

200706009A

厚生労働科学研究費補助金

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大島 伸一

平成20 (2008) 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	37
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?	45
室原豊明	
3. イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する臍型自己脂肪植え込み併用尿細管上皮前駆細胞治療の試みと臨床治療を見据えた腎細胞癌の腎動脈一時遮断症例における分腎機能の評価	50
後藤百万, 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	55
松尾清一	
5. 組織特異的幹細胞移植に関する研究	71
槇野博史	
(財) ヒューマンサイエンス振興財団ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業	
[外国への日本人研究者派遣事業] 特別報告 喜多村真治	80
6. 組織特異的幹細胞移植に関する研究	85
野入英世	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95
IV. 研究成果の刊行物・別刷	98

厚生労働科学研究費補助金（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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）

総括研究報告書

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

後藤 百万 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学教授

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 名古屋大学医学部附属病院泌尿器科講師

槇野 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血液浄化療法部准教授

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。本研究班では移植細胞別に3つのチームが連携を図って研究を進めている。

3年目（1）骨髄末梢血間葉系幹細胞チームは、Stromal Vascular Fraction（SVF）に関して、吸引脂肪から治療に必要な十分量のSVFが得られること、SVFを腎被膜下に注入することで腎不全動物モデルの腎機能が改善することを明らかにした。低血清培養脂肪組織由来間葉系幹/前駆細胞に関して、優れた増殖能を持つため、比較的短期間で実用化に十分な細胞量となること、細胞・組織保護作用をもつサイトカインを多く分泌し、その分泌能は分裂回数が増えても低下しないこと、動物での治療実験で優れた効果を認めることが明らかになった。骨髄末梢血幹細胞に関しては、従来の細胞治療メカニズムとは異なる機序が腎疾患で働いている可能性が示唆され治療効果がみられなかった。（2）上皮系幹細胞チームは、成体ラット腎由来の腎幹/前駆細胞様細胞（rKS56細胞、特許取得）の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た。また、rKS56細胞は3次元培養においての組織構築能が認められ、臓器構築能がある可能性が示唆された。マウス腎近位尿細管上皮由来幹/前駆細胞（mProx24、特許出願済）の移植治療効果を高めるために必要な、移植用SP細胞の純化プロセス、移植細胞のバリデーションに有用な手順の標準化が確立できた。（3）セルプロセッシングチームはヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から単離した腎幹/前駆細胞の樹立数と培養効率を大幅に向上させた。ヒト由来腎組織特異的幹/前駆細胞の単離と、その培養中の癌化リスクを評価しうる複数のバイオマーカーの検出系を確立した。イヌの尿中落下細胞を細胞移植（全43例）し、イヌ急性腎疾患に対する4週後の細胞の生着、BUN、血清クレアチニンによる腎機能の改善効果が確認できた。

A. 研究目的

昨年（2007年）、新健診項目から一時検尿が除外されるなど、医療保険制度の観点からは、腎疾患に関するエビデンスの確立が不十分と認識されている懸念があり、今後、慢性

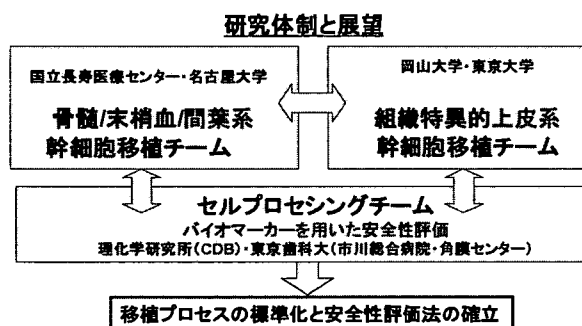
腎臓病（CKD）克服に向けたより早期からの診断・治療戦略の重要性が高まっている。一方、我が国の透析患者数は27万人を突破し、なお直線的に増加し続けており、透析医療費を含む慢性腎不全治療が我が国の医療財政

に与える影響は多大なものとなっている。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、自家細胞移植により重症化を防止する革新的医療技術の開発は透析、腎移植と異なる選択肢を提供しうるものとして期待されている。

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、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) ヒト尿中バイオマーカーを用いたヒト腎組織特異的幹／前駆細胞培養の効率化

これまでにヒト生体腎移植直後の初尿中に腎組織特異的腎幹／前駆細胞が豊富に含まれることを見出したため、培養を効率化する尿中バイオマーカーの探索と、そのカットオフ値の設定を試みた。同時に、移植直後の尿細管周囲の微小循環血流測定を行うことにより、尿中バイオマーカーと腎生理学的機能との関連についても検討した。

(1-2) ヒト尿中落下細胞の培養

上記にて確立したヒト尿中落下細胞の効率的な培養法に従い、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 24 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。

(1-3) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

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、昨年度同様、解析した。

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。

(1-4) ヒト尿中落下細胞の安全性評価

上記のごとく樹立されたヒト尿中落下細胞由来の腎特異的幹/前駆細胞に関して、細胞培養の過程で癌化等の安全性評価を行う際に適したバイオマーカーの探索を行った。

(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

昨年に引き続き、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19例(累計27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10例(累計16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

(a) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する自家尿中落下細胞移植

ヒト同様、虚血再灌流後の尿中落下細胞から尿細管上皮前駆細胞を4週間培養した。細胞採取した同じイヌについて、右腎動脈を露出、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。

(b) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する臍型自己脂肪植え込み併用尿細管上皮前駆細胞治療

昨年までの検討で、細胞注入による侵襲と出血により強い線維化が起こることが問題となっている。そこで、ヒト腎癌部分摘出時に施行される自己内臓脂肪による止血手技をイヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対しても取り入れた。自己内臓脂肪を約1g採取し、腎臓皮膜を約1cm切開し、その脂肪細胞を皮膜下に埋め込み3-0バイクリルで皮膜と脂肪を縫合した。(a)と同様、蛍光色素で尿細管上皮前駆細胞をマーカース、腎臓上極、中央、下極の3カ所に3分割して注入した。

