

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

ヒト腎臓由来幹細胞採取、培養方法の標準化に関する検討

分担研究者 篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院 角膜センター センター長
分担研究者 菅谷 健 東京歯科大学市川総合病院 角膜センター 客員講師
分担研究者 谷口 英樹 横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学 教授
研究協力者 與倉 みどり 東京歯科大学市川総合病院 角膜センター 客員研究員
研究協力者 岡本 理志 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
臓器再生研究ユニット 研究員

研究要旨

(1) セルプロセッシングチームはヒト腎疾患患者尿（全 42 例）およびイヌ尿中（全 43 例）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。
(2) 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バイオマーカーL-FABP および B-FABP の検出系を確立した。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、尿中排泄のメカニズムの解明を報告 (Yamamoto T et al., JASN, 2007) した。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。
(3) 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。細胞移植部位の線維化は不可避であったものの、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。

A. 研究目的

本研究は、腎障害の重症化防止を達成し、幹細胞移植による残存腎機能の再構築を目指す実用化研究である。近年、腎臓にも組織性幹/前駆細胞の存在が示唆されているが、この細胞を腎疾患患者本人から効率的に採取できれば、腎疾患に対する自己細胞移植に応用できると考えられる。

昨年度の本分担研究グループでは腎疾患患者の尿から腎臓幹/前駆細胞を効率よく単離し、培養条件を標準化した。本年度は、1) 腎疾患患者尿中から樹立するヒト腎臓幹/前駆細胞数を昨年比倍増させる数値目標、2) 樹立細胞の安全性評価法の確立と、引き続き他の分担研究グループに移植用細胞

として提供することを目標とした。

B. 研究方法

(1) 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、培養を効率化しう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ールに準じた。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。

(3) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞

(3-1) 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℃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。

まずmProx24細胞を用いて幹細胞が存在すると考えられているSP fractionをフローサイトメトリーによるsingle cell sortingを行い、1個ずつの細胞についてクローナルな培養を行った。詳細には、上述のmProx24細胞を1×10⁶個/mlに調製しヘキスト33342(Molecular Probe)を5mg/mlとなるように添加した。その後、細胞を37℃で1時間、振盪培養した後、蛍光活性化セルソーター(BD FACS Aria、Beckton Dickinson)を用いてSP細胞の解析、分離を行った。

(3-2) マウス移植細胞の安全性評価のための遺伝子発現解析

マウス尿細管上皮細胞株を培養し、ある

一定の細胞数まで増殖したところでTrypsin(GIBCO)処理により細胞を回収して、細胞の核染色剤であるHoechst33342(DOJINDO)を用いて染色を行う。このとき、Reserpine(Sigma)を添加したものを準備してネガティブコントロールとする。次に、セルソーターを用いて、染色した細胞から幹細胞が存在すると言われているSP(Side Population)分画を単離する。セルソーティングにより得られたSP細胞を96穴プレート(BD Falcon)に播種し、一定期間(約2週間)培養を行う。SP細胞のなかには、細胞の経上皮輸送能を示唆するドーム形成を示すコロニーも観察できる。次に、ある一定の細胞数まで増殖したコロニーを6穴プレート(BD Falcon)へ継代培養を行う。以上の実験で得られた、マウス尿細管上皮細胞株のSP分画由来のSP細胞を2検体、ドーム形成を示したSP細胞を2検体、ソーティングを行っていないマウス尿細管上皮細胞株を2検体準備する。それぞれの細胞よりIsogen(ニッポンジーン)を用いてTotal RNAを抽出し、RNeasy Micro Kit(QIAGEN)を用いてTotal RNAの精製を行う。Total RNAからcRNAを合成し、Affymetrix GeneChip(AFFYMETRIX)を用いて遺伝子発現解析を行う。

(倫理面への配慮)

ヒト生体試料の採取と個人情報の取り扱いに関しては、理化学研究所、名古屋大学医学部附属病院および社会保険中京病院における倫理委員会に諮り承認を得た。動物実験については、共同研究施設である東京大学医学部動物実験施設における規定に準じて行った。

