

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-一般-010)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大島 伸一

平成19 (2007) 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 | |
| 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 | 25 |
| 篠崎尚史, 菅谷健, 谷口英樹 | |
| 2. 骨髄単核球細胞及び骨髄由来間葉系細胞移植は腎機能を改善しうるか? | |
| 慢性腎不全モデルラットにおける検討 | 37 |
| 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 | 41 |
| 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 | 44 |
| 松尾清一 | |
| 5. 組織特異的幹細胞移植に関する研究 | 60 |
| 槇野博史 | |
| 6. 組織特異的幹細胞移植に関する研究 | 71 |
| 野入英世 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 81 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 84 |

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

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循環器内科学教授
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腎臓内科学教授
山本 徳則 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学講師
楨野 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、移植細胞の安全性評価法の確立と移植プロセスのバリデーションが求められる。本研究班では移植細胞の分担別に 1) 骨髄末梢血間葉系幹細胞チームと 2) 上皮系幹細胞チームとが、3) それら細胞の単離培養法の標準化と安全性評価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。

2年目の本年 1) 骨髄末梢血間葉系幹細胞チームはヒト脂肪細胞から効率よく間葉系幹細胞を分離培養する方法を確立し、サイトカイン分泌能の高い間葉系細胞を選択的に分離できた。さらにこのヒト細胞を腎不全ヌードラット腎被膜下に投与することにより長期間の生着と腎機能改善が達成された。一方、ラット骨髄由来間葉系細胞を静脈内投与しても腎機能の改善は見られなかった。2) 組織特異的上皮系幹細胞チームはラット腎幹細胞を急性腎不全モデルに被膜下移植した結果、多種の腎尿細管上皮細胞への分化、生着、腎機能改善を確認した。また、マウス腎幹細胞について、致死性の Cisplatin 腎症に対し生存率向上を可能にする移植細胞の形質を明らかにした。一方、慢性腎不全モデルに対しては、これら上皮系幹細胞の被膜下移植が困難であった。3) セルプロセッシングチームは、昨年度標準化された培養法に従い、ヒト腎疾患患者尿中からの腎幹/前駆細胞の単離培養例を昨年比し倍増できた。また同様にイヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、急性腎不全に対する自家移植法の手技的検討を行い、治療効果を明らかにした。

さらに本研究班にて開発された腎幹/前駆細胞の効率的な単離を可能にするバイオマーカーを用いて、移植細胞の安全性評価法確立の可能性が提示された。

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

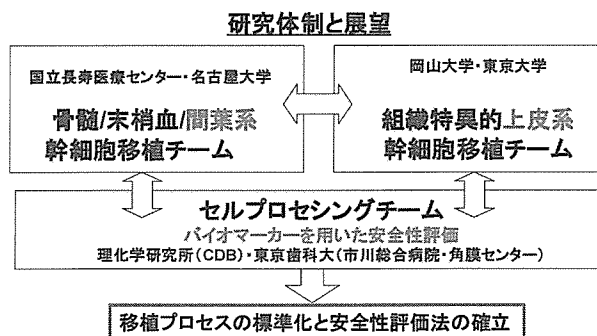
多大なものとなっている。さらに最近では慢性腎臓病が心血管疾患の独立した危険因子であることが報告されており、腎不全患者を減らすことの重要性が再認識されている。このような背景から、現在有効な治療薬のない

末期腎不全に対し、自家細胞移植による重症化防止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の再構築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。実用化には、これら細胞の腎疾患患者本人からの効率的な採取、その培養・移植法の標準化、および移植細胞の安全性評価法の確立が必須である。そこで2年目の本年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上皮系幹/前駆細胞の単離と、培養実施例の数値目標達成。(2) イヌ尿中細胞の単離培養と自家細胞移植実施例の増加。(3) ラット骨髄末梢血間葉系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・培養条件の標準化。(5) ラット腎組織特異的上皮系幹/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上皮系幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療および安全性評価。

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京

病院にて施行された生体腎移植 28 例、死体腎移植 10 例、腎部分切除術 18 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。

尿中落下細胞の単離・培養法は昨年度標準化したプロトコールに準じた。すなわち、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の単一細胞由来と考えられる各コロニーにおける遺伝子発現を確認した。

詳細には、上述のようにして単一細胞由来と考えられる初代培養を経時的に検鏡下 2 週間観察し続けた同心円状の各コロニーから total RNA を得た。RT-PCR 法または遺伝子チップ (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。

(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

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。細胞移植を行わないコントロールとして左腎摘出4週間後に右腎の50分虚血再灌流が6例実施された。

詳細には、左腎虚血50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。採尿後、左腎を摘出し、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50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、下極の2カ所に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。その間、経時的に採血し、細胞移植群とコントロール群とに関して、腎機能を追跡した。

(3) ラット骨髄末梢血幹細胞

(3-1) Doxorubicin 腎症モデルの妥当性検証

細胞移植の治療効果を判定する慢性腎不全モデルとしてDoxorubicin腎症ラットを用いることの妥当性を検証するため、薬剤介入により進行性の組織障害抑制と腎不全の重症化防止が可能かどうか検証した。介入プロトコールは添付論文の通り。

(3-2) Doxorubicin 腎症ラット

慢性腎不全モデルとしてDoxorubicin腎症ラットを用いて骨髄単核球細胞(BM-MNCs)及び骨髄由来間葉系細胞(BM-MSCs)による治療効果を検討した。

骨髄細胞の培養は既報に準じた(Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:4857)。

経静脈的投与 : Wistar rat (6-8wks, male) を以下の4群にランダムにわけた。Control群、Doxorubicin+生食投与群、Doxorubicin+BM-MNCs投与群、Doxorubicin+BM-MSCs投与群とした。Doxorubicinは、5mg/kgを経静脈的に投与した。BM-MNCs及びBM-MSCsはDoxorubicin投与時に経静脈的に投与した。BM-MNCsは、 10^8 個とし、BM-MSCsは、必要数が培養から得られなかったため、 10^6 個とした。Doxorubicin投与4週間後、蛋白尿、血液クレアチニン値、腎組織などの評価を行った。

腎実質内投与 : F344/N rat (6-8wks, male) を以下の4群にランダムにわけた。Control群、Doxorubicin+生食投与群、Doxorubicin+BM-MNCs投与群、Doxorubicin+BM-MSCs投与群とした。Doxorubicinは5mg/kgを経静脈的に投与した。BM-MNCs及びBM-MSCsをDoxorubicin投与4週後に腎実質内に直接移植した。BM-MNCsは 10^7 個、BM-MSCsは106個とした。Doxorubicin投与8週間後、蛋白尿、血液クレアチニン、腎組織などの評価を行った。

被膜下投与 : F344/N rat (6-8wks, male) を以下の3群にランダムにわけた。control群、右腎摘出+Doxorubicin+生食投与群、右腎摘出+Doxorubicin+BM-MNCs投与群とした。右腎摘出2週後にDoxorubicin 3mg/kgを、さらに2週後にDoxorubicin 2mg/kgを経静脈的に投与した。BM-MNCs 10

