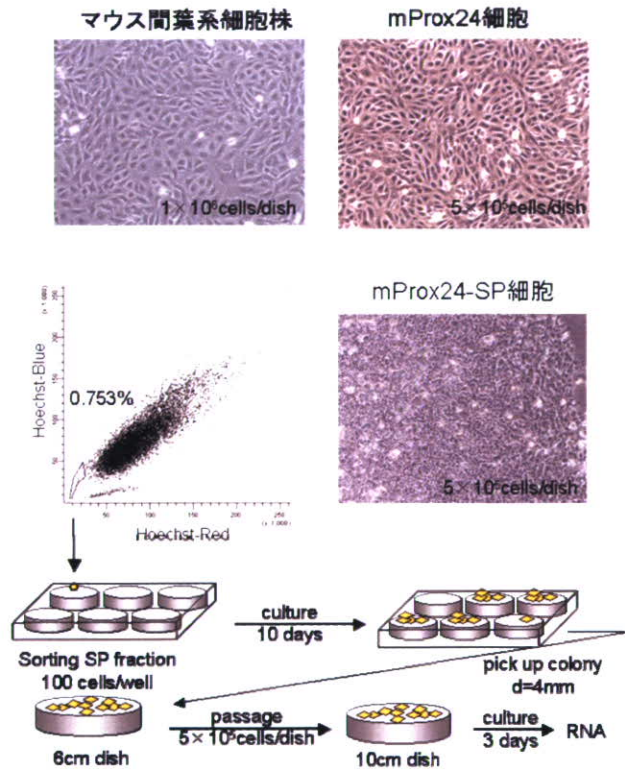


(6-2) マウス移植細胞の安全性評価

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



その結果、前2者では発現が低く、mProx24-SP 細胞のみで誘導が見られる安全性評価指標の候補遺伝子の絞込みを達成した(特許出願準備中)。

最近、SP細胞の分取率が高いヒト胃癌細胞株における未分化性と、Cancer stem like cells;CSLCsの存在比が正相関する可能性が提唱された(Matsuzaki2007)。mProx24-SP 細胞のみで誘導が見られる遺伝子には腎癌細胞特異的に発現する癌抑制遺伝子として知られている転写因子も含まれており、SP分取率がある一定の数値範囲(mProx24-SPの場合0.2~0.9)を

維持していることは、尿細管への分化能の制約を受けつつ、癌化抑制の機能が働いていることを意味しているとも考えられる。

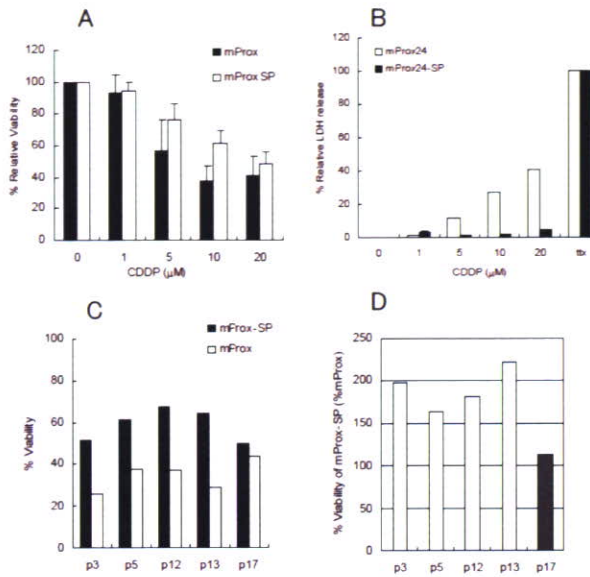
今後は安全性評価の指標として、これら遺伝子発現の有効性を検証する予定である。

(6-3) シスプラチンによる in vitro 細胞障害性の評価

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(図3A)。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(図3B)。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3C)、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3D)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応用していくことが有用である可能性が示唆された。

図 3



(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

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 ± 19.3 , 118.9 ± 18.2 , 20.1 ± 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おり (図 4B, 図 5)、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 ± 13.2 , 91.9 ± 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。

図 4

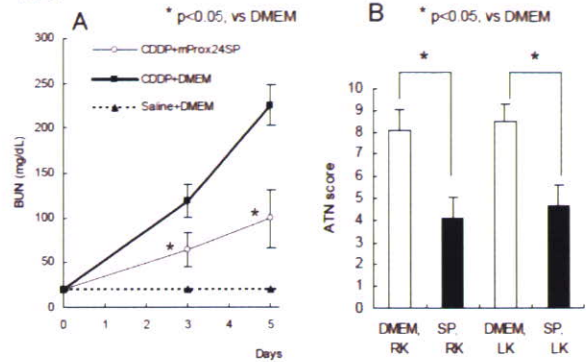


図 5

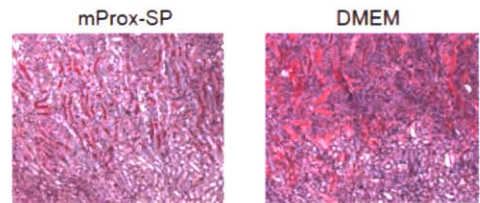
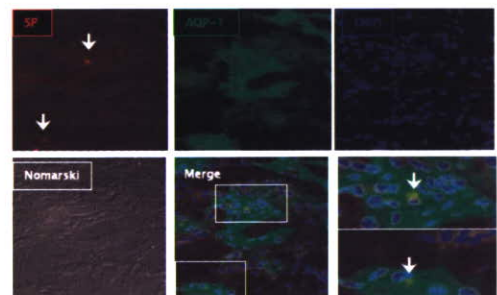