C. 研究結果

(1) 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)。

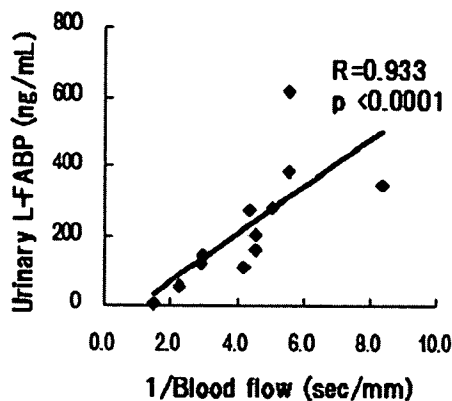


図 1-1 ヒト尿細管周囲血流と尿中 L-FABP との相関 (尿中 NAG, α 1MG, β 2MG と血流の間には有意な相関は認められなかった)

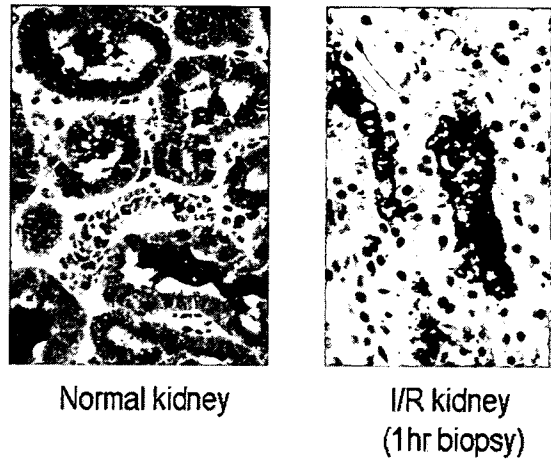


図 1-2 ヒト腎生検の L-FABP 免疫染色像

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)。

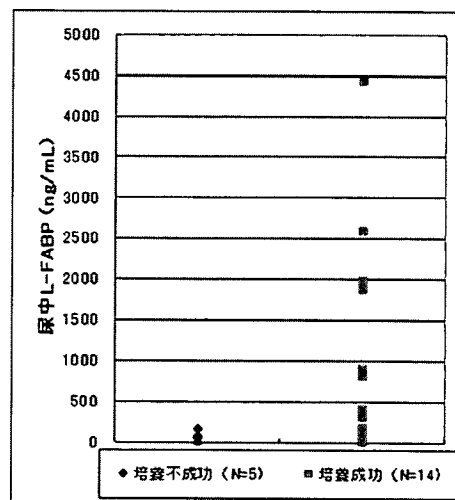


図 1-3 ヒト尿中 L-FABP と尿中落下細胞の培養成否との関係

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）、Aminopeptidase A、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。

表 1-1 尿中落下由来腎特異的幹/前駆細胞の遺伝子発現

Expression of nephron marker genes (DNA array data)

	Gene expression in		Intensity ratio of HUJC/HEK293T
	HUJC	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
H ⁺ /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 (NCKX1)	-	-	-
Collecting duct markers			
Epithelial Na ⁺ channel alpha	-	-	-
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter, SLC4A1	-	-	-
Aquaporin 2	-	+	-

