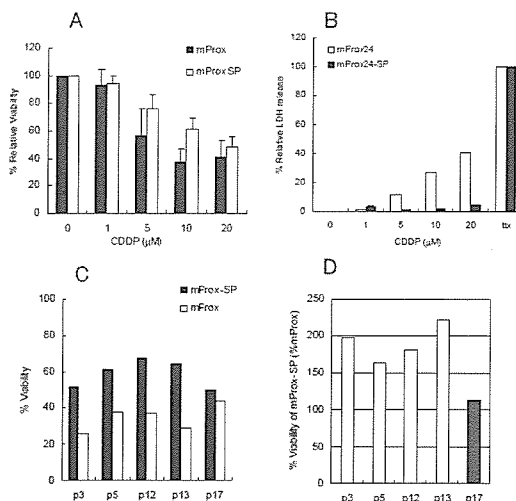


の細胞増殖抑制を調べたところ、mProx では顕著に増殖が抑制されていた (図 3A)。しかし mProx-SP では mProx ほどの増殖抑制は生じていなかった。またこの増殖抑制が細胞毒性によるものか LDH の放出の有無で検討したところ、mProx ではシスプラチンによって濃度依存的な細胞毒性が明らかなのに対し、mProx-SP では mProx に対して LDH 放出が有意に抑制されていた (図 3B)。以上より mProx-SP は mProx に比して、シスプラチンによる細胞障害への著しい抵抗性を示すことが分かった。

ただし、継代数を重ねていくことで、mProx-SP のシスプラチンによる増殖抑制の軽減作用は減弱してくることが確認され (図 3C)、mProx と mProx-SP との増殖抑制抵抗性の相対比は急速に減少していた (図 3D) ことから、少なくとも現在の培養系において mProx-SP の CDDP への障害抵抗性を維持しつづけるのは困難であるものの、13 回程度までの継代回数までは障害抵抗性という形質を維持し得ると考えられた。すなわち、mProx-SP の標準化評価系として CDDP 刺激に対する障害抵抗性を応用していくことが有用である可能性が示唆された。

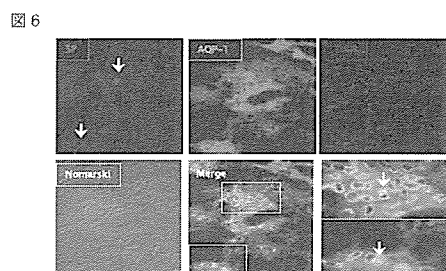
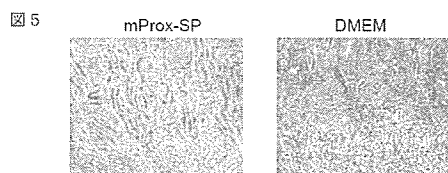
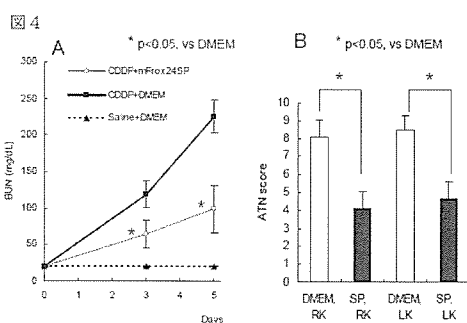
図 3



(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

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 mProx-SP (=CDDP+mProx-SP, N=7)、DMEM (=CDDP+DMEM, N=7)、Saline (=Saline+DMEM, N=7) 各群それぞれ 64.2±19.3, 118.9±18.2, 20.1±0.8 (mean ± SE) で、mProx-SP 群では DMEM 群に対して有意な改善を認めた。また、急性尿細管壊死によるスコアリング (ATN スコア) による尿細管障害の程度も mProx-SP 群で両腎とも有意に改善しており (図 4B, 図 5)、組織蛍光染色において CMRA 標識した mProx-SP が Aquaporin-1 と Overlap することが両腎で確認され (図 6)、尿細管への生着を示唆する所見と考えられた。

さらに、21 回継代後の mProx-SP を CDDP による急性腎不全モデルに被膜下投与したところ、mProx-SP 群、DMEM 群それぞれ 3 日目の BUN (mg/dl) が 56.0±13.2, 91.9±20.3 であり、7 日目までの生存率もそれぞれ 33.4% (3/9 匹)、0% (0/6 匹) と (Kaplan-Meier 法、Log-Rank test, p=0.11)、いずれも有意差は検出できなかった。



D. 考察

骨髄末梢血間葉系幹細胞チーム：下肢の動脈閉塞性疾患に骨髄幹細胞の局所注入が有効であることが示されて以来、骨髄由来幹細胞が再生医療における細胞ソースとして注目されてきた。しかし、骨髄は大量に採取するには患者に対する負担が非常に大きいという問題点がある。また、培養して増幅するにしても、増殖速度が遅く、臨床に使える細胞数を確保するのが難しい。さらに臨床応用を考えた場合、動物原料の排斥は必須であり、自己血清の使用も含めた自家移植の系を確立する必要があると考える。自己の細胞を使用することを考えた場合、脂肪組織の採取は骨髄細胞の採取よりも簡便でかつ安全である点は大きな利点となる。その上、脂肪組織由来の幹細胞は量・質ともに骨髄由来幹細胞を大きく上回る可能性があると考えている。

実際、本研究では高齢者の脂肪細胞からも質・量ともに十分な幹細胞を分離・培養することに成功した。高齢者の骨髄中には有効に機能する幹細胞が少ないことが臨床的には問題となっていることを考えると、脂肪組織の利用の意義は大変大きいものと思われる。当該技術は名古屋大学農学部の北川らが開発した低血清培養法（特許申請中）である。脂肪由来幹細胞を2%血清で培養して間葉系幹細胞を選択的かつ大量に増殖させる方法である。臨床応用を考えた動物由来製剤を使用しないことは大変重要なことである。低血清培養法ではウシ血清でなく自己の血清を用いて治療に必要な十分量の幹細胞を得ることができる。この点で、本法は実用化に近い独創性のある技術であると言える。さらに、今回の検討にて、低血清で培養した幹細胞は従来の高血清で培養した細胞に比べサイトカイン分泌能が高いことが明らかとなった。このことは低血清培養で増幅した細胞を用いることで、より治療効果が高まることが期待される。実際に腎障害モデルラットの腎機能を劇的に改善することができた。今後はそのメカニズムを詳細に検討するとともに、大動物での検討も行い、臨床応用を実現したいと考えている。

