

成 24 時間後において、シート内部での細胞のアポトーシスは検出されず、細胞間での Gap Junction の形成が認められた。シスプラチン腎障害モデルに対し、腎被膜外に磁性ナノ粒子を用いた hMSC シート移植した。hMSC シートから腎実質への hMSC の遊走は見られず、サイトカインなどによるパラクライン効果による腎機能の改善は認められなかった。今後は、腎被膜を除去して細胞シートを移植、シートを固定するため、さらにコラーゲンシートを用いて検討するなど、細胞治療効果と低侵襲性を併せ持つデバイスの開発が待たれる。

組織特異的上皮系幹細胞チーム：本研究チームは、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、またシスプラチン誘発急性腎不全モデルラットに投与し、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髄境界部の尿細管にも rKS56-LacZ 細胞の生着が確認された。

今後は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、そのような状況下でも細胞治療が有効かどうかの検討が必要であると考えられる。

本年度は、慢性腎障害モデル(慢性腎不全モデル)の作成、及びその細胞治療の検討を試みてきた。当初、片腎摘+抗Thy-1抗体投

与モデルにて慢性腎障害モデルの作成を試みたが、rKS56細胞の生着は確認されなかった。これは、慢性障害の場合、ニッシュの変化は急性障害よりも大きく、そのため rKS56細胞が生着する足場環境が大きく変化し、生着しえなかった可能性も示唆された。次に現在、片腎摘+抗Thy-1抗体投与モデルに変わるアドリマイシン複数回投与(2回)慢性腎障害モデルの作成を試みており、安定した慢性腎障害が作成できるかを試みているところである。

また、これまで rKS56細胞の組織構築能を *in vivo* で証明してきたが、*in vitro* での再評価も行ったところ、三次元培養において、尿細管様管腔構造を構築し、また培養条件によっては、管腔構造がさらに分枝し、UB様発達は観察された。これらは、rKS56細胞が腎臓作成原基細胞の一つである UB と同じような形質があることを示唆するものと思われ、今後とも更なる検討が必要と思われる。

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、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)に比べて高率であった。また、長期間の培養の経過で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。これまで mProx では認められなかった、Pax-2(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)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、ウェスタンプロ

ットにより確認された。以上より、mProx-SP画分がマウス近位尿細管細胞由来細胞株の中に存在する腎組織特異的幹/前駆細胞を高い比率で含むことが示唆された。

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と、細胞毒性を示すLDH放出量の著しい抑制が確認された。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3C、CDDP 10 μ 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、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、移植細胞の標準化に資する可能性が考えられる。

また、マウスCDDP腎障害モデルにおいて、両腎(細胞移植腎及び非細胞移植腎)ともに同等の尿細管壊死軽減効果が認められていること、Day3の時点でBUN上昇が有意に軽減していたことは、何らかの液性因子が腎障害軽減に大きく作用していると考えられる。さ

らに、細胞移植群では両腎ともに尿細管上皮の細胞増殖の誘導と、アポトーシス抑制が認められており、*in vitro*のCDDP刺激での結果と合致している点は特に興味深いといえる。

マウス薬剤性慢性腎障害モデルにおいても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。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。

セルプロセッシングチーム: ヒト尿中からの腎特異的幹/前駆細胞の単離培養を効率化しうるバイオマーカーL-FABPに関しては、最近その尿中排泄のメカニズムの解明を進めることができた(Yamamoto T et al., JASN, 2007)。ヒトL-FABPトランスジェニックマウスを用いた虚血再灌流モデルやヒト生体腎移植直後の腎微小循環血流測定を行うことによって、腎臓の微小循環障害により近位尿細管が

低酸素にさらされた結果、腎臓の L-FABP 遺伝子が発現誘導され、尿細管の酸化ストレスにより生じた過酸化脂質と L-FABP とが結合し原尿中に排出されるという、L-FABP 診断のコンセプトが証明された。

また今年度は、尿中落下細胞の安全性評価に資するバイオマーカーとして、L-FABP と同じ脂肪酸結合蛋白 (FABP) ファミリーである B-FABP に着目した。論文での報告通り、腎癌由来細胞株 (TUHR14TKB) では B-FABP の遺伝子発現が確認されたが、尿中落下初代培養細胞での発現は腎癌の約 1/30 と低かった。FABP ファミリーは分化と癌化の両方に関わる分子として、近年報告がなされてきていることから、今後、L-FABP と B-FABP をパネル化して細胞移植の安全性評価に利用できるものと期待される。

なお、医療応用を考えると、ヒト細胞の培養中にいかにエピジェネティックな修飾や、ゲノムの somatic mutation を抑えるかという問題が、非常に重要と考えられる。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、すでに本研究においてげっ歯類で確立した、SP 細胞の single cell sorting や、organ culture などの手法を駆使して自己複製・再構築能を有する細胞が繰り返し培養可能かどうか検討する必要がある。

さらに、ヒトと同様の手法を用いて、計 43 匹ものイヌ尿中から腎幹/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、血清 Cr 両者の上昇は有意に抑制できた。

本年度はヒト腎癌部分腎摘手術時に行われている内臓脂肪による腎臓侵襲部位への縫合術 (臍型自己脂肪植え込み法) を併用した

尿細管上皮前駆細胞治療を試みた。注入細胞の逆流や漏れという手技的な問題は克服されたものの、細胞移植部位の線維化は軽減されておらず、組織学的改善と、血清パラメータによる腎機能改善との間には、やや開きがあることが確認された。

E. 結論

(1) 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が明らかになった。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、慢性腎障害モデルに対する治療効果が見出せないことから、ASO 等における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た。

(2) 成体ラット腎由来の腎幹/前駆細胞様細胞 (rKS56 細胞) は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。慢性障害モデルにおいては今後とも更なる検討が必要と思われる。また、rKS56 細胞は in vivo での組織構築能のみでなく、3 次元培養における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) の移植治療効果を高めるために必要な、移植用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。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。

(3) 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が大幅向上した。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。

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
後藤 百万：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
槇野 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, Kawagoe Y, Suzuki T, Ueda Y, Koide H, Inoue T, Node K. Azelnidipine reduces urinary protein excretion and urinary liver-type fatty acid binding protein in patients with hypertensive chronic kidney disease. *Am J Med Sci*: 333(6):321-326, 2007
- 2) Nakaya I, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Yokoyama H, Ishida Y, Kondo T, Sugaya T, Kawachi H, Shimizu F, Narumi S, Haino M, Gerard C, Matsushima K, Kaneko S: Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol*. 107(1):e12-21, 2007
- 3) Nakamura T, Inoue T, Sugaya T, Kawagoe Y, Suzuki T, Ueda Y, Koide H, Node K: Beneficial effects of olmesartan and temocapril on urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in normotensive patients with immunoglobulin A nephropathy. *Am J Hypertens*. 20(11):1195-1201, 2007
- 4) Portilla D, Dent C, Sugaya T, Nagothu KK, Kundi I, Moore P, Noiri E, Devarajan P: Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*. 2007 Dec 19; [Epub ahead of print]
- 5) Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinugawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Gotoh M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T: Renal L-type fatty acid: binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol*. 18: 2894- 2902. 2007.
- 6) 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*. 96: 803-809. 2007.