図 6



平成 19 年度 :

(6-1) マウス mProx24 細胞の移植

(a) mProx, mProx-SP での Pax-2, Stathmin の発現 : mProx, mProx-SP は図 6-1 のような形態を示すが、特に mProx-SP は図 6-1A 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 6-2A, B)。一方、

Stathmin の発現は mRNA、蛋白ともに両方で明らかな発現の差は見られなかった。

(b) 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。但し、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 6-3C)、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 6-3D)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しうる可能性が示唆された。

(c) 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(Day3)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+/-19.3, 118.9+/-18.2, 20.1+/-0.8 (mean+/-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 6-4B, 図 6-5C)。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 (ss DNA)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 6-5A, C)と ssDNA 陽性細胞の減少が見られた(図 6-5B, 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 6-6)、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+/-13.2, 91.9+/-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 6-1)。

(6-2)慢性腎障害モデル

慢性腎症モデルとして Adenine 誘発性慢性間質性腎障害モデルを作製した。本モデルは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 6-8)、BUN も有意な軽減が認められなかった(図 6-7B)。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 6-7C)。

D. 考察

平成 17 年度：

骨髄末梢血幹細胞チーム：

当初下肢の動脈閉塞性疾患に有効性が示されている骨髄より培養した Endothelial progenitor cell (EPC)あるいは骨髄単核球成分のラット Cisplatin 腎症への細胞移植を検討した。腎再生に関しても骨髄細胞が関与してい

ることが報告されていたが、予想に反し EPC や骨髄単核球単独では十分な治療効果が得られなかった。

一方、G-CSF 単独は有効であり、骨髄単核球と G-CSF の併用ではさらなる治療効果の増強が確認された。臨床応用を実現する際、この結果の持つ意味は大きいと考える。

すなわち、幹細胞単独での投与という治療法に固執することなく幹細胞の作用を最大限に引き出す因子の併用可能性も検討する必要があると考えられた。次年度は、骨髄または脂肪組織由来間葉系幹細胞の単離・移植検討を行う予定である。

組織特異的幹細胞チーム：

ラットおよびマウスの腎由来幹/前駆細胞を急性腎不全モデルに移植、腎組織への生着、病態や生存率の改善を確認した。幹/前駆細胞としての形質を保持していると考えられるラット rKS56 やマウス mProx-SP が再生された尿細管管腔の一部を構成している所見が観察された。

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ており、さらに尿中バイオマーカーレベルが低減したことからも腎障害の軽減や障害からの回復促進が示唆された。標識された注入細胞の周囲に細胞集積が見られることから、注入細胞自体が増殖しているのか、注入細胞が腎局所に生着することにより液性因子を産生し、広範囲に腎再生を促しているのか、さらに検討が必要と考えられる。

セルプロセッシングチーム：

ヒト腎疾患患者尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、68.1%で成功した。今回、特に死体腎移植患者の術後 10 日目の尿から細胞が採取できたことは予後不良の患者から腎幹/前駆細胞を採取できる可能性を示している。またヒトと同様の手法を用いて再現性良く、イヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、自家移植によ

る急性腎不全に対する治療を開始した。今後は、コンセプト証明のためにも、細胞培養の系に添加する血清等をウシ由来ではなく同種由来に置換する必要がある。また、移植細胞の癌化等安全性評価も行う予定である。

さらに、ヒト尿中落下細胞からフローサイトメトリーによる細胞分離を行うことにより、ドーム形成能を有した近位尿細管前駆細胞を高率に単離することができた。

腎疾患患者の尿中には近位尿細管細胞へ分化しうる幹/前駆細胞が存在すると考えられた。

平成 18 年度：

骨髄末梢血間葉系幹細胞チーム：

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、骨髄は大量に採取するには患者に対する負担が非常に大きいという問題点がある。また、培養して増幅するにしても、増殖速度が遅く、臨床に使える細胞数を確保するのが難しい。さらに臨床応用を考えた場合、動物原料の排斥は必須であり、自己血清の使用も含めた自家移植の系を確立する必要があると考える。自己の細胞を使用することを考えた場合、脂肪組織の採取は骨髄細胞の採取よりも簡便でかつ安全である点は大きな利点となる。その上、脂肪組織由来の幹細胞は量・質ともに骨髄由来幹細胞を大きく上回る可能性があると考えている。実際、本研究では高齢者の脂肪細胞からも質・量ともに十分な幹細胞を分離・培養することに成功した。高齢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。当該技術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)である。脂肪由来幹細胞を 2%血清で培養して間葉