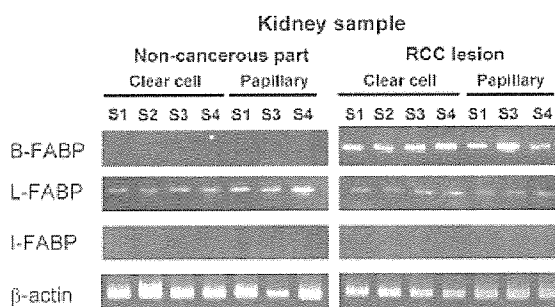
組織特異的上皮系幹細胞チーム：今後、腎幹／前駆細胞投与による腎再生治療を臨床応用するためには、以下の点を解明することが重要と思われる。まず、投与する腎幹／前駆細胞数や投与経路の至適条件の検討が必要である。骨髄由来幹細胞は、経静脈的もしくは経腎動脈的投与にて障害腎に生着することが報告されているが、昨年までの検討では経腎動脈的投与では腎への生着は認めなかった。上記の至適投与条件の検討は、今後の臨床応用における細胞投与のアプローチ、す

なわち腎被膜下に直接投与するか、もしくは腎動脈からカテーテルを用いて投与するか、を考慮する上で重要である。次に、急性腎不全のみならず、慢性腎不全状態の腎に腎幹/前駆細胞を投与することで、機能的・組織学的な改善効果を観察し得るかどうかについても検討が必要である。しかし、慢性腎不全状態では腎間質線維化をきたし、細胞外基質・増殖因子濃度勾配等の微小環境(niche)が変化しており、尿細管上皮細胞の再生に適していない可能性が考えられる。慢性腎障害モデルにてHGF投与により腎間質線維化が抑制されたという報告があるが、腎再生を促進する増殖因子と腎幹/前駆細胞移植を組み合わせることにより、腎尿細管上皮細胞再生・修復に適した微小環境を整えて幹細胞の生着・分化・ならびに組織修復を促進しうる可能性がある。今後抗GBM腎炎モデルや他の薬剤性尿細管障害モデル等を用いることにより、種々の慢性モデルに対する細胞治療の効果を検討したいと考えている。

セルプロセッシングチーム：今年度は昨年度実施例の2倍以上のヒト腎疾患患者(計56例)を対象に、尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養できた。生体腎移植症例のみならず、腎癌部分腎摘出症例についても、30分という短時間の片腎虚血において、尿中落下細胞から50%の確立で培養できた。

より多くの腎疾患症例からヒト腎組織特異的幹/前駆細胞を効率よく単離培養する目的で、腎微小循環のバイオマーカーであるL-FABPの迅速検査キットを試作し、尿中L-FABPと尿中落下細胞の培養成功の可否について検証した結果、L-FABPが非常に高い感度、特異度を有していることが明らかになった。ごく最近、FABPサブタイプの発現により、腎癌部位と正常部位の腎組織が判別可能で

あるという報告がなされた(Teratani T, et al. 2007 J. Urology)。下図のごとく、L-FABP(近位尿細管型)陽性、B-FABP(脳型)陽性、I-FABP(腸型)陰性の場合、腎癌細胞が混入している可能性が高いため、樹立した培養細胞の安全性評価に有用と考えられる。



また、ヒトと同様の手法を用いて、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治療を行った結果、BUNの上昇は有意に抑制できたが、尖刺細胞注入部位が強い線維化を起こしていることが明らかとなった。げっ歯類の腎被膜下に相当する移植細胞の注入スペースを外科的処置で確保できるか早急に検討する必要がある。

E. 結論

1) 低血清培養によるヒト脂肪由来間葉系幹細胞を、ヌードラット腎障害モデルの腎被膜下へ移植し、急速な腎機能の改善が達成された。本法は、患者の負担、動物原料の排斥、十分な細胞数の確保、治療効果など多くの有利な条件を兼ね備えており、臨床応用が期待できる。

2) げっ歯類腎組織特異的幹細胞を複数の急性腎不全モデルに被膜下移植し、腎組織への生着分化、腎機能改善が見られた。一方、慢性腎不全モデルに対しては細胞注入方法の工夫など改善が必要。

3) ヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から単離培養した腎幹/前駆細胞の樹立を大幅向上

した。移植細胞の安全性評価に利用可能な指標として候補遺伝子を絞り込んだ。細胞樹立の効率化に必須のバイオマーカーの迅速検査キットを試作し、臨床現場での使用を開始した。

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, Koide H:
Cigarette smoking affects urinary liver-type fatty acid-binding protein concentration in patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 29(7):1717. 2006.
- 2) Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Koide H: Effect of pioglitazone on urinary liver-type fatty-acid-binding protein concentrations in diabetes patients with microalbuminuria. *Diabetes Metab Res Rev*:22:385-389. 2006.
- 3) Nakamura T, Sugaya T, Koide H:
Angiotensin II receptor antagonist reduces urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in patients with diabetic nephropathy and chronic renal failure. *Diabetologia*. 50(2):490-492. 2007.
- 4) Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura M, Hanada S, Hisamoto T, Yoshida T, Kawaguchi T, Baba S, Maeyama M, Koga H, Harada M, Kumashiro R, Ueno T, Ikeda H, Imaizumi T, Murohara T, Sata M: Endothelial progenitor cell transplantation improves the outcome following liver injury in mice. *Gastroenterology*. 130: 521-531. 2006.
- 5) Shintani S, Kusano K, Ii M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thorne T, Murohara T, Losordo DW: Synergistic effect of combined intramyocardial CD34 cells and VEGF-2 gene therapy post-myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 3(Suppl.): S123-S128. 2006.
- 6) Egami K, Murohara T, Aoki M, Matsuishi T: Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. *J Leukoc Biol*. 79: 971-976. 2006.
- 7) Kobayashi K, Kondo T, Inoue N, Aoki M, Mizuno M, Komori K, Yoshida J, Murohara T. Combination therapy using angiopoietin-1 plasmid gene and autologous bone marrow cell implantation promotes functional angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1465-1472. 2006.
- 8) Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada

- M, Kondo T, Murohara T: The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation*. 114:I114-I119. 2006.
- 9) Shimizu K, Ito A, Lee JK, Yoshida T, Miwa K, Ishiguro H, Numaguchi Y, Murohara T, Kodama I, Honda H: Construction of multilayered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol Bioeng*. 2006 (in press).
- 10) Inoue N, Kondo T, Kobayashi K, Aoki M, Numaguchi Y, Shibuya M, Murohara T: Therapeutic angiogenesis using novel vascular endothelial growth factor-E/human placental growth factor chimera genes. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. (in press).
- 11) Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi K, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T: Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J*. 71: 2007
- 12) Ozaki T, Yamamoto T, Ono Y et.al: Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl* 2007 in press
- 13) Anas C, Yamamoto T, Gotoh M, Ono Y, et al.: The effects of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor on ischemic acute renal failure internal. *Journal of Urology*. 2007 in press
- 14) Terocero C, Ono Y, Yamamoto T et al.: I autonomous catheter insertion system using magnetic motion capture sensor for endovascular surgery. *The International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery* 2007 in press
- 15) Kaoru Yasuda K, Kasuga H, Aoyama T, Takahashi H, Toriyama T, Kawade Y, Iwashima S, Yamada S, Kawahara H, Maruyama S, Yuzawa Y, Ishii H, Murohara T, Matsuo S: Comparison of percutaneous coronary intervention with medication in the treatment of coronary artery disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2006 Aug;17(8):2322-32. Epub 2006 Jul 12.
- 16) Tanabe K, Maeshima Y, Ichinose K, Kitayama K, Takazawa Y, Hirokoshi K, Kinomura M, Sugiyama H, Makino H: Endostatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents the progression of peritoneal sclerosis in a mouse experimental model. *Kidney Int*. 71:227-238, 2007.
- 17) Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kinomura M, Hirokoshi K, Kitayama K, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Agata N, Makino H: 2-(8-Hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) propionic acid, an inhibitor of angiogenesis, ameliorates renal alterations in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 55:1232-1242. 2006.
- 18) Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, Yamamoto Y, Wu Y, Ichinose K, Hirokoshi

- K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H: Regulation of angiogenic factors in Angiotensin-II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. Am J Hypertens. 19:718-727. 2006.
- 19) 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 168:1413-24. 2006.
- 20) 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 104:e6-e14. 2006.
2. 学会発表
- 1) Yoshino Y, Yamamoto T, Ono Y et al: Renal function during intensive chemotherapy for advanced germ cell tumor :a clinical model revealing the implications of autologous peripheral blood stem cells. ASN 2006
- 2) Kinomura M, Maeshima Y, Kitamura S, Tanabe K, Ichinose K, Hirokoshi K, Takazawa Y, Kitayama H, Sugiyama H, Yamasaki Y, Sugaya T, Makino H: Amelioration of cisplatin-induced acute renal tubular injury by intrarenal injection of renal progenitor-like cells derived from adult rat kidney. Renal Week 2006. Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, CA, USA. Nov. 16-19, 2006.
- 3) 根岸康介, 野入英世, 前田るい, 與倉みどり, 谷口英樹, 篠崎尚史, 徳永勝士, 藤田敏郎, 菅谷健, 大島伸一: 腎尿細管特異的幹/前駆細胞移植による致死的シスプラチン腎障害の救命効果. 第6回日本再生医療学会. 横浜. 2007年3月13日-14日.
- 4) 安田 香, 丸山彰一, 渡辺達人, 岩島重二郎, 尾崎武徳, 山本徳則, 北川泰雄, 後藤百万, 松尾清一: ラット脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞によるラット下肢虚血モデルの治療. 第6回日本再生医療学会. 横浜. 3月13-14日. 2007.
- 5) 尾崎武徳, 丸山彰一, 渡辺達人, 岩島重二郎, 安田 香, 山本徳則, 北川泰雄, 後藤百万, 松尾清一: 低血清培養法による脂肪由来間葉系幹細胞の創傷治癒促進効果. 第6回日本再生医療学会. 横浜. 3月13-14日. 2007.
- 6) 木野村賢, 前島洋平, 喜多村真治, 一瀬邦宏, 高沢有紀, 來山浩之, 広越久美子, 田邊克幸, 菅谷健, 山崎康司, 杉山斉, 榎野博史: シスプラチン誘導急性腎不全モデルにおけるラット腎幹/前駆細胞(rKS56)治療効果の検討. 第49回日本腎臓学会総会. 東京. 6月14-16日. 2006.
- 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
松尾清一:
1) 低血清培養法を用いた脂肪由来幹細胞の分離・培養法: 特許出願済み

2) 脂肪由来多分化能幹細胞を含有する細胞
製剤：特許出願済み

槇野博史：

- 1) 特願 2003-071029: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 15 年 3 月 14
日）
- 2) 特願 2005-058494：糖尿病性腎症の治療
用医薬組成物（出願日平成 17 年 3 月 3 日）
- 3) 特願 2005-084218：糖尿病性腎症の治療用
医薬組成物（出願日平成 17 年 3 月 23 日）

東京歯科大，神戸理研：

腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞の安全性評
価指標（出願予定）

2. 実用新案特許

なし

3. その他

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

(1) 今年度は昨年度実施例の2倍以上のヒト腎疾患患者（計56例）を対象に、尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養できた。生体腎移植症例のみならず、腎癌部分腎摘出症例についても、30分という短時間の片腎虚血において、尿中落下細胞から50%の確立で培養できた。(2) 生体腎移植患者尿から分離した細胞を培養し、独立して得られた複数の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、ヘンレループ、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。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。(3) 腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞の安全性評価の指標を同定するために、マウス腎間葉系細胞株、腎近位尿細管由来上皮細胞株mProx24、および本細胞に複数回の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。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を絞り込んだ。(4) より多くの腎疾患症例からヒト腎組織特異的幹/前駆細胞を効率よく単離培養する目的で、腎微小循環のバイオマーカーであるL-FABPの迅速検査キットを試作し、尿中L-FABPと尿中落下細胞の培養成功の可否について検証した結果、L-FABPが非常に高い感度、特異度を有していることが明らかになった。

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応用できると考えられる。

昨年度の本分担研究グループでは腎疾患患者の尿から腎臓幹/前駆細胞を効率よく単離し、培養条件を標準化した。本年度は、1) 腎疾患患者尿中から樹立するヒト腎臓幹/前駆

細胞数を昨年比倍増させる数値目標、2) 樹立細胞の安全性評価法の確立と、引き続き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標とした。

B. 研究方法

(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央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。

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、10⁻⁸M 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10ml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。

(3) 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。

(4) マウス腎臓幹/前駆細胞の培養方法の標準化

昨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思われる 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℃ 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。

(5) 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、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。

(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

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、昨年に比して実施例数で 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 (図 1)。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 (図 2)。

(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、ヘンレループ、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 (図 3)。

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。

(3) 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 (図 4)。

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ので、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 (図 5 図 6、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。

細胞移植後 4 週間で剖検したところ、HA を腎実質に尖刺した部分に顕著な線維化が確認された (図 5)。HA のみの投与では、

腎皮質内の間質に押し出された HA 周囲には線維化が起きていない (図 6)。このことから、HA が線維化の原因ではなく、尖刺による尿細管周囲の出血や炎症がその後の間質障害を引き起こしているものと考えられる。

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。

(4) 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 (図 7) 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。

(5) 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 (図 8)。

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を絞り込んだ (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、尿管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。

