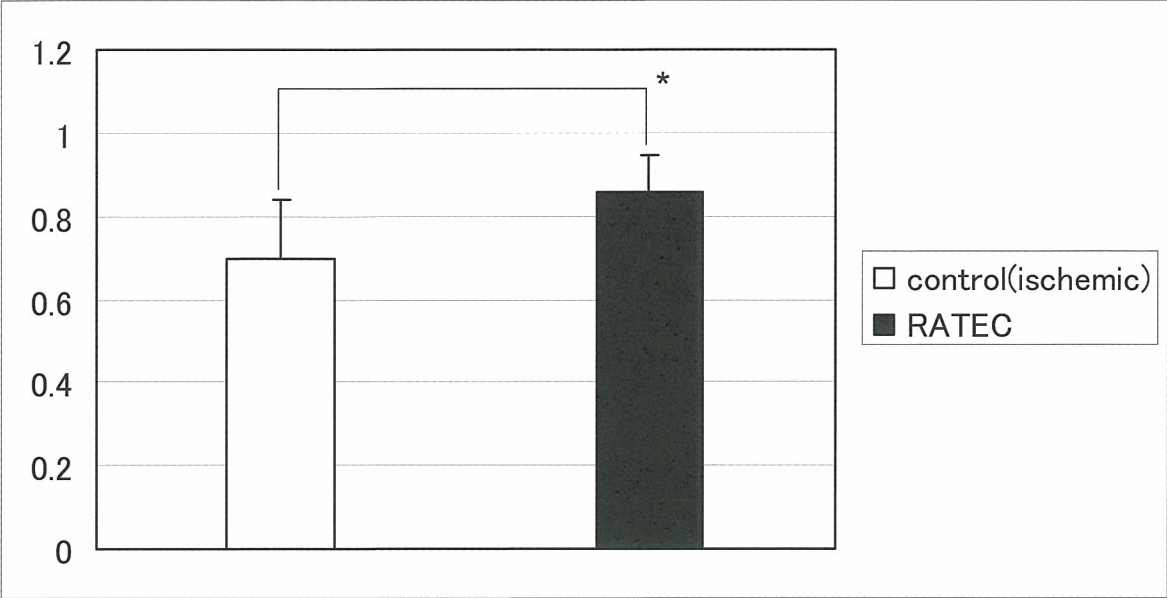


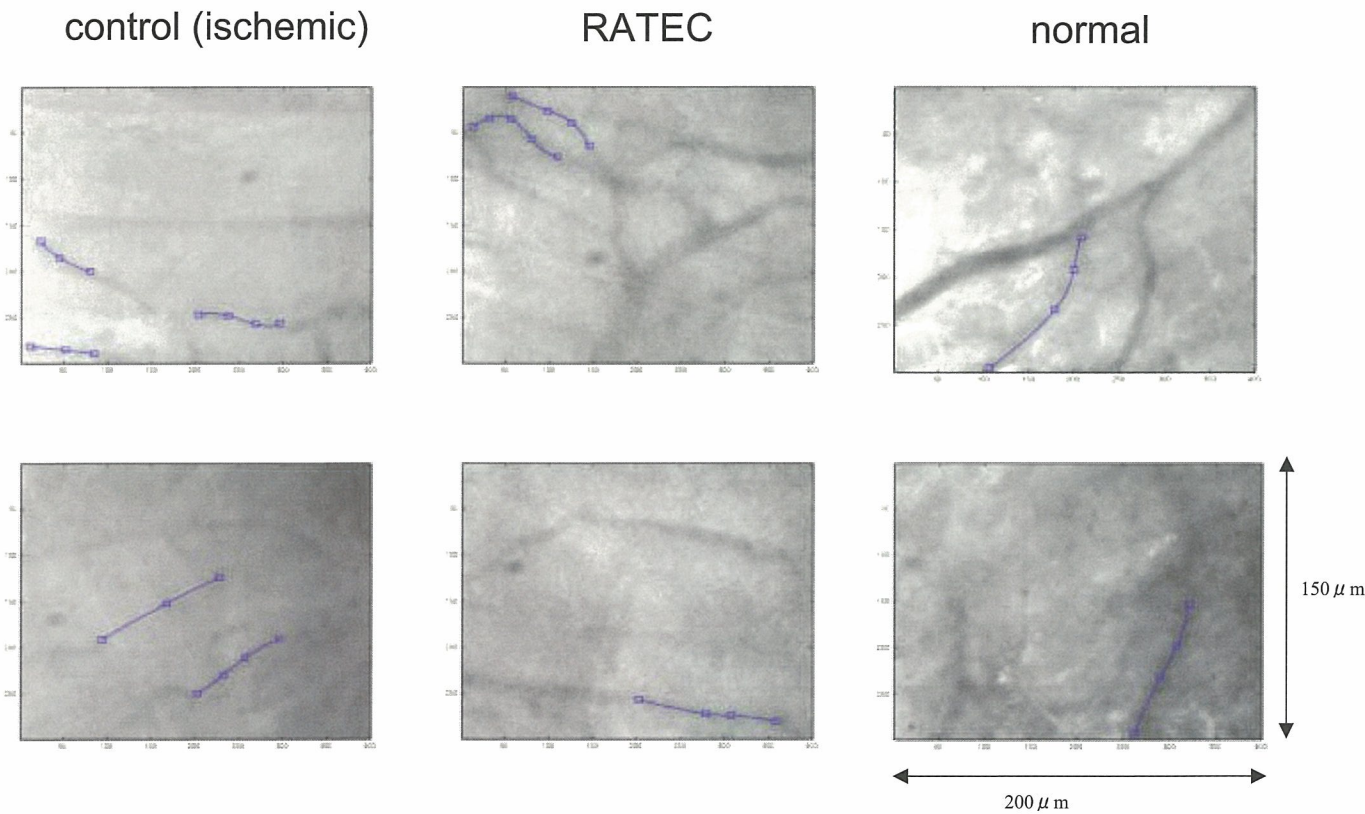
図13-2

Laser Doppler
Ischemia / normal blood perfusion ratio

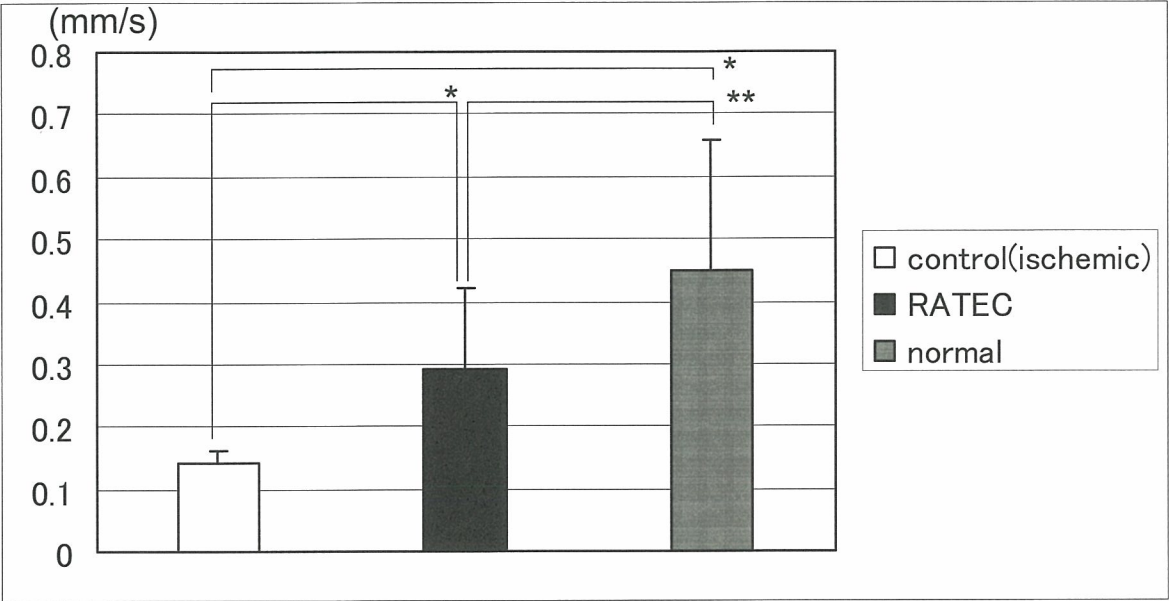


*P=0.04

図14-1

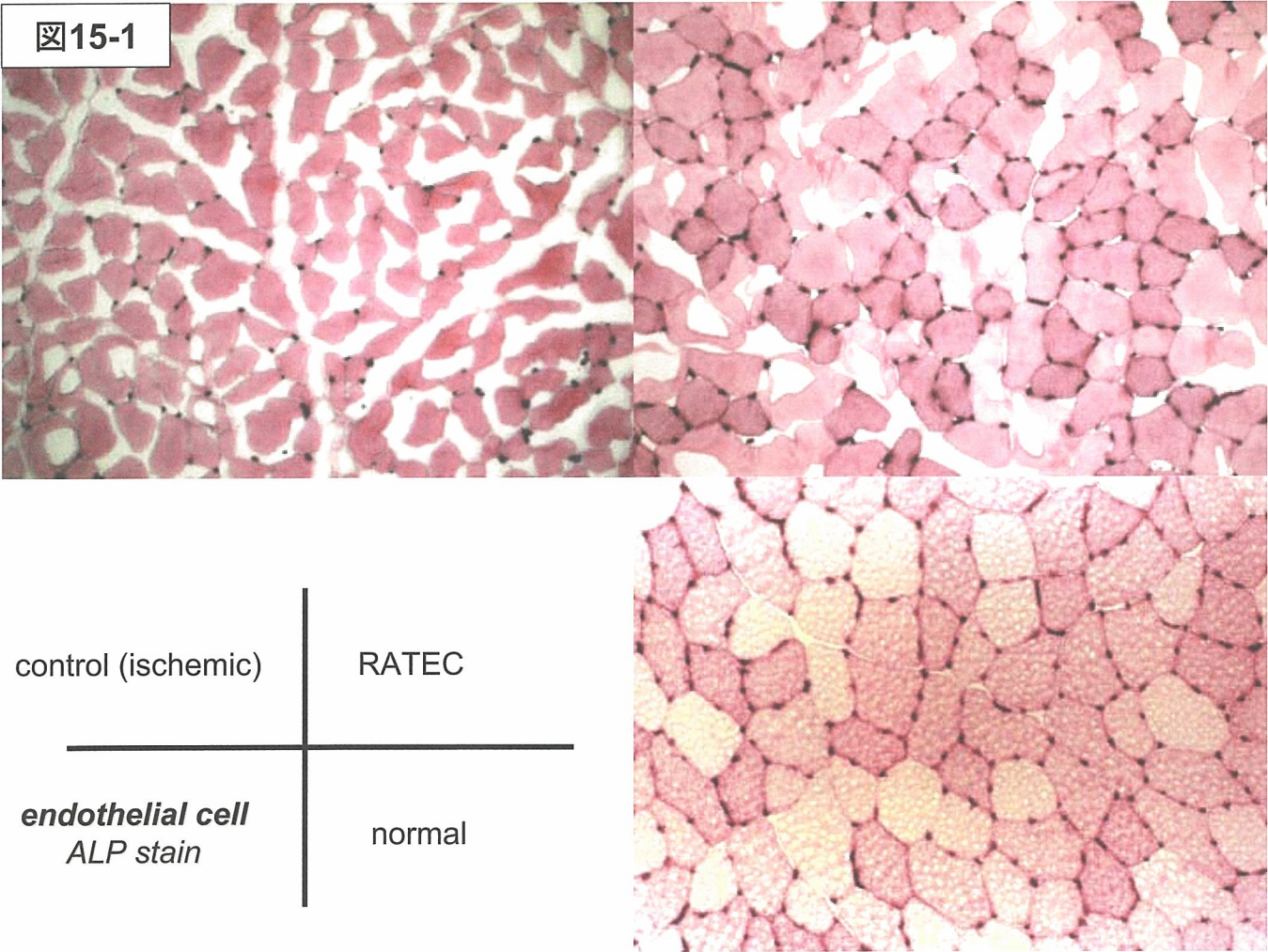


Current velocity of CCD camera

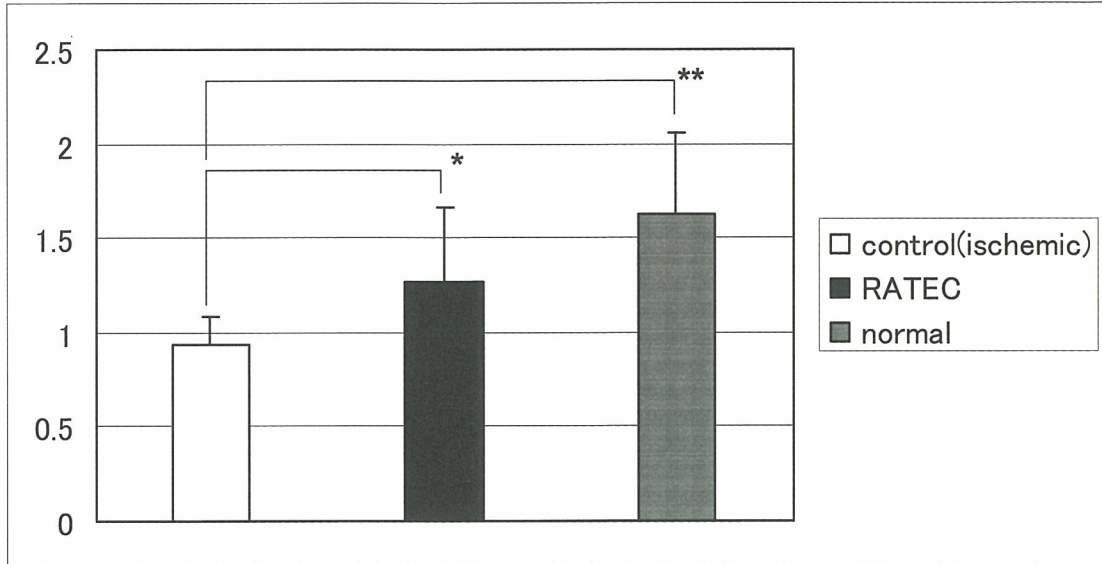


*P<0.01

**P=0.03



ALP stain Capillary / muscle fiber ratio



*P=0.039

**P<0.01

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

組織特異的幹細胞移植に関する研究

分担研究者 榎野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 教授
研究協力者 前島 洋平 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 助手
木野村 賢 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 大学院生
喜多村真治 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学

研究要旨

末期腎不全患者の増加を抑制するためには、慢性腎臓病患者における腎障害の進展を阻止する治療法の開発が必要であり、その観点から腎再生医療が現在注目されている。腎再生に関与する幹細胞の存在部位については、「骨髄由来」「腎組織由来」などの可能性がこれまでに検討されている。我々は成体ラット腎由来腎幹前駆細胞様細胞（rKS56 細胞）を樹立した。本研究にて、rKS56 細胞を急性腎尿細管障害モデルに外因性に投与し、組織修復作用及び腎構成細胞への分化能等に関して検討を行った。

