

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。5.0x10⁵ 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 μl)、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。

(6-2)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 5.0x10⁵ 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後、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の評価した。

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 μm 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)を用い、BUN は尿素窒素 B テストワコー(和光純薬)を用い測定した。

(統計解析)

JMP 5.1J (SAS Institute, Cary, NC) などを用いて統計解析を行った。

(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。この際に、個人情報管理者は別におき、個人情報が漏れることがないように最大限の注意を払う。本研究の目的以外には細胞を用いないこと、研究終了後には廃棄処分することを厳守する。

動物実験については、動物倫理に照らして実験動物に対する負荷を低減するよう留意し、各大学、研究機関の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

平成 17 年度 :

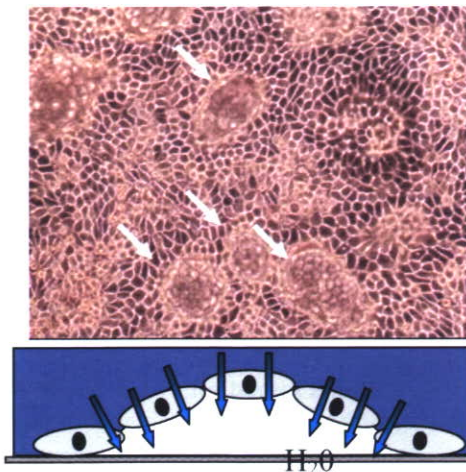
(1-1)尿中落下細胞の培養

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 例中 11 例、死体腎移植 4 例中 1 例、腎部分切除術 4 例中 3 例から初代培養細胞が樹立できた。

細胞を経時的に顕微鏡観察した結果、培養開始後 24 時間以内に培養皿上に生着し、以後 12 ~24 時間毎に細胞分裂を行い、培養開始から 2 週間後には約 5x10⁶ 個程度の細胞数にまで増殖した。このことから、この培養方法により、増殖能を有する細胞が得られることが確認された。

また、これらの増殖能を有する細胞群の中に

は、敷石状形態を示す尿細管上皮細胞様の細胞からなるコロニーが観察され、下図に示すように、経上皮輸送能を示唆する細胞ドームの形成も確認された。



これらの結果より、生体腎移植手術直後の患者の尿から分離した尿中落下細胞を培養することにより、尿細管細胞様の細胞を効率よく取得、培養可能であることが示された。

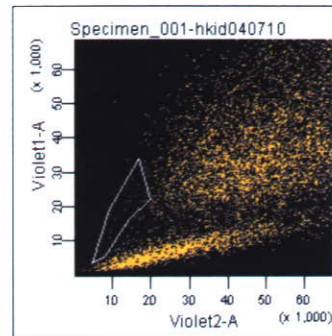
(1-2)尿中落下細胞の遺伝子発現解析

遺伝子発現解析の結果、尿中落下細胞においては、アクアポリン1、Na⁺/Cl⁻共輸送体(KCC3a)、N-カドヘリンなど、近位尿細管特異的な遺伝子の発現が確認された。また、近位尿細管およびヘンレループで発現する Na⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A4)、K-カドヘリン、ヘンレループおよび遠位尿細管で発現する Na⁺/HCO₃⁻共輸送体(SLC4A7)、遠位尿細管で特異的に発現するカルピンジン D28K などの遺伝子発現も確認された。また、胎児における発生期の腎臓で発現する Pax2 や Pax8 などの遺伝子の発現が確認された。

これらの結果から、尿中落下細胞の初代培養細胞中には、発生期の腎臓に存在する腎臓幹/前駆細胞のような未分化細胞や、近位尿細管>ヘンレループ>遠位尿細管と続く腎ネフロン尿細管細胞様に分化した細胞が存在することが示唆された。

(1-3)尿中落下細胞からの腎臓幹/前駆細胞の分離

SP細胞の解析結果を下図に示す。



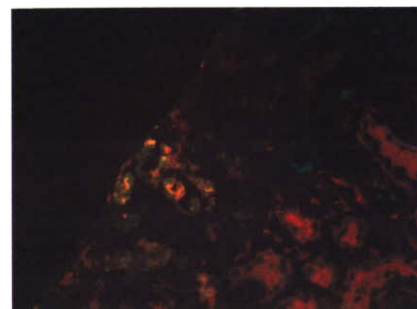
図中、実線で囲んだ領域がヘキスト 33342 弱陽性である。この画分は、レセルピンを添加した陰性コントロールでは完全に消失するため、この画分が SP 細胞画分であることが確認された。なお、尿中落下細胞中には平均で 0.33% (n=6) の SP 細胞が存在した。

この SP 細胞を分離・取得した後、初代培養時と同じ方法で培養を行った。培養を行うと、高増殖能を持ち、且つ近位尿細管上皮細胞様の敷石状形態を有する上皮性細胞コロニーが得られ、さらに培養を続けたところ、22 日経過後には細胞ドームの形成が確認された。一方、SP 細胞画分以外の細胞を同様の方法で培養しても、細胞ドームの形成は確認されなかった。

これらの結果から、初代培養した尿中落下細胞からヘキスト 33342 弱陽性の SP 細胞を分離することにより、尿細管上皮細胞に分化し得る腎臓幹/前駆細胞を分離・取得できることが示された。

(1-4)腎臓幹/前駆細胞の腎臓への生着

ヒト特異的 HLA 抗体(緑色蛍光標識)による免疫染色と、尿細管特異的アクアポリン 1 受容体に対する抗体(赤色蛍光標識)による免疫染色との 2 重染色を行った結果を下図に示す。



図中、黄色を呈した部位は、移植細胞が尿細管様の管腔構造を形成した共陽性の部位である。虚血性急性腎不全モデルに異種移植を実施したにもかかわらず、生命予後の悪化は観察されなかった。

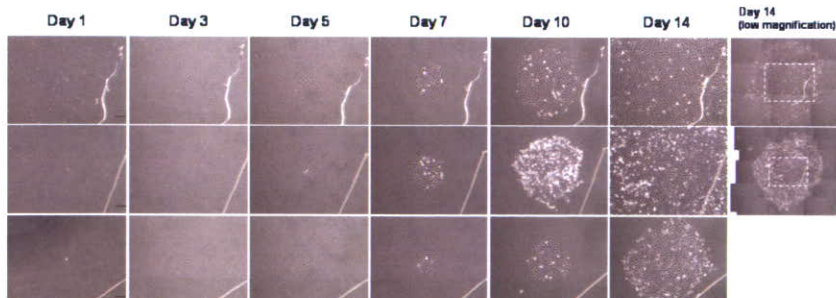
これらの結果から、分離した腎臓幹/前駆細胞は成体腎臓に生着し、尿細管特異的な機能を有するタンパクを発現する形質を有していることが示された。従って、この腎臓幹/前駆細胞を腎疾患患者に移植することで腎疾患を治療することができると考えられる。

平成 18 年度：

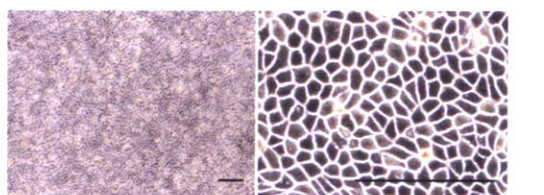
(1-1) 尿中落下細胞の培養

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 例中 20 例 (71%)、死体腎移植 10 例中 2 例 (20%)、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。本成績は、17 年度に比して実施例数で 2 倍以上という数値目標が達成できたことを示している。

細胞を経時的に顕微鏡観察した結果、培養開始後 24 時間以内に培養皿上に生着し、1 週間後までの倍化速度が 21.7 ± 2.8 という高増殖性を示した(下図)。Single cell から生じたコロニーの約 74% が敷石状形態の上皮様細胞となることが確認された。

