

ES細胞に続け

再生医療が期待される主な医療材料

材料	再生が期待される臓器	研究主体
尿中の未熟な細胞	腎臓の一部	厚労省研究班
未熟な歯の細胞	骨、肝臓、神経細胞	産業技術総合研究所
臍帯血	目の網膜の一部	関西医科大学
脂肪	歯を支える骨	日本医科大学
精巣の細胞	心臓の一部	京都大学

病気がケガで傷んだ患部を治す再生医療に使う医療材料の研究で、本命といわれる「胚(はい)性幹細胞(E細胞)」以外の様々な細胞で成果が相次いでいる。関西医科大学は臍帯(さいたい)血中の細胞で網膜の一部を再生。理化学研究所や名古屋大学などが参加する厚生労働省研究班は尿中の細胞を腎臓の一部に変化させた。ES細胞に続く医療材料の開発が加速してきた。

再生医療、材料研究が加速

臍帯血から網膜 尿中細胞で腎臓

関西医大はヒトの臍帯(さいたい)血に含まれる未熟な細胞「加齢黄斑変性症や網膜をマウスの網膜の下に注射(はく)り」など、二週間後に網膜を構成する網膜神経細胞の層が新たにできた。物を見るために重要な働きをする。理研や名大、東京歯科

大学などの厚労省研究班(代表・大島伸一国立長寿医療センター総長)は、腎臓病患者の尿から採取した細胞を培養し、腎臓を健康に保つ尿管の細胞に育てることに成功し

た。これを傷んだ腎臓に注入すれば症状悪化を防げる可能性が高いという。三十四年以内に患者を対象に安全性と効果を調べる考えだ。産業技術総合研究所は生える前の人の歯の細胞

「加齢黄斑変性症や網膜をマウスの網膜の下に注射(はく)り」など、二週間後に網膜を構成する網膜神経細胞の層が新たにできた。物を見るために重要な働きをする。理研や名大、東京歯科

を健康に保つ尿管の細胞に育てることに成功し

「胚(はい)性幹細胞(E細胞)」以外の様々な細胞で成果が相次いでいる。関西医科大学は臍帯(さいたい)血中の細胞で網膜の一部を再生。理化学研究所や名古屋大学などが参加する厚生労働省研究班は尿中の細胞を腎臓の一部に変化させた。ES細胞に続く医療材料の開発が加速してきた。

「胚(はい)性幹細胞(E細胞)」以外の様々な細胞で成果が相次いでいる。関西医科大学は臍帯(さいたい)血中の細胞で網膜の一部を再生。理化学研究所や名古屋大学などが参加する厚生労働省研究班は尿中の細胞を腎臓の一部に変化させた。ES細胞に続く医療材料の開発が加速してきた。

日本経済新聞

夕刊
3月9日
(木曜日)

発行所 日本経済新聞社
東京本社 〒100-8066 東京都千代田区大手町1-8-5
東京支社 〒100-8066 東京都千代田区大手町1-8-5
大阪本社 〒540-8588 大阪府大阪市中央区大手前1-1-1
名古屋支社 〒460-8388 名古屋市中区栄4-16-33
福岡支社 〒812-8686 福岡県博多区博多駅前2-16-1

平和不動産

東京都中央区日本橋兜町1-10
http://www.heiwa-net.co.jp/

◇親も子も老人
自宅に死にたい老人は多かろう。だが、在宅ケアは家族に重圧だ。八十年代半ば過ぎの親と同層の家がある。心不全、脳発作、認知症も少々。倒れては病院に担ぎ込む。

「厳格だった父が、甘えないスピードで人口の高齢化全体重をあげてくる。二十世紀半ばには、胸に迫るものがある」と息子。国民の三人に一人が六十五歳は言つて。子は父よりひと回り以上。いわれる老老介護は夫も老人と呼ばれる年齢だ。婦の問題だが、親子の老老介護が国は、諸外国に例をみても深刻化。 (小)

再生医療 臓器や組織を元通りに修復する。再生医療の最新は治せない難病を克服する手立てになると注目されている。特殊な細胞を培養し、患部と置き換えて移植したりする。愛精卵の段階で作る「胚(はい)性幹細胞(E細胞)」が、あらゆる臓器や組織に育つと考えられており、再生医療の最有力材料といわれている。「非ES細胞」はES細胞に比べ培養してできる種類が限られるが、患者の体質にあった臓器や組織を作れる可能性が

研究者の論文がねつ造と判明し、改めて基礎研究に時間がかかるとの認識が広がっている。関西医科大学や厚労省研究班などの「非ES細胞」は、ES細胞のような可能性はないものの、ES細胞の抱えるような課題がないという。また、患者自身から採取して治療できる可能性がある。再生医療は十年後に国内市場が一兆円ともいわれており、非ES細胞の両輪で研究が進みそうだ。

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）

分担研究報告書

分担研究者 篠崎尚史・菅谷健・谷口英樹
室原豊明
小野佳成・山本徳則
松尾清一
槇野博史
野入英世

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）

分担研究報告書

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

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	センター長
分担研究者	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
分担研究者	谷口 英樹	横浜市立大学大学院医学研究科	臓器再生医学	教授
研究協力者	與倉 みどり	東京歯科大学市川総合病院	角膜センター	客員研究員
研究協力者	岡本 理志	理化学研究所	発生・再生科学総合研究センター	臓器再生研究ユニット 研究員