ラット腎虚血再還流急性腎不全モデルを作成し、腎皮質内に rKS56 細胞を投与すると、腎皮髄境界部尿細管に主に生着し、一部の rKS56 細胞は Aquaporin-1 陽性を呈し、近位尿細管上皮細胞への分化が示唆された。また急性尿細管障害の指標である尿中 NAG の増加は rKS56 細胞治療群にて非治療群に比して有意に抑制された (Kitamura, S, FASEB J, 2005)。一方、シスプラチン誘導ラット急性腎不全モデルにて腎被膜下に rKS56 細胞を投与すると、腎被膜下・一部腎皮質に生着し、一部は Aquaporin-1 陽性で近位尿細管上皮細胞への分化が示唆された。また、rKS56 細胞治療群にて皮髄境界部において尿細管組織障害度の改善・尿細管上皮細胞のアポトーシスの抑制・増殖能の亢進作用を認め、腎機能障害 (S-Cr) も有意に改善された。さらに、生着した rKS56 細胞の一部は HGF, c-Met 陽性であった。

ラット急性尿細管障害モデルにおける rKS56 細胞による腎組織修復及び腎機能改善効果が観察され、急性腎不全病態への治療応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

種々の原疾患より慢性腎臓病を呈するが、予後不良例では原疾患の如何にかかわらず末期腎不全に至る。末期腎不全患者における腎機能代替治療として血液透析・腹膜透析・腎移植が現在施行されている。近年の医療技術の進歩により、末期腎不全患者の長期生存が可能となっている一方、本邦における透析人口増加・総医療費における透析医療費の割合の増加が問題となっている。また、血液透析・腹膜透析では腎機能を完全には代償し得ず、また長期透析による心血管合併症等により患者の QOL の維持が問題となる。一方、生体腎移植が主体である本邦では、腎移植に必要なドナー数が不足

しているのが現状である。従って、末期腎不全患者数増加の抑制が腎臓病領域における重要課題であるが、そのためには慢性腎臓病患者における腎障害の進展を阻止する必要があり、その点から腎再生医療が現在注目されている。

腎臓領域での日常臨床の場において、虚血や薬剤に起因する急性腎不全症例がしばしば経験されるが、その多くは一過性の尿細管壊死・腎機能障害に留まり、その後腎組織の自然修復がしばしば観察される。

このような障害腎修復に寄与する可能性のある腎幹細胞の存在の可能性がこれまでに示唆されている。まず、骨髄由来細胞のメサングウム細胞・糸球体内皮細胞・尿細

