

図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 bluo-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、bluo-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)。

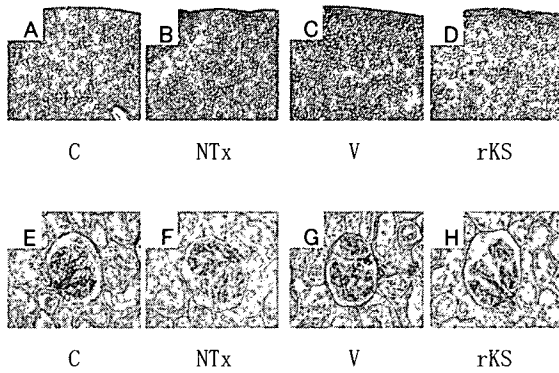


図2 片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおける腎障害評価と rKS56-lacZ 細胞投与における細胞生着の検討 (PAS 染色) : 10 週後。慢性腎不全誘導 10 週後の bluo-gal 染色と PAS 染色の二重染色像を示す。5 週後と比べ腎障害の程度はあまり変化は認められず、コントロール群における腎障害は認められず (A : 皮質、E : 糸球体部)、片腎摘群においても障害は軽度であるが (B : 皮質、F : 糸球体部)、片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいても皮質、糸球体でも障害の程度はあまり変化なく (C : 皮質、G : 糸球体部)、rKS56-lacZ 細胞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

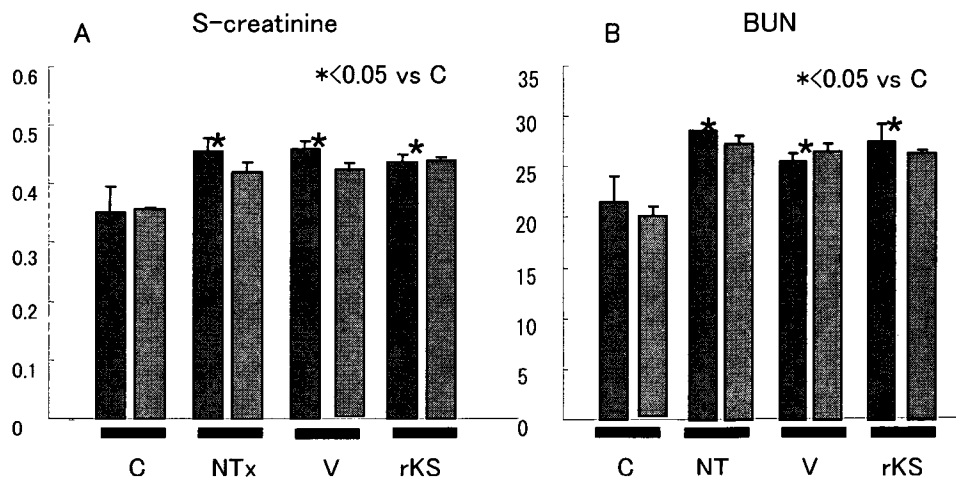


図3 rKS56-LacZ 細胞治療による腎機能 (BUN・Cr) の改善効果。片腎摘+抗 Thy-1 抗体投与モデルにおいて、片腎摘群 (N) で軽度腎機能の経時的低下傾向が認めら

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。

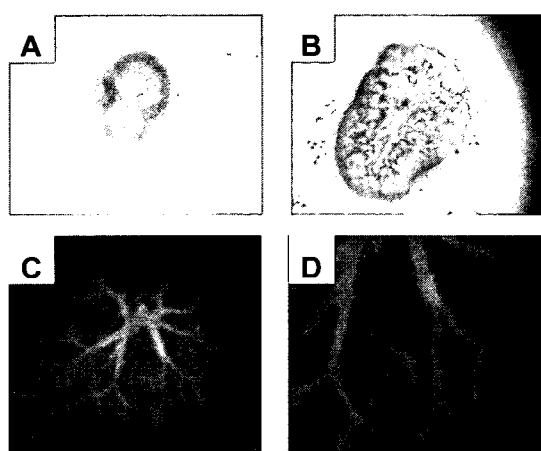


図 4 胎生 13 日目の腎臓を使用した organ culture。A: 胎生 13 日目の腎臓、B: transwell 上で 4 日培養した腎臓、C: 培養 4 日後の腎臓の PNA、DB 染色像 (赤: PNA、緑: DB)。D: 強倍率像 (赤: PNA、緑: DB)。

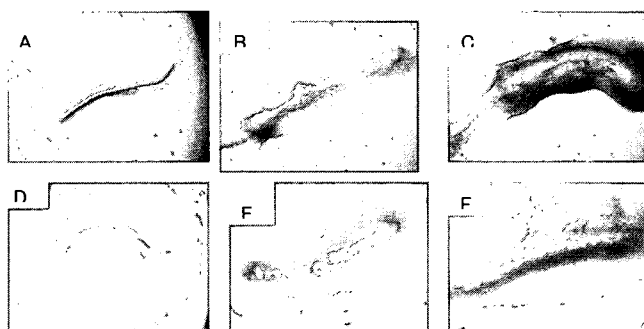


図 5 ウォルフィアン管 (WD) の初期発芽の検討。A: 中胚葉組織を取り除いた WD、B: 中胚葉組織を軽度取り除いた WD、C: 中胚葉組織を取り除いていない WD、transwell 上培養 4 日後; D: 中胚葉組織を取り除いた WD、E: 中胚葉組織を軽度取り除いた WD、F: 中胚葉組織を

