

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・骨髄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髄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① 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

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。

(倫理面への配慮)

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

動物を用いた研究に関しては名古屋大学に動物実験計画書を提出し承認を得ている。実験を実施する際には動物愛護の精神にのっとり、動物の苦痛を最小限するべく常に努力している。

C. 研究結果

(1) 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 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 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 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 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)。

(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 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 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 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 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。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 ± 72 pg/ 10^6 cells、 7594 ± 1650 pg/ 10^6 cells、 8706 ± 2269 pg/ 10^6 cells、HGF 1018 ± 113 pg/ 10^6 cells、 6937 ± 4005 pg/ 10^6 cells、 4813 ± 2789 pg/ 10^6 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 10, 11)。

(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 12)。

D. 考察

下肢の動脈閉塞性疾患に骨髄幹細胞の局所注入が有効であることが示されて以来、骨髄由来幹細胞が再生医療における細胞ソースとして注目されてきた。しかし、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。

E. 結論

Stromal Vascular Fraction (SVF) に関して

(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 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

(a) 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 (b) 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多くなっても低下しないこと (c) 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。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Shimizu H, Tanaka A, Matsuo S. : Drug induced nephropathy. *Nippon Rinsho* 65 Suppl 8:549-53. 2007.
- 7) Tanaka A, Shimizu H, Matsuo S. : Safe drug prescribing for patients with renal failure. *Nippon Rinsho.* 65 Suppl 8:58-66. 2007.
- 8) 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.
- 9) Imai E, Yamagata K, Iseki K, Iso H, Horio M, Mokino 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
- 10) Matsuo S. : CKD (chronic kidney disease). *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* Suppl 50th Ann:67-72. 2007.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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):219-25. 2007.
- 18) Inaguma D, Tatematsu M, Shinjo H, Suzuki S, Mishima T, Inaba S, Kurata K, Yuzawa Y, Matsuo S. : Relationship between renal function at the time of percutaneous coronary intervention and prognosis in ischemic heart disease patients. *Clin Exp Nephrol.* 11(1):56-60. 2007.
- 19) 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.
- 20) Ishii H, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, Kasuga H, Ichimiya S, Kanashiro M, Mitsushashi 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Yasuda K, Maruyama S, Ozaki T, Iwashima S, Kasuga H, Toriyama T, Kawahara H, Yuzawa Y, 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.
- 4) Ozaki T, Maruyama D, Watanabe T, Iwashima S, Yasuda K, Yamamoto T, Kitagawa Y, Gotoh M, Yuzawa Y, 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Ueda T, Ito M, Fujita Y, Kasuga T, Toriyama T, Kawahara H, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S : Ankle brachial

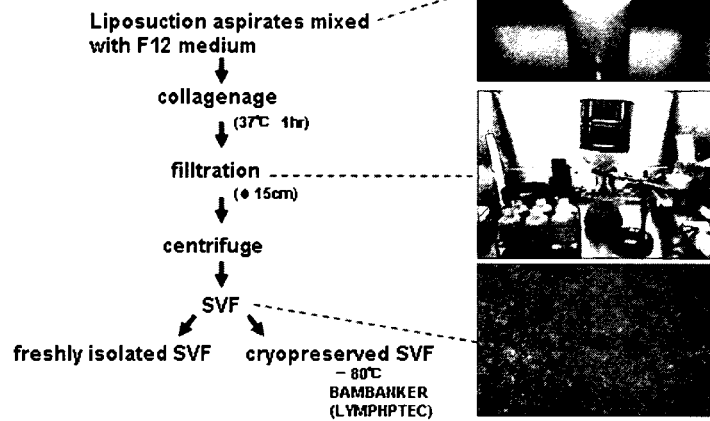
- pressure index (ABPI) but not pulse wave velocity (PWV) is individually useful for risk stratification of systemic arteriosclerotic events in hemodialysis (HD) patients. 40th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Francisco. Oct.31-Nov.5. 2007.
- 9) Fujita Y, Ueda T, Ito M, Kasuga 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) Yasuda K, Maruyama S, Kasuga H, Takahashi H, Toriyama T, Kawahara H, Iwashima S, Mizuno M, Morita Y, Ito Y, Yuzawa Y, Ishii H, Murohara T, Matsuo S : Comparison of percutaneous coronary intervention with medication in the treatment of coronary artery disease in hemodialysis patients. The 1st Research Forum on Chronic Kidney Disease. 名古屋. 2. 3. 2007.
 - 16) Anas C, Ozaki T, Maruyama S, Tamamoto