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。

表 1-2 尿中落下細胞の遺伝子発現

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		

(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。

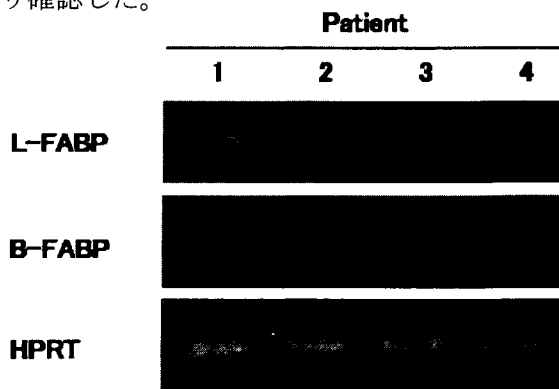


図 1-4 ヒト尿中落下由来腎特異的幹/前駆細胞の腎癌関連遺伝子 B-FABP 発現の探索

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。

(3) マウス腎臓幹/前駆細胞

(3-1) マウス腎臓幹/前駆細胞の培養方法の標準化

mProx24細胞のsingle cell sortingによるSP細胞のクローナルな培養を繰り返して実施したところ、マウス間葉系細胞培養上清を添加(図3-1●)する場合と、添加しない(図3-1○)場合とでは、SP分取率やコロニー形成率には差異がないが、ドーム形成比率とその維持日数に大きな違い

が出るようになった。以上より、本研究においては、腎臓幹/前駆細胞が一定の割合で自己複製能を保ちながら、分化した尿細管機能を維持するためには、間葉系細胞上清が必須であると考えられた。

Effect of murine mesenchymal cells secreting factor on dome-formation of mProx24-SP cells

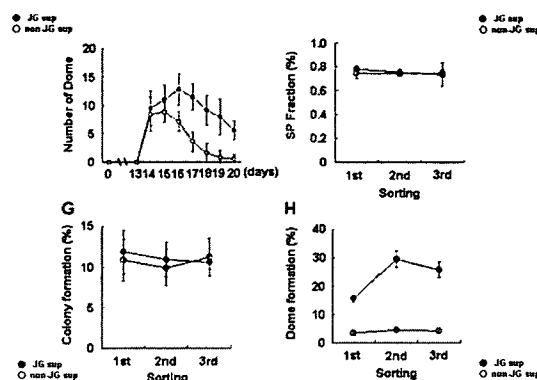


図3-1 マウス間葉系細胞上清のドーム形成に対する効果

(3-2) マウス移植細胞の安全性評価

mProx24-SP細胞の安全性評価の指標となりうる発現遺伝子を同定するために、マウス腎臓間葉系細胞株、cell sortingを行う以前のmProx24細胞、および複数回のSP sortingを行いSP分取率が一定に維持されている状態のmProx24-SP細胞からそれぞれ下図のごとくRNAを抽出した(図3-2)。

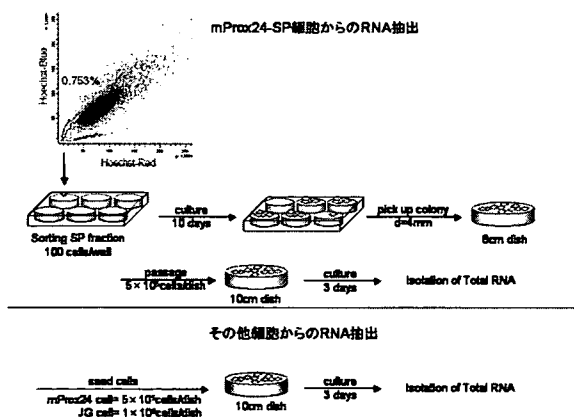


図3-2 mProx24-SP細胞からのRNA抽出

最近、SP 細胞の分取率が高いヒト胃癌細胞株における未分化性と、Cancer stem like cells; CSLCs の存在比が正相関する可能性が提唱された (Matsuzaki 2007)。mProx24-SP 細胞のみで誘導が見られる遺伝子には腎癌細胞特異的に発現する癌抑制遺伝子として知られている転写因子も含まれており、今後安全性評価の指標として、これら発現遺伝子の有効性を検証したい。

D. 考察

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

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. 研究発表

1) 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. *Kidney Int.* 72: 348-358, 2007

2) 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

3) 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

4) Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamiyo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol.* 18(11):2894-2902, 2007

5) 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

6) Wong MG, Suzuki Y, Tanifuji C, Akiba H, Okumura K, Sugaya T, Yamamoto T, Horikoshi S, Tan SY, Pollock C, Tomino Y. Peritubular ischemia contributes more to tubular damage than proteinuria in immune-mediated glomerulonephritis. *J*

Am Soc Nephrol. 2007 Dec 19; [Epub ahead of print]

