胞群を G418 (500 µg/ml) 含有培地にてさらに継続培養し rKS56-LacZ 細胞を樹立した。本細胞をラット虚血再灌流モデル腎に移植した結果、腎皮質の広範囲に細胞が生着することが確認された(下図)。



(5-2) 虚血再灌流ラット急性腎不全モデルへの rKS56 細胞投与

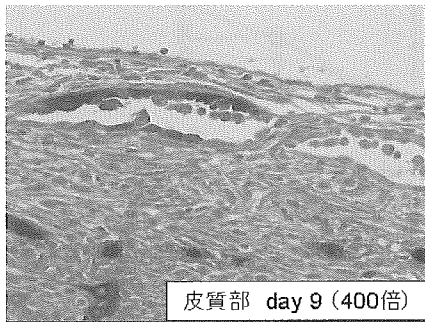
虚血再灌流(I/R)モデルラットに Di-0 標識した rKS56 細胞を皮質内注入し、7 日後に屠殺して腎を観察した。Di-0 陽性細胞は腎皮髄境界部の尿細管に主に生着し、上皮細胞マーカーサイトケラチン陽性であった。また一部の Di-0 陽性尿細管上皮細胞は Aquaporin-1 陽性であり、近位尿細管上皮細胞 lineage への分化が考えられた。Di-0 陽性細胞は注入部位の周囲だけでなく、穿刺部から離れた皮質・髄質部位にも局在が観察された。

血清学的検討では、BUN・Cr は I/R 非治療群と rKS56 細胞投与 I/R 群との間に有意差は認めなかった。一方、急性尿細管傷害マーカーである尿中 NAG は I/R 非治療群に比して、rKS56 細胞投与 I/R 群にて有意に減少していた。

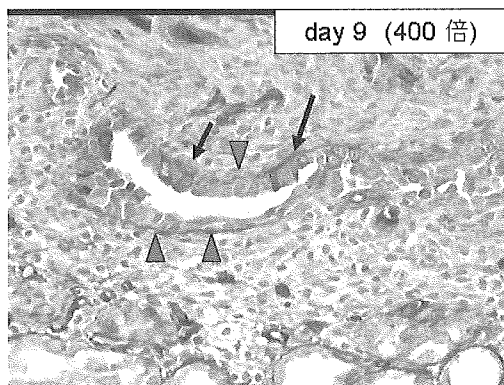
(5-3) シスプラチン惹起急性腎不全ラットモデルへの rKS56 細胞投与

シスプラチンを腹腔内に投与し、2 日後に LacZ 遺伝子を導入した rKS56-LacZ 細胞もしくは生食を腎被膜下もしくは経腎動脈的に投与し、細胞投与後 3 日及び 7 日目に屠殺した。各シスプラチン投与群の平均体重は、投与 5 日目まで減少を認め、その後増加した。rKS56-LacZ 細胞腎被膜下投与シスプラチン腎症群にて対照シスプラチン腎症群に比して体重増加が多い傾向を認めた。

rKS56-LacZ 細胞腎被膜下投与シスプラチン腎症群では、投与後 3 日目に、Bluo-gal 染色陽性（青色に染色）細胞が腎被膜下に散在し、rKS56-LacZ 細胞の生着が確認された。細胞投与 9 日目では、肉眼的に腎被膜の肥厚を認め、Bluo-gal 染色にて腎被膜下及び一部皮髄境界部に管腔様構造を呈する rKS56-LacZ 細胞が確認された。

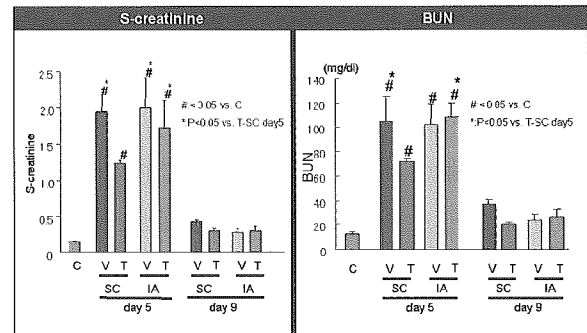


これらの腎被膜下の管腔様構造を呈した rKS56-LacZ 細胞は Aquaporin-1 を発現しており、近位尿細管上皮細胞 lineage への分化が示唆された。さらに、細胞投与 9 日目において、腎被膜下・皮質内の rKS56-LacZ 細胞は Ki-67 陽性で、増殖能を有していた。また、管腔様構造を呈した rKS56-LacZ 細胞の basolateral 側で、IV 型コラーゲン陽性の基底膜形成が観察された(下図)。一方、rKS56-LacZ 細胞経腎動脈投与シスプラチン腎症群では、腎臓内への細胞生着は観察し得なかった。



