

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

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

分担研究者 室原 豊明 名古屋大学医学部循環器内科学教授

研究協力者 新谷 理 名古屋大学医学部循環器内科学助手

朱宮 孝紀 名古屋大学医学部循環器内科学大学院生

研究要旨

研究の目的は、骨髄単核球細胞(BM-MNCs)及び骨髄由来間葉系細胞(BM-MSCs)移植が慢性腎不全モデルにおいて腎機能改善に有用であるか否かを検討することである。

慢性腎不全モデルである Doxorubicin 腎症ラットにおいて、経静脈的に BM-MNCs 及び BM-MSCs を投与したが、蛋白尿、血清クレアチニン、腎臓組織などで改善がみられなかった。現在、細胞投与法を腎実質内への直接移植とし検討を進めている。

A. 研究目的

本研究の目的は、骨髄由来幹細胞移植により慢性腎不全モデルにおける残存腎機能の再構築を目指すことである。つまり、細胞移植が腎機能改善に有用であるか否かを検討する。

いたが、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、腎臓組織などの評価を行った。

Protocol 2

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 10^6 個とした。Doxorubicin投与8週間後、蛋白尿、血液クレアチニン、腎臓組織などの評価を行った。

B. 研究方法

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。

Protocol 1

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、当初は、 10^8 個を目標として

Protocol 3

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。

(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

Protocol 1

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。

Protocol 2

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。

Protocol 3

細胞投与により蛋白尿の改善を認めなかった。血清クレアチニンは BM-MNCs 群に比して生食群で高かったが有意差はみとめなかった。

D. 考察

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、骨髓幹

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、骨髓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髓細胞の定着や分化も報告されており、骨髓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、骨髓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)。

現在のところ、薬剤性を含めた慢性腎不全モデルでは、骨髓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知られており、今回モデルとして使用した。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るなど、腎への直接的な投与が望ましいと考えられたため、投与方法を腎被膜下・腎実質内へ移植し検討している。現在のところ、尿蛋白や血清クレアチニンなどでは明らかな効果は認めていない。

E. 結論

現在のところ、Doxorubicin 腎症ラットモデルにおいて、BM-MNCs および BM-MSCs による明らかな効果は認められていない。

F. 研究発表

Yokoyama S, Fukuda N, Li Y, Hagikura K, Takayama T, Kunimoto S, Honye J, Saito S, Wada M, Satomi A, Kato M, Mugishima H, Kusumi Y, Mitsumata M, Murohara T. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*2006; 40: 24-34.

Murakami H, Murakami R, Kambe F, Cao X, Takahashi R, Asai T, Hirai T, Numaguchi Y, Okumura K, Seo H, Murohara T. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2006; 341: 973-978.

Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M, Amano T, Matsubara T, Murohara T. Effects of intravenous nicorandil before reperfusion for acute myocardial infarction in patients with stress hyperglycemia. *Diabetes Care.*2006; 29: 202-206.

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.*2006; 130: 521-531.

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.*2006; 3(Suppl.): S123-S128.

Egami K, Murohara T, Aoki M, Matsuishi T. Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. *J. Leukoc. Biol.*2006; 79: 971-976.

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.* 2006; 26: 1465-1472.

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.* 2006; 114: I114-I119.

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).

Yokouchi K, Numaguchi Y, Okumura K, Ishii M, Kubota R, Imai H, Murakami R, Kondo T, Murohara T. I-Caldesmon regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and inhibits neointimal formation after angioplasty. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. (in press).

Izawa H, Kondo T, Usui A, Yamamoto K, Shintani S, Inden Y, Isobe S, Unno K, Kajiguchi M, Noda A, Yokota M, Takamatsu J, Ueda Y, Komori K, Murohara T. Clinical Protocol: Angiogenesis by Intramyocardial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients with Severe Coronary Artery Disease. TACT-NAGOYA-HEART. *Circ. J.*2006; 70: 1180-1183.

Amano T, Matsubara T, Uetani T, Nanki M, Marui N, Kato M, Arai K, Yokoi K, Ando H, Ishii H, Izawa H, Murohara T. Impact of metabolic syndrome on tissue characteristics of angiographically mild to moderate coronary lesions: Integrated backscatter intravascular ultrasound study. *J. Am. Coll. Cardiol.*2007 (in press).

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).

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.*2007; 71:

Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numakuchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T. Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Circ. Res.*2007 (in press).

Takefuji M, Mori K, Morita Y, Arimura N, Nishimura T, nakayama M, Hoshino M, Iwamatsu A, Murohara T, kaibuchi K, Amano M. Rho-kinase modulates the function of STEF, a Rac GEF, through its phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2007 (in press).

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
講師 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 野入英世

研究要旨

前回報告ではイヌ尿細管上皮前駆細胞を培養することに成功した。今回は臨床を見据えた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 し、単腎再灌流障害モデルの対側腎に細胞注入群と生食注入群の腎機能を比較検討した。腎機能において血中 BUN は細胞注入後1週間、4週間で有意に低下し腎機能保護作用を認めた。細胞注入時腎臓実質に穿刺部周辺に腎機能低下を伴わない組織の線維化を局所に認め確実な皮膜下細胞注入が必要であることが明らかになった。その対策として臨床の腎部分切除ですでに行われている自己脂肪挟み込んで縫合する準じて皮膜スペースに細胞を注入する手技を開始している。

A. 研究目的

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、イヌ腎障害モデルに細胞治療を試み腎機能を評価した。

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10⁶-8/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。

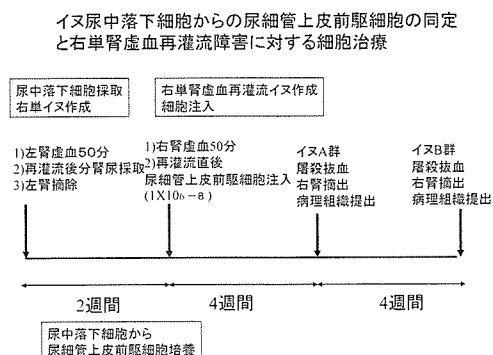
(3) 尿細管上皮前駆細胞の処理投与

蛍光色素で尿細管上皮前駆細胞をマーカーし、10⁶-8/個の細胞を皮膜下に注入した。細胞注入部位のマーキングと細胞の足場の可能性を目標にヒドロキシアパタイト(HA)を細胞と混和させ注入した。

(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免疫染色では、近位尿管マーカの N-cadherin(Ncad) 及び Aquaporin1 (AQP1)、遠位尿管マーカの E-cadherin(Ecad) 及び Na/Cl cotransporter(NCC) と上皮のマーカである ZO1 は epithelial marker なので proximal/distal 共に染色された。コントロールがないことよりイヌの尿中落下細胞の primary culture 中には proximal tubule-like cells 及び distal tubule-like cells の存在が推測された。