研究要旨

生体腎移植患者の尿から分離した細胞を培養し、増殖の見られた細胞集団の免疫組織学的解析や遺伝子発現解析を行った。また増殖した細胞からフローサイトメトリー(FCM)による細胞分離を行い、得られた細胞の特性解析を行った。腎疾患患者尿から分離した初代培養細胞は高増殖能を有し、敷石状形態を示したコロニーでは経上皮輸送能を獲得した結果生じるドーム形成が確認された。これらの細胞では AQP1 などの近位尿細管細胞マーカーや、Pax2, Pax8 など腎臓の発生に必須の遺伝子の発現が見られた。以上のことから、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。また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。FCM 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。さらにイヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、自家移植に供した。われわれの開発した培養方法と FCM 技術を組み合わせることにより、細胞移植に必要な細胞数を確保し、腎疾患治療法の開発に応用できると考えられる。

A. 研究目的

本研究は、腎障害の重症化防止を達成し、幹細胞移植による残存腎機能の再構築を目指す実用化研究である。近年、腎臓にも組織性幹/前駆細胞の存在が示唆されているが、この細胞を腎疾患患者本人から効率的に採取できれば、腎疾患に対する自己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1) 腎疾患患者の尿から腎臓幹/前駆細胞を効率よく単離し、細胞形質について解析すること、2) 得られた腎臓幹/前駆細胞の培養条件を標準化し、他の分担研究グループに移植用細胞として提供することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 尿中落下細胞の培養

まず、腎疾患患者の尿中から尿中落下細胞を分離し、培養した。

詳細には、生体腎移植手術直後の患者の尿10mlを無菌的に採取し、4℃、1100rpmの条件で5分間遠心分離し、上清を除去した後、10% FBS (Fetal Bovine Serum) (MBL) を含有するDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) 10ml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 (Sigma) に

終濃度として5 mg/ml インスリン、5 mg/ml トランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2.5 mg/ml ニコチナマイド、 10^{-8} M デキサメタゾン（以上、全て Sigma）を添加した培地と、マウス間葉系細胞を10% FBSを含有するDMEMで約24時間培養した際の培養上清とを1:1で混合した培地 10 ml で懸濁し、ゼラチンコーティングを行った細胞培養皿 (BD FALCON) にて培養した。

(2) 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 1.5×10^6 個に、ISOGEN (ニッポンジーン) 1 ml を加えて懸濁し、さらに0.2 ml のクロロホルムを加えてよく混合した後、4°C、12000 rpm の条件で10分間遠心分離した。そして、上清に0.5 ml のイソプロパノールを加えてよく混合してから、4°C、12000 rpm の条件で20分間遠心分離し、上清を除去してから1 ml の75% エタノールで洗浄した後、風乾させた。このようにして得られた 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。

(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トリプシン-E D T A 溶液 (Invitrogen) を用いて培養皿から剥がし、 1×10^6 個/ml となるように2% FBS を含有する DMEM に懸濁したものを2本調製した。そして、各サンプルにヘキスト 33342 (Morecular Probe) を5 mg/ml となるように添加し、一方のサンプルのみにレセルピン (Sigma) を1 mg/ml となるように添加して陰性コントロールとした。その後、細胞を37°C で1時間、振盪培養した後、遠心分離して上清を除去し、上清除去後の細胞を、死細胞を選別する目的で PI (propidium iodide) を1 mg/ml となるように添加した、2% FBS、10 mM HEPES (Invitrogen)、102 U/ml ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen) を含有する HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) で懸濁し、蛍光活性化セルソーター (BD FACSAria、Beckton Dickinson) を用いて SP 細胞の解析、分離を行った。

(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。

詳細には、ヒト腎臓幹/前駆細胞を異種移植する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 (約25 g) を使用し、両腎臓の腎動静脈を駆血し、30分後虚血を解除し、虚血性急性腎不全モデルを作製した。分離した SP 細胞をさらに5週間培養し、トリプシン-E D T A 溶液 (Invitrogen)

を用いて単一細胞にまで分散させた後、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。そして、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。

(5) 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。

(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。動物実験については、共同研究施設である東京大学医学部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) 尿中落下細胞の培養

細胞を経時的に顕微鏡観察した結果を図 1 に示す。図 1 (A) ~ (E) は、それぞれ 3 日、4 日、6 日、8 日、15 日経過後の細胞を示したものである。細胞は培養開始後 24 時間以内に培養皿上に生着し、以後 12 ~ 24 時間毎に細胞分裂を行い、培養開始から 2 週間後には約 5×10^6 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、敷石上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、図 2 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。

(2) 尿中落下細胞の遺伝子発現解析

尿中落下細胞においては、アクアポリン 1、Na⁺/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

細管及びヘンレーループで発現するNa⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A4)、K-カドヘリン、ヘンレーループ及び遠位尿細管で発現するNa⁺/HCO₃⁻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。その一方で、ネフリンやP-カドヘリンなどの腎小体特異的な遺伝子や、アクアポリン2やNa⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A1)などの集合管特異的な遺伝子の発現は確認されなかった。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>ヘンレーループ>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。

(3) 尿中落下細胞からの腎臓幹/前駆細胞の分離

SP細胞の解析結果を図3に示す。図3(A)はレセルピンを添加していないサンプルを示し、図3(B)はレセルピンを添加した陰性コントロールのサンプルを示す。図中、実線で囲んだ領域がヘキスト33342弱陽性又は陰性画分である。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しているため、この画分がSP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SP細胞が存在した。