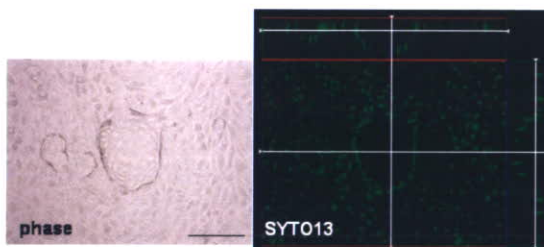


また、これらの敷石状形態を示すコロニーの中には尿細管上皮細胞に特徴的な水の経上皮輸送能を示唆する細胞ドームの形成も確認された(次図)。



Cobblestone-like cells

bar=200μm



Dome formation

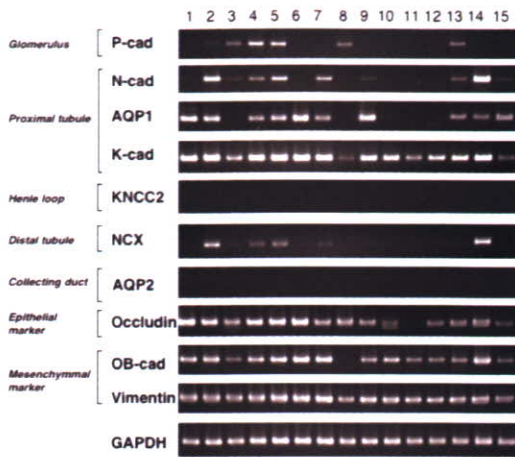
bar=200μm
Z axis=110μm

(1-2) ヒト尿中落下細胞の遺伝子発現解析

17 年度の遺伝子発現解析の結果、尿中落下細胞においては、アクアポリン 1、 Na^+/Cl^- 共輸送体 (KCC3a)、N-カドヘリンなど、近位尿細管特異的な遺伝子の発現が確認された。また、近位尿細管およびヘンレーループで発現する $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (SLC4A4)、K-カドヘリン、ヘンレーループおよび遠位尿細管で発現する $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 (SLC4A7)、遠位尿細管で特異的に発現するカルビンジン D28K などの遺伝子発現も確認された。また、胎児における発生期の腎臓で発現する Pax2 や Pax8 などの遺伝子の発現が確認された。

今回、独立して得られた 15 個の single cell コロニーを RNA サンプルとして、各コロニー内に異なるネフロンセグメントに相当する分化マーカーが同時に発現しているかどうかを RT-PCR 法により

検討した。その結果、複数の single cell コロニー内に胎児期のみで発現する遺伝子や、近位尿細管、ヘンレーループ、遠位尿細管それぞれに特徴的な遺伝子が同時に発現していることが確認された(次図)。



このことから、尿中落下細胞から得られる高増殖能を有する細胞の中に多分化能を獲得しうる幹/前駆細胞が含まれている可能性が示唆された。

今後、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、すでに当研究班においてげっ歯類で明らかにしたように SP 細胞などの single cell sorting により自己複製能を有する細胞が繰り返し培養可能かどうか、その安全性評価法も含めて検討する必要がある。

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

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)。

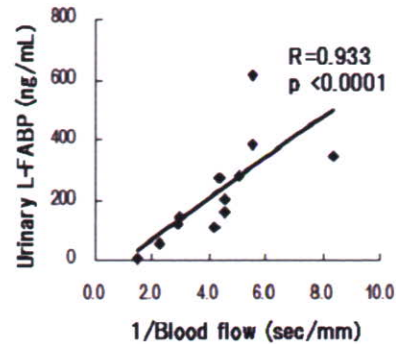


図 1-1 ヒト尿細管周囲血流と尿中 L-FABP との相関 (尿中 NAG, α 1MG, β 2MG と血流の間には有意な相関は認められなかった)

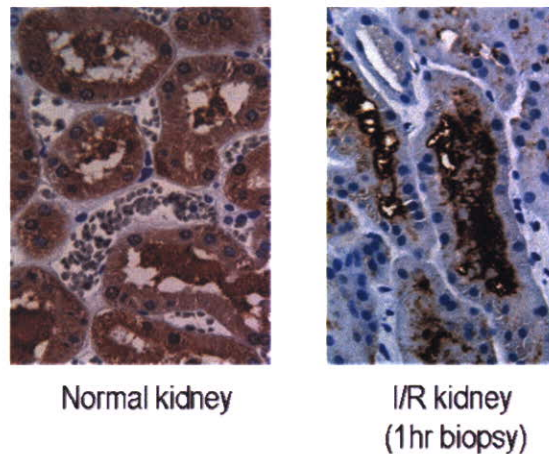


図 1-2 ヒト腎生検の L-FABP 免疫染色像
移植直後の尿細管周囲の微小循環血流と尿中 L-FABP との間に強い相関があり、その初尿中に腎組織特異的腎幹/前駆細胞が落下してくることから、尿中落下細胞培養の成否と尿中 L-FABP の値とを比較した (図 1-3)。

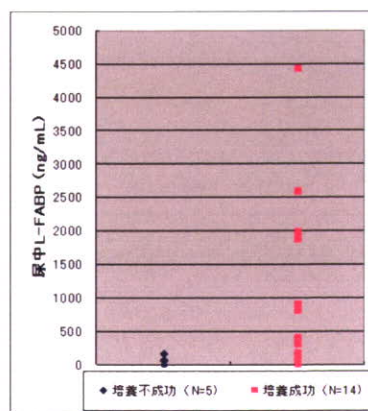


図 1-3
ヒト尿中 L-FABP と尿中落下細胞の培養成否との関係

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

昨年度に続き、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 HEK 293T 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)、AminopeptidaseA、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、HEK 293T に比して、約 1.3~14.9 倍も高値であった。

Expression of nephron marker genes
(DNA array data)

	Gene expression in		Intensity ratio of HUEC/HEK293T
	HUEC	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
N ⁺ /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 (NCX1)	-	-	-
Collecting duct markers			
Epithelial na ⁺ channel alpha	-	-	-
Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter, SLC4A1	-	-	-
Aquaporin 2	-	+	-

表 1-1 尿中落下由来腎特異的幹/前駆細胞の遺伝子発現

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。

Transcriptional Factors	Growth Factors / Receptors		Others
Pax2	FGF2	LIF	Integrin α8
Pax8	FGF7	LIFR	MMP2
Hoxa11	Gfra1	Six3	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		

表 1-2 尿中落下細胞の遺伝子発現

(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。

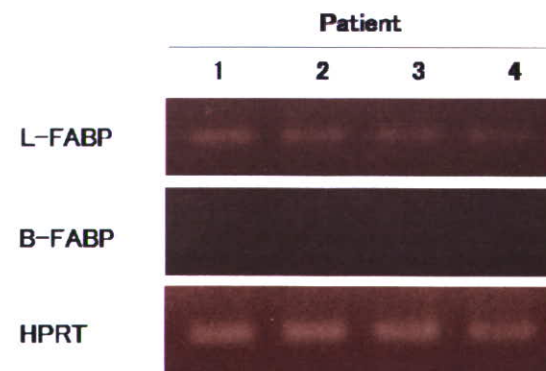


図 1-4 ヒト尿中落下由来腎特異的幹/前駆細胞の腎癌関連遺伝子 B-FABP 発現の探索

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

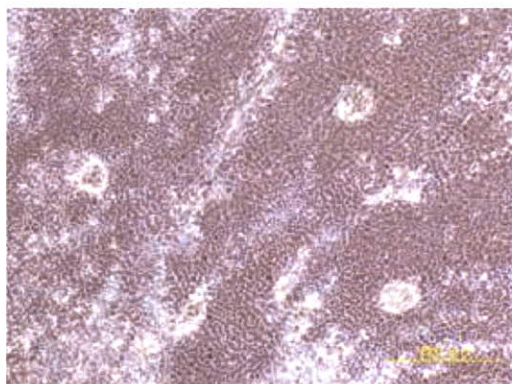
析からは、HK2 における B-FABP の発現を 1 としたとき、腎癌由来細胞株(TUHR14TKB)では2.6、尿中落下初代培養細胞で0.09、腎特異的幹/前駆細胞株(HUE233A)で0.91 と低値であった。

(2) イヌ腎組織特異的幹/前駆細胞

平成 17 年度：

(2-1) イヌ尿中落下細胞の培養

腎臓 50 分虚血、再灌流後 60 分腎盂に留置したチューブを介して尿中落下細胞から、尿細管上皮前駆細胞としてのドーム形成する細胞を primary culture により 100%(8/8)培養することに成功した(下図)。



