

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21386

研究課題名(和文) HGF発現細胞シート移植での局所・持続的HGF投与による腎線維化抑制効果の検討

研究課題名(英文) inhibition effect of renal fibrosis with administration topically sustained HGF by HGF-expressing cell sheet transplantation

研究代表者

関谷 佐智子 (sekiya, sachiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：HGF発現細胞シートの腎表層移植による線維化抑制解析をするため、腎表層へHGF溶液投与後分布を解析した結果、間質および毛細血管経由での速やかな浸潤が観察され、またhHGF発現細胞シートの虚血再灌流腎表層移植により、24時間後の腎内部hHGF陽性細胞が確認された。HGF発現細胞シート移植はラットシクロスポリン腎症での腎機能および組織障害の改善効果は著しくなく、尿細管萎縮と筋繊維芽細胞が減少していた。したがって、HGF発現細胞シート移植での線維化持続的抑制効果が考えられたが、初期腎障害へのHGFによる効果が、線維化に影響する可能性もあり、持続的線維化抑制治療としての有用性検証が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Before examination of antifibrotic effect by HGF expressing cell-sheets transplantation, we analyzed the HGF protein distribution after administration of HGF containing solution on the kidney surface. Infiltrating-HGF via the interstitium or capillary vessels was observed inner renal tissue. Inner hHGF-positive cells was also observed in rat ischemic reperfusion injury kidney model 24 hours after HGF expressing cell-sheets transplantation. Although the treatment of transplanted HGF expressing cell-sheet showed unremarkable improving renal function and tissue disorder in rat cyclosporin nephropathy, tubular atrophy and myofibroblasts decreased. In this research, it was suggested that sustained inhibitory effect for fibrosis with HGF-expressing cell-sheet transplantation. However, there was also the effect of HGF on early renal disorder correlated to chronic fibrosis. Therefore, we have to verify an availability for antifibrotic effect of sustained HGF administration with cell-sheet.

研究分野：組織工学

キーワード：細胞シート HGF発現細胞 腎線維化

1. 研究開始当初の背景

1) 腎不全治療開発研究の背景：線維化が進行した末期腎不全治療としては、腎移植と透析治療が挙げられるが、腎移植は圧倒的ドナー不足が課題のため、本邦では透析治療患者が30万人を超え、世界的にも透析患者数が多い。しかしながら、透析治療は発展途上国では誰でもが受けられる治療法ではなく、腎不全治療の新しい選択肢となりうる新規治療法開発が望まれている。これまでに不全腎の治療法開発研究としてサイトカイン投与による腎機能維持、保護作用が検討され、EGF、HGF、BMPの投与による腎不全誘発時の尿細管の壊死抑制や腎線維化進行抑制による組織保護効果が報告されている (Humes DH. JCI 1989, Zeisberg M., Nature Med. 2003, Mizuno S., Kidney Int., 2001)。特に HGF は、VEGF による血管内皮細胞の増殖促進効果の増強 (Suplice E., Biol Cell. 2009) などの血管新生促進効果から、遺伝子治療薬として臨床応用が検討されている (Suda H., 2014 Expert review cardiovascular therapy)。一方で HGF は半減期が短く、蛋白質投与では一定時間毎の間欠的静脈内投与 (Mizuno S., Kidney Int. 2001) や、遺伝子導入による投与 (Gao X., Kidney int. 2002) が必要となり、疾患部位以外での副作用惹起の懸念は払拭できない。そのため、局所的・持続的な HGF の投与方法開発の必要性は以前より指摘されている。

2) 細胞シート研究の背景：重篤疾患に対し、細胞移植により不全部位の再生促進を狙う細胞移植治療研究が活発化し、近年では、組織工学的手法を用いた細胞からの組織再構築後の移植が治療効果を増大することが報告されている。このような組織工学技術の一つ、細胞シート工学は、温度応答性培養皿上で細胞を培養、細胞がコンフルエントとなった後、32°C以下の低温処理により、高密度の細胞集団をシート状に回収可能な技術である。細胞シート工学は角膜、心筋、食道上皮、歯周組織などの疾患治療へ応用され、治療成果を挙げている (Nshida K., 2004 NEJM., Sawa Y., 2012 Surg Today., Ohki T., 2012 Gastroenterology., Iwata T., 2013 JTERM)。このような細胞シート移植による治療効果は、細胞移植は高い生着率が起因しており、障害・欠損組織を再構築組織によって代替する効果と、細胞シート分泌因子により障害組織の再生を促す、パラクライン効果が挙げられる。従って、細胞シートは標的臓器への局所的、持続的治療因子の投与ツールともなりうる。