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。

(a) Protocol 1

Wistar rat (6-8wks, male)を以下の4群にランダムに分けた。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、108個とし、BM-MSCsは、当初は、108個を目標としていたが、必要数が培養から得られなかったため106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。

(b) Protocol 2

F344/N rat (6-8wks, male)を以下の4群にランダムに分けた。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107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。

(c) Protocol 3

F344/N rat (6-8wks, male)を以下の3群にランダムに分けた。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 107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。

(3-2) 磁性ナノ粒子(magnetic nanoparticles)を用いたヒト骨髓由来間葉

系幹細胞シート(hMSC細胞シート)による治療検討

(a) hMSC細胞シートの作製

カチオニックリポソーム(Cationic Liposome)に磁性ナノ粒子であるマグネタイト(Fe₃O₄)を包埋した正電荷脂質包埋型マグネトリポソーム(Magnetite Cationic Liposome; MCL)を添加することにより、hMSCを磁気ラベルした。超低接着性の培養dishに2×10⁶個のMCLを包埋したhMSCを播種し、円柱磁石を培養皿底面に設置して24時間培養することでhMSC細胞シートを作製した。

(b) hMSC細胞シートの評価

細胞シートの断面を標本とし、ヘマトキシリン・エオジン染色、PCNA染色、TUNEL染色を行なった。細胞間Gap junctionの形成をみるため、connexin43の免疫染色を行なった。

(c) Cisplatin腎障害に対するhMSC細胞シートの移植

F344/N nude rat (8-9wks, male)に対し、Cisplatin 8mg/kgの単回皮下投与を行なった。Cisplatin投与1日後、後腹膜よりapproachし、腎被膜の外側にhMSC細胞シートを移植した。Control群はshamとした。Cisplatin投与3, 5, 8日後に血清クレアチニン、BUN値の測定、8日後に蛋白尿、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) Stromal Vascular Fraction ; SVF

(a) 吸引脂肪からのSVFの採取方法の確立およびSVFの量・性質の検討

ヒトの皮下吸引脂肪を採取し、臨床応用に十分な数のSVFの採取が可能かどうかを検討した。またFACSにて表面マーカーの解析を行ない、培養時のサイトカイン分泌能につき検討した。また凍結保存時の可能性につき検討

するため凍結SVFのviabilityを調べるため増殖速度、CD34陽性率、サイトカイン分泌に関して検討した。

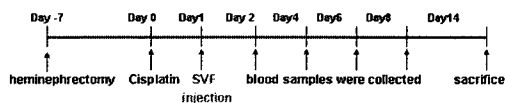
(b) 腎不全動物モデルでの治療効果の検討
ラットシスプラチン腎症モデルをラット皮下にシスプラチン 7mg/kg 注射する事により作成しSVFを 1×10^6 の6乗個を被膜下に注入し腎機能を評価した。

Methods

Treatment of cisplatin nephropathy by rat SVF

<Protocol>

F344 Rat 8 week-old male
day-7 heminephrectomy
day0 cisplatin(7mg/kg) was injected subcutaneously.
day1 SVF(1×10^6) were administrated into subcapsular of the kidney.
day0, 2, 4, 6, 8, 14
Blood samples were collected.



(4-2) 低血清培養脂肪組織由来間葉系幹/前駆細胞

(a) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の増殖に関する検討

①ヒト皮下脂肪より低血清培養法を用いて選択的に幹細胞を増殖す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、沈澱する細胞分画を得た。得られた細胞分画を DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2(低血清培養群)または DMEM/MCDB201+20%FBS(高血清培養群)または DMEM/MCDB201+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。

②ラットにおける皮下脂肪・骨髄由来幹細胞

の増殖の比較検討を行った。F344 ラット(オス・10 週齢)の皮下脂肪をメスにて細断し、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、沈澱する細胞分画を得た。得られた細胞分画を DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2(低血清培養群)または DMEM/MCDB201+20%FBS(高血清培養群)または DMEM/MCDB201+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。F344 ラット(オス・10 週齢)の大腿骨・脛骨から 18G の針を用いた注射器によって DMEM をフラッシュして骨髄を採取、得られた骨髄を 5 分間、1200rpm の遠心を行い沈澱する細胞分画を得た。得られた細胞分画を DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2(低血清培養群)または DMEM/MCDB201+20%FBS(高血清培養群)または DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2(高血清+FGF2 群)の 3 群に分けて培養を行った。

(b) 脂肪由来幹細胞のサイトカイン分泌能の検討

①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。高血清+FGF2(DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養(DMEM/MCDB201+20%FBS)、低血清培養(DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2)の 3 種類の培養液で同じヒト脂肪由来幹細胞を 8 例培養した。6 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。24 時間後に培養上清を採取し、VEGF-A、HGF 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。
②ラットにおける皮下脂肪・骨髓由来幹細胞のサイトカイン分泌の違いについて検討した。高血清+FGF2 (DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養 (DMEM/MCDB201+20%FBS)、低血清培養 (DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2) の3種類の培養液で同じラット脂肪および骨髓由来幹細胞を培養した。6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。24時間後に培養上清を採取し4~7代目までのVEGF-A、HGF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。

(c) 動物モデルに対する治療効果の検討
低血清培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞による下肢虚血(ASO)モデルの治療効果を検討した。F344 nude ラットで下肢虚血モデルを作成し、虚血下肢筋肉に①低血清培養ヒト脂肪組織由来細胞 1×10^7 個(低血清群) ②DMEMのみ(control群)を各々注入した。Laser-Doppler 法により下肢血流を経時的に比較検討した。また治療3日目の筋組織を採取し、組織中のhuman VEGF、human HGF濃度をELISA法にて測定した。