取り除いていない WD

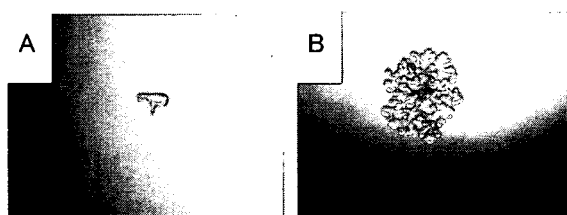


図 6 尿管芽 (UB) 培養。A: 胎生 13 日目の尿管芽、B: 培養 7 日後の UB、培養条件: BSN-CM + 10% FCS+GDNF (125ng/ml) + FGF- b (125ng/ml) + 1% antibiotics。

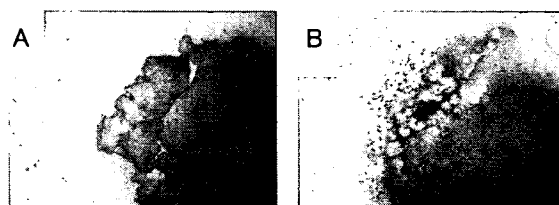


図 7 後腎発生系間葉系幹細胞 (MM) の上皮化誘導。A: MM と胎生 13 日目の神経管 (spinal code) の共培養。B: 培養 3 日目: MM の部分にコンマシェイプ・ボディが観察され、上皮化が

誘導されている。

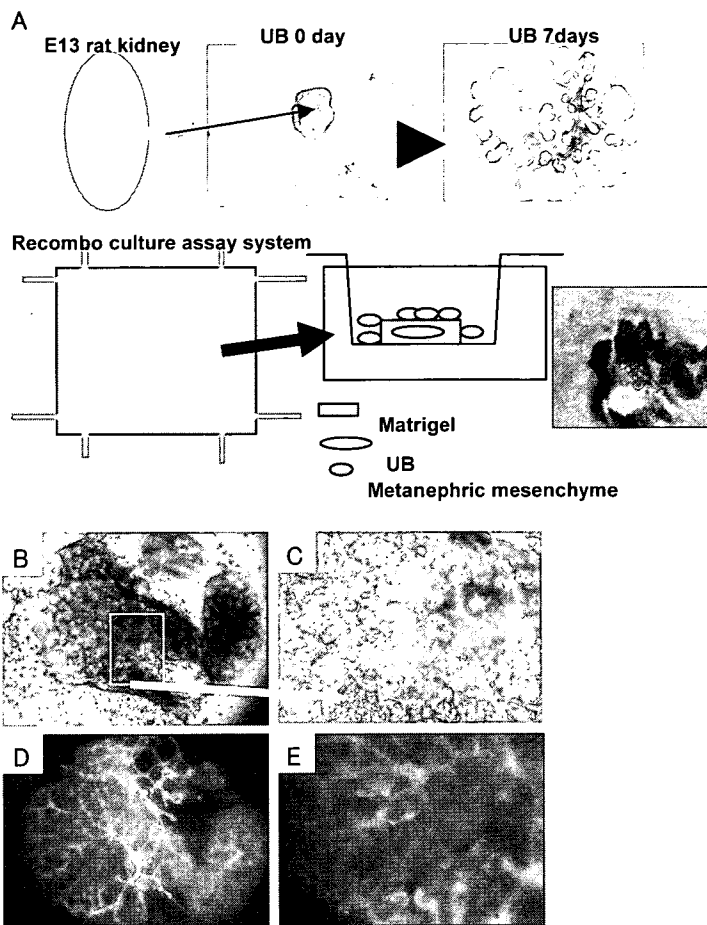


図 8 recomb assay system.

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・ボデイが確認され、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。

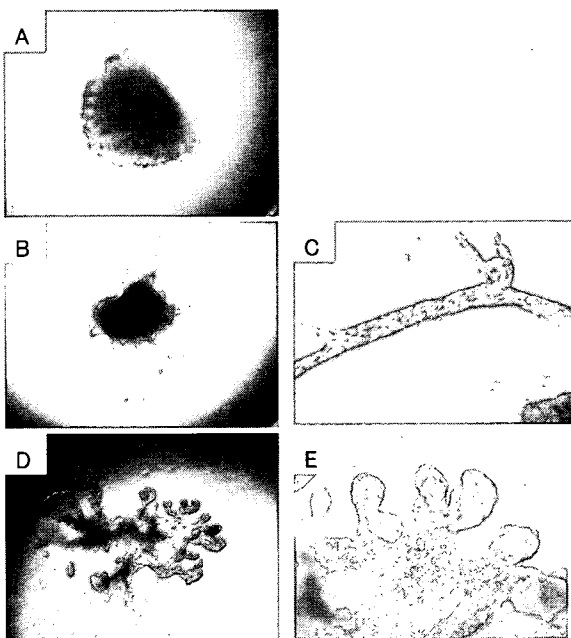


図 9 rKS56 細胞を使用した組織構築能 (in vitro)。

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- b (250ng/ml) + HGF (250ng/ml) + BMP-7 (250ng/ml) + 1 % antibiotics)。

(財) ヒューマンサイエンス振興財団
ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業
[外国への日本人研究者派遣事業]

特別報告

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

喜多村 真治

1. 派遣先機関

カリフォルニア大学サンディエゴ校
所在地： アメリカ合衆国カリフォルニア
州ラホヤ市 9500 ギルマン通り (0693)
University of California, San diego
9500 Gilman Dr 0693 La Jolla CA 92093, USA

2. 派遣先研究指導者

カリフォルニア大学サンディエゴ校
サンジェイ・K・ニガム教授
Professor Sanjay K Nigam
University of California, San diego

3. 派遣期間

平成 19 年 3 月 10 日～平成 19 年 9 月 8 日

4. 研究課題

慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残腎機能再構築

5. 派遣事業の要約

我々の課題である慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残腎機能再構築に対し、私は今後、幹細胞に対する細胞評価の一環として、我々の分担研究で行っている幹細胞の効果を *in vivo* だけでなく *in vitro* での評価も行う必要があると考え、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。