7個を Doxorubicin 投与 2 週後に腎被膜下・腎実質内に移植した。Doxorubicin 投与 8 週間後、蛋白尿、血液クレアチニン、腎組織などの評価を行った。

(4) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞

(4-1) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の分離増幅に関する検討

ヒト皮下および内臓脂肪より低血清培養法を用いて選択的に幹細胞を得る方法について検討した。手術時に得られたヒト皮下脂肪組織をメスにて細断し、1mg/ml のコラゲナーゼ type I を加えて 37°C、60 分間振とうした。処理溶液を孔径が 100 μ m のスチールメッシュで濾過し、コラゲナーゼ消化されていない組織片を取り除いた。室温で 5 分間、1200rpm の遠心で細胞懸濁液を遠心することで、沈澱する細胞分画 (SVF 分画) を得た。SVF を DMEM/MCDB201 + 2%FBS + 10ng/ml FGF-2 (低血清培養群) または DMEM + 20%FBS (高血清培養群) または DMEM + 20%FBS + 10ng/ml FGF-2 (高血清 + FGF2 群) の 3 群に分けて培養を行った。3 群間で細胞の増殖速度について比較検討した。低血清培養で得られた細胞についてフローサイトメトリーを用いて CD10、CD13、CD14、CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD117、CD133、Stro-1、HLA-DR の表面抗原の有無について解析した。

(4-2) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の多分化能についての検討

1) 脂肪誘導

0.5mM IBMX、1 μ M Dexamethasone、10 μ g/ml Insulin、100 μ M Indomethasin、1 μ M Hydrocortizon を含む培地で脂肪誘導をかけ、2 週間後に BODIPY にて脂肪滴を染色した。

2) 骨誘導

1 μ M Dexamethason、50 μ M アスコルビン酸、10mM β -glycerophosphate を含む培地で骨誘導をかけ、3 週間後に Von Kossa 染色を行った。

3) 軟骨誘導

5 μ g/ml Insulin-Transferrin-Mixture、0.1 μ M Dexamethazone、5ng/ml TGF- β 1、5ng/ml BMP-2 を含む培地で軟骨誘導をかけ、2 週間後に Alcian Blue 染色を行った。

(4-3) 脂肪由来幹細胞のサイトカイン分泌能の検討

1) 低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞およびヒト腎由来線維芽細胞 (HEK293 cell) のサイトカイン分泌量を比較検討した。それぞれの細胞を 25cm フラスコにて培養し、セミコンフルエントになったら培養液を 5ml の DMEM+10%FBS に交換した。24 時間培養後に上清を採取し、VEGF-A、VEGF-C、HGF、FGF-7 (KGF) を ELISA 法にて測定した。同時にトリプシンにて細胞を剥がし、細胞数をカウントし、10⁶ 個当たりのサイトカイン分泌量で評価した。

2) ヒト脂肪由来幹細胞の培養方法によるサイトカイン分泌の違いについて検討した。低血清培養 (DMEM/MCDB201 + 2%FBS + 10ng/ml FGF-2)、高血清培養 (DMEM + 20%FBS)、高血清 + FGF2 (DMEM + 20%FBS + 10ng/ml FGF-2) の 3 種類の培養液で同じヒト脂肪由来の SVF を培養した。4 から 5 代継代培養し、セミコンフルエントになった時点で培養液を 5ml の DMEM+10%FBS に交換した。その後、正常酸素下と低酸素下 (1% O₂) の 2 群に分けて培養した。24 時間後に培養上清を採取し、VEGF-A、VEGF-C、HGF、FGF-2、FGF-7 (KGF)、TGF- β 、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 、レプチン、

アディポネクチン、レジスチンを ELISA 法にて測定した。同時にトリプシンにて細胞を剥がし、細胞数をカウントし、 10^6 個当たりのサイトカイン分泌量で評価した。

(4-4) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の創傷治癒促進効果の検討

7 週齢の F344 ラットの背部の皮膚を 1.5×1.5 cm の正形状に全層切除した。低血清培養にて分離培養したラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞 1×10^7 個（低血清培養脂肪由来幹細胞治療群）または高血清培養にて分離培養したラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞 1×10^7 個（高血清培養脂肪由来幹細胞治療群）を Carboxy-fluorescein diacetate (CFDA) にてラベル後、DMEM に懸濁し、切除部位周辺の皮下に注入した。コントロールは DMEM のみを皮下注した。経時的に皮膚欠損部の面積を測定し、比較検討した。また、治療 3 日目の皮膚組織を肉芽部およびその周辺部に分けて採取し、組織中の VEGF、HGF 濃度を ELISA 法にて測定した。治療 3 日目、6 日目、14 日目の組織を CFDA に対する抗体で免疫染色し、細胞を追跡した。また、6 日目の組織を CD31 にて染色し、血管への分化について検討した。

(4-5) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の腎障害に対する効果の検討

12 週齢のヌードラットの右腎臓を摘出し、1 週間後に葉酸 200mg/kg を尾静脈より投与し、急性腎不全モデルを作成した。葉酸投与 7 時間後に低血清培養にて分離培養したヒト皮下脂肪由来間葉系幹細胞 4×10^6 個を生食に懸濁し、左腎皮膜下に注入した。コントロールは生理食塩水のみを注入した。24 時間後にペンシル型 CCD カメラにて腎皮膜直下の尿細管周囲毛細血管の血流を測定した。その後、経時的に BUN、S-Cr を測定し、比較検討した。また、治療 14 日目にラットを屠殺し腎組織

を採取し、ヒト特異的抗原 (LaminaA/C) に対する抗体にて免疫染色を行った。

(4-6) 脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞による下肢虚血 (ASO) モデルの治療効果の検討

名古屋大学農学部北川教室で樹立された脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞は rat 脂肪細胞由来 stromal vascular fraction を single colony isolation により分離したものであり、内皮条件で培養することによりマトリゲル上での Tube formation の形成やアセチル化 LDL の取り込み能を持つことが示されている。我々はこの細胞をさらに FACS により表面マーカーの解析を加えると共にサイトカイン分泌能を解析した。またラット下肢虚血モデルを作成し control には DMEM のみを、治療群には細胞を 1×10^7 個を下肢筋肉内に注入し 2 週間後に Leaser-Doppler により表皮血流を、CCD カメラにより筋肉内毛細血管血流を、筋肉組織を ALP 染色することにより capillary-to-muscle fiber ratio にて毛細血管密度を測定し、また組織中サイトカイン評価した。

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

(5-1) rKS56-LacZ 細胞の作成

生体内へ投与された rKS56 細胞の分布を経時的により正確に追跡するため、beta-gal を stable に発現する rKS56 細胞 (rKS56-LacZ 細胞) を plasmid DNA 遺伝子導入により作成し、シスプラチン誘導急性腎不全モデルラットへの細胞投与時に用いた。

IV 型コラーゲンでコートした 6-well plate に rKS56 細胞を 5×10^4 cells/well にて撒き、1 日後に Fugene-6 (Roche Diagnostic) を用いて pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ plasmid を細胞内に導入した。LacZ を恒性発現した rKS56 細胞を得るために、