- 7) 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.* 27: 99-105. 2007.
- 8) 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: 196-201. 2007.
- 9) 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.* 100: 904-913. 2007.
- 10) Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, Sakata R, Kumashiro R, Murohara T, Ueno T, Sata M: Significance and Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cell Transplantation in a Cirrhotic Liver Rat Model. *Gastroenterology.* 133: 91-107. 2007.
- 11) Saito Y, Sasaki K, Katsuda Y, Murohara T, Takeshita Y, Okazaki T, Arima K, Katsuki Y, Shintani S, Shimada T, Akashi H, Ikeda H, Imaizumi T: Effect of autologous bone marrow cell transplantation on ischemic ulcer in patients with Burger's disease. *Circ J.* 71: 1187-1192. 2007.
- 12) Yamada T, Kondo T, Numaguchi Y, Tsuzuki M, Matsubara T, Manabe I, Sata M, Nagai R, Murohara T: Angiotensin II Receptor Blocker Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Regulation of Smooth Muscle-like Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 2363-2369. 2007.
- 13) Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 365: 279-284. 2008.
- 14) Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Murohara T. Role of bradykinin, nitric oxide and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension.* 51: 252-258. 2008.
- 15) Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Costantini F, Murohara T, Takahashi M. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol.* 2008 (in press).
- 16) Suga H, Nagasaki H, Kondo T, Okajima Y, Suzuki C, Ozaki N, Arima H, Yamamoto T, Ozaki N, Akai M, Sato A, Uozumi N, Inoue M, Hasegawa M, Oiso Y: Novel treatment

- for nephrogenic diabetes insipidus using the Sendai-virus vector
Endocrinology. 2008 (in press).
- 17) Wong MG, Suzuki Y, Tanifuji C, Akiba H, Okumura K, Sugaya T, Yamamoto T, Horikosh S, Tan SY, Pollock C Tomino Y : Peritubular ischemia contributes more to tubular damage than proteinuria in immune-mediated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 19: 290-29. 2008.
 - 18) Ozaki T, Anas C, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ito Y, Gotoh M, Yuzawa Y, Matsuo S: Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl*. Sept5;(Epub ahead of print) .2007.
 - 19) Tanaka T, Noiri E, Yamamoto T, Sugaya T, Negishi K, Maeda R, Nakamura K, Portilla D, Gotoh M, Fujita T: Urinary human L-FABP is a potential biomarker to predict COX-inhibitor-induced renal injury. *Nephron Exp Nephrol*. 108(1):e19-e26. 2008.
 - 20) Tercero C, Ikeda S, Uchiyama T, Fukuda T, Arai F, Okada Y, Ono Y, Hattori R, Yamamoto T, Negoro M, Takahashi I: Autonomous catheter insertion system using magnetic motion capture sensor for endovascular surgery. *Int J Med Robot*. 3:52-8. 2007.
 - 21) Anas C, Ozaki T, Maruyama S, Yamamoto T, Gotoh M, Ono Y, Matsuo S: Effects of Olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure. *Int J Urol*. 14(3):219-225. 2007.
 - 22) Takei Y, Nemoto T, Mu P, Fujishima T, Ishimoto T, Hayakawa Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T, Kadomatsu K : In vivo silencing of a molecular target by short interfering RNA electroporation:tumor vascularization correlates to delivery efficiency. *Mol Cancer Ther*. 7(1):211-21. 2008.
 - 23) Yamagata K, Iseki K, Nitta K, Imai H, Iino Y, Matsuo S, Makino H, Hishida A. : Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. *Clin Exp Nephrol*. 12(1):1-8. 2008.
 - 24) Aoyama T, Ishii H, Toriyama T, Takahashi H, Kasuga H, Murakami R, Amano T, Uetani T, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T : Sirolimus-eluting stents vs bare metal stents for coronary intervention in Japanese patients with renal failure on hemodialysis. *Circ J*. 72(1):56-60. 2008.
 - 25) Ishimoto T, Takei Y, Yuzawa Y, Hanai K, Nagahara S, Tarumi Y, Matsuo S, Kadomatsu K. : Downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 involving short interfering RNA attenuates hapten-induced contact hypersensitivity. *Mol Ther*. 16(2):387-95. 2007.
 - 26) Ozaki T, Anas C, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ito Y, Gotoh M, Yuzawa Y, Matsuo S : Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates

- ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 23(1):110-9. 2007.
- 27) Imai E, Horio M, Nitta K, Yamagata K, Iseki K, Tsukamoto Y, Ito S, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Modification of the modification of diet in renal disease (MDRD) study equation for Japan. *Am J Kidney Dis.* 50(6):927-37. 2007.
- 28) Imai E, Yamagata K, Iseki K, Iso H, Horio M, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Kidney disease screening program in Japan: history, outcome, and perspectives. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2(6):1360-6. 2007.
- 29) Matsuo S: CKD (chronic kidney disease). *Nippon Jinzo Gakkai Shi. Suppl 50th Ann:*67-72. 2007.
- 30) Dambara A, Morinaga T, Fukuda N, Yamakawa Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Matsuo S, Takahashi M.: Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation. *Exp Cell Res.* 313(17):3755-66. 2007.
- 31) Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Arata-Kawai H, Suzuki N, Kato N, Matsuo S, Kadomatsu K.: Midkine is involved in tubulointerstitial inflammation associated with diabetic nephropathy. *Lab Invest.* 87(9):903-13. 2007.
- 32) Mizuno M, Nozaki M, Morine N, Suzuki N, Nishikawa K, Morgan BP, Matsuo S: A protein toxin from the sea anemone *Phyllodiscus semoni* targets the kidney and causes a severe renal injury with predominant glomerular endothelial damage. *Am J Pathol.* 171(2):402-14. 2007.
- 33) Imai E, Horio M, Iseki K, Yamagata K, Watanabe T, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Hirakata H, Moriyama T, Ando Y, Nitta K, Inaguma D, Narita I, Iso H, Wakai K, Yasuda Y, Tsukamoto Y, Ito S, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Prevalence of chronic kidney disease (CKD) in the Japanese general population predicted by the MDRD equation modified by a Japanese coefficient. *Clin Exp Nephrol.* 11(2):156-63. 2007.
- 34) Matsuo S, Suzuki S, Tsukamoto Y, Kuriyama S, Moriyama T.: Chronic kidney diseases: progress in its diagnosis and treatment. Discussion. *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 96(5): 956-74. 2007.
- 35) Mizuno M, Blanchin S, Gasque P, Nishikawa K, Matsuo S: High levels of complement C3a receptor in the glomeruli in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 49(5):598-606. 2007.
- 36) Imai E, Horio M, Nitta K, Yamagata K, Iseki K, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Hirakata H, Watanabe T, Moriyama T, Ando Y, Inaguma D, Narita I, Iso H, Wakai K, Yasuda Y, Tsukamoto Y, Ito S, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Estimation of glomerular filtration rate by the MDRD study equation modified for Japanese patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 11(1):41-50. 2007.
- 37) Ishii H, Toriyama T, Aoyama T,

