

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25420839
 研究課題名(和文)細胞シート積層化技術を用いた3次元ヒト腹膜組織評価法の確立と新治療法開発への応用

 研究課題名(英文) Establish of a three-dimensional human peritoneal tissue evaluation method using the cell sheet lamination technology and its application to new treatment development

 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

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腎不全治療で用いられるPD液が生体に適しているかどうかを評価する手法の一つの開発です。細胞シートを生体外で積層化することで、3層から成る疑似腹膜組織の作製に成功しました。また、疑似腹膜組織は、単層では見られなかった血管の内腔構造が観察されました。一方、疑似腹膜組織の溶質透過係数は、単層組織に比べて、分子量4000では1/26.5、分子量10000では1/4.5、分子量70000では1/1.9となり、組織化することで溶質が通過しにくくなっていることが示され、生体に近い結果となりました。生体外で疑似腹膜組織を作成し、その評価法の開発に成功しました。

研究成果の概要(英文)：This study is one of the development of techniques to assess whether PD liquid used in renal failure treatment is suitable for the living body. By stacking the cell sheet in vitro, it was successful in the production of pseudo-peritoneal tissue composed of three layers. Further, the pseudo-peritoneal tissue lumen structure of a single layer was observed vessels were observed. On the other hand, the solute permeability coefficient of the pseudo-peritoneal tissue, compared to a single-layer structure, 1 / 26.5 in molecular weight of 4000, 1 / 4.5 in molecular weight of 10,000, 1 / 1.9 in molecular weight of 70000, the solute is less likely to pass by organizing It becomes and it is shown that, became a result close to a living body. To create a pseudo-peritoneal tissue in vitro, it has succeeded in the development of the evaluation method.

研究分野：Tissue engineering

キーワード：solute permeability peritoneal tissue cell sheets cell sheet lamination kidney failure

1. 研究開始当初の背景

腹膜透析 (PD) は、残腎機能が維持されやすく血液透析 (HD) に比べて PD 液だけであるので低コストであり、QOL の高い腎不全治療法であるが本邦の PD 患者は腎不全患者全体 304592 人の 3.2% にしかすぎない。世界的には、8.4% が PD 患者であり、メキシコや香港の半数以上が PD である。長期 PD 患者の腹膜は、生体不適合な PD 液に随時さらされるため、腹膜劣化に起因する線維化や腹膜硬化症などの重度な病態に陥り、腹膜機能の低下すなわち溶質透過亢進と除水不全が生じる。この溶質透過亢進には、血管内皮細胞層、基底膜層、間質層、中皮細胞層が関与し、それらの傷害により生ずる (図 1A)。このため、PD はある程度の期間 (5 年) を目安に中止し、HD に移行する。一方、腹膜平衡試験と呼ばれる検査方法は、腹腔内に指定された透析液を決められた量入れて、腹膜の溶質透過能と除水能を測定する方法がある。この方法は患者が 4 時間も測定で拘束されることや年 1 回の評価のため腹膜の状態の把握がとらえにくい。また腹膜の状態に対する *in vitro* での検査方法はなく、基礎研究においても小動物を用いた評価になってしまう。

腹膜の傷害に対する研究は国内外で盛んに行なわれている。主な原因は、PD 液に含まれるグルコースやグルコース分解産物により、PD 患者排液あるいは大網から採取した中皮細胞が線維芽細胞に形質転換する (epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)) ことと報告され (N. Engl. J. Med. 348, 403-413, 2003)、EMT の研究が盛んに行なわれている。また、透析液が腹腔内で攪拌することが刺激になり、*in vitro* でラット腹膜組織の傷害になることが報告された (B.B.R.C., 416, 391-396, 2011)。一方、*in vitro* で細胞を用いた研究として、ヒト中皮細胞や正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をトランスウェル上に播種して過酸化水素傷害を与え、細胞間接着の指標として膜間抵抗が傷害により低下することや蛍光色素デキストランにより透過係数の低下が示された (P.D.I., 29, 217-226, 2009)。他方、細胞の組織化において、細胞シート工学が東京女子医科大学の岡野により提唱され、細胞のみの組織が温度感受性培養皿 (37 で細胞が付着し、20 で細胞が剥離する) を用いて作製されている。