G418 (Sigma) 500 μ g/ml 含有培地で培養し、得られたコロニーを single cell 化して再度培養、その後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 μ g/ml) 含有培地にてさらに継続培養し、rKS56-LacZ 細胞を樹立した。

(5-2) シスプラチン誘導急性腎不全ラットモデルへの rKS56-LacZ 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) 6 mg/kg 体重を単回腹腔内投与した。既報にて、シスプラチン投与後 5 日目に BUN/Cr 増加がピークとなり、9 日目には改善することが報告されている。本検討では、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。腎被膜下投与群では、 1.0×10^6 個の rKS56 - LacZ 細胞 (生食 300 μ l に浮遊) を腎被膜下へ、被膜が広範囲に膨隆するように 27G 注射針を用いて投与した。また経左腎動脈的投与群では、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、左腎動脈分岐部を 27G 針にて穿刺し、 1.0×10^6 個の rKS56 - LacZ 細胞 (生食 300 μ l に浮遊) 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。①腎被膜下・rKS56 - LacZ 細胞投与群 (rKS-SC 群: $n = 5$)、②経腎動脈・rKS56 - LacZ 細胞投与群 (rKS-IA 群: $n = 5$)、③腎被膜下・生食投与群 (vehicle-SC 群: $n = 5$)、④経腎動脈・生食投与群 (vehicle-IA 群: $n = 4$) の 4 実験群にて検討した。シスプラチン投与後第 5, 9 病日に、24 時間蓄尿を行い、屠殺 6 時間前に BrdU (50mg/kg 体重) の腹腔内注射を行ってから、両側腎臓を摘出した。血清 BUN・Cr・総蛋白の測定、血清 AST・ALT 測定による肝機能の評価、尿蛋白と尿中クレアチニン

の測定を行った。

(5-3) Bluogal 染色

投与した rKS56-LacZ 細胞の腎への生着を確認する目的で腎組織の Bluogal 染色を行った。すなわち、摘出腎を固定液 (PBS, 2%paraformaldehyde, 0.2%glutaraldehyde, 0.02% Nodidet-P40) に、4°C・1 時間浸漬し、PBS にて洗浄した後、1 mg/ml Bluogal (beta-gal の基質) 反応液 (3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferrocyanide, 1.5 mM magnesium sulfate, 0.2% sodium deoxycholate, 0.1% NP-40) 内に 4°C・24 時間浸漬し、発色させた。その後、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。

(5-4) 組織学的検討

シスプラチン誘導急性腎不全モデルの尿細管障害は主として皮髄境界部に著明に観察されるため、近位尿細管の組織学的尿細管障害度を検討した。すなわち、PAS 染色した腎切片を、拡大倍率 400 倍にて無作為に観察し、得られた 20 視野中の尿細管障害度を grade0-5 にてスコア化して評価した。

(5-5) 免疫組織化学染色

腎組織における近位尿細管上皮細胞マーカー発現・細胞増殖を検討する目的で、酵素抗体法にて AQP-1・Ki-67 免疫染色を行った。また、腎再生に寄与する因子の発現変化の検討目的にて、代表的な腎再生因子である HGF と、その受容体である c-Met の免疫染色を酵素抗体法にて行った。

Bluogal 染色後の腎組織のパラフィン切片 (4 μ m 厚) を用い、10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 内で 10 分間 microwave 処理 (抗原賦活) した。一次抗体として抗 AQP-1 抗体 (Chemicon, 1:400)・抗 Ki-67 抗体 (DAKO, 1:100)・抗 HGF 抗体 (東京免疫化学)・抗 c-Met 抗体 (Santa Cruz) を、二次抗体とし

てビオチン標識抗ウサギ抗体（フナコシ）を用い、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories)にて発色反応を行った。

また、尿細管基底膜の同定の目的にて、IV型コラーゲンの免疫染色を行った。Bluo-gal染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、0.1%トリプリン液にて37 $^{\circ}$ C、30分処理した。一次抗体として抗IV型コラーゲン抗体(LSL, 1:100)、二次抗体としてビオチン標識抗マウス抗体（フナコシ）を用い、Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories)にて発色反応を行った。

さらに、皮髄境界部の細胞増殖を観察する目的で、BruU免疫染色を行った。Bluo-gal染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、Cell proliferation kit (Amersham)にて染色し、拡大倍率400倍にて無作為に観察し、得られた20視野中の皮髄境界部のBrdU陽性細胞数を検討した。

(5-6) TUNEL 染色

皮髄境界部の尿細管上皮細胞のアポトーシスの程度を評価するため、TUNEL染色を行った。Bluo-gal染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、ApopTag plus *in situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon)にて染色し、拡大倍率400倍にて無作為に観察し、得られた20視野中の皮髄境界部のTUNEL陽性細胞数を検討した。

(5-7) 片腎摘及び抗Thy-1抗体腎炎慢性腎障害モデルラットにおける検討

180-210g体重の雄性SDラットの右腎を、ネンブタール腹腔内注射による麻酔下で摘出した。片腎摘出後7日目に、尾静脈より抗Thy-1抗体（新潟大学河内裕先生/清水不二雄先生より供与）1.0mg/ratを投与した。既報にて、抗Thy-1抗体投与後60-70日目に有意に尿細管間質の線維化・糸球体硬化を認

めることが報告されている。本検討では、抗Thy-1抗体投与7日後にrKS56-LacZ細胞を左腎被膜下に投与した。腎被膜下投与群では、 1.0×10^6 個のrKS56-LacZ細胞(生食300 \cdot 1に浮遊)を腎被膜下へ、被膜が広範囲に膨隆するように27G注射針を用いて投与した。①片腎摘+Thy-1+rKS56-LacZ細胞投与群($n=5$)、②片腎摘+Thy-1+生食投与群($n=6$)、③片腎摘群($n=4$)、④正常対照群の4群にて検討した。rKS56-LacZ細胞投与後第5もしくは10週目に、24時間蓄尿を行い、腎臓を摘出した。血清BUN \cdot Cr \cdot 総蛋白の測定、尿蛋白と尿中Crの測定を行った。

シスプラチン腎症モデルと同様にrKS56-LacZ細胞の腎臓における分布をbluo-gal染色により検討した。

(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

初年度に培養方法の標準化が完了したマウス近位尿細管細胞株(mProx24細胞)を用いた。

まずmProx24細胞を用いて幹細胞が存在すると考えられているSP fractionをフローサイトメトリーによるsingle cell sortingを行い、1個ずつの細胞についてクローナルな培養を行った。詳細には、上述のmProx24細胞を 1×10^6 個/mlに調製しヘキスト33342 (Morecular Probe)を5mg/mlとなるように添加した。その後、細胞を37 $^{\circ}$ 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SP細胞の解析、分離を行った。

