

200706009B

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

慢性腎障害の重症化防止を目的とした

幹細胞移植による残存腎機能再構築

(H17-再生-一般-010)

平成17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 大島 伸一

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総合研究報告	
慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残存腎機能再構築	1
大島伸一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	69
III. 研究成果の刊行物・別刷	70

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）

慢性腎障害の重症化防止を目的とした
幹細胞移植による残存腎機能再構築

総合研究報告書

大 島 伸 一

国立長寿医療センター総長

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）

総合研究報告書

慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残存腎機能再構築

主任研究者：大島 伸一 国立長寿医療センター総長
分担研究者：篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院角膜センター長
菅谷 健 東京歯科大学市川総合病院角膜センター客員講師
室原 豊明 名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学教授
後藤 百万 名古屋大学大学院医学系研究科泌尿器科学教授（H19年度）
小野 佳成 愛知淑徳大学医療福祉部教養教育センター教授（H17・18年度）
松尾 清一 名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学教授
山本 徳則 名古屋大学医学部附属病院泌尿器科講師
槇野 博史 岡山大学医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学教授
野入 英世 東京大学医学部附属病院血液浄化療法部准教授
谷口 英樹 横浜市立大学大学院医学研究科臓器再生学教授

研究要旨

本研究は、幹細胞移植により残存腎機能を再構築し、腎障害の重症化防止を目指す実用化研究である。本研究班では移植細胞別に3つのチームが連携を図って研究を進めた。

(1) セルプロセッシングチームとして、菅谷、篠崎らはヒト尿中落下細胞を非侵襲的に採取し、腎障害の高感度のバイオマーカー尿中L-FABPを指標に、効率よく腎特異的幹/前駆細胞を培養する新技術(特許出願2006)を確立した。山本らは計61症例から採尿し、谷口、菅谷らは樹立した腎特異的幹/前駆細胞株の薬剤感受性と癌化リスクの評価を行い、高度に分化した尿細管特異的なドーム形成能を指標に移植細胞培養法を標準化した。(2) 腎特異的幹細胞移植チームとして、槇野らはラット近位尿細管S3セグメントに存在する幹/前駆細胞株を樹立(特許取得2008)した。この細胞はラット急性腎不全モデルの腎被膜下へ移植すると、一部は尿細管細胞に分化し腎組織の一部として再構築されるとともに、低下した腎機能を改善することが証明された。野入らは同様にマウス腎から樹立された幹/前駆細胞株を用い、腎被膜下に移植することで致死的な薬剤性腎障害を起こしたマウスを50%以上救命することができた。さらに山本らは、げっ歯類以外の大動物における細胞移植実験として、ヒト同様、イヌから尿中落下細胞を採取し、急性腎不全モデルの腎被膜下に自家移植(全43例)したところ、有意な腎機能改善効果が確認された。(3) 骨髄・末梢血・間葉系幹細胞移植チームとして、室原らは重度の下肢虚血患者に対する骨髄幹細胞移植を世界に先駆けて実用化した実績を有しているため、本研究でも当初は骨髄・末梢血幹細胞を用いて腎障害モデルへの細胞移植を行ったが、十分な治療効果が得られなかった。そこで松尾らは高齢者や慢性腎臓病患者からも採取が可能な脂肪組織に着目し、2%自己血清を含む培養液を用いる脂肪由来間葉系幹細胞の低血清培養法(特許出願2007)を確立した。本法により腎再生因子の分泌能が高い幹細胞を、脂肪組織1gから2週間で移植に必要な量選択的に得ることができた。さらにヒト脂肪由来間葉系幹細胞を腎障害モデルラットの腎局所に移植することで長期間生着し、腎機能の改善が達成された。

本研究班にて開発された腎組織特異的幹/前駆細胞の単離培養法および、間葉系幹細胞の培養増殖法により、他臓器に比して遅れていたヒト腎疾患に対する再生医療の実現化に向け、細胞移植プロセスの標準化と安全性評価の基盤技術が確立できたと考えられる。

A. 研究目的

日本における透析患者数は年々増加し 27 万人を超え、透析医療には約 1 兆 2 千億円の医療費を要している。腎不全医療は医療経済学的にも患者・介護者の QOL の観点からも深刻な状況にある。さらに慢性腎臓病が動脈硬化性の疾患(狭心症や心筋梗塞、脳梗塞、下肢閉塞性動脈硬化症など)を高率に合併することが明らかとなり、慢性腎臓病対策は医療全体を考えた上でも大変重要な課題となっている。

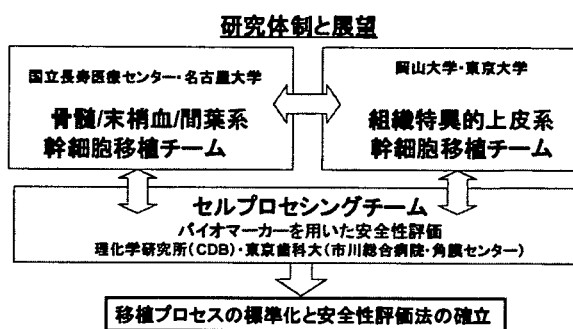
我々は、腎障害の重症化防止を達成すべく、幹細胞移植による残存腎機能の再構築を目指す再生医療の研究を行ってきた。障害を受けた際、腎臓には自己再生する能力があるが、その再生能を上回る障害が起こると腎臓は機能低下に陥るものと考えられる。腎組織を再生するものになる細胞(=幹細胞/前駆細胞)は腎臓内および骨髄などの腎臓外から供給されることがわかっている。我々は、腎臓内および腎臓外の幹細胞を用いる方法の両面から腎再生医療の実用化研究を行ってきた。

そこで本分担研究グループでは初年度、以下の移植細胞種別に目標を設定した。(1)ヒト腎疾患患者尿からの腎組織特異的幹/前駆細胞の単離と、培養条件の標準化、(2)イヌ尿中細胞の単離培養と自家細胞移植、(3)ラット骨髄末梢血幹細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療、(4)ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養、(5)ラット腎組織特異的幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療、(6)マウス腎組織特異的幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療。

2 年目以降は、以下の移植細胞種別に目標を設定した。(1)ヒト腎疾患患者尿からの腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞の単離と、培養実施例の数値目標達成、(2)イヌ尿中細胞の単離培養と自家細胞移植実施例の増加、(3)ラット骨髄末梢血間葉系幹細胞を用いた腎障害モデル