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

(5-1) 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 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。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bluo-gal染色により検討した。

(5-2) アドリアマイシン複数投与による慢性腎障害モデルの作成の試みと細胞治療に関する検討

アドリアマイシンを3mg/kgを初日投与を行い、14日目に再びアドリアマイシンを2mg/kgを投与。その2週後に細胞を投与し、細胞治療の効果を判定した。

(5-3) 胎生期腎臓を使用した培養アッセイ系による評価

(a) Organ Culture

胎生13日目のSDラット(雌)から胎生13日目の胎児を採取し、その腹部から腎臓発生原基である腎臓、ウォルフィアン管、中胚葉系細胞群を組織まとめて剥離し、マイクロダイセクション法にて腎臓、ウォルフィアン管、中胚葉系組織へと分け、各々を分離。それぞれを培養アッセイ系に使用した。

上記方法にて分離した胎生13日目の腎臓をtranswell上にて培養した。培養条件はDMEM/F12+10%FCS+1%antibioticsにて行

った。

(b) ウォルフィアン管発芽培養

上記の方法にて分離したウォルフィアン管を transwell 上に置き、DMEM/F12+10%FCS +GDNF (125~250ng/ml) +FGF-b (125~250ng/ml) +1%antibiotics にて培養し、発芽について検討を行った。

(c) 尿管芽分枝培養

得られた胎生期 13 日目の腎臓をトリプシン処理し、マイクロダイセクション法にて尿管芽を分離した。胎生 13 日目の尿管芽は T 型構造をとっており、それを BSN-CM+10% FCS+GDNF (125ng/ml) +FGF-b (125ng/ml) +1% antibiotics の培養条件にてマトリジェル内にて培養を行い、尿管芽の発生を検討した。

(d) MM Spinal Code Induction

得られた胎生 13 日目の腎臓をトリプシン処理し、尿管芽を分離後に、後腎発生系間葉系幹細胞組織 (MM) を分離し、それを、同じく胎生 13 日目の神経管 (spinal code) と transwell 上にて共培養を行い、MM が上皮化し、mesenchymal epithelial transdifferentiation (MET) を検討した。

(e) Recombo Culture Assay

上記の方法にて得られた尿管芽を約 7 日間培養し、数分枝したものをマトリジェルから取り出し、transwell 上にて胎生 13 日目の MM 組織と共培養を行い、MM 組織、及び尿管芽の組織の再結合、分化を検討した。

(f) rKS56 細胞を用いた 3 次元培養

上記方法にて、発生期の腎臓を in vivo から in vitro へと写し、腎臓発生を再現する技術を習得した。その技術を応用し、rKS56 細胞の組織構築能を検討した。

rKS56 細胞をハンギング・ドロップ法にて細胞塊にし、それをマトリジェル内で種々の培

養条件下にて培養し、rKS56 細胞が腎臓関連の組織へと分化するかの検討を行った。

(6) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞

(6-1) マウス腎臓幹/前駆細胞の移植方法の標準化

(a) マウス

本研究では、ヒトにおける幹/前駆細胞移植のバイオマーカー候補である L-FABP のヒト染色体遺伝子を導入したトランスジェニック (L-FABP-Tg) マウスを用い、ヒト腎臓と同様の遺伝子発現調節を受ける、ヒト化腎臓モデルとして実験に供した。これにより臨床指標と全く同じ検出系を動物実験による前臨床試験に導入することが可能となる。8~15 週齢雄の C57BL/6J 野生型および EGFP-ヒト L-FABP-Tg マウスを用いて、一週間の予備飼育後にそれぞれの実験モデルを実施した。

(b) 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°C 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。

(c) 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' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' , Stathmin1: Forward 5' -gcatcc tgatattcag .gtg-3' , Reverse 3' -cttgccttctctcgcaage-5' , Pax-2: Forward 5' -gaagctctgg atcgagtctt -3' , Reverse 3' -gaatctccaagcctcattgta-5' である。

(d) ウェスタン解析
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-4000 (FUJIFILM) で検出し、解析を行った。

(e) 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 2x10⁴cells/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 (Ex: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。

(f) 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 週間以内に致死的となる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。5.0x10⁵ 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。

(6-2) 慢性腎障害モデル

6 週齢の雄 C57BL/6 マウスに Adenine 添加食を 4 週間経口投与し、5 週目以降は通常飼料を投与した。7 週目に塩酸ケタミン 30mg/kg とキシラジン 8mg/kg の腹腔内投与により麻酔した。背部を切開し、両腎を露出した。細胞移植 (CKD/SP) 群には 5.0x10⁵ 個に調整した CMRA 標識 mProx-SP を両腎被膜下に投与し閉腹した。非移植 (CKD/sham、陽性対照) 群には偽手術のみ施行し、Control (陰性対照) 群には通常飼料を投与ののち、7 週目に偽手術のみ施行した。10 週経過時に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。また、0, 4, 7 週目には尾静脈より採血し BUN 測定により経時的に腎機能を評価した。

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。免疫染色には Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA, DAKO)、Single-stranded DNA (ssDNA, DAKO)、Aquaporin-1 (AQP-1, Chemicon) を用い、BUN は尿素窒素 B テストワコー (和光

純薬) を用い測定した。

(統計解析)

JMP 5.1J (SAS Institute, Cary, NC) などを用いて統計解析を行った。

(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。この際に、個人情報管理者は別におき、個人情報が漏れることがないように最大限の注意を払う。本研究の目的以外には細胞を用いないこと、研究終了後には廃棄処分することを厳守する。

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) ヒト尿中バイオマーカーを用いたヒト腎組織特異的幹/前駆細胞培養の効率化