- Takahashi H, Yamada S, Kasuga H, Ichimiya S, Kanashiro M, Mitsuhashi H, Maruyama S, Matsuo S, Naruse K, Matsubara T, Murohara T: Efficacy of oral nicorandil in patients with end-stage renal disease: a retrospective chart review after coronary angioplasty in Japanese patients receiving hemodialysis. Clin Ther. 29(1):110-22. 2007.
- 38) Kinomura M, Kitamura S, Tanabe K, Ichinose K, Hirokoshi K, Takazawa Y, Kitayama H, Nasu T, Sugiyama H, Yamasaki Y, Sugaya T, Maeshima Y, Makino H: Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. Cell transplantation. 2008 (in press).
- 39) Negishi K, Noiri E, Maeda R, Portilla D, Sugaya T, Fujita T: Renal L-type fatty acid-binding protein mediates the bezafibrate reduction of cisplatin-induced acute kidney injury. Kid Int. 2008 (in press).
- 40) Negishi K, Noiri E, Sugaya T, Li S, Megyesi J, Nagothu K, Portilla D: A role of liver fatty acid-binding protein in cisplatin-induced acute renal failure. Kid Int 72:348-358. 2007.
- 41) 山本徳則, 菅谷健, 野入英世, 山田伸, 上平修, 絹川常郎, 小松智徳, 松川宣久, 吉野能, 服部良平, 大島伸一, 後藤百万: 新しい腎虚血バイオマーカー: Renal L type-FABP (L-FABP). 日本腎予防医学研究会雑誌. 掲載予定. 2008.
- 42) 山本徳則: 腎後性のAMI. 臨床雑誌『内科学』. 102(1):掲載予定. 2008.
2. 学会発表
- 1) Negishi K, Noiri E, Sugaya T, Maeda R, Yokura M, Taniguchi H, Sinozaki N, Fujita T, Ohshima S: Renal tubular epithelial stem-like cell transplantation rescues lethal cisplatin induced renal injury in mice. American Society of Nephrology Renal Week 2007. San Francisco. 2007.
- 2) Sugaya T, Maeda R, Yokura M, Taniguchi H, Sinozaki N, Fujita T, Ohshima S, Noiri E, Negishi K: Side population of mProx; renal tubular epithelial stem-like cell and resistance to cisplatin induced cytotoxicity. American Society of Nephrology Renal Week 2007. San Francisco. 2007.
- 3) Sassa N, Hattori R, Ono Y, Yamamoto T, Gotoh M: Direct visualization of renal hemodynamics affected by carbon dioxide pneumoperitoneum. 102nd Annual Meeting of American Urological Association. May. 2007
- 4) Sassa N, Hattori R, Yamamoto T, Gotoh M: Renal hemodynamics affected by CO2 pneumoneum with direct visualization. 13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Sep. 2007.
- 5) Urahama Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Fujimoto T, Matsuo S: Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from apoptosis induced by fatty acids. 40th Annual Meeting of the American Society of

- Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
- 6) Kasuga H, Ishii H, Nishio M, Fujita Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Murohara T, Matsuo S : Impact of renal dysfunction on uptake of F-18 fluorodeoxyglucose on positron emission tomography in arterial plaques. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 7) Yasuda K, Maruyama S, Ozaki T, Iwashima S, Kasuga H, Toriyama T, Kawahara H, YuzawaY, Matsuo S : Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 8) Ozaki T, Maruyama D, Watanabe T, Iwashima S, Yasuda K, Yamamoto T, Kitagawa Y, Gotoh M, YuzawaY, Matsuo S : Adipose derived stromal cells cultured in low-serum media secrete high levels of cytokines and ameliorate acute kidney injury. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 9) Yasuda K, Maruyama S, Ozaki T, Watanabe T, Iwashima S, Yamamoto T, Yuzawa Y, Gotoh M, Matsuo S : Novel autologous cell therapy for cisplatin induced acute kidney injury by using adipose derived stromal vascular fraction. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 10) Imai E, Horio M, Yamagata K, K Iseki, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Tsukamoto Y, Ito S, Makino H, Hishida A, Matsuo S : GFR decline rate of Japanese general population: A 10 Year follow-up study. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 11) Yamada T, Ueda T, Ito M, Fujita Y, Kasuga H, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S : Silent brain infarction predicts cardiovascular events and mortality in long-term hemodialysis patients. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 12) Ueda T, Ito M, Fujita Y, Kasuga T, Toriyama T, Kawahara H, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S : Ankle brachial pressure index (ABPI) but not pulse wave velocity (PWV) is individually useful for risk stratification of systemic arteriosclerotic events in hemodialysis (HD) patients. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31–Nov.5. 2007.
 - 13) Fujita Y, Ueda T, Ito M, Kasuga H, Toriyama T, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S : High prevalence of cardiac valve calcification and its association with future cardiovascular morbidity and mortality in end-stage renal disease patients at beginning of hemodialysis therapy. 40th Annual Meeting of the American Society of

- Nephrology. San Francisco.
Oct. 31–Nov. 5. 2007.
- 14) Iwashima S, Maruyama S, Ozaki T, Yasuda K, Kasuga H, Toriyama T, Kawahara H, Yuzawa Y, Matsuo S: Cardiac troponin T predicts long-term cardiovascular morbidity and mortality in chronic kidney disease patients on maintenance hemodialysis. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct. 31–Nov. 5. 2007.
- 15) Kosugi T, Kato N, Yuzawa Y, Kadomatsu K, Matsuo S: Transmembrane glycoprotein, basigin (CD147), is involved in the pathogenesis of renal fibrosis. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct. 31–Nov. 5. 2007.
- 16) Watanabe M, Kinashi H, Wakai K, Mizuno M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S: Kidney dysfunction is significantly accelerated in patients who developed ischemic stroke. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct. 31–Nov. 5. 2007.
- 17) Sato W, Heinig M, Roncal C, Yuzawa Y, Wei M, Reungjui S, Gersch M S, Croker B, Matsuo S: eNOS deficiency as a mechanism for development of mesangiolytic, glomerular microaneurysms and nodular glomerulosclerosis in the mouse kidney. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct. 31–Nov. 5. 2007.
- 18) Horio M, Imai E, Nitta K, Yamagata K, Iseki K, Tsukamoto Y, Ito S, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Modification of the IDMS MDRD study equation for Japanese. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct. 31–Nov. 5. 2007.
- 19) Ozaki T, Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, Yasuda K, Ishii H, Takahashi H, Kasuga H, Ito M, Kimura K, Toriyama T, Ito Y, Yuzawa Y, Kawahara H, Matsuo S: Circulating CD34-positive cells and the prognosis in chronic hemodialysis patients. The 2nd Research Forum on Chronic Kidney Disease. Nagoya. Feb. 2. 2008.
- 20) 山本徳則, 菅谷健, 岡本理志, 與倉みどり, 谷口英樹, 小野佳成, 吉野能, 服部良平, 大島伸一, 後藤百万: 尿中落下細胞からの尿細管上皮前駆様細胞の培養と腎障害治療—腎微小循環からの見地の臨床と基礎—. 第95回日本泌尿器科学会. 神戸. 4月14–17日. 2007.
- 21) 佐々直人, 服部良平, 山本徳則, 小野佳成, 後藤百万: 気腹圧が腎微小循環に与える影響. 第95回日本泌尿器科学会総会. 神戸. 4月14–17日. 2007.
- 22) 佐々直人, 山本徳則, 服部良平, 後藤百万: 移植腎血流再開早期の尿中落下細胞からの尿細管前駆様細胞の培養と治療応用. 第43回日本移植学会総会. 仙台. 11月22–24日. 2007.
- 23) 安田香, 丸山彰一, 尾崎武徳, 岩島重二郎, 渡辺達人, 坂洋祐, 山本徳則, 湯澤由紀夫, 北川泰雄, 松尾清一: シスプラチン急性腎不全モデルに対する自己脂肪由来細胞を用いた新たな細胞療法. 第7回日本再生医療学会総会. 名古屋. 3月