腎臓発生を *in vitro* で評価する方法として、organ culture や腎臓発生におけるウォルフィアン管から尿管芽の初期発芽を *in vitro* で再現するアッセイ系や尿管芽を *in vitro* で発育させるアッセイ系、後腎発生間葉系細胞の上皮化を促す神経管との共培養による上皮化誘導アッセイ系などを習得し、それらを応用し分枝形成させた尿管芽を後腎発生間葉系細胞組織と共培養させることにより腎臓発生を再度構築することを再現させる recombo culture アッセイ系などを習得した。

これらのアッセイ系を利用し、現在我々が日本で行っている成体腎臓幹/前駆細胞様細胞株 (rKS56 細胞) を使用し、腎臓発生に関わる rKS56 細胞の役割、また発生細胞を成体幹/前駆細胞様細胞に置き換えられることができるかなど発生・再生を融合させた研究を行う予定である。

6. 研究活動の概要

この度の外国への派遣は、研究課題：慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残腎機能再構築に貢献できる内容であるべきであり、班研究に今後寄与すべき内容、手技を学ぶべく派遣先を検討した。

現在、種々の再生研究が行われているが、そのような再生研究の基礎的な考え方は発生期のシステムとほぼ同じ過程で再生過程も行われていると考えられており、その基礎的な考え方と通じると考えられている。そのため、腎臓発生期のシステムの解明、及びその実験手技の取得が今後の当該研究班に寄与しえると考え、発生に関連した手技、システム解明を課題とし検討した。

私が派遣希望したアメリカ、カリフォルニア大学サンディエゴ校のサンジェイ・K・ニガム教授の下では、腎臓発生に関するシステム解明を主に行っており、実験手技として発生期の腎臓を使用し、in vivo から in vitro への培養システムが確立されており、それにより腎臓の発生を in vitro で観察でき、その技術の取得を第一に、またそれに関連して、腎臓発生の勉強およびシステム解明を習得するべく行った。

in vivo から in vitro への培養システム手技の内容としては、マテリアルとして主にげっ歯類の発生期の個体を用い、マイクロダイセクション法にて腎臓発生期の各部を取り出し、その各部を in vivo から in vitro に移行し、培養を行い、腎臓発生を培養系内で再現することであった。具体的には、ラットにおいて胎生 12~14 日（主には 13 日）目の胎児を用い、その腎臓を顕微鏡下で摘出し、その腎臓原基をトリプシン処理後、腎臓発生期の原基である尿管芽と間葉系細胞群とをマイクロダイセクション法にて分離し、その各原基を培養系に移し、腎臓発生の変化を in vitro にて観察することである。

まず。私は、胎生 13 日目の腎臓をフィルター上にて培養する organ culture の手

技の取得から行った（図 1）。それらを尿管上皮のマーカの一つである PNA、また尿管芽のマーカである DB で染色を行った。

次に尿管芽が発生する原基であるウォルフィアン管そのものを胎児から分離し、ウォルフィアン管から尿管芽が発生する行程を in vitro 系に移すアッセイ系の習得を行った。これは胎生 12or13 日目の腎臓から尿管芽が発生するウォルフィアン管をマイクロダイセクション法にて取り出し、それを発芽誘発因子である GDNF を加え、培養することにより発芽させる実験である（図 2）。これにより腎臓原基の一つである尿管芽の初期発芽を in vitro にて再現し、その培養系に種々の成長因子等を加えたりすることにより、初期発芽に関係する因子、経路などの実験が可能となる。

通常、胎生 13 日目の腎臓の原基である尿管芽は既に 1 分岐してあり、T の字に似ており T 字型と呼ばれる。この T 字型尿管芽を上記のマイクロダイセクション法にて取り出し、マトリゲルの中で培養し、腎臓発生過程の一分岐している T から分岐が進み、腎臓の複雑な分岐過程を培養系にて再現した（図 3）。この培養系には特殊な培養条件が必要であり、この研究室では発生期の腎臓細胞を使用したコンディションメディアウムを使用していた。また尿管芽の発生過程と対を成す間葉系細胞群の分化過程の培養系での観察も行った。この実験においては胎生 13 日目の腎臓から間葉系細胞群を取り出し、フィルター上で培養を行った。その場合、分化誘発のため、神経管とで共培養を行った。その場合、2, 3 日目くらいから間葉系細胞群はその形態を変化させ、上

皮細胞様に変化を起し、尿細管様形態が観察された (図 4)。

次に最近、当研究室にて、それら培養を行った尿管芽を再度間葉系細胞群と共培養することにより、腎臓を人工的に作り出す手技が確立され、その手技の取得も行った。具体的には胎生期 13 日目の尿管芽を培養し、T 字型から 5~7 分岐まで *in vitro* で培養を行い、その後、そのように培養した尿管芽を間葉系細胞群とフィルター上で共培養を行った。そうすると間葉系細胞群は尿管芽との相互作用を起し、間葉系から上皮系へと分化し、尿細管様細管を作りだし、あたかも通常の腎臓のような形態形成が観察された (図 5)。この手技にて未分化な細胞を使用すれば培養系によっては腎臓様の器官を作りだせる可能性が示唆された。実際、つくり出された人工的な腎臓様器官は染色を行うと正常の腎臓のように各種細胞が分化していることも確認された。しかし、腎臓が機能を持つためには、血管の陥入は必須であるが、この人工培養腎臓には血管は構築されておらず、糸球体と尿細管のみの構築が観察されるのみである。そのため、今後腎臓としての機能を持たせるためには血管の再構築も重要な課題であり、血管陥入に関わる因子の同定も必要と考えられた。