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。

(6-2) マウス移植細胞の安全性評価

細胞移植にはマウス腎間葉系細胞の培養上清を添加した K-1 medium で培養することにより、一定の SP 分取率を維持しながら継代した mProx24-SP 細胞を使用した。mProx24-SP 細胞の安全性評価の指標となる発現遺伝子を同定するために、マウス腎間葉系細胞、および cell sorting を行う以前の mProx24 細胞では発現が低く、mProx24-SP 細胞のみで高発現となる遺伝子の探索を Gene Chip (Affymetrix 社製)を用いて行った。さらに、本細胞を移植後長期観察する癌原性試験に着手した。

(6-3) シスプラチンによる in vitro 細胞障害性の評価

シスプラチン投与 24 時間前に mProx、及び mProx-SP をそれぞれ 96well plate に 2×10^4 cells/well になるように播いた。対数増殖期の細胞に対しシスプラチンを 0, 1, 5, 10, 20 μ M を加え 20 時間培養した。Alamar Blue を各 well に 10 μ l ずつ加え 2 時間インキュベート後に蛍光プレートリーダーで測定した (EC:544, EM:599)。細胞毒性を評価するために細胞からの LDH の放出量を測定した。各濃度のシスプラチンを加えて 20 時間培養後の上清を用いて Cytotox96

(Promega) を使用して測定した。LDH の最大放出量は 10% Triton-X を加えた well を用いた。

(6-4) 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、致死性シスプラチン誘発急性腎不全モデルを作製した。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。

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、L-FABP-Tg (C57BL/6 系雄) 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、 5.0×10^5 個に調整した CMFDA 蛍光標識 mProx-SP、または mProx (non-SP) を左腎被膜下に投与後 (投与総量 100 μ 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。

(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

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。

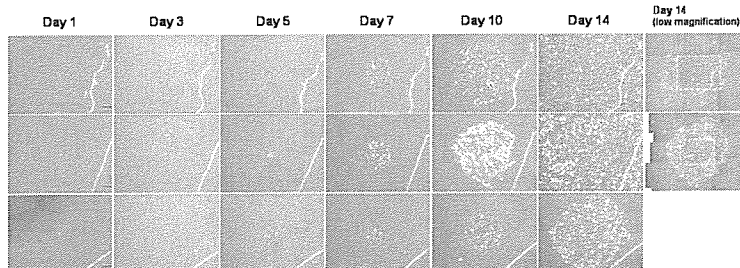
C. 研究結果

(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

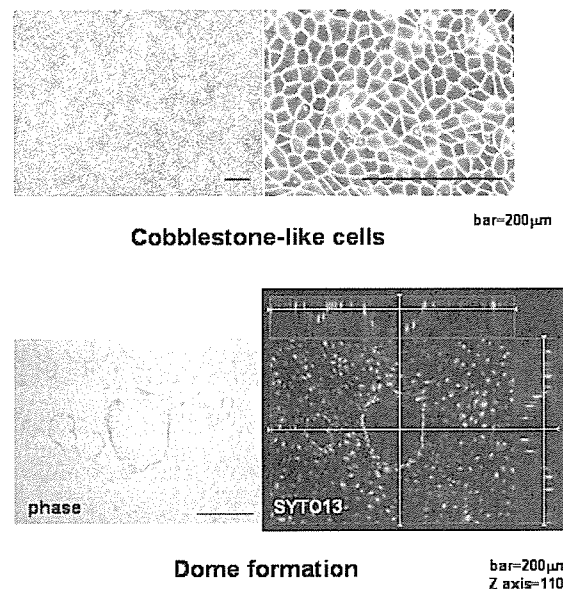
名古屋大学泌尿器科および社会保険中京病院にて施行された生体腎移植 28 例中 20 例 (71%)、死体腎移植 10 例中 2 例 (20%)、腎部分切除術 18 例中 9 例 (50%) から初代培養細胞が樹立できた。本成績は、昨年と比較して実施例数で 2 倍以上という数値目標が達成できたことを示している。

細胞を経時的に顕微鏡観察した結果、培養開始後 24 時間以内に培養皿上に生着し、1 週間後までの倍化速度が 21.7 ± 2.8 という高増殖性を示した(下図)。Single cell から生じたコロニーの約 74% が敷石状形態の上皮様細胞となることが確認された。



また、これらの敷石状形態を示すコロニーの中には尿細管上皮細胞に特徴的な水の経

上皮輸送能を示唆する細胞ドームの形成も確認された(下図)。

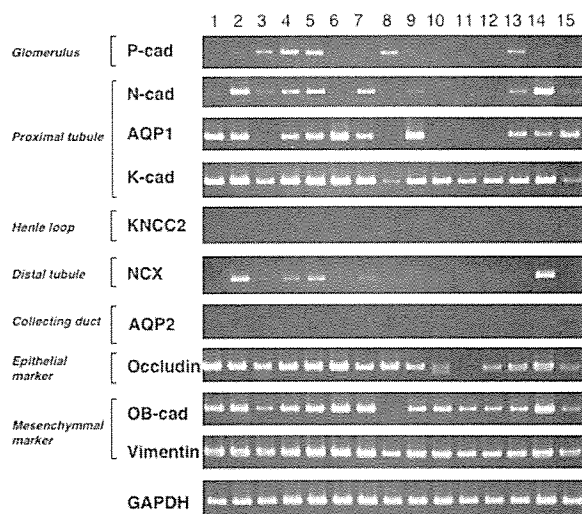


(1-2) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

昨年度の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、 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。

今回、独立して得られた 15 個の single cell コロニーを RNA サンプルとして、各コロニー内に異なるネフロンセグメントに相当する分化マーカーが同時に発現しているかどうかを RT-PCR 法により検討した。その結果、複数の single cell コロニー内に胎児

期のみで発現する遺伝子や、近位尿細管、ヘンループ、遠位尿細管それぞれに特徴的な遺伝子が同時に発現していることが確認された(下図)。エラー!



このことから、尿中落下細胞から得られる高増殖能を有する細胞の中に多分化能を獲得しうる幹/前駆細胞が含まれている可能性が示唆された。

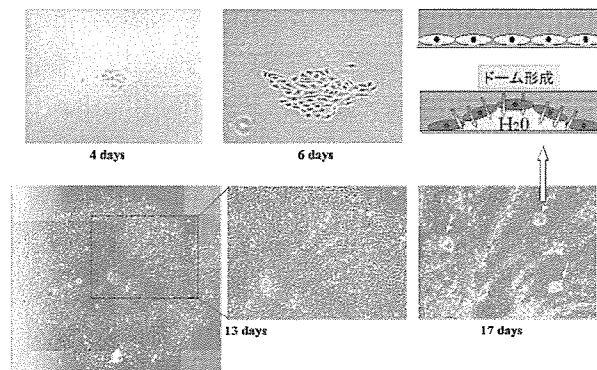
今後、腎疾患患者本人から得られた腎組織由来幹細胞を利用して一定の品質の分化細胞を増殖させ移植に用いるには、すでに当研究班においてげっ歯類で明らかにしたようにSP細胞などのsingle cell sortingにより自己複製能を有する細胞が繰り返し培養可能かどうか、その安全性評価法も含めて検討する必要がある。