- 13-14 日. 2008.
- 24) 坂洋祐, 丸山彰一, 岩島重二郎, 渡辺達人, 安田香, 尾崎武徳, 湯澤由紀夫, 北川泰雄, 松尾清一: 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた低血清培養法の検討. 第 7 回日本再生医療学会総会. 名古屋. 3 月 13-14 日. 2008.
- 25) 安田宜成, Cohen CD, Nelson PJ, Schloendorff D, 松尾清一, Kretzler M: Conserved expression signatures in murine and human disease imply a shared transcriptome regulated in renal damage. 第 50 回日本腎臓学会学術総会. 浜松. 5 月 25-27 日. 2007.
- 26) 加藤規利, 小杉智規, 湯澤由紀夫, 門松健治, 松尾清一: 腎虚血再灌流モデルにおける Basigin (CD147) の関与. 第 50 回日本腎臓学会学術総会. 浜松. 5 月 25-27 日. 2007.
- 27) 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. 第 50 回日本腎臓学会学術総会. 浜松. 5 月 25-27 日. 2007.
- 28) 丸山彰一, 田口明彦, 岩島重二郎, 尾崎武徳, 春日弘毅, 松尾清一: A reduced number of circulating CD34-positive cells is a strong predictor of cardiovascular events in chronic hemodialysis patients. 第 50 回日本腎臓学会学術総会. 浜松. 5 月 25-27 日. 2007.
- 29) 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 34 回日本臓器保存生物医学会 定期学術集会. 札幌. 11 月 16 日. 2007.
- 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) 平成 20 年 1 月特許査定完了 (成立)
- 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 (株) バイオリンク:
- 1) PCT/JP2007/065375 : 腎臓幹/前駆細胞の分離方法及び腎臓幹/前駆細胞、並びに腎疾患治療薬 (出願日平成 18 年 8 月 6 日)
2. 実用新案特許
- なし
3. その他

臍型自家脂肪腎皮膜下移植後細胞注入法

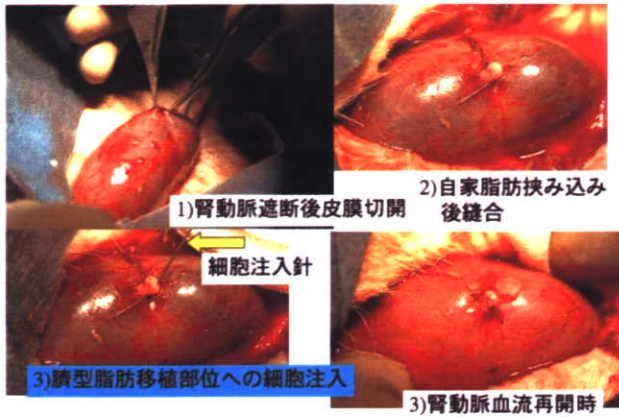


図 2-1

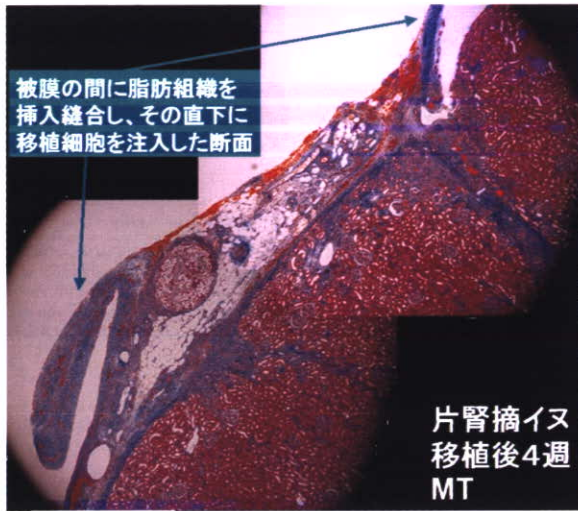


図 2-2

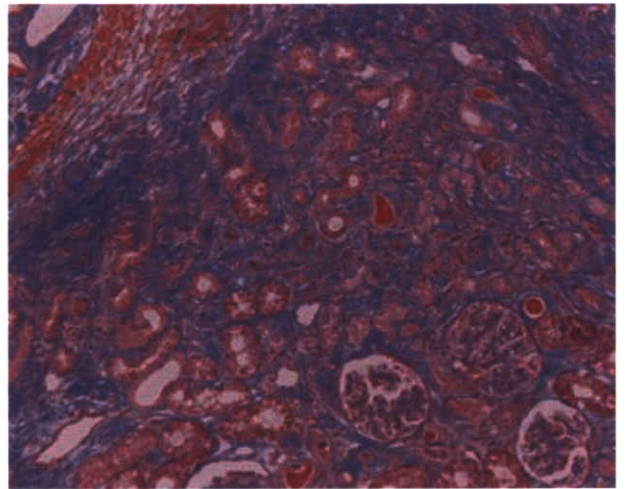


図 2-3

尿中落下細胞投与群における腎機能の推移

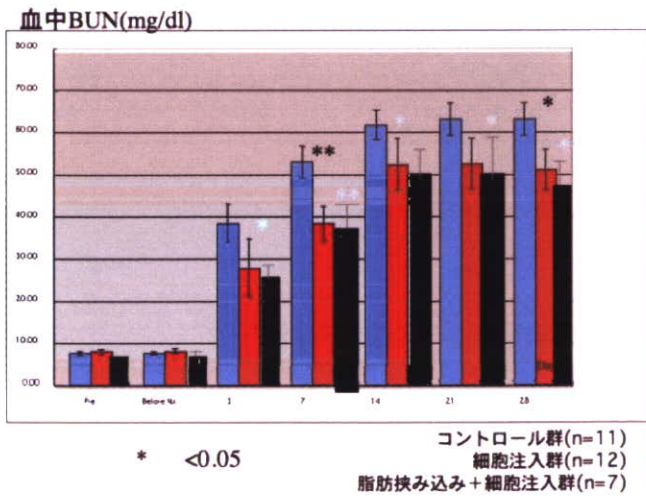


図 2-4

尿中落下細胞投与群における腎機能の推移

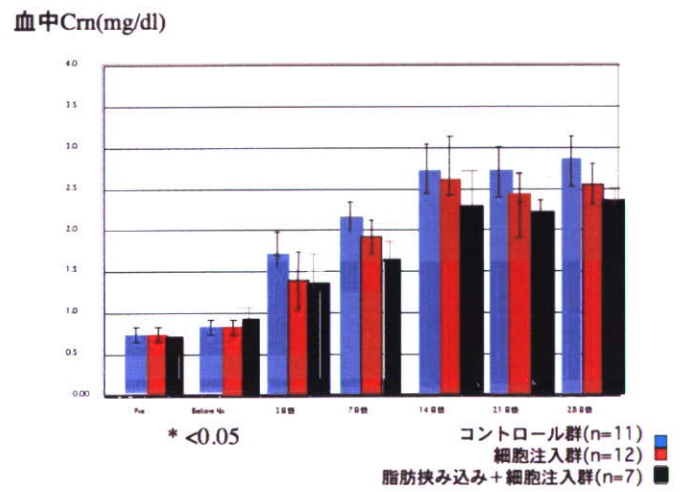


図 2-5

図1 Processes of SVF preparation

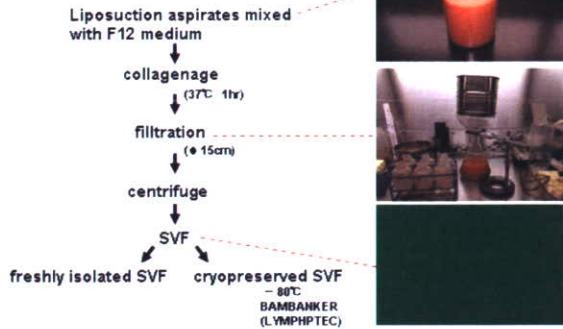
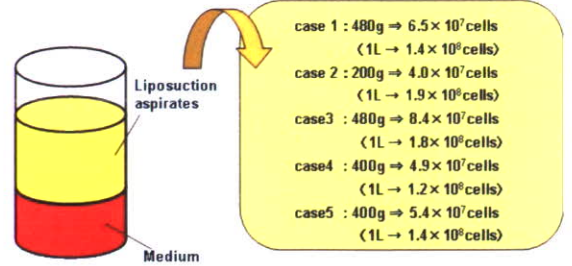