系幹細胞を選択的かつ大量に増殖させる方法である。臨床応用を考えた動物由来製剤を使用しないことは大変重要なことである。低血清培養法では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。この点で、本法は実用化に近い独創性のある技術であると言える。さらに、今回の検討にて、低血清で培養した幹細胞は従来の高血清で培養した細胞に比べサイトカイン分泌能が高いことが明らかとなった。このことは低血清培養で増幅した細胞を用いることで、より治療効果が高まることが期待される。実際に腎障害モデルラットの腎機能を劇的に改善することができた。今後はそのメカニズムを詳細に検討するとともに、大動物での検討もを行い、臨床応用を実現したいと考えている。

組織特異的上皮系幹細胞チーム：

今後、腎幹/前駆細胞投与による腎再生治療を臨床応用するためには、以下の点を解明することが重要と思われる。

まず、投与する腎幹/前駆細胞数や投与経路の至適条件の検討が必要である。骨髄由来幹細胞は、経静脈的もしくは経腎動脈的投与にて障害腎に生着することが報告されているが、昨年までの検討では経腎動脈的投与では腎への生着は認めなかった。上記の至適投与条件の検討は、今後の臨床応用における細胞投与のアプローチ、すなわち腎被膜下に直接投与するか、もしくは腎動脈からカテーテルを用いて投与するか、を考慮する上で重要である。

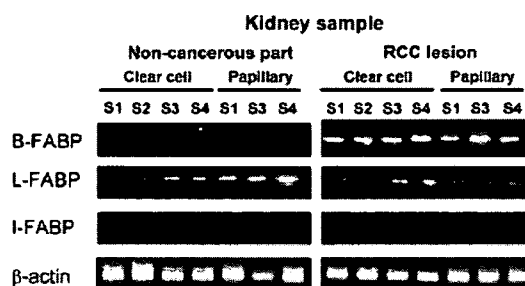
次に、急性腎不全のみならず、慢性腎不全状態の腎に腎幹/前駆細胞を投与することで、機能的・組織学的な改善効果を観察し得るかどうかについても検討が必要である。しかし、慢性腎不全状態では腎間質線維化をきたし、細胞外基質・増殖因子濃度勾配等の微小環境(niche)が変化しており、尿細管上皮細胞の再生に適していない可能性が考えられる。慢性腎障害モデ

ルにて HGF 投与により腎間質線維化が抑制されたという報告があるが、腎再生を促進する増殖因子と腎幹/前駆細胞移植を組み合わせることにより、腎尿細管上皮細胞再生・修復に適した微小環境を整えて幹細胞の生着・分化・ならびに組織修復を促進しうる可能性がある。今後抗 GBM 腎炎モデルや他の薬剤性尿細管障害モデル等を用いることにより、種々の慢性モデルに対する細胞治療の効果を検討したいと考えている。

セルプロセッシングチーム：

今年度は昨年度実施例の2倍以上のヒト腎疾患患者(計56例)を対象に、尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養できた。生体腎移植症例のみならず、腎癌部分腎摘出症例についても、30分という短時間の片腎虚血において、尿中落下細胞から50%の確立で培養できた。

より多くの腎疾患症例からヒト腎組織特異的幹/前駆細胞を効率よく単離培養する目的で、腎微小循環のバイオマーカーであるL-FABPの迅速検査キットを試作し、尿中L-FABPと尿中落下細胞の培養成功の可否について検証した結果、L-FABPが非常に高い感度、特異度を有していることが明らかになった。ごく最近、FABPサブタイプの発現により、腎癌部位と正常部位の腎組織が判別可能であるという報告がなされた(Teratani T, et al. 2007 J. Urology)。下図のごとく、L-FABP(近位尿細管型)陽性、B-FABP(脳型)陽性、I-FABP(腸型)陰性の場合、腎癌細胞が混入している可能性が高いため、樹立した培養細胞の安全性評価に有用と考えられる。



また、ヒトと同様の手法を用いて、イヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、自家移植による急性腎不全治療を行った結果、BUNの上昇は有意に抑制できたが、尖刺細胞注入部位が強い線維化を起こしていることが明らかとなった。げっ歯類の腎被膜下に相当する移植細胞の注入スペースを外科的処置で確保できるか早急に検討する必要がある。

平成 19 年度：

骨髄末梢血間葉系幹細胞チーム：

虚血再灌流による腎障害や、抗体を使用した糸球体腎炎モデルにおいて、骨髄幹細胞による腎障害の修復について報告されている (LinksRookmaaker MB et al. Am J Pathol. 2003;163(2):553-62) と (Kale S et al. J Clin Invest. 2003;112(1):42-9. Epub 2003 Jun 16)。また、骨髄細胞投与による腎再生治療における有用性についても報告されている (Morigi M et al. J Am Soc Nephrol. 2004; 15(7):1794-804) と (Uchimura H et al. J Am Soc Nephrol. 2005;16: 997- 1004)。これらの報告では、糸球体のメサンギウム細胞の増殖が抑制されることや、腎臓において投与した骨髄細胞の定着や分化も報告されており、骨髄幹細胞は腎臓の細胞に分化する能力があることが示唆される。