イヌ自己細胞移植群 (T群) と生食注入群 (C群) の血中 Crn では有意差は認められ

ないが、血中 BUN を比較すると注入後1週間と4週間で有意な差が認められ腎機能保護作用が認められた (n=6)。

(前 C群 vs T群: 7.85 ± 0.54 vs 7.90 ± 1.00 mg/dl, 1週間後 C群 vs T群: 53.61 ± 4.33 vs 45.40 ± 8.18 mg/dl *, 4週間後 C群 vs T群: 63.78 ± 4.52 vs 55.01 ± 8.01 mg/dl*)
*: P<0.05

HA を細胞と混和した群 (T+HA 群) では細胞移植に適した腎皮膜下のスペースがなく、腎実質に尖刺した部分の線維化が確認された。しかしながら血中 BUN の悪化は見られなかった (n=4)。(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)。

D. 考察

以上の結果から、ヒトへの応用を考えると、腎皮膜下に相当する細胞移植スペースの確保を、何らかの外科的処置により行う必要がある。臨床において腎癌部分切除後に、「腎切除部に患者自身の脂肪細胞を挟み込んで縫合する」

プロトコールが確立されており、片腎全摘よりも腎機能が温存されるとされている。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、腹腔鏡手術下に残存腎へ細胞移植できると考えられる。

E. 結論

尿中落下細胞から培養した尿細管前駆様細胞治療は血中 BUN を指標とした腎機能保護作用を認めた。すでにこの実験におけるイヌにおいて、腎皮膜を切開し、自家脂肪細胞縫合術を行い、同部位への尿中落下細胞移植を開始している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozaki T, Yamamoto T, Ono Y et.al
Recombinant Human Soluble
Thrombomodulin Ameliorates Ischemic
Acute Renal Failure. Nephrol Dial
Transpl 2007 in press
- 2) 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
- 3) Terocero C, Ono Y, Yamamoto T et al.
I Autonomous Catheter Insertion System
using Magnetic Motion Capture Sensor
for endvascular surgery The
International Journal of Medical
Robotics and Computer Assisted Surgery
2007 in press

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

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む） なし

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
	岩島 重二郎	名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学大学院生
	渡辺 達人	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。我々は名古屋大学農学部との共同研究にてヒト脂肪組織から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、低血清培養法という方法を確立した。この方法を用いることにより、従来の高血清培養に比べサイトカイン分泌能の高い細胞が選択的に分離増殖可能であることが明らかとなった。さらにこの細胞を腎皮膜下に投与することにより腎不全動物モデルの腎機能が改善した。低血清培養を用いた脂肪由来幹細胞は、患者の負担、動物原料の排斥、十分な細胞数の確保、治療効果などすべての有利な条件を兼ね備えており、臨床応用が期待できると考えられる。

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**脂肪由来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。最近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。我々は名古屋大学農学部北川らとの共同研究によりヒト脂肪組織から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、低血清培養法という方法を確立した。この方法を用いることにより、従来の高血清培養に比べ分化能力の高い細胞が選択的に分離増殖可能であることが明らかとなっている。今回はこの細胞の詳細な特徴やサイトカイン分泌能を明らかにし、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。

B. 研究方法

(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。

(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 Hydrocortison 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

0.1 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。

(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) 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。

(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(LaminA/C)に対する抗体にて免疫染色を行った。

(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。

(倫理面への配慮)

脂肪由来幹細胞を用いた研究に関しては名古屋大学倫理委員会に申請し承認を得ている。脂肪組織を提供して頂く際には十分な説明の上にご本人に文書で同意を得ている。またすべての検体は匿名化して扱い、個人情報漏洩することがないように最大限の注意を払っている。

動物を用いた研究に関しては名古屋大学

に動物実験計画書を提出し承認を得ている。実験を実施する際には動物愛護の精神にのっとり、動物の苦痛を最小限するべく常に努力している。

C. 研究結果

(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 1 g 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 (図 1)。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 (図 2)。

(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 (図 3)。

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 (図 3)。

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 (図 3)。

(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はそれぞれ、VEGF-A 2598 ± 481 pg/ 10^6 cells、 91.1 ± 10.7 pg/ 10^6 cells、VEGF-C 5811 ± 174 pg/ 10^6 cells、 69.7 ± 11.0 pg/ 10^6 cells、HGF 1049 ± 380 pg/ 10^6 cells、 113 ± 30 pg/ 10^6 cells、FGF-7 385.71 ± 31.0 pg/ 10^6 cells、 1.13 ± 1.19 pg/ 10^6 cells であった。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 (図 4)。

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は、それぞれ VEGF-A 5394 ± 184 pg/ 10^6 cells、 1369 ± 131 pg/ 10^6 cells、 1734 ± 290 pg/ 10^6 cells、VEGF-C 5811 ± 174 pg/ 10^6 cells、 7984 ± 306 pg/ 10^6 cells、 7228 ± 253 pg/ 10^6 cells、HGF 647 ± 59 pg/ 10^6 cells、 587 ± 53 pg/ 10^6 cells、 652 ± 30 pg/ 10^6 cells、FGF-2 250 ± 2.7 pg/ 10^6 cells、 7.2 ± 12 pg/ 10^6 cells、 69 ± 3.7 pg/ 10^6 cells、FGF-7 (KGF) 386 ± 31 pg/ 10^6 cells、 68 ± 8.7 pg/ 10^6 cells、 65 ± 1.4 pg/ 10^6 cells、TGF- β 14.5 pg/ 10^6 cells、 10.8 pg/ 10^6 cells、 5.6 pg/ 10^6 cells、IL-6 3671 pg/ 10^6 cells、 1434 pg/ 10^6 cells、 358 pg/ 10^6 cells、IL-8 852 pg/ 10^6 cells、 56 pg/ 10^6 cells、 188 pg/ 10^6 cells、IL-10 16 pg/ 10^6 cells、 0 pg/ 10^6 cells、 2.8 pg/ 10^6 cells、MCP-1 8452 pg/ 10^6 cells、 0 pg/ 10^6 cells、 883 pg/ 10^6 cells であった。

IL-1 β 、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。(図5-1, 2)

(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(図6)。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(図7)。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(図8)。CD31染色では、血管への分化は確認できなかった(図9)。

(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(図10)。ペンシル型CCDカメラで測定した腎皮膜下の尿細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(図11)。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ヵ月後でも細胞は残存していた(図12)。