このSP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。細胞を経時的に顕微鏡観察した結果を図4に示

す。図4(A)~(F)は、それぞれ12時間、3日、10日、15日、19日、22日経過後の細胞を示したものである。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性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、SP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弱陽性又は陰性のSP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。

(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図6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。

(5) 腎臓幹/前駆細胞の培養法の標準化

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 13 日目には細胞の経上皮輸送能を示すドーム形成を観察された。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。

D. 考察

DNA 結合色素であるヘキスト 33342 (Hoechst33342) は、紫外線レーザー光で励起すると 400~600 nm 以上に亘る広範囲の蛍光を発することが知られており、多種の細胞が混ざったヘテロな細胞集団、例えば骨髄細胞等をこの色素で染色した後にフローサイトメトリーを用いて 450 nm 前後の青色蛍光と 675 nm 前後の赤色蛍光とで二次元に展開すると、通常の細胞周期解析で見られる G0/G1 期の細胞よりもさらに蛍光の暗い部分に特異なパターンを持つヘキスト 33342 弱陽性又は陰性の細胞集団が現れる。この細胞集団は、残りの大部分の細胞が属する主集団 (main population; MP) から突出した展開パターンを示すため、サイドポピュレーション (side population; SP) 細胞と呼ばれる。

骨髄細胞においては、この SP 細胞中に造血幹細胞が濃縮されていることが知られている (Goodell M. A. et al., J. Exp. Med., 183, 1797, 1996)。また、骨髄以外に、脳や骨格筋、心臓、肝臓、腎臓などの組織中でも SP 細胞が見つかっており (Murayama A. et al., J. Neurosci. Res., 69, 837, 2002, Gussoni E. et al., Nature, 401, 390, 1999, Hierlihy A. M. et al., FEBS Lett., 530, 239, 2002, Asakura A. et al., Exp. Hematol., 30, 1339, 2002、

Iwatani H. et al., *Kidney Int.*, **65**, 1604, 2004)、尿中落下細胞の中にも組織幹細胞として混在している可能性がある。

今回の検討で、腎疾患患者尿から分離した初代培養細胞は高増殖能を有し、敷石状形態を示したコロニーでは経上皮輸送能を獲得した結果生じるドーム形成が確認された。これらの細胞ではAQP1などの近位尿細管細胞マーカーや、Pax2, Pax8など腎臓の発生に必須の遺伝子の発現が見られた。以上のことから、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

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。

本分担研究グループにて開発された培養方法とフローサイトメトリーを組み合わせることにより、近位尿細管細胞に分化しうる腎臓幹/前駆細胞を高率に単離、培養、維持することができた。こうして管理培養された細胞は凍結融解や継代が可能であるため、細胞移植に必要な細胞数を確保し、腎疾患治療法の開発に応用できると考えられる。

次年度以降、現在マウス間葉系細胞の培養上清により代用しているヒト腎臓幹/前駆細胞の培養に適したヒト間葉系細胞の選択と、ヒト腎臓幹/前駆細胞の細胞移植を想定した場合生じる安全性評価や癌原性評価を計画している。

F. 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) 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) 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9日. 2006.
- 2) 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.

- 3) 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. 3rd World Congress of Nephrology. A133, T-P010046. Singapore. June 28. 2005.