7) 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]

8) Tanaka T, Noiri E, Yamamoto T, Sugaya T, Negishi K, Maeda R, Nakamura K, Portilla D, Goto M, Fujita T. Urinary human L-FABP is a potential biomarker to predict COX-inhibitor-induced renal injury. *Nephron Exp Nephrol.* 108:e19-e26, 2008

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

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）

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

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？

分担研究者 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

研究協力者 新谷 理 名古屋大学医学部循環器内科・助教

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、重症下肢虚血に対し有効な治療効果を認めた細胞移植血管再生療法が、腎不全・腎障害に対しても機能改善効果が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、経静脈的あるいは腎実質内へ直接法で骨髄単核球細胞 (BM-MNCs) 及び骨髄由来間葉系細胞 (BM-MSCs) を移植したが、蛋白尿・血清クレアチニンの改善がみられず、組織学的にも変化を認めなかった。我々の検討では、骨髄幹細胞移植による治療効果が見られなかったが、生着効率を上げる移植法の開発により、移植細胞が治療効果を発揮する可能性はあると考えた。

今回我々は、磁性ナノ粒子 (magnetic nanoparticles) を用いた細胞シートの作成に成功し、治療効果の検討を行なった。磁性ナノ粒子を用いることで 3 次元ヒト間葉系幹細胞シート (hMSC シート) を作成することができ、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。また、hMSC シートの移植により下肢虚血で血管新生および組織壊死の軽減効果が観察された。

シスプラチンによる腎障害モデルラットを作成し、まず、腎被膜外へ hMSC シートを移植した。移植した細胞シートから腎実質への細胞の遊走は見られず、腎機能の改善は得られなかった。

Protocol 1

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。細胞移植が腎機能改善に有用であるか否かを検討する。また、細胞投与経路として磁性ナノ粒子を用いた細胞シート移植が効果的であるか否かを検討する。

B. 研究方法

1) 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。

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、 10^8 個とし、BM-MSCs は、当初は、 10^8 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 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 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、腎組織などの評価を行った。

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 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。

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)を作製し、急性腎不全モデルである Cisplatin 腎症ラットに対する治療効果を検討した。

a) hMSC 細胞シートの作製

カチオンリポソーム(Cationic Liposome)に磁性ナノ粒子であるマグネタイト(Fe_3O_4)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 2×10^6 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。

(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

1) Doxorubicin 腎症モデル

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。腎組織上も明らかな変化を認めなかった。

Protocol 3

細胞投与により蛋白尿の改善を認めな

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。

2) Cisplatin 腎症モデル

b) hMSC 細胞シートの評価

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。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。

c) 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。

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、骨髄幹細胞による腎障害の修復について報告されている (Links Rookmaaker 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)。

現在のところ、薬剤性を含めた慢性腎不全モデルでは、骨髄幹細胞を使用して治療効果があるという報告はない。

Doxorubicin 腎症は慢性腎不全モデルとして知られており、今回の実験モデルとして使用した。経静脈的もしくは腎被膜下・腎実質内に 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毛細血管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たが、有効性はみられなかった。

次に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。

今回、低侵襲な移植法と今後、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。

E. 結論

慢性腎不全モデルである 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なかった。

磁性ナノ粒子を用いた 3 次元 hMSC シートを作成することができ、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 hMSC 細胞シートの移植をしたが、腎機能の改善は得られなかった。

F. 研究発表

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.** 2007; 96: 803-809.

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.** 2007; 27: 99-105.

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: 196-201.

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; 100: 904-913.

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.** 2007; 133: 91-107.

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.** 2007; 71: 1187-1192.

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.** 2007; 27: 2363-2369.

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.** 2008; 365: 279-284.

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.** 2008; 51: 252-258.

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).