本研究では以下の 2 つのアプローチに着目した。生体腹膜を疑似した *in vitro* での腹膜機能 (透過) を評価できる腹膜モデル (中皮層、間質層、血管内皮層) を作製する必要がある。通常、数種の細胞を混ぜた状態、あるいは一層接着した上に細胞を播種しても細胞毎で分かれた層を形成することはできない。そこで 1 つ目は、*in vitro* で中皮層、間質層、血管内皮層の 3 層を別々に形成する技術として、細胞間接着を壊すこと無くほぼ無侵襲に細胞が剥離できる **細胞シート** であ

る。さらに 2 つ目として、別々に作製した細胞シートを生体に模倣して重ねる **積層化技術** である。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* で腹膜組織を構築するために、中皮層に中皮細胞シート、間質層に線維芽細胞シート、血管内皮層に内皮細胞シートを作製し、積層化させることで工学的な 3 次元腹膜組織を作製し、PD 液傷害に対する評価系を確立し、PD 患者の腹膜機能の指標や新規 PD 劣化治療法開発への応用を目指す。具体的には、1. 腹膜モデルを作成する。(ヒト中皮細胞シート (中皮細胞層)、ヒト線維芽細胞シート (間質層)、HUVEC シート (血管内皮層) を作製し、積層化させる) (*in vitro*) 2. PD 液中に存在する腹膜傷害因子による傷害と *in vitro* 腹膜機能評価法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト中皮細胞株 (Met) は M199+10% FBS 培地、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF) は FGM-2 (Ronza) 培地、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) は EGM-2 (Ronza) 培地にて培養を行なった。

(2) 細胞傷害評価

96well に Met、NHDF、HUVEC を 4.0×10^5 、 4.0×10^5 、 1.0×10^6 cells/mL で 2.0 mL 播種し 24 時間培養した。その後、酸性腹膜透析液から検出された傷害因子の一つであるグルコース分解産物の一種、メチルグリオキサール (MGO) を 0~3mM で添加し、MTT アッセイにて、ミトコンドリア活性を評価した。

(3) 細胞シート作成

35mm 温度感受性培養皿 (Cell sheds) に Met、NHDF、HUVEC の細胞懸濁液をそれぞれ 4.0×10^5 、 4.0×10^5 、 1.0×10^6 cells/mL で 2.0 mL 播種し、37 °C、5%CO₂ インキュベータで培養した。播種後、24 時間でコンフルエントを確認した。播種から 3 日目に、20 °C、5%CO₂ インキュベータに移して、自発的に細胞が培養皿から剥がれることで細胞シートを作成した。

(4) 積層化細胞シートの作成

ゼラチンを用いて、積層化シートを作成した。まず、8%ゼラチンを 37 °C に加温し、スタンプ作成器具に注ぎ、4 °C にて固化させ、ゼラチンスタンプを作成した。次に、温度感受性培養皿に播種したコンフルエントの細胞にゼラチンスタンプを載せて約 90g の重りをのせ、20 °C、5%CO₂ インキュベータで 1 時間静置することで、細胞は培養皿から剥がれてゼラチン側に転写された。中皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の順にスタンプして、積層化細胞シートを作成した。

(5) 溶質透過試験

トランスウェル (コーニング) に Met、NHDF、

HUVEC の細胞懸濁液を Transwell (Costar, MA) の Apical 側にそれぞれ 4.0×10^5 、 4.0×10^5 、 1.0×10^6 cells/mL で 0.5 mL 播種し、Basal 側に培養培地を 1.5 mL 加え 24 時間培養し 1 層の細胞層を構築した。FITC デキストラン (4、10、70 kDa) を 25 $\mu\text{g/mL}$ で Apical 側に 0.5 mL 添加し、溶質透過試験を行った。(Fig.1) 溶質透過の経時変化を比較するため、経時的に Apical 側から Basal 側へ移動したデキストランの量を、吸光度計で測定した。また、積層化した 3 層の細胞シートをスタンプにてトランスウェル上に移動させ、3 層の疑似腹膜層を構築し、同様の溶質透過実験を行なった。単層と 3 層それぞれの溶質拡散透過係数 k [m/s] を 1 式より算出した。

$$\ln [(Ca(t) - Cb(t)) / Ca(0)] = -4kA/3V \cdot t \quad \dots (1)$$

k : 溶質透過係数 [m/s], V : 体積 [m^3], A : 膜面積 [m^2], t : 時間 [s], C : 分子量マーカの濃度 [kg/m^3]

a: apical, b: basal, 0: 初期値

4. 研究成果

(1) 細胞傷害

MTT 活性は、傷害無し (0 μM) に比べて、MGO 0.5 μM 、1 μM で Met は 58%、58%、NHDF は 40%、95%、HUVEC は 0%、62% 低下した (Fig.1)。

