

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591879

研究課題名 (和文)

低血清培養法による脂肪由来幹細胞を用いた腎障害治療におけるニッチ

研究課題名 (英文)

Niche of treatment of adiposed driven stem cell for renal damage by low serum culture

研究代表者

山本 徳則 (TOKUNORI YAMAMOTO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20182636

研究成果の概要 (和文)：腎障害ラットモデル低血清培養法を用いた脂肪組織由来幹細胞治療群とコントロール群を比較検討した。細胞治療群はコントロール群と比較して投与後数日で血中Crn, BUNの改善を認めた。同様に尿細管周囲毛細血管血流の改善も認めた。In vitroでの低血清と高血清で培養したもので比較すると低血清培養での細胞から分泌された虚血状態ではさらにその差が大きくなった。細胞から分泌されると考えられるサイトカインがレシピエントの腎臓尿細管毛細血管の血流増加を引き起こし陣保護作用を示したものと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Acute kidney injury (AKI) represents a major clinical problem with high mortality and limited causal treatments. The use of cell therapy has been suggested as a potential modality to improve the course and outcome of AKI.

We investigated the possible renoprotection of low serum cultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells (ADRCs) in a rat ischemia-reperfusion (I-R) model of AKI. We demonstrated that ADRC group drastically significantly reduced than control group serum creatinine and BUN. In addition, ADRCs group increased than control group in peritubular blood flow. Collectively, these results suggest a potential clinical role for ADRC therapy in patients with AKI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：脂肪組織由来幹細胞、ニッチ、腎障害治療、尿細管周囲毛細血管血流

1. 研究開始当初の背景

名古屋大学農学部北川先生が考案した低血清培養による脂肪由来幹細胞法を用いて、腎障害、下肢虚血、創傷治癒そして骨粗鬆症治療の用途特許を出願した。(脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤 発明者 尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄 特許願人 名古屋大学 出願日平成18年8月9日 (日本特許 特願 2006-216234) (国際特許 PCT/JP2007/065431))

2. 研究の目的

様々な細胞に分化することが可能な多分化能幹細胞を利用して、損傷を受けた組織を再建しようとする試みが世界的な規模で行われている。例えば、多分化能幹細胞の一つである間葉系幹細胞 (MSCs) は骨細胞、軟骨細胞、心筋細胞など、様々な細胞への分化能を有し、その臨床応用に注目が集まっている。従来、多分化能幹細胞は一般に骨髄から採取されていた。しかしながら、骨髄中に含まれる多分化能幹細胞の量は少なく、臨床応用を視野にいれれば、十分な細胞数を得るために全身麻酔下で数百 ml もの骨髄を採取しなければならない場合も想定され、患者への負担が大きい。少ない量の骨髄液から必要な量の多分化能幹細胞を得ることを可能にする培養技術も開発されているが、それには通常大量の血清 (例えば 10%程度) が必要とされる。このことが、臨床応用する際に重要な、異種動物原料を完全に排斥した製造プロセスの確立にとって足枷となっている。尚、骨髄由

来多分化能幹細胞については様々な臨床応用の可能性が検討されており、例えば腎虚血再灌流障害に対して間葉系幹細胞が有効であることが示されたている。最近になって、多分化能幹細胞源として脂肪組織が有望であることがいくつかの研究グループによって報告された)。また、脂肪組織から分離した細胞を 10%FCS 含有培養液で培養することで増殖した間葉系幹細胞が下肢虚血の病変改善に有効であることが示された (非特許文献 4)。しかしながら、10%という大量の血清の使用は、臨床応用を視野にいれたときに大きな問題となる。一方、北川らによって、脂肪組織より、多分化能を示す細胞集団を簡便な操作で大量に調製することが可能であることが報告されるとともに、得られた細胞が脂肪組織への分化能を有し、脂肪組織の再建に有効であることが示された

なかでも我々の領域で問題となっている腎障害に対する低血清培養法を用いた脂肪組織由来幹細胞治療における細胞環境すなわちニッチについて基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

低血清培養を用いて、下肢虚血そして腎障害のモデルラットの重要な環境因子として尿細管周囲毛細血管ならびにサイトカイン分泌について検討を行った。

4. 研究成果

低血清培養の有用性を明らかにするためにラット下肢虚血モデルに同系の皮下脂肪由来幹細胞 (ADSc) を注入すると明らかな血流増加を認めた。In vitroにおいて正常状態よりも虚血状態の方が明らかに VEGF の分泌が多いことを明らかにし、再生環境によって ADSc はパラ

