

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09556

研究課題名（和文）積層型デュアル間葉系幹細胞シートを利用した慢性腎臓病に対する新規治療開発

研究課題名（英文）Development of novel treatments for chronic kidney disease with biofabricated cell sheets

研究代表者

道面 尚久（Domen, Takahisa）

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：90750878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、間葉系幹細胞で積層型の新規細胞シートを利用した腎機能障害に対する新規治療の基礎的検討を行った。ラットの脂肪組織由来間葉系幹細胞とゼラチン繊維基材を用いて、積層型デュアル間葉系幹細胞シート（積層細胞シート）を作製した。ラット腎臓に凍結傷害を与えた後、自己細胞で作製した積層細胞シートを腎被膜下にパッチ移植した。無細胞シートを移植した対照群では、経時的に腎機能が低下した。しかし、積層細胞シート移植群では、傷害を受けた腎組織が部分的に回復するとともに、腎機能の低下が抑制された。積層細胞シート移植治療は、慢性腎不全への進行を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病（CKD）は、新たな国民病と位置づけられている疾患であり、患者数は、約1,330万人と推定されている。徐々に進行していく腎機能の低下を抑制する治療、低下した腎機能を回復させる治療がないため、CKD患者の約30万人が慢性腎不全に至り、人工透析や腎移植などの腎代替療法が必要となっている。本研究では、積層型デュアル間葉系幹細胞シートを利用することによって、慢性腎不全への進行の抑制、正常な腎機能の回復が可能かどうか基礎的検討を行った。本研究の成果は、積層型デュアル間葉系幹細胞シートを用いるCKDの新規治療の基盤技術を構築した。

研究成果の概要（英文）：This study determined whether transplantation of biofabricated adipose-derived mesenchymal cell (AMC) sheets could improve renal functions. The AMCs were cultured on temperature responsive dishes, and applied to gelatin hydrogel sheets. Two AMC-gelatin sheets were attached together. The recipient kidney was cryo-injured by spraying with liquid nitrogen, following the biofabricated AMC sheet was autologously transplanted into the renal capsule (n=6). Control rats were treated without the sheets (n=7). The control exhibited increases of both rate of urine protein to urine creatinine and blood creatinine. However, the transplanted rats did not show those increases. In the transplanted kidney, renal tubular disorder decreased compared to controls. This study suggested that the biofabricated AMC-gelatin sheets might improve renal functions.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：慢性腎臓病 間葉系幹細胞 ゼラチン繊維基材 細胞シート ラット

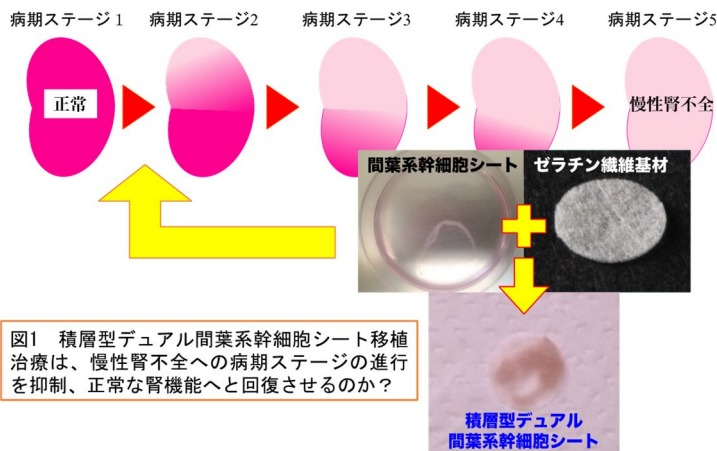
1. 研究開始当初の背景

本邦での慢性腎臓病(CKD)の患者数は、約 1,330 万人と推定されており、そのうち約 30 万人が慢性腎不全と公表されている。慢性腎不全に至ると腎代替療法としての人工透析や腎臓移植が必要となる。しかし、人工透析は、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。そこで、われわれは、CKD から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ことを目的とした新規治療開発研究を精力的に行っている。特に、間葉系幹細胞を用いて、様々な Tissue Engineering の手法による技術開発を行っている。

