

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790801

研究課題名（和文）腹膜障害の診断、治療戦略としての iPS 細胞由来腹膜中皮細胞の分化誘導法の樹立

研究課題名（英文）The establishment of the leading differentiation for peritoneal mesothelial cells derived from iPS cells as the diagnosis and treatment strategy for the peritoneal damage.

研究代表者

鷲田 直輝 (WASHIDA NAOKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40468492

研究成果の概要（和文）：

ヒト iPS 細胞から分化させた細胞のうち、腹膜中皮細胞特異的と考えられた Flk1/HBME-1 陽性細胞をソートした。この細胞の形態は腹膜中皮細胞に極めて類似していた。

次に免疫不全マウスを用いて、被嚢性腹膜硬化症（EPS）モデルマウス作成した。メチルグリオキサールを腹腔内投与することにより EPS モデルマウスを作成した。

再生細胞 1×10^5 個/回/日を 1 日 1 回 5 日間連日移植した。細胞移植を行った群と細胞移植を行わなかった群との間で腹膜肥厚を比較検討した。腹膜厚に明らかな有意差を認めず、細胞移植が効果的であるとはいえなかった。

研究成果の概要（英文）：

The Flk1/HBME-1 positive cell, which might be specific to the peritoneal mesothelial cell, was given to sort out in differentiated cells derived from human iPS cells.

The encapsulating peritoneal sclerosis(EPS) model mice, coming from the immunodeficiency mice, were made by the intraperitoneal injection of Methylglyoxal.

The regenerative cells were transplanted at the density of 1×10^5 cell per day for five days in the abdominal cavities of the EPS model mice. The submesothelial thickening were compared between the cell-transplanted group and untransplanted group. In the result, the thickening did not significantly differ from between these groups. In this research, it was not proved that the regenerative cell transplantation into the peritoneal cavity was effective to EPS model mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総 計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：①中皮細胞再生②中皮細胞移植③被嚢性腹膜硬化症④腹膜癒着防止⑤腹膜透析

1. 研究開始当初の背景

腹膜透析は在宅にて施行可能な透析療法であり、QOL改善や経済活動支援につながる。しかしながら、被嚢性腹膜硬化症(EPS)という腹膜透析特有の重篤な合併症があり、その普及を妨げている。その病態は明確でなく、予知マーカーや治療法が確立されていないため、患者は漠然と腹膜透析期間を最重要項目とした統計学的根拠に基づき、腹膜透析を中止している。EPS発症に重要な役割を果たしていると考えられている細胞の一つが腹膜中皮細胞である。腹膜中皮細胞は滑液を分泌することで、腹腔内臓器同士の摩擦を軽減している。また各種サイトカインを産生し、抗炎症や免疫調節を担っている。さらに病態の中心と考えられている腹膜表面のフィブリン層の形成予防に重要な役割を担っているとの報告もあるが、腹膜中皮細胞の役割は十分には判明していない。

2. 研究の目的

腹膜中皮細胞を再生し、EPSモデルに移植することが、EPSに効果的であるか検証する。この検証を通じてEPS病態の解明ならびに腹膜中皮細胞の役割を究明する。

3. 研究の方法

(1)再生腹膜中皮細胞

ラット腹膜中皮細胞、ヒト培養腹膜中皮細胞を含む様々な細胞腫を用いて、DNAアレイにより遺伝子を網羅的に検討した。腹膜中皮細胞に特異的である可能性のある遺伝子に着目した。この遺伝子に対する抗体を用いて細胞を標識し、分取した。

(2)EPSモデルマウスの作成

免疫不全マウスを用いて、被嚢性腹膜硬化症(EPS)モデルマウス作成を試みた。まず、既報(Washida N et al, NDT2011)で我々が報告したモデルの作成を試みた。しかし、クロールヘキシジン腹腔内投与によりマウスは短期間に死亡したため、EPSモデルマウスの作成は困難であった。次に、メチルグリオキサールを腹腔内投与することによりEPSモデルマウスを作成することとした。こちらのほうは計30匹のマウスを使用した結果、約1/3の9匹でEPSモデルを作成することに成功した。

(3)腹膜中皮細胞移植

分取した再生腹膜中皮細胞は、増殖力が弱く、モデルマウスに 1×10^5 個/回/日を5回ずつ連日移植した。9匹のモデルマウスのうち、4匹は腹膜炎を引き起こし評価困難であった。残り5匹において腹膜形態を比較検討した。

生理食塩水のみを腹腔内投与したコントロールと比べEPSモデル群(移植未施行群)の腹膜厚は有意に肥厚していた。しかしEPSモデル群と比べて、移植群の腹膜厚に有意差を認めなかった(図1)。

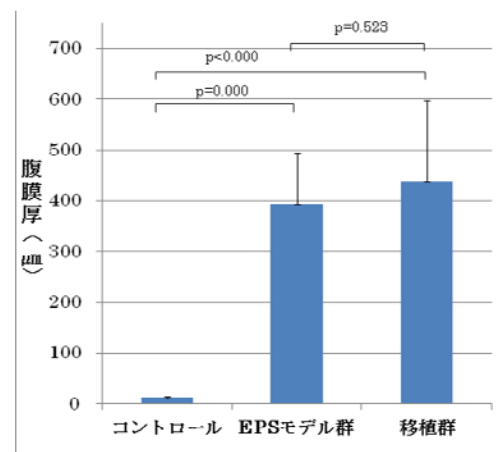


図 1

4. 研究成果

(1) 腹膜中皮細胞再生

再生させた細胞の形態は極めて腹膜中皮細胞に類似しており、腹膜中皮細胞を再生できた可能性がある。さらに腹膜中皮細胞特異的なマーカーを特定し、性質についても検討する予定である。

(2) EPS モデルマウスの作成

免疫不全マウスで EPS モデルを作成することとに成功した。しかしこのモデルにおいて細菌性と考えられる腹膜炎を高頻度に認めた。原因としてメチルグリオキサールを腹腔内投与する際に消化管を損傷することが考えられる。消化管を損傷せずに腹腔内投与するアクセスを作成した動物モデルの作成を今後予定している。

(3) 腹膜中皮細胞移植

この研究において現時点では再生させた腹膜中皮細胞移植が腹膜肥厚を改善させるという結果は得られなかった。

この原因について、まず再生した細胞の増殖力が弱く、十分な細胞数を獲得できなかったことがあげられる。腹膜中皮細胞特異的遺伝子の同定についてさらなる十分な検討を要する。

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 2 件)

1. Washida N, Wakino S, Tonozuka Y, Homma K, Tokuyama H, Hara Y, Hasegawa K, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Hayashi K, Itoh H, Rho-kinase inhibition ameliorates

peritoneal fibrosis and angiogenesis in a rat model of peritoneal sclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 査読有、26(9)巻、発行年 2011 年、ページ 2770-2779

2. 鷲田直輝、細谷幸司、脇野修、伊藤裕 持続的血糖測定装置の透析患者への応用の可能性 *臨床透析* 査読有、27(3)巻、発行年 2011 年、ページ 334-337,

[学会発表] (計 1 件)

1. 鷲田直輝、脇野修、細谷幸司、小松素明、田蒔昌憲、森本耕吉、井上秀二、林晃一、伊藤裕: 臨床的観点ならびに腹膜障害メカニズムから腹膜温存のためになすべきこと、第 17 回日本腹膜透析医学会総会ワークショップ4「腹膜劣化予防の決め手はこれだ!」、2011 年 9 月 25 日、大宮ソニックシティ(さいたま市)

[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〕

特記すべき事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷲田 直輝 (WASHIDA NAOKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40468492