への移植治療、(4)ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養条件の標準化、(5)ラット腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療、(6)マウス腎組織特異的上皮系幹/前駆細胞を用いた腎障害モデルへの移植治療および安全性評価。

なお本研究は以下の流れ図に示す3つの研究チームの連携により進められた。



B. 研究方法

(1)ヒト腎組織特異的幹/前駆細胞

平成 17 年度：

(1-1)ヒト尿中落下細胞の培養

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 14 例、死体腎移植 4 例、腎部分切除術 4 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。

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、5 mg/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

培地と、マウス間葉系細胞 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。

(1-2) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

次に、分離した尿中落下細胞における遺伝子発現を確認した。詳細には、上述のようにして初代培養を 5 週間続けた細胞 1.5×10^6 個から得られた total RNA をサンプルとして、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。

(1-3) 尿中落下細胞からの腎臓幹/前駆細胞の分離

尿中落下細胞においても他の臓器で知られているような side population (SP) 細胞が存在し、腎臓幹/前駆細胞として機能している可能性が考えられるため、尿中落下細胞からの SP 細胞の分離を試みた。

詳細には、上述のように初代培養を 3 週間続けた尿中落下細胞を 1×10^6 個/ml に調製しヘキスト 33342 (Molecular Probe) を 5 mg/ml となるように添加した。その後、細胞を 37°C 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。

(1-4) 腎臓幹/前駆細胞の腎臓への生着

次に、分離した腎臓幹/前駆細胞が成体腎臓に生着し、機能する形質を有しているか否かを確認するため、成体腎臓に障害を与え、腎臓が再生する過程においてこの細胞が生着するか否かを検討した。

分離した SP 細胞をさらに 5 週間培養し、ヒト腎臓幹/前駆細胞を異種移植した。レシピエントとして、拒絶反応を起しにくい実験的免疫不全マウスである NOG マウスを使用し、虚血性急性腎不全モデルを作製した。SP 細胞を虚血解除した直後の腎皮膜下経路により注射器に

て細胞移植を行った。3 日後に剖検して腎臓を摘出し、凍結切片を作成、免疫組織化学的な解析を行った。

平成 18 年度 :

(1-1) ヒト尿中落下細胞の培養

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、死体腎移植 10 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 17 年度に標準化したプロトコルに準じた。すなわち、患者尿 10ml を遠心分離し、上清を除去した後、10% FBS を含有する DMEM 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。

(1-2) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

次に、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確認した。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。

平成 19 年度 :

(1-1) ヒト尿中バイオマーカーを用いたヒト腎組織特異的幹/前駆細胞培養の効率化

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

(1-2) ヒト尿中落下細胞の培養

上記にて確立したヒト尿中落下細胞の効率的な培養法に従い、名古屋大学泌尿器科および社会保険中京病院にて施行された生体腎移植 24 例、腎部分切除術 18 例から同意を得て無菌的に尿検体を採取した。術後直ちに、尿検体をセルプロセッシング施設である神戸理研に冷蔵輸送し、48 時間以内に採取された患者尿から尿中落下細胞を分離し、初代培養に供した。

尿中落下細胞の単離・培養法は 17 年度に標準化したプロトコルに準じた。すなわち、患者尿 10ml を遠心分離し、上清を除去した後、10% FBS を含有する DMEM で懸濁し、再度遠心分離して上清を除去して細胞を分離した。さらに、この懸濁、遠心分離、上清除去による細胞洗浄の操作を 4 回繰り返した。このようにして分離された細胞を、10% FBS を含有する DMEM/ F12 培地に終濃度として 5mg/ml インスリン、5mg/ml トランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2.5mg/ml ニコチナマイド、 10^{-8} M デキサメタゾン を添加した培地と、マウス間葉系細胞を 10% FBS を含有する DMEM で培養した際の培養上清とを 1:1 で混合した培地で懸濁し、ゼラチンコーティングを行った細胞培養皿にて培養した。

(1-3) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

分離した尿中落下細胞の単一細胞由来と考

えられる各コロニーにおける遺伝子発現を、昨年度同様、解析した。詳細には、上述のようにして単一細胞由来と考えられる初代培養を経時的に検鏡下 2 週間観察し続けた同心円状の各コロニーから total RNA を得た。RT-PCR 法または遺伝子チップ (Human Genome U133 Plus 2.0 Array Gene Chip、Affymetrix) を用いて遺伝子発現解析を行った。

(1-4) ヒト尿中落下細胞の安全性評価

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

(2) イヌ腎組織特異的幹/前駆細胞

平成 17 年度 :

(2-1) イヌ尿中落下細胞の培養

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 8 例実施された。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。イヌ尿中落下細胞はヒトの場合と全く同様に初代培養された。4 週間培養後、細胞を蛍光標識し、自家移植に供した。

(2-2) イヌ尿中落下細胞の自家移植

4 週間後、細胞採取した同じイヌについて、右腎動脈を露出し 50 分クランプし右単腎症腎虚血再灌流障害を作成した。血流再開直後に蛍光標識された 10^7 個の細胞を腎中央に 1 カ所または、上極、中央、下極の 3 カ所に 3 分割して局所注入した。細胞移植後 4 週間または 8 週間で剖検して腎臓を摘出し、ホルマリン固定、免疫組織化学的な解析を行った。

平成 18 年度 :

(2-1) イヌ尿中落下細胞の培養

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 8 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 6 例実施された。詳細には、左腎虚血 50 分直後から 1 時間、左腎中部尿管からチューブを腎盂に留置し無菌的に採尿した。採尿後、左腎を摘出し、イヌ尿中落下細胞はヒトの場合と全く同様に初代培養された。4 週間培養後、細胞を蛍光標識し、自家移植に供した。

(2-2)イヌ尿中落下細胞の自家移植

4 週間後、細胞採取した同じイヌについて、右腎動脈を露出し 50 分クランプし右単腎症腎虚血再灌流障害を作成した。血流再開直後に蛍光標識された 10^7 個の細胞を腎中央に 1 カ所または、上極、下極の 2 カ所に分割して局所注入した。細胞移植後 4 週間または 8 週間で剖検して腎臓を摘出し、ホルマリン固定、免疫組織化学的な解析を行った。その間、経時的に採血し、細胞移植群とコントロール群とに関して、腎機能を追跡した。

平成 19 年度 :