ヒト生体腎移植時の腎血流再灌流直後における尿細管周囲血流を、非侵襲的 CCD ビデオ撮影により計測し、同時に採取した初尿中のバイオマーカー L-FABP の測定値と比較した。尿中 L-FABP は尿細管周囲血流と非常に高い相関を有しており、既存の尿検査項目 (NAG, α 1MG, β 2MG) とは異なる機序により尿細管の虚血を鋭敏に検出できることが明らかとなった (図 1-1)。

また、抗 L-FABP 抗体を用いた免疫染色の結果から、正常腎における L-FABP は、近位尿細管細胞質に局在しているのに対し、移植腎再灌流後 1 時間の時点で施行された腎生検標

本では、細胞質から尿細管腔内に L-FABP が速やかに排出されていることが明らかとなった (図 1-2)。

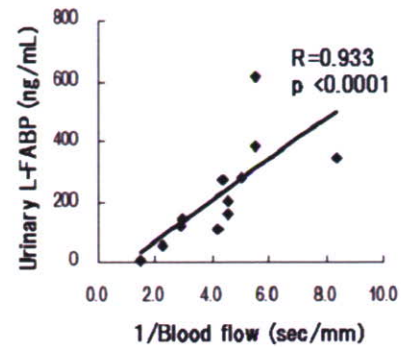


図 1-1 ヒト尿細管周囲血流と尿中 L-FABP との相関 (尿中 NAG, α 1MG, β 2MG と血流の間には有意な相関は認められなかった)

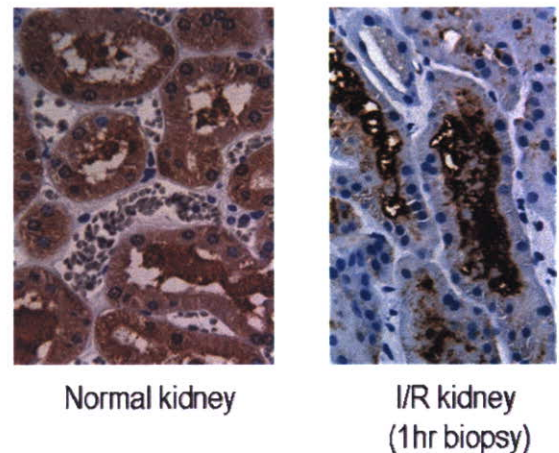


図 1-2 ヒト腎生検の L-FABP 免疫染色像

移植直後の尿細管周囲の微小循環血流と尿中 L-FABP との間に強い相関があり、その初尿中に腎組織特異的腎幹/前駆細胞が落下してくることから、尿中落下細胞培養の成否と尿中 L-FABP の値とを比較した (図 1-3)。

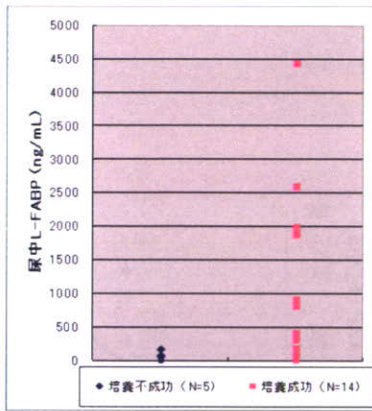


図1-3 ヒト尿中L-FABPと尿中落下細胞の培養成否との関係

以上より、尿中L-FABPのカットオフ濃度を100ng/mL付近に設定した場合、最も効率化よく尿中の腎組織特異的腎幹/前駆細胞が採取、培養できることが判明した(特許出願済み)。

(1-2) ヒト尿中落下細胞の培養

昨年に引き続き、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11例中3例(27%)、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。

(1-3) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

上記のように樹立されたヒト尿中落下細胞由来の腎特異的幹/前駆細胞に関して、DNAアレイによる遺伝子発現解析を行った。対照として、ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293Tを用いた。結果は表1-1に示すごとく、近位尿細管特異的な遺伝子、アクアポリン1、K⁺/Cl⁻共輸送体(KCC3a)、Na⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A4)、AminopeptidaseA、N-カドヘリン、K-カドヘリンなど、遠位尿細管で発現するNa⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A7)、E-カドヘリンなどの遺伝子発現が、HEK293Tに比して、約1.3~14.9倍も高値であった。

Expression of nephron marker genes (DNA array data)

	Gene expression in		Intensity ratio of
	hUEC	HEK293T	hUEC/HEK293T
Glomerulus (podocyte) markers			
Nephrin	-	-	-
Podocin	-	-	-
P-cadherin	-	-	-
Proximal tubule			
Aquaporin 1	+	-	1.7
K ⁺ /Cl ⁻ cotransporter 3a	+	+	1.3
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter, SLC4A4	+	+	2.5
Aminopeptidase A	+	+	14.9
N-cadherin	+	+	3.2
K-cadherin	+	-	11.3
Na ⁺ /H ⁺ exchanger 3	-	-	-
Distal tubule markers			
Calbindin D 28K	+	+	0.9
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter, SLC4A7	+	+	2.6
E-cadherin	+	+	2.3
Thiazide-sensitive Na ⁺ /Cl ⁻ cotransporter	-	-	-
Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger 1 (NCX1)	-	-	-
Collecting duct markers			
Epithelial na ⁺ channel alpha	-	-	-
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter, SLC4A1	-	-	-
Aquaporin 2	-	+	-

表1-1 尿中落下由来腎特異的幹/前駆細胞の遺伝子発現

また、腎発生時や上皮間葉転換時に発現する遺伝子群に関しては、表1-2に示すものが確認された。

Transcriptional Factors	Growth Factors / Receptors		Others
Pax2	FGF2	LIF	Integrin α8
Pax8	FGF7	LIFR	MMP2
Hoxa11	Gfra1	Slit3	MMP9
Foxc1	BMP2	Robo1	Syndecan 1
Foxd1	Activin A	Wnt5b	Heparan sulfate
Emx2	TGFβ2	Notch2	2-sulfotransferase
	Amphiregulin	Jagged1	
	TGFα	Presenilin 1	
	EGFR	Presenilin 2	
	PDGF		
	PDGFR		
	GDF11		