上記の手技は、我々が検討を行っている腎臓幹/前駆細胞様細胞を利用した細胞治療のアプローチだけでなく、細胞から組織、組織から器官 (臓器) へと一段利用しやすい形に培養系でもっていき、その後移植するなどのアプローチも考えられ、またひいては、そのような未分化な細胞群から人工的に腎臓様器官形成へと応用できる可能性があると思われた。

私は、初めの数ヶ月を主に上記のような培養系の手技の習得を行った。次にそれらの手技を利用し、当研究室の方針とも沿った実験を行い、その手技の習熟および、腎臓発生システムの解明を行った。

当初上記の手技を取得後、腎臓発生原基の各細部の RNA を採取し、各々の遺伝子発現の変化をみて、各腎臓発生段階の遺伝子発現から各時期にどのような遺伝子、成長因子等が必要になるかを検討し、再生に応用しようと考えたが、時間的な余裕がなく、かつそのような長期の研究は帰国後に班研究に寄与することということで以下の実験を行った。

再生には主に三要素：細胞、足場、成長因子が必要と言われているが、我々の班研究においては既に細胞や成長因子に関する研究が行われており、そのため、足場との相互作用をみるためにも、足場と細胞の関連をみる研究を行った。

具体的には、腎臓発生過程において各部腎臓発生原基の RNA を取り出し、それらを足場との接着、シグナル伝達の主因子であるインテグリン発現を調べ、どの時期にどのようなインテグリンが発現し、作用しているかを検討した。

その結果、インテグリン $\alpha 3, 6$ と $\beta 1, 4$ が関係している可能性が示唆されたため、その各インテグリンを中和抗体にて作用を抑制し、胎生 13 日目の腎臓、尿管芽、間葉系細胞群、ウォルフィアン管の培養を行った。するとウォルフィアン管からの初期発芽はどのような条件においても抑制は起こらず、その後の尿管芽の発育に $\beta 1$ インテグリンが関わっている可能性が考えられた。このことは初期発芽においてはインテグリン

ンの関与は薄く、その後の腎臓の成熟にインテグリンのシグナルが必要になる事が示唆された。

上記のことは我々の班研究にも関連して来るであろう内容であり、今後慢性腎障害に対し、治療する場合、ただ単に細胞を移植するだけでなく、その足場環境も是正すべきであることも示唆される。

また、今回の派遣により、今まで再生の研究は再生からのアプローチしか考えず、また実験もしてこなかったが、今回の派遣を通し、発生の観点からも再生に通じる考え方、アプローチ法など新たな面を知り、再生に対し寄与する引き出しを多く持つことができた。派遣期間は当初は長く申請していたが、実験手技の習得をメインに据えてみると派遣期間内で習得でき、それを今後の班研究に寄与していきたいと思う。

7. 派遣事業の成果

現在我々研究班は成体腎臓細胞株のみならず脂肪未分化細胞の応用も検討しており、それらのマテリアルを使用し、私が習得してきた技術を活かし、総合的な観点から腎臓再構築へと応用できることを目指していきたい。

私どもの分担研究分野にて、現在、腎臓発生を *in vitro* で再現するバイオアッセイ系の技術を利用し、成体腎臓幹/前駆細胞様細胞株 (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、*in vitro* でも臓器構築能をもつ可能性が示唆された (図 6)。今後、我々の班研究が遂行している成体腎臓幹/前駆細胞様細胞株を使用し、発生から応用した再生へとアプローチしていきたいと思う。

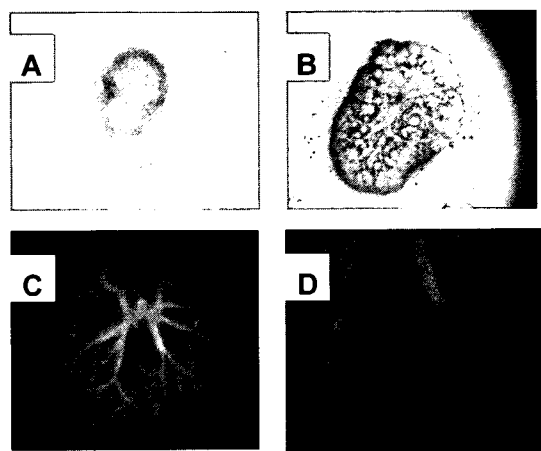


図 1 : 胎生 13 日目の腎臓を使用した organ culture。A : 胎生 13 日目の腎臓、B : transwell 上で 4 日培養した腎臓、C : 培養 4 日後の腎臓の PNA、DB 染色像 (赤 : PNA、緑 : DB)。D : 強倍率像 (赤 : PNA、緑 : DB)。

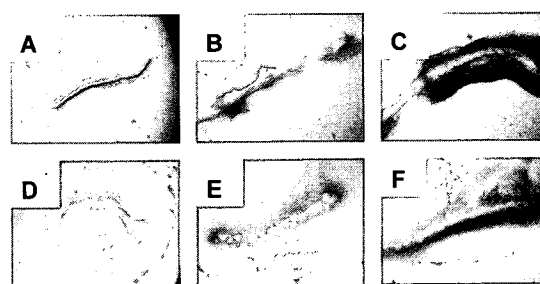


図 2 : ウォルフィアン管 (WD) の初期発芽の検討。A : 中胚葉組織を取り除いた WD、B : 中胚葉組織を軽度取り除いた WD、C : 中胚葉組織を取り除いていない WD、transwell 上培養 4 日後 ; D : 中胚葉組織を取り除いた WD、E : 中胚葉組織を軽度取り除いた WD、F : 中胚葉組織を取り除いていない WD