管上皮細胞への分化が報告されている。一方、生理的狀態では腎幹細胞の細胞周期が slow-cycling であるという特徴がある点や、Hoechst33342 を排出する特徴 (side population) を用いた腎組織幹細胞の分離・同定の検討が報告されている。当科の喜多村らは、腎虚血再環流急性尿細管障害モデルラットにて、BrdU 陽性増殖細胞が腎皮髄境界部に多数観察されることに着目し、腎組織幹細胞の単離を試みた。microdissection 法を用いて腎ネフロン各 segment を単離し、それらを培養した後、outgrow した細胞を段階希釈・培養し、皮髄境界部 (S3 segment) 由来細胞より増殖能の高い細胞 (rKS56) を単離した (Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, et al. FASEB J. 19: 1789, 2005)。

rKS56 細胞は増殖能を有し、長期間にわたる継代培養が可能で、敷石状形態 (cobblestone appearance) を呈し上皮系・間葉系細胞マーカー蛋白並びに腎発生に関与する Pax-2・WT-1・Wnt-4 を発現していた。以上より、rKS56 細胞は腎上皮細胞に由来し、未分化な形質を有するものと思われた。また、異なる培養条件下にて rKS56 細胞の異なるネフロンセグメントへの分化が観察され、多分化能が示唆された。以上の結果より、rKS56 細胞が腎の幹/前駆細胞として作用するものと考えられた。

一般に、組織幹細胞は、組織局所に存在し、生理的な組織構成細胞の脱落時や、臓器が傷害された際の修復・再生に寄与する。

本研究にて我々は、平成 17 年度は、虚血再還流急性腎不全モデルラット・シスプラチン誘導急性腎不全モデルラットを用い、rKS56 細胞を腎被膜下に投与し、障害腎へ

の同細胞の生着と腎機能改善効果を観察した。平成 18 年度は、ラットシスプラチン誘導急性腎不全モデルにおける rKS56 細胞投与による腎機能改善効果について、より詳細な組織学的検討を行い、細胞増殖・アポトーシス等に関する検討を加えた。また、生着した rKS56 細胞に関しても分布、増殖、分化マーカー発現等の解析を加えた。さらに、種々の投与経路による腎機能改善効果の差異に関して検討を加えた。次に、慢性腎不全モデルを作成し、rKS56 細胞を腎皮膜下投与して細胞生着の有無を観察した。