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（再生医療等研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学 教授 後藤 百万
名古屋大学医学部附属病院泌尿器科 講師 山本 徳則
研究協力者 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学 准教授 服部 良平
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血液浄化療法部 准教授 野入 英世

研究要旨

腎臓再生において腎特異的幹細胞が大きな役割を果たすことが予測される。イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する自己脂肪植え込み併用尿細管上皮細胞治療を行い血中の BUN が改善したものの血中 Crn の上昇の有意な低下はみられなかった。その原因として、1) 腎皮膜下の細胞注入時注入針の腎臓実質の繊維化、2) 注入し細胞の腎皮膜外への逆流があげられる。そこでこの問題を解決と上皮-間葉系の一つとして従来臨床で行われている自己脂肪植え込みを行い、尿細管上皮前駆細胞を脂肪と腎臓実質の間に注入した。注入後 1 週間と 4 週間において明らかな血中 Crn の上昇の有意な低下が認められた。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腎保護作用を認めた。またこの方法を臨床に対するモデルとして腎細胞癌の腎動脈一時遮断症例後における分腎機能の評価を MAG3 腎臓シンチ検査を行い有意に低下することを明らかにした。大動物でのこの細胞治療の有用性と臨床で想定される対象疾患としての腎部分切除症例の分腎機能を明らかにし、具体的な臨床腎再生のモデルを提言した。

A. 研究目的

腎臓再生において腎特異的幹細胞が大きな役割を果たすことが予測される。イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する自己脂肪植え込み併用尿細管上皮細胞治療を行い血中の BUN が改善したものの血中 Crn の上昇の有意な低下はみられなかった。その原因として、1) 腎皮膜下の細胞注入時注入針の腎臓実質の繊維化、2) 注入し細胞の腎皮膜外への逆流があげられる。そこでこの問題を解決と上皮-間葉系の一つとして従来臨床で行われている自己脂肪植え込みを行い、尿細管上皮前駆細胞を脂肪と腎臓実質の間に注入し腎臓機能を検討した。この方法が実際臨床で応用できる適応症例の一つ

として、尿中落下細胞から尿細管上皮前駆細胞培養すでに同定されている腎細胞癌の腎動脈一時遮断症例を検討した。

B. 研究方法

(1) 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

(a) 尿細管上皮前駆細胞同定培養、尿中落下細胞採取法、処理、採血、採血は前回同様な方法で行った。

(b) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する自己脂肪植え込み
自己内蔵脂肪を約 1g 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1)。前回同様、蛍光色素で尿細管上皮前駆細胞をマーカーし、腎臓上極、中央、下極の3カ所に3分割して注入した。

(2) 腎細胞癌部分切除の腎動脈一時遮断症例における細胞治療の名古屋大学経験症例からの適応の考察とその分腎機能の評価法としての関心領域は部分切除の影響の最も少ない腎臓実質に置いた局所MAG3腎臓シンチ検査(図7)。手術前手術後1週間6ヶ月でMAG3腎臓シンチ検査で分腎機能評価を行った。

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

(1)

(b) 腎皮膜下臍型脂肪と腎臓実質に細胞注入出来た症例は、1) 腎皮膜下の細胞注入時注入針の腎臓実質の繊維化2) 注入し細胞の腎皮膜外への逆流の所見はなかった。

(c) 細胞注入後1、2、3、4週間血中BUNの改善(図2)と1週間3、4週間で血中Crnの改善を認めた(図3)。

(2) **片腎、腎機能低下例、両側腎癌症例である Imperative case**と腫瘍径の3cm以下で健側腎臓を有する **Elective case**に分類して名古屋大学の経験症例のプロファイル(図4)と手術結果(図5)を示した。Imperative caseは術前にCcrが既に低下しており虚血によりさらに低下した。腫瘍径の3cm以下で健側腎臓を有する **Elective case**は術前総腎機能を反映するCcrは健側腎が代償するためにCcrの低下が少ない(図6)。局所MAG3腎臓シンチ検査で部分切除側腎臓を評価したところ術後1週間、6ヶ月で有意に分腎機能低下し、健側腎は有

意に分腎機能は上昇した(図8)。早期からいわゆる腎臓代償性肥大が生じることを明らかにした。部分切除側腎臓の虚血時間を25分以上、以下の2群に分けるとその2つグループは1週間、6ヶ月で分腎機能低下し、2群間に有意な差が示された(図9)。