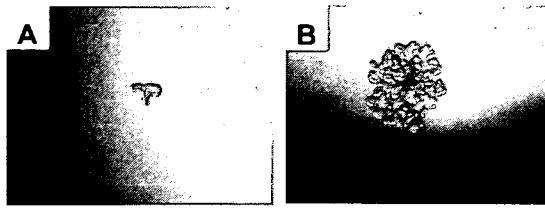


図3：尿管芽 (UB) 培養。 A:胎生 13 日目の尿管芽、B:培養 7 日後の UB、培養条件：BSN-CM+10%FCS+GDNF (125ng/ml) +FGF-b (125ng/ml) +1%antibiotics。

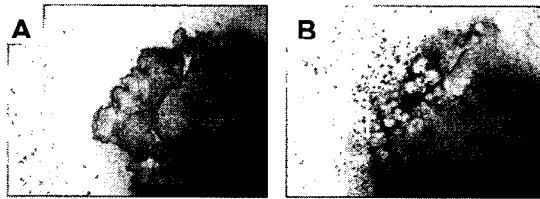


図4：後腎発生系間葉系幹細胞 (MM) の上皮誘導。 A: MM と胎生 13 日目の神経管 (spinal code) の共培養。 B:培養 3 日目: MM の部分にコンマシェイプ・ボディが観察され、上皮化が誘導されている。

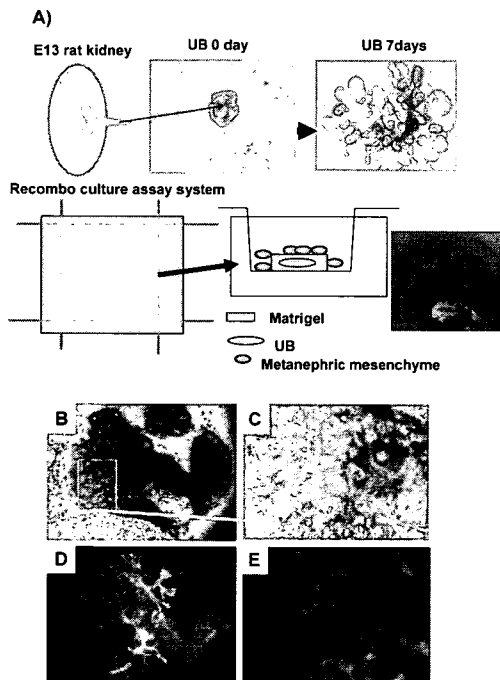


図5：recombo assay system。 A:胎生

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。

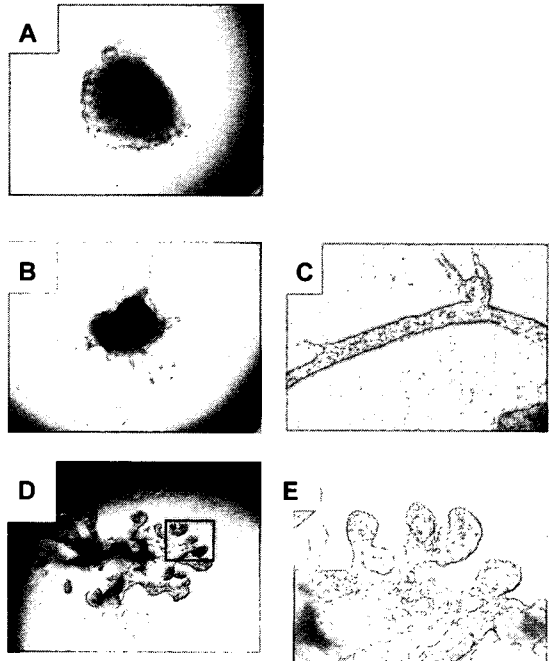


図6. rKS56 細胞を使用した組織構築能 (in vitro)。 A:ハンギング・ドロップ法を用いて rKS56 細胞を細胞塊にした。 B:rKS56 細胞をマトリゲル内にて培養 (K-1medium+MCS supernatant)。 管腔構造形成が認められる。 D:強倍率、 E:rKS56 細胞をマトリゲル内にて培養 (K-1medium+MCS supernatant+GDNF (250ng/ml) +FGF-b (250ng/ml)+HGF (250ng/ml) +BMP-7 (250ng/ml) +1%antibiotics)。

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 野入 英世 東京大学医学部附属病院 血液浄化療法部 准教授
研究協力者 根岸 康介 東京大学医学部附属病院 血液浄化療法部 医員
研究協力者 前田 るい 東京大学 21世紀COEプログラム
「動的分子論に立脚したフロンティア基礎化学」 技術員

研究要旨

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

さらに、薬剤性慢性腎障害モデルへのmProx-SP腎被膜下单回移植を試みたが、腎機能、組織学的にもmProx-SP移植群での大幅な改善は認められなかった。今後は移植細胞の品質管理や投与方法についても更に検討していく必要がある。

A. 研究目的

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

本研究では、Cell Processing Team によって確立されつつある標準化プロトコルで採取した上皮系幹/前駆細胞を用いた腎障害への細胞移植の治療効果について検討した。昨年度までの経過では、まずマウス尿細管上皮由来幹/前駆細胞（mProx-SP）についてフローサイトメーター（FACS）を用い

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

B. 研究方法

(1) 移植細胞

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

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

(2) RT-PCR

mProx、mProx-SP それぞれ TRIzol (Invitrogen) を使用してプロトコルに従って RNA を得た。Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いて cDNA とし、RT-PCR を行ったのち、泳動して各サンプルでの発現を評価した。使用したプライマーは G3PDH: Forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA-3', Reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', Stathmin1: Forward 5'-gcatcc tgatattcag gtg-3', Reverse 3'-cttgtccttctctcgcgaagc-5', Pax-2: Forward 5'-gaagctctgg atcgagtctt-3', Reverse 3'-gaatctccaagcctcattgta-5' である。

