

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09189

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の立体組織を利用した慢性腎臓病の新規治療開発研究

研究課題名（英文）Development of novel treatments for chronic kidney disease with mesenchymal stem cell structures

研究代表者

今村 哲也（Imamura, Tetsuya）

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00467143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、慢性腎不全への移行段階での病期ステージの進行を抑制して、正常な腎機能へと回復させることを目的とした新規治療開発の基礎研究を行う。本研究では、脂肪組織由来の間葉系幹細胞を用いてハイブリッド型積層細胞シート、および、立体型の細胞構造体を作製した。続いて、機能が低下した糖尿病ラットの腎臓の被膜下へのパッチ移植を試みた。移植4週間後、積層細胞シート、あるいは、構造体の移植によって血中クレアチニン値や尿タンパク量の低下等の腎機能が改善する傾向を明らかにした。本研究の成果により、今後の慢性腎臓病の新規治療開発研究における重要な基盤を築くことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病は、新たな国民病と位置づけられる疾患である。しかし、慢性腎臓病において、慢性腎不全に至ると透析治療や腎移植などの腎代替療法が必要となる。これらの腎代替療法には、患者の社会活動の厳しい制限、生活の質の著しい低下、ドナー腎の不足など多くの課題が山積している。本研究は、最新の細胞シート工学や生体組織印刷技術を利用して立体型の細胞体を作製して、慢性腎不全への移行段階での病期ステージの進行を抑制して、正常な腎機能へと回復させる新規治療開発を目的とした非常に高い学術的意義を有している。さらに、本研究の成果は、現行の腎代替療法に関わる課題を解決して患者に大きく貢献できる社会的意義を有している。

研究成果の概要（英文）：This study aims are developments of novel treatments for patients with chronic kidney disease. By using cell sheet engineering and/or biofabrication, the treatments inhibit progressions to chronic renal failure, and restore kidney functions. In this study, engineered cell sheets and/or biofabricated cell structures composed of adipose-derived mesenchymal stem cells were produced, and then they were patch-transplanted into renal capsule of type II-diabetes mellitus rats, which were used as chronic kidney disease. At 4week after, serum creatine, or urine protein in the engineered cell sheets- and/or biofabricated cell structures-transplanted rats tended to decrease compared to the control rats. This study will provide basic technologies of the novel treatments for chronic kidney disease.

研究分野：泌尿器科

キーワード：間葉系幹細胞 慢性腎臓病 細胞シート工学 生体組織印刷 糖尿病ラット

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病は、20歳以上の成人8人に1人と推定されており、新たな国民病と位置づけられている。慢性腎臓病において、慢性腎不全に至った患者に対する治療としては、透析療法や腎移植などの腎代替療法が行われている。しかし、透析療法は、患者への非常に大きな負担が課題であり、移植医療に関しては、ドナー不足が深刻な課題である。したがって、慢性腎不全への進行を抑制する、あるいは、正常な腎機能を回復させる新規治療開発は、早急な研究課題である。

現在、細胞シート工学、生体組織印刷技術(バイオ3Dプリンタ)の発展にともない積層型、あるいは、立体型の細胞構造体の作製が可能になった。これまでに、本邦で開発されたバイオ3Dプリンタ(株式会社サイフューズ)を利用して、ヒトとラットの間葉系幹細胞の立体型細胞構造体の作製条件を確立した(図1A:出願番号:PCT/JP2017/020531,特願2019-93184)。ラット骨髄由来細胞の構造体を放射線照射した膀胱へ移植すると機能的な膀胱が再生することを報告した(米国泌尿器科学会2017 Best Poster 受賞、平成27-29年度基盤研究(C))。また、膀胱再生技術としてPCT特許出願を行った。一方、温度応答性培養皿(株式会社セルシード)とゼラチン不織布(ニッケ・メディカル株式会社)を利用して、間葉系幹細胞からハイブリッド型積層細胞シートを確立した(図1B:特願2020-162394)。本研究は、これらの研究成果を基礎として、慢性腎臓病における新規治療の基盤技術開発を行った。