SP fraction は 0.1%の比率にて、増殖能力の高い細胞として回収された。

(2-2) イヌ尿中落下細胞の自家移植

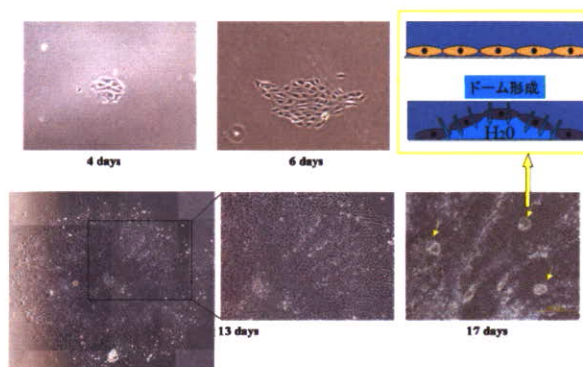
右単腎症に 4 週間適応させた後、右腎動脈を露出し 50 分クランプし腎虚血再灌流障害を作製した。再灌流後、蛍光でラベリングした尿細管上皮前駆細胞を腎局所注入した。その 4 週間後では、蛍光ラベリングされた尿細管前駆細胞が、腎臓被膜下の細胞注入部位に集塊を形成、さらに皮髄境界にかけて散在性に存在する像を確認した。8 週間後では、蛍光ラベリングされた尿細管前駆細胞を確認できなかったが、正常腎臓とかわらないマクロの所見であった。病理組織学的には、細胞注入部に PCNA 陽性の再生を示唆する細胞増殖所見が見られた。細胞の代わりに生食を打ち込んだ腎虚血再灌流障害コントロールイヌ 1 例では、著明な尿細管壊死

を伴う急性腎不全像を呈して術後 9 日にて死亡した。現在、血液生化学的な解析を行っている。

平成 18 年度：

(2-1) イヌ尿中落下細胞の培養

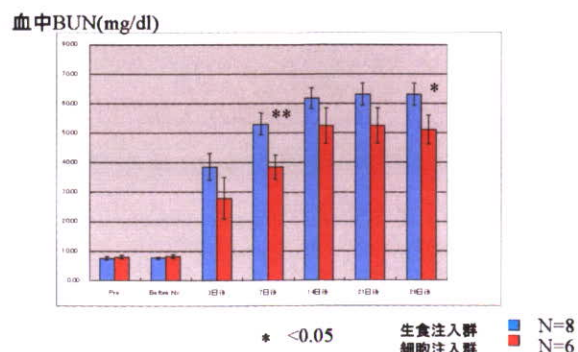
細胞移植を行わないコントロールとして左腎摘出 4 週間後に右腎の 50 分虚血再灌流のみ行う処置が 6 例、イヌ尿中落下細胞の腎実質への自家移植が 8 例、尿中落下細胞と同時にヒドロキシアパタイト(HA)の腎実質投与が 4 例、計 18 例実施された。腎臓 50 分虚血、再灌流後 60 分腎盂に留置したチューブを介して尿中落下細胞から、ヒトの場合と同様ドーム形成する尿細管上皮細胞を primary culture により 100%(15/15)培養することに成功した(下図)。



(2-2) イヌ尿中落下細胞の自家移植

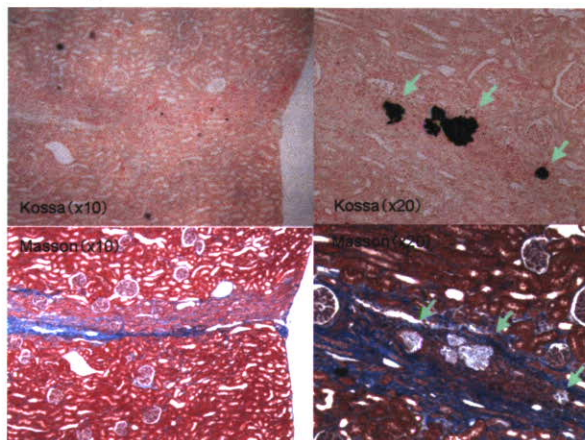
右単腎症に 4 週間適応させた後、右腎動脈を露出し 50 分クランプし腎虚血再灌流障害を作製した。再灌流後、蛍光でラベリングした尿細管上皮前駆細胞を腎局所注入した。イヌ自己細胞移植群(T 群=赤)と生食注入群(C 群=青)の血中 BUN の推移を下図に示す。

細胞投与群における腎機能の推移



細胞移植後1週間と4週間の時点において移植群で BUN 上昇に対する有意な抑制効果が認められ腎機能保護作用が示された。血中クレアチニンも移植群で抑制傾向であったが有意差は見られなかった。イヌ腎臓は、げっ歯類のそれと異なり、腎被膜が厚いため、被膜下への細胞注入が困難であることが、これまでの検討で問題視されていた。ヒト腎臓もイヌに近いので、イヌで有効な細胞注入法を開発することは極めて重要と考えられる。

そこで、生体適合性物質の一つヒドロキシアパタイト(HA)を細胞移植時に腎実質へ同時投与し、腎実質投与影響を組織学的に解析した。HA は、移植細胞の蛍光ラベルが減弱する移植後数週間後であっても、Ca 染色(下図矢印)により、注入部位が正確に同定できるという利点がある。



HA を細胞と混和した群(T+HA 群)では腎実質に尖刺した部分に顕著な線維化が確認された。一方、血中 BUN の悪化は見られなかった。(前C群 vs T+HA 群: 7.85 ± 0.54 vs 7.90 ± 1.00 mg/dl, 1週間後 C群 vs T群+HA: 53.61 ± 4.33 vs 48.10 ± 7.97 mg/dl, 4週間後 C群 vs T群+HA: 63.78 ± 4.52 vs 57.75 ± 9.24 mg/dl)。

今後、腎実質への尖刺細胞注入法に代わる細胞移植の手技開発が必要である。現在腎被膜切開後、患者自身の脂肪細胞を挟み込んで縫合する手技(名古屋大学では腎癌部分切除後の処置として長年の実績がある)をイヌに対して実施

し、移植細胞の注入スペース確保の可能性を検討中である。

このような手術の対象患者は、もとより腎機能低下のリスクが高く、術後腎障害重症化防止を目的として、部分切除時に患者自身の尿中落下細胞を採取し、培養後冷凍保管しておけば、後日腎機能が低下を始めた場合に腹腔鏡手術下に残存腎へ細胞移植できると考えられる。

平成 19 年度 :

(2-1)イヌ尿中落下細胞の培養

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。

(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: 4週間後に、右腎の50分虚血再灌流を実施し、細胞移植法に関しては種々検討した。右腎動脈を露出、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4週後の剖検時点では、腎皮膜下の細胞注入時注入針による侵襲・出血が原因と考えられる腎臓実質の線維化が見られた。また、侵襲を少なくするため皮膜下浅部に注入した場合は、細胞が注入部位から逆流してしまうことが判明した。

(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: 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(図2-1)。腎皮膜下臍型脂肪と腎臓実質に細胞注入出来た症例は、注入し細胞の腎皮膜外への逆流の所見はなかった(図2-2)が、脂肪細胞直下には、強い線維化が確認された(図2-3)。その一方で、細胞移植群では細胞注入後1、2、3、4週間血中BUNの改善(図2-4)と1週間3、4週間で血中Crnの改善を認めた(図2-5)。

(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

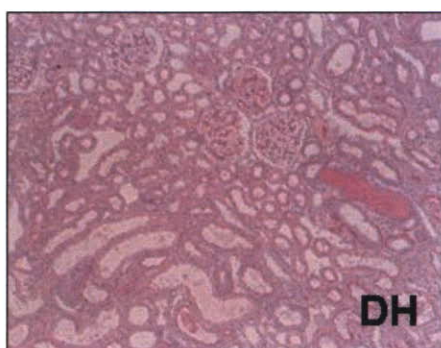
Cisplatin 腎症ラットにおいては、経静脈的にEPCを投与したが、蛋白尿の減少などEPCによる効果は認められなかった。また、腎組織上も明らかな変化を認めない。ただし、EPCを投与したことによる腎障害の悪化なども認めなかった。

(3-2)Doxorubicin 腎症ラット

Doxorubicin 投与ラットにおいて高塩分負荷により、塩分感受性高血圧を発症し、尿蛋白、腎障害も著明に増大した(下図)。

	DOX(-)	DOX(+)
normal-sodium diet	C	D
high-sodium diet	H	DH

normal-sodium diet,0.4% NaCl; high-sodium diet,4% NaCl
DOX(+),single dose of 6mg/kgBW iv. DOX(-),saline iv.