(3) ウェスタン解析

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

LAS-4000 (FUJIFILM) で検出し、解析を行った。

(4) シスプラチンによる細胞障害性の比較

シスプラチン投与 24 時間前に mProx、及び mProx-SP をそれぞれ 96well plate に 2×10^4 cells/well になるように播いた。対数増殖期の細胞に対しシスプラチンを 0, 1, 5, 10, 20 μ M を加え 20 時間培養した。Alamar Blue を各 well に 10 μ l ずつ加え 2 時間インキュベート後に蛍光プレートリーダーで測定した (Ex:544, Em:599)。細胞毒性を評価するために細胞からの LDH の放出量を測定した。各濃度のシスプラチンを加えて 20 時間培養後の上清を用いて Cytotox96 (Promega) を使用して測定した。LDH の最大放出量は 10% Triton-X を加えた well を用いた。

(5) マウス

本研究では、8~15 週齢雄の C57BL/6J 野生型および EGFP-ヒト L-FABP 遺伝子発現マウスを用いて、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。

(6) シスプラチン誘発急性腎不全

予備検討においてシスプラチン 15mg/kg の腹腔内投与により 1 週間以内に致死的となる急性腎不全を発症することがわかっている。そこで、C57BL/6J 雄の野生型マウスにシスプラチン 15mg/kg (溶液総量 60ml/kg) を腹腔内投与し、24 時間後に塩酸ケタミン 30mg/kg とキシラジン 8mg/kg の腹腔内投与により麻酔した。左背部を切開し、左腎を露出した。 5.0×10^5 個に調整した CMRA 標識 mProx-SP、または non SP を左腎被膜下に投与後 (投与総量 100 μ l)、穿刺部をアロンアルファ A (三共) で塞ぎ、閉腹

した。DMEM（陽性対照）群にはDMEMを被膜下投与し、Control（陰性対照）群には生理食塩水60ml/kgの腹腔内投与24時間後、同様にDMEMを左腎に被膜下投与した。シスプラチン投与48時間後、72時間後に生理食塩水60ml/kgを腹腔内投与した。3日目（Day3）、5日目（Day5）に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

（7）慢性腎障害モデル

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

（8）組織学的検討

腎組織は、10%緩衝ホルマリン溶液により36時間固定後、パラフィン包埋し、組織切片を $3\mu\text{m}$ に薄切して、蛍光顕微鏡下に移植細胞の局在を直接的に検討した。免疫染色にはProliferative Cell Nuclear Antigen（PCNA, DAKO）、Single-stranded DNA（ssDNA, DAKO）、Aquaporin-1（AQP-1, Chemicon）を使用した。

（9）血清尿素窒素（BUN）

尿素窒素Bテストワコー（和光純薬）を用い、プロトコルに従って測定した。

（10）統計解析

JMP 5.1J（SAS Institute, Cary, NC）を用いて統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

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

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

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

（2）シスプラチンによる細胞障害性の比較

Alamar Blue Assayによってシスプラチンでの細胞増殖抑制を調べたところ、mProxでは顕著に増殖が抑制されていた。しかしmProx-SPではmProxほどの増殖抑制は生じていなかった。またこの増殖抑制が細胞毒

性によるものか LDH の放出の有無で検討したところ、mProx ではシスプラチンによって濃度依存的な細胞毒性が明らかなのに対し、mProx-SP では mProx に対して LDH 放出が有意に抑制されていた。

以上より mProx-SP は mProx に比して、シスプラチンによる細胞障害への著しい抵抗性を示すことが分かった。

ただし、継代数を重ねていくことで、mProx-SP のシスプラチンによる増殖抑制の軽減作用は減弱してくることが確認され (図 3 C)、mProx と mProx-SP との増殖抑制抵抗性の相対比は急速に減少していた (図 3 D) ことから、少なくとも現在の培養系において mProx-SP の CDDP への障害抵抗性を維持しつづけるのは困難であるものの、13 回程度までの継代回数までは障害抵抗性という形質を維持し得ると考えられた。すなわち、mProx-SP の標準化評価系として CDDP 刺激に対する障害抵抗性を指標とする可能性が示唆された。

(3) シスプラチン誘発急性腎不全

本検討で用いたシスプラチンの用量では、投与後 1, 2 日の血清尿素窒素 (BUN) の上昇は軽度であるが、投与後 2~3 日目に向けて急激に腎機能が低下し上昇する。3 日目 (Day 3) の血清尿素窒素 BUN (mg/dl) は mProx-SP (=CDDP+mProx-SP, N=7)、DMEM (=CDDP+DMEM, N=7)、Saline (=Saline+DMEM, N=7) 各群それぞれ 64.2 \pm 19.3, 118.9 \pm 18.2, 20.1 \pm 0.8 (mean \pm SE) で、mProx-SP 群では DMEM 群に対して有意な改善を認めた。また、急性尿細管壊死によるスコアリング (ATN スコア) による尿細管障害の程度も mProx-SP 群で両腎とも有意に改善

していた (図 4 B, 図 5 C)。また、DMEM 群では PCNA 陽性の細胞増殖期にある尿細管上皮の減少と、アポトーシスを示す Single-stranded DNA (ssDNA) 陽性細胞の増加を認めたが、mProx-SP 群では PCNA 陽性細胞の増加 (図 5 A, C) と ssDNA 陽性細胞の減少が見られた (図 5 B, C)。組織蛍光染色において CMRA 標識した mProx-SP が Aquaporin-1 と Overlap することが両腎で確認され (図 6)、尿細管への生着を示唆する所見と考えられた。

さらに、21 回継代後の mProx-SP を CDDP による急性腎不全モデルに被膜下投与したところ、mProx-SP 群、DMEM 群それぞれ 3 日目の BUN (mg/dl) が 56.0 \pm 13.2、91.9 \pm 20.3 であり、7 日目までの生存率もそれぞれ 33.4% (3/9 匹)、0% (0/6 匹) と (Kaplan-Meier 法、Log-Rank test, p=0.11)、いずれも有意差は検出できなかった (表 1)。