(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(図13-1、2)、筋肉内毛細血管血流(図14-1、2)、毛細血管密度(図15-1、2)は共にcontrol群に比べ治療群で良好であった。

D. 考察

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。我々は名古屋大学農学部の北川らが開発した低血清培養法を用いている(特許申請中)。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。実際に我々はこうして分離培養した脂肪由来幹細胞をラット創傷モデルに投与したところ、その高い有効性が確認された。また腎障害モデルラットの腎機能も劇的に改善した。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。

E. 結論

低血清培養を用いた脂肪由来幹細胞は、患者の負担、動物原料の排斥、十分な細胞数の確保、治療効果などすべての有利な条件を兼ね備えており、臨床応用が期待できると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaoru Yasuda, Hirotake Kasuga, Toru Aoyama, Hiroshi Takahashi[†], Takanobu Toriyama[†], Yasumasa Kawade, Shigejiro Iwashima, Shigeki Yamada, Hirohisa Kawahara, Shoichi Maruyama, Yukio Yuzawa, Hideki Ishii, Toyoaki Murohara and Seiichi

Matsuo : 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.

2. 学会発表

- 1) 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」, 横浜, 3月13-14日, 第6回日本再生医療学会総会, 2007.
- 2) 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」, 横浜, 3月13-14日, 第6回日本再生医療学会総会, 2007.
- 3) 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急性腎不全に対する効果」, 横浜, 3月13-14日, 第6回日本再生医療学会総会, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