図 4 - 1

図2 Number of cells retrieved from liposuction aspirates

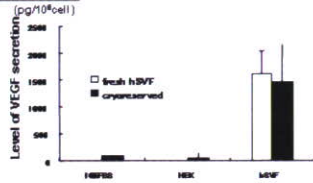


The number of nucleate cells in SVF were $1.63 \pm 0.40 \times 10^8$ per 1L of adipose potion.

図 4 - 2

図3 Viability of freshly isolated SVF and cryopreserved SVF:

(2) VEGF secretion



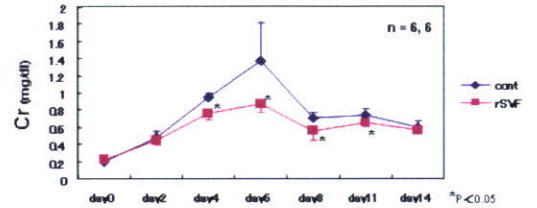
Growth factor secretion and surface antigen expression in freshly isolated SVF and cryopreserved SVF were examined. Growth factor secretion was determined by ELISA test.

(3) Surface antigen expression

FACS analysis showed that the rates of CD34 positive cells were 15-45% in fresh isolated SVF whereas the rate was 15% in cryopreserved SVF.

図 4 - 3

図4 The creatinine levels of cisplatin nephropathy



SVF cells protected cisplatin-treated rat from a deterioration in renal function. SVF cells were purified from the adipose tissue of a male F344 rat and injected under the renal subcapsule (1X10⁶ cells) of a male F344 rat 2days after cisplatin (7 mg/kg subcutaneously). Blood creatinin (Cr) levels were measured at different time intervals. Data are mean ± SD.

図 4 - 4

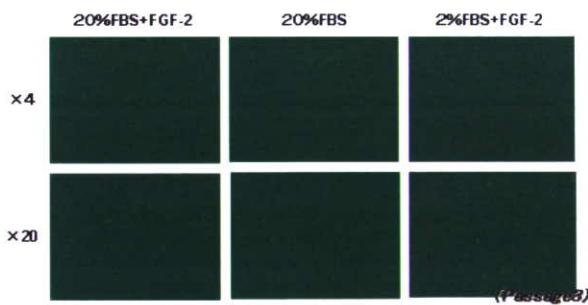


図5 高血清培養法(FGFありなし両方)では低血清培養法と比べて早期より結核状の形態変化が起こる。

図 4 - 5

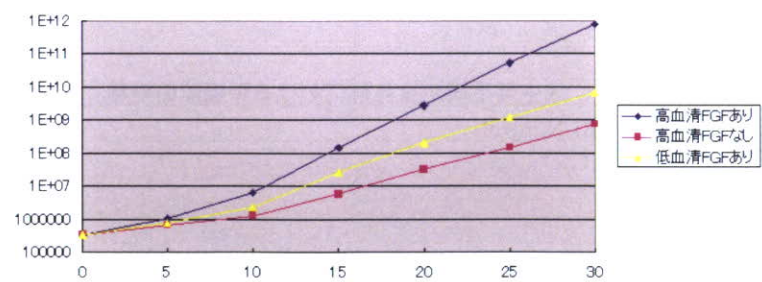


図 4 - 6

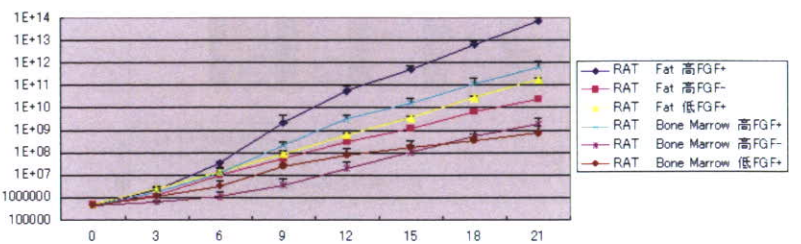


図 4 - 7

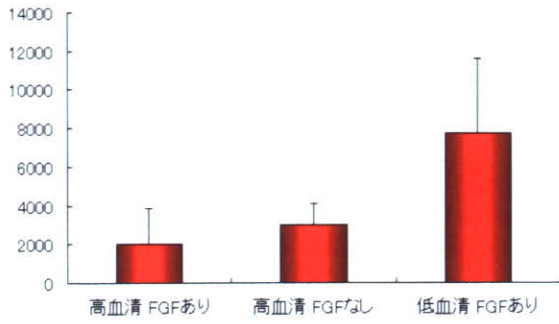


図 4-8

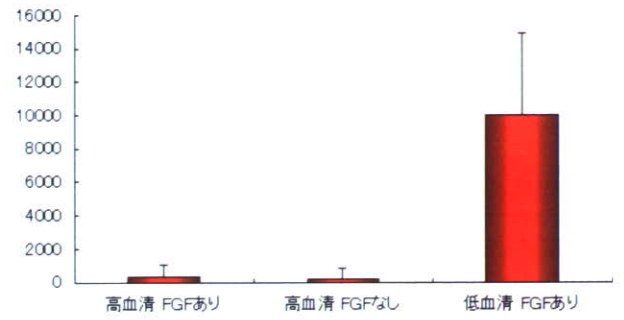


図 4-9

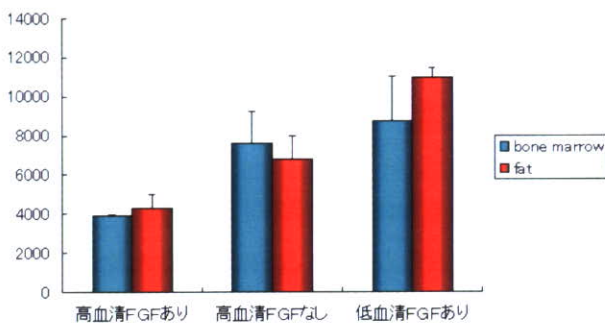


図 4-10

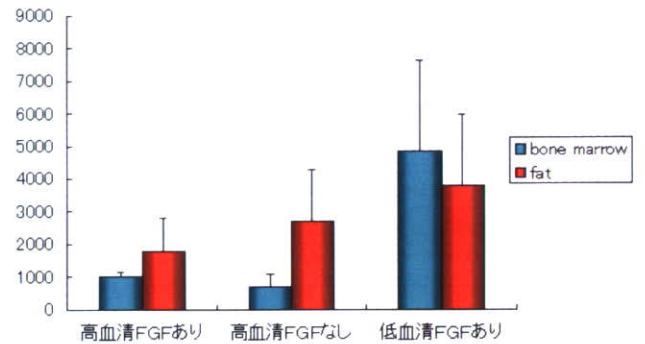


図 4-11

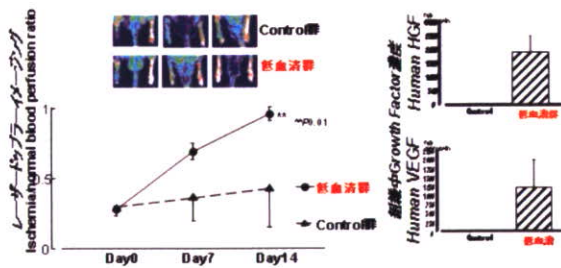


図12. 低血清培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞による下肢虚血(ASO)モデルの治療効果の検討