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

特許出願準備中

図 1

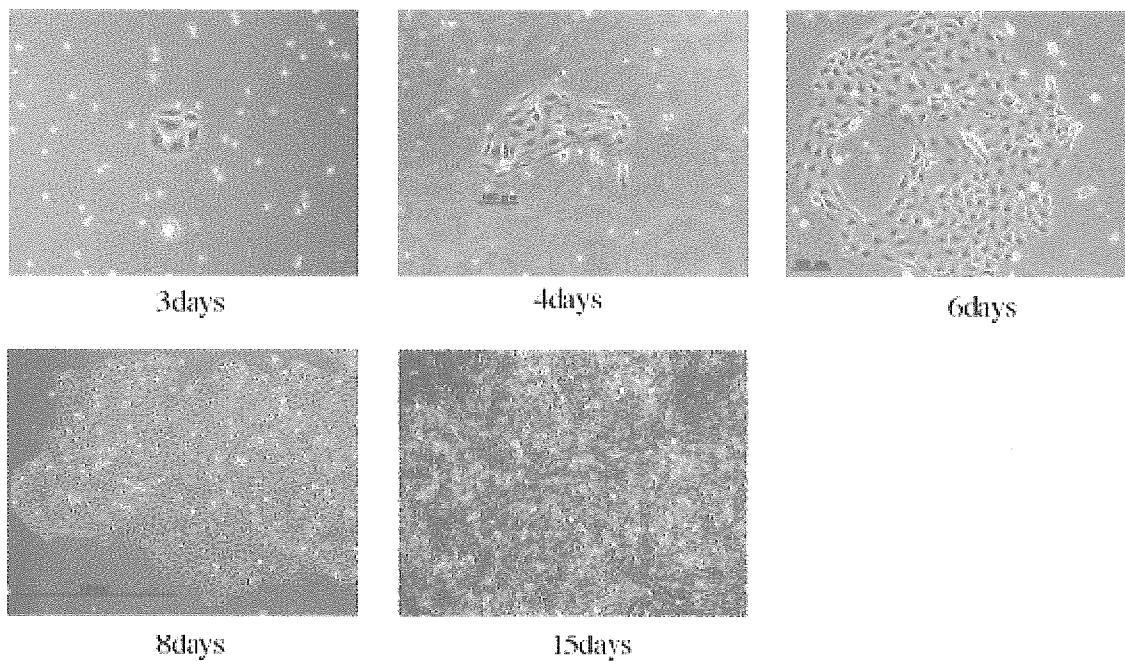


図 2

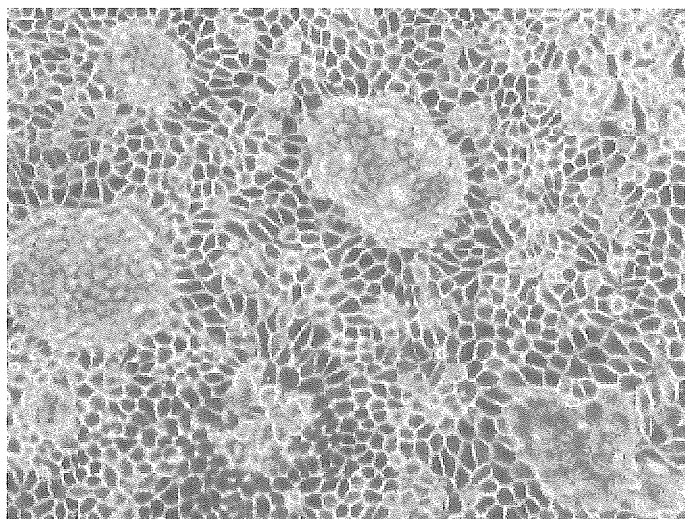
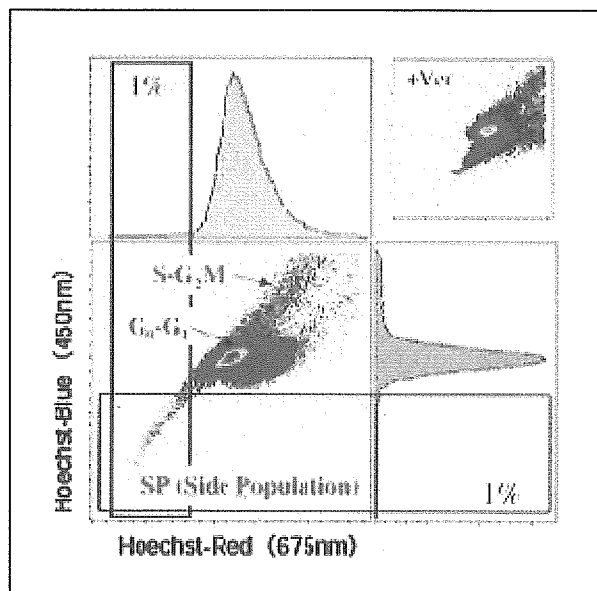
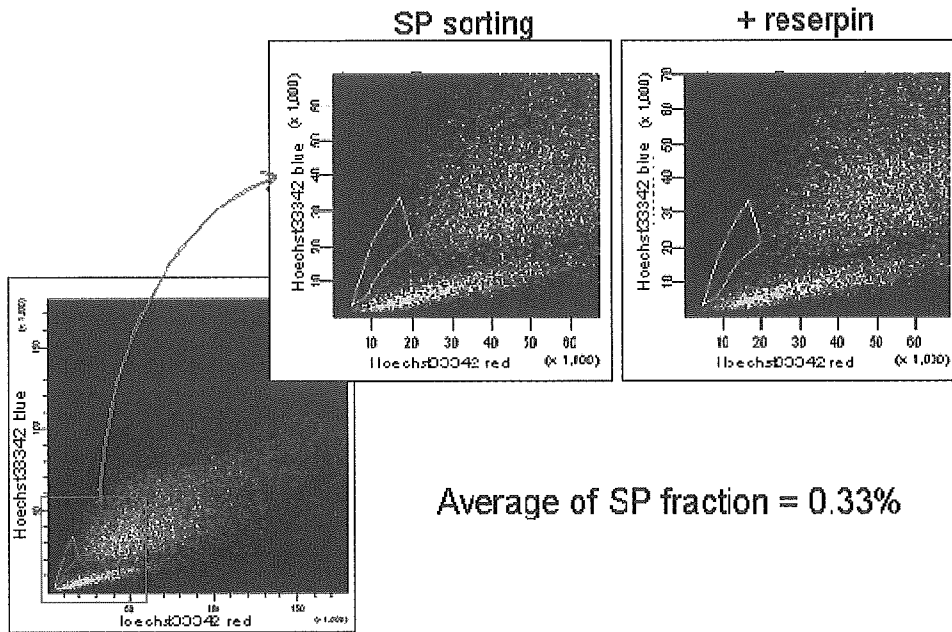