D. 考察

今年度は昨年度実施例の 2 倍以上のヒト腎疾患患者 (計 56 例) を対象に、尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養できた。生体腎移植症例のみならず、腎癌部分腎摘出症例についても、30 分という短時間の片腎虚血において、尿中落下細胞から 50% の確立で培養できた。

より多くの腎疾患症例からヒト腎組織特異的幹/前駆細胞を効率よく単離培養する目的で、腎微小循環のバイオマーカーである L-FABP の迅速検査キットを試作し、尿中

L-FABP と尿中落下細胞の培養成功の可否について検証した結果、L-FABP が非常に高い感度、特異度を有していることが明らかになった (図 9)。2006 年 9 月、尿中 L-FABP は医薬品医療機器総合機構において、日本発の新規測定項目として体外診断薬の製造販売承認申請を完了し、現在審査中である。

ごく最近、FABP サブタイプの発現により、腎癌部位と正常部位の腎組織が判別可能であるという報告がなされた (Teratani T, et al. 2007 J. Urology)。図 10 のごとく、L-FABP (近位尿管型) 陽性、B-FABP (脳型) 陽性、I-FABP (腸型) 陰性の場合、腎癌細胞が混入している可能性が高いため、樹立した培養細胞の安全性評価に有用と考えられる。

また、ヒトと同様の手法を用いて、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治療を行った結果、BUN の上昇は有意に抑制できたが、尖刺細胞注入部位が強い線維化を起こしていることが明らかとなった。げっ歯類の腎被膜下に相当する移植細胞の注入スペースを外科的処置で確保できるか早急に検討する必要がある。

E. 結論

ヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から単離培養した腎幹/前駆細胞の樹立を大幅向上した。移植細胞の安全性評価に利用可能な指標として候補遺伝子を絞り込んだ。細胞樹立の効率化に必須のバイオマーカーの迅速検査キットを試作し、臨床現場での使用を開始した。

次年度は、ヒト腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞とヒト脂肪由来間葉系細胞との上皮/間葉相互作用による治療効果腎疾患細

胞治療に対する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) Nakamura T, Sugaya T, Koide H:
Cigarette Smoking Affects Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Concentration in Patients With Early Diabetic Nephropathy
Diabetes Care: 2006. 29(7):1717

2) Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Koide H:
Effect of pioglitazone on urinary liver-type fatty-acid-binding protein concentrations in diabetes patients with microalbuminuria
Diabetes Metab Res Rev: 2006. 22:385-389

3) Nakamura T, Sugaya T, Koide H:
Angiotensin II receptor antagonist reduces urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in patients with diabetic nephropathy and chronic renal failure.
Diabetologia. 2007. 50(2):490-492.

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞の安全性評価指標（出願予定）

図1

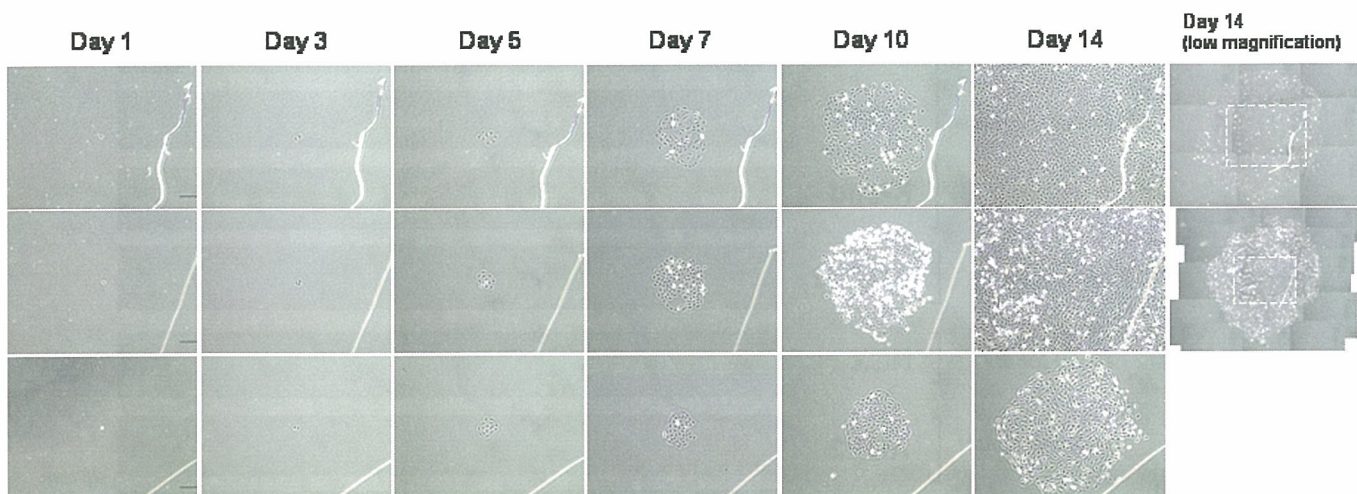
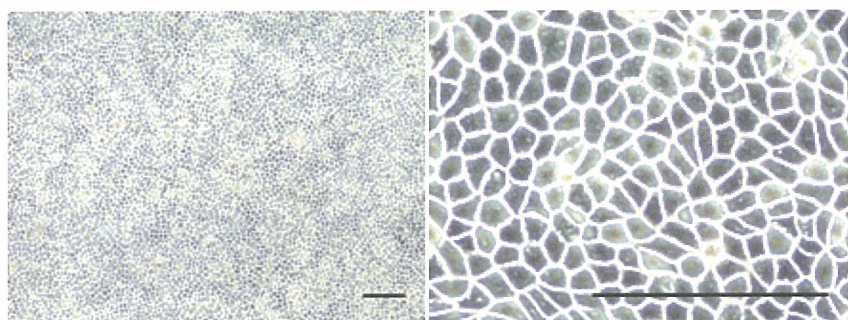
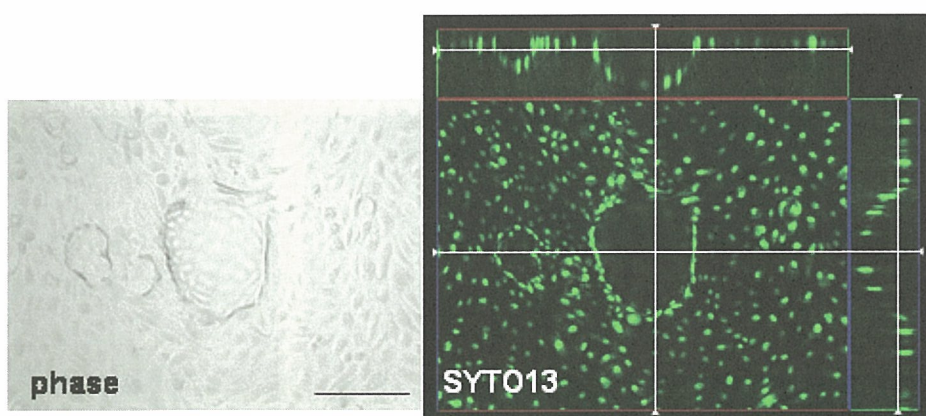