- T, Gotoh M, Ono Y, Matsuo S : Effects of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure. The 1st Research Forum on Chronic Kidney Disease. 名古屋. 2. 3. 2007.
- 17) 尾崎武徳、丸山彰一、渡辺達人、岩島重二郎、安田香、山本徳則、北川泰雄、後藤百万、松尾清一：低血清培養法による脂肪由来間葉系幹細胞の創傷治癒促進効果。第6回再生医療学会総会。横浜。3. 13-14. 2007.
- 18) 稲熊大城、立松美穂、鈴木祥代、倉田圭、松尾清一、湯澤由紀夫：慢性腎臓病管理における患者教育を解した病診連携システム。第50回日本腎臓学会学術総会。浜松。5. 25-27. 2007.
- 19) 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. 25-27. 2007.
- 20) 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. 25-27. 2007.
- 21) 渡辺緑子、小野木健詞、鬼無洋、水野正司、伊藤恭彦、湯澤由紀夫、松尾清一：脳梗塞患者の腎機能と予後について。第50回日本腎臓学会学術総会。浜松。5. 25-27. 2007.
- 22) 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. 25-27. 2007.
- 23) 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. 25-27. 2007.
- 24) 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. 名古屋. 2. 2. 2008.

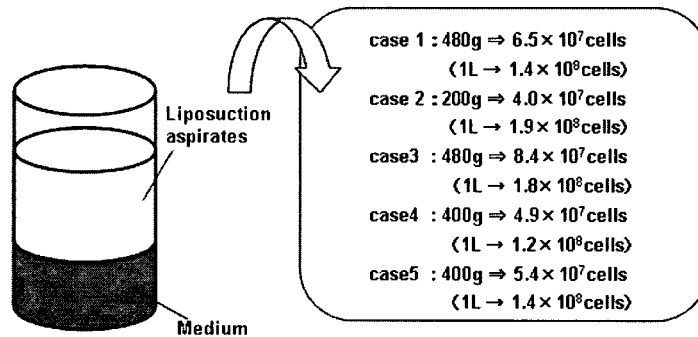
G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
 - 1) 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

☒1 Processes of SVF preparation



☒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.

☒3 Viability of freshly isolated SVF and cryopreserved SVF:

(2) VEGF secretion

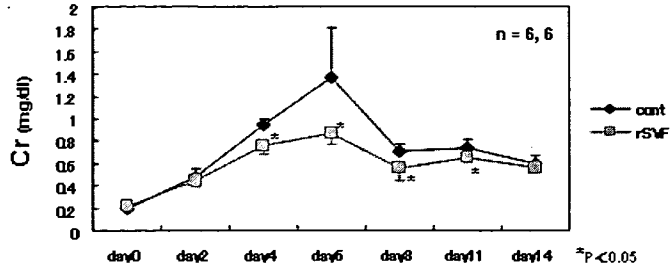


Growth factor secretion and surface antigen expression in freshly isolated SVF and cryopreserved SVF were examined. Growth factor secretion was determined by ELISA test.

(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 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 (1×10^6 cells) of a male F344 rat 2 days after cisplatin (7 mg/kg subcutaneously). Blood creatinin (Cr) levels were measured at different time intervals. Data are mean \pm SD.