一方で、腎臓の修復過程においては、腎臓内の間葉系の幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell) が関与しており、骨髄細胞の関与は少ないとの報告もされている (J Clin Invest 2005;115:1756)。

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。

また、本年度は移植細胞の投与経路として、磁性ナノ粒子を用いた細胞シートの検討を行った。磁性ナノ粒子を含んだ MSC の増殖能が維持されること (Ito A et al. *Biochem Eng J* 2004) や骨、脂肪、軟骨などへの多分化能が保持されることが報告されている (Shimizu K et al. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*:2007)。磁性ナノ粒子を用いることによって、10~15 層の 3 次元 hMSC シートを作成することが可能であり、hMSC シート作成 24 時間後において、シート内部での細胞のアポトーシスは検出されず、細胞間での Gap Junction の形成が認められた。シスプラチン腎障害モデルに対し、腎被膜外に磁性ナノ粒子を用いた hMSC シート移植した。hMSC シートから腎実質への hMSC の遊走は見られず、サイトカインなどによるパラクライン効果による腎機能の改善は認められなかった。

今後は、腎被膜を除去して細胞シートを移植、シートを固定するため、さらにコラーゲンシートを用いて検討するなど、細胞治療効果と低侵襲性を併せ持つデバイスの開発が待たれる。

組織特異的上皮系幹細胞チーム：

本研究チームは、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。

本年度は、慢性腎障害モデル(慢性腎不全モデル)の作成、およ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、rKS56 細胞の生着は確認されなかった。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、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、これまで 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。

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、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、さらに 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) に比べて高率であった。また、長期間の培養の経過で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。これまで mProx では認められなかった、Pax-2 (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) 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。以上より、mProx-SP 画分がマウス近位尿細管細胞由来細胞株の中に存在する腎組織特異的幹/前駆細胞を高い比率で含むことが示唆された。

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と、細胞毒性を示す LDH 放出量の著しい抑制が確認された。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 3C、CDDP10 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、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 を移植した際にははず

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、移植細胞の標準化に資する可能性が考えられる。

また、マウス CDDP 腎障害モデルにおいて、両腎 (細胞移植腎および非細胞移植腎) と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。

セルプロセッシングチーム：

ヒト尿中からの腎特異的幹/前駆細胞の単離培養を効率化しうるバイオマーカーL-FABPに関しては、最近その尿中排泄のメカニズムの解明を進めることができた(Yamamoto T et al., JASN, 2007)。ヒトL-FABPトランスジェニックマウスを用いた虚血再灌流モデルやヒト生体腎移植直後の腎微小循環血流測定を行うことによって、腎臓の微小循環障害により近位尿管が低酸素にさらされた結果、腎臓のL-FABP遺伝子が発現誘導され、尿管の酸化ストレスにより生じた過酸化脂質とL-FABPとが結合し原尿中に排出されるという、L-FABP診断のコンセプトが証明された。

また今年度は、尿中落下細胞の安全性評価に資するバイオマーカーとして、L-FABPと同じ脂肪酸結合蛋白(FABP)ファミリーであるB-FABPに着目した。論文での報告通り、腎癌由来細胞株(TUHR14TKB)ではB-FABPの遺伝子発現が確認されたが、尿中落下初代培養細胞での発現は腎癌の約1/30と低かった。FABPファミリーは分化と癌化の両方に関わる分子として、近年報告がなされてきていることから、今後、L-FABPとB-FABPをパネル化して細胞移植の安全性評価に利用できるものと期待される。

なお、医療応用を考えると、ヒト細胞の培養中にいかにエピジェネティックな修飾や、ゲノムのsomatic mutationを抑えるかという問題が、非常に重要と考えられる。腎疾患患者本人から得られた腎組織由来幹細胞を利用して一定の品質の分化細胞を増殖させ移植に用いるには、すでに本研究においてげっ歯類で確立した、SP細胞のsingle cell sortingや、organ cultureなどの手法を駆使して自己複製・再構築能を有する細胞が繰り返し培養可能かどうか

を検討する必要がある。

さらに、ヒトと同様の手法を用いて、計43匹ものイヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、自家移植による急性腎不全治療を行った結果、BUN、血清Cr両者の上昇は有意に抑制できた。

本年度はヒト腎癌部分腎摘手術時に行われている内臓脂肪による腎臓侵襲部位への縫合術(臍型自己脂肪植え込み法)を併用した尿管上皮前駆細胞治療を試みた。注入細胞の逆流や漏れという手技的な問題は克服されたものの、細胞移植部位の線維化は軽減されておらず、組織学的改善と、血清パラメータによる腎機能改善との間には、やや開きがあることが確認された。