B. 研究方法

(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 Eugene-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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$) 含有培地にてさらに継続培養し、rKS56-LacZ 細胞を樹立した。

(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。

(2-1) Bluo-gal 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 Bluo-gal 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 Bluo-gal (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。

(2-2)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。

(2-3) 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。

Bluo-gal 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。

Blueo-gal 染色後の腎組織のパラフィン切片 (4 μm 厚) を用い、0.1%トリプリン液にて 37°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。Blueo-gal 染色後の腎組織のパラフィン切片 (4 μm 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。

(2-4) 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。Blueo-gal 染色後の腎組織のパラフィン切片 (4 μm 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。

(3) 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 μl 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・Cr・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 blueo-gal 染色により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験施設の定める動物実験倫理規定に基づいて施行した。

C. 研究結果

(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、Blueo-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 Bluo-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、近位尿細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髓境界部の 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。

(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髓境界部での、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)。

(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髓境界部での、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、皮髓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。

(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髓境界部での、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 病日では皮髓境界部の 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、皮髓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) 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。

(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。

(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、bluo-gal 陽性の rKS56-LacZ 細胞の腎内への生着は確認し得なかった。

D. 考察

腎幹細胞の由来として、骨髓、腎組織に存在するという報告がこれまでにあり、細胞移植療法として、造血幹細胞や骨髓幹細胞を用いた検討結果が報告されている。これまでに我々は、腎幹/前駆細胞様細胞と考えられる rKS56 細胞を成体ラット腎より分離し、腎虚血再還流モデルにおける細胞生着、尿細管障害の改善作用を報告した。今回の検討では、rKS56-lacZ 細胞を、シスプラチン誘発急性腎不全モデルラットに投与し、同細胞の生着・分化、尿細管障害と腎機能の改善効果等に関して観察した。

本検討にて、腎被膜下への rKS56-LacZ 細胞の投与により、被膜下のみならず、本実験モデルにおける主要障害部位である皮髓境界部の尿細管にも rKS56-LacZ 細胞の生

着が確認された。被膜下に投与した rKS56-LacZ 細胞がどのような経路を経て皮髓境界部の障害部位に到達し生着したかという点に関しては今後の検討が必要である。また、rKS56-LacZ 細胞を経腎動脈的に投与しても障害部位への生着が観察されなかったことより、血行性ではなく、被膜下より皮髓境界部まで遊走して生着した可能性が示唆された。今後、腎被膜下に投与した rKS56-LacZ 細胞を連日にわたって追跡観察することによる、障害部位への遊走および生着の確認が必要である。

また、rKS-SC 群にて多くの rKS56-LacZ 細胞が被膜下に集簇する像が観察されたが、主として管腔様構造を呈し、AQP-1 陽性であったことから、腎被膜下部位での近位尿細管上皮細胞への分化能が示唆された。一方、rKS-SC 群では腎障害極期において有意な腎機能改善効果を認め、シスプラチン投与にて主として障害される皮髓境界部の尿細管壊死等の減少・尿細管上皮細胞のアポトーシスの抑制・増殖能の亢進作用を認めた。今回の検討では、腎被膜下に比して腎皮質内に生着が確認された rKS56-LacZ 細胞は少数であり、直接的な傷害尿細管部位への生着による修復機序のみでなく、rKS56-LacZ 細胞が腎再生に関与する液性因子を分泌し腎修復に寄与する可能性 (paracrine 機序) が示唆された。これまでに、HGF・BMP-7 等の因子が腎尿細管発生及び障害腎修復/再生作用を有することが報告されているが、我々の今回の検討でも HGF とその受容体 c-Met が腎被膜下に生着した rKS56-LacZ 細胞の一部に発現していた。今後 HGF の発現を mRNA レベルで解析するとともに、その他の腎再生促進因子や受

容体等の rKS56-LacZ 細胞投与腎における発現変化に関しても検討を行う予定である。

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。骨髓由来幹細胞は、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、今回の我々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、尿管上皮細胞再生・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。

現時点では、ラット strain (SD) に起因すると思われる疾患モデル作成上の問題点等もあり、慢性腎不全モデルにおける rKS56-LacZ 細胞の腎内生着は確認し得ていないが、今後抗 GBM 腎炎モデルや他の薬剤

性尿管障害モデル等を用いることにより、検討したいと考えている。

今回、ラットの腎組織幹／前駆細胞を単離・樹立することが可能であったが、同様にヒトで腎幹／前駆細胞を単離し、かつその未分化な形質を保ったまま、維持培養し、治療応用することが今後の臨床応用に向けての検討課題である。

E. 結論

我々が樹立した成体ラット腎由来の腎幹／前駆細胞様細胞 (rKS56 細胞) のシスプラチン誘導ラット急性腎不全モデルへの投与による、腎障害の組織学的・機能的修復効果が観察され、paracrine 機序の関与が示唆された。

腎不全を対象とした再生医療の実現に向けて未だ克服すべき課題は多いが、今後幹細胞移植の有効性・安全性を検証することにより、将来的に臨床応用が可能となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

2. 学会発表

1) 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、槇野博史：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。

2) Kinomura, M, Maeshima, Y, Kitamura, S, Tanabe, K, Ichinose, K, Hirokoshi, K, Takazawa, Y, Kitayama, H, Sugiyama, H, Yamasaki, Y, Sugaya, T and 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.