(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

細胞移植を行わないコントロールとして左腎摘出4週間後に右腎の50分虚血再灌流のみ行う処置が6例、イヌ尿中落下細胞の腎実質への自家移植が8例、尿中落下細胞と同時にヒドロキシアパタイト(HA)の腎実質投与が4例、計18例実施された。腎臓50分虚

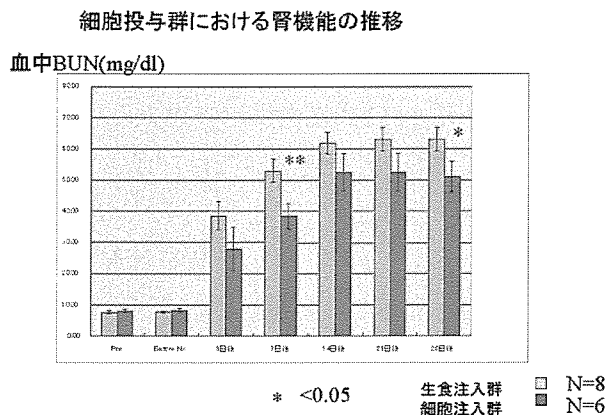
血、再灌流後60分腎盂に留置したチューブを介して尿中落下細胞から、ヒトの場合と同様ドーム形成する尿細管上皮細胞をprimary cultureにより100%(15/15)培養することに成功した(下図)。



(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。

イヌ自己細胞移植群(T群=赤)と生食注入群(C群=青)の血中BUNの推移を下図に示す。

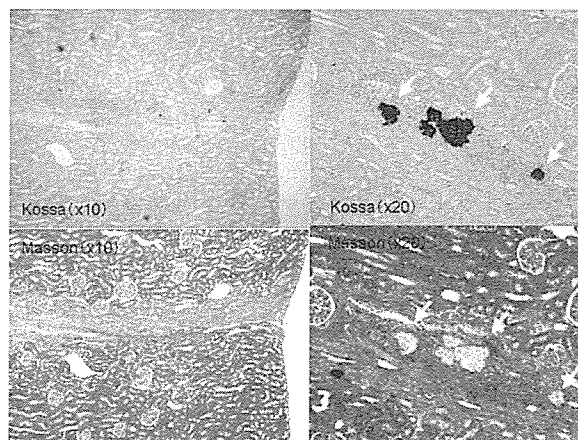


細胞移植後1週間と4週間の時点において移植群でBUN上昇に対する有意な抑制効果が認められ腎機能保護作用が示された。血中クレアチニンも移植群で抑制傾向であったが有意差は見られなかった。

イヌ腎臓は、げっ歯類のそれと異なり、腎被膜が厚いため、被膜下への細胞注入が困難

であることが、これまでの検討で問題視されていた。ヒト腎臓もイヌに近いため、イヌで、有効な細胞注入法を開発することは極めて重要と考えられる。

そこで、生体適合性物質の一つヒドロキシアパタイト (HA) を細胞移植時に腎実質へ同時投与し、腎実質投与影響を組織学的に解析した。HA は、移植細胞の蛍光ラベルが減弱する移植後数週間後であっても、Ca 染色 (下図矢印) により、注入部位が正確に同定できるという利点がある。



HA を細胞と混和した群 (T+HA 群) では腎実質に尖刺した部分に顕著な線維化が確認された。一方、血中 BUN の悪化は見られなかった。(前 C 群 vs T+HA 群: 7.85 ± 0.54 vs 7.90 ± 1.00 mg/dl, 1 週間後 C 群 vs T 群+HA: 53.61 ± 4.33 vs 48.10 ± 7.97 mg/dl, 4 週間後 C 群 vs T 群+HA: 63.78 ± 4.52 vs 57.75 ± 9.24 mg/dl)。

今後、腎実質への尖刺細胞注入法に代わる細胞移植の手技開発が必要である。現在腎被膜切開後、患者自身の脂肪細胞を挟み込んで縫合する手技 (名古屋大学では腎癌部分切除後の処置として長年の実績がある) をイヌに対して実施し、移植細胞の注入スペース確保の可能性を検討中である。

このような手術の対象患者は、もとより腎機能低下のリスクが高く、術後腎障害重症化

防止を目的として、部分切除時に患者自身の尿中落下細胞を採取し、培養後冷凍保管しておけば、後日腎機能が低下を始めた場合に腹腔鏡手術下に残存腎へ細胞移植できると考えられる。

(3) ラット骨髄末梢血幹細胞

(3-1) Doxorubicin 腎症モデルの妥当性検証

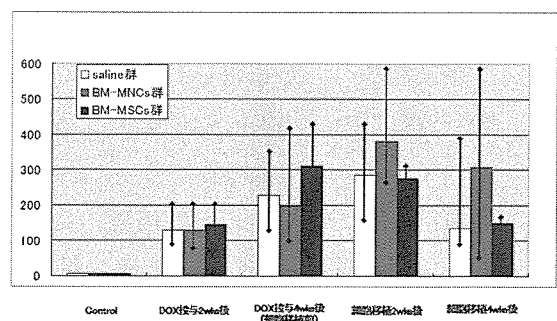
細胞移植の治療効果を判定する慢性腎不全モデルとして Doxorubicin 腎症ラットを用いることの妥当性を検証するため、エリスロポイエチン製剤による介入試験を行った。その結果、腎虚血に対する効果の高い製剤介入により進行性の組織障害抑制と腎不全の重症化防止が可能であることが判明した。このことから、本モデルは進行性の腎障害を呈するが、介入治療の効果を評価できる点で妥当であると結論付けられる。詳細は添付論文の通り。

(3-2) Doxorubicin 腎症ラット

経静脈的な移植では、蛋白尿、血清クレアチニンの改善は認めなかった。腎組織上も明らかな変化を認めなかった。

BM-MSCs の投与では蛋白尿や血清クレアチニンの改善はみられなかった。Doxorubicin の投与で同程度の腎障害が得られていなかったこともあり、BM-MNCs の投与について検体を増やして検討中である。

細胞移植後の経時的尿蛋白量の変化



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、糸球体のメサンギ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)。

Doxorubicin 腎症ラットは、以前より慢性腎不全モデルとして知られている。経静脈的に BM-MNCs、BM-MSCs を投与したが、尿蛋白、血清クレアチニン、腎組織の改善は認められなかった。経静脈的投与では細胞が肺でトラップされた可能性もある。腎への直接的な投与が望ましいと考えられたため、投与法を腎被膜下移植に変更し検討中である。

(4) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞

(4-1) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の分離増幅に関する検討

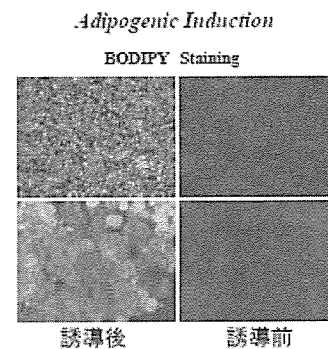
脂肪組織 1g から得られた幹細胞を含む分画 (SVF) 中には約 1×10^5 個の有核細胞が含まれていた。それを培養すると、低血清培養、高血清培養、高血清 + bFGF 培養のいずれにおいても紡錘形の線維芽細胞様の細胞の増殖が認められた。増殖速度は高血清 + bFGF 培養、