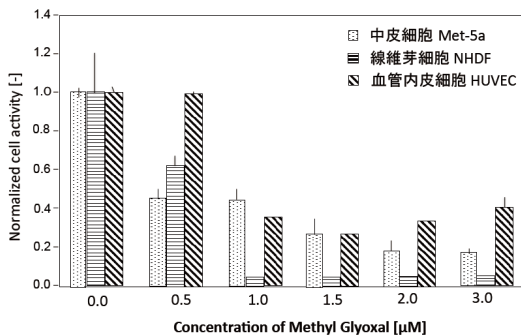


Fig.1 中皮細胞、線維化細胞、血管内皮細胞における MGO 傷害

(2) 溶質透過

単層の溶質透過係数の結果を Fig.2 に示した。現行の腹膜透析液に含まれる MGO 濃度は 0.11 μM 以下である。

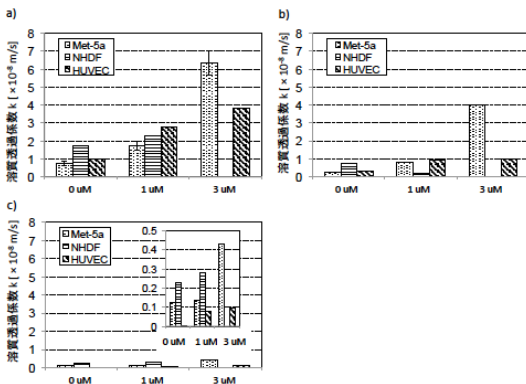


Fig.2 単層の溶質透過係数の比較。a) FITC デキストラン 4kD、b) 10kD、c) 70kD

今回の実験では約 10、30 倍の濃度を用いた。MGO 傷害により溶質の透過性は亢進した。デキストラン分子量の増大に伴い、透過係数は減少した。コントロール (0 μM) で比較すると、4kDa では NHDF > HUVEC > Met-5A、10kD では NHDF > HUVEC > Met-5A、70kD では NHDF > Met-5A > HUVEC と NHDF の溶質透過が高かった。次に、単層と 3 層の溶質透過係数を比較した結果を Fig.3 に示した。4kD は単層の 1/26.5、10kD は 1/4.5、4kD は 1/1.9 に低下した。単層よりも積層化することで組織が構築され、単層の横だけの接続だけでなく、上下の接続も構築されたことで溶質透過係数が積層化で低下した。

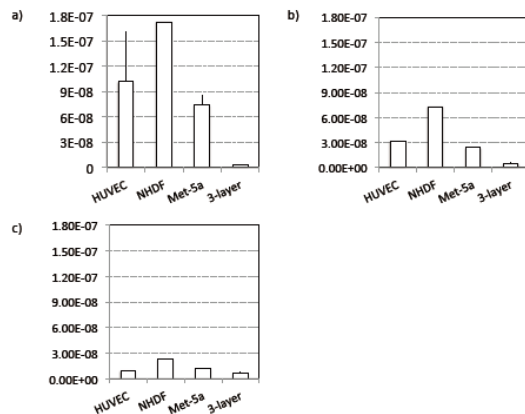


Fig.3 3 層の溶質透過係数と単層の比較。a) FITC デキストラン 4kD、b) 10kD、c) 70kD

(3) 積層化シートの構造

積層化シートの断面 HE を Fig.4 に示した。中皮細胞 (Fig.4a) と血管内皮細胞 (Fig.4c) ではシート作成時に生じる細胞の収縮により細胞が 2 から 3 層になっている部分が確認された。しかし、線維芽細胞 (Fig.4b) では単層にちかい状態であった。また、単層では観察できなかった管腔構造が、積層化では、積層化 1 時間で観察された。積層化することで、上下の接着、ならびに他の細胞からの刺激が生じることで、管腔構造の構築が早期に達成されたと考えた。