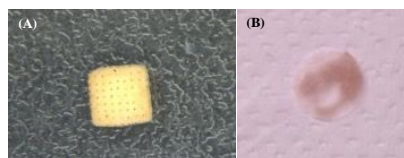
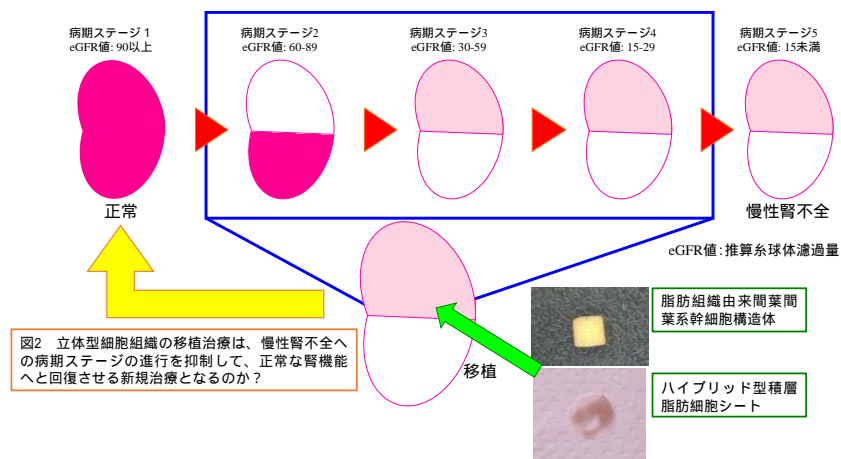


図1 立体型細胞構造体(A)とハイブリッド型積層細胞シート(B)

2. 研究の目的

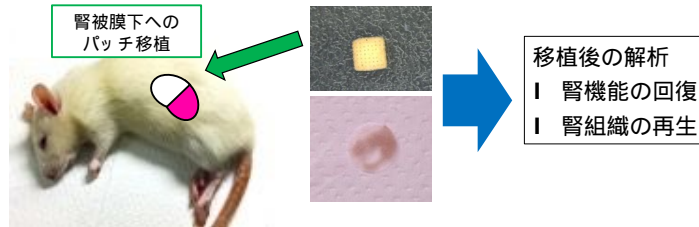
慢性腎臓病の治療において、慢性腎不全への進行を止め、腎機能を回復させる有効な治療手段がない。本研究は、細胞シート工学、バイオ3Dプリンタを利用して、脂肪由来細胞から作製したハイブリッド型積層細胞シート(以下、積層細胞シート)あるいは、立体型細胞構造体(以下、構造体)を用いた移植治療は、慢性腎不全へと移行する段階での腎臓に対して、病期ステージの進行を抑制して、正常な腎機能へと回復させる新規治療となるのかを明らかにすることを目的とした(図2)。



本研究では、慢性腎臓病モデル動物として、右腎を摘出した後、8週間の高脂肪飼料と塩分含有飼料の混合飼料飼育によって生じる腎機能が低下した2型糖尿病ラット(Goto-Kakizaki: GKラット)を用いた。一方、ドナー細胞は、GFP-SDラットの腹部脂肪組織から採取して、初代培養から得られた脂肪由来幹細胞を用いた。腎機能が低下したGKラットの腎臓の被膜下に構造体または、積層細胞シートをパッチ移植すると腎機能が回復するのか、腎組織が再生するのかを検討

した(図3)。

3. 研究の方法



右腎の摘出、高脂肪飼料と塩分含有飼料との混合飼料飼育によって腎機能が低下したGKラット

図3 本研究の目的は、バイオ3Dプリンタ、細胞シート工学を利用して作製した構造体、または、積層細胞シートの移植による機能的な腎臓を再生できるのか明らかにする。

3-1. GKラット慢性腎臓病モデルの作製

10週齢雌GKラットの右腎を摘除した後、1週間の通常飼育(回復期)を行った。腎摘1週間後目から高脂肪飼料と4%塩分含有飼料を1:1で混合した混合飼料で8週間飼育を行ったラットを慢性腎臓病モデルとした。

3-2. 脂肪由来細胞の初代培養

18週齢雄GFPトランスジェニックSDラットの下腹部から脂肪組織(2-5g)を採取した。採取した脂肪組織を細断して、0.2%コラゲナーゼ酵素(37℃、約90分、遠心振盪)処理によって単離した細胞を回収した。15%仔牛血清、0.1%ペニシリン・ストレプトマイシン含有DMEM培地を用いて、回収した細胞をコラーゲンコート培養皿にて7-10日間初代培養を行った。初代培養期間中、培養皿(コラーゲン)に接着、伸展した間葉系幹細胞を含む細胞群を脂肪由来細胞とした。

3-3. ハイブリッド型積層脂肪由来細胞シートの作製

初代培養を経た脂肪由来細胞を6cm温度応答性培養皿(UpCell、株式会社セルシード)に 1.0×10^6 cells/dish/5ml-培地(R-STEM、ロート製薬株式会社)となるように播種して、7-10日間培養を行った。オーバーコンフルエントに達した後、培養皿の温度を(約20℃程度まで)低下させて、細胞をシート状に培養皿から遊離させた。ゼラチン不織布(Genocel、ニッケメディカル株式会社)を利用して、遊離したシート状の細胞単層を回収した。それを2枚作製して、細胞側同士が接着するように合わせ、無培地で約2時間インキュベーションした(図4)。インキュベーション後、培養培地を添加して2日間培養を行った。