2. 研究の目的

HGF 蛋白を発現可能な細胞を用い細胞シートを作成、腎不全モデルへ移植することで不全腎へ HGF を局所・持続投与し、腎線維化抑制、及び組織保護効果を検証する。

3. 研究の方法

1) HGF 発現細胞シートの作製

遺伝子導入 HGF 発現細胞シート：ヒト中皮細胞由来細胞株 Met-5A 細胞への HGF 遺伝子を抗生物耐性遺伝子とともに導入を行い、抗生物質存在下で選択・HGF 遺伝子導入細胞のクローニングを行った。作製した HGF 発現細胞を用いて細胞シート作製した。細胞シートより合成される HGF 定量は培養液を回収し、培養液中 HGF 濃度を ELISA にて定量した。

HGF 発現能をもつ間葉系幹細胞シート：5 週齢雄の GFP 陽性 SD ラットの骨髄から間葉系幹細胞を初代培養し、継代後細胞シートを作製した。

2) ラット腎不全モデル作製：腎不全モデルとしては、一側尿管結紮腎不全モデル (Unilateral ureteric obstruction: UUO)、虚血再灌流障害モデル (Ishchemic reperfusion injury: IRI)、シクロスポリン腎症 (Cyclosporin A: CyA) モデル (減塩食 + CsA30mg/kg 連日皮下注射) 等を作製した。UUO 以外のモデルはモデル作製開始一週間前から片腎摘出を行い、残存腎での不全モデルを作製した。

3) 細胞シート移植：作製した HGF 発現細胞シートを各々のモデルにモデル作製時から投与を行った。作製した HGF 発現細胞シートを各々のモデルにモデル作製時から投与を行った。遺伝子導入細胞を移植する際、陰性コントロールとして HGF 遺伝子を導入する前の細胞を用いた細胞シートの移植を行った (図は GFP 陽性細胞シート移植直後の腎臓)。



4) HGF 発現細胞シートの腎表層部移植後の HGF 蛋白の腎分布：HGF 遺伝子導入細胞シート移植後を想定した腎表層部からの HGF 蛋白分布を解析した。腎被膜を一定面積剥離し、暴露した腎実質に FITC ラベルした HGF 蛋白を 5ug/kg で投与した。投与後、経時的に分布の変化を組織学的解析にて行い、分布速度の推測を行った。実際に HGF 遺伝子導入細胞シート移植後の組織についても抗 hHGF 抗体を用いて解析した。

5) 解析と評価：IRI、CyA モデルは血液を採取し、クレアチニン値を測定、腎機能を評価した。採取した腎臓については固定し、組織標

本を作製した。標本は HE や PAS 染色にて形態を確認、線維化はシリウスレッド染色もしくはマッソントリクロム染色を行うことで解析した。また血流評価は採取前に FITC-トマトレクチンを血中に灌流することで血流のある血管を標識、凍結切片として解析を行った。血管は RECA-1 抗体を用いて免疫抗体染色することで可視化した。

4. 研究成果

1) HGF 発現細胞シートと発現量

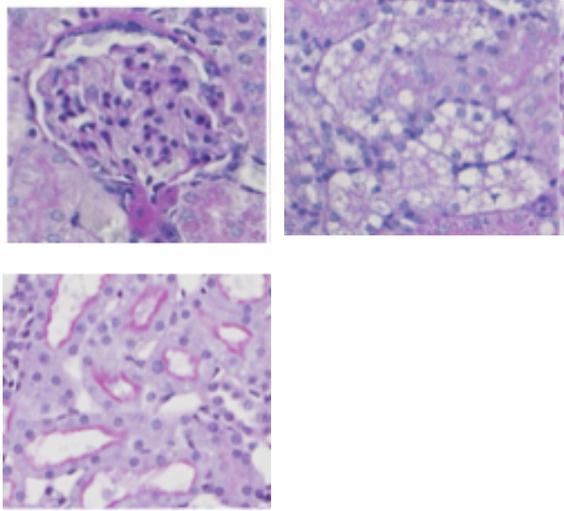
本研究で作製した hHGF 遺伝子導入細胞を用い、温度応答性培養皿にて細胞シートを作製した。この hHGF 遺伝子導入細胞シート一枚から分泌される hHGF 蛋白量/Day は、平均約 1.38ng/day 程度であった。以前作成されたものと比較するとおよそ 5 倍の発現量が得られた。一方で、rat 骨髄由来間葉系幹細胞を初代培養し、作製した細胞シートからの rHGF 発現量は 400 pg/day と推測された。