これまでに、温度応答性培養皿から作製した細胞シートは、優れたパラクリン効果を発揮して、組織再生や機能回復することを報告した。一方で、温度応答性培養皿で作製した単層状の細胞シートは、脆弱でありハンドリングが非常に困難である。また、単層状の細胞シートを複数枚、積層するという技術も広く用いられている技術であるが、積層して厚みを増すことにも制限がある。われわれは、近年開発されたゼラチン繊維基材を導入することによって、効率的に細胞シートを積層するとともに、細胞シートの課題である脆弱性を改善して、困難なハンドリングを回避できる積層型デュアル間葉系幹細胞シート(以下、積層細胞シート)を開発した。腎再生医療研究では、ドナー細胞の静脈投与法、直接注入法などが実施されているが、レシピエント腎臓内での生着率が極めて低いという課題があった。われわれが開発した積層細胞シートは、腎被膜下に差し込む形で腎臓へのパッチ移植が可能なおことからドナー細胞の効率的なデリバリーという点においても大きな利点を有している。

また、腎再生医療研究において用いられる腎不全モデルは、腎動静脈を阻血した急性腎虚血モデルや薬物誘発腎障害モデルである。しかし、発症する腎機能障害や腎組織傷害は、一過性であり長期にわたる治療効果を評価するモデルとして適さないことが課題である。そこで、われわれは、片腎を摘除して残存した腎臓に対して凍結傷害を与えることにより、長期に腎機能障害と腎組織傷害を呈する凍結腎機能障害モデルを確立した。

以上の研究成果を基盤として、本研究では、積層細胞シートを利用することによって、CKD 患者の慢性腎不全への病期ステージ進行を抑制するとともに正常な腎機能を回復させることができるのか基礎的検討を行った(図1)。



2. 研究の目的

本研究は、CKD 患者の慢性腎不全への進行を抑制するとともに正常な腎機能を回復させることを目的とした、積層細胞シートを利用する新規治療の基盤技術を検討した。

最初に脂肪組織から採取した間葉系幹細胞を用いて積層型細胞シートを作製した。続いて、ラット腎臓に凍結傷害を与えた後に、腎被膜下へ自己細胞から作製した積層細胞シートをパッチ移植した。積層細胞シート移植後に腎機能が回復するのかどうか、腎組織が再生するののかどうかを明らかにして、その治療効果の機序について考察をした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪組織由来の間葉系幹細胞を用いた積層細胞シートの作製

10 週齢雄 Sprague-Dawley (SD)ラットの右腎周辺の脂肪組織を約 1g 採取した。採取した脂肪組織を細断して、0.2% コラゲナーゼ処理 (回転振盪、37°C、1 時間)を行った。組織溶解液を遠心分離にかけて下層の細胞ペレットを培養培地 (15%FBS/DMSO) で懸濁した。細胞懸濁液をフィルターレーション (40µm メッシュ) して、脂肪由来細胞を得た。

得られた脂肪由来細胞を 10cm コラーゲンコート培養皿で 7-10 日間コンフルエントに達するまで初代培養を行った。このとき、1 日おきの全量培地交換を行い培養皿に接着しなかった細胞を除去した。培養後、コラーゲン培養皿に接着伸展した細胞を脂肪組織由来間葉系幹細胞とした。

初代培養を経た脂肪組織由来間葉系幹細胞に対して、移植後に細胞を検出するために細胞標識 (PKH26 赤色蛍光細胞リンカーキット、Sigma-aldrich)を行った。標識した細胞を 6-well (35mm) 温度応答性培養皿 (UpCell、株式会社セルシード) に播種して (1.0x10⁶ cell/well/3 ml-培地)、オーバーコンフルエントに到達するまで 5-7 日間継代培養した。

オーバーコンフルエントに達した後、培地を除去して、細胞を培養している温度応答性培養皿を約 20°C にすることによって接着していた脂肪由来間葉系幹細胞を細胞間結合を保持したまま

ま培養皿から剥離した。単層シート状の脂肪由来間葉系幹細胞をゼラチン繊維基材(直径 20mm、Genocel、ニッケ・メディカル)に接着させて回収した。この脂肪由来間葉系幹細胞-ゼラチン基材を 2 枚作製して、細胞同士が接着するように積層した。積層後、無培地で 37°C、1 時間インキュベーションした後、培地を添加して 3 日間培養を行ったものを積層細胞シートとした。