図 4-12

表 4-1 Characteristic of human adipose-derived cells

	Present study (average)*	Yoshimura	Zuk	Gronthos	Lee	David
Passage	0	0	2	2	2	2
Antibody CD13	39.56	20	99	99	-	-
CD31	19.88	16	2.22	1	-	2
CD34	36.98	28	3.55	28	0	0
CD45	36.55	28	2.52	0	-	1.4
CD90	48.42	25	25.96	-	98.3	98.85

* In the present study, cell surface antigens of SVF freshly isolated from nine patients were examined.

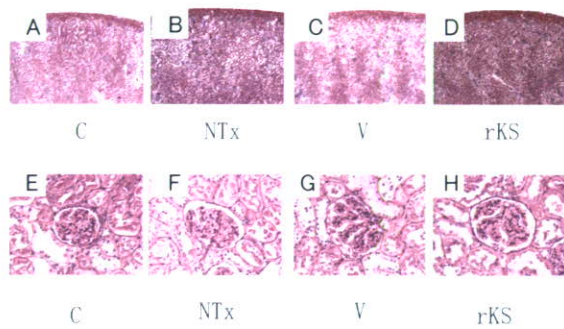


図 5-1 片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおける腎障害評価と rKS56-lacZ 細胞投与における細胞生着の検討 (PAS 染色) : 5 週後。慢性腎不全誘導 5 週後の blu-gal 染色と PAS 染色の二重染色像を示す。コントロール群における腎障害は認められず (A : 皮質、E : 糸球体部)、片腎摘群においても障害は軽度であるが

(B : 皮質、F : 糸球体部)、片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいても皮質、糸球体でも障害の程度はあまり変化なく (C : 皮質、G : 糸球体部)、rKS56-lacZ 細胞投与群において、blu-gal 陽性の細胞もあまり認められなかった (D : 皮質、H : 糸球体部)。

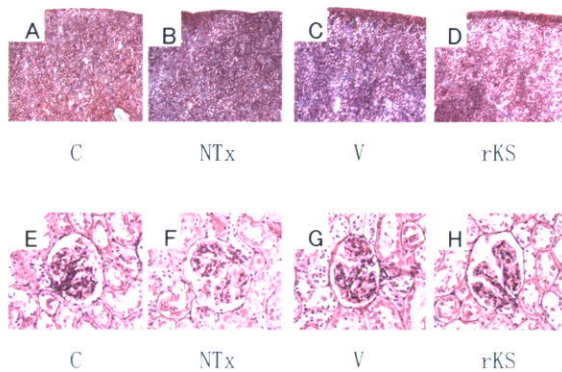


図 5-2 片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおける腎障害評価と rKS56-lacZ 細胞投与における細胞生着の検討 (PAS 染色) : 10 週後。慢性腎不全誘導 10 週後の blu-gal 染色と PAS 染色の二重染色像を示す。5 週後と比べ腎障害の程度はあまり変化は認められず、コントロール群における腎障害は認められず (A : 皮質、E : 糸球体部)、片腎摘群においても障害は軽度であるが (B : 皮質、F : 糸球体部)、片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいても皮質、糸球体でも障害の程度はあまり変化なく (C : 皮質、G : 糸球体部)、rKS56-lacZ 細胞投与群において、blu-gal 陽性の細胞もあまり認められなかった (D : 皮質、H : 糸球体部)。

(B : 皮質、F : 糸球体部)、片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいても皮質、糸球体でも障害の程度はあまり変化なく (C : 皮質、G : 糸球体部)、rKS56-lacZ 細胞投与群において、blu-gal 陽性の細胞もあまり認められなかった (D : 皮質、H : 糸球体部)。

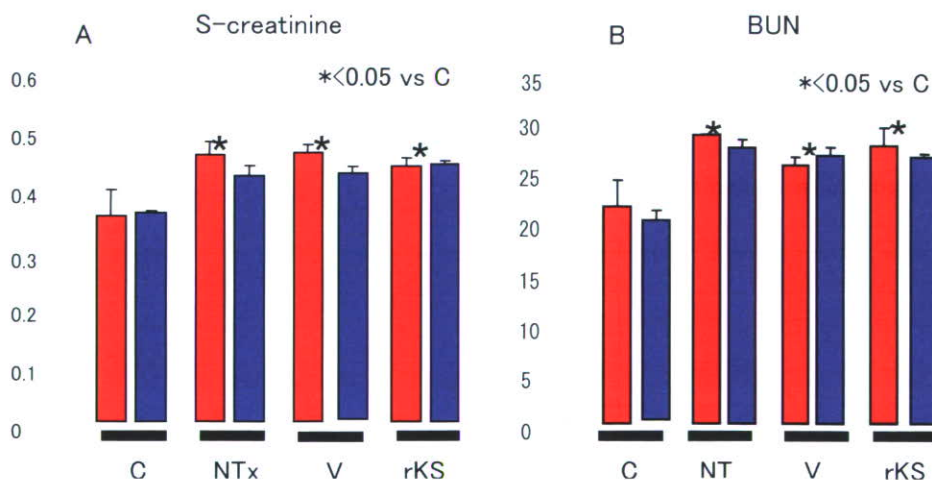


図 5-3 rKS56-LacZ 細胞治療による腎機能 (BUN・Cr) の改善効果。片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいて、片腎摘群 (N) で軽度腎機能の経時的低下

傾向が認められ、片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいても軽度腎機能の経時的低下傾向が認められたが、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。

C:コントロール、Ntx:片腎摘群、V:片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデル+生食投与群、rKS:片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデル+rKS56-LacZ 細胞・被膜下投与群。

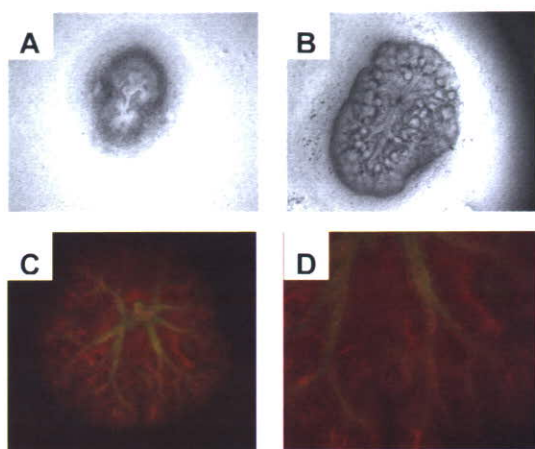


図 5-4 胎生 13 日目の腎臓を使用した organ culture。A: 胎生 13 日目の腎臓、B: transwell 上で 4 日培養した腎臓、C: 培養 4 日後の腎臓の PNA、DB 染色像 (赤: PNA、緑: DB)。D: 強倍率像 (赤: PNA、緑: DB)。