1. 特許

- 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

図1

低血清でも FGF-2添加により良好な増殖が得られる

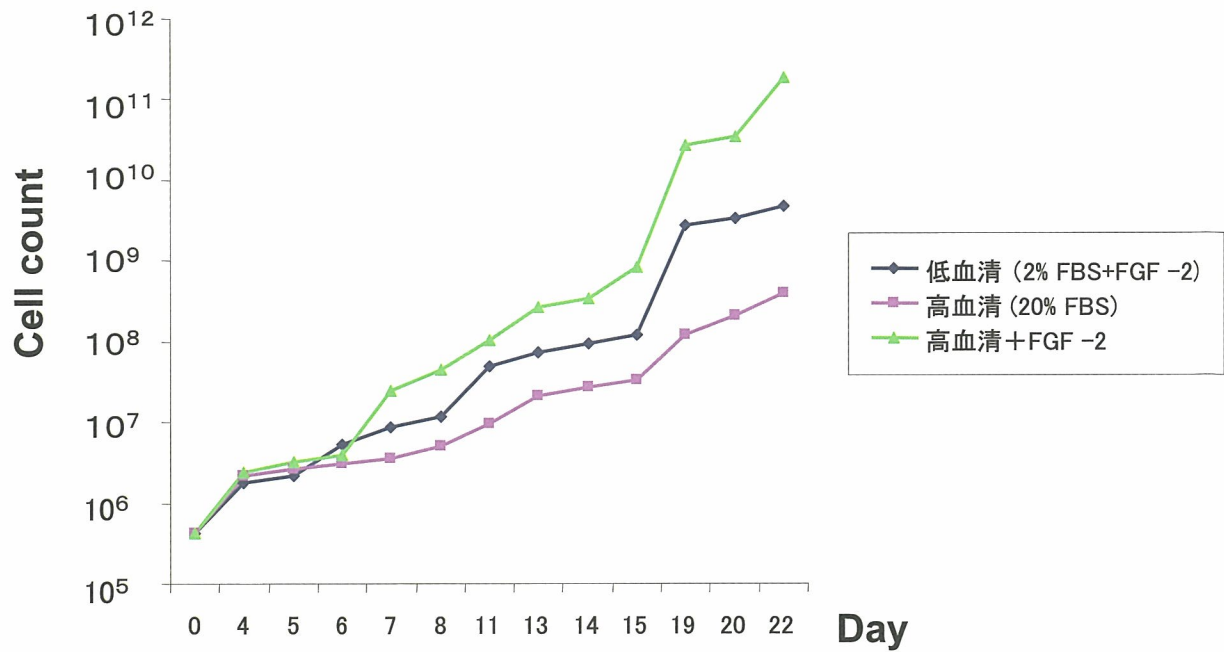


図2

表面マーカー解析

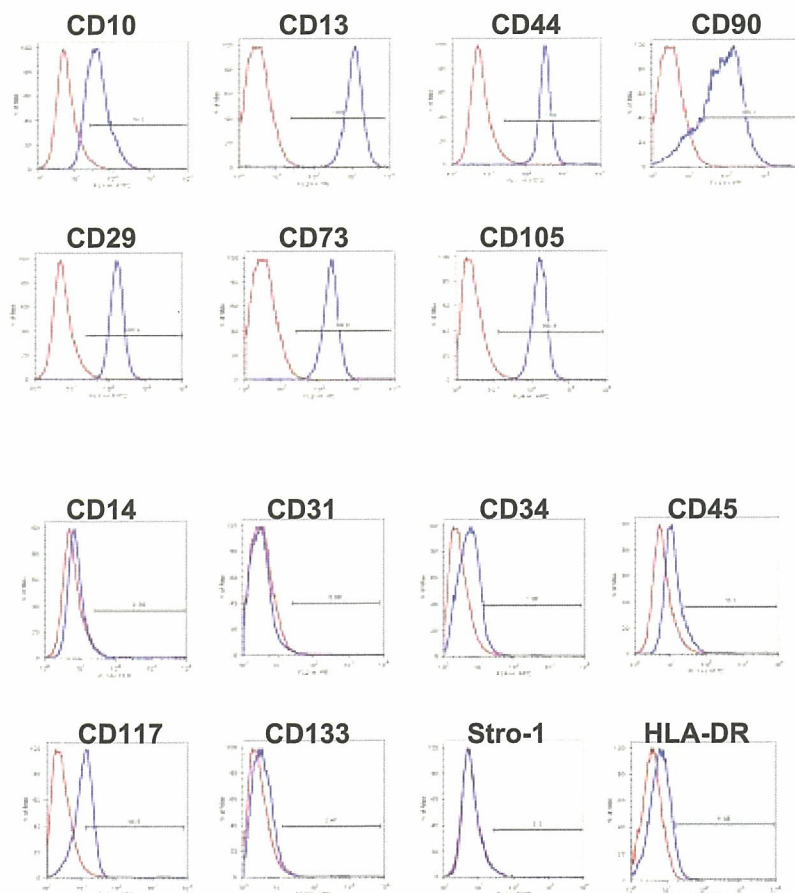


図3