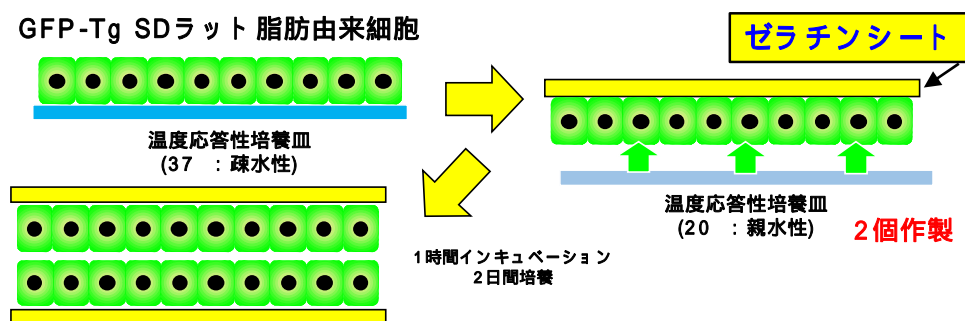


図4 細胞シート工学を応用したハイブリッド型積層脂肪由来細胞シートの作製

3-4. 立体型脂肪由来細胞構造体の作製

初代培養を経た脂肪由来細胞を継代（拡大）培養して十分な細胞数を得た。96-well プレートの 1 well あたりに 1.0×10^5 cells/100 μ l-培地（R-STEM）となるよう播種して、2 日間培養を行い、細胞凝集体（以下、スフェロイド）を形成した。形成した直径 500-600 μ m スフェロイドをバイオ 3D プリンタ（S-PIKE、株式会社サイフューズ）に配置して 5 列 x5 列 x2 層（約 5mm x 5mm x 1mm）の構造体を積層した。積層した構造体を培地（R-STEM）にて 7 日間循環培養した。循環培養後、積層するための治具（針）から構造体を抜き移植実験に用いた（図 5）。

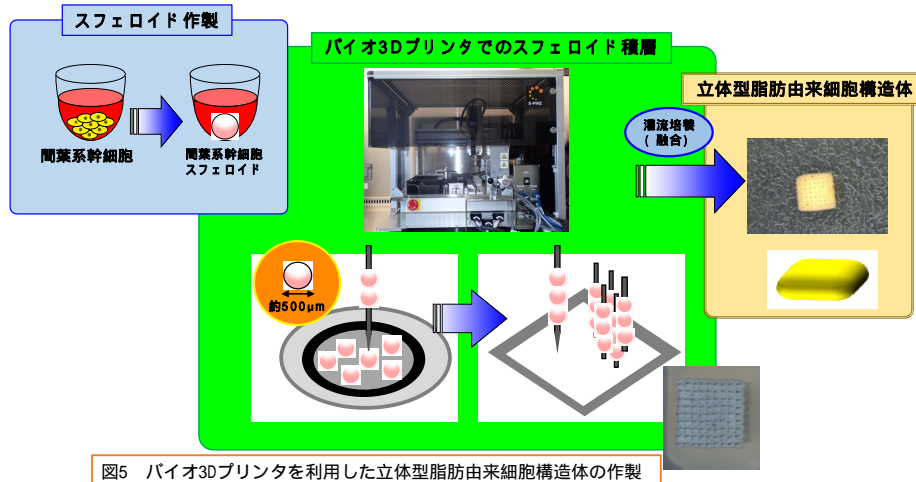


図5 バイオ3Dプリンタを利用した立体型脂肪由来細胞構造体の作製

3-5. 慢性腎臓病モデルとしての GK ラットの腎臓へのパッチ移植

右腎を摘除して、8 週間混合飼料で飼育した GK ラットの 24 時間採尿、及び、鼠径部からの採血を行った。続いて、背側から左腎を露出させた。腎被膜を丁寧に剥離して、ポケット状のスペースを形成した。形成したスペースに作製した構造体、あるいは、積層細胞シートを挿入する形でパッチ移植した（図 6）。偽手術を行ったラットを対照群とした。パッチ移植 2 週後に、24

時間採尿、及び、鼠径部からの採血を行った。移植 4 週間後に 24 時間採尿、及び、鼠径部からの採血を行い、腎臓を摘出した。摘出した腎臓の一部を生検して、残りを組織標本とした。



図6 ハイブリッド型積層脂肪由来細胞シートのパッチ移植

4. 研究成果

4-1. GK ラットの慢性腎臓病モデルとしての評価

右腎を摘除した GK ラットを通常飼料、あるいは、高脂肪飼料で 4 週間飼育を行ったとき、明確な血中クレアチニン値、尿タンパク量などの変化から腎機能障害を確認できなかった。しかし、高脂肪飼料と 4% 塩分含有飼料を 1:1 で混合した混合飼料で 8 週間飼育を行うと通常飼料飼育した場合よりも、血中クレアチニン値や尿タンパク量が増大する腎機能障害が認められた。従って、本研究では、右腎を摘除した GK ラットを混合飼料で 8 週間飼育したものを慢性腎臓病モデルとした。