シスプラチン投与 5 日目における血清

BUN・Cr の上昇は rKS56-LacZ 細胞腎被膜下投与群にて vehicle 腎被膜下投与群に比して有意に抑制された。rKS56-LacZ 細胞経腎動脈投与群では、vehicle 経腎動脈投与群に比して腎機能改善効果は認められなかった。BUN・Cr とシスプラチン投与 9 日目には、各群にてほぼ正常値まで改善した(下図)。肝機能や血清総蛋白は細胞投与による明らかな変化を認めなかった。



## (6) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞

### (6-1) マウス腎臓幹/前駆細胞の培養方法の標準化

まず mProx24 細胞を用いてフローサイトメトリーにより解析した結果、長期継代後の mProx24 細胞中には、0.2%の SP fraction が存在した。SP fraction 由来の細胞を 96 well plate 上で 15 日間クローナルに培養したところ、その細胞は上皮様形態を示し、また高い増殖能を示した。培養 1 3 日目には細胞の経上皮輸送能を示すドーム形成が観察された。また、そのドーム形成能は細胞単位では 2~4 日間維持され、凍結融解後の再培養によって再形成されることが確認された。SP fraction から得られたドーム形成細胞は AQP-1, E-cadherin, ZO-1 陽性であった。

一方、mProx24 細胞の MP および non-SP fraction よりソートした細胞を SP

fractionと同様に15日間培養したところ、上皮様形態とfibroblast様形態を示すクローンが混在しており、ドーム形成率はMPでSP fractionの1/10、non-SP fractionではドーム形成は皆無であった。

また、mProx24細胞のsingle cell sortingによるSP細胞のクローナルな培養を繰り返して実施したところ、1st-sortingに比し2nd-sorting後のSP fractionの割合は0.2%から0.83%に上昇した。その後繰り返し行ったsorting後のSP fractionの割合は一定に維持されたことから、腎臓幹/前駆細胞が一定の割合で自己複製能を保ちながら、分化した尿細管機能を維持していることが確認された。

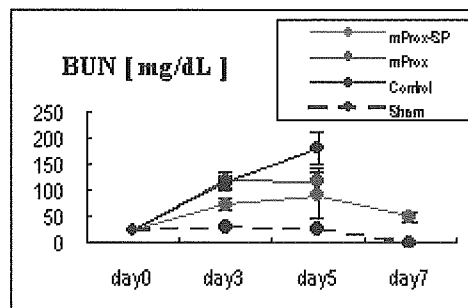
さらにmProx24細胞の培養時に添加しているマウス間葉系細胞の培養上清が、これら腎臓幹/前駆細胞の維持増殖に必須かどうか検討した。マウス間葉系細胞の培養上清を添加せずにSP細胞を培養した結果、ドーム形成が確認されたクローンの数、ドーム形成維持期間が激減した。

mProx24細胞を用いた以上の検討より、single cell sortingによりSP細胞を単離し、マウス間葉系細胞の培養上清にて培養することにより、効率的な機能性近位尿細管上皮細胞の培養法の標準化が達成できると考えられた。

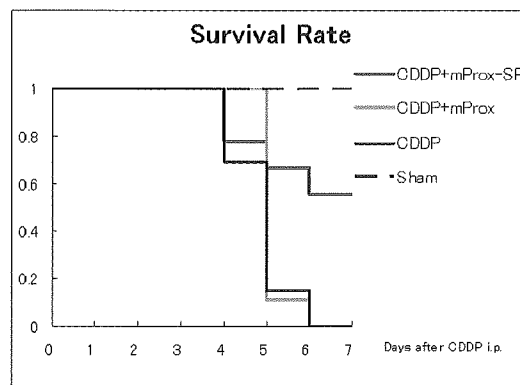
#### (6-2) 致死性シスプラチン誘発急性腎不全マウスへの細胞移植

本検討で用いたシスプラチンの用量では、投与後1,2日の血清尿素窒素(BUN)の上昇は軽度であるが、投与後2~3日目に向けて急激に腎機能が低下し上昇する。3日目(Day 3)の血清尿素窒素BUN [mg/dl]はmProxSP (=CDDP+mProxSP, N=9)、mProx