今後、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)の細胞移植を行い、治療効果を検討する予定である。

(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

ラットから骨髄幹細胞を採取し、60匹のCisplatin 腎症ラットに移植した。骨髄単核球細胞単独投与群ではコントロール群に比べ腎機能の改善効果は認められなかった。G-CSF 単独投与群ではコントロール群に比べ有意に腎機能の悪化を抑制していた。さらに G-CSF+骨髄単核球細胞移植併用療法群では G-CSF 単独投与群に比べ腎機能悪化の抑制効果が強かった。

平成18年度：

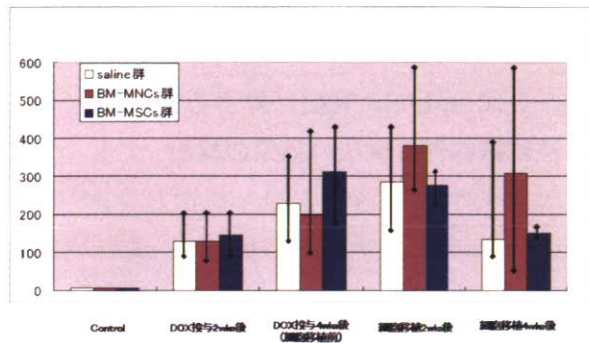
(3-1)Doxorubicin 腎症モデルの妥当性検証

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、エリスロポイエチン製剤による介入試験を行った。その結果、腎虚血に対する効果の高い製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であることが判明した。このことから、本モデルは進行性の腎障害を呈するが、介入治療の効果を評価できる点で妥当であると結論付けられる。詳細は添付論文の通り。

(3-2)Doxorubicin 腎症ラット

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。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。Doxorubicinの投与で同程度の腎障害が得られていなかったこともあり、BM-MNCsの投与について検体を増やして検討中である。

細胞移植後の経時的尿蛋白量の変化



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は数多く報告されている (Am J Pathol 2003;163: 503) と (J Clin Invest 2003; 112:42)。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数多く報告されている (J Am Soc Nephrol 2004;15:1794) と (J Am Soc Nephrol 2005;16:997)。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)。

Doxorubicin 腎症ラットは、以前より慢性腎不全モデルとして知られている。経静脈的に 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でトラップされた可能性もある。腎への直接的な投与が望ましいと考えられたため、投与法を腎被膜下移植に変更し検討中である。

平成 19 年度 :

(3-1) Doxorubicin 腎症ラット

(a) 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。

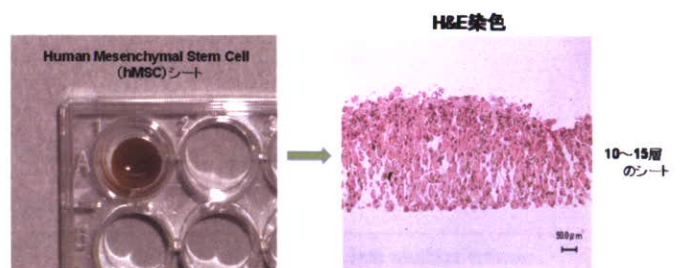
(b) Protocol 2 : BM-MSCs の投与では蛋白尿や血清クレアチニンの改善はみられなかった。腎組織上も明らかな変化を認めなかった。

(c) Protocol 3 : 細胞投与により蛋白尿の改善を認めなかった。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認めなかった。

(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

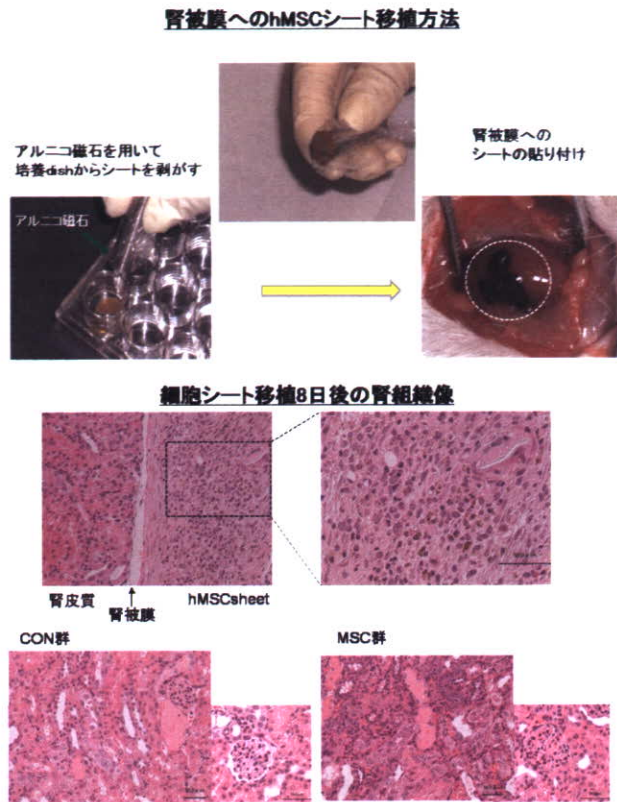
(a) hMSC 細胞シートの作製・評価 : ヘマトキシリン・エオジン染色で、10-15 層の hMSC 細胞シートが確認された (下図)。PCNA 染色で増殖細胞がみられた。TUNEL 染色でアポトーシスしている細胞はほとんどみられなかった。connexin43 の免疫染色で細胞間 Gap junction の形成が確認された。

Magnetic Cationic Liposome (MCL) を用いた細胞シートの作成



(b) 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(下図)。



(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

手術で得られた内臓脂肪、皮下脂肪および吸引で得られた皮下脂肪のいずれからも間葉系幹細胞を得ることができた(下図)。骨、軟骨、脂肪への分化も確認され、高齢者からも十分量の幹細胞が得られた。脂肪由来間葉系幹細胞を動物疾患モデルに投与したところ、その治療的効果が確認された(特許出願準備中)。



図. 低血清培養によるヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離

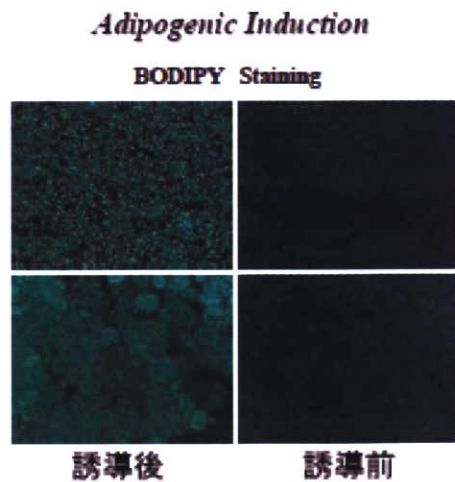
平成 18 年度 :

(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

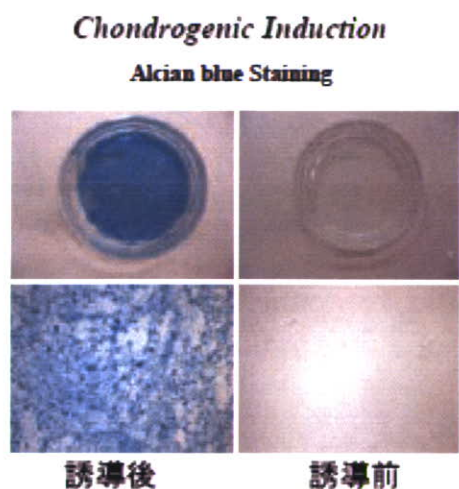
脂肪組織 1g から得られた幹細胞を含む分画(SVF)中には約 1×10^5 個の有核細胞が含まれていた。それを培養すると、低血清培養、高血清培養、高血清+bFGF 培養のいずれにおいても紡錘形の線維芽細胞様の細胞の増殖が認められた。増殖速度は高血清+bFGF 培養、低血清培養、高血清培養の順に良かった。フローサイトメトリーによる表面マーカーの解析では CD10、CD13、CD44、CD90、CD29、CD73、CD105 陽性、CD14、CD31、CD34、CD45、CD117、CD133、Stro-1、HLA-DR 陰性であり、従来報告されている骨髄由来間葉系幹細胞と表面マーカーは同じであった。