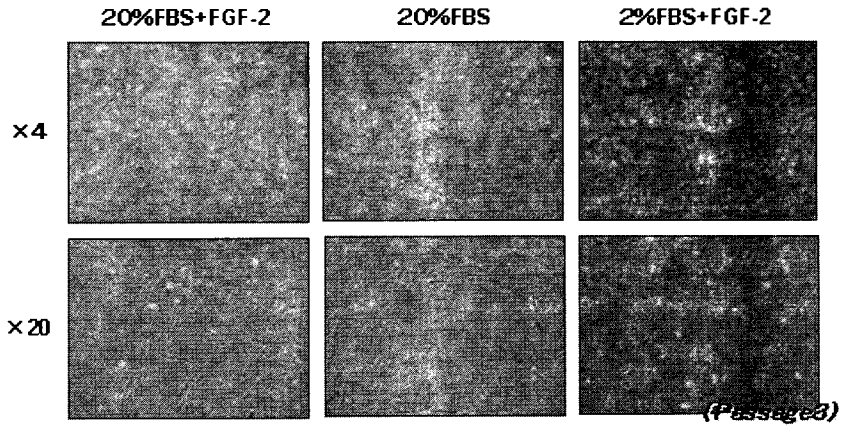


図5 高血清培養法(FGFあり・なし両方)では低血清培養法と比べて早期より紡錘状の形態変化が起こる。

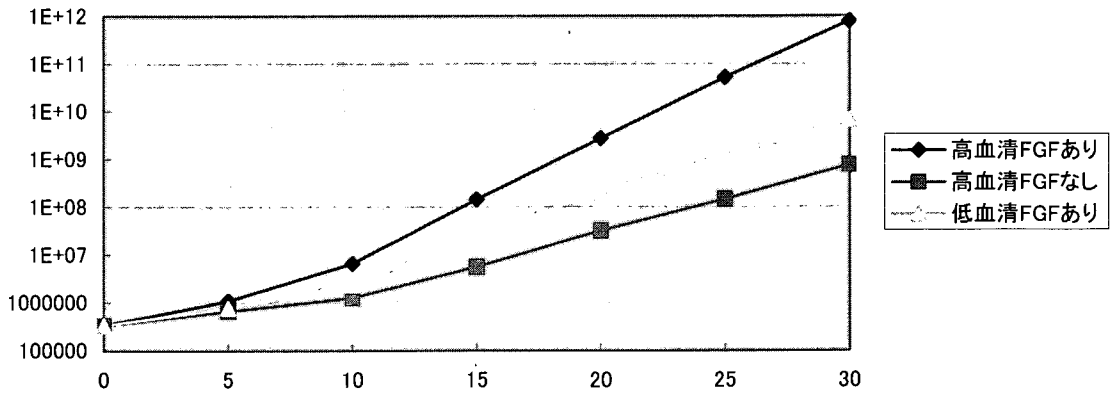


図6. 脂肪由来幹細胞の増殖に関する検討

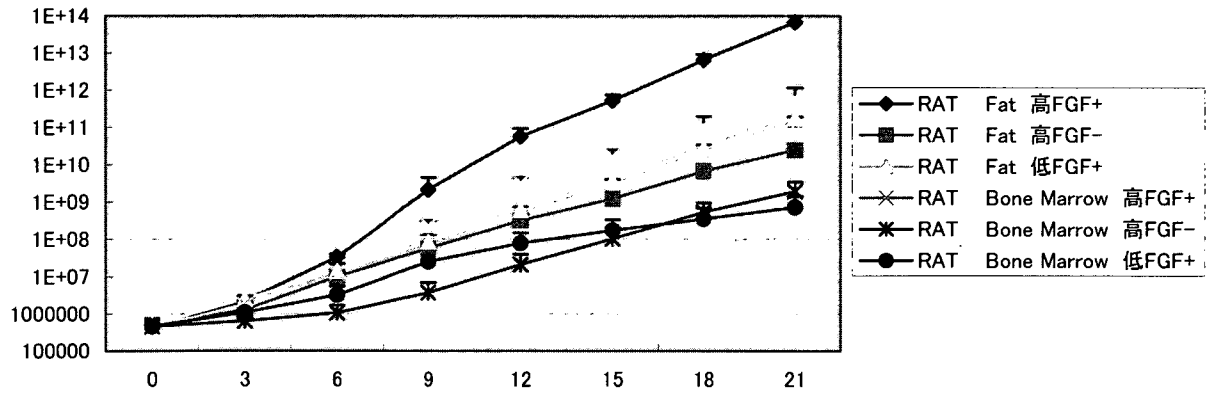


図 7. 脂肪由来幹細胞と骨髄の増殖に関する比較検討

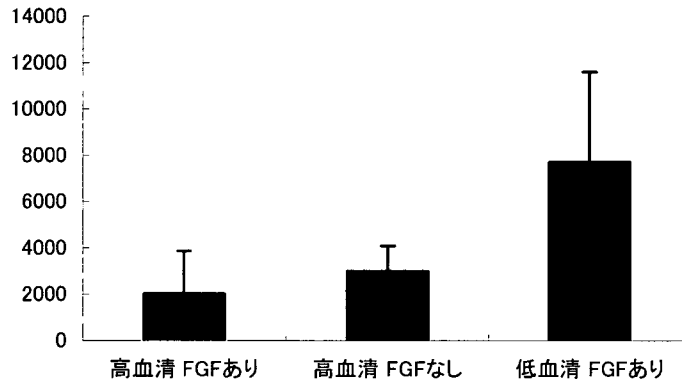


図 8. 培地上清 human VEGF 濃度 (n=8)