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

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）

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

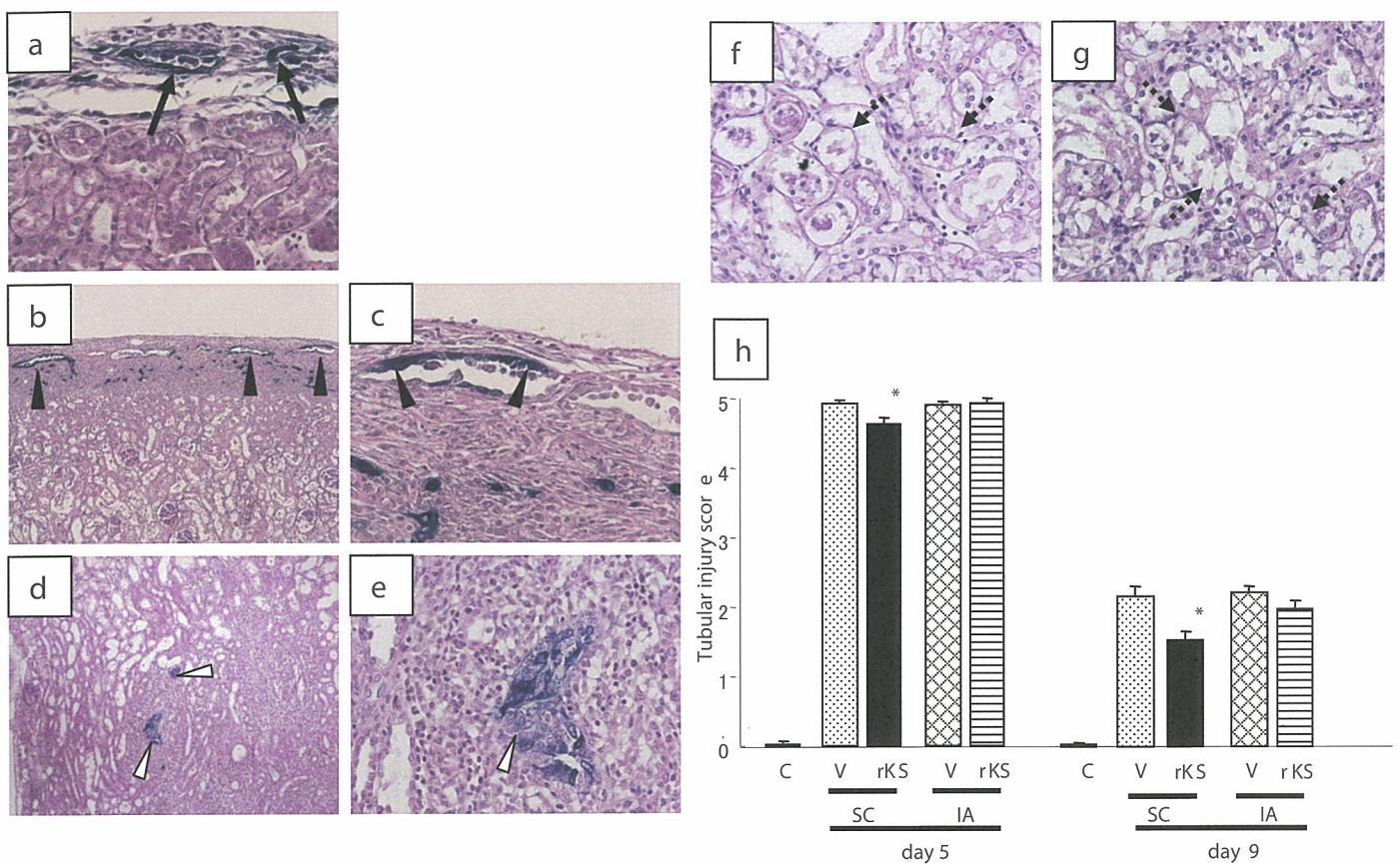


図1:シスプラチン誘導急性腎不全ラットモデルにおける腎被膜下投与後のrKS56-LacZ細胞の分布と急性尿細管障害の軽減効果(PAS染色)。急性腎不全誘導5日目(細胞投与3日)、9日目(細胞投与7日)のblue-gal染色とPAS染色の二重染色像を示す。急性腎不全誘導後5日目では、被膜下にLacZ陽性細胞を認めるのみである(a; ×80)。一方急性腎不全誘導後9日目では、被膜下の領域が肥厚し、LacZ陽性細胞数は増加、一部は管腔様構造を呈した(b; ×80, c; ×400)。また、急性腎不全誘導後9日目にて、一部皮髄境界部にもLacZ陽性細胞を認める(d; ×80, e; ×400)。また急性腎不全誘導後5日目(rKS56-LacZ細胞投与後3日目)では、rKS-SC群(f; ×400)ではV-SC群(g; ×400)に比し、尿細管上皮細胞の脱落(矢印)の減少を認めた。(h)尿細管障害スコアは、急性腎不全誘導5日目・9日目において、rKS-SC群で減少した。rKS-SC: rKS56-LacZ細胞・被膜下投与、rKS-IA: rKS56-LacZ細胞・左腎動脈投与、V-SC: 生食・被膜下投与、V-IA: 生食・左腎動脈投与。