(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

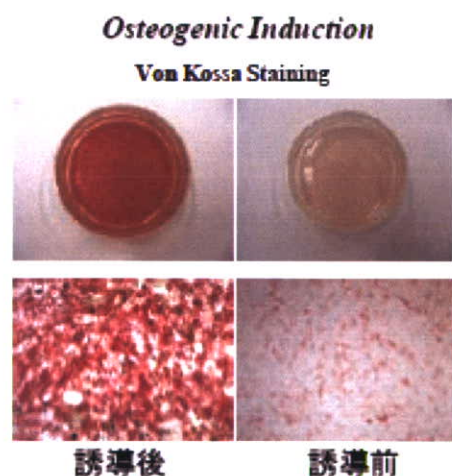
- ① 脂肪誘導 : 2 週間後にほとんどの細胞が BODIPY 陽性の細胞に変化し、脂肪への分化が確認された(下図)。



- ② 骨誘導：3週間後には Von Kossa 染色陽性となり、骨への分化が確認された(下図)。

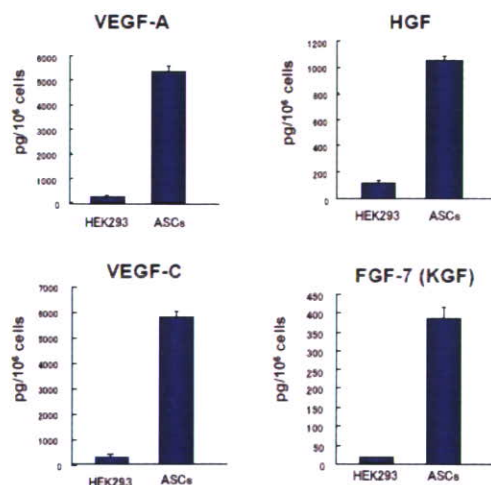


- ③ 軟骨誘導：2週間後に Alcian Blue 染色陽性となり、軟骨様細胞への分化が確認された(下図)。

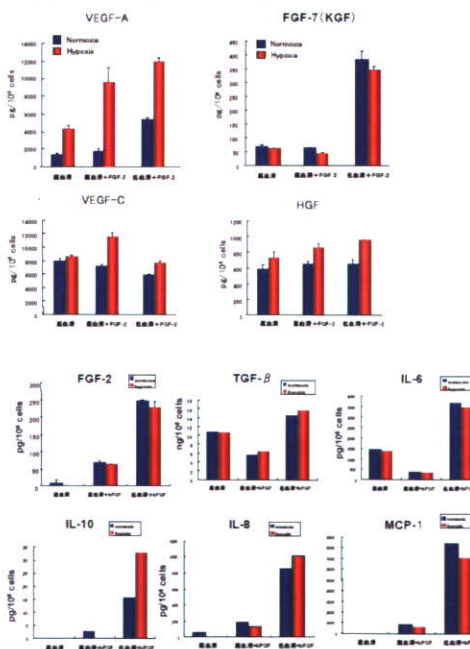


(4-3) 脂肪由来幹細胞のサイトカイン分泌能の検討

- 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次頁に示す。低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞はヒト腎由来線維芽細胞(HEK293 cell)に比べ、VEGF-A、VEGF-C、HGF、FGF-7を多く分泌していた。



- ② ヒト脂肪由来幹細胞の低血清培養(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)におけるサイトカイン分泌量を次図に示す。IL-1 β 、TNF- α 、レプチン、アディポネクチン、レジスチンは分泌していなかった。低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞は高血清で培養した細胞に比べ、多くのサイトカインで分泌量が多かった。



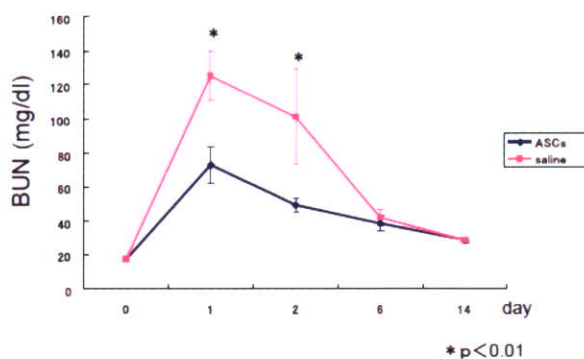
(4-4) 低血清培養法による脂肪由来幹細胞の創傷治癒促進効果の検討

細胞治療後7日目以降において、低血清培養脂肪由来幹細胞治療群では高血清培養脂肪由

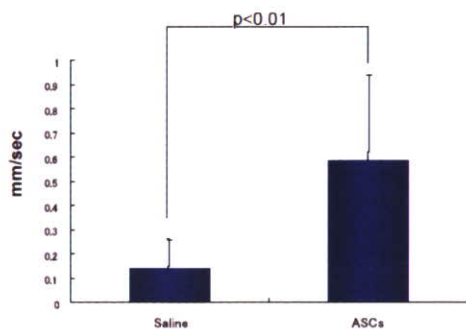
来幹細胞治療群やコントロール群に比べ、有意に皮膚欠損面積の縮小が認められた。低血清培養脂肪由来幹細胞治療群ではコントロール群に比べ、肉芽部およびその周辺部の皮膚組織中の VEGF-A 濃度が有意に高かった。HGF については有意差を認めなかった。CFDA に対する免疫染色では治療 3、6、14 日目ともに皮下に残存する低血清培養脂肪由来幹細胞が確認された。CD31 染色では、血管分化は確認できなかった。

(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

低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞治療群では生食治療群に比べ治療 1 日目および 2 日目において腎機能障害が有意に改善した。

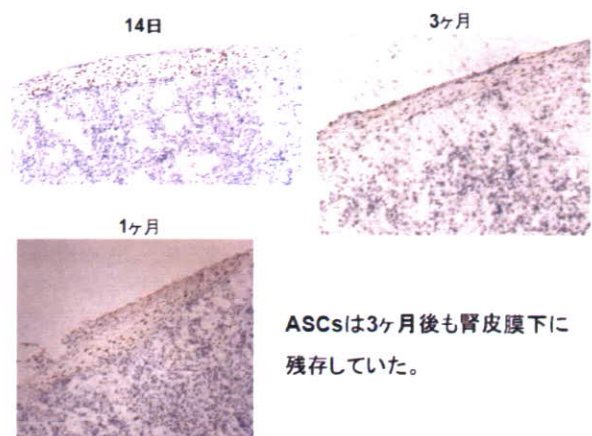


ペンシル型 CCD カメラで測定した腎皮膜下の尿細管周囲毛細血管の血流速度は低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞治療群では生食治療群に比べ有意に速かった(下図)。



ヒト特異的抗原(LaminA/C)の免疫染色では、低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞は腎皮膜下に良好に生着しており、3 ヶ月後でも細胞は残存

していた(下図)。



(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

脂肪細胞由来血管内皮前駆細胞上清では VEGF 分泌を認め、また組織中の VEGF の上昇も確認された。表皮血流、筋肉内毛細血管血流、毛細血管密度は共に control 群に比べ治療群で良好であった。

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 : 図4-1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 乗個/1Lであり十分量の採取が可能であった(図4-2)。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4-1)。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4-3)。

(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4-4)。

(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 4-5)。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 4-6)。

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 4-7)。

(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 $2034 \pm 1845 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $3003 \pm 1085 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $7710 \pm 3881 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、HGF $342 \pm 726 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $216 \pm 611 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $9993 \pm 4899 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 。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 4-8, 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 $4272 \pm 720 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $6759 \pm 1224 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $10973 \pm 469 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、HGF $1779 \pm 1027 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $2709 \pm 1564 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $3782 \pm 2183 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ であった。VEGF-A、HGF 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 $3895 \pm 72 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $7594 \pm 1650 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $8706 \pm 2269 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、HGF $1018 \pm 113 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $6937 \pm 4005 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ 、 $4813 \pm 2789 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}$ であった。VEGF-A、HGF 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 4-10, 11)。