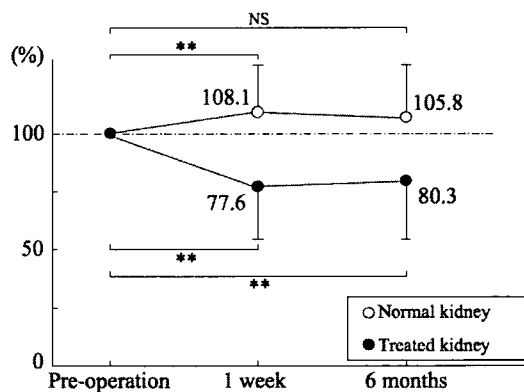
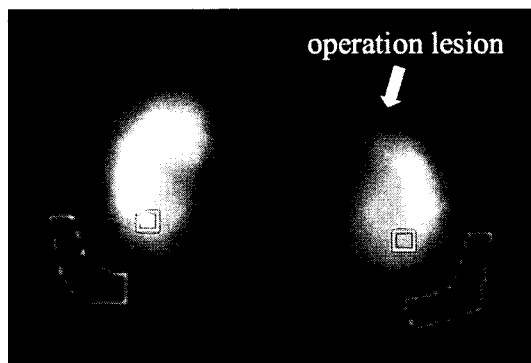
今後の展望：

最後に今後、臨床応用に向けた細胞移植法の適応をどのような症例に設定するかについて考察する。現段階では、名古屋大学泌尿器科における腎細胞癌部分切除の腎動脈一時遮断症例のImperative caseと虚血時間の25分以上のElective caseがこの細胞治療の適応になり、その評価としては局所MAG3腎臓シンチ検査有用と考えられた。

具体的には、腎細胞癌の部分切除は、片腎、腎機能低下例、両側腎癌症例で根治性を犠牲にして腎臓機能保護を優先したImperative caseと腫瘍径の3cm以下で健側腎臓を有し、根治性、腎臓機能保護も保ったElective caseに分類される。Imperative caseは術前にCcrが既に低下しており虚血によりさらに低下し細胞治療の適応になる。腫瘍径の3cm以下で健側腎臓を有するElective caseは術前総腎機能を反映するCcrは健側腎が代償するためにCcrの低下が少ない。

そこで我々は部分切除の影響を受けない部位に関心領域を設定した局所MAG3腎臓シンチ検査を考案した。この方法で、部分切除側腎臓

を評価したところ術後1週間、6ヶ月で有意に分腎機能低下し、健側腎は有意に分腎機能は上昇した。早期からいわゆる部分切除対側の腎臓代償性肥大が生じることを明らかにした。虚血の生じている部分切除側腎臓の虚血時間を25分以上、以下の2群にグループ分けした。その25分以上虚血のグループは25分以下の虚血グループもしくは虚血の生じていないコントロールの状態と比較して1週間、6ヶ月で有意に分腎機能低下を確認した。よって、Imperative caseに加えてelective caseの25分以上の虚血グループも細胞治療の適応であることを局所MAG3腎臓シンチ検査で明らかにした(下図)。本法を用いることにより、適切に細胞移植の効果判定を行えるものと考えられる。



E. 結論

2007年、新健診項目から一時検尿が除外されるなど、医療保険制度の観点からは、腎疾患に関するエビデンスの確立が不十分と認識されている懸念があり、今後、慢性腎臓病 (CKD)

克服に向けたより早期からの診断・治療戦略の重要性が高まっている。一方、我が国の透析患者数は27万人を突破し、なお直線的に増加し続けており、透析医療費を含む慢性腎不全治療が我が国の医療財政に与える影響は多大なものとなっている。このような背景から、現在有効な治療薬のない末期腎不全に対し、自家細胞移植により重症化を防止する革新的医療技術の開発は透析、腎移植と異なる選択肢を提供するものとして期待されている。

近年、腎障害の再生過程に骨髄末梢血幹細胞や組織特異的幹細胞の関与が示唆されている。実用化には、これら細胞の腎疾患患者本人からの効率的な採取、その培養・移植法の標準化、および移植細胞の安全性評価法の確立が必須である。

平成17年度：

(1) ラット骨髄末梢血幹細胞による細胞移植法の最適化検討を行い G-CSF との相乗的な治療効果を確認した。

(2) ラット腎組織特異的幹細胞を急性腎不全モデルに移植し、腎組織への生着、腎機能の改善が見られた。また、マウス腎組織特異的幹細胞移植により、致死性の Cisplatin 腎症に対し、50%以上の生存率向上と組織病変の改善を達成した。

(3) マウス腎組織特異的幹細胞をセルソーターにより単離、SP 分画を継代維持する培養方法の標準化に成功した。ヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から腎幹/前駆細胞を単離培養し、腎組織への生着能を確認した。

平成18年度：

(1) 低血清培養によるヒト脂肪由来間葉系幹細胞を、ヌードラット腎障害モデルの腎被膜下へ移植し、急速な腎機能の改善が達成された。本法は、患者の負担、動物原料の排斥、十分な