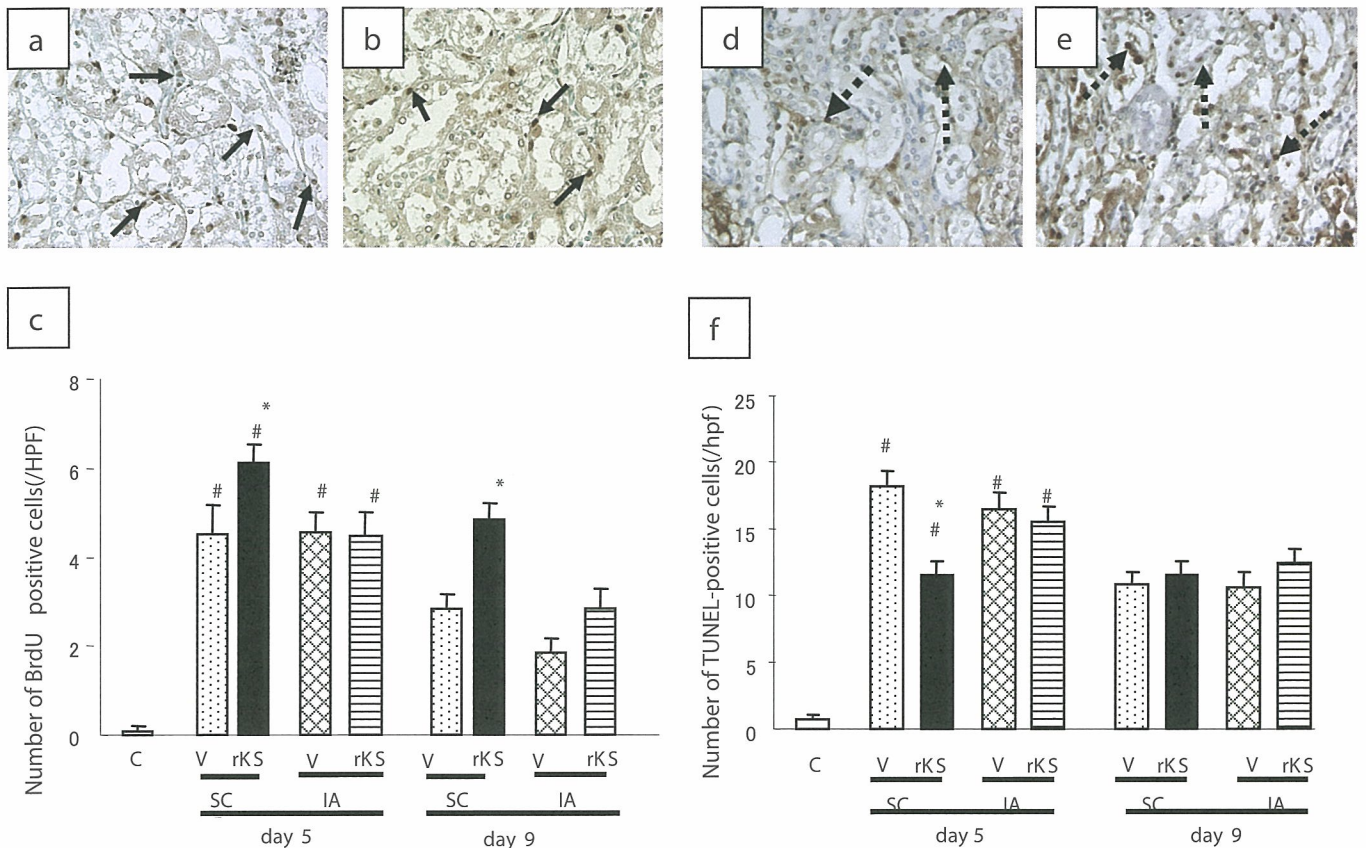


図2: rKS56-LacZ細胞投与による、シスプラチン誘導急性腎不全モデル腎皮髄境界部でのBrdU取り込み増加作用(免疫組織化学)とアポトーシスの抑制作用(TUNEL染色)。急性腎不全誘導後5日目(rKS56-LacZ細胞投与後3日目)では、rKS-SC群(a; × 400)ではV-SC群(b; × 400)に比し、BrdU陽性尿細管細胞(矢印)の増加を認めた。(c) BrdU陽性尿細管細胞数は、急性腎不全誘導後5日・9日目において、rKS-SC群では他群に比して増加した。一方急性腎不全誘導後5日目(rKS56-LacZ細胞投与後3日目)では、rKS-SC群(a; × 400)ではV-SC群(b; × 400)に比し、TUNEL染色陽性尿細管細胞(矢印)の減少を認めた。(c) TUNEL染色陽性尿細管細胞数は、急性腎不全誘導後5日目において、rKS-SC群では他群と比し減少した。rKS-SC: rKS56-LacZ細胞・被膜下投与、rKS -IA: rKS56-LacZ細胞・左腎動脈投与、V-SC: 生食・被膜下投与、V-IA: 生食・左腎動脈投与。

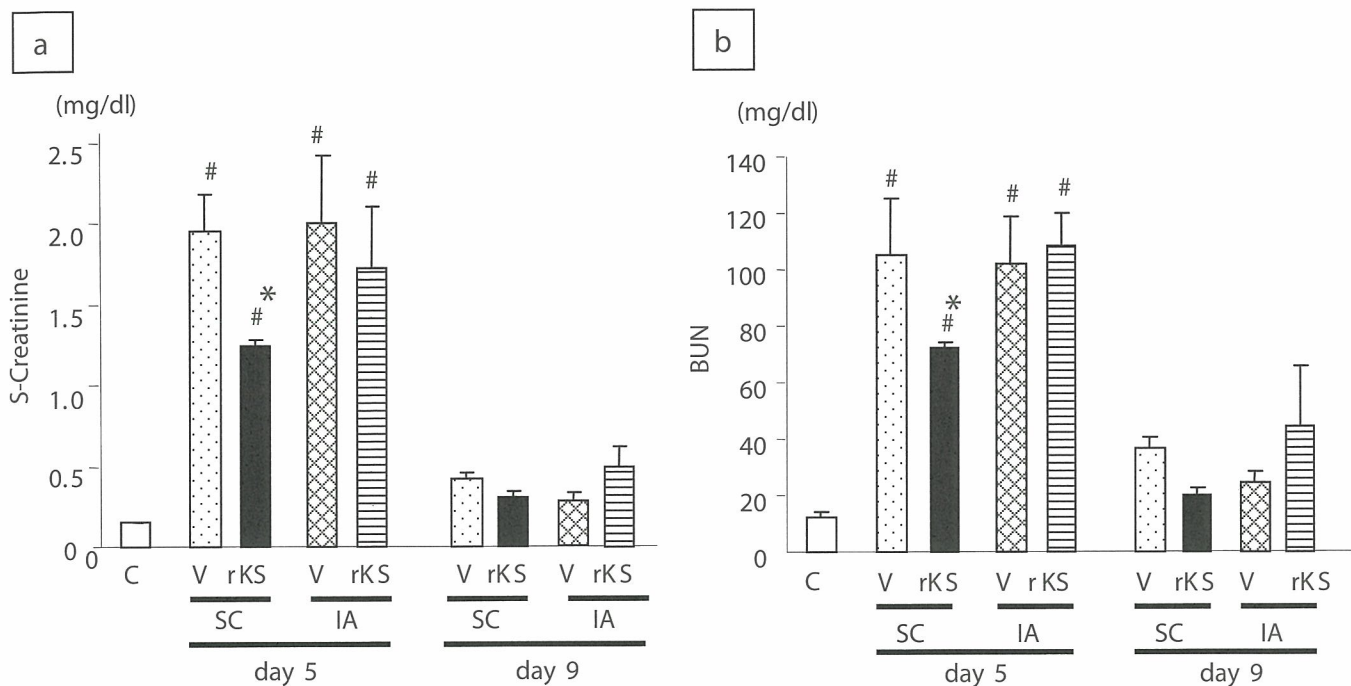


図3: rKS56-LacZ細胞治療による腎機能(BUN・Cr)の改善効果。 rKS-SC群にて血清クレアチニン(a)と尿素窒素(b)の有意な改善効果を認めた(day 5)。Day 5: シスプラチン投与後5日目(rKS56-LacZ細胞投与後3日目)。Day9: シスプラチン投与後9日目(rKS56-LacZ細胞投与後7日目) rKS-SC: rKS56-LacZ細胞・被膜下投与、rKS-IA: rKS56-LacZ細胞・左腎動脈投与、V-SC: 生食・被膜下投与、V-IA: 生食・左腎動脈投与。