クリン作用を發揮してニッチを整えることを行っていることを明らかにした。ラット慢性腎障害葉酸腎障害モデルを対象に同系のADScを腎臓皮下に注入治療を行った。その結果細胞投与2-3日目にコントロール群と比較して血中Crn, BUNの上昇の抑制すなわち腎保護作用を認めた。その細胞を注入した皮膜下のニッチとしての微小循環すなわち尿細管集毛細血管も同様にADSc注入群はコントロール群と比較して有意な血流増加を認め、腎保護作用とともにニッチに関与しているものと推測された。またヌードラット慢性障害モデルにヒト脂肪由来幹細胞被膜下に注入治療を行うと同様の腎保護作用と注入後1ヶ月の状態でも腎被膜下にヒト脂肪由来幹細胞の細胞塊が存在し、サイトカイン分泌を含んだ機能を行っている状態が推測された。さらに、注入した多分化能を有するADRCsは効果を發揮する以外の臓器構成エレメントとしての筋肉、骨そして脂肪には分化しなかった。注入したADRCsはそのレシピエント側の環境すなわちニッチによって適切な分化誘導が行われているものと推測された。

また、まずは、微小循環と再生について、マウスを対象に再生に必要な微小循環環境の実験を行った。マウスを対象に、ドライアイスを用いた骨髄幹細胞投与後、膀胱再生時の微小循環につき検討を行った。細胞投与後2日目早期にドライアイスを用いた群はコントロール群と比較して膀胱毛細血管流用の明らかな低下を認め、同時に組織での再生に必要な局所でのサイトカインの上昇を認めた。ホストの微小循環に可逆性の傷害が生じることによって、平滑筋の構造が傷害されることによりスペースが確保され再生部位局所のサイトカインが刺激され再生が亢進するものと考えられた。次に再生の腎保護作用について、ラットを用いて腎の機能血管である尿細管周囲毛細血管微小循環について検討を行った。腎傷害モデルラットを対象に低血清培養を用いた脂肪組織由来幹細胞を腎皮膜下に注入し、細胞投与後3日目早期に血中Crn BUNと腎臓組織はコントロール群と比して細胞投与群は有意に血中Crn BUNの低下とATNスコアの低下を認めた。その原因として生体顕微鏡を用いた、表在尿細管周囲毛細血管流量は有意に細胞

投与群の方が多い結果であり、臓器保護の発現時期から考えると血流改善の因子が腎保護作用に早期に関与していることが窺えた。早期の腎機能保護作用が認められることより、細胞から分泌される血流増加にサイトカイン(VGF等)のサイトカインが関与する可能性が推測された。

このことは現在臨床研究として行っている腹圧性尿失禁症例に対する脂肪組織由来幹細胞治療において細胞注入後のMRI検査でも言えることで、基礎研究臨床研究においてそのニッチの状態を確認し、それはひいては脂肪組織由来幹細胞治療の安全性に寄与することが推測された。

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20件)

①Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo T, Yasuda K, Saka K, Ozaki T, Yuzawa Y, Matsuo S, Gotoh M Int J Urol. 2011 accepted Improvement of urethral sphincteric function by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived stem cells in a rat model of stress urinary incontinence . 査読有

②Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Maruyama S, Matsuo S, Yuzawa Y, and Niki I Distribution of Hydrogen sulfide (H2S) Producing Enzymes and the Role of H2S in Diabetic Nephropathy AJP Renal Physiol 2010 accepted. 査読有

③Ogawa T, Hattori R, Yamamoto T, Gotoh M. Safe use of ultrasonically activated devices based on current studies. Expert Rev Med Devices. 2011 May;8(3):319-24. 査読有

④Aoki G, Hattori R, Yamamoto T, Funahashi Y, Mastukawa Y, Gotoh M, Yamada Y, Honda N Contrast-enhanced ultrasound using a time-intensity curve for diagnosis of renal cell carcinoma BJU International 2010 Nov 2. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09799.x. [Epub ahead of print]. 査読有

⑤ Mizuno Y, Yamamoto T, Okutsu H, Ohtake A, Samata, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Hattori R, Gotoh M Effect of tamsulosin on bladder microcirculation in a rat ischemia-reperfusion model, evaluated by pencil lens charge-coupled device microscopy system Urology 2010 Nov;76(5):1266. e1-5. 査読有

⑥Kim JS, Hattori R, Yamamoto T, Yoshino Y, Gotoh M. How can we safely use ultrasonic laparoscopic coagulating shears? Int J Urol. 2010 Apr;17(4):377-81.