D. 考察

ヒトの腎血管遮断時間は30分以内であれば機能障害が生じないと言われている。今回50分腎血管遮断イヌ単腎虚血再灌流を作成し、大動物での細胞注入として、臨床ではすでに腎臓止血の目的のために行っている自己脂肪はさみ込みにヒントを得て、臍型自己脂肪植え込み併用尿細管上皮前駆細胞治療で腎臓保護作用を明らかにした。腎細胞癌部分切除の腎動脈一時遮断症例の **Imperative case**と虚血時間の25分以上の **Elective case**がこの細胞治療の適応になりその評価としては我々が提唱する局所MAG3腎臓シンチ検査有用と考えられた。

E. 結論

臨床応用を見据えた大動物モデル、イヌ単腎虚血再灌流障害モデルを対象とした臍型自己脂肪植え込み併用尿細管上皮前駆細胞治療を行い腎保護作用を認めた。また、この腎臓再生治療を臨床応用する適応症例の一つとして腎細胞癌部分切除の腎動脈一時遮断症例の **Imperative case**と虚血時間の25分以上の **Elective case**あり、評価押ししては我々が提唱する局所MAG3腎臓シンチ検査有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

山本徳則：腎後性のAMI. 臨床雑誌『内科学』. 102巻1号. 2008掲載予定

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. 2008年掲載予定

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

Wong MG, Suzuki Y, Tanifuji C, Akiba H, Okumura K, Sugaya T, Yamamoto T, Horikoshi S, Tan SY, Pollock C Tomino Y: Peritubular Ischemia Contributes More to Tubular Damage than Proteinuria in Immune-Mediated Glomerulonephritis. JASN. 2008 19: 290-29

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 2007 Sept5; (Epub ahead of print)

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 2008 ;108:e19-e26

Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamiyo 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. JASN 2007 18:2894-2902

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. 2007 Mar;3:52-8.

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. 2007 Mar;14(3):219-225.

2. 学会発表

口頭発表

1. N. Sassa, R. Hattori, Y. Ono, T. Yamamoto, M. Gotoh: Direct visualization of renal hemodynamics affected by carbon

- dioxide pneumoperitoneum. 102th Annual Meeting of American Urological Association, 2007. 5.
2. N. Sassa, R. Hattori, T. Yamamoto, M. Gotoh: Renal hemodynamics affected by CO2 pneumoneum with direct visualization. 13th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 2007. 9.
 3. 佐々直人、服部良平、松川宜久、小松智徳、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40回日本臨床腎移植学会、2007年3月
 4. 山本徳則、菅谷 健、岡本理志、興倉みどり、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総会、2007年4月
 5. 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、2007年11月