(2-1)イヌ尿中落下細胞の培養

昨年に引き続き、ヒト尿中落下細胞の自家移植による腎疾患治療というコンセプトを、げっ歯類よりも大型の動物で検証するため、名古屋大泌尿器科によりイヌ尿中落下細胞の自家移植が 19 例(累計 27 例)実施された。細胞移植を行わないコントロールとして左腎摘出 4 週間後に右腎の 50 分虚血再灌流が 10 例(累計 16 例)実施された。詳細には、左腎虚血 50 分直後から 1 時間、左腎中部尿管からチューブを腎盂に留置し無菌的に採尿した。採尿後、左腎を摘出し、イヌ尿中落下細胞はヒトの場合と全く同様に初代培養された。4 週間培養後、細胞を蛍光標識し、自家移植に供した。

(2-2)イヌ尿中落下細胞の自家移植

(a) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する自家尿中落下細胞移植 : ヒト同様、虚血再灌流後の尿中落下細胞から尿細管上皮前駆細胞を 4 週間培養した。細胞採取した同じイヌについて、右腎動脈を露出し、50 分クランプし右単腎症腎虚血再灌流障害を作成した。血流再開直後に蛍光標識された 10^7 個の細胞を腎中央に 1 カ所または、上極、下極の 2 カ所に分割して局所注入した。

(b) イヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対する臍型自己脂肪植え込み併用尿細管上皮前駆細胞治療 : 昨年までの検討で、細胞注入による侵襲と出血により強い線維化が起こることが問題となっている。そこで、ヒト腎癌部分摘出時に施行される自己内臓脂肪による止血手技をイヌ単腎虚血再灌流障害モデルに対しても取り入れた。自己内臓脂肪を約 1g 採取し、腎臓皮膜を約 1cm 切開し、その脂肪細胞を皮膜下に埋め込み 3-0 バイクリルで皮膜と脂肪を縫合した。(a) と同様、蛍光色素で尿細管上皮前駆細胞をマーカーし、腎臓上極、中央、下極の 3 カ所に 3 分割して注入した。細胞移植後 4 週間または 8 週間で剖検して腎臓を摘出し、ホルマリン固定、免疫組織化学的な解析を行った。その間、経時的に採血し、細胞移植群とコントロール群とに関して、腎機能を追跡した。

(3)ラット骨髄末梢血幹細胞

平成 17 年度 :

(3-1)Cisplatin 腎症ラット

急性腎不全モデルである Cisplatin 腎症ラットにおいて、骨髄幹細胞より培養した EPC による効果を検討した。7 週令の Wistar ラット次のように 4 群にわけ検討を行った。1)Control 群、2)Cisplatin 群、3)EPC 群、4)Cisplatin と EPC 群。Cisplatin は 7mg/kg を腹腔内投与した。EPC は、骨髄細胞を以前より報告された方法(CirRes 2002;90:E80)で培養

した。Cisplatin 投与 1 週間後に EPC を投与しその後 2 週間飼育して評価を行った。EPC の細胞数は、 $10^7/\text{ml}$ とした。尿は 1 週間毎にメタボリックゲージにて 24 時間尿を採取し蛋白尿などの評価を行った。また腎臓を取り出し組織学的な検討も行った。

(3-2) Doxorubicin 腎症ラット

慢性腎不全モデルである Doxorubicin 腎症ラットにおいて、骨髄幹細胞より培養した間葉系幹細胞による効果を検討した。今後、塩分負荷における血圧の変化に対する効果についても検討する予定である。

7 週令の Wistar ラット次のように 4 群にわけ検討を行った。1) Control 群、2) Doxorubicin 群、3) 間葉系幹細胞投与群、4) Doxorubicin と間葉系幹細胞投与群。Doxorubicin は、 $5\text{mg}/\text{kg}$ を経静脈的に投与した。間葉系幹細胞は Doxorubicin 投与当日と 1 週間後に経静脈的に投与した。骨髄細胞の培養は以前に報告されていたように行った (Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4857)。間葉系幹細胞数は、当初は、 $10^8/\text{ml}$ 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、 $10^7/\text{ml}$ とした。Doxorubicin 投与後、4 週間飼育し評価を行った。現在のところ塩分負荷については行っていないため血圧については評価していない。Cisplatin 腎症ラットと同様に 24 時間尿の採取と腎臓の組織学的検討を行う。

(3-3) Cisplatin 腎症に対する G-CSF、骨髄単核球細胞併用療法の効果の検討

7 週令の Lewis ラットに cisplatin $6\text{ mg}/\text{kg}$ を腹腔内投与し、骨髄単核球細胞単独群、G-CSF 単独群、G-CSF+骨髄単核球細胞群、コントロール群の 4 群に分けた。骨髄単核球細胞単独群では、cisplatin 投与 24 時間後に他の Lewis ラットから採取した骨髄単核球細胞 2.5×10^7 個を尾静脈より投与した。G-CSF 単独群では cisplatin 投与時、6 時間後、24 時間後、48 時

間後、72 時間後に G-CSF $50\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与した。G-CSF+骨髄単核球細胞群では、G-CSF 単独群と同様の G-CSF 投与に加え、cisplatin 投与 6 時間後に他の Lewis ラットから採取した骨髄単核球細胞 2.0×10^7 個を尾静脈より投与した。コントロール群では cisplatin 投与時、6 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に同量の生理食塩水を皮下投与した。4 群とも day0、day1、day4、day5、day7、day11、day29 に血液を採取し、腎機能を比較検討した。

平成 18 年度：

(3-1) Doxorubicin 腎症モデルの妥当性検証

細胞移植の治療効果を判定する慢性腎不全モデルとして Doxorubicin 腎症ラットを用いることの妥当性を検証するため、薬剤介入により進行性の組織障害抑制と腎不全の重症化防止が可能かどうか検証した。介入プロトコルは添付論文の通り。

(3-2) Doxorubicin 腎症ラット

慢性腎不全モデルとして Doxorubicin 腎症ラットを用いて骨髄単核球細胞 (BM-MNCs) および骨髄由来間葉系細胞 (BM-MSCs) による治療効果を検討した。骨髄細胞の培養は既報に準じた (Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:4857)。経静脈的投与：Wistar rat (6-8wks, male) を以下の 4 群にランダムにわけた。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、 $5\text{mg}/\text{kg}$ を経静脈的に投与した。BM-MNCs および 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、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。

腎実質内投与：F344/N rat (6-8wks, male) を以下の 4 群にランダムにわけた。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 および 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 106 個とした。Doxorubicin 投与 8 週間後、蛋白尿、血液クレアチニン、腎組織などの評価を行った。

被膜下投与 : F344/N rat (6-8wks, male) を以下の 3 群にランダムにわけた。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。