低血清培養、高血清培養の順に良かった。フローサイトメトリーによる表面マーカーの解析では CD10、CD13、CD44、CD90、CD29、CD73、CD105 陽性、CD14、CD31、CD34、CD45、CD117、CD133、Stro-1、HLA-DR 陰性であり、従来報告されている骨髄由来間葉系幹細胞と表面マーカーは同じであった。

(4-2) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の多分化能についての検討

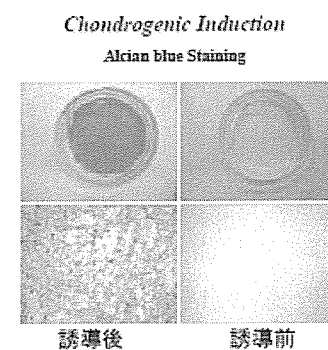
① 脂肪誘導

2週間後にほとんどの細胞が BODIPY 陽性の細胞に変化し、脂肪への分化が確認された (下図)。



② 骨誘導

3週間後には Von Kossa 染色陽性となり、骨への分化が確認された (下図)。

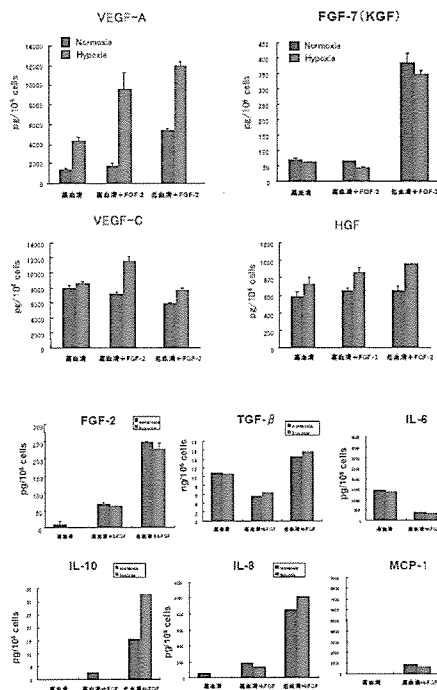
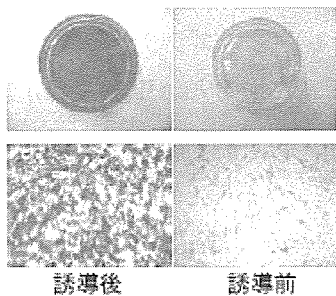


③ 軟骨誘導

2週間後に Alcian Blue 染色陽性となり、軟骨様細胞への分化が確認された (次図)。

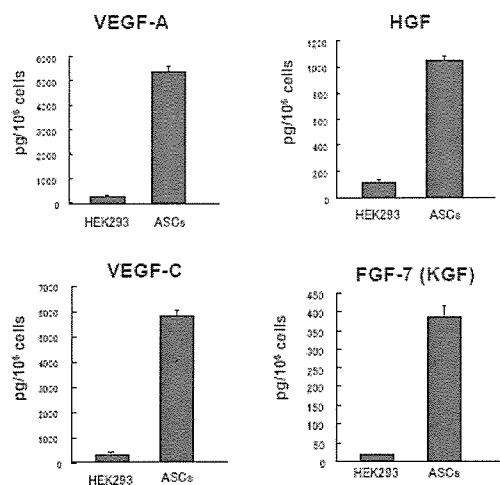
Osteogenic Induction

Von Kossa Staining



(4-3) 脂肪由来幹細胞のサイトカイン分泌量の検討

① 低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞およびヒト腎由来線維芽細胞 (HEK293 cell) のサイトカイン分泌量を次頁に示す。低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞はヒト腎由来線維芽細胞 (HEK293 cell) に比べ、VEGF-A、VEGF-C、HGF、FGF-7 を多く分泌していた。



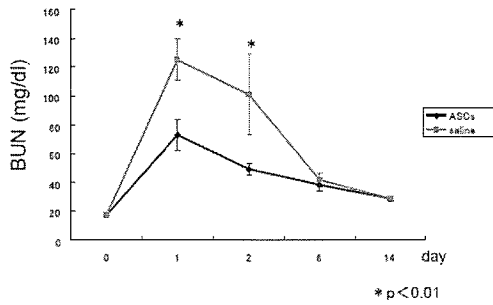
② ヒト脂肪由来幹細胞の低血清培養 (DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養 (DMEM+20%FBS)、高血清+FGF2 (DMEM+20%FBS+10ng/ml FGF-2) におけるサイトカイン分泌量を下図に示す。IL-1β、TNF-α、レプチン、アディポネクチン、レジスチンは分泌していなかった。低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞は高血清で培養した細胞に比べ、多くのサイトカインで分泌量が多かった。

(4-4) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の創傷治癒促進効果の検討

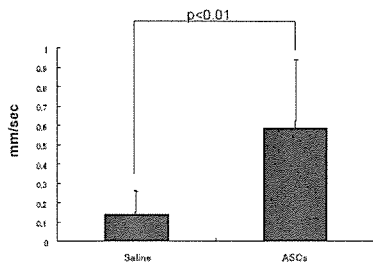
細胞治療後 7 日目以降において、低血清培養脂肪由来幹細胞治療群では高血清培養脂肪由来幹細胞治療群やコントロール群に比べ、有意に皮膚欠損面積の縮小が認められた。低血清培養脂肪由来幹細胞治療群ではコントロール群に比べ、肉芽部およびその周辺部の皮膚組織中の VEGF-A 濃度が有意に高かった。HGF については有意差を認めなかった。CFDA に対する免疫染色では治療 3、6、14 日目ともに皮下に残存する低血清培養脂肪由来幹細胞が確認された。CD31 染色では、血管分化は確認できなかった。

(4-5) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の腎障害に対する効果の検討

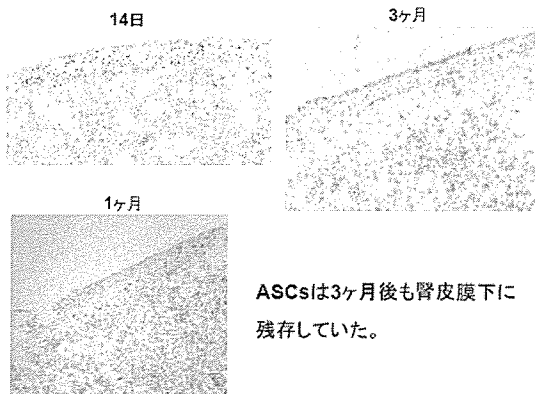
低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞治療群では生食治療群に比べ治療 1 日目および 2 日目において腎機能障害が有意に改善した。



ペンシル型 CCD カメラで測定した腎皮膜下の尿管周囲毛細血管の血流速度は低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞治療群では生食治療群に比べ有意に速かった (下図)。



ヒト特異的抗原 (LaminA/C) の免疫染色では、低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞は腎皮膜下に良好に生着しており、3 ヶ月後も細胞は残存していた (下図)。



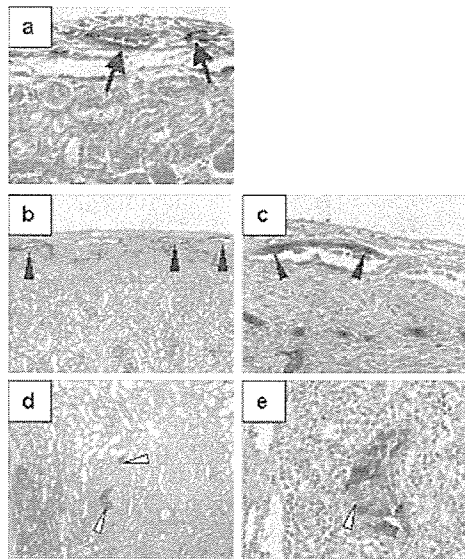
(4-6) 脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞による下肢虚血 (ASO) モデルの治療効果の検討
脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞上清では VEGF 分泌を認め、また組織中の VEGF の上昇も確認された。表皮血流、筋肉内毛細血管血流、毛細血管密度は共に control 群に比べ治療群で良好であった。

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

(5-1) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける rKS56-LacZ 細胞の生着・分化及び組織修復効果

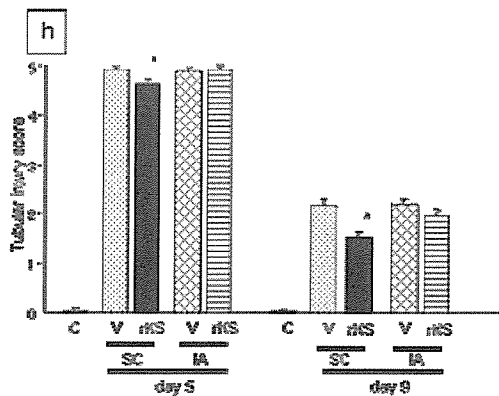
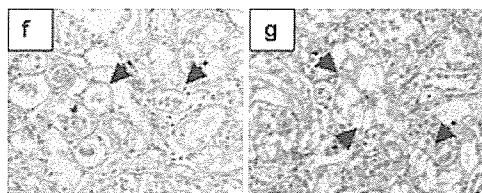
シスプラチンを腹腔内に投与し、2 日後に rKS56-LacZ 細胞もしくは生食を腎被膜下もしくは経腎動脈的に投与し、細胞投与後 3 日及び 7 日目に屠殺した。各シスプラチン投与群の平均体重は、投与 5 日目まで減少を認め、その後増加した。rKS-SC 群では対照群に比して体重増加が多い傾向を認めた。

rKS-SC 群では、投与後 3 日目に、Blue-gal 陽性 (青色に染色) 細胞が腎被膜下に散在し、rKS56-LacZ 細胞の生着が観察された (図 1a)。細胞投与後 7 日目では、肉眼的に腎被膜の肥厚を認め、腎被膜下及び一部皮髄境界部に管腔様構造を呈する Blue-gal 陽性 rKS56-LacZ 細胞が観察された (図 1b-e)。腎被膜下の管腔様構造部内の rKS56-LacZ 細胞は Aquaporin-1 を発現しており、近位尿管上皮細胞系統への分化が示唆された。さらに、細胞投与後 7 日目において、腎被膜下及び一部皮髄境界部の 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 細胞の基底側で、IV 型コラーゲン陽性の基底膜構造の形成が観察された。一方、rKS-IA 群では、腎臓内への rKS56-LacZ 細胞の生着は観察し得なかった。



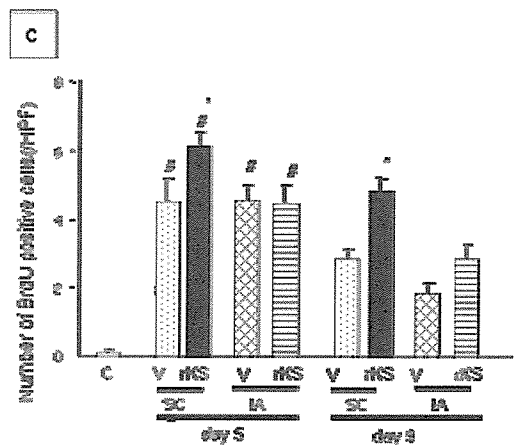
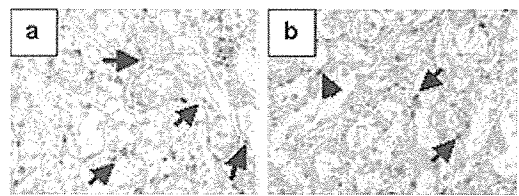
(5-2) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける rKS56-LacZ 細胞投与後の組織学的検討

本実験モデルにて最も著明に傷害される皮髄境界部での、rKS56-LacZ 細胞投与後の組織修復効果を検討した。rKS-SC 群 (図 1f) では、vehicle-SC 群 (図 1g) と比較して、第 5 及び 9 病日において尿細管障害スコアの有意な改善を認めた。一方、rKS-IA 群では vehicle-SC 群と比較して、第 5 及び 9 病日において尿細管障害スコアの改善は認めなかった (図 1h)。



(5-3) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管上皮細胞増殖能の検討

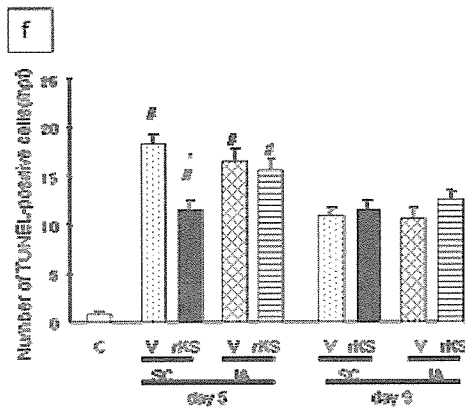
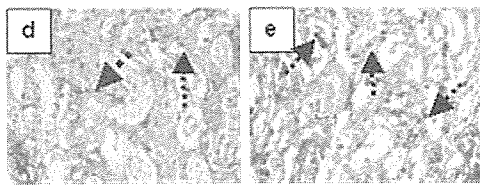
本実験モデルにて最も著明に傷害される皮髄境界部での、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管増殖能を BrdU 取り込み細胞数により評価した。rKS-SC 群 (図 2a) では、vehicle-SC 群 (図 2b) と比較して、第 5 及び 9 病日において BrdU 陽性尿細管上皮細胞数の有意な増加を認めた。一方、rKS-IA 群では、vehicle-SC 群と同程度であった (図 2c)。腎被膜下に rKS56-LacZ 細胞を投与することで、皮髄境界部の尿細管上皮細胞の増殖能が亢進し、組織修復を促進した可能性が示唆された。



(5-4) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管上皮細胞のアポトーシスの検討

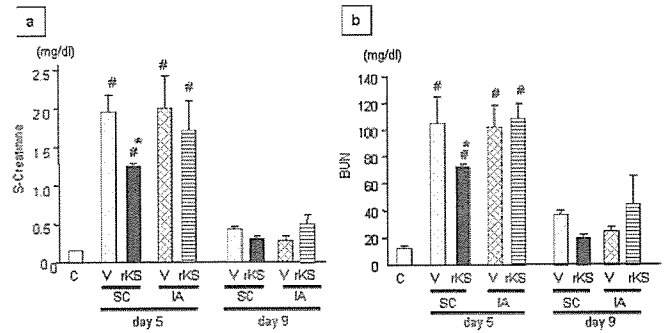
本実験モデルにて最も著明に傷害される皮髄境界部での、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管上皮細胞のアポトーシスを TUNEL 陽性細胞数にて評価した。rKS-SC 群 (図 2d) では、vehicle-SC 群 (図 2e) に比して、第 5 病日

において TUNEL 陽性尿細管上皮細胞数の有意な増加を認めた。第 9 病日には皮髄境界部の TUNEL 陽性尿細管上皮細胞数は減少し、各群間で有意差を認めなかった。一方、rKS-IA 群では、vehicle-SC 群と同程度であった (図 2f)。腎被膜下に rKS56-LacZ 細胞を投与することで、皮髄境界部の尿細管上皮細胞のアポトーシスが抑制され、組織修復が促進された可能性が示唆された。



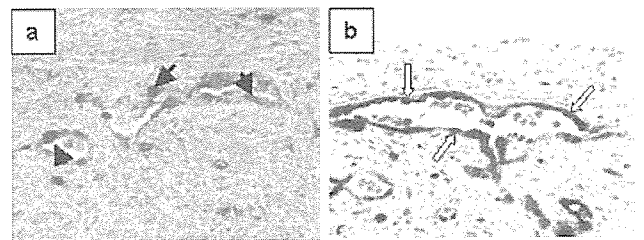
(5-5) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の腎機能の検討

第 5 病日における血清 BUN・Cr の上昇は rKS-SC 群にて vehicle-SC 群に比して有意に抑制された。rKS-IA 群では、vehicle-IA 群に比して腎機能改善効果は認められなかった。BUN・Cr とも第 9 病日には、各群にてほぼ正常レベルまで改善した (図 3a-b)。肝機能や血清総蛋白は rKS56-LacZ 細胞投与により明らかな影響を受けなかった。



(5-6) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の腎再生促進因子発現の検討

シスプラチン誘発急性腎不全モデルにおける rKS56-LacZ 細胞投与による腎機能・腎組織修復作用に関連して、腎再生促進因子 HGF とその受容体 c-Met の免疫染色を行った。rKS-SC 群では、腎被膜下の管腔様構造内の rKS56-LacZ 細胞の一部は HGF (図 4a)・c-Met (図 4b) を発現していた。



(5-7) 片腎摘及び抗 Thy-1 腎炎ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の腎内細胞分布の検討

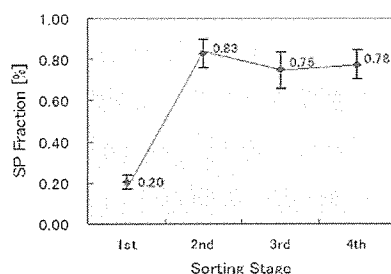
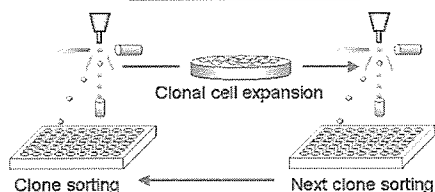
慢性的に糸球体及び尿細管間質病変の進行する片腎摘及び抗 Thy-1 腎炎ラットモデルを作成した。生食投与+片腎摘及び抗 Thy-1 腎炎群にて、有意な蛋白尿及び腎機能障害を認めなかった。rKS56-LacZ 細胞投与+片腎摘及び抗 Thy-1 腎炎群では、5 週目・10 週目の時点で、blue-gal 陽性の rKS56-LacZ 細胞の腎内への生着は確認し得なかった。

(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

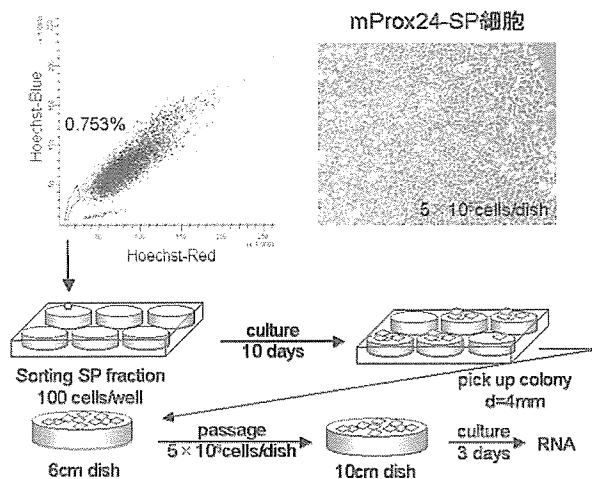
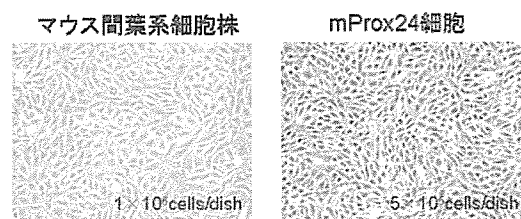
mProx24 細胞の single cell sorting による SP 細胞のクローナルな培養を繰り返して実施したところ、1st-sorting に比し 2nd-sorting 後の SP fraction の割合は 0.2% から 0.83% に上昇した。その後繰り返し行った sorting 後の SP fraction の割合は一定に維持された (次頁) ことから、腎臓幹/前駆細胞が一定の割合で自己複製能を保ちながら、分化した尿細管機能を維持していることが確認された。

Analysis for self-renewal capability of the dome-forming clone



(6-2) マウス移植細胞の安全性評価

mProx24-SP 細胞の安全性評価の指標となりうる発現遺伝子を同定するために、マウス腎間葉系細胞株、cell sorting を行う以前の mProx24 細胞、および複数回の SP sorting を行い SP 分取率が一定に維持されている状態の mProx24-SP 細胞からそれぞれ RNA を抽出した (次図)。



その結果、前二者では発現が低く、mProx24-SP 細胞のみで誘導が見られる安全性評価指標の候補遺伝子の絞込みを達成した (特許出願準備中)。

最近、SP 細胞の分取率が高いヒト胃癌細胞株における未分化性と、Cancer stem like cells; CSLCs の存在比が正相関する可能性が提唱された (Matsuzaki 2007)。mProx24-SP 細胞のみで誘導が見られる遺伝子には腎癌細胞特異的に発現する癌抑制遺伝子として知られている転写因子も含まれており、SP 分取率がある一定の数値範囲 (mProx24-SP の場合 0.2~0.9) を維持していることは、尿細管への分化能の制約を受けつつ、癌化抑制の機能が働いていることを意味しているとも考えられる。

今後は安全性評価の指標として、これら遺伝子発現の有効性を検証する予定である。

(6-3) シスプラチンによる in vitro 細胞障害性の評価

Alamar Blue Assay によってシスプラチンで