図2



Cobblestone-like cells

bar=200 μ m



Dome formation

bar=200 μ m
Z axis=110 μ m

図3

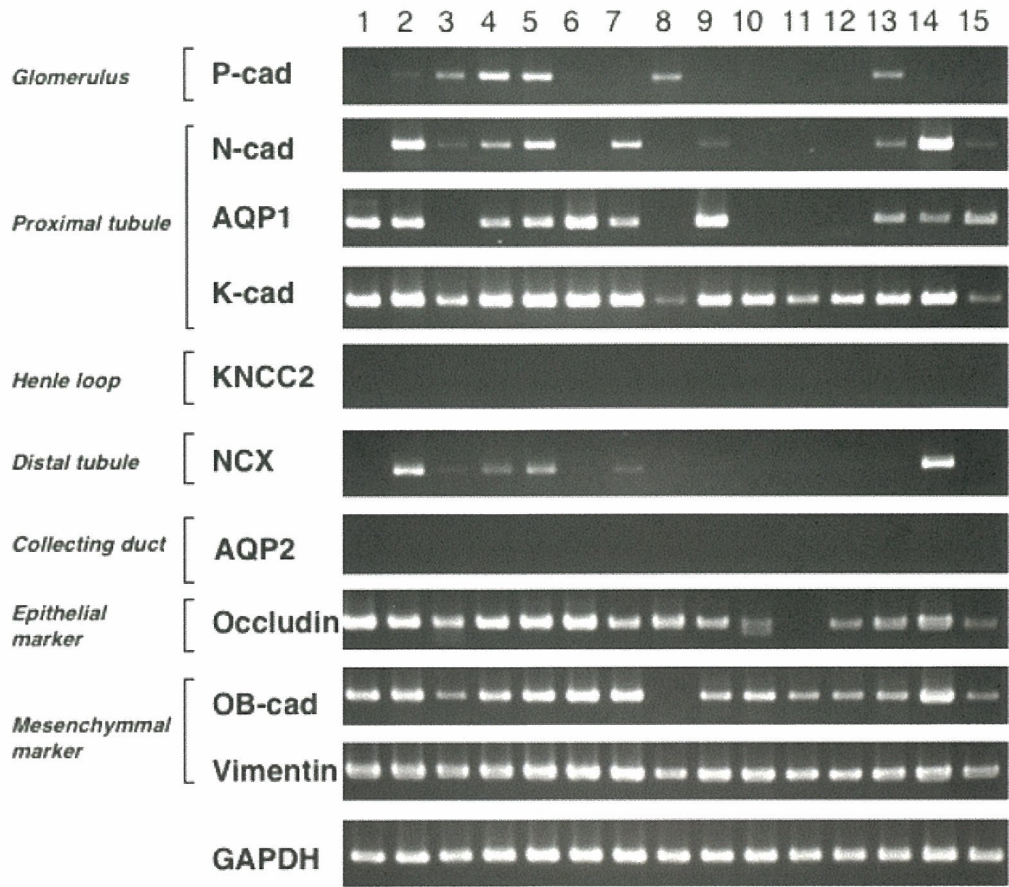


図4

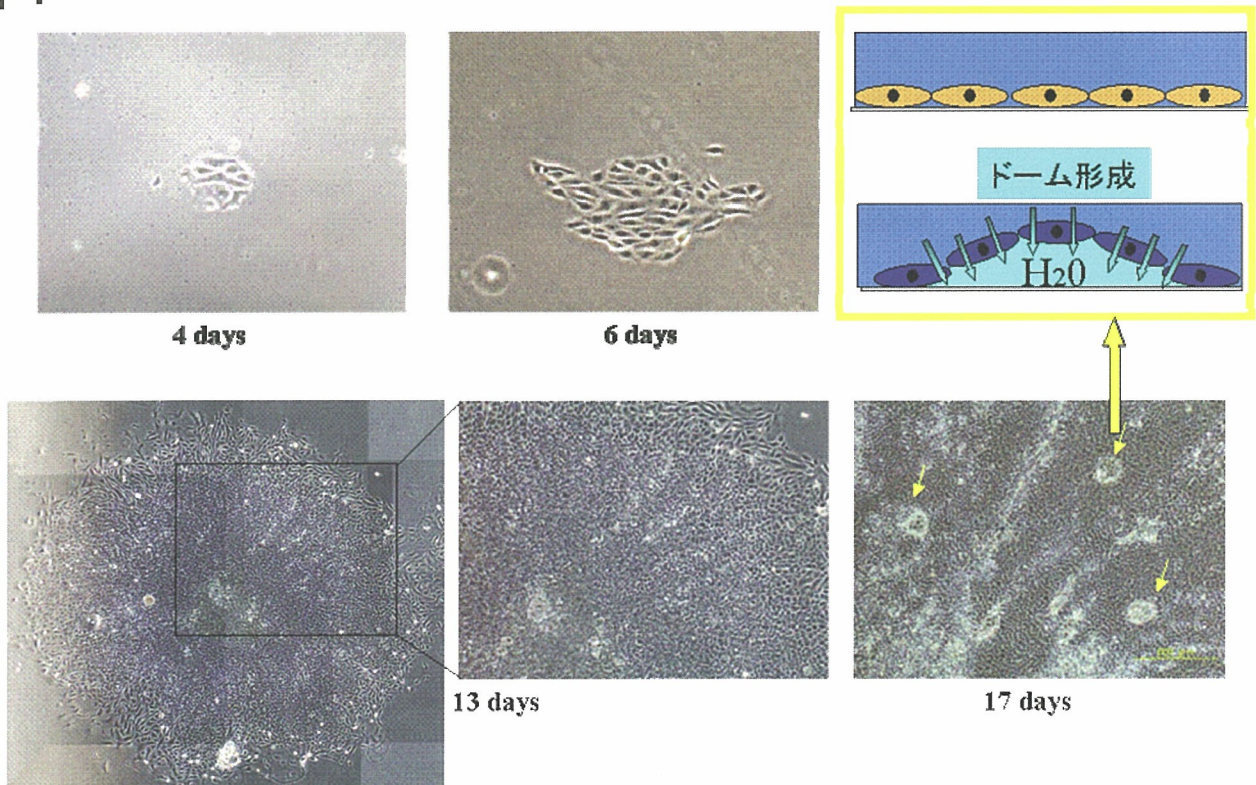