低血清培養脂肪由来幹細胞は多分化能をもつ

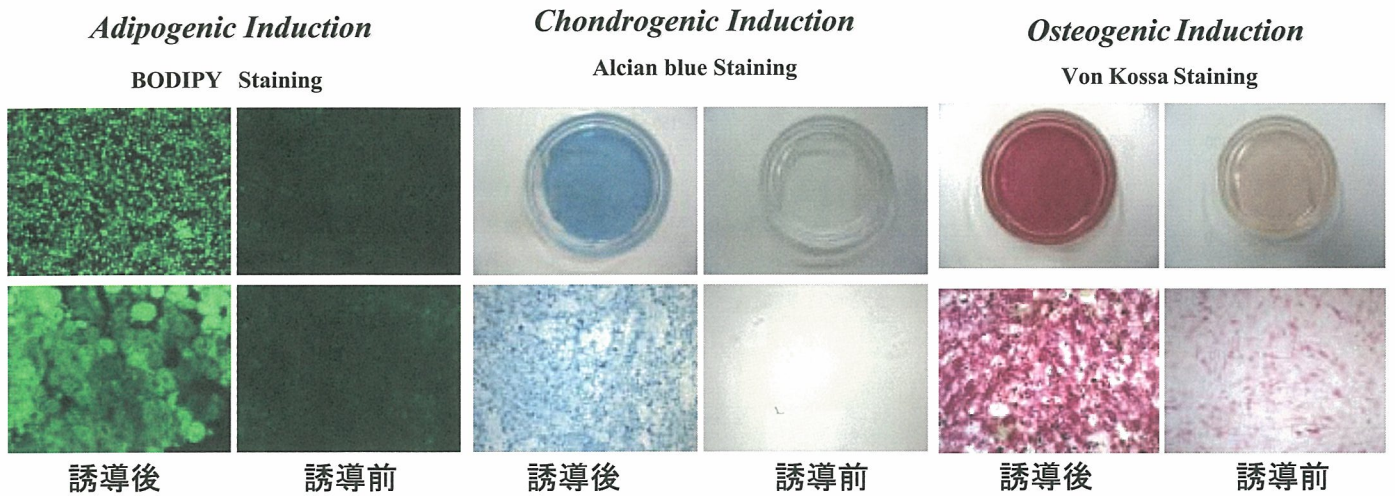


図4

低血清培養脂肪由来幹細胞は多くの増殖因子を分泌する

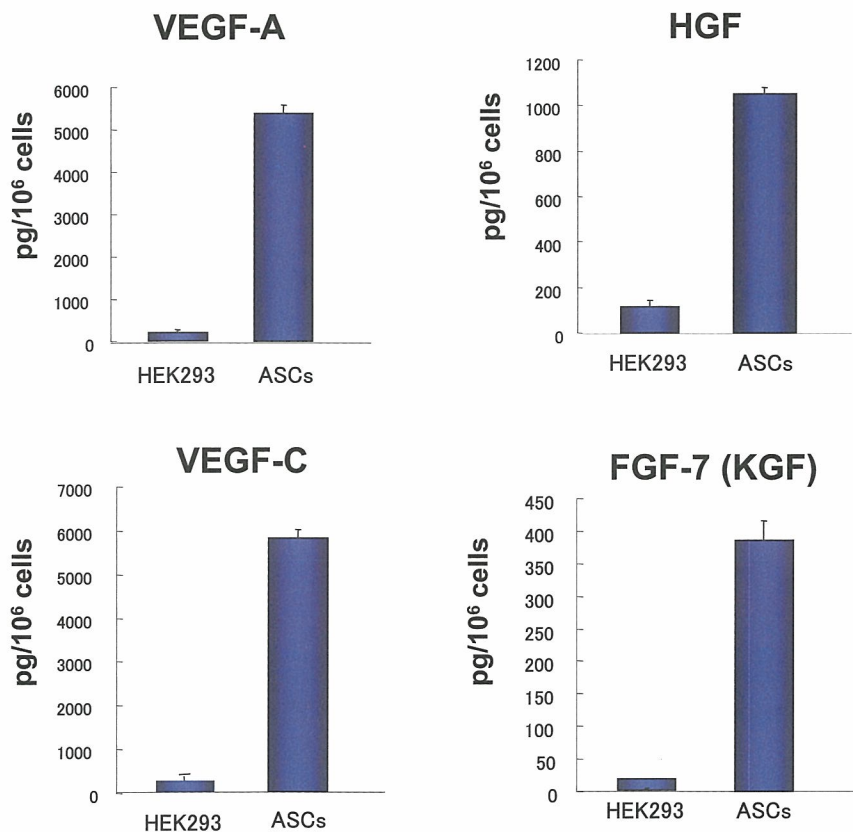


図 5-1 培養方法によるサイトカイン分泌の相違

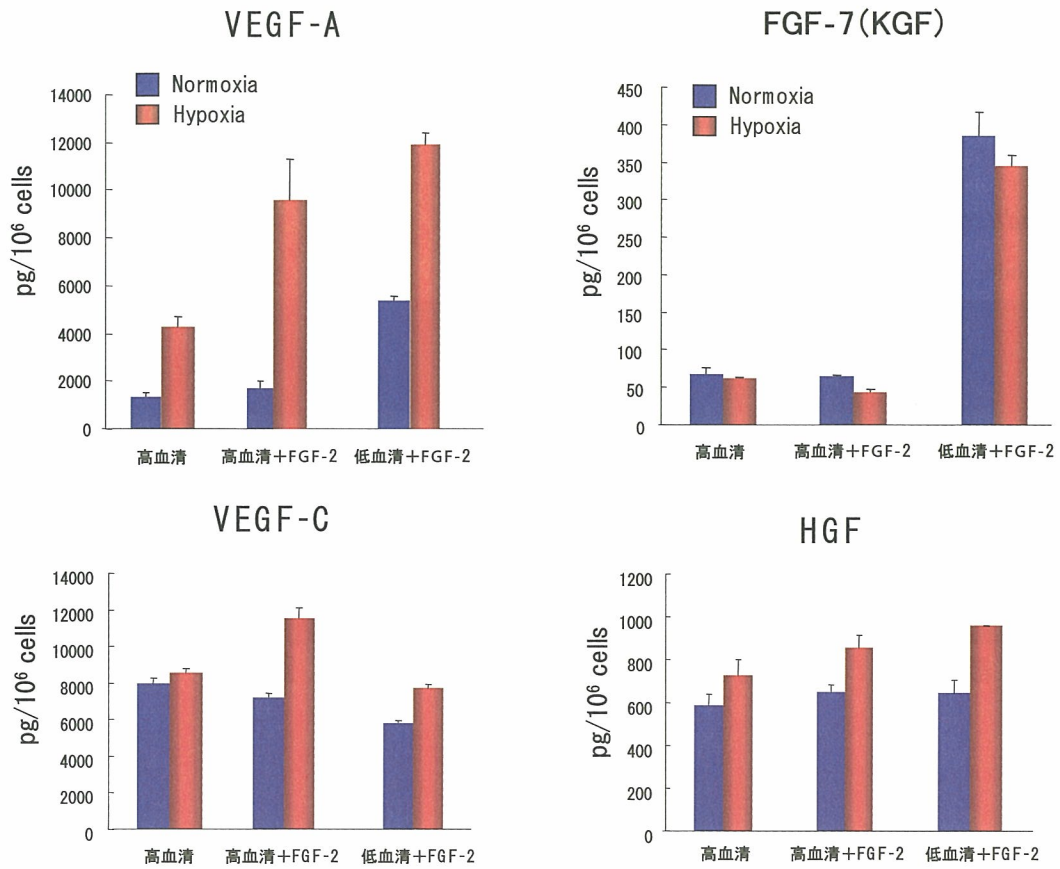


図 5-2