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

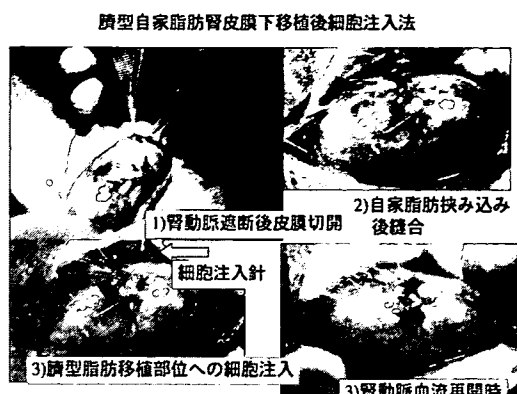


図 1

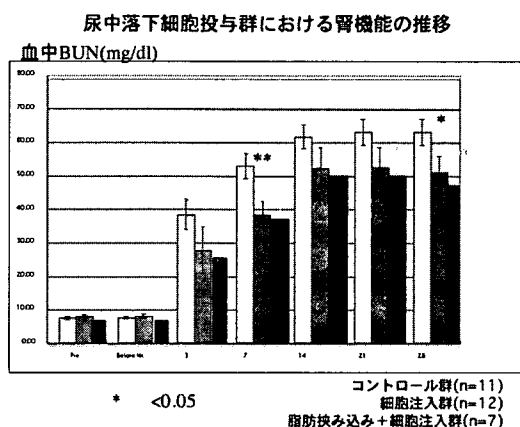


図 2

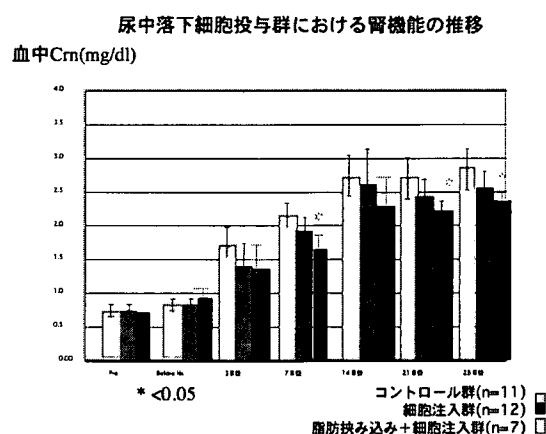


図 3

対 象

	Elective case	Imperative case
症例	25	10
温阻血時間	24±7分	26±8分
年齢	54.2歳 (35~72)	65歳 (50~76)
左右	右 15例 左 10例	右 2例 左 8例
腫瘍径	24 mm (15~40)	27 mm (15~50)
腫瘍部位	上: 8例 中: 9例 下: 8例	上: 3例 中: 1例 下: 6例

図 4

手術成績

	Elective case (N=25)	Imperative case (N=10)
手術合併症		出血 2例*
術後合併症	後出血 3例 尿漏 1例	尿漏 2例
出血量	280ml (10~1200)	680ml (7~2052)
手術時間	3.9 hr (2~5.3)	5.2hr(3.6~6.8)
病理診断	RCC pT1 18例 pT3a 1例 AML 6例	RCC pT1 8例 AML 2例

Imperative case: 片腎、腎機能低下例、両側腎癌症例

図 5

腎機能の変化

	Elective Case (N=25)	Imperative case (N=10)
腫瘍径(mm)	24	27
術前 C-Cr (ml/min)	98 (72-166)	56 (15-93)
術後 C-Cr (ml/min)	96 (61-165)	49 (12-78)

Imperative case: 片腎、腎機能低下例、両側腎癌症例

図 6

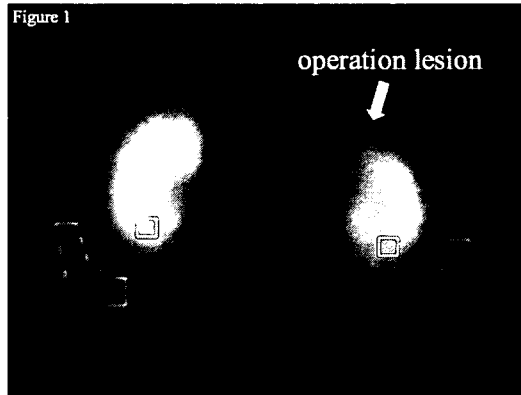


図 7

Figure 2

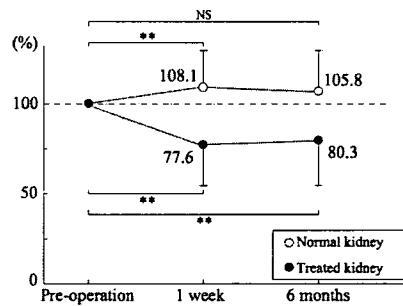


図 8

Figure 4

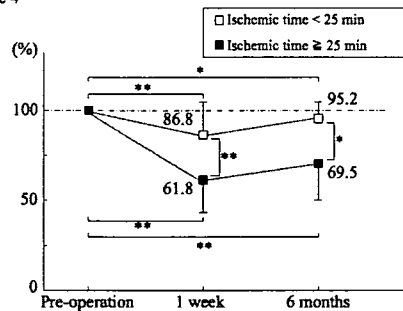


図 9

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

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
	坂 洋祐	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