图5

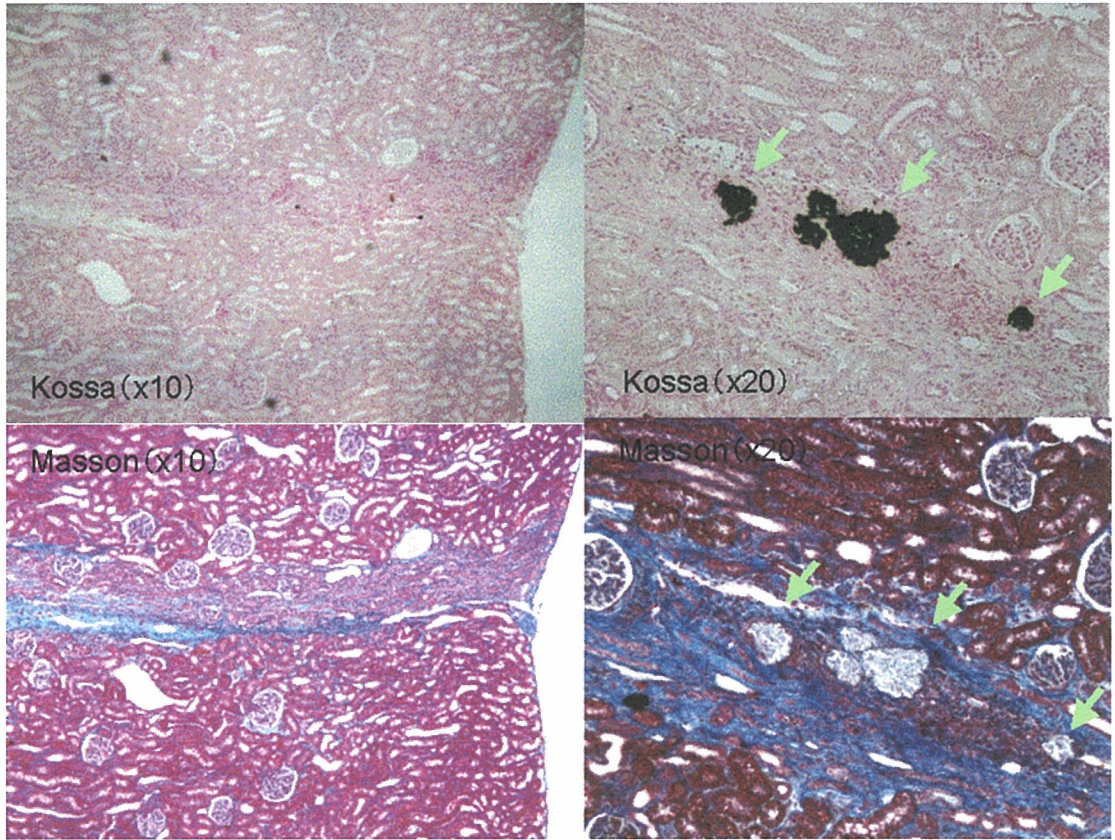


图6

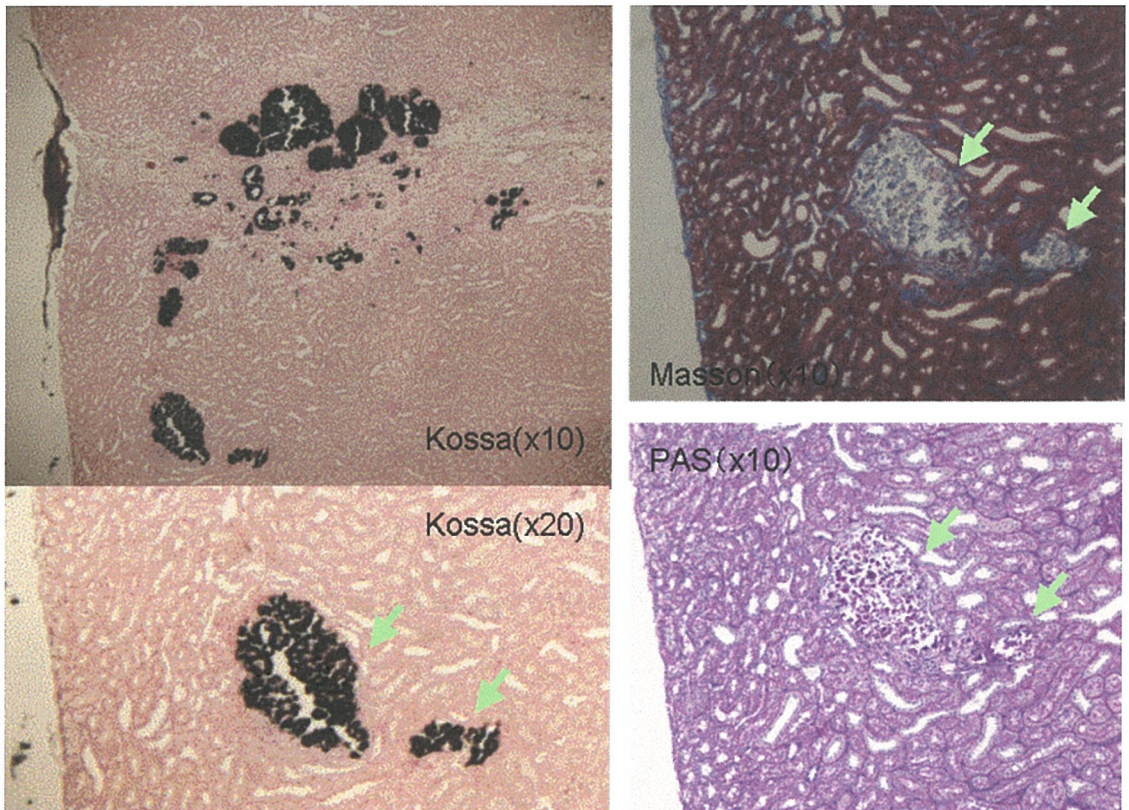


図7

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