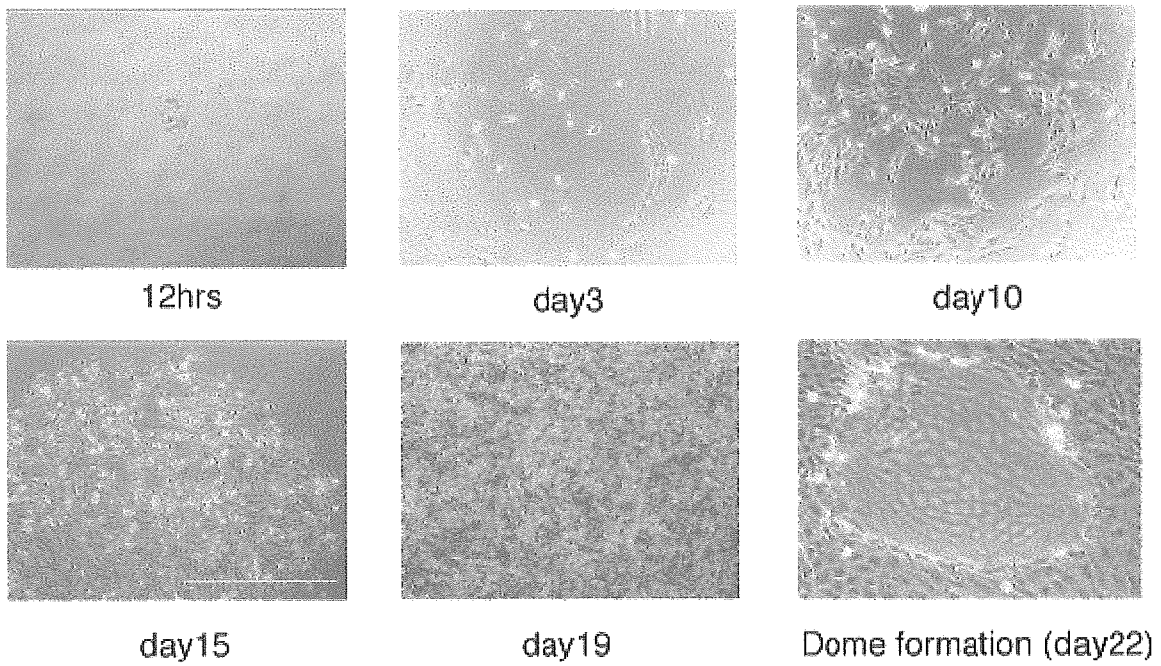
図 3



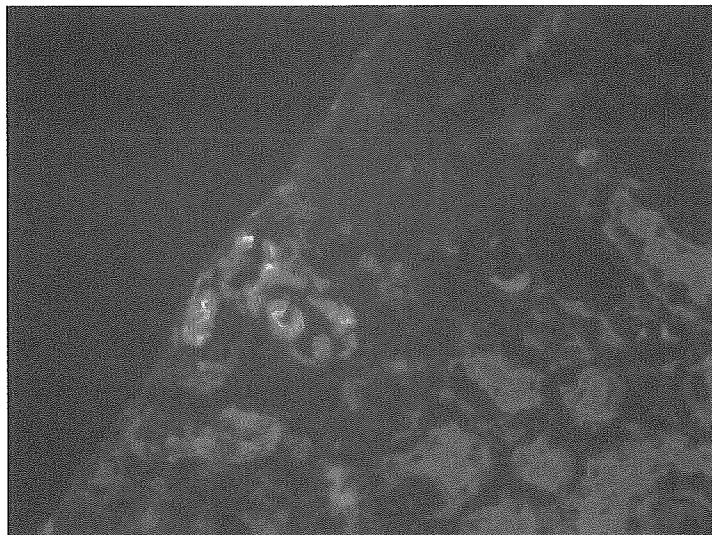
☒ 4



☒ 5



☒ 6



研究要旨

研究の目的は、ラット薬剤性腎障害モデルにおける骨髄細胞の効果を検討することである。急性腎不全モデルである Cisplatin 腎症ラットにおいて、骨髄細胞より培養した EPC による効果を検討し、慢性腎不全モデルである Doxorubicin 腎症ラットにおいて、骨髄細胞より培養した、間葉系幹細胞による効果を検討した。

Cisplatin 腎症ラットにおいては、経静脈的に EPC を投与したが、EPC による効果は現在のところ認められていない。このモデルについては、今後、投与する細胞数、種類、経路、時期などについて検討する必要があると考えられる。Doxorubicin 腎症ラットにおいては、骨髄細胞より培養した間葉系幹細胞を投与したが、蛋白尿などのパラメーターでは明らかな効果を認めていない。今後は、実験を重ねると共に、腎臓の組織学的な検討を行う予定である。

現在のところ、薬剤性腎障害モデルにおいて、骨髄細胞より培養した幹細胞投与による明らかな効果は単独では認められていない。今後、骨髄細胞による効果的な治療法について更に検討を行う予定である。

A. 研究目的

本研究の目的は、腎障害の重症化防止を達成し、幹細胞移植による残存腎機能の再構築を目指す実用化研究である。我々の研究の目的は、骨髄幹細胞を投与することにより腎障害モデルに対する腎機能改善効果と腎臓再生治療の可能性を検討することである。

初年度の目的として、小動物モデルとしてラット薬剤性腎障害モデルにおける骨髄幹細胞投与の効果を検討する。また幹細胞の種類による効果の増強などが認められるかの検討も行うため、骨髄細胞から、Endothelial progenitor cell (EPC) や間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) を培養してラット薬剤性腎障害モデル投与し、その効果を検討する。

B. 研究方法

(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。

(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。骨髄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、 $10^8/\text{ml}$ 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、 $10^7/\text{ml}$ 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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋大学医学部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) 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による効果は現在のところ認められていない。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い。