4-2. 積層細胞シート、構造体のパッチ移植効果

右腎を摘除して、8 週間混合飼料で飼育した GK ラットの左腎に積層細胞シート、あるいは、構造体をパッチ移植すると、4 週間後、対照群と比較して血中クレアチニン値や尿タンパク量の増大が抑制される傾向を認めた。一方、組織学的解析では、明らかな腎組織の変化は、認められなかった。

4-3 . 本研究成果の総括

本研究では、GK ラットを利用した慢性腎臓病モデルを確立できた。また、最新の技術である、細胞シート工学、あるいは、生体組織印刷技術を利用した脂肪由来間葉系幹細胞からのハイブリッド型積層細胞シート、立体型細胞構造体の作製を確立するとともに、それらの腎被膜下へのパッチ移植の手技を確立した。これらの研究成果は、今後の新規治療としての基盤技術となると考える。

しかし、積層細胞シート、構造体の両パッチ移植でも、4 週間後の評価での腎機能低下の抑制効果の傾向が認められたが、統計学的な有意差を得られなかった。積層細胞シート、あるいは、構造体から分泌される種々の液性因子による抗炎症作用、血管新生作用、免疫調節作用などのパラクリン効果によって、腎機能低下の抑制、改善すると予想している。従って、移植後 4 週間の経過観察では、十分な効果が現れなかったと推察する。今後、長期経過観察を計画に入れ検討を継続する。もう一方で、本研究で用いた GK ラットの腎機能の低下を認めたが、軽症であると考えられる。この点からも細胞治療効果が見えにくかったのではないかと考えている。

本研究では、慢性腎臓病新規治療としての基盤技術を確立した。本研究から得られた課題を解決するとともに、中・大動物へのステップアップを進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagai Takashi, Imamura Tetsuya, Ogawa Teruyuki, Minagawa Tomonori, Domen Takahisa, Suzuki Toshiro, Ueno Manabu, Ishizuka Osamu	4. 巻 38
2. 論文標題 Nicotine induced hypoxia in rat urothelium deteriorates bladder storage functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 1560 ~ 1570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nau.24050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ueno Manabu, Minagawa Tomonori, Saito Tetsuichi, Imamura Tetsuya, Nagai Takashi, Ogawa Teruyuki, Ishizuka Osamu	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic effects of Choreito, a traditional Japanese (Kampo) medicine, on detrusor overactivity induced by acetic acid in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/luts.12302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Imamura, Shimamura, Ogawa, Minagawa, Nagai, Gautam, Ishizuka	4. 巻 24
2. 論文標題 Biofabricated structures reconstruct functional urinary bladders in radiation-injured rat bladders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1574-1587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.tea.2017.0533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 今村哲也	4. 巻 66
2. 論文標題 最新のトピックス 下部尿路再生医療の実現へのトランスレーショナルリサーチ “次世代Tissue Engineering” でのアプローチ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 信州医学雑誌	6. 最初と最後の頁 407-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今村哲也
2. 発表標題 次世代Tissue Engineeringによる泌尿器科再生医療の発展をめざして
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村哲也、道面尚久、松岡大輔、井上貴浩、石塚修
2. 発表標題 放射線腎症を模倣した放射線照射傷害によるラット腎機能モデルの確立
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村哲也、小川輝之、鈴木都史郎、上野 学、鈴木 中、原 寛彰、井上貴浩、永井 崇、皆川倫範、石塚 修
2. 発表標題 シクロホスファミドと放射線照射によって誘発したラット膀胱炎におけるヒト間質性膀胱炎の特異的遺伝子発現との類似性の検討
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村哲也
2. 発表標題 冷えストレス排尿筋過活動の機序におけるTRPA1チャンネルを介する排尿反射経路の関与の解明
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也
2. 発表標題 放射線照射傷害膀胱モデルを用いた骨髄由来細胞立体構造体の移植による膀胱再生
3. 学会等名 第15回泌尿器科再建再生研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也
2. 発表標題 下部尿路再生医療の実現に向けたトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第8回細胞再生医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也
2. 発表標題 PDE5阻害薬による下部尿路閉塞ラットの冷えストレス排尿筋過活動の抑制効果
3. 学会等名 第25回日本排尿機能学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村哲也
2. 発表標題 Biofabricated Bone Marrow-derived Cell Structures Recover Radiation-injured Bladders in Rats
3. 学会等名 The 13th Pan-Pacific Continence Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部泌尿器科学教室
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/urology/index.htm>
信州大学 医学部 泌尿器科学教室
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/urology/index.htm>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------