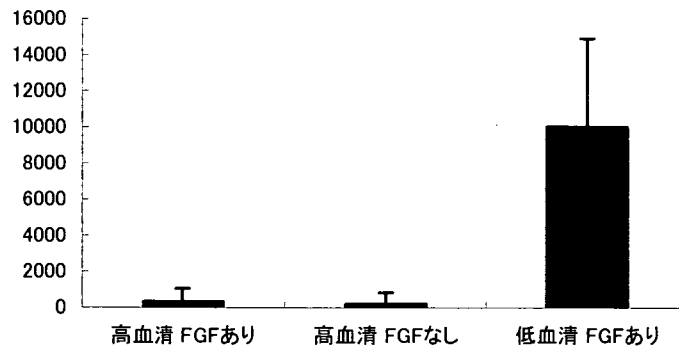


図 9. 培地上清 human HGF 濃度 (n=8)

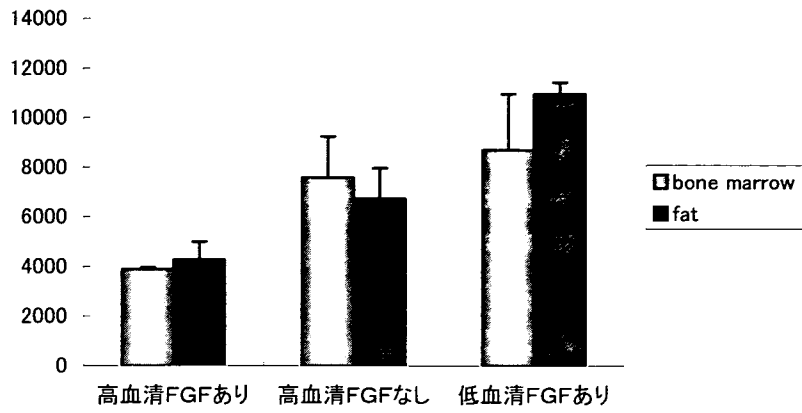


図10. 培地上清ラット VEGF 濃度 (n=3)

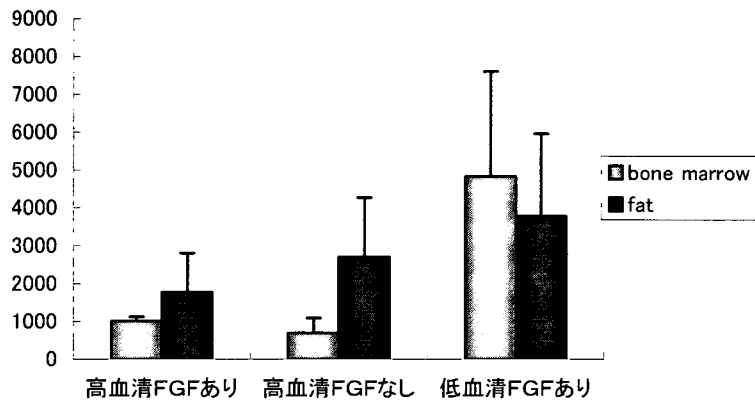


図11. 培地上清ラット HGF 濃度 (n=3)

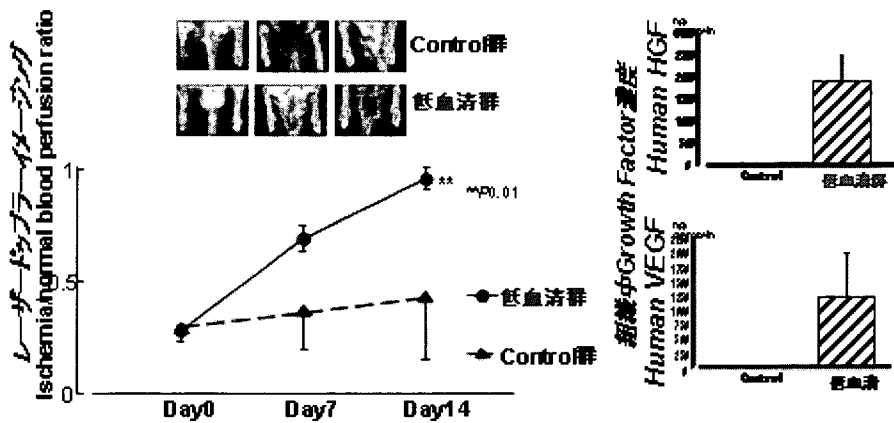


図12. 低血清培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞による下肢虚血(ASO)モデルの治療効果の検討

