

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790584

研究課題名 (和文) 腹膜硬化症に対する骨髄幹細胞を用いた再生療法

研究課題名 (英文) Effect of mesenchymal stem cell on peritoneal fibrosis in rat model

研究代表者

中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：40448262

研究成果の概要：

ラットへ 0.1%クロルヘキシジングルコネート+15%エタノール生食液を腹腔内投与して腹膜障害モデルを作成した。このラットへ骨髄幹細胞を静注、あるいは腹腔内投与し、腹膜の経時的变化を観察した。骨髄幹細胞投与群 (静注および腹腔内投与) ではコントロールと比較し、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞の著明な抑制を認めた。また、GFP 陽性幹細胞を用いて同様の実験を行ったところ、腹腔内投与群のみ、腹膜～横隔膜直下へ GFP 陽性幹細胞が生着していた。以上より、骨髄幹細胞投与によって腹膜線維化が抑制される可能性があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	270,000	2,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：人工透析学、幹細胞、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全による維持透析患者は年々増

加の一途を辿り、現在 25 万人を超え、毎年 3 万人が新規に透析導入されている。腹膜透析

は 24 時間連続して毎日行う緩徐な透析方法であり、週 3 回・1 回 4 時間という短時間で断続的に施行される血液透析とは異なり、持続的な体液補正が可能である。このため心循環系への負担も少なく、長期間の残腎機能の維持が可能である。また、血液透析は月に約 13 回の通院が必要であるのに対し、腹膜透析患者は通院回数が月に 1、2 回で済むため、社会復帰が容易であり、血液透析と比較し医療費も安価である。このような利点があるにもかかわらず、腹膜透析の割合が全透析患者の 3.6%と非常に低い理由は、腹膜の経時的劣化が避けられないことにある。腹膜が長期的に透析液に暴露されることによって、腹膜中皮細胞の露出および腹膜の線維化が引き起こされ、限外濾過ができなくなる。このため腹膜透析の実施可能期間は約 5~10 年であり、以降は血液透析への移行を余儀なくされる。腹膜障害が強い症例では、被嚢性腹膜硬化症をきたすこともある。被嚢性腹膜硬化症は、びまん性に肥厚した腹膜の癒着が起こる疾患であり、生命予後も不良である。このように腹膜透析の最大の弱点は、透析液の貯留によって腹膜中皮細胞が障害を受け、腹膜が肥厚し線維化する事である。腹膜の劣化をいかに抑制できるか、あるいは劣化した腹膜を回復させられるかが重要な課題であるが、現時点では、劣化した腹膜を改善させる治療法は存在しない。

## 2. 研究の目的

骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた組織再生技術を応用して、腹膜中皮細胞を再生し腹膜機能の回復を図ることを目的とした。骨髄幹細胞が同じ中胚葉由来である腹膜中皮細胞に分化する可能性は高く、また近年、骨髄幹細胞自体が抗炎症作用を有しているとい

う報告からも、腹膜線維化モデルラットの腹腔内に幹細胞を投与することにより、腹膜中皮細胞が再生し、腹膜線維化が抑制され、腹膜透析を安全かつ長期に継続することが可能になると考えられた。

ラット腹膜線維化モデルにおいて、vascular endothelial growth factor (VEGF) 特異的中和抗体の投与や、Heat shock protein 47 の antisense の遺伝子導入による腹膜線維化抑制効果が報告されているが、臨床応用可能な物質による腹膜線維化抑制は、国内外を問わず報告がない。骨髄幹細胞は自己の細胞であり、免疫反応等の副作用がほとんど無いと考えられるため、臨床応用可能なアプローチとして有望である。再生医療のもう一つの柱である遺伝子治療と比較しても、我々が計画する自己骨髄幹細胞治療は外来遺伝子の導入による安全性の問題も無く、既に幹細胞の採取・分離法も確立していることから、臨床応用が現実的である。

骨髄幹細胞により腹膜線維化が抑制されることが明らかになれば、腹膜に骨髄幹細胞を投与することにより腹膜の劣化を予防し、腹膜透析を長期に継続することが可能となり、患者の QOL や生命予後を改善できると考える。さらに血液透析と比較し、腹膜透析は医療コストが安価であることより年々増加する透析領域の医療費軽減にも役立つと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット腹膜線維化モデル作製

雄性、7~8 週齢の SD ラットまたは近交系 F344 ラットを使用。0.1%クロロヘキシジングルコネート+15%エタノール生食液を腹腔内投与し、投与量や投与間隔、観察期間を決める。

## (2) 骨髄幹細胞の採取・投与

ラット骨髄から採取した幹細胞を培養し、腹膜線維化モデルラットに静注、あるいは腹腔内投与し、腹膜の経時的変化を観察する。さらに、得られた検体にて、下記の検討を行う。

① マッソントリクローム染色で腹膜線維化、腹膜肥厚、新生血管の程度を評価する。

② 免疫染色による染色性 ( $\alpha$ SMA, TGF  $\beta$ , Collagen type III, VEGF など) を評価する。

## (3) 骨髄幹細胞が腹膜に生着するか？

GFP 陽性ラット由来の骨髄幹細胞を投与し、GFP 陽性幹細胞の局在を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) ラット腹膜線維化モデル作製

SD ラットへの 10 日～4 週間のクロルヘキシジングルコネート連日腹腔内投与では、腹膜の線維化が強く、血性腹水も増加し、骨髄幹細胞の腹腔内投与を行ったが線維化の改善は認めなかった。そこで、クロルヘキシジングルコネートを 1 日のみ腹腔内投与するモデルを作成し検討した。このモデルでは腹水の貯留がほとんど無く、2 週間腹膜肥厚が継続していた。

### (2) 骨髄幹細胞の採取・投与

そこで、クロルヘキシジングルコネートを 1 日のみ腹腔内投与するモデルを用いて、骨髄幹細胞の効果を検討した。(コントロール群；クロルヘキシジングルコネートを腹腔内投与し 15 分後に PBS のみ腹腔内投与、IV 群；クロルヘキシジングルコネートを腹腔内投与し直後に骨髄幹細胞を尾静脈より静注、IP 群；クロルヘキシジングルコネートを腹腔内投与し 15 分後に骨髄幹細胞を腹腔内投与)。3 群とも腹膜の肥厚を認め、群間に有意な差を認めなかったが、IV 群および IP 群にて  $\alpha$

-SMA 陽性細胞の著明な抑制を認めた。今後、腹膜機能検査を用いて腹膜機能が改善しているか検討する。

### (3) 骨髄幹細胞が腹膜に生着するか？

骨髄幹細胞が腹膜組織に生着するかを検討するため、GFP ラットの骨髄幹細胞を使用し、クロルヘキシジングルコネート投与後に静注あるいは腹腔内投与後 24 時間で屠殺し、各臓器(腹膜・肺・脾臓・肝臓・心臓・横隔膜・腎臓)への GFP 陽性骨髄幹細胞の有無を検討した。IV 群では肺組織に GFP 陽性細胞の散在を認めたが、他の臓器には認めなかった。IP 群では、わずかではあるが腹膜～横隔膜直下への GFP 陽性細胞の生着を認めた、他の臓器には認めなかった。今後、腹膜への経時的な生着細胞数を検討する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：40448262

(2)研究分担者

(3)連携研究者

頼岡 徳在(YORIOKA NORIAKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40144828