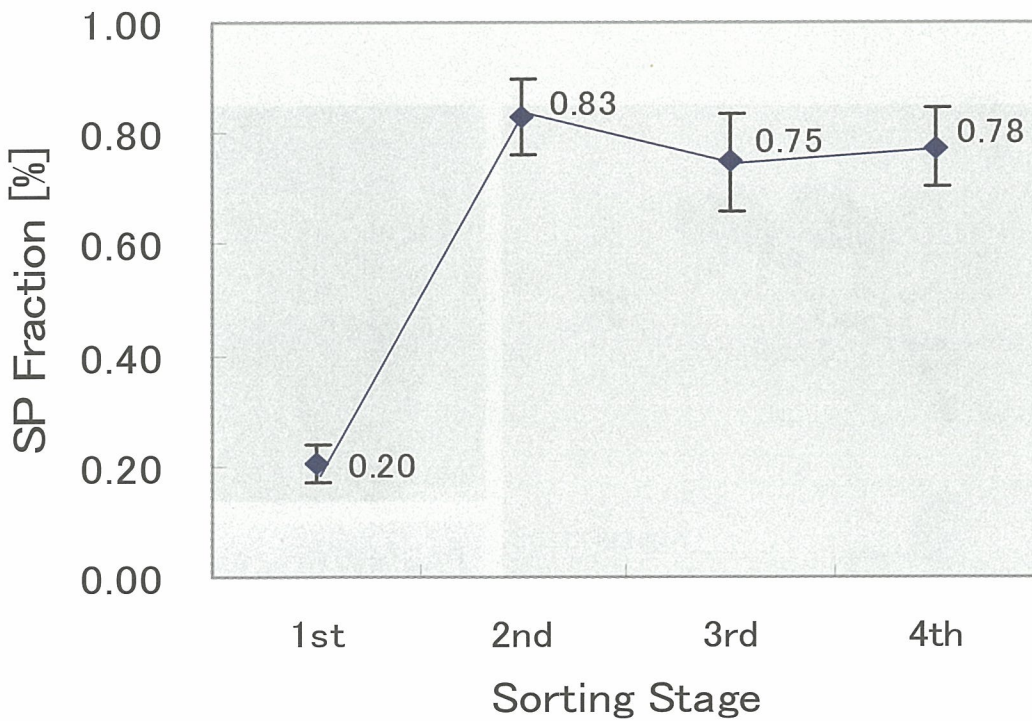
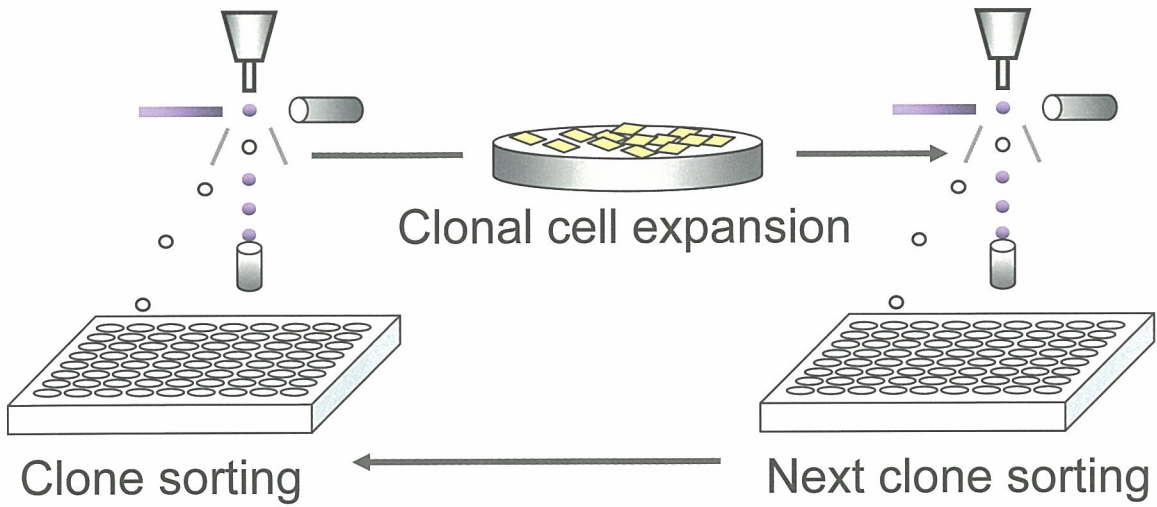
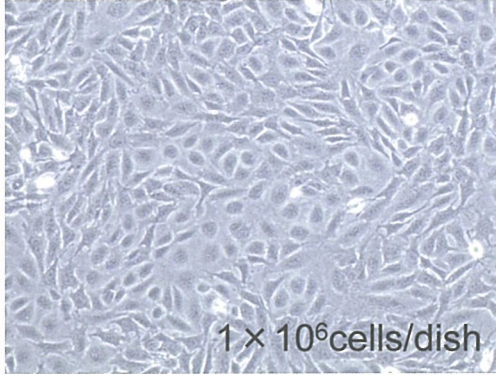
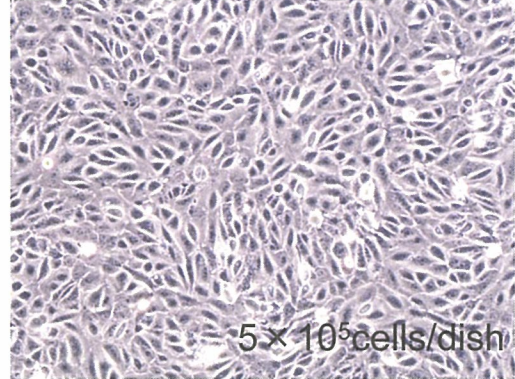