表1-2 尿中落下細胞の遺伝子発現

(1-4) ヒト尿中落下細胞の安全性評価

樹立されたヒト尿中落下細胞由来の腎特異的幹/前駆細胞に関して、細胞培養の過程で癌化等安全性評価に適したバイオマーカーの探索を行った。前述のように、ヒト正常近位尿細管にはL-FABPが発現していることが明らかとなっているが、最近、腎癌では同じFABPの異なるサブタイプB-FABPが特徴的に発現するという報告がなされた(Teratani T, et al., 2007, J.Urology)。

そこで、今回樹立したヒト腎由来細胞の L-FABP と B-FABP 発現について RT-PCR により確認した。

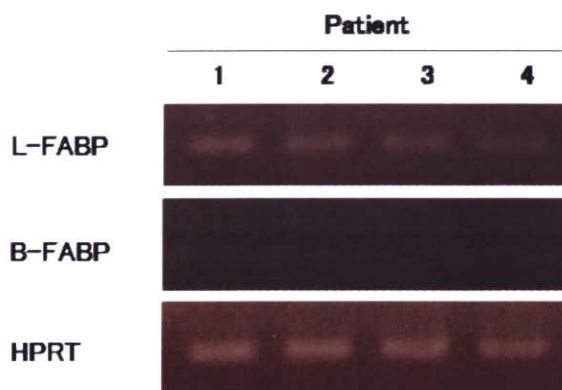


図 1-4 ヒト尿中落下由来腎特異的幹/前駆細胞の腎癌関連遺伝子 B-FABP 発現の探索

その結果、すべての細胞株に関して、L-FABP は確認されたが、B-FABP の発現は検出されなかった。

また、DNA アレイによる遺伝子発現解析からは、HK2 における B-FABP の発現を 1 としたとき、腎癌由来細胞株 (TUHR14TKB) では 2.6、尿中落下初代培養細胞で 0.09、腎特異的幹/前駆細胞株 (HUE233A) で 0.91 と低値であった。

(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

本研究では、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、イヌ尿中落下細胞の自家移植を累計 27 例、細胞移植を行わないコントロールをとして累計 16 例、計 43 匹もの移植実験を実施した。左腎摘出時に虚血再灌流を実施し、尿中落下細胞を左腎中部尿管からチューブを腎盂に留置し無菌的に採取した。4 週間培養後、細胞を蛍光標識し、自家移植に供した。イヌ尿中

落下細胞は、ヒトと同様の培養条件下で、100%の培養効率にて増殖させ得た。

(2-2) イヌ尿中落下細胞の自家移植

(a) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する自家尿中落下細胞移植

4 週間後に、右腎の 50 分虚血再灌流を実施し、細胞移植法に関しては種々検討した。

右腎動脈を露出、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 4 週後の剖検時点では、腎皮膜下の細胞注入時注入針による侵襲・出血が原因と考えられる腎臓実質の線維化が見られた。

また、侵襲を少なくするため皮膜下浅部に注入した場合は、細胞が注入部位から逆流してしまうことが判明した。

(b) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する臍型自己脂肪植え込み併用尿細管上皮前駆細胞治療

そこで、ヒト腎癌部分摘出時に施行される自己内臓脂肪による止血手技をイヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対しても取り入れた。自己内臓脂肪を約 1 g 採取し、腎臓皮膜を約 1 cm 切開し、その脂肪細胞を皮膜下に埋め込み 3-0 バイクリルで皮膜と脂肪を縫合した

(図 2-1)。腎皮膜下臍型脂肪と腎臓実質に細胞注入出来た症例は、注入し細胞の腎皮膜外への逆流の所見はなかった (図 2-2) が、脂肪細胞直下には、強い線維化が確認された (図 2-3)。

その一方で、細胞移植群では細胞注入後 1、2、3、4 週間血中 BUN の改善 (図 2-4) と 1 週間 3、4 週間で血中 Crn の改善を認めた (図 2-5)。

(3) ラット骨髓末梢血幹細胞

(3-1) Doxorubicin 腎症ラット

(a) 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。

(b) 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。腎組織上も明らかな変化を認めなかった。

(c) Protocol 3

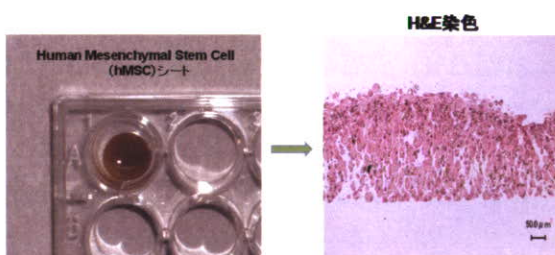
細胞投与により蛋白尿の改善を認めなかった。血清クレアチニンはBM-MSCs 群に比して生食群で高かったが有意差はみとめなかった。

(3-2) 磁性ナノ粒子(magnetic nanoparticles)を用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞シート(hMSC 細胞シート)による治療検討

(a) hMSC 細胞シートの作製・評価

ヘマトキシリン・エオジン染色で、10-15層の hMSC 細胞シートが確認された(下図)。PCNA 染色で増殖細胞がみられた。TUNEL 染色でアポトーシスしている細胞はほとんどみられなかった。connexin43 の免疫染色で細胞間 Gap junction の形成が確認された。