2) 腎表層からの投与 HGF 蛋白の腎臓内分布

健常腎表層部から FITC 標識 HGF 蛋白投与後の HGF 抗体を用いた組織免疫染色の結果、経時的に HGF 蛋白が浸潤することが確認され、表層部から HGF 陽性末端までの距離を組織内で計測した結果、約 20 μ m/分の速度で浸潤していた。一方、髄質近くまで浸潤している HGF 蛋白が観察されることから、浸潤経路としては、尿細管の間質間隙と表層部毛細血管から入る血管での内部浸潤が存在すると考えられ、髄質浸潤 HGF 蛋白は血管経由で浸潤したことが推測された。さらに 1ng/day にて HGF を発現可能な遺伝子導入細胞シートを IRI モデルへ移植した結果、24 時間後に腎皮質組織に hHGF 抗体陽性尿細管、糸球体内にてやや強めの hHGF 陽性細胞が観察された。正常腎、IRI24 時間後陰性コントロール、IRI24 時間後 HGF 移植群における HGF 受容体の発現を解析したところ、移植群での受容体発現亢進が確認され、細胞シートにより局所持続投与した HGF が受容体の発現に影響しているのではないかと考えられた。IRI24 時間後の HGF 蛋白局所・持続投与の効果として、摘出前に灌流した FITC トマトレクチン陽性血管にて解析したところ、陽性部位がより移植群において多く観察され、血流の向上が示唆された。一方で、腎機能であるクレアチニン値は陰性コントロールと比較して大きく変化しておらず、さらなる解析が必要であると考えられた。

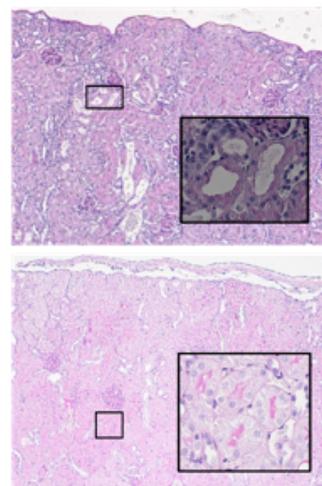
3) CyA モデルでの線維化抑制効果の比較検討
先行研究にて、HGF 発現細胞シートをモデル作製直後に移植した際、一週間後の線維化が抑制され、さらに3日後、5日後と移植日を変化させた結果、5日後では抑制効果が低減することが確認されたが、UUOやIRIではモデル作成後、腎臓周囲組織癒着があり、数日後の腎表面への移植に伴うアプローチが難しい。そこ

で、CyAモデルを選択作成した。作成CyAモデルには特徴的な輸入細動脈の硝子化、尿細管上皮細胞の空胞状変性、および皮質尿細管萎縮（下図参照、上左図PAS染色による輸入細動脈の硝子化、上右図尿細管上皮細胞の空胞状変性、および下図皮質尿細管萎縮）などが観



察されたが、4週後においても線維化は観察されなかった。このCyAモデルにHGF発現細胞シートを移植した結果、輸入細動脈の硝子化と空胞状変性、および血清クレアチニン値は改善しなかったが、シート非移植群では4週後に生じる尿細管萎縮が、移植群においては減少傾向であった（図参照）。

また、線維化の際増加する筋繊維芽細胞の出現頻度も移植群において低下する傾向が観察された。以上の結果より、HGF 蛋白発現細胞シート移植では腎線維化シグナルを持続的に抑制する効果が示唆された。一方で腎障害初期の腎障害にも HGF が影響を与えることも示唆されるため、慢性期障害や線維化に繋がる残存急性期障害の軽減効果も混在している結果であることが考えられた。今後、線



CyA 投与 3 週間での細胞シート非移植群 (上) と HGF 発現細胞シート移植群 (下) の PAS 染色腎組織像

(枠内を拡大して表示)

維化抑制治療としてのシート移植による持続的サイトカイン投与の有用性を検証することが必要だと考えられた。

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 1 件)

① 関谷佐智子 「組織工学(細胞シート工学)と腎疾患治療応用への可能性」腎と透析 73 893-896 2015 査読なし

[学会発表] (計 2 件)

① 関谷佐智子、宮部陽永、酒井克也、松本邦夫、清水達也「腎表面移植細胞シートからの徐放サイトカインの浸潤と治療効果の可能性」第 16 回日本再生医療学会総会(仙台国際センター：宮城県仙台市) 2017 年 3 月 8 日

② 関谷佐智子、岡雅俊、崎山亮一、新田孝作、清水達也 「ラット閉塞性腎症における HGF 産生細胞シートの線維化抑制効果の検討」第 15 回日本再生医療学会総会(大阪国際会議場：大阪府大阪市)2016 年 3 月 17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷佐智子 (SEKIYA, Sachiko)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：00398801

(4) 研究協力者

宮部陽永 (MIYABE Yoei)
今福礼 (Imafuku Aya)
崎山亮一 (SAKIYAMA Ryoichi)
松本邦夫 (MATSUMOTO Kunio)
酒井克也 (SAKAI Katsuya)