細胞数の確保、治療効果など多くの有利な条件を兼ね備えており、臨床応用が期待できる。

(2) げっ歯類腎組織特異的幹細胞を複数の急性腎不全モデルに被膜下移植し、腎組織への生着分化、腎機能改善が見られた。一方、慢性腎不全モデルに対しては細胞注入方法の工夫など改善が必要。

(3) ヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から単離培養した腎幹/前駆細胞の樹立を大幅向上した。移植細胞の安全性評価に利用可能な指標として候補遺伝子を絞り込んだ。細胞樹立の効率化に必須のバイオマーカーの迅速検査キットを試作し、臨床現場での使用を開始した。

平成 19 年度：

(1) Stromal Vascular Fraction (SVF) に関して、吸引脂肪から治療に必要な十分量の SVF が得られること、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、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、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、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。骨髄末梢血幹細胞に関しては、慢性腎障害モデルに対する治療効果が見出せないことから、ASO 等における細胞治療メカニズムとは異なる機序が腎疾患で働いている可能性が示唆された。

(2) 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

おいての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。

マウス腎近位尿細管上皮由来幹/前駆細胞 (m Prox24) の移植治療効果を高めるために必要な、移植用細胞の純化プロセス、移植細胞のバリデーションに有用な手順の標準化が確立できた。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。

(3) ヒト腎疾患患者尿およびイヌ尿中から単離した腎幹/前駆細胞の樹立数と培養効率が大幅向上した。ヒト由来腎組織特異的幹/前駆細胞の単離と、その培養中の癌化リスクを評価しうる複数のバイオマーカーの検出系を確立した。

イヌの尿中落下細胞を細胞移植 (全 43 例) し、イヌ急性腎疾患に対する 4 週後の細胞の生着、BUN, 血清クレアチニンによる腎機能の改善効果が確認できた。

F. 健康危険情報

主任研究者：	大島 伸一：	特記事項なし
分担研究者：	篠崎 尚史：	特記事項なし
	菅谷 健：	特記事項なし
	室原 豊明：	特記事項なし
	後藤 百万：	特記事項なし
	松尾 清一：	特記事項なし
	山本 徳則：	特記事項なし
	槇野 博史：	特記事項なし
	野入 英世：	特記事項なし
	谷口 英樹：	特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, Sugaya T, Sugiyama H, Maeshima Y, Makino

- H: Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *FASEB J.* 19:1789-1797. 2005.
- 2) Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Osada S, Koide H: Effect of Pitavastatin on urinary liver-type fatty acid-protein levels in patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 28:2728-2732. 2005.
 - 3) Kondo N, Kiyomoto H, Yamamoto T, Miyatake A, Sun GP, Rahman M, Hitomi H, Moriwaki K, Hara T, Kimura S, Abe Y, Kohno M, Nishiyama A: Effects of calcium channel blockade on angiotensin II-induced peritubular ischemia in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Nov 30; [Epub ahead of print]
 - 4) Fukuda N, Morinaga T, Matsuo S: GZF1, a new GDNF-inducible gene, is required for renal branching morphogenesis. *Kidney Int.* 68(5):1964. 2005.
 - 5) Morinaga T, Enomoto A, Shimono Y, Hirose F, Fukuda N, Dambara A, Jijiwa M, Kawai K, Hashimoto K, Ichihara M, Asai N, Murakumo Y, Matsuo S, Takahashi M: GDNF-inducible zinc finger protein 1 is a sequence-specific transcriptional repressor that binds to the HOXA10 gene regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 3:4191-4201. 2005.
 - 6) Mochizuki E, Fukuta K, Tada T, Harada T, Watanabe N, Matsuo S, Hashimoto H, Ozato K, Wakamatsu Y: Fish meso-nephric model of polycystic kidney disease in medaka (*Oryzias latipes*) pc mutant. *Kidney Int.* 68(1)23-34. 2005.
 - 7) Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J: Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes.* 54:1823-1828. 2005.
 - 8) Sato W, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Muramatsu T: Midkine antisense oligodeoxynucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion. *Kidney Int.* 67:1330-1339. 2005.
 - 9) Suzuki S, Maruyama S, Sato W, Morita Y, Sato F, Miki Y, Kato S, Katsuno M, Sobue G, Yuzawa Y, Matsuo S: Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney int.* 67:2210-2220. 2005.
 - 10) Kitamura S, Yamasaki Y, Makino H: Establishment of renal stem/progenitor-like cell line from S3 segment of proximal tubules in adult rat kidney. *Kidney Int.* 68:1966 (abstr). 2005.
 - 11) Noiri E, Kobayashi N, Takamura Y, Iijima T, Takagi T, Doi K, Nakao A, Yamamoto T, Takeda S, Fujita: T Pulse total-hemoglobinometer provides accurate noninvasive monitoring. *Crit Care Med.* 33(12):2831-2835. 2005.
 - 12) Nakamura T, Sugaya T, Node K, Ueda Y, Koide H: Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 47:439-444. 2006.
 - 13) Nakamura T, Sugaya T, Koide H: Cigarette

