

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ~ 2009
 課題番号：19700408
 研究課題名(和文) HGF 遺伝子導入中皮細胞シートを用いた腹膜再生による腹膜線維症の改善
 研究課題名(英文) Improvement of peritoneal fibrosis by peritoneal regeneration using HGF genetic mesothelial cell sheets.
 研究代表者
 崎山 亮一 (SAKIYAMA RYOICHI)
 東京女子医科大学・医学部・助教
 研究者番号：30408471

研究成果の概要(和文)：

腎不全患者の腹膜傷害は、腹膜中皮細胞が非生理的な腹透透析液と接することで、中皮細胞の脱落が起因して生じると考えられている。よって、傷害を改善するアプローチとして、1. 中皮細胞シートによる補充、2. 肝細胞増殖因子(HGF)による再生効果を用いた。結果、腹膜傷害を本研究課題で開発した遺伝子導入細胞シートは、in vitroで遺伝子導入した細胞の移植効率をあげる手法であり、そのため移植後傷害部位での効果が非常に高いことを実証した。本手法が腹膜傷害に効果的である非常に重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：

Peritoneal fibrosis with denuded mesothelial cells due to a peritoneal dialysis therapy for chronic renal failure is one of the most serious complications. In this study, cell sheet engineering techniques and hepatocyte growth factor (HGF) as a strong repairing factor for damaged tissue were focused, and the transplantation of HGF transgenic cell injection and HGF transgenic cell sheets were evaluated using a mice model with damaged peritoneum.

The transplanted cell sheet survived at two weeks. The sheets was observed to cover the host tissue at one week and stay as mesothelial lining on the parietal peritoneum. The cause of this phenomenon was considered to be the enhancement of attachment and repair of the damaged peritoneum by the cell sheets and HGF.

These results indicate that the developed transgenic HGF mesothelial cell sheets can be applied for repairing damaged peritoneum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：腹膜線維症、HGF、細胞シート、遺伝子治療、再生医工学、腹膜透析

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全患者数の治療法の一つである腹膜透析 (PD) は在宅治療より血液透析 (週3回、1回4-5時間の間歇治療) に比べQOLの非常に高い治療法であるが導入患者は極めて低い (PD患者数は全透析患者数の約5%)。この原因の一つとして、長期PD患者の腹膜は、生体不適切な透析液に随時さらされるため、腹膜の劣化と線維化に起因する腹膜硬化症や被嚢性腹膜硬化症などの重度な病態にさらされることが考えられる。このため、すでに腹膜透析液の生体適合性への検討や腹膜硬化症の改善の研究が数多く報告されているが、根本的な治療にいたっていないのが現状である。そこで、脱落した中皮細胞において、細胞を単体で用いても、その機能は組織化した細胞に比べ明らかに低下することが問題であるため、高機能の長期間維持が可能な細胞の組織化として細胞シートに着目した。さらに、腹膜線維化において、線維化の解除と実質細胞の再生を強力に高める肝細胞増殖因子 (HGF)に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、腹膜傷害からの新規治療法を開発するため、HGFを遺伝子導入したヒト中皮細胞 (Human Mesothelial Cell: ヒト中皮細胞株を用いた細胞シート (HMCS+HGF)) を組織工学的手法により作製し、HMCS+HGFによる腹膜線維症の再生を腹膜傷害ヌードマウスで検証した。

3. 研究の方法

(1) HGF 徐放腹膜中皮細胞シートの開発

C-SR plasmide に human HGF cDNA を組み込み、SR を promoter として発現させる Human HGF 遺伝子プラスミドを作成した。リポフェクタミンを用いて、中皮細胞株に HGF 遺伝子を導入した。

温度感受性培養皿に HGF 遺伝子導入細胞を播種し、48時間後、低温処理を行うことで HMCS+HGF を作製した。

(2) 腹膜傷害ヌードマウス用いた HGF による線維化解除・再生機構の *in vivo* 評価
グルコン酸クロルヘキシジンヌードマウスの腹腔内に毎日7回投与することで腹膜傷害ヌードマウスを作製した。