(2) ラット腎凍結傷害モデルの作製、および、積層細胞シートパッチ移植

上述、(1)で脂肪組織を採取した後、続けて右腎を摘除して閉創した。積層細胞シートが仕上がるまでの 17-23 日間、右腎摘除したラットを通常飼育した。最初に、残存している左腎を露出させて、腎動静脈をクランプした。腎臓の腹側に対して腎門部から扇状に液体窒素を 60 秒噴霧した後、凍結部位が自然融解するまで放置した。凍結部位の融解後、凍結傷害を与えた側の腎皮膜をポケット状に剥離した。積層細胞シートを腎被膜下に挿入して、剥離した腎皮膜を被せて積層細胞シートを固定した (n=7)。最後にクランプを外して、閉創した。同様に、無細胞シートを腎臓にパッチ移植したものを対照群 (n=6) とした (図 2)。

(3) 腎機能測定、および、組織学的解析

凍結傷害を与える前日と移植後 2、4 週間後に 24 時間採尿、および鼠径部より採血を行った。採取した尿において、尿中タンパク量と尿中クレアチニン (Cre) を測定した。採血からは、血中 Cre を測定した。

また、移植 4 週間後、採尿採血を終えたラットから移植処置を行った左腎を摘出して、4%PFA 浸漬固定、パラフィン包埋を行った。パラフィン薄切標本に対して、組織学的評価を行った。

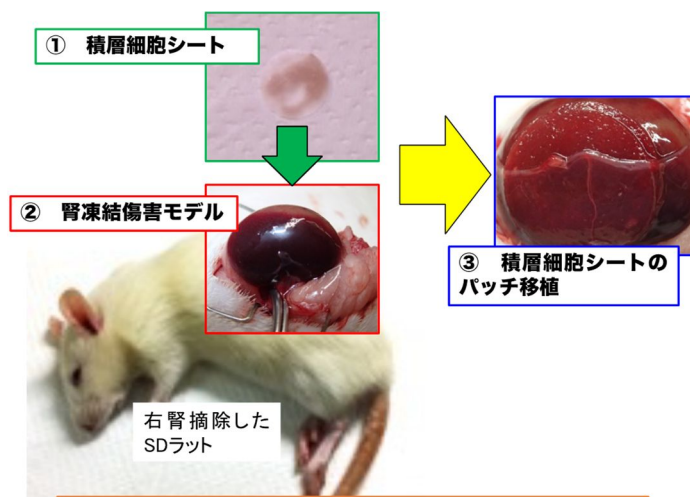


図2 腎凍結傷害への積層細胞シートパッチ移植

4. 研究成果

(1) 積層細胞シート移植による腎機能低下の抑制

無細胞シートを移植した対照群での尿中タンパク Cre 比は、術後 2 週間後まで変化はなかったが、術後 4 週間後に増大を示した (図 3 A)。また、血中 Cre においては、術後、2、4 週間後と経時的に増大した (図 3 B)。しかし、積層細胞シートをパッチ移植した群では、術後に尿中タンパク Cre 比、および、血中 Cre の増大を示さなかった (図 3 A, B)。