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

D. 考察

マウス近位尿細管細胞由来の細胞株 mProx は、cell processing によって dorm formation を有し (図 1 A)、長期培養に

かなり耐える表現型を有するようになった (mProx-SP)。これらの細胞では、Sca-1 の発現はほぼ 100%に検出されるようになり、Kim-1、CD34 陽性細胞数も増加すること、更に c-kit 陽性細胞数は少数であるものの、mProx-SP では発現量が cell processing を受けていない野生型 (mProx) に比べて高率であることを昨年度に報告している。そして、長期間の培養の経過で図 1 B のような敷石状の形態を一部に示し、やがて野生型 とほぼ同様の紡錘状を呈することが確認されている。

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

次に、*in vitro*においてCDDP刺激での細胞障害性の影響を比較したところ、mProx-SP では mProx に比べて著明な細胞増殖抑制の軽減(図 3 A)と、細胞毒性を示すLDH放出量の著しい抑制が確認された(図 3 B)。ただし、この細胞障害抵抗性は13回までの継代回数までは保たれていたものの、17回では mProx とほぼ同レベルまで減弱してきており(図 3 C、CDDP 10 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 移植の結果を表1にまとめた。3日目までは全例生存しており、3日目のBUNと7日目までの

生存率で比較したところ、継代回数が8回までのmProx-SP投与時にはBUN上昇の低減や生存率の改善が有意に示されたが、継代回数21回のmProx-SPを移植した際にはいずれも有意な改善が得られなかった。この結果は *in vitro* study での mProx-SP の CDDP に対する障害抵抗性が減弱していた所見が *in vivo* への投与結果に反映されていると考えても矛盾しない。*in vitro* study での mProx-SP の CDDP に対する障害抵抗性を細胞の標準化評価系として適用することで、*in vivo* への細胞治療の確実性をより向上させることが可能と考えられる。

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。

本研究では、cell processingにより得られたマウス腎皮質尿細管由来上皮系幹細胞のcharacterizationを特に機能的側面より行ない、CDDPに対する障害抵抗性を標準化評価系の一つとして有用な指標になり得ることを確認した。また、マウス急性腎障害モデルへの移植実験を実施し、組織学的にも尿細管障害が改善し、一部尿細管への生着も示された。一方、マウス腎皮質尿細管由来上皮系幹細胞単回投与によるマウス慢性間質性腎障害モデルへの介入治療効果は認められないことが分かった。

E. 結論

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, in press.
- 2) 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(1):e19-e26. 2008
- 3) Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamiyo A, Kimura K, Fujita T, Kinugawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T: Renal L-Type Fatty Acid Binding Protein: Possible Stress Reducer and Biomarker for Human Renal Microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 18(11):2894-902. 2007
- 4) 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