腹膜傷害ヌードマウスの壁側腹膜に単離細胞や HMCS、HMCS+HGF を移植し、腹膜傷害の回復を観察した。

4. 研究成果

HGF 遺伝子を導入した細胞を用いて、細胞のみから構成される HGF 徐放中皮細胞シート (HMCS+HGF) の作成に成功した。この HGF の放出は、HGF 遺伝子無の細胞シート (HMCS) では HGF の放出が 0pg/ml であるのに対して、HMCS+HGF では約 240pg/ml であり、文献値のラット腹膜中皮細胞での 80pg/ml の約3倍を示した。よって、本手法は *in vitro* で安全に遺伝子導入した細胞を用いたシート作製が可能であることを示唆する重要な知見であり、遺伝子導入と組織工学を組み合わせた意義ある手法を得ることができた。

次に腹膜傷害ヌードマウスは、中皮の脱落と腹膜の肥厚を伴っていた。この腹膜傷害マウスに単離細胞、HMCS、HMCS+HGF を移植した。移植1週間後と2週間後で、単離細胞では腹膜の肥厚が軽減されなかったが、HMCSで腹膜の肥厚が軽減され、さらに HMCS+HGF により腹膜の肥厚が軽減された。また、移植後1週間では、移植した HMCS、HMCS+HGF は腹膜内に包埋されたが、腹膜表面に宿主中皮細胞の再生が確認された。この現象については現在検討中である。これらの結果より、腹膜傷害マウスの腹膜傷害の軽減において、HMCSで効果があり、さらに HMCS+HGF で効果があった。今回開発した遺伝子導入細胞シートは、*in vitro* で遺伝子導入した細胞の移植効率をあげる手法であり、そのため移植後傷害部位での効果が非常に高いことを実証した。本手法が腹膜傷害に効果的である非常に重要な知見を得た。

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3件)

崎山亮一、峰島三千男、ダイアライザ性能の経時変化、臨床透析、vol.26、427-432、2010、査読無

崎山亮一、峰島三千男、高性能ダイアライザにおける性能の経時変化、Clinical Engineering、vol.20、798-800、2009、査読無

Mineshima M, Ishimori I, Sakiyama R., Validity of internal filtration - enhanced hemodialysis as a new hemodiafiltration therapy, Blood Purif., 27, 33-37, 2009、査読有

〔学会発表〕(計 25 件)

崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、新田孝作、峰島三千男、HGF 徐放ヒト中皮細胞による腹膜傷害改善の効果、第 9 回日本再生医療学会、2010.3.19、広島

Ryoichi Sakiyama, Isamu Ishimori, Satoshi Yoshida, Michio Mineshima、Improvement of solute removal performance by internal filtration in a high-flux polysulfone membrane dialyzer. 30th Annual Dialysis Conference、2010.3.8、Seattle

崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、新田孝作、峰島三千男、単離細胞移植と細胞シート移植の傷害腹膜組織への影響、第 15 回日本腹膜透析研究会 2009.11.28、静岡

崎山 亮一、石森 勇、吉田 智史、峰島三千男、V 型ダイアライザ FX-S における内部濾過の影響、第 15 回日本 HDF 研究会、2009.11.21、徳島

崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、新田孝作、峰島三千男、肝細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子導入ヒト中皮細胞シートによる腹膜傷害修復の試み、第 47 回日本人工臓器学会、2009.11.13、新潟

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、培養皿表面での親水化処理を利用した(細胞シート工学)マニピレーション技術と腹膜再生への応用、日本化学工学会第 41 回秋季大会、2009.9.17、広島

Ryoichi Sakiyama, Hidekazu Sekine, Kazuho Honda, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Michio Mineshima、Evaluation of transplantation of tissue-engineered human mesothelial cell sheets in a mice model with the damaged peritoneum. TERMIS 2nd, World Congress、Seoul、