Magnetite Cationic Liposome (MCL)を用いた細胞シートの作成

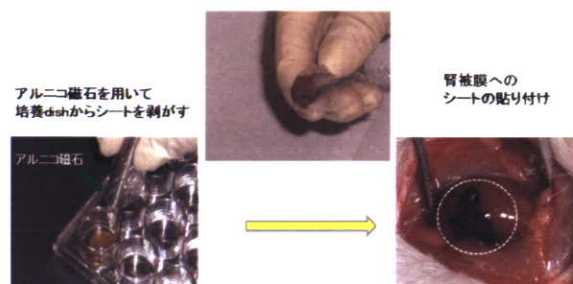


(b) Cisplatin 腎障害に対する hMSC 細胞シートの移植

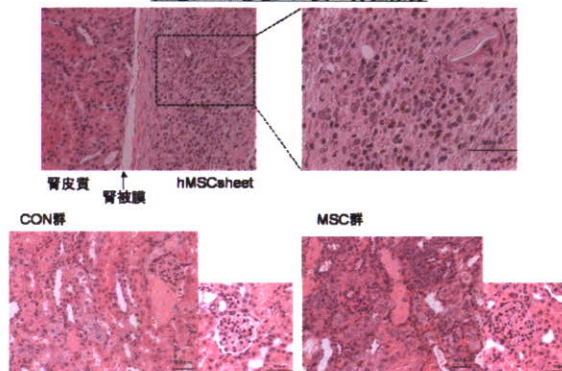
血清クレアチニン値、BUN 値ともに 5 日でピークとなり 8 日目には改善がみられた。hMSC 細胞シート群と Control 群で差はみられなかった。尿蛋白にも両群間で差はみられなかった。腎組織上は、腎被膜外に移植

したシートは存在し、腎実質内に移行した移植細胞はみられなかった。糸球体に変化はみられず、一部の間質に炎症細胞の浸潤と硝子円柱が両群で認められた(下図)。

腎被膜へのhMSCシート移植方法



細胞シート移植8日後の腎組織像



(4) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞

(4-1) Stromal Vascular Fraction ; SVF

(a) 吸引脂肪からのSVFの採取方法の確立およびSVFの量・性質の検討

図4-1に示すように吸引脂肪から大量に SVFを調整する方法を確立した。得られる有核細胞数は平均で 1.63×10^8 個/1Lであり十分量の採取が可能であった(図4-2)。SVFをFACSにて解析したところCD34陽性率は平均で36.98% (15~45%)であった(表4-1)。VEGF産生能もコントロール細胞(HEK細胞)と比較し高い分泌能が得られた。生細胞と凍結細胞を比較したところ、細胞増殖速度、表面マーカーの解析(CD34)、VEGFのサイトカイン分泌能は遜色なく凍結保存の可能性が

考えられた (図4-3)。

(b)腎不全動物モデルでの治療効果の検討

SVF 導入によるシスプラチン腎症モデルでは優位差をもって治療群の腎障害の軽減がみられた (図 4-4)。

(4-2) 低血清培養脂肪組織由来間葉系幹/前駆細胞

(a)低血清培養法による脂肪由来幹細胞の増殖に関する検討

①皮下脂肪組織から得られた幹細胞を培養すると、高血清培養および高血清+bFGF 培養においては紡錘形形態をとる線維芽細胞様の細胞の増殖が認められた。一方で低血清培養+bFGF 培養においては敷石状の細胞増殖が認められ、高血清培養および高血清+bFGF 培養とは異なる細胞形態を認めた (図 4-5)。培養 30 日後の細胞数は高血清+bFGF 培養 $2.58 \pm 4.23 \times 10^{14}$ 、低血清培養+bFGF 培養 $1.16 \pm 1.23 \times 10^{11}$ 、高血清培養 $2.23 \pm 2.8 \times 10^{10}$ となり、増殖速度は高血清+bFGF 培養、低血清培養+bFGF 培養、高血清培養の順に良かった (図 4-6)。

②ラットの皮下脂肪・骨髄から得られた幹細胞を培養すると高血清培養および高血清+bFGF 培養においては紡錘形形態をとる線維芽細胞様の細胞の増殖が認められた。一方で低血清培養+bFGF 培養においては敷石状の細胞増殖が認められ、高血清培養および高血清+bFGF 培養とは異なる細胞形態を認めた。培養 21 日後の細胞数は皮下脂肪で高血清+bFGF 培養 $6.86 \pm 2.95 \times 10^{13}$ 、低血清培養+bFGF 培養 $1.75 \pm 0.179 \times 10^{11}$ 、高血清培養 $2.46 \pm 0.282 \times 10^{10}$ となり、増殖速度は高血清+bFGF 培養、低血清培養+bFGF 培養、高血清培養の順に良かった。一方骨髄では高血清+bFGF 培養 $6.23 \pm 5.44 \times 10^{11}$ 、高血清培養 $1.89 \pm 1.48 \times 10^9$ 、低血清培養+bFGF 培養

$7.07 \pm 7.04 \times 10^8$ となり、増殖速度は高血清+bFGF 培養、高血清培養、低血清培養+bFGF 培養の順に良かった。全体での増殖速度は皮下脂肪：高血清+bFGF 培養、骨髄：高血清+bFGF 培養、皮下脂肪：低血清培養+bFGF 培養、皮下脂肪：高血清培養、骨髄：高血清培養、骨髄：低血清培養+bFGF 培養の順となった。同じ培養方法であれば骨髄よりも皮下脂肪のほうの増殖速度が優れていた (図 4-7)。