(=CDDP+mProx, N=9)、Control(=CDDP, N=13)各群それぞれ72.1±11.4、118.4±14.8、113.4±14.5(mean ±SE)で、CDDP+mProxSPではCDDPに対して有意な改善を認めた(下図)。



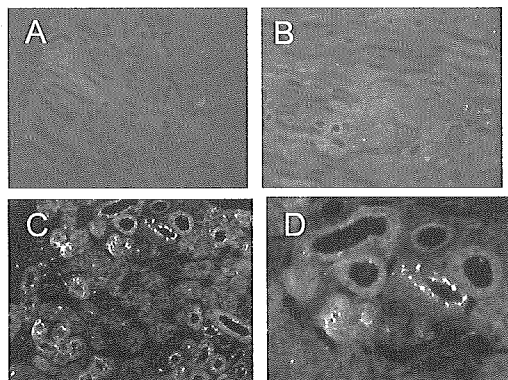
CDDP投与一週間までの経過でmProxSP群ではday7まで5/9匹が生存。CDDP群及びCDDP+mProx群は5日目で全例が死亡した。Kaplan-Meier法におけるログランク検定でCDDP群に対してCDDP+mProxSP群の有意な死亡率の逡減が確認された(下図:p<0.001)。



mProx-SP vs CDDP : p < 0.01, mProx vs CDDP : N S

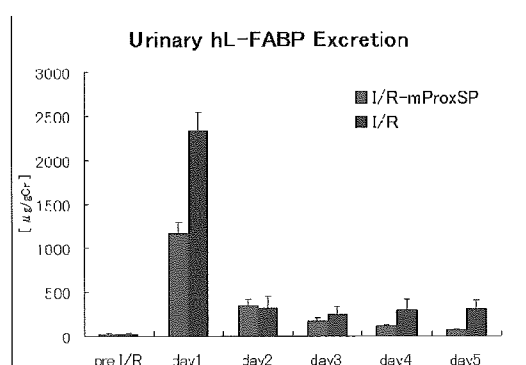
腎組織所見のAはCDDP+DMEM群より得られた切片で、CDDP投与4日目に瀕死状態で摘出した腎より得られた。近位尿細管のbrush borderはなく、尿細管腔内に脱落上皮細胞が観察された。BはCDDP+mProx群の投与後4日目で同様の状態の腎組織である。ここではmProxを蛍光標識しているが、mProxは殆ど認められなかった。Cは

CDDP+mProxSP 群で、移植細胞が高輝度の蛍光を呈していることが分かる。その高倍率が D である。標識された細胞が障害された尿細管管腔の一部を構成しており、尿細管再生に関わる所見の可能性が示唆された。



(6-3) 腎虚血再灌流障害マウスへの細胞移植とバイオマーカーによる治療効果の評価

mProx-SP を細胞移植することにより、血漿クレアチニン上昇や組織学的な尿細管障害が有意に軽減した。さらに細胞移植群で、尿中 hL-FABP レベルが有意に低減されたことから腎障害の軽減や障害からの回復促進が示された(下図)。



#### D. 考察

1) 骨髄末梢血幹細胞チームは、当初下肢の動脈閉塞性疾患に有効性が示されている骨髄より培養した Endothelial progenitor cell (EPC) あるいは骨髄単核球成分のラッ

ト Cisplatin 腎症への細胞移植を検討した。腎再生に関しても骨髄細胞が関与していることが報告されていたが、予想に反し EPC や骨髄単核球単独では十分な治療効果が得られなかった。一方、G-CSF 単独は有効であり、骨髄単核球と G-CSF の併用ではさらなる治療効果の増強が確認された。臨床応用を実現する際、この結果の持つ意味は大きいと考える。すなわち、幹細胞単独での投与という治療法に固執することなく幹細胞の作用を最大限に引き出す因子の併用可能性も検討する必要があると考えられた。次年度は、骨髄または脂肪組織由来間葉系幹細胞の単離・移植検討を行う予定である。

2) 組織特異的幹細胞チームはラットおよびマウスの腎由来幹/前駆細胞を急性腎不全モデルに移植、腎組織への生着、病態や生存率の改善を確認した。幹/前駆細胞としての形質を保持していると考えられるラット rKS56 やマウス mProx-SP が再生された尿細管管腔の一部を構成している所見が観察された。血漿クレアチニン上昇や組織学的な尿細管障害が有意に軽減しており、さらに尿中バイオマーカーレベルが低減したことから腎障害の軽減や障害からの回復促進が示唆された。標識された注入細胞の周囲に細胞集積が見られることから、注入細胞自体が増殖しているのか、注入細胞が腎局所に生着することにより液性因子を産生し、広範囲に腎再生を促しているのか、さらに検討が必要と考えられる。