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,
California

- 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, California

- G. 知的財産権の出願・登録
なし

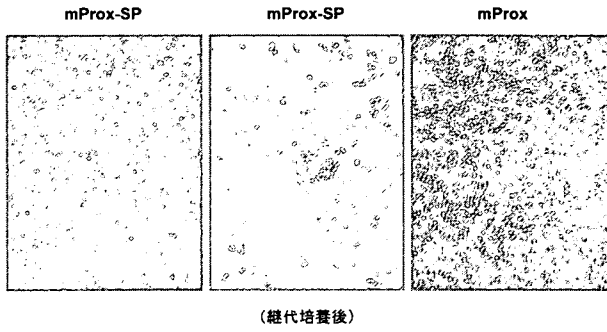


図 1

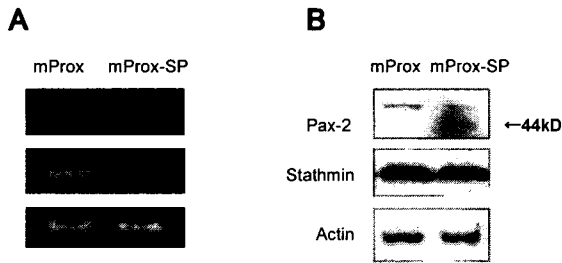


図 2

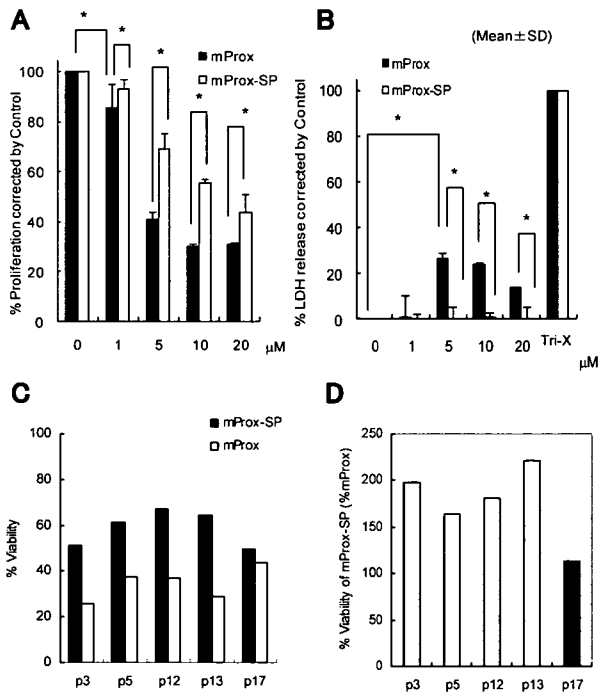


図 3

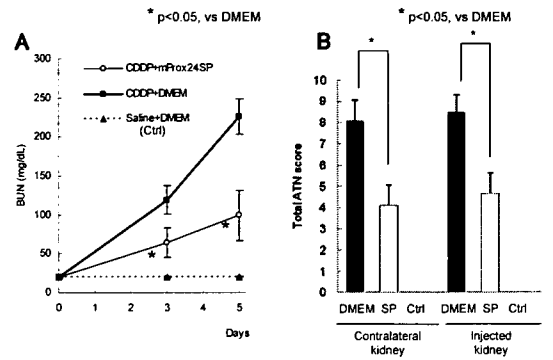


図 4

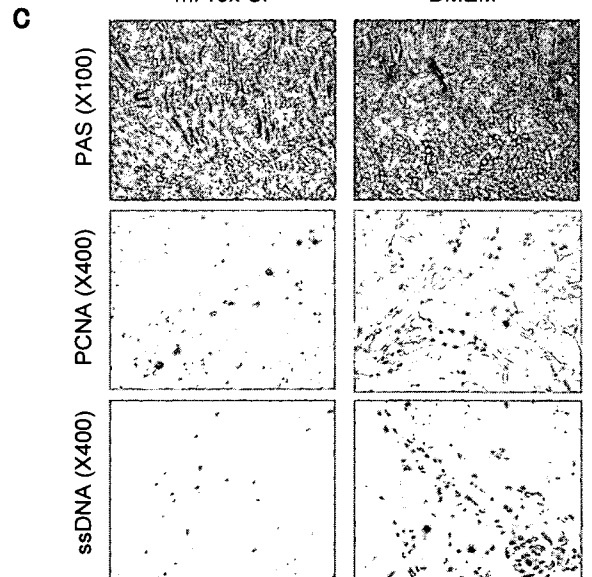
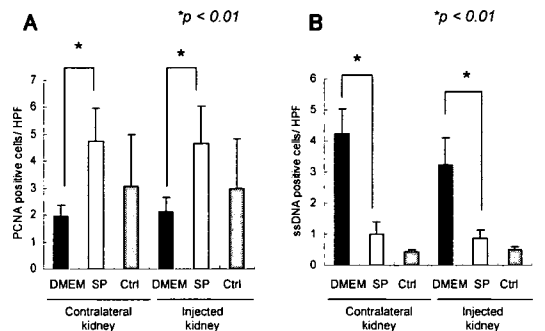


図 5

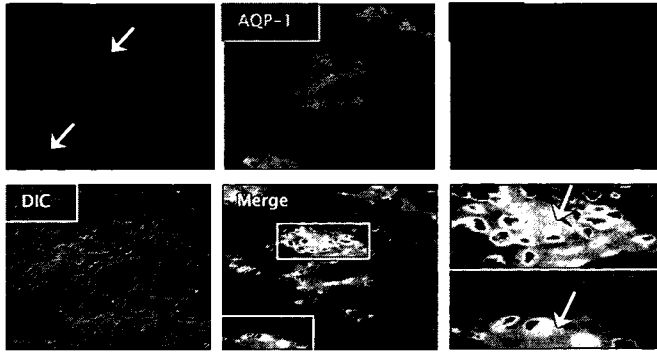


图 6

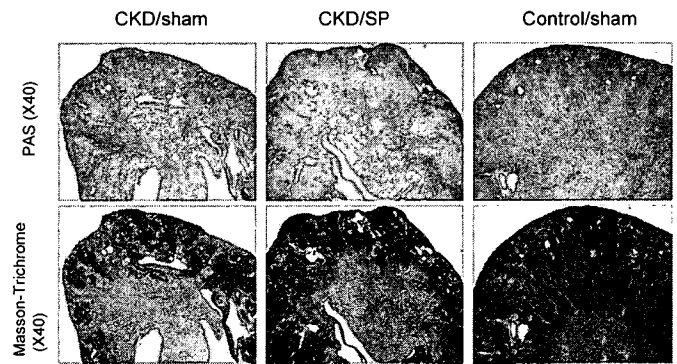
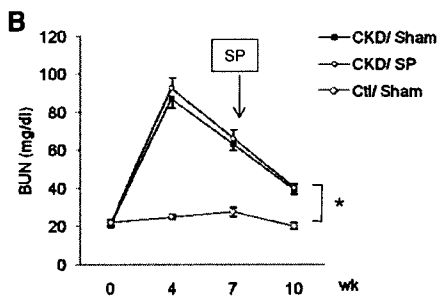
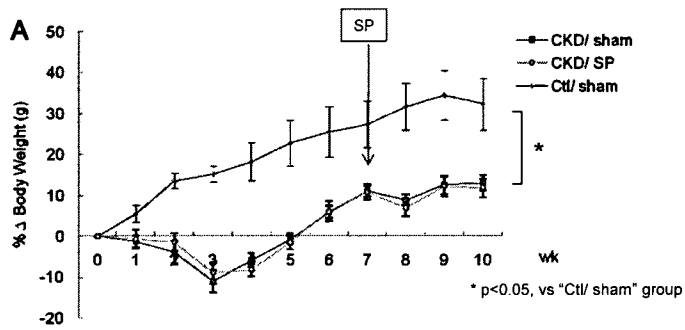


图 8

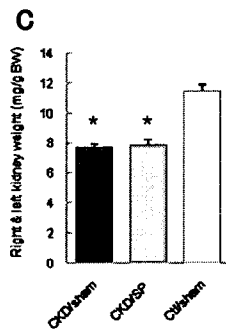


图 7

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 1

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）

研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamiyo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa 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
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
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	e19-e26	2008
Maeda R, Noiri E, Isobe H, Homma T, Tanaka T, Negishi K, Doi K, Fujita T, Nakamura E	A water-soluble fullerene vesicle alleviates angiotensin II-induced oxidative stress in human umbilical venous endothelial cells	Hypertens Res	31	141-151	2008
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
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
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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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
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
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
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
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	(in press)		2008