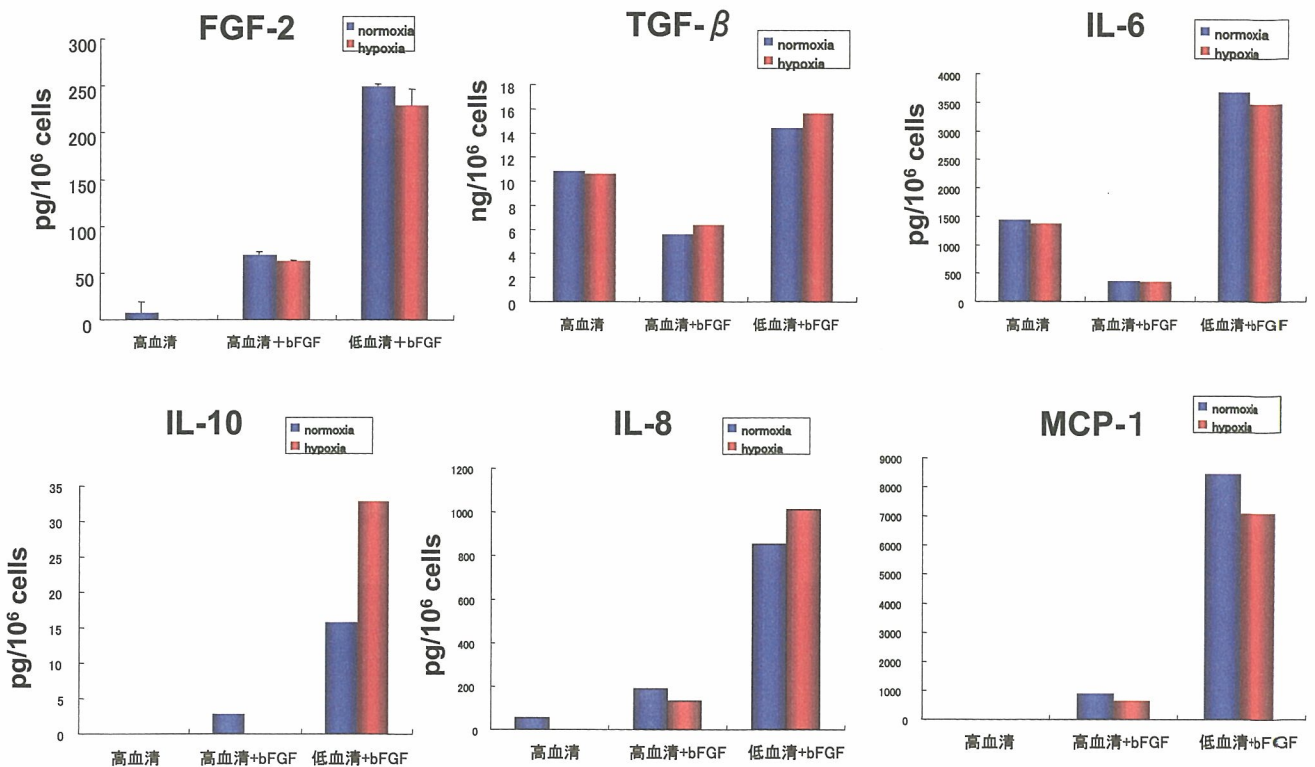


図6

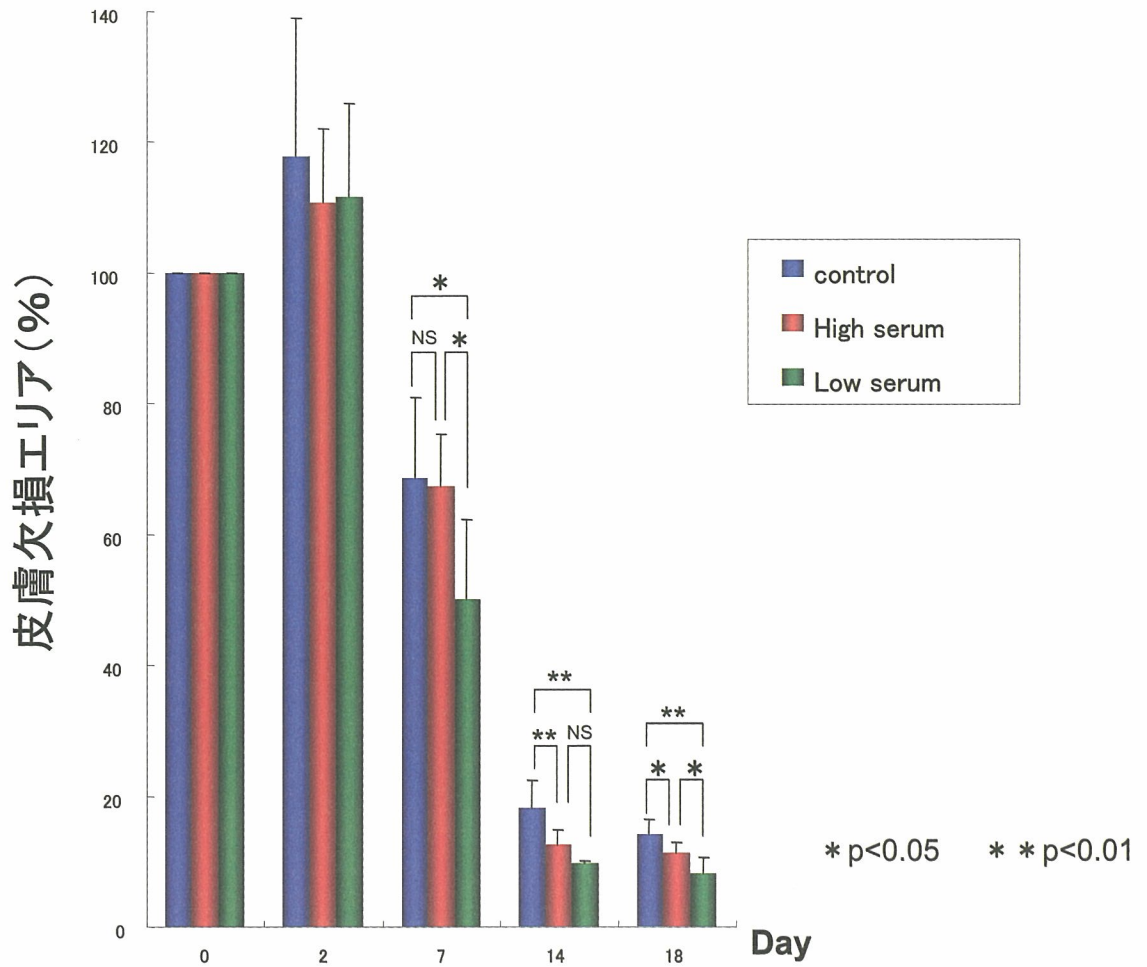
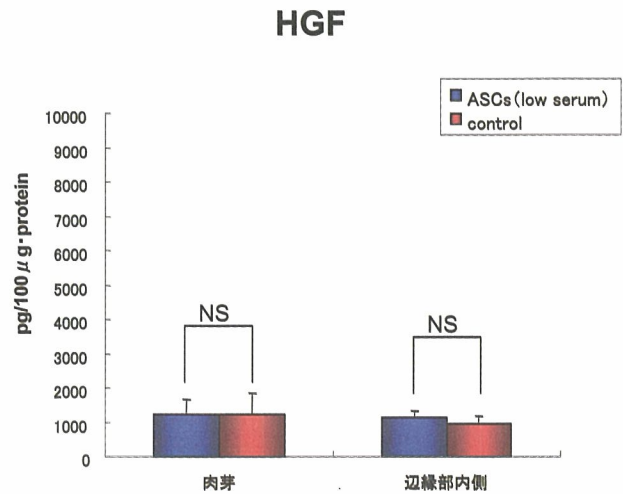
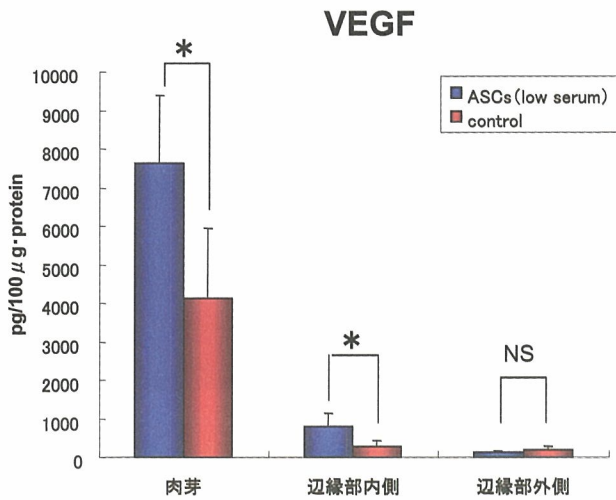
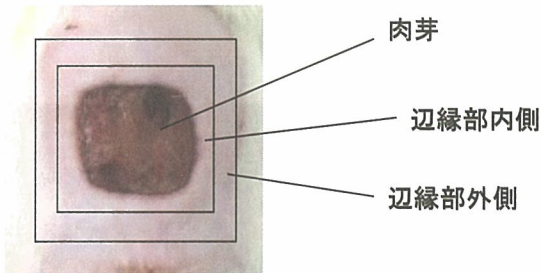