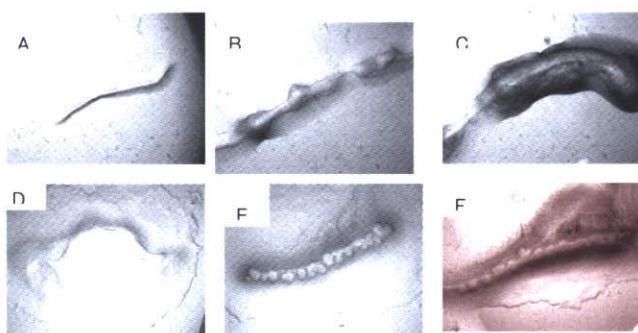


図 5-5 ウォルフィアン管 (WD) の初期発芽の検討。A: 中胚葉組織を取り除いた WD、B: 中胚葉組織を軽度取り除いた WD、C: 中胚葉組織を取り除いていない WD、transwell 上培養 4 日後; D: 中胚葉組織を取り除いた WD、E: 中胚葉組織を軽度取り除いた WD、F: 中胚葉

組織を取り除いていない WD

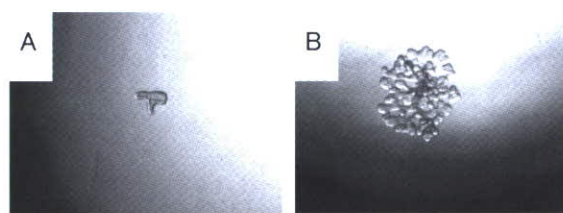


図 5-6 尿管芽 (UB) 培養。A: 胎生 13 日目の尿管芽、B: 培養 7 日後の UB、培養条件: BSN-CM + 10 % FCS+GDNF (125ng/ml) + FGF- b (125ng/ml) + 1 % antibiotics。

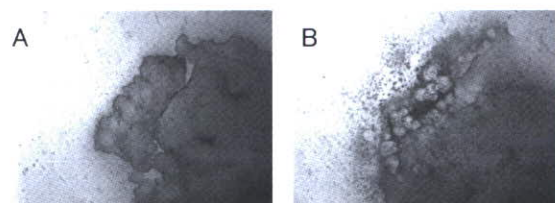


図 5-7 後腎発生系間葉系幹細胞 (MM) の上皮化誘導。A: MM と胎生 13 日目の神経管 (spinal code) の共培養。B: 培養 3 日目: MM の部分にコンマシェイプ・ボディが観察され、上皮化が

誘導されている。

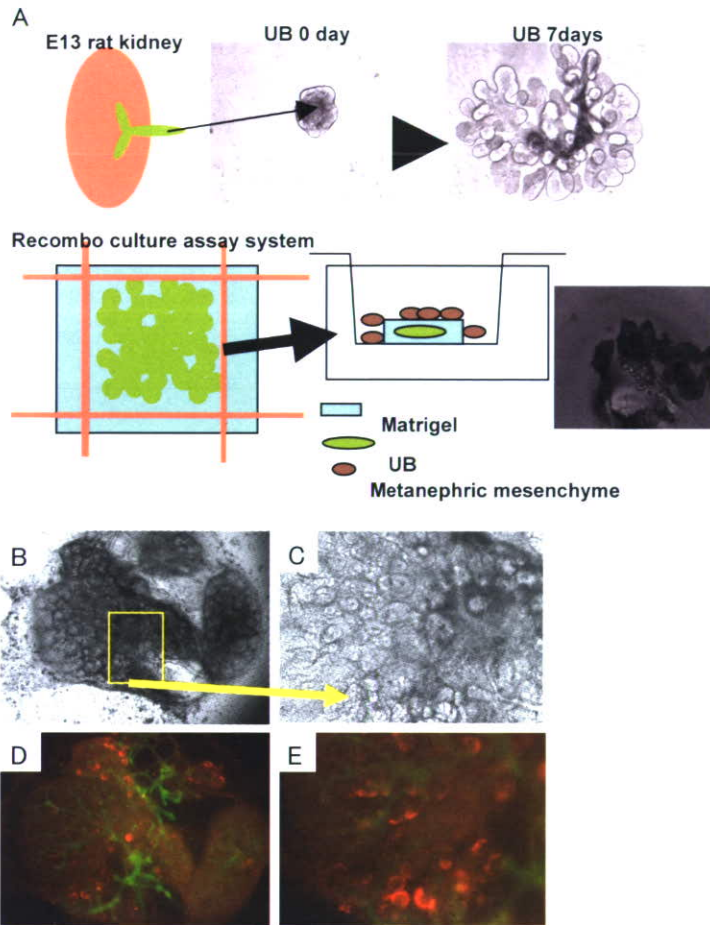


図5-8 recomboculture assay system.

A: 胎生期 13 日目の UB を培養し、数分枝するまで成長させ、マトリゲルから取り出し、transwell 上で成長した UB と MM 組織を共培養することにより、腎臓発生を再現した。B: 培養 7 日目の人工腎臓。MM の部分にコンマシェイプ・ボディが確認され、MM が分化誘導されている。また UB も分枝は促進し、相互作用により、腎臓形成が促進されている。(C: 強倍率) D: 人工腎臓の染色像。赤: PNA, 緑: DB。E: 強倍率像。

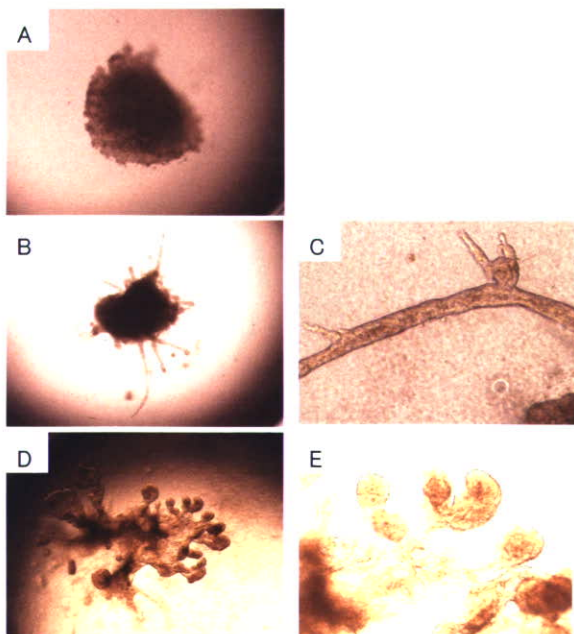


図 5-9 rKS56 細胞を使用した組織構築能 (in vitro)。A: ハンギング・ドロップ法を用いて rKS56 細胞を細胞塊にした。B: rKS56 細胞をマトリゲル内にて培養 (K-1medium + MCS supernatant)。管腔構造形成が認められる。D: 強倍率、E: rKS56 細胞をマトリゲル内にて培養 (K-1medium + MCS supernatant + GDNF (250ng/ml) + FGF- β (250ng/ml) + HGF (250ng/ml) + BMP-7 (250ng/ml) + 1% antibiotics)。