現在透析医療に要する医療費は莫大である。また慢性腎疾患は心血管疾患に対する大きな危険因子である。ゆえに慢性腎疾患の阻止は大変重要な課題である。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。我々は高齢者やCKD患者でも採取が容易で骨髄に比べ幹細胞/前駆細胞（CD34陽性細胞）が豊富な脂肪組織に着目した。脂肪組織をコラゲナーゼ処理すると血管内皮幹/前駆細胞、間葉系幹/前駆細胞などを含む Stromal Vascular Fraction ; SVF が得られる。今回我々は (a) 吸引脂肪から治療に必要な十分量の SVF が得られること (b) 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確認した。また我々はこれまでに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「低血清培養法」を確立している。低血清培養法のこれまで明らかにされている利点は、分化能の高い細胞が選択的に分離増殖できることや、ヒト血清（自己血清）で培養が可能であることである。今回我々は低血清培養法がヒトでの実用化に必要な (a) 優れた細胞増殖能を持ち、比較的短時間で十分量の細胞を準備できること (b) 従来の高い血清濃度培養液を用いる培養法に比べ、細胞・組織保護作用をもつサイトカインを多く分泌する細胞が得られ、しかもその分泌能は分裂回数が多くなっても低下しないこと (c) 得られた細胞を用いた動物での治療実験では、優れた効果を認めること。3つの利点を確認した。

脂肪由来幹/前駆細胞はヒトでの腎臓再生医療の実用化にあたり非常に有望であると考えられた。

A. 研究目的

我が国の透析患者数は 27 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 1.2 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。体性幹細胞によるヒトでの実用化研究としては、骨

髄・末梢血幹細胞による下肢虚血治療が先行して行われ、Burger 病での有効性が報告されている。その有効性の機序は、移植細胞の障害細胞・組織への分化というよりも、移植細胞によりパラクライン、エンドクラインされるサイトカインによる障害細胞・組織の viability の保持や apoptosis の抑制が主たるものだと考えられている。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。

我々は高齢者や CKD 患者でも採取が容易で骨髄に比べ幹細胞/前駆細胞 (CD34 陽性細胞) が豊富な脂肪組織に着目した。脂肪組織をコラゲナーゼ処理すると血管内皮幹/前駆細胞、間葉系幹/前駆細胞などを含む Stromal Vascular Fraction ;SVF が得られる。今回我々は (1) 吸引脂肪から得られる SVF の性質および量 (2) 腎不全動物モデルでの治療効果 の2点を検討した。

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るが、治療に使用可能な細胞数は採取脂肪組織量に依存しており、十分な脂肪組織を採取できない患者では治療に必要な十分量の細胞を確保できない可能性がある。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、十分量の細胞を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た。我々は名古屋大学農学部北川らとの共同研究により、2%血清および bFGF を添加した低血清の培養液を用いることで、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 (低血清培養法) を開発した。この培養方法の利点は①従来の高い血清濃度の培養液を用いる培養法に比べ、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②少量の血清しか必要としないためヒト血清 (自己血清) をで培養可能なことであることが、これまでに明らかになっている。今回我々は低血清培養法がヒトでの実用化に必要な (a) 治療に必要な十分量の

細胞を reasonable な培養時間で得ることができるか (増殖能の評価) (b) 細胞・組織保護作用の高い細胞かどうか (VEGF, HGF 分泌能の評価) (c) 実際に疾患動物モデルで治療効果があるか

3つの要点から検討した。

B. 研究方法

(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

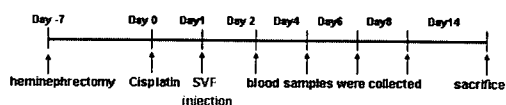
ラットシスプラチン腎症モデルをラット皮下にシスプラチン 7mg/kg 注射する事により作成しSVFを 1×10^6 の6乗個を被膜下に注入し腎機能の評価した。

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.



(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