(2) Doxorubicin腎症ラット

このモデルについては、現在、検討中である。十分な実験動物の数が揃っていないため評価は不十分であるが、尿蛋白の検討

では明らかな間葉系幹細胞による効果は認めていない。今後、実験を重ねるとともに、腎臓の免疫組織学的な検討を行い、間葉系幹細胞による効果について評価する。

D. 考察

今までのところ、虚血再灌流による腎障害や、抗体を使用した糸球体腎炎モデルにおいて、骨髄幹細胞による腎障害の修復については数多く報告されている(Am J Pathol 2003;163:503)と(J Clin Invest 2003;112:42)。また、骨髄細胞投与による腎再生治療における有用性についても数多く報告されている(J Am Soc Nephrol 2004;15:1794)と(J Am Soc Nephrol 2005;16:997)。これらの報告では、糸球体のメサングウム細胞の増殖が抑制されることや、腎臓において投与した骨髄細胞の定着や分化も報告されており、骨髄幹細胞は腎臓の細胞に分化する能力があることが示唆される。

一方で、腎臓の修復過程においては、腎臓内の間葉系の幹細胞(mesenchymal stem cell)が関与しており、骨髄細胞の関与は少ないとの報告もされている(J Clin Invest 2005;115:1756)。また、マウスモデルであるが、シスプラチン障害モデルにおいて、mesenchymal stem cellでは効果を認めるが、hematopoietic stem cellでは効果を認めないという報告もある(J Am Soc Nephrol 2004;15:1794)。

我々の検討では、Cisplatin腎症ラットにおいては、EPCは明らかな効果を示さなかった。このことは、腎臓の再生治療には間葉系の幹細胞の方が、より効果の強い可能性があることを示唆していると考えられる。

しかし、EPC が Cisplatin 腎症ラットに効果がないかは、細胞数の増加、投与時期の変更、経静脈的ではなく腎動脈など選択的な投与方法などを考慮した上で決定すべきと考えられる。また骨髄細胞を培養して EPC としたものは、VEGF といった血管新生に必要な cytokine を多く分泌することも報告されており、この点からも効果が期待できると考えられる。

Cisplatin 腎症ラットは急性腎不全モデルであるが、薬剤生を含めた慢性腎不全モデルでは、今までのところ骨髄幹細胞を使用して治療効果があるという報告はないと考えられる。Doxorubicin 腎症ラットは、以前より慢性腎不全モデルとしてよく知られているため、今回モデルとして使用した。腎臓に治療効果が高いと考えられる間葉系細胞を投与して検討中である。十分な数がないため評価不十分だが、現在のところ、尿蛋白では明らかな効果は認めていない。今後、実験を進めると共に組織学的検討を行っていく予定である。

また、骨髄細胞からの間葉系幹細胞の培養で十分数を増加させることができていない。投与経路も含めて今後検討する必要があると考えられる。

E. 結論

現在のところ、薬剤性腎障害モデルにおいて、骨髄細胞より培養した幹細胞投与による明らかな効果は単独では認められていない。今後は、骨髄細胞による治療を効果的にして実用化するために、薬剤性腎障害モデルにおいて、骨髄細胞の培養法と共に投与する幹細胞の種類、数、経路、時期な

どについて検討を行う必要があると考えられる。

F. 研究発表

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

該当なし。

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）

分担研究報告書

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

分担研究者 名古屋大学医学部泌尿器科学 助教授 小野 佳成

助手 山本 徳則

研究協力者 理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・臓器再生研究ユニット

研究員 菅谷 健

主任研究員 谷口 英樹

東京大学医学部附属病院

腎臓内科講師 野入永世

研究要旨

腎臓再生において腎臓特異的幹細胞は大きな役割を果たすことが予測されている。そこで腎臓特異的幹細胞的な細胞すなわち尿細管上皮前駆細胞を同定培養そして細胞治療について検討する必要がある。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。それに加えて、生体腎移植14症例に対して腎血管吻合後60分の尿中落下細胞を含む尿を無菌的を採取して同定、培養を行い、ドーム形成する尿細管上皮前駆細胞を 78.6%(11/14)に培養することに成功した。腎虚血再灌流直後60分の尿からの尿中落下細胞より尿細管前駆細胞が同定培養可能であることを明らかにした。臨床治療を目的とした単腎症虚血再灌流イヌ障害に対する尿細管上皮前駆細胞治療実験を行って効果を評価している最中である。

A. 研究目的

尿細管上皮細胞再生において、腎外の細胞と腎内の細胞が関与していることが知られている。前者においては、骨髄幹細胞または間葉系細胞が後者においては臓器特異的幹細胞であるが、腎臓の尿細管上皮そのものを再生するにあたり大きな役割を果たすのは後者であることが明らかにされつつある。今回後者の臓器幹細胞的特徴を有する尿細管上皮前駆細胞を同定培養し、イヌ腎障害モデル治療を試みた。

B. 研究方法

(1) 尿細管上皮前駆細胞の同定培養

ヒトゲノム・再生医療等研究事業での共同研究施設である岡山大学のグループが尿

細管S3セグメントから尿細管前駆細胞を同定培養(FASEB2005)しているが、同様な方法を用いて行った。なお細胞は 10^6 - 8 /個まで培養した。

(2) 尿中落下細胞採取方法

麻酔イヌを正中切開により左腎尿管を露出させ、中部尿管を切開7Fのチューブを腎盂に留置し無菌的に採取した。

(3) 尿細管上皮前駆細胞の処理投与

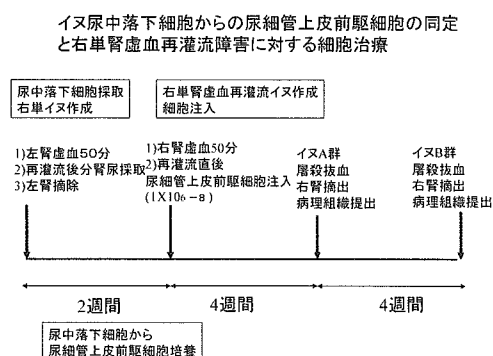
蛍光色素で尿細管上皮前駆細胞をマーカ一し、 10^6 - 8 /個の細胞を腎中央に1カ所または、上極、中央そして下極の3カ所に3分割して局所注入した。