図7

治療後3日目の皮膚組織中のサイトカイン濃度



* p < 0.01

図8

Carboxy-fluorescein diacetate (CFDA) staining

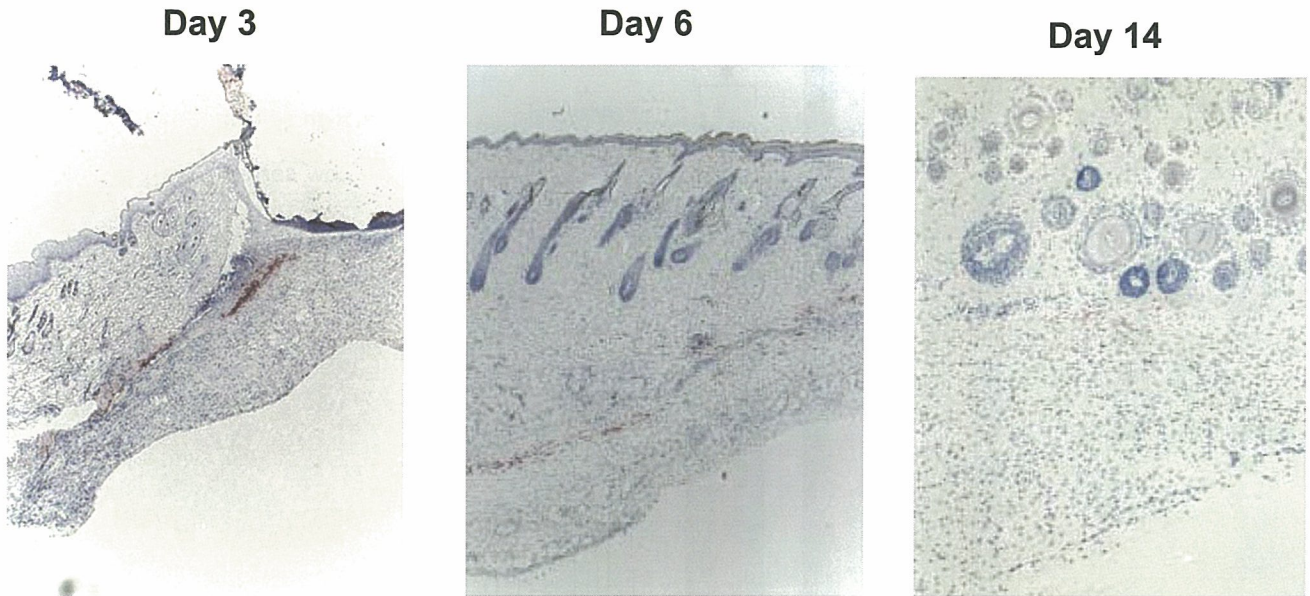


図9

Day 6

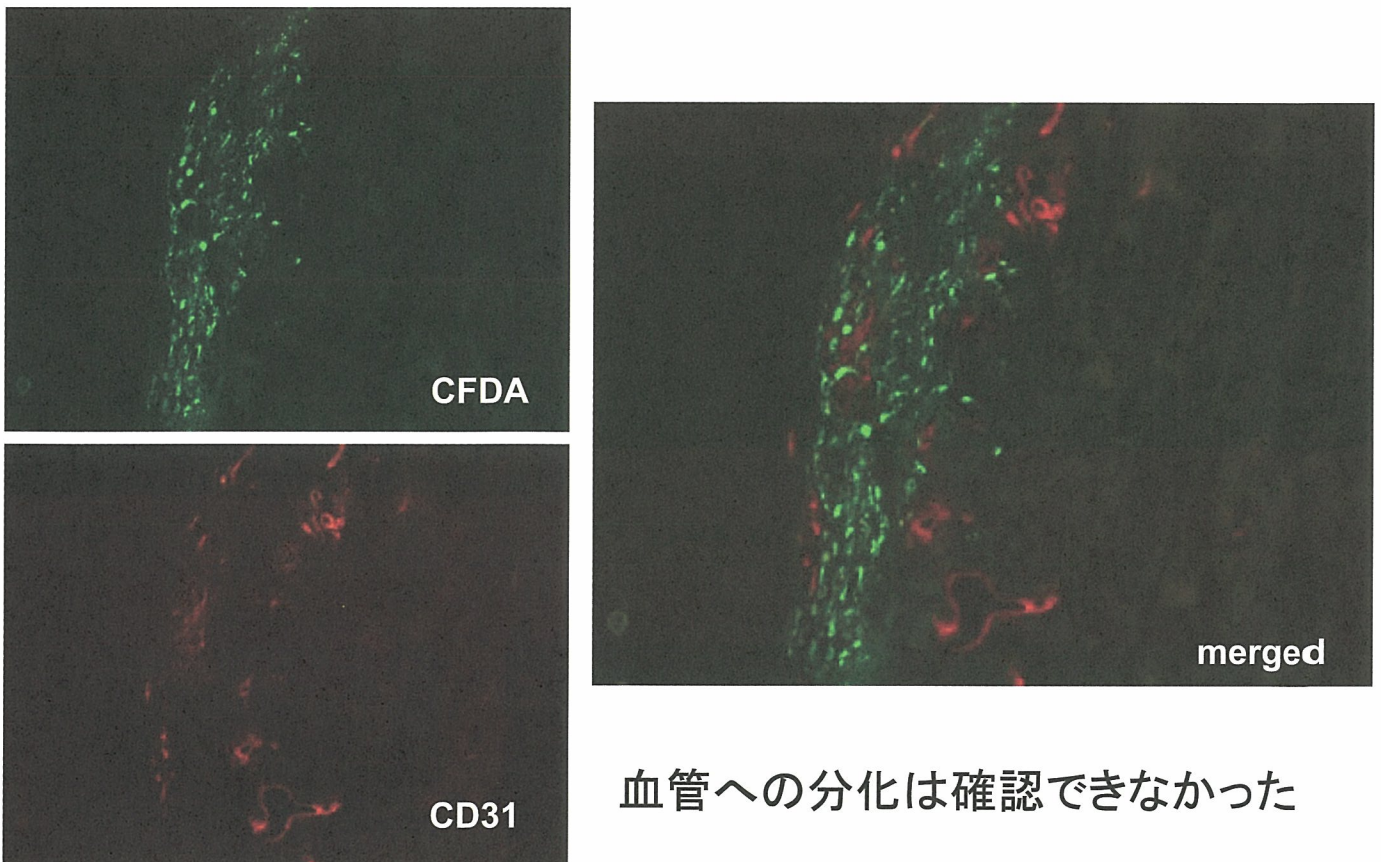


図10

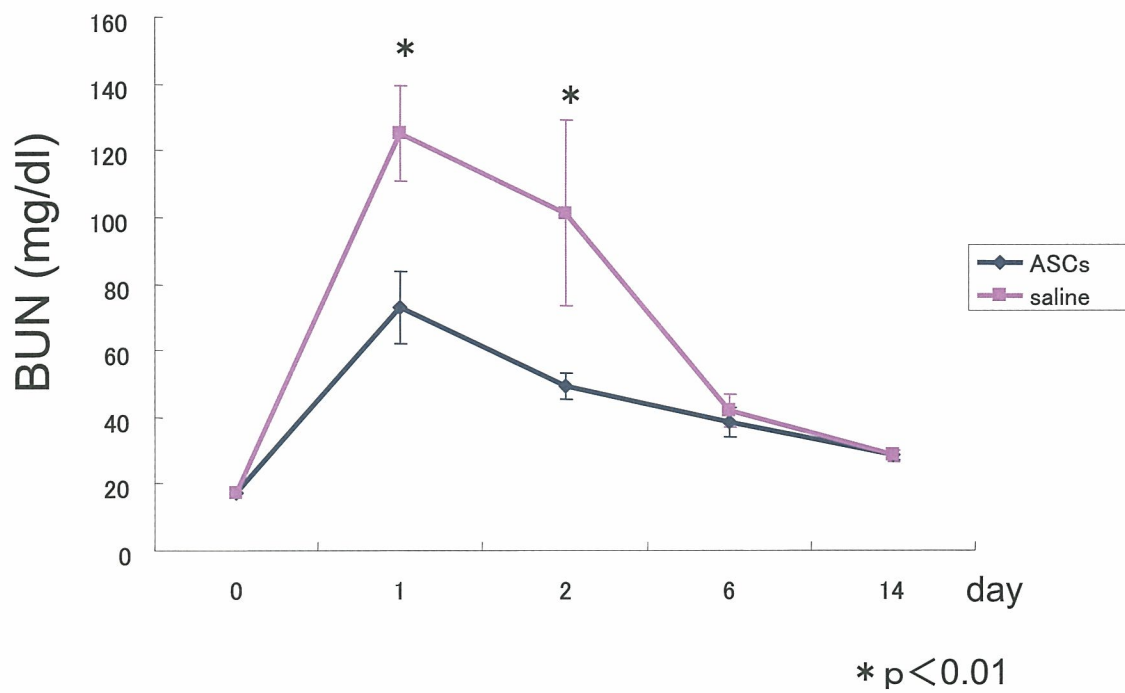


図11

尿細管周囲毛細血管の血流

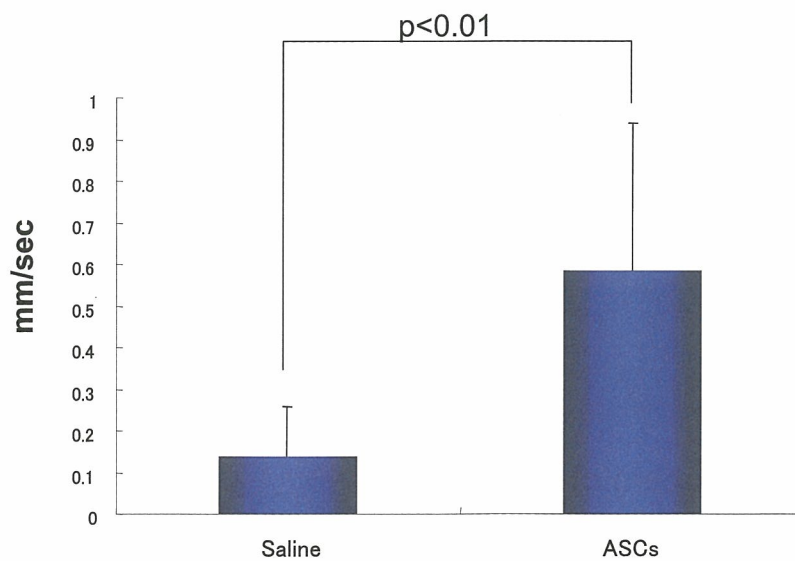