⑦ Funahashi Y, Hattori R, Yamamoto T, Kamihira O, Sassa N, Gotoh M. Relationship Between Renal Parenchymal Volume and Single Kidney Glomerular Filtration Rate Before and After Unilateral Nephrectomy. Urology. 2010 Jun 4. [Epub ahead of print]. 査読有

⑧Funahashi Y, Hattori R, Matsukawa Y, Yamamoto T, Mizutani K, Yoshino Y, Komatsu T, Sassa N, Hagikura S, Gotoh M. Solitary Fibrous Tumor of the Seminal Vesicle. Aktuelle Urol. 2010 Sep;41(5):326-7. Epub 2010 Mar 22. German. 査読有

⑨Imamura T, Ishizuka O, Yamamoto T, Gotoh M. Nishizawa O Bone Marrow-Derived Cells Implanted into Freeze-injured Urinary Bladders Reconstruct Functional Smooth Muscle Layers LUTUS 2010 April 2(1)1-10. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

① Yamamoto T, Gotoh M, Adult stem cell therapy for Stress Urinary Incontinence invited, 第一回国際細胞移植学会, 2011 年 2 月 19 日, サンデゴ Estancia La Jolla Hotel

② 山本徳則、後藤百万, 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する, 前立腺癌治療用細胞製剤, 第 3 回名古屋大学医学・バイオ系知財フェア, 2010 年 12 月 17 日, 名古屋市

③山本徳則、舟橋康人、佐々直人、青木久佳、土屋拓真、松川宜久、加藤真史、水谷一夫、吉野 能、服部良平、後藤百万, 造影超音波検査による腎微小循環からの移植腎機能定量化の試み, 第 58 回レオロジー学会討論, 2010 年 10 月 4 日, 仙台市

④山本徳則、水野秀紀、舟橋康人、佐々直人、松川宜久、加藤真史、吉野 能、服部良平、後藤百万, ニコランジルの急性虚血腎障害モデルに対する腎微小循環保護作用—腎微小循環可視化イメージング法による検討—, 第 23 回ニコランジル研究会, 2010 年 10 月 30 日, 東京都千代田区

⑤山本徳則、舟橋康人、佐々直人、松川宜久、加藤真史、吉野能、水谷一夫、服部良平、後藤百万, 造影超音波検査による移植腎機能定量化の試み, 日本超音波医学会第 30 回中部地方会, 2010 年 9 月 12 日, 名古屋市

- ⑥山本徳則, 脂肪組織由来幹細胞療法の臨床: 圧迫性尿失禁, 脂肪組織由来幹細胞療法コンセンサ会議, 2010年8月21日, 神戸市
- ⑦山本徳則, 難治性泌尿器科疾患を対象にした自己脂肪由来幹細胞移植治療, 第15回鶴舞公開セミナー, 2010年4月23日, 名古屋市
- ⑧山本徳則, 臨床腹圧性尿失禁治療の経験, 第1回独協医科大学再生医療プロジェクト研究会, 2010年1月18日, 栃木県下都賀郡
- ⑨山本徳則、水野秀紀、松川宜久、服部良平、後藤百万, 下部尿路閉塞モデルラットにおける塩酸タムスロシンの膀胱微小循環real time imaging, 第3回排尿障害モデル動物研究会, 2010年11月26日, 静岡市
- ⑩山本徳則、渡辺達人、丸山彰一、松川宜久、小松智徳、服部良平、後藤百万, 根治的前立腺摘除術後の腹圧性尿失禁に対する、自己皮下脂肪組織由来幹細胞の傍尿道的注入による再生治療: 基礎的検討, 第98回日本泌尿器科学会総会, 2010年4月30日, 盛岡市
- ⑪山本徳則, 血流観測装置, 第9回国際バイオEXPO, 2010年7月2日, 東京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 徳則(YAMAMOTO TOKUNORI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20182636

(2) 研究分担者

後藤 百万(GOTO MOMOKAZU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10186900

(3) 連携研究者

なし