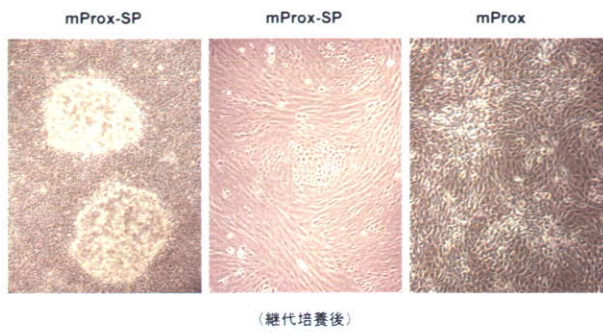


図 6-1

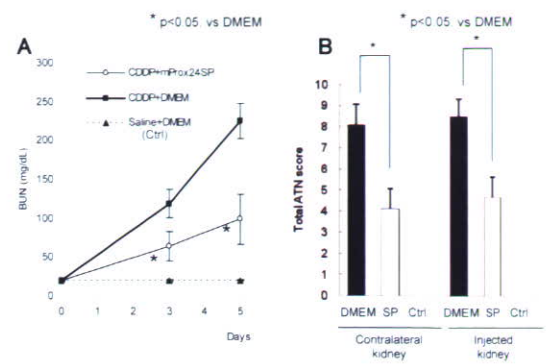


図 6-4



図 6-2

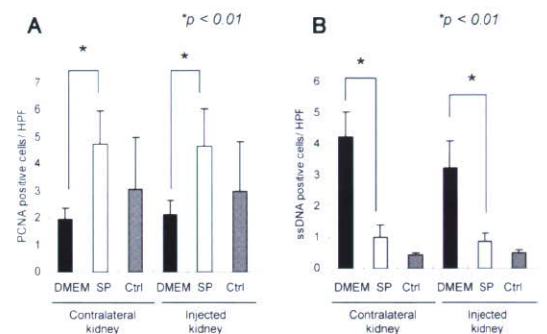


図 6-5

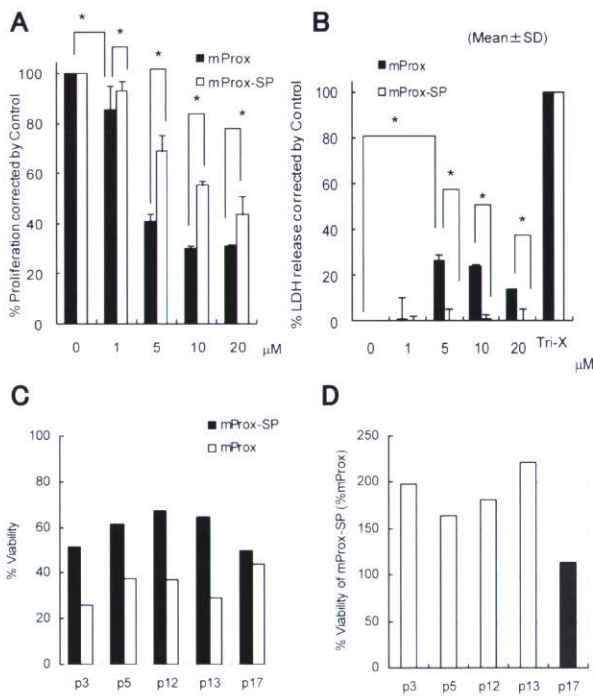
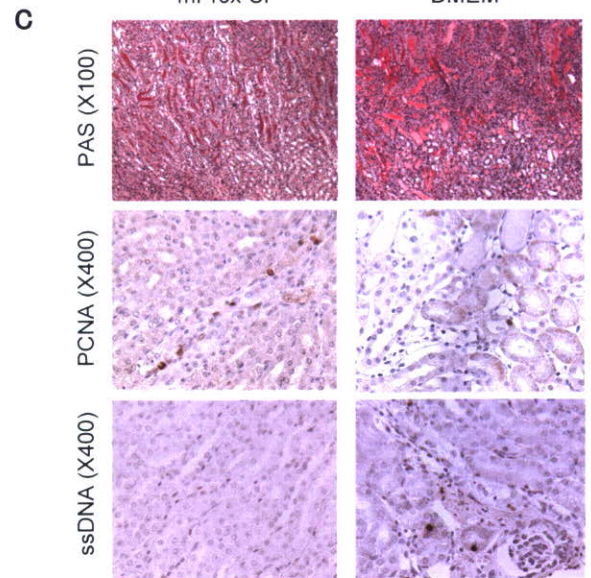


図 6-3



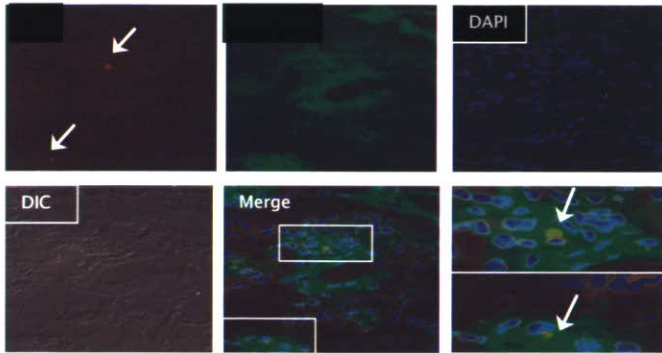


图 6-6

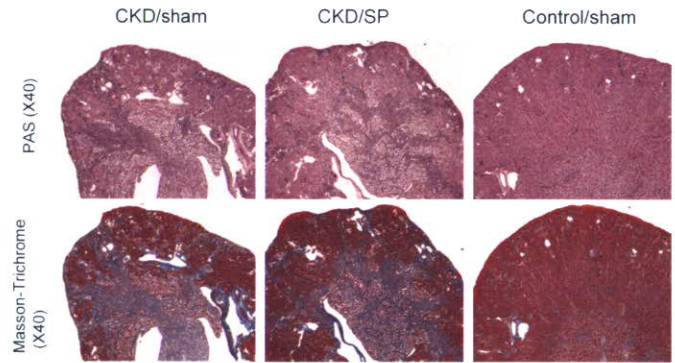
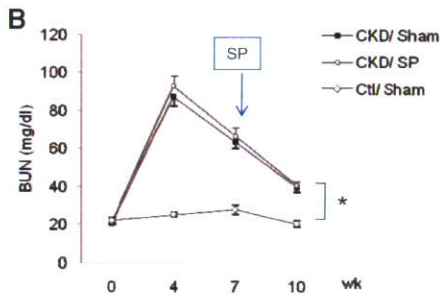
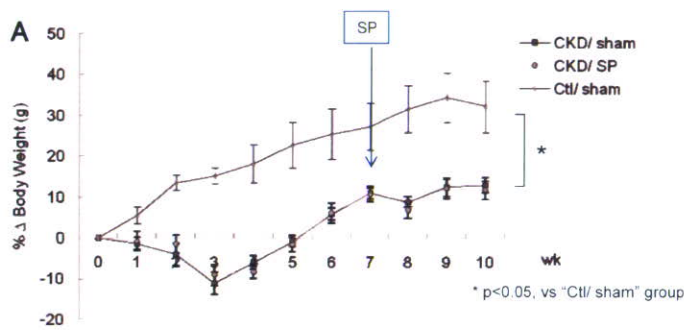


图 6-8

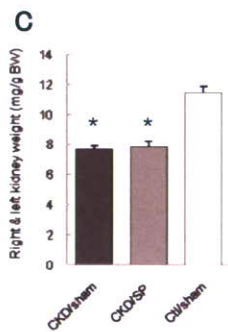


图 6-7

	Passage	BUN at day3 (t-test)	Survival Rate (Kaplan-Meier)
1 st	P2-P5	p<0.05	p<0.05
2 nd	P5-P8	p<0.05	N. D. (Sacrificed at day5)
3 rd	P21	N. S.	N. S.

表 6-1

厚生労働科学研究費補助金（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
後藤百万・山本徳則
松尾清一
楨野博史
野入英世