(b) 脂肪由来幹細胞のサイトカイン分泌能の検討

①ヒト脂肪由来幹細胞の高血清+FGF2

(DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養 (DMEM/MCDB201+20%FBS)、低血清培養 (DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2) における 6 代目のサイトカイン分泌量はそれぞれ VEGF-A 2034 ± 1845 pg/ 10^6 cells、 3003 ± 1085 pg/ 10^6 cells、 7710 ± 3881 pg/ 10^6 cells、HGF 342 ± 726 pg/ 10^6 cells、 216 ± 611 pg/ 10^6 cells、 9993 ± 4899 pg/ 10^6 cells。VEGF-A、HGF において低血清培養群がサイトカイン分泌能に優れていた (図 4-8, 9)。

②ラット脂肪由来幹細胞の高血清+FGF2

(DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養 (DMEM/MCDB201+20%FBS)、低血清培養 (DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2) における 6 代目のサイトカイン分泌量はそれぞれ VEGF-A 4272 ± 720 pg/ 10^6 cells、 6759 ± 1224 pg/ 10^6 cells、 10973 ± 469 pg/ 10^6 cells、HGF 1779 ± 1027 pg/ 10^6 cells、 2709 ± 1564 pg/ 10^6 cells、 3782 ± 2183 pg/ 10^6 cells であつた。VEGF-A、HGF ともに低血清培養群がサイトカイン分泌能に優れていた。ラット骨髄由来幹細胞の高血清+FGF2

(DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養 (DMEM/MCDB201+20%FBS)、低血清培養 (DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml

FGF-2) における 6 代目のサイトカイン分泌量はそれぞれ VEGF-A $3895 \pm 72 \text{pg}/10^6 \text{cells}$ 、 $7594 \pm 1650 \text{pg}/10^6 \text{cells}$ 、 $8706 \pm 2269 \text{pg}/10^6 \text{cells}$ 、HGF $1018 \pm 113 \text{pg}/10^6 \text{cells}$ 、 $6937 \pm 4005 \text{pg}/10^6 \text{cells}$ 、 $4813 \pm 2789 \text{pg}/10^6 \text{cells}$ であった。VEGF-A、HGF とともに低血清培養群がサイトカイン分泌能に優れていた。低血清培養法による脂肪由来幹細胞と骨髄由来幹細胞では同等の VEGF-A、HGF 分泌能を示した (図 4-10, 11)。

(4-3) 動物モデルに対する治療効果の検討

低血清培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞による下肢虚血 (ASO) モデルの治療効果の検討

細胞治療後 14 日目で低血清群はコントロールと比較し有意に下肢血流の改善を認めた。低血清群ではコントロール群に比べ、筋肉組織中の human VEGF、HGF 濃度が有意に高かった (図 4-12)。

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

(5-1) 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。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 (図 5-1, 2)。生食投与+片腎摘及び抗 Thy-1 腎炎群にて、有意な腎機能障害を認めなかった (図 5-3)。

(5-2) アドリアマイシン複数投与による慢性腎障害モデルの作成の試みと細胞治療に関する検討

アドリアマイシンを $3 \text{mg}/\text{kg}$ を初日投与行

い、14 日目に再びアドリアマイシンを $2 \text{mg}/\text{kg}$ を投与。その 2 週後に細胞を投与し、細胞治療の効果を判定する。現在、慢性化モデルの作成を行っている。

(5-3) 胎生期腎臓を使用した培養アッセイ系による評価

(a) Organ Culture

胎生期 13 日目の腎臓を transwell 上にて培養したところ、胎生 13 日目では腎臓は MM と尿管芽 (UB) でできており、UB は T 型化し、まだ 1 分岐のみである (図 5-4A) が、培養後、UB に関しては分岐成長を行い、その先端においては MM と相互反応し、MM は MET を起こし、コンマシェイプ・ボディを形成し (図 5-4B)、胎生期における腎臓発生を再現しえた。その腎臓を MM から上皮に分化し、その尿細管上皮マーカーである PNA と尿管芽のマーカーである DB で染色したところ、UB は分岐成長しており、コンマシェイプ・ボディは PNA 陽性であり、MET を起こし、尿細管上皮へと分化していることが確認された。

(b) ウォルフィアン管発芽培養

胎生期 13 日目の腎臓発生部位から得られたウォルフィアン管 (WD) をマイクロダイセクション法にて全く mesoderm tissue が無い clean な WD (図 5-5A) と軽度 mesoderm tissue を残した WD (semi-clean WD: 図 5-5B) と全く mesoderm tissue を分離していない WD (whole-WD: 図 5-5C) で WD から行われる UB への発芽を検討した。transwell 上では clean な WD は全く発芽せず (図 5-5D)、semi-clean な WD、whole-WD は発芽を行い (図 5-5E, F)、腎臓発生に関わる最初の発芽の過程を再現しえた。

(c) 尿管芽分岐培養

分離した尿管芽は胎生 13 日目では 1 分岐のみであり、T 型構造をとっている (図 5-6A)。

それをマトリゲル内にて3次元培養を行ったところ、UBは分枝成長していき、7日目には5~6分岐し(図5-6B)、腎臓発生の経過を再現しえた。

(d) MM Spinal Code Induction

胎生13日目より得られたMMをtranswell上にて神経管と共培養を行った(図5-7A)。3日目にはMMは上皮へと分化を起し(MET), MM内には上皮化したコンマシェイプ・ボディを観察しえた(図5-7B)。

(e) Recombo Culture Assay

今まで述べた手技を使用し、まずはUBをマトリゲル内で培養。成長させたUBをマトリゲルから分離し、そのUBと胎生期13日目から得られたMM組織を共培養(図5-8A)。約7日目には、共培養したそれぞれの組織は、分離で培養したにも関わらず、お互いに反応しあい、MMは上皮化を起し、コンマシェイプ・ボディを形成し、UBは分枝した後も、さらに分枝を行い、MMと相互作用をおこしていた(図5-8B,C)。できた人工腎臓を尿管管のマーカーのPNA、尿管芽のマーカーのDBで染色したところ、コンマシェイプ・ボディがPNAにて染まり、UBの分枝もDBにて染色され、お互いの別々に培養された組織も共培養することにより、再結合、相互作用しあい、腎臓発生過程を再現した(図5-8D,E)。