図8

マウス間葉系細胞株



mProx24細胞



mProx24-SP細胞

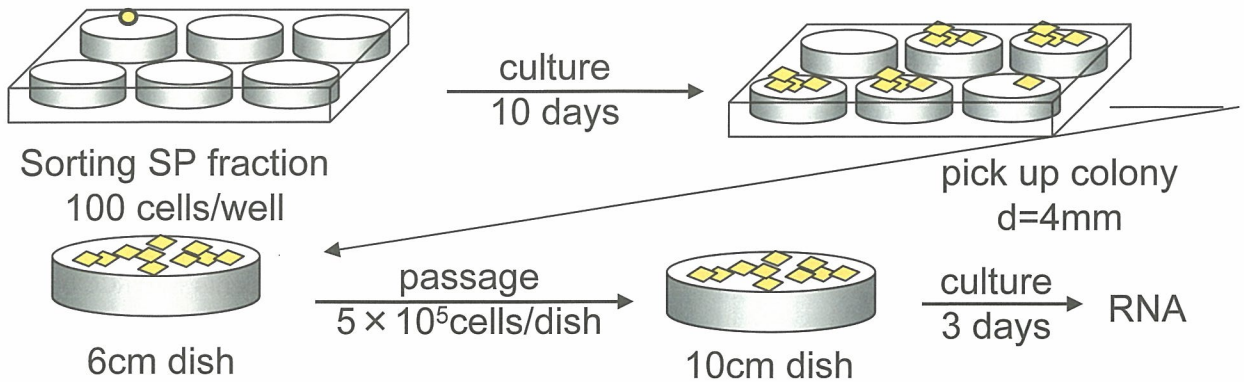
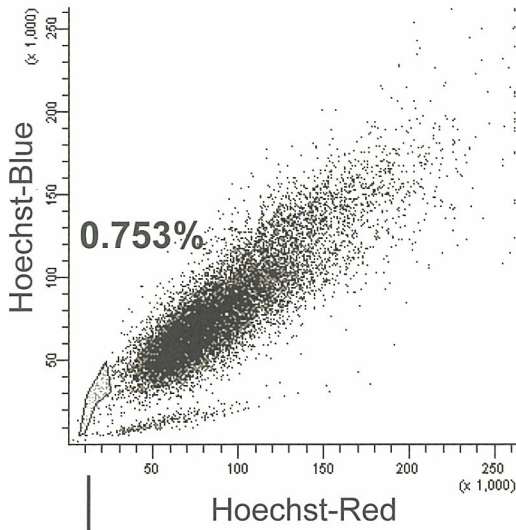
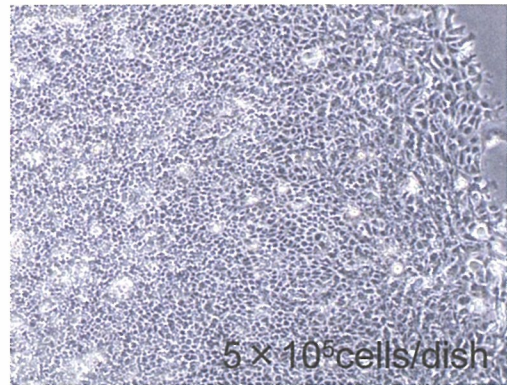


図9

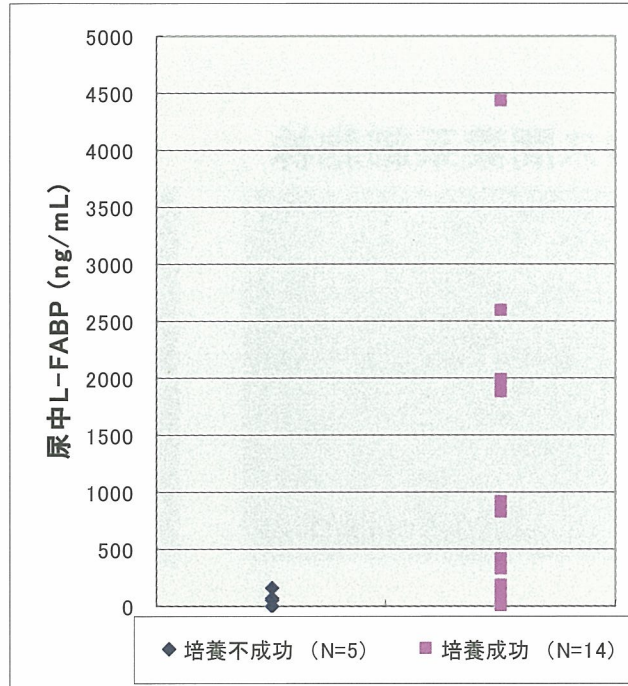
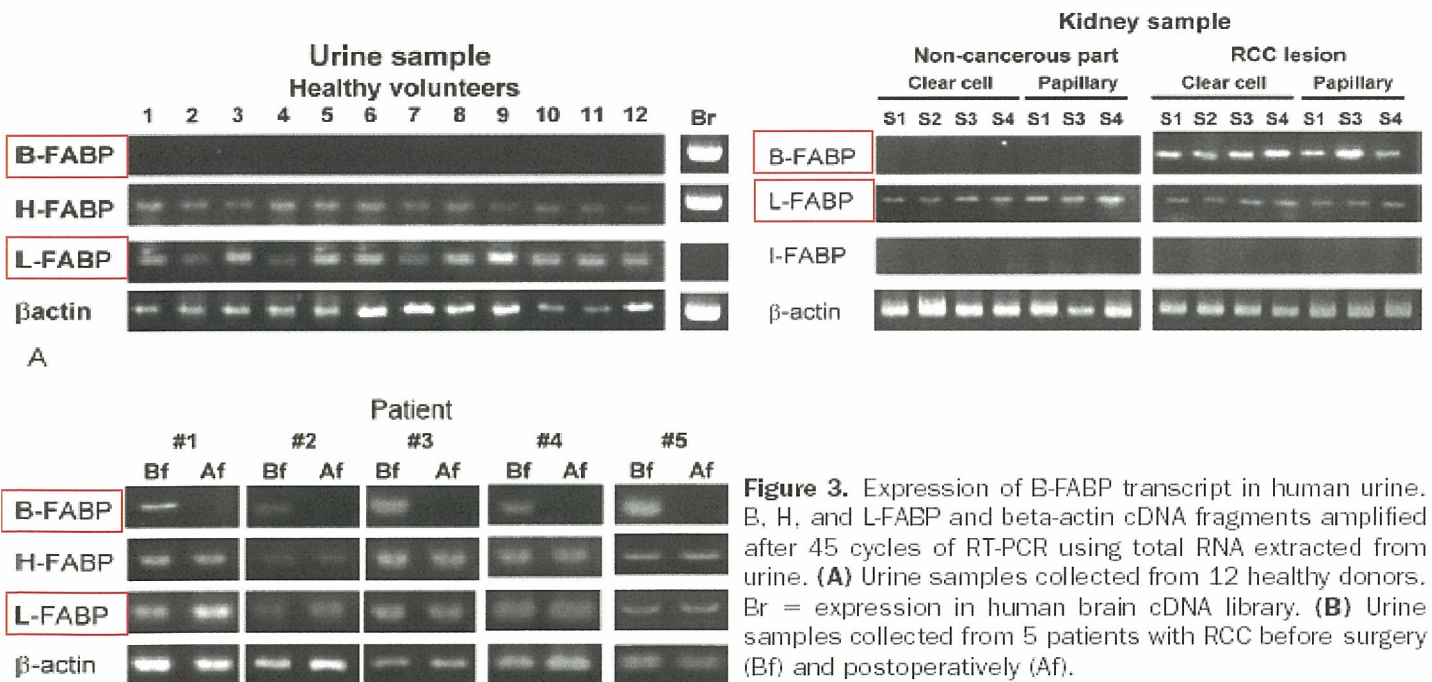


図10

ヒト尿中落下細胞の安全性試験にFABPの発現サブタイピングが利用できる



Detection of Transcript for Brain-Type Fatty Acid-Binding Protein in Tumor and Urine of Patients with Renal Cell Carcinoma. Teratani-T, et al. J.Urology (2007)