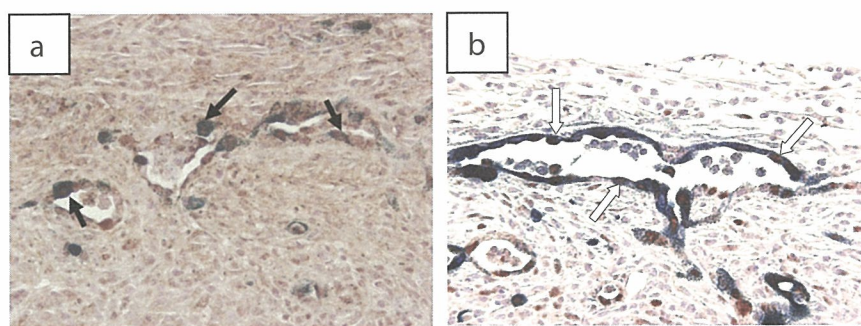


図4: 生着したrKS56-LacZ細胞におけるHGF及びc-Met発現。 急性腎不全誘導後9日目(rKS56-LacZ細胞投与後7日目)で認めた、管腔様構造を呈するLacZ陽性細胞は、一部HGF(a; ×400)・c-Met(b; ×400)陽性であった。

分担研究者 野入 英世 東京大学医学部附属病院 血液浄化療法部 講師
研究協力者 根岸 康介 東京大学医学部・大学院医学系研究科内科学 大学院生
研究協力者 前田 るい 東京大学 21世紀COEプログラム
「動的分子論に立脚したフロンティア基礎化学」 技術員

研究要旨

髄質外層部の尿細管上皮細胞は、急性腎不全や進行性腎障害における間質性腎障害の病態を形成する中心的細胞群である。腎尿細管上皮特異的幹細胞移植による効果検討として、昨年度はマウス尿細管上皮特異的幹細胞（mProx-SP）の腎被膜下投与により、シスプラチン（CDDP）での致死性急性腎不全による自然経過（腎死）の有意な改善を確認した。今年度は、まず mProx-SP の Characterization を行った。種々の表面抗原、蛋白発現解析を実施し、Pax-2 が安定的に発現することを確認した。また、in vitro での CDDP 刺激において mProx-SP が mProx に比べて有意に障害抵抗性を示し、継代回数を重ねると CDDP に対する障害抵抗性が減弱することも確認した。継代回数の少ない mProx-SP 移植で一部の移植細胞の尿細管上皮への生着と、有意な尿細管壊死の軽減が得られたが、継代を重ねた mProx-SP は生存率を有意に改善し得なかった。以上より、CDDP に対する障害抵抗性が上皮由来幹細胞の標準化評価系として機能させることができると考えられる。

そして、予備的検討として重度の薬剤性慢性腎障害モデルへの mProx-SP 腎被膜下移植を試みたが、本モデル腎では被膜と腎実質との強固な結合のため被膜下領域への細胞移植が困難であり、腎機能、組織学的にも mProx-SP 移植群での大幅な改善は認められなかった。今後は移植細胞の品質管理や投与経路について特に検討していく必要がある。

A. 研究目的

上皮系幹細胞移植の臨床応用に向けての候補細胞群は、cell processing によって focus を絞り込む作業を繰り返しながら、characterization を順次実施していく必要がある。そしてまた、選別されて得られた上皮系幹細胞に富んだ細胞群は、実際に組織障害修復に効果を発揮しうる可能性があるかどうかを検討することが必須である。

本研究では、Cell Processing Team によって確立されつつある標準化プロトコルで採取した上皮系幹/前駆細胞を用いた腎障害への細胞移植の治療効果について検討している。昨年度はまずマウス尿細管上皮由来幹/前駆細胞（mProx-SP）について、フローサイトメーター（FACS）を用いた解析で、cell processing により変化を受けるマ

ーカーを検出する試みを行ない、Antimycin 投与での ATP 枯渇による酸化ストレスでは、mProx-SP における Kim-1 の発現が低下することを確認した。また、mProx-SP の腎被膜下投与により、腎虚血再灌流障害モデルでの有意な腎機能低下の軽減だけでなく、シスプラチン（CDDP）での致死性急性腎不全においても自然経過（腎死）の有意な改善を確認した。今年度は CDDP による急性腎不全モデルへの mProx-SP の腎被膜下投与時の組織学的検討の継続、移植細胞の標準化評価系としての表面抗原・蛋白発現の解析と CDDP に対する反応性を利用した in vitro assay の検討、及び慢性腎障害モデルでの mProx-SP の腎被膜下投与の効果検討を行なうこととした。

B. 研究方法

(1) 移植細胞

C57BL/6J の腎 microdissection により得られた近位尿細管上皮細胞 (以下 mProx) を 37℃ 5%CO₂ 条件下に 10% FBS 添加 DMEM/F-12HAM で培養し、20~30 回継代したものを使用した。

また、神戸理研において mProx の Side Population (SP) 分画より cell sorter で分離された尿細管上皮幹/前駆細胞 (mProx-SP) を樹立。間葉系上皮細胞の培養上清を添加した K-1 medium で培養しながら、single cell sorting を複数回繰り返して純化した細胞群を使用した。細胞注入に際して、一部蛍光標識を行った。

(2) RT-PCR

mProx、mProx-SP それぞれ TRIzol (Invitrogen) を使用してプロトコルに従って RNA を得た。Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いて cDNA とし、RT-PCR を行ったのち、泳動して各サンプルでの発現を評価した。

使用したプライマーは G3PDH: Forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA-3', Reverse 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3', Stathmin1: Forward 5'-gcatcc tgatattcag gtg-3', Reverse 3'-cttgccttctctcgcaagc-5', Pax-2: Forward 5'-gaagctctgg atcgagtctt-3', Reverse 3'-gaatctccaagcctcattgta-5' である。

(3) ウェスタンブロット

RIPA バッファで処理後、サンプルの一部は蛋白量測定に使用し、同量を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜にトランスファーした。5%BSA でブロッキングののち、各抗体を一晩インキュベートし、二次抗体と反応後 ECL plus (Amersham) を使用し、

LAS-1000 (FUJIFILM) で検出し、解析を行った。

(4) シスプラチンによる細胞障害性の比較

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。

(5) マウス

本研究では、田辺 RDS より 8~15 週齢雄の C57BL/6J 野生型および EGFP-ヒト L-FABP 遺伝子発現マウスを搬入し、一週間の予備飼育後に実験モデルを適用した。

(6) シスプラチン誘発急性腎不全

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を発症することがわかっている。そこで、C57BL/6J 雄の野生型マウスにシスプラチン 15mg/kg (溶液総量 60ml/kg) を腹腔内投与し、24 時間後に塩酸ケタミン 30mg/kg とキシラジン 8mg/kg の腹腔内投与により麻酔した。左背部を切開し、左腎を露出した。5.0 $\times 10^5$ 個に調整した CMRA 標識 mProx-SP、または 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。DMEM（陽性対照）群には DMEM を被膜下投与し、Control（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 を左腎に被膜下投与した。シスプラチン投与 48 時間後、72 時間後に生理食塩水 60ml/kg を腹腔内投与した。3 日目 (Day3)、5 日目 (Day5) に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