3) セルプロセシングチームは、ヒト腎疾患患者尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、68.1%で成功した。今回、特に死体腎移植患者の術後 10 日目の尿から細胞が採取できたことは予後不良の患者から腎幹/前



駆細胞を採取できる可能性を示している。またヒトと同様の手法を用いて再現性良く、イヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、自家移植による急性腎不全に対する治療を開始した。今後は、コンセプト証明のためにも、細胞培養の系に添加する血清等をウシ由来ではなく同種由来に置換する必要がある。また、移植細胞の癌化等安全性評価も行う予定である。

さらに、ヒト尿中落下細胞からフローサイトメトリーによる細胞分離を行うことにより、ドーム形成能を有した近位尿細管前駆細胞を高率に単離することができた。

腎疾患患者の尿中には近位尿細管細胞へ分化しうる幹/前駆細胞が存在すると考えられた。

#### E. 結論

1) ラット骨髄末梢血幹細胞による細胞移植法の最適化検討を行い G-CSF との相乗的な治療効果を確認した。

2) ラット腎組織特異的幹細胞を急性腎不全モデルに移植し、腎組織への生着、腎機能の改善が見られた。また、マウス腎組織特異的幹細胞移植により、致死性の Cisplatin 腎症に対し、50%以上の生存率向上と組織病変の改善を達成した。

3) マウス腎組織特異的幹細胞をセルソーターにより単離、SP 分画を継代維持する培養方法の標準化に成功した。ヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、腎組織への生着能を確認した。

#### F. 健康危険情報

主任研究者: 大島 伸一: 特記事項なし

分担研究者: 篠崎 尚史: 特記事項なし  
菅谷 健: 特記事項なし  
室原 豊明: 特記事項なし  
小野 佳成: 特記事項なし  
松尾 清一: 特記事項なし  
山本 徳則: 特記事項なし  
榎野 博史: 特記事項なし  
野入 英世: 特記事項なし  
谷口 英樹: 特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamura T, Sugaya T, Node K, Ueda Y, Koide H: Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 47:439-444. 2006.
- 2) Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, Sugaya T, Sugiyama H, Maeshima Y, Makino H: Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *FASEB J.* 19:1789-1797. 2005.
- 3) Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Osada S, Koide H: Effect of Pitavastatin on urinary liver-type fatty acid-protein levels in patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 28:2728-2732. 2005.
- 4) Kondo N, Kiyomoto H, Yamamoto T, Miyatake A, Sun GP, Rahman M, Hitomi H, Moriwaki K, Hara T, Kimura S, Abe Y, Kohno M, Nishiyama A: Effects of calcium channel blockade on

- angiotensin II-induced peritubular ischemia in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Nov 30; [Epub ahead of print]
- 5) Fukuda N, Morinaga T, Matsuo S: GZF1, a new GDNF-inducible gene, is required for renal branching morphogenesis. *Kidney Int.* 68(5):1964. 2005.
  - 6) Morinaga T, Enomoto A, Shimono Y, Hirose F, Fukuda N, Dambara A, Jijiwa M, Kawai K, Hashimoto K, Ichihara M, Asai N, Murakumo Y, Matsuo S, Takahashi M: GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the HOXA10 gene regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 3:4191-4201. 2005.
  - 7) Mochizuki E, Fukuta K, Tada T, Harada T, Watanabe N, Matsuo S, Hashimoto H, Ozato K, Wakamatsu Y: Fish mesonephric model of polycystic kidney disease in medaka (*Oryzias latipes*) pc mutant. *Kidney Int.* 68(1)23-34. 2005.
  - 8) Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J: Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2005. 54:1823-1828.
  - 9) Sato W, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Muramatsu T: Midkine antisense oligodeoxynucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion. 2005. *Kidney Int.* 67:1330-1339.
  - 10) Suzuki S, Maruyama S, Sato W, Morita Y, Sato F, Miki Y, Kato S, Katsuno M, Sobue G, Yuzawa Y, Matsuo S: Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney int.* 67: 2210-2220. 2005.
  - 11) Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Kawai H, Matsuo S, Takei Y, Muramatsu T, Kadomatsu K: Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol.* 168: 9-19. 2006.
  - 12) Kitamura S, Yamasaki Y, Makino H: Establishment of renal stem/progenitor-like cell line from S3 segment of proximal tubules in adult rat kidney. *Kidney Int.* 68:1966 (abstr). 2005.
  - 13) Noiri E, Kobayashi N, Takamura Y, Iijima T, Takagi T, Doi K, Nakao A, Yamamoto T, Takeda S, Fujita: T Pulse total-hemoglobinometer provides accurate noninvasive monitoring. *Crit Care Med.* 33(12):2831-2835. 2005.
  - 14) Doi K, Okamoto K, Negishi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Toda A, Yokomizo T, Kita Y, Kihara Y, Ishii S, Shimizu T, Noiri E: Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Am J Pathol.*