(4-3) 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

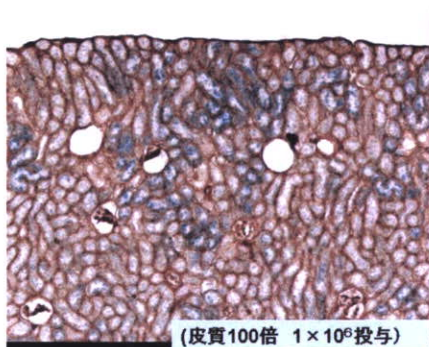
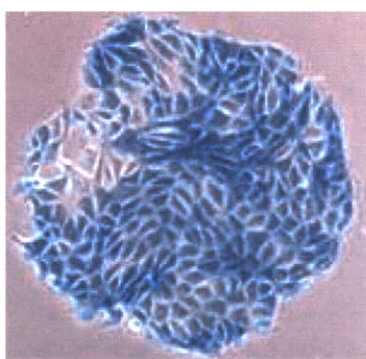
による下肢虚血(ASO)モデルの治療効果の検討
細胞治療後 14 日目で低血清群はコントロールと比較し有意に下肢血流の改善を認めた。低血清群ではコントロール群に比べ、筋肉組織中の human VEGF, HGF 濃度が有意に高かった(図 4-12)。

(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

Lac-Z を恒性発現した rKS56 細胞を得るために、G418(Sigma)500 µg/ml 含有培地で培養し、得られたコロニーを single cell にして再度培養、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 µg/ml)含有培地にてさらに継続培養し rKS56-LacZ 細胞を樹立した。本細胞をラット虚血再灌流モデル腎に移植した結果、腎皮質の広範囲に細胞が生着することが確認された(下図)。



(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

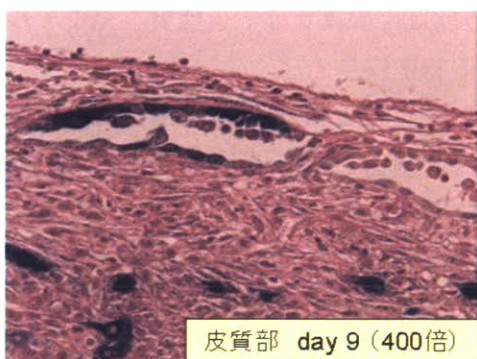
虚血再灌流(I/R)モデルラットに Di-0 標識した rKS56 細胞を皮質内注入し、7 日後に屠殺して腎を観察した。Di-0 陽性細胞は腎皮髄境界部の尿細管に主に生着し、上皮細胞マーカーサイトケラチン陽性であった。また一部の Di-0 陽性尿細管上皮細胞は Aquaporin-1 陽性であり、近位尿細管上皮細胞 lineage への分化が考えられた。Di-0 陽性細胞は注入部位の周囲だけでなく、穿刺部から離れた皮質・髄質部位にも局在が観察された。

血清学的検討では、BUN・Cr は I/R 非治療群と rKS56 細胞投与 I/R 群との間に有意差は認めなかった。一方、急性尿細管傷害マーカーである尿中 NAG は I/R 非治療群に比して、rKS56 細胞投与 I/R 群にて有意に減少していた。

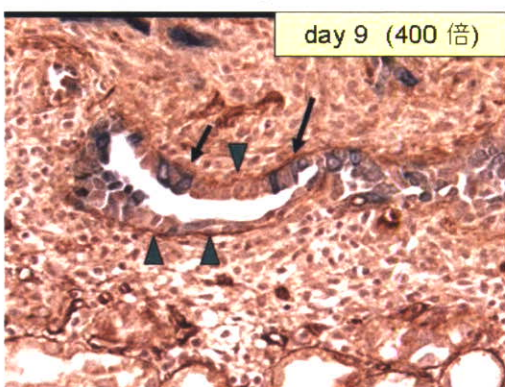
(5-3)シスプラチン惹起急性腎不全ラットモデルへの rKS56 細胞投与

シスプラチンを腹腔内に投与し、2 日後に LacZ 遺伝子を導入した rKS56-LacZ 細胞もしくは生食を腎被膜下もしくは経腎動脈的に投与し、細胞投与後 3 日および 7 日目に屠殺した。各シスプラチン投与群の平均体重は、投与 5 日目まで減少を認め、その後増加した。rKS56-LacZ 細胞腎被膜下投与シスプラチン腎症群にて対照シスプラチン腎症群に比して体重増加が多い傾向を認めた。

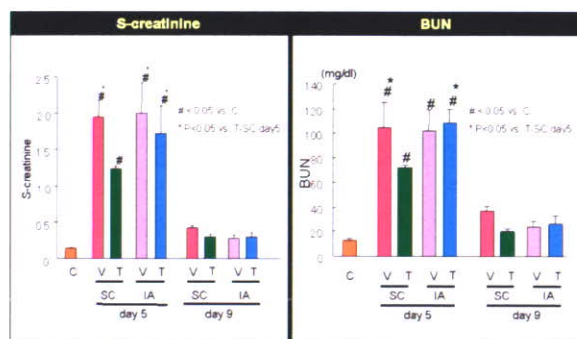
rKS56-LacZ 細胞腎被膜下投与シスプラチン腎症群では、投与後 3 日目に、Blue-gal 染色陽性(青色に染色)細胞が腎被膜下に散在し、rKS56-LacZ 細胞の生着が確認された。細胞投与 9 日目では、肉眼的に腎被膜の肥厚を認め、Blue-gal 染色にて腎被膜下および一部皮髄境界部に管腔様構造を呈する rKS56-LacZ 細胞が確認された。



これらの腎被膜下の管腔様構造を呈した rKS56-LacZ 細胞は Aquaporin-1 を発現しており、近位尿細管上皮細胞 lineage への分化が示唆された。さらに、細胞投与 9 日目において、腎被膜下・皮質内の rKS56-LacZ 細胞は Ki-67 陽性で、増殖能を有していた。また、管腔様構造を呈した rKS56-LacZ 細胞の basolateral 側で、IV 型コラーゲン陽性の基底膜形成が観察された(下図)。一方、rKS56-LacZ 細胞経腎動脈投与シスプラチン腎症群では、腎臓内への細胞生着は観察し得なかった。



シスプラチン投与 5 日目における血清 BUN・Cr の上昇は rKS56-LacZ 細胞腎被膜下投与群にて vehicle 腎被膜下投与群に比して有意に抑制された。rKS56-LacZ 細胞経腎動脈投与群では、vehicle 経腎動脈投与群に比して腎機能改善効果は認められなかった。BUN・Cr ともシスプラチン投与 9 日目には、各群にてほぼ正常値まで改善した(次図)。肝機能や血清総蛋白は細胞投与による明らかな変化を認めなかった。



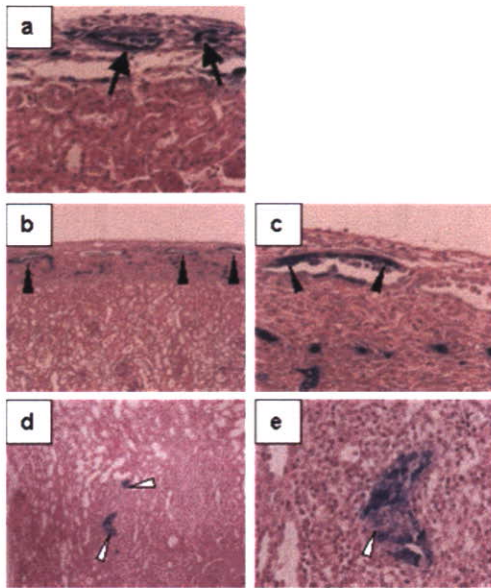
平成 18 年度 :

(5-1)シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける rKS56-LacZ 細胞の生着・分化および組織修復効果

シスプラチンを腹腔内に投与し、2 日後に rKS56-LacZ 細胞もしくは生食を腎被膜下もしくは経腎動脈的に投与し、細胞投与後 3 日および 7 日目に屠殺した。各シスプラチン投与群の平均体重は、投与 5 日目まで減少を認め、その後増加した。rKS-SC 群では対照群に比して体重増加が多い傾向を認めた。