- smoking affects urinary liver-type fatty acid-binding protein concentration in patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 29(7):1717. 2006.
- 14) Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Ueda Y, Koide H: Effect of pioglitazone on urinary liver-type fatty-acid-binding protein concentrations in diabetes patients with microalbuminuria. *Diabetes Metab Res Rev*:22:385-389. 2006.
- 15) Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura M, Hanada S, Hisamoto T, Yoshida T, Kawaguchi T, Baba S, Maeyama M, Koga H, Harada M, Kumashiro R, Ueno T, Ikeda H, Imaizumi T, Murohara T, Sata M: Endothelial progenitor cell transplantation improves the outcome following liver injury in mice. *Gastroenterology*. 130: 521-531. 2006.
- 16) Shintani S, Kusano K, Ii M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thorne T, Murohara T, Losordo DW: Synergistic effect of combined intramyocardial CD34 cells and VEGF-2 gene therapy post-myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 3(Suppl.): S123-S128. 2006.
- 17) Egami K, Murohara T, Aoki M, Matsuishi T: Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. *J Leukoc Biol*. 79: 971-976. 2006.
- 18) Kobayashi K, Kondo T, Inoue N, Aoki M, Mizuno M, Komori K, Yoshida J, Murohara T. Combination therapy using angiopoietin-1 plasmid gene and autologous bone marrow cell implantation promotes functional angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1465-1472. 2006.
- 19) Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada M, Kondo T, Murohara T: The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation*. 114:I114-I119. 2006.
- 20) Yasuda K, Kasuga H, Aoyama T, Takahashi H, Toriyama T, Kawade Y, Iwashima S, Yamada S, Kawahara H, Maruyama S, 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. *J Am Soc Nephrol* 2006 Aug;17(8):2322-32. Epub 2006 Jul 12.
- 21) Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Kawai H, Matsuo S, Takei Y, Muramatsu T, Kadomatsu K: Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol*. 168: 9-19. 2006.
- 22) Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kinomura M, Hirokoshi K, Kitayama K, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Agata N, Makino H: 2-(8-Hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) propionic acid, an inhibitor of angiogenesis, ameliorates renal alterations in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 55:1232-1242. 2006.
- 23) Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, Yamamoto Y, Wu Y, Ichinose K, Hirokoshi K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H: Regulation of angiogenic factors in

- Angiotensin-II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. *Am J Hypertens.* 19:718-727. 2006.
- 24) Doi K, Okamoto K, Negishi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Toda A, Yokomizo T, Kita Y, Kihara Y, Ishii S, Shimizu T, Noiri E: Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Am J Pathol* 168:1413-24. 2006.
- 25) Noiri E, Nagano N, Negishi K, Doi K, Miyata S, Abe M, Tanaka T, Okamoto K, Hanafusa N, Kondo Y, Ishizaka N, Fujita T: Efficacy of darbepoetin for doxorubicin induced cardio-renal injury in rat. *Nephron Exp* 104:e6-e14. 2006.
- 26) Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamiyo A, Kimura K, Fujita T, Kinugawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Gotoh M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T: Renal L-type fatty acid: binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol.* 18: 2894- 2902. 2007.
- 27) Nakamura T, Sugaya T, Kawagoe Y, Suzuki T, Ueda Y, Koide H, Inoue T, Node K: Azelnidipine reduces urinary protein excretion and urinary liver-type fatty acid binding protein in patients with hypertensive chronic kidney disease. *Am J Med Sci.* 333(6):321-326, 2007
- 28) Nakaya I, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Yokoyama H, Ishida Y, Kondo T, Sugaya T, Kawachi H, Shimizu F, Narumi S, Haino M, Gerard C, Matsushima K, Kaneko S: Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol.* 107(1):e12-21, 2007
- 29) Nakamura T, Inoue T, Sugaya T, Kawagoe Y, Suzuki T, Ueda Y, Koide H, Node K: Beneficial effects of olmesartan and temocapril on urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in normotensive patients with immunoglobulin A nephropathy. *Am J Hypertens.* 20(11):1195-1201, 2007
- 30) Portilla D, Dent C, Sugaya T, Nagothu KK, Kundi I, Moore P, Noiri E, Devarajan P: Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.* 2007 Dec 19: [Epub ahead of print]
- 31) Nakamura T, Sugaya T, Koide H: Angiotensin II receptor antagonist reduces urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in patients with diabetic nephropathy and chronic renal failure. *Diabetologia.* 50(2):490-492. 2007.
- 32) Tanabe K, Maeshima Y, Ichinose K, Kitayama K, Takazawa Y, Hirokoshi K, Kinomura M, Sugiyama H, Makino H: Endostatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents the progression of peritoneal sclerosis in a mouse experimental model. *Kidney Int.* 71:227-238, 2007.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) Ozaki T, Anas C, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ito Y, Gotoh M, Yuzawa Y, Matsuo S: Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl.* Sept5;(Epub ahead of print) .2007.
- 41) Tercero C, Ikeda S, Uchiyama T, Fukuda T, Arai F, Okada Y, Ono Y, Hattori R, Yamamoto T, Negoro M, Takahashi I: Autonomous catheter insertion system using magnetic motion capture sensor for endovascular surgery. *Int J Med Robot.* 3:52-8. 2007.
- 42) 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):219-225. 2007.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) Imai E, Yamagata K, Iseki K, Iso H, Horio M, Makino 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.
- 47) Matsuo S: CKD (chronic kidney disease). *Nippon Jinzo Gakkai Shi. Suppl 50th Ann:*67-72. 2007.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) Ishii H, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, Kasuga H, Ichimiya S, Kanashiro M, Mitsunashi 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.
- 56) 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.
- 57) 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(1):e19-e26. 2008.
- 58) 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.
- 59) 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.
- 60) 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Costantini F, Murohara T, Takahashi M: Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol.* 2008 (in press).
- 64) Suga H, Nagasaki H, Kondo T, Okajima Y, Suzuki C, Ozaki N, Arima H, Yamamoto T, Ozaki N, Akai M, Sato A, Uozumi N, Inoue M, Hasegawa M, Oiso Y: Novel treatment for nephrogenic diabetes insipidus using the Sendai-virus vector *Endocrinology.* 2008 (in press).
- 65) Wong MG, Suzuki Y, Tanifuji C, Akiba H, Okumura K, Sugaya T, Yamamoto T, Horikoshi S, Tan SY, Pollock C Tomino Y: Peritubular ischemia contributes more to tubular damage than proteinuria in immune-mediated glomerulonephritis. *JASN.* 19: 290-29. 2008.
- 66) Kinomura M, Kitamura S, Tanabe K, Ichinose K, Hirokoshi K, Takazawa Y, Kitayama H, Nasu T, Sugiyama H, Yamasaki Y, Sugaya T, Maeshima Y, Makino H:

- Amelioration of cisplatin-induced acute renal injury by renal progenitor-like cells derived from the adult rat kidney. Cell transplantation. 2008 (in press).
- 67) 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.
- 68) 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. 2008 (in press).
- 69) 菅谷健, 野入英世, 土井研人, 根岸康介, 上條敦子, 木村健二郎: 腎虚血再灌流障害モデルにおける脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の腎保護作用. Therapeutic Research. 26:21-22. 2005.
- 70) 山本徳則, 菅谷健, 野入英世, 山田伸, 上平修, 絹川常郎, 小松智徳, 松川宣久, 吉野能, 服部良平, 大島伸一, 後藤百万: 新しい腎虚血バイオマーカー: Renal L-type-FABP(L-FABP). 日本腎予防医学研究会雑誌. 掲載予定. 2008.
- 71) 山本徳則: 腎後性のAMI. 臨床雑誌『内科学』. 102(1):掲載予定. 2008.
2. 学会発表等
- 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. 2007.
- 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. 2007.
- 3) Sugaya T, Noiri E, Yamamoto T, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K. L-type fatty acid-binding protein(L-FABP) ameliorates renal ischemia reperfusion injury (I/R) in human L-FABP transgenic mice. 3rd World Congress of Nephrology. A133, T-P010046. Singapore. June 28. 2005.
- 4) Yamamoto T, Ono Y et al: Direct visualization of cortical peritubular capillary of transplanted human kidney with reperfusion injury using a magnifying endoscopy. ASN 2005
- 5) Maruyama S, Ozaki T, Chabouk A, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, Matsuo S: Renoprotective properties of G-CSF and mononuclear cells derived from bone marrow. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 6) Ozaki T, Chabouk A, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, Matsuo S: Recombinant human soluble thrombomodulin inhibits apoptosis and attenuates ischemic acute renal failure. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 7) Chabouk A, Ozaki T, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, Matsuo S: The effects of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure, ASN 38th

- Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 8) Yoshino Y, Yamamoto T, Ono Y et al: Renal function during intensive chemotherapy for advanced germ cell tumor: a clinical model revealing the implications of autologous peripheral blood stem cells. ASN 2006
 - 9) Kinomura M, Maeshima Y, Kitamura S, Tanabe K, Ichinose K, Hirokoshi K, Takazawa Y, Kitayama H, Sugiyama H, Yamasaki Y, Sugaya T, Makino H: Amelioration of cisplatin-induced acute renal tubular injury by intrarenal injection of renal progenitor-like cells derived from adult rat kidney. Renal Week 2006. Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, CA, USA. Nov. 16-19, 2006.
 - 10) 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. Nagoya. Feb. 3. 2007.
 - 11) 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. The 1st Research Forum on Chronic Kidney Disease. Nagoya. Feb. 3. 2007.
 - 12) Sassa N, Hattori R, Ono Y, Yamamoto T, Gotoh M: Direct visualization of renal hemodynamics affected by carbon dioxide pneumoperitoneum. 102th Annual Meeting of American Urological Association. May. 2007
 - 13) Sassa N, Hattori R, Yamamoto T, Gotoh M: Renal hemodynamics affected by CO2 pneumoneum with direct visualization. 13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Sep. 2007.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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 mesangio-lysis,