- 2006 (in press).
- 15) Noiri E, Nagano N, Negishi K, Doi K, Miyata S, Abe M, Tanaka T, Okamoto K, Hanafusa N, Kondo Y, Ishizaka N, Fujita T: Efficacy of darbepoetin for doxorubicin induced cardio-renal injury in rat. *Nephron Exp.* 2006 (in press).
  - 16) 菅谷健, 野入英世, 土井研人, 根岸康介, 上條敦子, 木村健二郎: 腎虚血再灌流障害モデルにおける脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の腎保護作用. *Therapeutic Research.* 26:21-22. 2005.
2. 学会発表
- 1) Sugaya T, Noiri E, Yamamoto T, Doi K, Negishi K, Kamiyo A, Kimura K. L-type fatty acid-protein (L-FABP) ameliorates renal ischemia reperfusion injury (I/R) in human L-FABP transgenic mice. 3<sup>rd</sup> World Congress of Nephrology. A133, T-P010046. Singapore. June 28. 2005.
  - 2) Yamamoto T, Ono Y et al: Direct visualization of cortical Peritubular Capillary of transplanted human kidney with reperfusion injury using a magnifying endoscopy. ASN 2005
  - 3) Maruyama S, Ozaki T, Chabouk A, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, Matsuo S: Renoprotective properties of G-CSF and mononuclear cells derived from bone marrow. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
  - 4) Ozaki T, Chabouk A, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, Matsuo S: Recombinant human soluble thrombomodulin inhibits apoptosis and attenuates ischemic acute renal failure. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
  - 5) Chabouk A, Ozaki T, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, Matsuo S: The effects of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure, ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
  - 6) 與倉みどり, 谷口英樹, 岡本理志, 野入英世, 大島伸一, 篠崎尚史, 菅谷健: マウス腎組織特異的な幹細胞の単離培養法と細胞移植法の標準化検討. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 3月8-9日. 2006.
  - 7) 岡本理志, 菅谷健, 與倉みどり, 山本徳則, 篠崎尚史, 谷口英樹: ヒト尿中落下細胞からの腎臓幹/前駆細胞の単離. 第5回日本再生医療学会. 岡山. 3月8日. 2006.
  - 8) 松尾清一: 特別企画 慢性腎臓病の克服をめざして - Japan Chronic Kidney Disease Initiative/JCKDI「日本における慢性腎臓病(CKD)対策」. 第48回日本腎臓学会学術総会. 横浜. 6月23-26日. 2005.
  - 9) 喜多村真治: 腎不全CAPDラットに対する細胞治療の検討. 第48回日本腎臓学会総会. 横浜. 6月23-25日. 2005.
  - 10) 木野村賢, 喜多村真治, 山崎康司, 菅谷健, 前島洋平, 杉山斉, 槇野博史: 腎臓幹/前駆細胞様細胞(rKS56-LacZ細胞株)による虚血性急性腎不全モデルの障

害尿細管修復機序の検討. 第 48 回日本  
腎臓学会総会. 横浜. 6 月 23-25 日. 2005.

H. 知的財産権の出願・登録取得状況（予  
定を含む）

1. 特許取得

東京歯科大, 神戸理研: 特許出願準備中

松尾清一:

- ・ Geranylgeranylacetone 投与によるラッ  
ト腎での Hsp 70 の誘導と腎虚血再灌流障  
害の抑制作用について: 特許出願済
- ・ 低血清培養法を用いた脂肪由来幹細胞の  
分離・培養法: 特許出願済
- ・ 脂肪由来幹細胞を用いた再生医療: 特許  
申請準備中

槇野博史:

特願 2 0 0 3 - 0 7 1 0 2 9 : 腎臓幹細胞  
前駆細胞、腎臓幹細胞前駆細胞の分離方  
法、及び腎疾患の治療法（出願日 平成  
1 5 年 3 月 1 4 日）

2. 実用新案特許

なし

3. その他

平成 18 年 3 月 9 日付け

日本経済新聞(夕刊)記事掲載(別添)