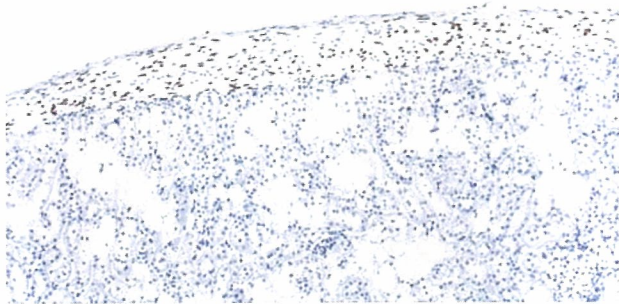
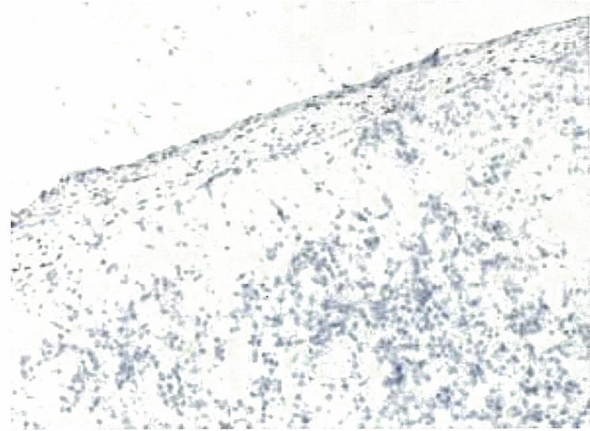


図12

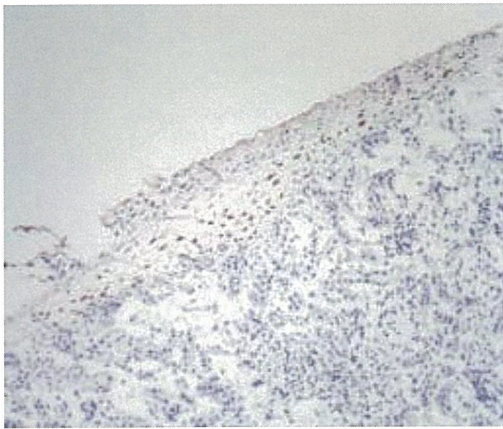
14日



3ヶ月

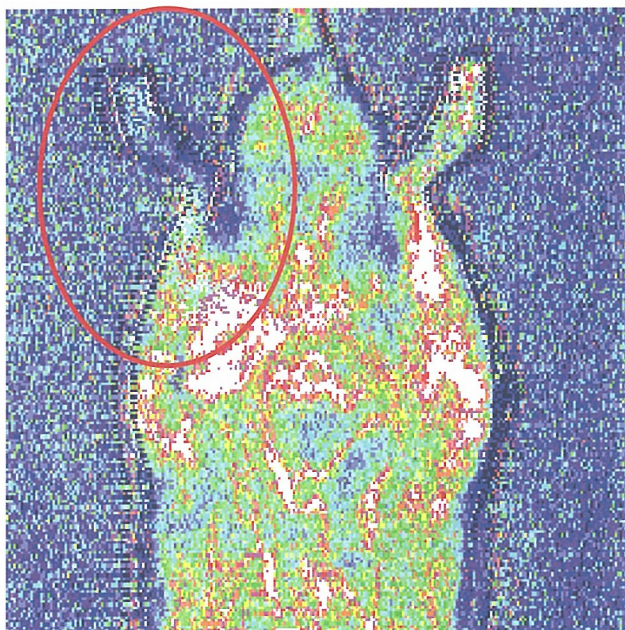


1ヶ月

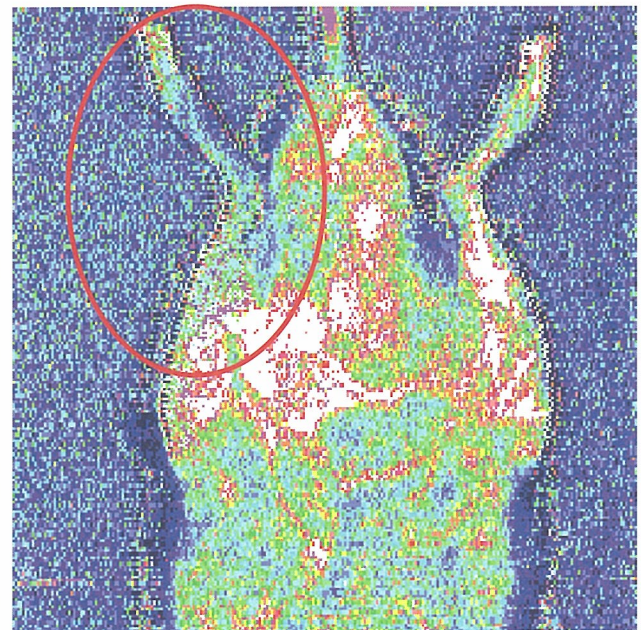


**ASCsは3ヶ月後も腎皮膜下に
残存していた。**

図13-1



Control (ischemic)



RATEC

Laser Doppler