（7）組織学的検討

腎組織は、10%緩衝ホルマリン溶液により 36 時間固定後、パラフィン包埋し、組織切片を 3 μ m に薄切して、蛍光顕微鏡下に移植細胞の局在を直接的に検討した。

（8）血清尿素窒素（BUN）

尿素窒素 B テストワコー（和光純薬）を用い、プロトコルに従って測定した。JMP 5.1J (SAS Institute, Cary, NC) を用いて統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

（倫理面への配慮）

動物実験は、全て東京大学医学部・大学院医学系研究科の動物実験に関する倫理規定に準拠し、医学系研究科附属疾患生命工学センター動物次元研究領域当 SPF エリアで隔離飼育され、同委員会で承認されたプロトコル（承認番号 1520T047）及び遺伝子組み換え生物等の第二種使用等拡散防止措置の承認（承認番号 45）をうけて実施されている。

C. 研究結果

（1）mProx, mProx-SP での Pax-2, Stathmin の発現

発生段階での発現亢進が知られている転

写因子の一つである Pax-2 について検討したところ、mProx-SP では mRNA、蛋白の発現がそれぞれ RT-PCR、ウェスタンブロットにより確認されたが、mProx では認められなかった（図 2 A, B）。一方、Stathmin の発現は mRNA, 蛋白ともに両方で明らかな発現の差は見られなかった。

（2）シスプラチンによる細胞障害性の比較

Alamar Blue Assay によってシスプラチンで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。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。

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た（図 3 C）、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 3 D）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。

(3) シスプラチン誘発急性腎不全

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 $\pm$ 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 4 B, 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

マウス近位尿細管細胞由来の細胞株 mProx は、cell processing によって dorm formation を有し (図 1 A)、長期培養にかなり耐える表現型を有するようになった (mProx-SP)。これらの細胞では、Sca-1 の発現はほぼ 100%に検出されるようになり、

Kim-1、CD34 陽性細胞数も増加すること、更に c-kit 陽性細胞数は少数であるものの、mProx-SP では発現量が cell processing を受けていない野生型 (mProx) に比べて高率であることを昨年度に報告している。そして、長期間の培養の経過で図 1 B のような敷石状の形態を一部に示し、やがて野生型とほぼ同様の紡錘状を呈することが確認されている。

今年度では、腎臓発生段階での発現亢進が知られている転写因子の一つである Pax-2 について検討したところ、mProx-SP では mRNA、蛋白の発現がそれぞれ RT-PCR、ウェスタンブロットにより確認されたが、mProx では認められなかった (図 2 A, B)。今後、CDDP などの障害惹起の際の発現についても解析を進めていく予定である。

次に、*in vitro*において CDDP 刺激での細胞障害性の影響を比較したところ、mProx-SP では mProx に比べて著明な細胞増殖抑制の軽減 (図 3 A) と、細胞毒性を示す LDH 放出量の著しい抑制が確認された (図 3 B)。ただし、この細胞障害抵抗性は 13 回までの継代回数までは保たれていたものの、17 回では mProx とほぼ同レベルまで減弱してきており (図 3 C、CDDP $10 \mu\text{M}$, 20 時間共培養での結果を比較)、mProx との相対比でも 150~200%程度から 110%程度までに低下していた。

今年度までに行った典型的な CDDP による急性腎不全モデルへの mProx-SP 移植の結果を表 1 にまとめた。3 日目までは全例生存しており、3 日目の BUN と 7 日目までの生存率で比較したところ、継代回数が 8 回までの mProx-SP 投与時には BUN 上昇の低減や生存率の改善が有意に示されたが、継代

回数 21 回の mProx-SP を移植した際にはい
ずれも有意な改善が得られなかった。この
結果は *in vitro* study での mProx-SP の
CDDP に対する障害抵抗性が減弱していた所
見が *in vivo* への投与結果に反映されてい
ると考えても矛盾しない。*in vitro* study
での mProx-SP の CDDP に対する障害抵抗性
を細胞の標準化評価系として適用すること
で、*in vivo* への細胞治療の確実性をより
向上させることが可能と考えられる。

今年度、予備的検討として行った重度のマ
ウス薬剤性慢性腎障害モデルにおいて
mProx-SP の被膜下投与を試みたが、BUN や
腎組織の線維化などにおいて明らかな改善
効果は認めなかった。詳細については現在
解析中であるが、有効性が得られなかった
主な原因として、慢性腎障害が明かに成立
してしまったマウス腎被膜は、正常時や急
性腎不全初期と異なり、被膜と腎実質との
結合が強く、被膜下の空間に細胞や vehicle
を注入することそのものが困難であったこ
とが挙げられる。これは、臨床的にも腎生
検時に、CKD の進行症例で生検針が被膜を
貫通しにくいことなどでしばしば経験する
ことに合致している。つまり、被膜下投与
に関して、従来の方法では CKD 進行症例例
えば 4 期以上には対応できない可能性が高
く、CKD の 3 期程度までの症例に相当する
CKD モデル；即ち治療介入により改善の余
地が見込める病態で今後その投与方法につ
いて検討する必要がある。FDA の Critical
Path Initiative では、ヒトでの創薬を視
野に入れた適切な動物モデルの確立が謳わ
れており、腎疾患領域ではこの点での研究
が遅れている。

本年度の研究では、cell processing によ

り得られたマウス腎皮質尿細管由来上皮系
幹細胞の characterization を一部行ない、
CDDP に対する障害抵抗性を標準化評価系
の一つとして有用な指標になり得ることを確
認した。また、マウス急性腎障害モデルへ
の移植実験を実施し、組織学的にも尿細管
障害が改善し、一部尿細管への生着も示さ
れた。次年度ではここで確立しつつある手
法をもとに、免疫不全マウスを用いてヒト
腎皮質尿細管由来上皮系幹細胞での移植実
験を行う予定である。同時に、投与方法や
CKD モデルを再度検討の上、マウス慢性腎
障害モデルへの移植実験を実施する予定で
ある。

E. 結論

マウス急性腎障害の疾患モデルに対する
腎尿細管上皮系幹細胞移植治療効果につ
いて検討した。移植用細胞の純化プロセス、
移植前の確認プロセスとして有用な手順の
標準化がほぼ確立しつつあると考えられた。

細胞移植治療は、マウス急性腎不全レ
ベルでは生存率に効果を発揮しうる改善率を
示した。ヒト腎尿細管上皮系幹細胞におけ
る同様の手順・効果を詳細に検討すること
が臨床応用に向けて必須と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 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