平成 19 年度 :

(3-1) Doxorubicin 腎症ラット

慢性腎不全モデルとして Doxorubicin 腎症ラットを用いて骨髄単核球細胞 (BM-MNCs) および骨髄由来間葉系細胞 (BM-MSCs) による治療効果を検討した。

(a) Protocol 1 : Wistar rat (6-8wks, male) を以下の 4 群にランダムに分けた。Control 群、Doxorubicin+生食投与群、Doxorubicin+BM-MNCs 投与群、Doxorubicin+BM-MSCs 投与群とした。Doxorubicin は、5mg/kg を経静脈的に投与した。BM-MNCs および BM-MSCs は Doxorubicin 投与時に経静脈的に投与した。BM-MNCs は 108 個とし、BM-MSCs は当初は 108 個を目標としていたが、必要数が培養から得られなかったため 106 個とした。Doxorubicin 投与 4 週間後、蛋白尿、血液クレアチニン値、腎組織などの評価を行った。

(b) Protocol 2 : F344/N rat (6-8wks, male) を以下の 4 群にランダムに分けた。Control 群、Doxorubicin+生食投与群、Doxorubicin+BM-

MNCs 投与群、Doxorubicin+BM-MSCs 投与群とした。Doxorubicin は 5mg/kg を経静脈的に投与した。BM-MNCs および BM-MSCs を Doxorubicin 投与 4 週後に腎実質内に直接移植した。

BM-MNCs は 107 個、BM-MSCs は 106 個とした。Doxorubicin 投与 8 週間後、蛋白尿、血液クレアチニン、腎組織などの評価を行った。

(c) Protocol 3 : F344/N rat (6-8wks, male) を以下の 3 群にランダムに分けた。Control 群、右腎摘出+Doxorubicin+生食投与群、右腎摘出+Doxorubicin+BM-MNCs 投与群とした。右腎摘出 2 週後に Doxorubicin 3mg/kg を、さらに 2 週後に Doxorubicin 2mg/kg を経静脈的に投与した。BM-MNCs 107 個を Doxorubicin 投与 2 週後に腎被膜下・腎実質内に移植した。Doxorubicin 投与 8 週間後、蛋白尿、血液クレアチニン、腎組織などの評価を行った。

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

(a) hMSC 細胞シートの作製 : カチオニックリポソーム (Cationic Liposome) に磁性ナノ粒子であるマグネタイト (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。

(4) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞

平成 17 年度 :

(4-1) ヒト脂肪組織からの間葉系幹細胞の分離・培養

- ① 開腹もしくは腹腔鏡下手術を受けられる患者に十分に説明し同意を得た上で内臓脂肪および皮下脂肪組織を採取する。採取された脂肪はメスで裁断する。
- ② 皮下脂肪吸引手術を受けられる患者からも同様に皮下脂肪を含む吸引液を採取する。大型遠心器を用いて吸引液を遠心し、上層から脂肪組織を採取する。
- ③ 上記で得られた脂肪組織をコラゲナーゼ消化する。
- ④ 1200 回転で5分間遠心分離し SVF (stromal vascular fraction) を採取する。
- ⑤ 一部はこの時点で凍結保存し、残りの SVF を以下の方法⑥⑦で培養する。
- ⑥ 北川らの開発した低血清培養法で間葉系幹細胞を選択的に分離増殖させる。具体的には2%血清と bFGF を用いて SVF 中の細胞を培養する。3-6 代培養した時点で、脂肪・骨・軟骨への誘導条件で培養し、それぞれの分化度を中性脂肪含有量、カルシウム含有量、alcian blue 染色で多分化能の評価を行う。残りは凍結保存する。
- ⑦ 脂肪提供者の臨床背景(年齢、性別、基礎疾患など)と脂肪由来幹細胞の量および質との関連を検討する。
- ⑧ 脂肪由来幹細胞を各種動物モデルに投与し治療効果を判定する。

平成 18 年度 :

(4-1) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の分離増幅に関する検討

ヒト皮下および内臓脂肪より低血清培養法を用いて選択的に幹細胞を得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(SVF 分画)を得た。SVF を DMEM/MCDB201+2%FBS +10ng/ml FGF-2 (低血清培養群)または DMEM+20%FBS (高血清培養群)または DMEM+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。低血清培養で得られた細胞についてフローサイトメトリーを用いて CD10、CD13、CD14、CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD117、CD133、Stro-1、HLA-DR の表面抗原の有無について解析した。

(4-2) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の多分化能についての検討

- 1) 脂肪誘導 : 0.5mM IBMX、1 μ M Dexamethasone、10 μ g/ml Insulin、100 μ M Indomethasin、1 μ M Hydrocortizon を含む培地で脂肪誘導をかけ、2週間後に BODIPY にて脂肪滴を染色した。
- 2) 骨誘導 : 1 μ M Dexamethason、50 μ M アスコルビン酸、10mM β -glycerophosphate を含む培地で骨誘導をかけ、3週間後に Von Kossa 染色を行った。
- 3) 軟骨誘導 : 5 μ g/ml Insulin-Transferrin-Mixture、0.1 μ M Dexamethazone、5ng/ml TGF- β 1、5ng/ml BMP-2 を含む培地で軟骨誘導をかけ、2週間後に Alcian Blue 染色を行った。

(4-3) 脂肪由来幹細胞のサイトカイン分泌能

の検討

1) 低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞およびヒト腎由来線維芽細胞(HEK293 cell)のサイトカイン分泌量を比較検討した。それぞれの細胞を25cm フラスコにて培養し、セミコンフルエントになったら培養液を5mlのDMEM+10%FBSに交換した。24時間培養後に上清を採取し、VEGF-A、VEGF-C、HGF、FGF-7(KGF)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) 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。低血清培養(DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2)、高血清培養(DMEM+20%FBS)、高血清+FGF2(DMEM+20%FBS+10ng/ml FGF-2)の3種類の培養液で同じヒト脂肪由来のSVFを培養した。4から5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。その後、正常酸素下と低酸素下(1% O_2)の2群に分けて培養した。24時間後に培養上清を採取し、VEGF-A、VEGF-C、HGF、FGF-2、FGF-7(KGF)、TGF- β 、IL-6、IL-8、IL-10、MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 、レプチン、アディポネクチン、レジスチンを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。