(4) 右単腎症腎虚血再灌流障害イヌの作成 左腎虚血50分直後から1時間上記の方法で無菌的に尿を採取する。4週間後同

イヌを開腹し、右腎臓動脈を露出し50分クランプし右単腎症腎虚血再灌流障害を作成し、血流再開直後に細胞を上記の方法で投与した。

(2) 採血採尿と病理組織

実験のプロトコールを示す。



(倫理面への配慮)

名古屋大学倫理委員会においてこの研究はすでに承認され、十分な倫理的配慮がなされている。

C. 研究結果

イヌ尿中落下細胞

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。SP fraction は0.100%と増殖能力の高い細胞であった。この培養細胞は AQP-1、ZO-1 が発現し、近位尿管への分化を示唆する可能性があった。

単腎50分虚血障害イヌに対して蛍光でラベリングした尿管上皮前駆細胞を局所注入し、その4週間後腎臓被膜下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蛍光でラベリングした尿管上皮前駆細胞を確認した。

胞を確認した。

単腎50分虚血障害イヌに対して蛍光でラベリングした尿管上皮前駆細胞を局所注入し、その8週間で評価した。細胞注入時にマーキングのために腎臓表面にかけていたバイクリルとその周囲の皮下出血はすっかり吸収され正常腎臓とかわらないマクロの所見であった。なお病理組織でも再生に関与したと思われる軽度の細胞浸潤はあるが異常を認めなかった。8週間後蛍光でマーキングした尿管上皮前駆細胞を確認できなかったが、PAS 陽性の細い束のようになった尿管を皮髄境界に一部認めた。再生を示唆する所見か現在増殖マーカーを用いて検討中である。細胞の代わりに生食を打ち込んだコントロール群を6頭作成、治療群との腎機能と病理組織との比較を行う。

ヒト尿中落下細胞

14症例の生体腎移植症例に対して腎血管吻合後60分の尿中落下細胞を含む尿を無菌的を採取して培養を行った。その結果ドーム形成する尿管上皮細胞を78.6%(11/14)に培養することに成功した。

D. 考察

腎機能評価の結果を待つところが大きい、現時点では摘出腎マクロそして病理組織所見より、この尿管上皮細胞は単腎症虚血再灌流イヌモデルの腎障害を軽減せしめる可能性を示唆した。今後は同様な方法でさらに胚葉の異なる骨髓細胞と尿管上皮前駆細胞を混合したものを注入する予定である。

E. 結論

イヌ、ヒトにおいて虚血再灌流直後の無菌尿の尿中落下差細胞から尿細管上皮前駆細胞を培養同定することに成功した。単腎50分虚血障害イヌに対する細胞治療の実験中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katoh M, Ono Y, Ohshima S et al: Long time follow up of CD28- CD4+ T cells in living kidney transplant patients. Clin Transplant. 18:242-246. 2005.
- 2) Noiri E, Yamamoto T et al: Pulse total-hemoglobinometer provides accurate noninvasive monitoring. Crit Care Med. 2005 Dec;33(12):2831-5.
- 3) Kondo N, Yamamoto T et al: Effects of calcium channel blockade on angiotensin II-induced peritubular ischemia in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2005 Nov 30; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 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

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む） なし

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）

分担研究報告書

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

分担研究者	松尾 清一	名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学分野教授
研究協力者	丸山 彰一	名古屋大学医学部附属病院腎臓内科科講師
	尾崎 武徳	名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学大学院生
	安田 香	名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学大学院生
	シャブーク アナス	名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学大学院生

研究要旨

透析医療に要する医療費は莫大なものである。さらに慢性腎疾患が心血管疾患に対する危険因子であることが明らかとなり、慢性腎不全の阻止は医療全体を考えた上でも大変重要な課題となっている。本研究は、体性幹細胞移植による腎機能の再構築を目指す実用化研究である。

臍帯血由来内皮前駆細胞の投与はラットの糖尿病性神経障害を軽減した。骨髄由来幹細胞はG-CSFとの併用により治療効果を示した。脂肪組織から自己血清を用いて幹細胞を分離・培養し、その幹細胞を動物モデルに投与することで治療効果が得られることを見出した。またトロンボモジュリン、ホスホジエステラーゼインヒビター、Geranylgeranylacetoneといった臨床応用可能な薬剤が腎保護および腎再生促進作用を有することを明らかにした。多機能成長因子であるmidkineの制御が、腎虚血再灌流障害や糖尿病性腎症を発症・進展を抑制するという結果が得られた。さらに腎臓の発生に関わる新規分子GZF1の結合遺伝子がHOXA10であることを見出した。メダカのpcモデルを樹立し、pc原因遺伝子を同定することに成功した。

本研究の成果は体性幹細胞を用いた腎再生療法の開発を推し進める上で大変重要なものであると考えられた。

A. 研究目的

我が国の透析患者数は25万人を超えなお直線的に増え続けている。透析に要する医療費は1兆円を超えており、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。さらに最近では慢性腎臓病が心血管疾患の独立した危険因子であることが報告されており、腎不全患者を減らすことの重要性が再認識されている。本研究は、腎障害の進行防止を達成すべく、体性幹細胞移植による腎機能の再構築を目指す実用化研究である。