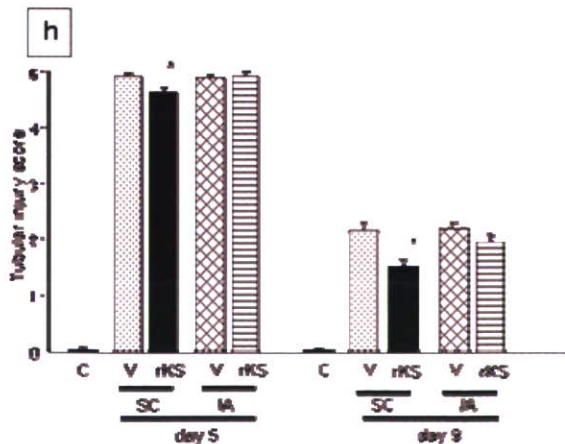
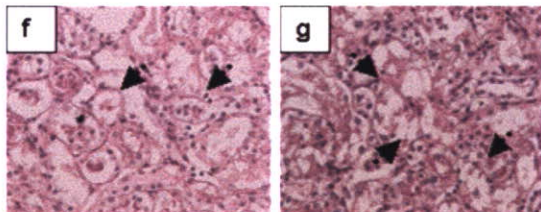
rKS-SC 群では、投与後 3 日目に、Bluo-gal 陽性(青色に染色)細胞が腎被膜下に散在し、rKS56-LacZ 細胞の生着が観察された(図 1a)。細胞投与後 7 日目では、肉眼的に腎被膜の肥厚を認め、腎被膜下および一部皮髓境界部に管腔様構造を呈する Bluo-gal 陽性 rKS56-LacZ 細胞が観察された(図 1b-e)。

腎被膜下の管腔様構造部内の rKS56-LacZ 細胞は Aquaporin-1 を発現しており、近位尿細管上皮細胞系統への分化が示唆された。さらに、細胞投与後 7 日目において、腎被膜下および一部皮髓境界部の rKS56-LacZ 細胞は Ki-67 陽性で、増殖能を有していた。また、管腔様構造を呈した rKS56-LacZ 細胞の基底側で、IV 型コラーゲン陽性の基底膜構造の形成が観察された。一方、rKS-IA 群では、腎臓内への rKS56-LacZ 細胞の生着は観察し得なかった。



(5-2) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける rKS56-LacZ 細胞投与後の組織学的検討

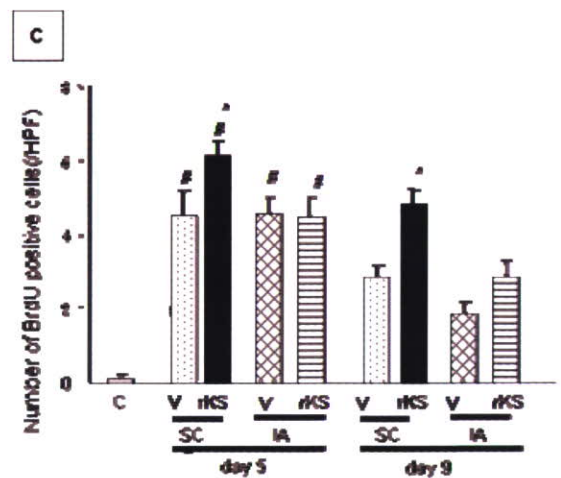
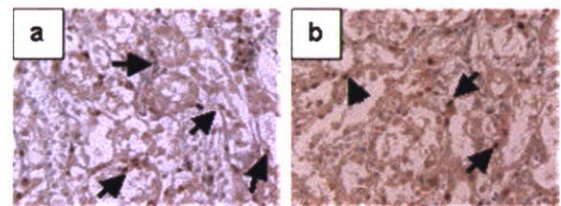
本実験モデルにて最も著明に傷害される皮髄境界部での、rKS56-LacZ 細胞投与後の組織修復効果を検討した。rKS-SC 群(図 1f)では、vehicle-SC 群(図 1g)と比較して、第 5 および 9 病日において尿細管障害スコアの有意な改善を認めた。一方、rKS-IA 群では vehicle-SC 群と比較して、第 5 および 9 病日において尿細管障害スコアの改善は認めなかった(図 1h)。



(5-3) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管上皮細胞増殖能の検討

本実験モデルにて最も著明に傷害される皮髄境界部での、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管増殖能を BrdU 取り込み細胞数により評価した。rKS-SC 群(図 2a)では、vehicle-SC 群(図 2b)と比較して、第 5 および 9 病日において BrdU 陽性尿細管上皮細胞数の有意な増加を認めた。

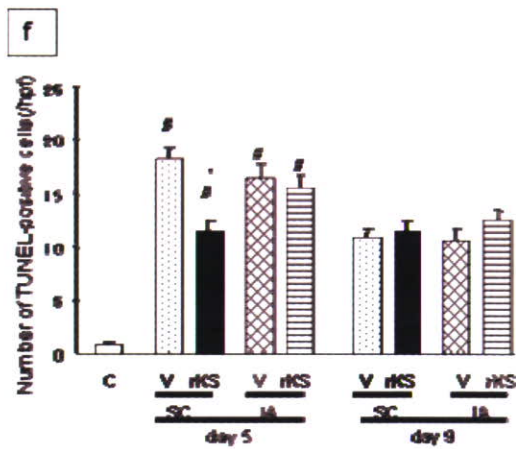
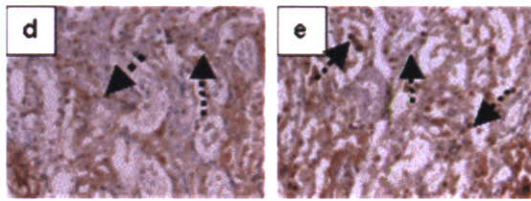
一方、rKS-IA 群では、vehicle-SC 群と同程度であった(図 2c)。腎被膜下に rKS56-LacZ 細胞を投与することで、皮髄境界部の尿細管上皮細胞の増殖能が亢進し、組織修復を促進した可能性が示唆された。



(5-4) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管上皮細胞のアポトーシスの検討

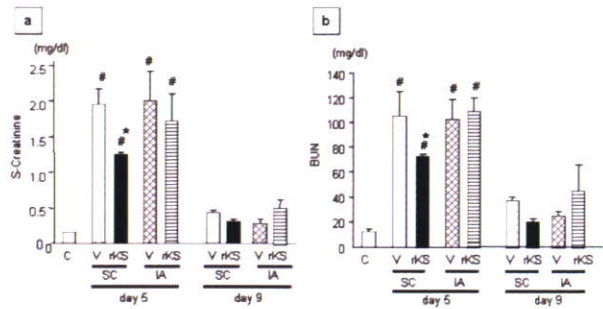
本実験モデルにて最も著明に傷害される皮髄境界部での、rKS56-LacZ 細胞投与後の尿細管上皮細胞のアポトーシスを TUNEL 陽性細胞数にて評価した。rKS-SC 群(図 2d)では、vehicle-SC 群(図 2e)に比して、第 5 病日にお

いて TUNEL 陽性尿細管上皮細胞数の有意な増加を認めた。第 9 病日には皮髄境界部の TUNEL 陽性尿細管上皮細胞数は減少し、各群間で有意差を認めなかった。一方、rKS-IA 群では、vehicle-SC 群と同程度であった(図 2f)。腎被膜下に rKS56-LacZ 細胞を投与することで、皮髄境界部の尿細管上皮細胞のアポトーシスが抑制され、組織修復が促進された可能性が示唆された。



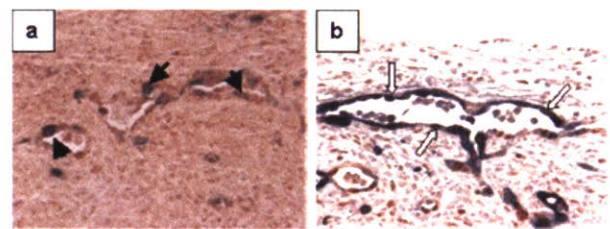
(5-5) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の腎機能の検討

第 5 病日における血清 BUN・Cr の上昇は rKS-SC 群にて vehicle-SC 群に比して有意に抑制された。rKS-IA 群では、vehicle-IA 群に比して腎機能改善効果は認められなかった。BUN・Cr とも第 9 病日には、各群にてほぼ正常レベルまで改善した(図 3a-b)。肝機能や血清総蛋白は rKS56-LacZ 細胞投与により明らかな影響を受けなかった。



(5-6) シスプラチン誘発急性腎不全ラットモデルにおける、rKS56-LacZ 細胞投与後の腎再生促進因子発現の検討

シスプラチン誘発急性腎不全モデルにおける rKS56-LacZ 細胞投与による腎機能・腎組織修復作用に関連して、腎再生促進因子 HGF とその受容体 c-Met の免疫染色を行った。rKS-SC 群では、腎被膜下の管腔様構造内の rKS56-LacZ 細胞の一部は HGF (図 4a)・c-Met (図 4b) を発現していた。