(f) rKS56細胞を用いた3次元培養

以上の培養手技を利用し、我々が作成したrKS56細胞を用いて、3次元培養を行うことにより、rKS56細胞の組織構築能の検討を行った。

rKS56細胞を細胞塊にするためにハンギング・ドロップ法にて細胞塊にした(図5-9A)。そのrKS56細胞塊をK-1 medium+MCS supernatantにて培養したところ、rKS56細胞は管腔構造を作っていくことが確認され

た(図5-9C,D)。また、K-1 medium+MCS supernatant+GDNF(250ng/ml)+FGF-b(250ng/ml)+HGF(250ng/ml)+BMP-7(250ng/ml)+1%antibioticsの条件で培養したところ、rKS56細胞塊は、管腔構造だけでなく、胎生13日目のUBの発芽、分枝成長のような分枝成長が認められた(図5-9E)。

(6) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞

(6-1) マウスmProx24細胞の移植

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

mProx, mProx-SPは図6-1のような形態を示すが、特にmProx-SPは図6-1Aのようなドーム形成を示しうる細胞である。

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6-2A,B)。一方、Stathminの発現はmRNA、蛋白ともに両者で明らかな発現の差は見られなかった。

(b) 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。

但し、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 6-3C）、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 6-3D）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指標としうる可能性が示唆された。

(c) 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 ± 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いた (図 6-4B, 図 6-5C)。また、DMEM 群では PCNA 陽性の細胞増殖期にある尿細管上皮の減少と、アポトーシスを示す Single-stranded DNA (ssDNA) 陽性細胞の増加を認めたが、mProx-SP 群では PCNA 陽性細胞の増加 (図 6-5A, C) と ssDNA 陽性細胞の減少が見られた (図 6-5B, C)。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 6-6)、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 (表 6-1)。

(6-2) 慢性腎障害モデル

慢性腎症モデルとして Adenine 誘発性慢性間質性腎障害モデルを作製した。本モデルは高度の腎間質線維化を示す慢性腎障害モデルであったが、腎被膜下は細胞注入に際して癒着傾向が強く、拡張しにくい印象であった。本検討では両腎に細胞を単回注入したが、線維化の明らかな改善は見られず (図 6-8)、BUN も有意な軽減が認められなかった (図 6-7B)。また、腎重量も改善は見られず著しい萎縮を呈していた (図 6-7C)。

D. 考察

骨髄末梢血間葉系幹細胞チーム：

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報告されている (LinksRookmaaker MB et al. Am J Pathol. 2003;163(2):553-62) と (Kale S et al. J Clin Invest. 2003;112(1):42-9. Epub 2003 Jun 16)。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報告されている (Morigi M et al. J Am Soc Nephrol. 2004;15(7):1794-804) と (Uchimura H et al. J Am Soc Nephrol. 2005;16: 997- 1004)。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)。

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、①骨髄の採取は全身麻酔を要するため患者の負担が大きいこと、②CKD患者や高齢者など骨髄機能が低下している患者では十分な幹細胞数の確保が困難であること、③透析患者の閉塞性動脈硬化症(ASO)に対しては有効性が認められなかったことなどの問題点も明らかとなっている。脂肪組織は吸引で比較的容易に採取が可能であり、我々の今回の検討でも吸引脂肪で治療に必要な十分量のSVFを確保することができた。SVFは多種の幹細胞/前駆細胞が迅速(組織採取後約2時間)に得られる利点があり凍結保存も可能で、今回の検討で腎不全への治療効果もみとめられたことから、ヒトでの腎再生医療の実用化に有望であると考えられた。

また、我々はヒトでの実用化において十分な効果を得るためには、繰り返し投与することも有用であると考えた。そのためには細胞を必要な時に必要な量だけ安定供給する必要があり、その条件を満たすためには細胞培養を行う必要があると考えられる。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(特許申請中)を用いて脂肪組織由来間葉系幹細胞を培養して使用している。ヒトで実用化する場合、動物由来材料を使用しないことは大変重要なことだが、低血清培養法では大量の血清を必要としないため、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。本研究では低血清培養脂肪組織由来細胞の増殖能の評価を行った。1gの脂肪組織から約3週間で 1×10^9 の9乗個の細胞を得ることが可能であり、ヒトでの実用化に必要な十分量の細胞を比較的短期間で得ることができると考えられた。また高齢者や腎不全患者の脂肪組織からも同様に十分量の細胞を得ることが可能であった。高齢者や腎不全患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。また低血清培養法で得られた幹細胞は従来の高い血清濃度の培養条件で得られた細胞に比べVEGF, HGFの分泌能が高い(特にHGF分泌能は著しく高い)こと、さらに分裂回数が多くなっても、これらのサイトカインの分泌能は低下しないことが今回明らかとなった。これらのことから障害細胞・障害組織の修復能力が高い細胞を大量培養できることが示唆された。実際の動物での治療実験でも低血清培養で得られた幹細胞は通常培養の細胞よりも高い治療効果を示した。今後はさらに詳細に治療効果のメカニズムの検討を行い、さらに安全性に関する検討もすすめ、早期のヒトでの実用化を実現したいと考えている。

また、本年度は移植細胞の投与経路として、磁性ナノ粒子を用いた細胞シートの検討を行なった。磁性ナノ粒子を含んだMSCの増殖能が維持されること(Ito A et al. Biochem Eng J 2004)や骨、脂肪、軟骨などへの多分化能が保持されることが報告されている(Shimizu K et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater:2007)。磁性ナノ粒子を用いることによって、10~15層の3次元hMSCシートを作成することが可能であり、hMSCシート作