崎山亮一、石森勇、吉田智史、峰島三千男、ダイアライザ性能の経時変化とファウリング特性、第 54 回日本透析医学会、2009.6.6、横浜

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、ヒト中皮細胞シートの腹膜中皮細胞機能発現、第 8 回日本再

生医療学会、2009.3.5、東京

崎山亮一、石森 勇、吉田 智史、峰島三千男、V 型ダイアライザ PES150s の溶質除去特性に及ぼす内部濾過の影響、第 14 回日本 HDF 研究会、2009.2.14、名古屋

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、培養担体表面と細胞播種密度による細胞シートの組織化と機能発現への影響、第 46 回日本人工臓器学会、2008.11.26、東京

Ryoichi Sakiyama, Hidekazu Sekine, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Michio Mineshima、Function of the human mesothelial cell sheets using cell sheet-based tissue engineering for repair the damaged peritoneum.、ASN's 41st Annual Renal Week Meeting、2008.11.8、Philadelphia

崎山亮一、石森勇、峰島三千男、超音波ドブラー法を用いたダイアライザ内部濾過現象の推定、第 40 回日本化学工学会秋季大会、2008.9.26、仙台

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、ヒト中皮細胞シートの腹膜中皮細胞機能発現、第 14 回日本腹膜透析研究会、2008.9.13、札幌

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、腹膜透析における腹膜線維化の修復を目指した中皮細胞シートの可能性、第 53 回日本透析医学会、2008.6.18、神戸

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、腹膜線維化の修復を目指した中皮細胞シートの開発とその移植法の検討、第 7 回日本再生医療学会、2008年3月13日、名古屋

R. Sakiyama, H. Sekine, Y. Akiyama, M. Yamato, T. Okano, M. Mineshima、Possibility of human mesothelial cell sheets to repair the damaged peritoneum.、28th Annual Dialysis Conference、2008年3月2日、Orland

R. Sakiyama, H. Sekine, Y. Akiyama, J. Yang, M. Yamato, T. Okano, M. Mineshima、Development of tissue engineered human mesothelial cell sheets to regenerating the damaged peritoneum.Tissue Engineering International & Regenerative Me

dicine SocietyAsia-Pacific Chapter Meeting 2007、2007年12月5日、東京

東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30408471

崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、岡野光夫、峰島三千男、腹膜線維化からの修復を目指した中皮細胞シートの開発、第13回日本腹膜透析研究会、2007年11月25日、広島

R. Sakiyama, H. Sekine, Y. Akiyama, M. Yamato, T. Okano, Development of Human Mesothelial Cell Sheets to Regenerate the Damaged Peritoneum, Secretariat of 3rd Asian Chapter Meeting of ISPD2007、2007年11月23日、広島

21 崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、岡野光夫、峰島三千男、腹膜線維化の防止・改善を目指した中皮細胞シートの開発、第45回日本人工臓器学会、2007年10月29日、大阪

22 崎山亮一、関根秀一、秋山義勝、岡野光夫、峰島三千男、細胞シート工学を用いた再組織化における培養微小環境による組織体形成の制御、化学工学会第39回秋季大会、2007年9月13日、札幌

23 崎山亮一、石森勇、塚本真司、峰島三千男、内部濾過促進型ダイアライザAPS-15EXの性能評価、第13回日本HDF研究会、2007年9月8日、大分

24 崎山亮一、関根秀一、岡野光夫、峰島三千男、腹膜線維症改善のためのヒト中皮細胞株シートの開発、第52回日本透析医学会、2007年6月15日、大阪

25 R.Sakiyama, I. Ishimori, M. Mineshima, Effect of blood flow rate on internal filtration flow rate in a polysulfone membrane dialyzer, American society for artificial internal organs, 53rd annual conference、2007年6月8日、Chicago

〔図書〕(計 1件)

崎山 亮一、臨床工学講座 生体機能代行装置学(代謝)、医歯薬出版株式会社、2010 in press

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ce.twmu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎山 亮一 (SAKIYAMA RYOICHI)