(4-4)低血清培養法による脂肪由来幹細胞の創傷治癒促進効果の検討

7週齢のF344ラットの背部の皮膚を1.5x1.5cmの正形状に全層切除した。低血清培養にて分離培養したラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞 1×10^7 個(低血清培養脂肪由来幹細胞治療群)または高血清培養にて分離培養したラット皮下脂肪由来間葉系幹細胞 1×10^7 個(高血清培養脂肪由来幹細胞治療群)をCarboxy-fluorescein diacetate(CFDA)にてラベル後、DMEMに懸濁し、切除部位周辺の皮下に注入し

た。コントロールはDMEMのみを皮下注した。経時的に皮膚欠損部の面積を測定し、比較検討した。また、治療3日目の皮膚組織を肉芽部およびその周辺部に分けて採取し、組織中のVEGF、HGF濃度をELISA法にて測定した。治療3日目、6日目、14日目の組織をCFDAに対する抗体で免疫染色し、細胞を追跡した。また、6日目の組織をCD31にて染色し、血管への分化について検討した。

(4-5)低血清培養法による脂肪由来幹細胞の腎障害に対する効果の検討

12週齢のヌードラットの右腎臓を摘出し、1週間後に葉酸200mg/kgを尾静脈より投与し、急性腎不全モデルを作成した。葉酸投与7時間後に低血清培養にて分離培養したヒト皮下脂肪由来間葉系幹細胞 4×10^6 個を生食に懸濁し、左腎皮膜下に注入した。コントロールは生理食塩水のみを注入した。24時間後にペンシル型CCDカメラにて腎皮膜直下の尿細管周囲毛細血管の血流を測定した。その後、経時的にBUN、S-Crを測定し、比較検討した。また、治療14日目にラットを屠殺し腎組織を採取し、ヒト特異的抗原(LaminA/C)に対する抗体にて免疫染色を行った。

(4-6)脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞による下肢虚血(ASO)モデルの治療効果の検討

名古屋大学農学部北川教室で樹立された脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞はrat脂肪細胞由来stromal vascular fractionをsingle colony isolationにより分離したものであり、内皮条件で培養することによりマトリゲル上でのTube formationの形成やアセチル化LDLの取り込み能を持つことが示されている。我々はこの細胞をさらにFACSにより表面マーカーの解析を加えると共にサイトカイン分泌能を解析した。またラット下肢虚血モデルを作成しcontrolにはDMEMのみを、治療群には細胞を 1×10^7 個を下肢筋肉内に注入し2週間後に

Leaser-Doppler により表皮血流を、CCD カメラにより筋肉内毛細血管血流を、筋肉組織を ALP 染色することにより capillary-to-muscle fiber ratio にて毛細血管密度を測定し、組織中サイトカイン評価した。

平成 19 年度：

(4-1) Stromal Vascular Fraction ; SVF

(a) 吸引脂肪からの SVF の採取方法の確立および SVF の量・性質の検討：ヒトの皮下吸引脂肪を採取し、臨床応用に十分な数の SVF の採取が可能かどうかを検討した。また FACS にて表面マーカーの解析を行ない、培養時のサイトカイン分泌能につき検討した。また凍結保存時の可能性につき検討するため凍結 SVF の viability を調べるため増殖速度、CD34 陽性率、サイトカイン分泌に関して検討した。

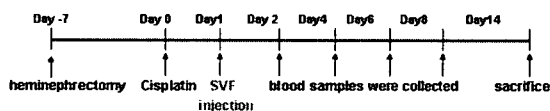
(b) 腎不全動物モデルでの治療効果の検討：ラットシスプラチン腎症モデルをラット皮下にシスプラチン 7mg/kg 注射する事により作成し SVF を 1×10^6 の 6 乗個を被膜下に注入し腎機能の評価した。

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.



(4-2) 低血清培養脂肪組織由来間葉系幹/前駆細胞

(a) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の増殖に関する検討：

① ヒト皮下脂肪より低血清培養法を用いて選択的に幹細胞を増殖する方法について検討した。手術時に得られたヒト皮下脂肪組織をメスにて細断し、1mg/ml のコラゲナーゼ type I を

加えて 37°C、60 分間振とうした。処理溶液を孔径が 100 μ m のスチールメッシュで濾過し、コラゲナーゼ消化されていない組織片を取り除いた。室温で 5 分間、1200rpm の遠心で細胞懸濁液を遠心することで、沈澱する細胞分画を得た。得られた細胞分画を DMEM/MCDB201+2% FBS+10ng/ml FGF-2 (低血清培養群) または DMEM/MCDB201+20%FBS (高血清培養群) または DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2 (高血清+FGF2 群) の 3 群に分けて培養を行った。3 群間で細胞の増殖速度について比較検討した。

② ラットにおける皮下脂肪・骨髄由来幹細胞の増殖の比較検討を行った。F344 ラット (オス・10 週齢) の皮下脂肪をメスにて細断し、1mg/ml のコラゲナーゼ type I を加えて 37°C、60 分間振とうした。処理溶液を孔径が 100 μ m のスチールメッシュで濾過し、コラゲナーゼ消化されていない組織片を取り除いた。室温で 5 分間、1200rpm の遠心で細胞懸濁液を遠心することで、沈澱する細胞分画を得た。得られた細胞分画を DMEM/MCDB201+2%FBS+10ng/ml FGF-2 (低血清培養群) または DMEM/MCDB201+20%FBS (高血清培養群) または DMEM/MCDB201+20%FBS+10ng/ml FGF-2 (高血清+FGF 2 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/MCDB 201+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：
低血清培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞による下肢虚血 (ASO) モデルの治療効果を検討した。F344 nude ラットで下肢虚血モデルを作成し、虚血下肢筋肉に①低血清培養ヒト脂肪組織由来細胞 1×10^7 個 (低血清群) ②DMEMのみ (control 群) を各々注入した。Laser-Doppler 法により下肢血流を経時的に比較検討した。また治療3日目の筋組織を採取し、組織中の human VEGF、human HGF 濃度を ELISA 法にて測定した。

(5) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞

平成 17 年度：

(5-1) ラット腎組織特異的幹/前駆細胞株 rKS56 細胞の標識細胞の作製

投与した rKS56 細胞を追跡するため、シスプラチン誘導急性腎不全モデルへの細胞投与実験では、LacZ plasmid 導入 rKS56 細胞 (rKS56-LacZ 細胞) を作成し、細胞移植に用いた。IV型コラーゲンでコートした6-well plateにrKS56細胞を 5×10^4 cells/well にて撒き、1日後にFugene-6 (Roche Diagnostic) を用い pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ plasmid を細胞内に導入した。