(5-7) 片腎摘および抗 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

慢性的に糸球体および尿細管間質病変の進行する片腎摘および抗 Thy-1 腎炎ラットモデルを作成した。生食投与+片腎摘および抗 Thy-1 腎炎群にて、有意な蛋白尿および腎機能障害を認めなかった。rKS56-LacZ 細胞投与+片腎摘および抗 Thy-1 腎炎群では、5 週目・10 週目の時点で、blue-gal 陽性の rKS56-LacZ 細胞の腎内への生着は確認し得なかった。

平成 19 年度 :

(5-1) 片腎摘および抗 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

慢性的に糸球体および尿細管間質病変の進行する片腎摘および抗 Thy-1 腎炎ラットモデルを作成した。rKS56-LacZ 細胞投与+片腎摘および抗 Thy-1 腎炎群では、5 週目・10 週目の時点で、bluo-gal 陽性の rKS56-Lac Z 細胞の腎内への生着は確認し得なかった(図 5-1, 2)。生食投与+片腎摘および抗 Thy-1 腎炎群にて、有意な腎機能障害を認めなかった(図 5-3)。

(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する。現在、慢性化モデルの作成を行っている。

(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 5-4A)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 5-4B)、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。

(b) 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 5-5A)と軽度 mesoderm tissue を残した WD(semi-cleanWD:図 5-5B)と全く mesoderm tissue を分

離していない WD(whole-WD:図 5-5C)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 5-5D)、semi-clean な WD、whole-WD は発芽を行い(図 5-5E, F)、腎臓発生に関わる最初の発芽の過程を再現しえた。

(c) 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 5-6A)。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 5-6B)、腎臓発生の経過を再現しえた。

(d) 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 5-7A)。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 5-7B)。

(e) 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 5-8A)。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 は分岐した後も、さらに分岐を行い、MM と相互作用をおこしていた(図 5-8B, 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 の分岐も 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 5-8D, E)。

(f) 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 5-9 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 5-9C, 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 5-9E)。

(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

まず mProx24 細胞を用いてフローサイトメトリーにより解析した結果、長期継代後の mProx24 細胞中には、0.2%の SP fraction が存在した。SP fraction 由来の細胞を 96 well plate 上で 15 日間クローナルに培養したところ、その細胞は上皮様形態を示し、また高い増殖能を示した。培養 13 日目には細胞の経上皮輸送能を示すドーム形成が観察された。また、そのドーム形成能は細胞単位では 2~4 日間維持され、凍結融解後の再培養によって再形成されることが確認された。SP fraction から得られたドーム形成細胞は AQP-1, E-cadherin, ZO-1 陽性であった。

一方、mProx24 細胞の MP および non-SP fraction よりソートした細胞を SP fraction と同様に 15 日間培養したところ、上皮様形態と fibroblast 様形態を示すクローンが混在しており、ドーム形成率は MP で SP fraction の 1/10、non-SP fraction ではドーム形成は皆無であった。

また、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、1st-sorting に比し

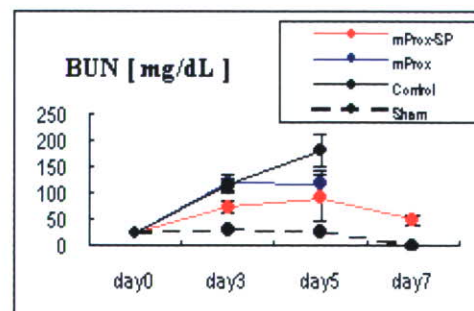
2nd-sorting 後の SP fraction の割合は 0.2% から 0.83% に上昇した。その後繰り返し行った sorting 後の SP fraction の割合は一定に維持されたことから、腎臓幹/前駆細胞が一定の割合で自己複製能を保ちながら、分化した尿細管機能を維持していることが確認された。

さらに mProx24 細胞の培養時に添加しているマウス間葉系細胞の培養上清が、これら腎臓幹/前駆細胞の維持増殖に必須かどうか検討した。マウス間葉系細胞の培養上清を添加せずに SP 細胞を培養した結果、ドーム形成が確認されたクローンの数、ドーム形成維持期間が激減した。

mProx24 細胞を用いた以上の検討より、single cell sorting により SP 細胞を単離し、マウス間葉系細胞の培養上清にて培養することにより、効率的な機能性近位尿細管上皮細胞の培養法の標準化が達成できると考えられた。

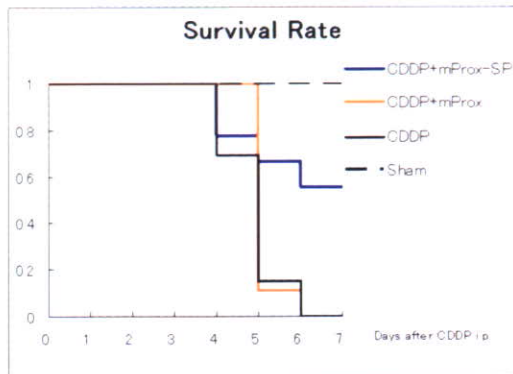
(6-2) 致死性シスプラチン誘発急性腎不全マウスへの細胞移植

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(Day3)の血清尿素窒素 BUN[mg/dl] は mProxSP (=CDDP+mProx SP, N=9), mProx (=CDDP+mProx, N=9), Control (=CDDP, N=13) 各群それぞれ 72.1±11.4, 118.4±14.8, 113.4±14.5(mean±SE)で、CDDP+mProxSP では CDDP に対して有意な改善を認めた(下図)。



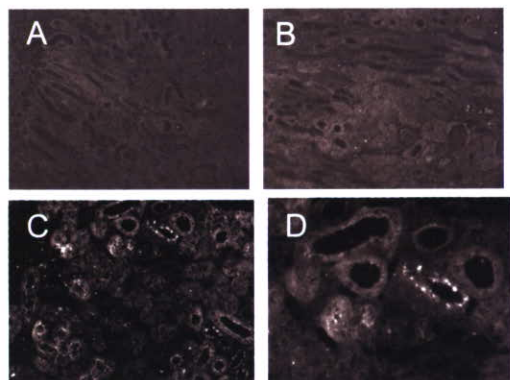
CDDP 投与一週間までの経過で mProxSP 群で

は day7 まで 5/9 匹が生存。CDDP 群および CDDP+mProx 群は 5 日目まで全例が死亡した。Kaplan-Meier 法におけるログランク検定で CDDP 群に対して CDDP+mProxSP 群の有意な死亡率の逓減が確認された(下図 : $p < 0.001$)。



mProx-SP vs CDDP : $p < 0.01$, mProx vs CDDP : NS

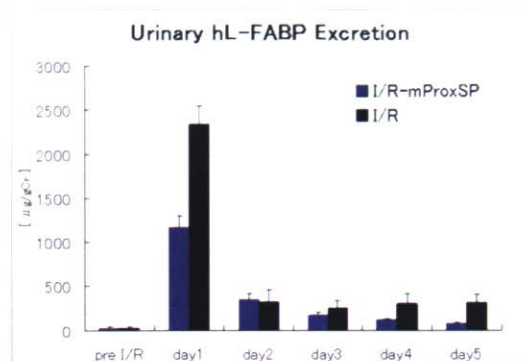
腎組織所見の A は CDDP+DMEM 群より得られた切片で、CDDP 投与 4 日目に瀕死状態で摘出した腎より得られた。近位尿細管の brush border はなく、尿細管腔内に脱落上皮細胞が観察された。B は CDDP+mProx 群の投与後 4 目で同様の状態の腎組織である。ここでは mProx を蛍光標識しているが、mProx は殆ど認められなかった。C は CDDP+mProxSP 群で、移植細胞が高輝度の蛍光を呈していることが分かる。その高倍率が D である。標識された細胞が障害された尿細管管腔の一部を構成しており、尿細管再生に関わる所見の可能性が示唆された。



(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

mProx-SP を細胞移植することにより、血漿ク

レアチニン上昇や組織学的な尿細管障害が有意に軽減した。さらに細胞移植群で、尿中 hL-FABP レベルが有意に低減されたことから腎障害の軽減や障害からの回復促進が示された(下図)。



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

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、1st-sorting に比し 2nd-sorting 後の SP fraction の割合は 0.2% から 0.83% に上昇した。その後繰り返し行った sorting 後の SP fraction の割合は一定に維持されたことから、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していることが確認された。

Analysis for self-renewal capability of the dome-forming clone