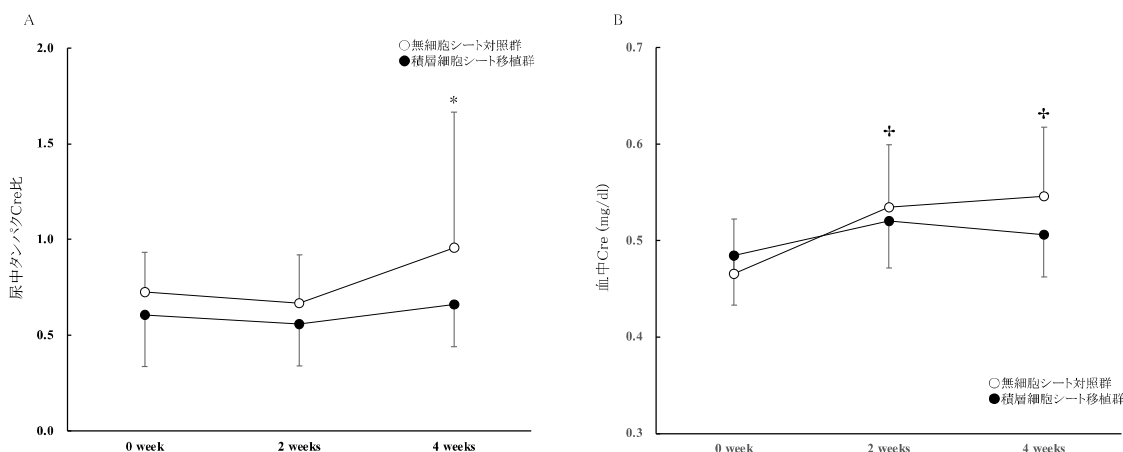


図3 積層細胞シートパッチ移植後の腎機能変化
*P<0.05; compared to 2 weeks in each group, +P<0.01; compared to 0 week in each group

(2) 積層細胞シート移植による腎組織の回復

術後 4 週間後、両群において凍結傷害を与えた部位での凝固壊死様の腎組織傷害が認められた (図 4A, B)。損傷部位、および、その近傍では、正常な組織学的形態を保持した尿管が減少しており (図 4A, B) 尿管上皮細胞の扁平化をともなう尿管の拡張が認められた (図 4C, D、米印)。しかし、観察部位での正常尿管あたりの拡張尿管の比率において、積層細胞シート群 (81.10±4.38%) では、対照群 (92.33±1.91, P<0.05) と比較して有意な減少が認

められた。

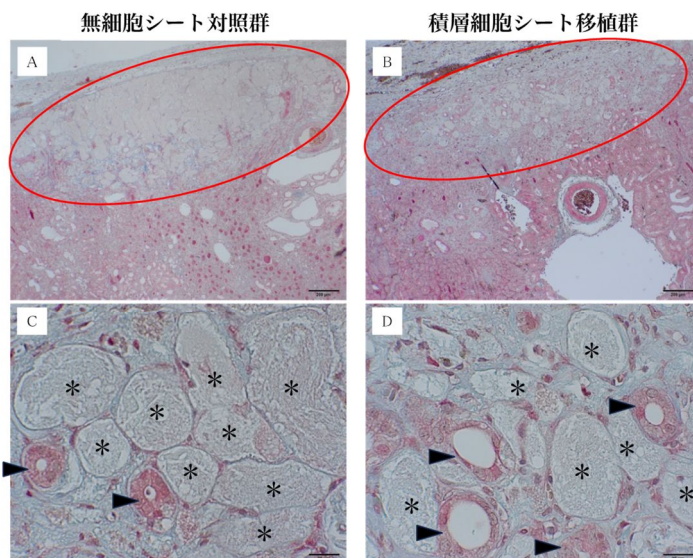


図4 積層細胞シートパッチ移植後の腎組織
赤囲み: 凍結傷害部位、鎌: 正常尿管、米印: 拡張尿管

(3) 積層細胞シート移植による腎再生機序の考察

移植4週間後の組織解析によって、PKH26 標識細胞が検出されたことから、積層細胞シートを構成している脂肪由来間葉系幹細胞の生着を確認した。また、積層細胞シート移植群では、血管新生因子である VEGF が対照群よりも高発現している傾向があった。加えて、ピクロシリウスレッド染色より、積層細胞シート移植した腎組織では、対照群と比較して腎組織内の線維化が抑制される傾向を確認した。今後、これらの結果を数値化する計画である。

本研究では、積層細胞シートを移植すると傷害を受けた腎組織が部分的に回復することによって、腎機能低下が抑制されることを示した。この機序は、積層細胞シートを構成している脂肪由来間葉系幹細胞が生着して、パラクリン効果を発揮したことが示唆される。凍結傷害によって影響を受けた末梢血管が VEGF などのよって回復して、腎組織内での線維化が抑制されたのではないかと考察している。以上の考察を明瞭にするため、複数の低酸素や線維化のマーカーを用いて解析するとともに、その他の細胞増殖因子やサイトカインなどの生理活性物質の発現などの解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞移植材、その製造方法及び使用方法	発明者 今村哲也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-162394	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--

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
研究分担者	今村 哲也 (Imamura Tetsuya) (00467143)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	

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
---------	---------