(5-2) 虚血再灌流ラット急性腎不全モデルへの rKS56 細胞投与

100-150g 体重の雄性 SD ラット (Clea Japan Inc.) の右腎動脈を結紮し、左腎を摘出した。予備実験では、虚血再灌流モデルでの腎障害は第3-4病日がピークで、第7病日には腎機能・腎組織変化が改善した。投与した rKS56 細胞を追跡するため、虚血再灌流モデルへの投与実験では、Vybrant Di-0 solution にて標識した。rKS56 細胞を Vybrant Di-0 solution を含む無血清培地内で10分間 incubate し標識した後無血清培地で2回洗浄し細胞投与を行った。40分後に結紮を解除し、400 μ l の墨汁を加えたPBSで懸濁し、Di-0 標識した rKS56 細胞 (1.6×10^7 個) を、右腎臓の皮質内に4カ所注入した。①対照非疾患群 ($n=6$)、②虚血再灌流非治療群 ($n=7$)、③虚血再灌流 rKS56 細胞投与群 ($n=6$) の3群を作成した。第4、7病日に屠殺し、腎機能評価および腎組織学的検討を行った。

(5-3) シスプラチン惹起急性腎不全ラットモデルへの rKS56 細胞投与

200-250g 体重の雄性 SD ラットの腹腔内に、生食で溶解したシスプラチン (sigma) を 6mg/kg 単回投与した。既報にてシスプラチン投与後、5日目に BUN/Cr 増悪がピークとなり、9日目に改善することが報告されている。シスプラチン

投与 2 日後に rKS56-LacZ 細胞を左腎被膜下もしくは経左腎動脈的に投与した。被膜下投与群では、 1.0×10^6 個の rKS56-LacZ 細胞(生食 $300 \mu\text{l}$)を腎被膜下に被膜が膨隆するように 27G 針を用いて投与した。また経左腎動脈的投与群では、下行大動脈の腎動脈分岐部の上下と右腎動脈の計 3ヶ所を阻血し、左腎動脈分岐部に 27G 針を穿刺し、 1.0×10^6 個の rKS56-LacZ 細胞(生食 $300 \mu\text{l}$)を投与した。穿刺部の止血を確認後、3ヶ所の阻血を解除した。実験は①腎被膜下・rKS56-LacZ 細胞投与群($n=5$)、②経腎動脈・rKS56-LacZ 細胞投与群($n=5$)、③腎被膜下・生食投与群($n=5$)、④経腎動脈・生食投与群($n=4$)の計 4 群で検討した。シスプラチン投与後第 5, 9 病日に屠殺し、両側腎臓を摘出した。血清 BUN・Cr・総蛋白, AST・ALT による肝機能の評価、尿蛋白と尿中クレアチニン、尿中 NAG 定量を行った。

平成 18 年度 :

(5-1) rKS56-LacZ 細胞の作成

生体内へ投与された rKS56 細胞の分布を経時的により正確に追跡するため、beta-gal を stable に発現する rKS56 細胞(rKS56-LacZ 細胞)を plasmid DNA 遺伝子導入により作成し、シスプラチン誘導急性腎不全モデルラットへの細胞投与時に用いた。IV 型コラーゲンでコートした 6-well plate に rKS56 細胞を 5×10^4 cells/well にて撒き、1 日後に Fugene-6 (Roche Diagnostic)を用いて pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ plasmid を細胞内に導入した。LacZ を恒性発現した rKS56 細胞を得るために、G418 (Sigma) $500 \mu\text{g/ml}$ 含有培地で培養し、得られたコロニーを single cell 化して再度培養、その後出現したコロニーを X-gal staining kit (Roche)にて染色し、青色に染まったコロニーを選択して取り出し、その細胞群を G418 ($500 \mu\text{g/ml}$)含有培地にてさらに継続培養し、rKS56-LacZ 細胞を樹立した。

(5-2) シスプラチン誘導急性腎不全ラットモデルへの rKS56-LacZ 細胞投与

200-250g 体重の雄性 SD ラットの腹腔内に、生食で溶解したシスプラチン(Sigma) 6 mg/kg 体重を単回腹腔内投与した。既報にて、シスプラチン投与後 5 日目に BUN/Cr 増加がピークとなり、9 日目には改善することが報告されている。本検討では、シスプラチン投与 2 日後に rKS56-LacZ 細胞を左腎被膜下もしくは経左腎動脈的に投与した。腎被膜下投与群では、 1.0×10^6 個の rKS56-LacZ 細胞(生食 $300 \mu\text{l}$ 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。また経左腎動脈的投与群では、下行大動脈の腎動脈分岐部の上下と右腎動脈の計 3ヶ所を阻血し、左腎動脈分岐部を 27G 針にて穿刺し、 1.0×10^6 個の rKS56-LacZ 細胞(生食 $300 \mu\text{l}$ に浮遊)を投与した。穿刺部の止血を確認後、3ヶ所の阻血を解除した。①腎被膜下・rKS56-LacZ 細胞投与群(rKS-SC 群: $n=5$)、②経腎動脈・rKS56-LacZ 細胞投与群(rKS-IA 群: $n=5$)、③腎被膜下・生食投与群(vehicle-SC 群: $n=5$)、④経腎動脈・生食投与群(vehicle-IA 群: $n=4$)の 4 実験群にて検討した。シスプラチン投与後第 5, 9 病日に、24 時間蓄尿を行い、屠殺 6 時間前に BrdU (50 mg/kg 体重)の腹腔内注射を行ってから、両側腎臓を摘出した。血清 BUN・Cr・総蛋白の測定、血清 AST・ALT 測定による肝機能の評価、尿蛋白と尿中クレアチニンの測定を行った。

(5-3) Bluo-gal 染色

投与した rKS56-LacZ 細胞の腎への生着を確認する目的で腎組織の Bluo-gal 染色を行った。すなわち、摘出腎を固定液(PBS, 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, 0.02% Nodidet-P40)に、 $4^\circ\text{C} \cdot 1$ 時間浸漬し、PBS にて洗浄した後、 1 mg/ml Bluo-gal (beta-gal の基質)反応液 (3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferro-cyanide, 1.5 mM

magnesium sulfate, 0.2% sodium deoxycholate, 0.1% NP-40)内に4°C・24時間浸漬し、発色させた。その後、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。