表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.**

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

組織特異的幹細胞移植に関する研究

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

研究要旨

末期腎不全患者に伴う透析患者の増加を抑制するためには、慢性腎臓病（CKD）患者における腎障害の進展を阻止する治療法の開発が必要であり、現在、腎再生医療が現在注目されている。再生医療に必要な因子として、主に 3 因子あり、細胞、再生因子、足場が必要と言われている。それらの中で細胞に関しては幹細胞が知られており、腎再生に関与する幹細胞の存在部位については、「骨髄由来」「腎組織由来」などの可能性がこれまでに検討されている。我々は組織性幹細胞に注目し、成体ラット由来の腎由来腎幹前駆細胞様細胞（rKS56 細胞）を樹立した。我々は rKS56 細胞を利用し、本研究にて、rKS56 細胞を急性腎尿細管障害モデルに外因性に投与し、組織修復作用及び腎構成細胞への分化能等に関して検討を行った。

我々は、慢性腎障害に対する細胞治療効果を検討するため、慢性腎障害モデルの作成を試みた。最初に片腎摘を行い、Thy-1 を投与することによる慢性腎障害モデルの作成を行ったが、腎障害の程度に波があり、安定した障害モデルが得られないため、現在アドリアマイシン複数投与モデルにて慢性腎障害モデル作成を試みており、そのモデルに対し細胞治療を行う予定である。

また、研究協力者である喜多村が、日本人の海外派遣事業を終了し、班研究に復帰した。喜多村は派遣先である University of California, San Diego の Nigam Lab にて腎臓発生を *in vitro* で再現するバイオアッセイ系の習得を行った。それら習得した技術を利用し、rKS56 細胞をハンギング・ドロップ法を用いて細胞塊にし、マトリジェル内にて三次元培養を行ったところ、管腔構造構築が認められ、培養条件を変えると、尿管芽培養アッセイにて認められる分枝形成が認められた。このことから、rKS56 細胞は管腔構造構築能が *in vivo* だけでなく、*in vitro* でも確認され、臓器構築能をもつ可能性が示唆された。

A. 研究目的

種々の原疾患より慢性腎臓病を呈するが、予後不良例では原疾患の如何にかかわらず末期腎不全に至る。末期腎不全患者における腎機能代替治療として血液透析・腹膜透析・腎移植が現在施行されている。近年の医療技術の進歩により、末期腎不全患者の透析治療による長期生存が可能となっている一方、本邦における透析人口増加・総医療費における透析医療費の割合の増加が問題となっている。また、血液透析・腹膜透

析では腎機能を完全には代償し得ず、また長期透析による心血管合併症等により患者の QOL の維持が問題となる。一方、生体腎移植が主体である本邦では、腎移植に必要なドナー数が不足しているのが現状である。従って、末期腎不全患者数増加の抑制が腎臓病領域における重要課題であるが、そのためには慢性腎臓病患者における腎障害の進展を阻止する必要がある、慢性腎障害重症化防止の観点から腎再生医療が現在注目されている。

一方、腎臓領域での日常臨床の場において、虚血や薬剤に起因する急性腎不全症例がしばしば経験されるが、その多くは一過性の尿細管壊死・腎機能障害に留まり、その後腎組織の自然修復がしばしば観察される。

再生医療の観点から、このような障害腎修復に寄与する可能性がある腎幹細胞の存在の可能性がこれまでに示唆されている。まず、骨髄由来細胞のメサンギウム細胞・糸球体内皮細胞・尿細管上皮細胞への分化が報告されている。一方、生理的状态では腎幹細胞の細胞周期が slow-cycling であるという特徴がある点や、Hoechst33342 を排出する特徴 (side population) を用いた腎組織幹細胞の分離・同定の検討が報告されている。当科の喜多村らは、腎虚血再循環急性尿細管障害モデルラットにて、BrdU 陽性増殖細胞が腎皮髄境界部に多数観察されることに着目し、腎組織幹細胞の単離を試みた。microdissection 法を用いて腎ネフロン各 segment を単離し、それらを培養した後、outgrow した細胞を限界希釈法により、単細胞単離し、培養。皮髄境界部 (S3 segment) 由来細胞より増殖能の高い細胞 (rKS56) を単離した (Kitamura S, et al. FASEB J. 19: 1789, 2005)。

rKS56 細胞は増殖能を有し、長期間にわたる継代培養が可能で、敷石状形態 (cobblestone appearance) を呈し上皮系・間葉系細胞マーカー蛋白並びに腎発生に関与する Pax-2・WT-1・Wnt-4 を発現していた。以上より、rKS56 細胞は腎上皮細胞に由来し、未分化な形質を有するものと考えられた。また、異なる培養条件下にて rKS56 細胞が異なるネフロンセグメントへ