我々は各種体性幹細胞を動物モデルに投与しその治療効果を検討することを目的とする研究を計画した。近年、骨髄幹細胞が

下肢虚血病変に有効であることが明らかとなり、臨床応用されている。体性幹細胞の採取元としては、従来から主に骨髄、臍帯血、末梢血などが用いられてきた。我々はまず臍帯血由来の内皮前駆細胞を糖尿病ラットに投与し、神経障害に対する治療効果を検討した。続いて骨髄幹細胞が腎障害にも有効であるかどうかを検討するために小動物にて腎障害モデルを作成し、骨髄単核球細胞を投与しその効果を検討した。同時にG-CSFなどのサイトカインを同時に投与することにより治療効果が増強されるかどうかも検討した。最近では脂肪組織中には豊富な幹細胞が含まれていることが明らかとなり、脂肪由来間葉系幹細胞も細胞治療の

ソースとして注目されている。我々はヒト脂肪組織より効率よく間葉系幹細胞を分離培養する方法の開発を試みた。また、この脂肪由来幹細胞を用いて疾患動物モデルに対する治療効果を検討した。

腎再生を関連する分子・薬剤を同定し、その作用機序を解明することを目的とする研究も進めている。急性尿細管壊死後に尿細管上皮細胞は再生するが、その再生をより増強する薬剤が同定されれば、腎再生医療の実現には大きな前進となると考える。我々は現在すでに臨床で使用可能もしくは近い将来に使用可能となるべき薬剤に着目した。具体的には、トロンボモジュリン、ホスホジエステラーゼインヒビター、Geranylgeranylacetoneなどを急性腎不全モデルラットへ投与し治療効果を検討した。また、腎障害における多機能成長因子である midkine の役割の解明と midkine 抑制による腎疾患モデルに対する治療効果を明らかにするための研究も行った。

腎再生医療を実現するためには腎発生のメカニズムを解明することも重要であると考えている。我々が従来から行ってきた**腎発生の分子メカニズムの解明を目的とした基礎的研究**も進めている。具体的には、腎発生時の尿管芽の発芽、進展に関わる新規分子 (GZF1) の機能解明、Polycystic Kidney disease メダカモデルを用いた腎尿細管発生に関わる分子の検討などを行った。

以上のように様々な角度から腎再生に関する研究を行い、最終的にはこれらの研究成果を統合しより有効な腎不全治療法を開発する予定である。本研究は**実現可能な腎再生医療の開発を最終的な目的とする研究**と位置づけられる。

B. 研究方法

(1) 臍帯血由来内皮前駆細胞の糖尿病神経障害に対する治療効果の検討

ヒト臍帯静脈血より単核球細胞分画を分離し、内皮細胞条件にて培養した。得られた細胞が血管内皮前駆細胞 (EPCs) であることをアセチル化 LDL の取り込み、マトリゲル上での Tube formation の形成、フローサイトメトリーで CD34⁺、CD45⁻であることなどより確認した。次に、ヌードラットに Streptozotocin (STZ) 60mg/kg を腹腔内投与し、糖尿病モデルを作成した。8週間後に上記の EPCs 1×10^6 個を下肢筋肉内に注入した。コントロール群は同量の生理食塩水を筋注した。治療4週間後に運動神経伝導速度 (MNCV)、坐骨神経内膜栄養血流 (SNBF) を測定した後、下肢筋肉組織を採取し、von Willebrand factor (vWF) にて免疫染色を行い、capillary-to-muscle fiber ratio にて毛細血管密度を評価した。

(2) 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

7週齢の Lewis ラットに cisplatin 6 mg/kg を腹腔内投与し、骨髄単核球細胞単独群、G-CSF 単独群、G-CSF + 骨髄単核球細胞群、コントロール群の4群に分けた。骨髄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髄単核球細胞 2.5×10^7 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 μ g/kg を皮下投与した。G-CSF + 骨髄単核球細胞群では、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髄単核

球細胞 2.0×10^7 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。

(3) ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養と動物モデルにおける治療効果の検討

- 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。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。

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。

(4) 腎虚血再還流障害に対する thrombomodulin の効果の検討

12 週齢の SD ラットに右腎摘出を行い、1 週間後に左腎動脈より腎臓内に HRS-TM 0.25 mg/kg、同量の生食、argatroban 20 μ g/kg をそれぞれ充填したのち腎動静脈を 45 分間クランプした。再還流後 24 時間後に CCD カメラにて腎尿管周囲毛細血管の血流を測定した。その後ラットを屠殺し腎組織および血液を採取し、病理組織所見および BUN, S-Cr につき比較検討した。また、培養ラット尿管上皮細胞へ H_2O_2 200 μ M を 6 時間負荷し、HRS-TM 10 μ g/ml を同時に添加した群と添加しなかった群で TUNEL 陽性細胞数を比較検討した。

(5) 腎虚血再還流障害に対する塩酸 olprinone の効果の検討

(実験 1) 12 週齢の SD ラットに右腎摘出を行った後、皮下に浸透圧ポンプ (alzet osmotic pumps) を埋め込み、塩酸 olprinone を 0.2 μ g/kg/min で持続投与した。コントロールとして同量の生理食塩水を同じポンプを用いて皮下投与した。ポンプ埋め込み後 30 分後に左腎動静脈を 45 分間クランプし、再還流後 24 時間後に CCD カメラにて腎尿管周囲毛細血管の血流を測定した。