(5-4)組織学的検討

シスプラチン誘導急性腎不全モデルの尿細管障害は主として皮髄境界部に著明に観察されるため、近位尿細管の組織学的尿細管障害度を検討した。すなわち、PAS染色した腎切片を、拡大倍率400倍にて無作為に観察し、得られた20視野中の尿細管障害度をgrade0-5にてスコア化して評価した。

(5-5)免疫組織化学染色

腎組織における近位尿細管上皮細胞マーカー発現・細胞増殖を検討する目的で、酵素抗体法にてAQP-1・Ki-67免疫染色を行った。また、腎再生に寄与する因子の発現変化の検討目的にて、代表的な腎再生因子であるHGFと、その受容体であるc-Metの免疫染色を酵素抗体法にて行った。Bluo-gal染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)内で10分間microwave処理(抗原賦活)した。一次抗体として抗AQP-1抗体(Chemicon, 1:400)・抗Ki-67抗体(DAKO, 1:100)・抗HGF抗体(東京免疫化学)・抗c-Met抗体(Santa Cruz)を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体(フナコシ)を用い、Vectastain Elite ABC kit(Vector Laboratories)にて発色反応を行った。また、尿細管基底膜の同定の目的にて、IV型コラーゲンの免疫染色を行った。Bluo-gal染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、0.1%トリプリン液にて37°C、30分処理した。一次抗体として抗IV型コラーゲン抗体(LSL, 1:100)、二次抗体としてビオチン標識抗マウス抗体(フナコシ)を用い、Vectastain Elite ABC kitにて発色反応を行った。さらに、皮髄境界部の細胞増殖を観察する目的で、BruU免疫染色を行った。Bluo-gal

染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、Cell proliferation kit(Amersham)にて染色し、拡大倍率400倍にて無作為に観察し、得られた20視野中の皮髄境界部のBrdu陽性細胞数を検討した。

(5-6)TUNEL染色

皮髄境界部の尿細管上皮細胞のアポトーシスの程度を評価するため、TUNEL染色を行った。Bluo-gal染色後の腎組織のパラフィン切片(4 μ m厚)を用い、ApopTag plus *in situ* Apoptosis Detection Kit(Chemicon)にて染色し、拡大倍率400倍にて無作為に観察し、得られた20視野中の皮髄境界部のTUNEL陽性細胞数を検討した。

(5-7)片腎摘および抗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 \cdot 1に浮遊)を腎被膜下へ、被膜が広範囲に膨隆するように27G注射針を用いて投与した。①片腎摘+Thy-1+rKS56-LacZ細胞投与群($n=5$)、②片腎摘+Thy-1+生食投与群($n=6$)、③片腎摘群($n=4$)、④正常対照群の4群にて検討した。rKS56-LacZ細胞投与後第5もしくは10週目に、24時間蓄尿を行い、腎臓を摘出した。血清BUN・Cr・総蛋白の測定、尿蛋白と尿中Crの測定を行った。シスプラチン腎症モデルと同様にrKS56-LacZ細胞の腎臓における分布をbluo-gal染色により検討した。

平成19年度：

(5-1) 片腎摘および抗 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。

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

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

(5-3) 胎生期腎臓を使用した培養アッセイ系による評価

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

それぞれを培養アッセイ系に使用した。上記方法にて分離した胎生 13 日目の腎臓を transwell 上にて培養した。培養条件は DMEM/F12+10%FCS+1%antibiotics にて行った。

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

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

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

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

(f) rKS56 細胞を用いた 3 次元培養 : 上記方法にて、発生期の腎臓を in vivo から in vitro へと写し、腎臓発生を再現する技術を習得した。その技術を応用し、rKS56 細胞の組織構築能を検討した。rKS56 細胞をハンギング・ドロップ法にて細胞塊にし、それをマトリジェル内で種々の培養条件下にて培養し、rKS56 細胞が腎臓関連の組織へと分化するかの検討を行った。

(6) マウス腎組織特異的幹/前駆細胞

平成 17 年度：

(6-1) マウス腎臓幹/前駆細胞の培養方法の標準化

培養方法の標準化を行う段階で、ヒト尿中落下細胞を用いる際考慮すべき個体差を回避するため、初年度は組織特異的幹細胞が局在すると考えられている近位尿細管 S3 セグメントから樹立され長期間継代培養したマウス近位尿細管細胞株 (mProx24 細胞) を用いた。まず mProx24 細胞を用いてフローサイトメトリーによる single cell sorting を行い、幹細胞が存在すると考えられている SP fraction と、比較対象の main population (MP)、non-SP fraction、それぞれからソートした 1 個ずつの細胞についてクローナルな培養を行った。また、得られた SP 細胞について凍結融解による影響を検討した。

次に、こうして得られたクローナルな培養細胞を増殖後、再度フローサイトメトリーにより 1 回目と同様に分画し、再度培養に供した。このような操作を 4 回繰り返し、腎臓幹/前駆細胞の自己複製能について数値化した。さらに、この自己複製能、多分化能、高増殖能を維持するために必要なマウス間葉系細胞上清の効果を確認するため、上清を添加して維持してきた腎臓幹/前駆細胞を、マウス間葉系細胞上清を加えずに培養し、上清添加群と比較した。

(6-2) 致死性シスプラチン誘発急性腎不全マウスへの細胞移植

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 週間以内に致死的な急性腎不全が発症することを確認し、C57BL/6J 雄、野生型にシスプラチン 15mg/kg (溶液総量 60ml/kg) を腹腔内投与した。24 時間後に左背部を切開し、 5.0×10^5 個に調整した CMFDA 蛍光標識 mProx SP、または non SP を左腎被膜下に

投与後 (投与総量 $100 \mu\text{l}$)、穿刺部をアロンアルファ A (三共) で塞ぎ閉腹した。陽性対照群には DMEM/F-12 HAM を被膜下投与し、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/F-12 HAM を左腎に被膜下投与した。3 日目 (Day3)、5 日目 (Day5) に経時的に尾静脈より採血し、7 日目に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

(6-3) 腎虚血再灌流障害マウスへの細胞移植とバイオマーカーによる治療効果の評価

げっ歯類における細胞移植の治療効果をヒトに敷衍する場合、臨床的に測定可能なバイオマーカーを用いて評価することが望ましい。ヒトの急性腎不全において、腎近位尿細管に発現する L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) が腎臓の微小循環血流の低下に伴い遺伝子誘導され、速やかに尿中に排出される。このため、尿中 L-FABP は血中クレアチニンや NAG などの従来の指標よりも鋭敏な腎障害のバイオマーカーとして、種々の腎疾患で報告が相次いでいる。

そこで、ヒト型 L-FABP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (L-FABP-Tg) を用い、腎虚血再灌流障害モデルを作製した。本マウスはヒト L-FABP 発現調節領域を含む染色体遺伝子が導入されているため、ヒトと同様の L-FABP 誘導機構により腎障害時には尿中 L-FABP が著明に増大する。尿中ヒト型 L-FABP は臨床検査で用いられている ELISA キットにより定量し、細胞移植の治療効果を評価した。

L-FABP-Tg (C57BL/6 系雄) 背部正中を切開し、両腎を露出した。両側腎基部に血管鉗子をかけ、 37°C に保ったインキュベーターに入れた。30 分後に血管鉗子をはずし、 5.0×10^5 個に調整した蛍光標識 mProx SP を両腎被膜下に投与後 (投与総量 $100 \mu\text{l}$)、穿刺部をアロンアルファ A (三共) で塞ぎ、虚血腎の再灌流を肉眼的に確認し閉腹した。陽性対照群には DMEM/F-12 HAM を被膜下投与し、陰性対照群には擬手術後、同様に

DMEM/F-12 HAM を両腎に被膜下投与した。24 時間ごとの採尿のほか、虚血再灌流 24 時間後、48 時間後、72 時間後に尾静脈より採血し、5 日目 (Day5) に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

平成 18 年度：

(6-1) マウス腎臓幹/前駆細胞の培養方法の標準化

初年度に培養方法の標準化が完了したマウス近位尿細管細胞株 (mProx24 細胞) を用いた。

まず mProx24 細胞を用いて幹細胞が存在すると思われる 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 1×10^6 個/ml に調製しヘキスト 33342 (Morecular Probe) を 5mg/ml となるように添加した。その後、細胞を 37°C 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。

次に、こうして得られたクローナルな培養細胞を増殖後、再度フローサイトメトリーにより 1 回目と同様に分画し、再度培養に供した。このような操作を 4 回繰り返し、腎臓幹/前駆細胞の自己複製能について数値化した。

(6-2) マウス移植細胞の安全性評価

細胞移植にはマウス腎間葉系細胞の培養上清を添加した K-1 medium で培養することにより、一定の SP 分取率を維持しながら継代した mProx24-SP 細胞を使用した。mProx 24-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、マウス腎間葉系細胞、および cell sorting を行う以前の mProx24 細胞では発現が低く、mProx24-SP 細胞のみで高発現となる遺伝子の探索を Gene Chip (Affymetrix 社製) を用いて行った。さらに、本細胞を移植後長期観察する癌原性試験に着手した。

(6-3) シスプラチンによる in vitro 細胞障害性の評価

シスプラチン投与 24 時間前に mProx、および 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 (EC: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。

(6-4) 致死性シスプラチン誘発急性腎不全マウスへの細胞移植とバイオマーカーによる治療効果の評価

げっ歯類における細胞移植の治療効果をヒトに敷衍する場合、臨床的に測定可能なバイオマーカーを用いて評価することが望ましい。ヒトの急性腎不全において、腎近位尿細管に発現する L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) が腎臓の微小循環血流の低下に伴い遺伝子誘導され、速やかに尿中に排出される。このため、尿中 L-FABP は血中クレアチニンや NAG などの従来指標よりも鋭敏な腎障害のバイオマーカーとして、種々の腎疾患で報告が相次いでいる。

そこで、ヒト型 L-FABP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (L-FABP-Tg) を用い、致死性シスプラチン誘発急性腎不全モデルを作製した。本マウスはヒト L-FABP 発現調節領域を含む染色体遺伝子が導入されているため、ヒトと同様の L-FABP 誘導機構により腎障害時には尿中 L-FABP が著明に増大する。尿中ヒト型 L-FABP は臨床検査で用いられている ELISA キットにより定量し、細胞移植の治療効果を評価した。

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週間以内に致死的な急性腎不全が発症することを確認し、L-FABP-Tg (C57BL/6系雄)にシスプラチン15mg/kg(溶液総量60ml/kg)を腹腔内投与した。24時間後に左背部を切開し、 5.0×10^5 個に調整したCMFDA蛍光標識 mProx-SP、またはmProx(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。陽性対照群にはDMEM/F-12HAMを被膜下投与し、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/F-12HAMを左腎に被膜下投与した。3日目(Day3)、5日目(Day5)に経時的に尾静脈より採血し、7日目に屠殺して腎機能、組織学的所見を評価した。

平成19年度：

(6-1)マウス腎臓幹/前駆細胞の移植方法の標準化

(a) マウス：本研究では、ヒトにおける幹/前駆細胞移植のバイオマーカー候補であるL-FABPのヒト染色体遺伝子を導入したトランスジェニック(L-FABP-Tg)マウスを用い、ヒト腎臓と同様の遺伝子発現調節を受ける、ヒト化腎臓モデルとして実験に供した。これにより臨床指標と全く同じ検出系を動物実験による前臨床試験に導入することが可能となる。8~15週齢雄のC57BL/6J野生型およびEGFP-ヒトL-FABP-Tgマウスを用いて、1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管上皮細胞(以下mProx)を37°C5%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で分離された尿管上皮幹/前駆細胞(mProx-SP)を樹立。間葉系上皮細胞の培養上清を添加したK-1 mediumで培養しながら、single

cell sortingを複数回繰り返して純化した細胞群を使用した。細胞注入に際して、一部蛍光標識を行った。

(c) RT-PCR：mProx、mProx-SPそれぞれTRIzol(Invitrogen)を使用してプロトコルに従ってRNAを得た。Rever Tra Ace(TOYOBO)を用いてcDNAとし、RT-PCRを行った後、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'-cttgccttctctcgcaagc-5', Pax-2: Forward 5'-gaagctctgg atcgagtctt-3', Reverse 3'-gaatctccaagcctcattgta-5'である。

(d) ウェスタン解析：RIPAバッファで処理後、サンプルの一部は蛋白量測定に使用し、同量を用いてSDS-PAGEを行い、PVDF膜にトランスファーした。5%BSAでブロッキングの後、各抗体を一晩インキュベートし、二次抗体と反応後ECLplus(Amersham)を使用し、LAS-4000(FUJIFILM)で検出し解析を行った。

(e) シスプラチンによる細胞障害性の比較：シスプラチン投与24時間前にmProx、およびmProx-SPをそれぞれ96well plateに2x10⁴ 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。

(f) シスプラチン誘発急性腎不全：予備検討