分化することが観察され、多分化能が示唆された。以上の結果より、rKS56 細胞が腎の幹/前駆細胞として作用するものと考えられた。

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

本研究にて我々は、平成 17 年度は、虚血再還流急性腎不全モデルラット・シスプラチン誘導急性腎不全モデルラットを用い、rKS56 細胞を腎被膜下に投与し、障害腎への同細胞の生着と腎機能改善効果を観察した。平成 18 年度は、ラットシスプラチン誘導急性腎不全モデルにおける rKS56 細胞投与による腎機能改善効果について、より詳細な組織学的検討を行い、細胞増殖・アポトーシス等に関する検討を加えた。また、生着した rKS56 細胞に関しても分布、増殖、分化マーカー発現等の解析を加えた。さらに、種々の投与経路による腎機能改善効果の差異に関して検討を加えた。平成 19 年度には、慢性腎不全モデルの作成を試み、rKS56 細胞を用いて細胞治療の効果を試みている。

B. 研究方法

(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 blue-gal 染色により検討した。

(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。

(3) 胎生期腎臓を使用した培養アッセイ系の習得

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。

(4) Organ Culture

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。

(5) ウォルフィアン管発芽培養

(2) 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。

(6) 尿管芽分枝培養

(2) より得られた胎生期 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。

(7) MM Spinal Code Induction

(2) より得られた胎生 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。

(8) Recombo Culture Assay

(5) 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。

(9) 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、それをマトリゲ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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 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 1, 図 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 3**)。

(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する。現在、慢性化モデルの作成を行っている。

(3) 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 4 A**) 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 4 B**)、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。

(4) 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 がない clean な WD (**図 5 A**) と軽度 mesoderm tissue を残した WD (semi-clean WD: **図 5 B**) と全く mesoderm tissue を分離していない WD (whole-WD: **図 5 C**) 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 D**)、semi-clean な WD、whole-WD は発芽を行い (**図 5 E, F**)、腎臓発生に関わる最初の発芽の過程を再現しえた。

(5) 尿管芽分枝培養

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

(6) 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 7 A**)。

3 日目には MM は上皮へと分化を起こし (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 7 B)。

(7) 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 8 A)。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 は上皮化を起こし、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 8 B, C)。できた人工腎臓を尿細管のマーカーの 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 8 D, E)。

(9) 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 9 A)。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 9 C, 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 9 E)。

D. 考察

我々は、腎幹/前駆細胞様細胞と考えられる rKS56 細胞を成体ラット腎より分離し、腎虚血再還流モデルにおける細胞生着、尿細管障害の改善作用を報告し、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化どうかの検討が必要であると考えられる。

現在、我々は、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、腎障害の程度が安定せず、慢性腎障害モデルの作成までいかず、また rKS56 細胞の生着も確認されなかった。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た、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、我々は 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 様発達も観察された。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。

E. 結論

我々が樹立した成体ラット腎由来の腎幹/前駆細胞様細胞（rKS56 細胞）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。

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

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kinomura M, Kitamura S, Katsuyuki

Tanabe, Kunihiro Ichinose, Kumiko Hirokoshi, Yuki Takazawa, Hiroyuki Kitayama, Tatsuyo Nasu, Hitoshi Sugiyama, Yasushi Yamasaki, Takeshi Sugaya, Yohei Maeshima, Hirofumi Makino. :

Amelioration of Cisplatin-Induced Acute Renal Injury by Renal Progenitor-like cells Derived From the adult Rat Kidney. : Cell transplantation in press.

2. 学会発表

1) 木野村賢、前島洋平、喜多村真治、一瀬邦宏、高沢有紀、來山浩之、広越久美子、田邊克幸、菅谷健、山崎康司、杉山斉、槇野博史：シスプラチン誘導急性腎不全モデルにおけるラット腎幹/前駆細胞（rKS56）治療効果の検討. 第34回日本臓器保存生物医学学会 定期学術集会 平成19年 11月16日. 札幌。

G. 知的財産権の出願・登録取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

1) 特願 2003-071029：腎臓幹細胞前駆細胞、腎臓幹細胞前駆細胞の分離方法、及び腎疾患の治療法（出願日 平成15年3月14日）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし