

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 4 月 27 日現在

機関番号：32653
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22700477
 研究課題名（和文） 腹膜線維症改善を目指した HGF & BMP-7 遺伝子導入積層型中皮細胞シートの開発
 研究課題名（英文） Development of HGF and BMP-7 genetic stacking mesothelial cell sheets for improvement of peritoneal fibrosis.
 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）：

腹膜透析患者の腹膜傷害は、中皮細胞の脱落が起因し、腹膜の線維化が生じる。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）、3. 骨形成因子 7 (BMP-7) による再生効果としてシートの積層化を用いた。結果、HGF ならびに BMP-7 遺伝子導入中皮細胞シートの積層型細胞シートの開発に成功した。本手法は、線維化改善に期待される。

研究成果の概要（英文）：

Cell sheet engineering techniques as a cell therapy, hepatocyte growth factor (HGF) and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) as a strong repairing factor for damaged tissue were focused. We developed the HGF and BMP-7 genetic stacking mesothelial cell sheets using the HGF transgenic cell sheets and the BMP-7 transgenic cell sheets.

The developed genetic stacking cell sheets can be applied for repairing damaged by fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：人工臓器工学・再生医工学、腹膜線維症、HGF、BMP-7、積層型細胞シート、遺伝子治療、

1. 研究開始当初の背景

腹膜透析（PD）は、腹膜傷害による PD 中止が問題となっている。我々は腹膜傷害に対し、Tissue engineering 技術である細胞シート工

学と再生因子徐放技術を組み合わせることで細胞のみから構成される世界初の再生因子徐放細胞シート治療法を開発した。具体的に再生因子である HGF 遺伝子を導入したヒト中

皮細胞シート (HGF 中皮シート) を開発し腹膜傷害部位に移植した結果、シートの良好な接着と傷害の軽減が示された。そこで、本研究ではさらに強力な新規治療法の開発を目指して、線維化抑制因子である BMP-7 を用いた BMP-7 中皮シートを開発し、HGF 中皮シートと積層化させることで HGF&BMP-7 積層型中皮シート を開発し、腹膜傷害から回復効果を検討する。

2. 研究の目的

腹膜障害解除のため、以下の3点に着目した。1つ目は、腹膜線維化では、多くの線維化疾患に対して、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) と 骨形成因子 7 (BMP-7) である。次に脱落した中皮細胞では、実質細胞を疾患部位に到達させ、疾患の改善を目的とした細胞療法が近年注目されているが、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。よって2つ目に高機能の長期間維持が可能な 細胞の組織化 (細胞シート) と 3つ目に 強度&機能が向上する積層化 である。以上を達成できる組織デバイスの開発を行った。

3. 研究の方法

(1) BMP-7 徐放腹膜中皮細胞シートの開発

① C-SR α plasmide に human BMP-7 cDNA を組み込み、SR α をプロモータとして発現させる Human BMP-7 遺伝子プラスミドを作成した。
② リポフェクタミンを用いて、中皮細胞株に BMP-7 遺伝子を導入した。
③ 温度感受性培養皿に BMP-7 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+BMP-7 を作製した。

(2) HGF&BMP-7 積層型中皮シートの開発

① 温度感受性培養皿を用いて、HMCS+HGF を作製した。
② HMCS+HGF 上に HMCS+BMP-7 を上から重ねることで HGF&BMP-7 積層型中皮シートを作製した。

4. 研究成果

HGF ならびに BMP-7 遺伝子の GAPDH に対する発現量は、導入無しでは 0% に対して、HGF では $267.5 \pm 8.0\%$ 、BMP-7 では $7.9 \pm 0.2\%$ であり、 $P < 0.01$ であり、優位な遺伝子発現がみられた。その細胞と温度感受性培養皿を用いて培養を行い、温度を 37°C から 20°C に下げる操作のみで細胞のみが培養皿から剥離する手法を用いて、細胞のみから構成される HGF 徐放中皮細胞シート (HMCS+HGF) ならびに BMP-7 徐放中皮細胞シート (HMCS+BMP-7) の作成に成功した。HGF 遺伝子あるいは BMP-7 遺伝子無しの細胞シート (HMCS) の HGF ならびに BMP-7 の発現量は 0pg/ml であるのに対して、

HMCS+HGF では約 240pg/ml、HMCS+BMP-7 では約 80pg/ml であり、有意に高い放出量を示し、遺伝子の発現量を反映していた。さらに、温度感受性培養皿を用いて、HMCS+HGF に HMCS+BMP-7 を重ねた HGF&BMP-7 遺伝子導入積層型中皮細胞シート の作製に成功した。よって、本手法は in vitro で安全に目的の遺伝子を導入した細胞を用いてシート作製が可能であり、更に積層化させることで、強度が向上し、異なる遺伝子発現をもつ組織の構築ができ、線維化疾患の改善の強力なツールとなることが期待される。今後は線維化モデルにて、線維化解除を実証する予定である。

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 5 件)

① Ryoichi Sakiyama, Isamu Ishimori, Takashi Akiba, Michio Mineshima, Effect of blood flow rate on internal filtration in a high-flux dialyzer with polysulfone membrane, J Artif Organs, 2012, in press, 査読有

② 崎山亮一、石森勇、吉田智、秋葉隆、峰島三千男、ヘモダイヤフィルタ ABH-F の前希釈 HDF と後希釈 HDF における性能比較、医工学治療学会、vol. 24、20-27、2012、査読有

③ 崎山亮一、本田一穂、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、中皮細胞シートによる腹膜改善の試み、医工学治療学会、vol. 24、45-48、2012、査読無

④ 崎山亮一、山本健一郎、峰島三千男、血液浄化療法における化学工学の役割、化学工学会バイオ部会 News letter、vol. 28、9-12、2011 査読無

⑤ 崎山亮一、峰島三千男、血液透析膜の変遷と展望、人工臓器、vol. 39、77-80、2010、査読無

[学会発表] (計 20 件)

① 崎山亮一、本田一穂、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、腹膜再生を目指した中皮細胞シートの応用、日本医工学治療学会 第 28 回学術大会、2012. 3. 24、札幌

② 崎山亮一、吉田智史、石森勇、山本健一

郎、峰島三千男、HDF 操作条件におけるヘモ
ダイアフィルタの経時的な溶質除去特性、
化学工学会第 77 回年会、2012. 3. 16、東京

③ 崎山亮一、本田一穂、大和雅之、岡野光
夫、峰島三千男、中皮細胞シートによる傷害
腹膜の改善効果、第 49 回日本人工臓器学会
大会 2011. 11. 26、東京

④ 崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義
勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、腹膜
傷害における中皮細胞シートの再生効果、第
17 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会、
2011. 9. 25、大宮

⑤ 崎山亮一、石森勇、山本健一郎、峰島三
千男、血液透析ダイアライザ内で生じる内部
濾過への血流量の影響、
化学工学会第 42 回秋季大会、2011. 9. 15、名
古屋

⑥ 崎山亮一、石森勇、鈴木雄太、木全直樹、
秋葉隆、峰島三千男、バスキュラーアクセス
の評価・維持管理 II、第 13 回日本アクセス
研究会セミナー、2011. 7. 24、横浜

⑦ 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、ヒト中皮細胞シートによる傷害腹膜改
善の効果、
第 56 回 日本透析医学会学術集会・総会、
2011. 6. 17、横浜

⑧ 崎山亮一、本田一穂、大和雅之、岡野光
夫、峰島三千男、細胞シート工学による腹膜
再生、日本医工学治療学会 第 27 回学術大
会、2011. 4. 23、岡山

⑨ 崎山亮一、石森勇、山本健一郎、峰島三
千男、高性能ダイアライザ内で生じる内部濾
過現象の血流量依存性の検討、
化学工学会第 76 回年会、2011. 3. 16、東京

⑩ 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、中皮細胞シート
による腹膜傷害からの再生効果、第 10 回日
本再生医療学会、2011. 3. 2、東京

⑪ R. Sakiyama, H. Sekine, K Honda, Y.
Akiyama, M. Yamato, T. Okano, M. Mineshima,
Regeneration of Mesothelial Cell in the
Damaged Peritoneum by Tissue Engineered
Mesothelial Cell Sheet、31th Annual
Dialysis Conference、2011. 2. 21、Phoenix,
Arizona,

⑫ K Fukuda, R. Sakiyama, HM. Mineshima,
K Sakai, Hepatocyte Growth Factor Prevents
Solute Hyper Permeation of Mesothelial
Layer Induced by Methylglyoxal、31th
Annual Dialysis Conference、2011. 2. 21、
Phoenix, Arizona,

⑬ 崎山亮一、High flux dialyzer の牛血
系評価法の意義、第 3 回神戸 HDF 懇話会、
2011. 2. 5、神戸

⑭ 崎山亮一、石森勇、吉田智史、峰島三千
男、V 型ダイアライザにおける内部濾過流量
の血流量特性、第 16 回日本 HDF 研究会学術
集会・総会、2010. 11. 20、神戸

⑮ 崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義
勝、大和雅之、福田一弘、中村敏一、岡野光
夫、峰島三千男、細胞シート工学を用いた新
規遺伝子治療法の開発、第 48 回 日本人工臓
器学会大会、2010. 11. 19、仙台

⑯ 崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義
勝、大和雅之、岡野光夫、峰島三千男、腹膜
再生を目指した細胞シート工学の応用、第 16
回日本腹膜透析医学会学術集会・総会、2010
. 11. 6、静岡

⑰ 崎山亮一、石森勇、鈴木雄太、木全直樹、
秋葉隆、峰島三千男、クリットライン等を用
いたバスキュラーアクセス管理、第 14 回日本
アクセス研究会学術集会・総会、2010. 10. 30
、山梨

⑱ 崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義
勝、大和雅之、福田一弘、中村敏一、岡野光
夫、峰島三千男、細胞シート工学を用いた遺
伝子導入細胞の安全かつ高い移植効率の提
案と再生医療への応用、化学工学会第 42 回秋
季大会、2010. 9. 8、京都

⑲ 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
ト中皮細胞シートの傷害腹膜改善効果、第 55
回 日本透析医学会学術集会・総会、2010. 6.
18、神戸

⑳ 崎山亮一、本田一穂、関根秀一、秋山義
勝、岡野光夫、峰島三千男、細胞シート工学
を用いた腹膜傷害治療へのアプローチ、日本
医工学治療学会 第 26 回学術大会、2010. 4. 4
、東京

〔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)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30408471