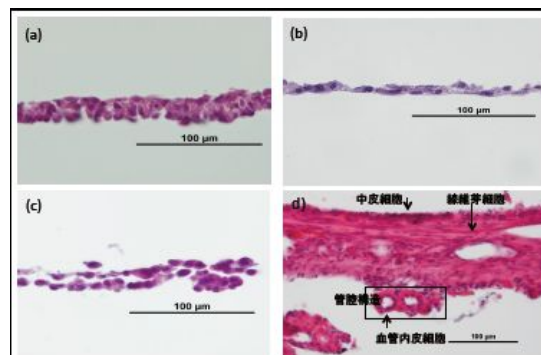


Fig.4 細胞シートの HE 観察。(a) 中皮細胞シート (b) 線維芽細胞シート (c) 血管内皮細胞シート (d) 中皮細胞-線維芽細胞-血管内皮細胞の 3 層の積層化シート

(4) まとめ

異なる細胞から成る 3 層の積層化細胞シート構築に成功した。また、腹膜透析時における腹膜の透過性を *in vitro* にて再現することにも成功し、溶質透過拡散係数を算出することで腹膜機能を *in vitro* で評価できる系の作成に成功した。この評価ツールを用いて、現存している腹膜透析液の比較評価を行うことで、より生体に優しい腹膜透析液の開発に貢献できれば、腹膜透析がさらに長期に使用可能な治療となり、腎不全患者の QOL 向上に役立つ。

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)

Takashi Kato, Ryoichi Sakiyama, Kiyomasa Oka, Toshikazu Nakamura. Identification of core active disaccharides in heparin for HGF-inducing activity. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. 査読有 6. 2015. 72-82.

Sakiyama R, Yamamoto K, Ishimori I, Yoshida S, Akiba T, Mineshima M. Performance evaluation of developed polysulfone membrane hemodiafilters, ABH-F and ABH-P, in post- and pre-dilution hemodiafiltration. J Artif Organs. 査読有 18. 2015. 330-337.

[学会発表](計 13 件)

Sakiyama Ryoichi, Kanako Fukuda, Shimizu Mutumi, Sakai Kiyotaka, Mineshima Michio. Effect of Hepatocyte Growth Factor for Prevention of Solute Hyper Permeation in Mesothelial Cell Layer Induced by Methylglyoxal. 34rd Annual Dialysis Conference. 2014年2月9日-11日. Atlanta, Georgia (USA).

崎山亮一, 福田佳那子, 清水 睦, 酒井清孝, 峰島三千男. 中皮細胞層モデルを用いた腹膜傷害因子による溶質透過性亢進における HGF の抑制効果. 化学工学会第 76 回年会. 2014年3月18日-20日. 岐阜県岐阜市.

崎山亮一, 福田佳那子, 清水睦, 酒井清孝, 峰島 三千男. 中皮細胞層モデルを用いた溶質透過性亢進における HGF の抑制効果. 日本医工学治療学会 第 30 回学術大会. 2014年3月21日-23日. 愛知県名古屋市.

大内奎, 崎山亮一, 山下明泰, 峰島三千男. *In vitro* 疑似腹膜モデル作製のための基礎検討., 化学工学会第 46 回秋季大会. 2014年9月17日-19日. 福岡県福岡市.

Sakiyama Ryoichi, Kenichiro Yamamoto, Isamu Ishimori, Kazuhiro Okano, Takashi Akiba, Mineshima Michio. Effects of internal filtration on solute removal efficiency in hemodialysis treatments with a super high flux membrane dialyzer. 35rd Annual Dialysis Conference. 2015年1月31日-2月3日. NEW ORLEANS, Louisiana (USA).

大内奎, 崎山亮一, 山下明泰, 峰島三千男. *In vitro* 腹膜モデルにおける溶質透過の検討., 化学工学会第 80 年会. 2015年3月19日から21日. 東京都江東区

崎山亮一, 清水聖也, 山下明泰, 峰島三千男. 細胞を用いた蛋白結合型尿毒素インドキシル硫酸の解離特性の基礎検討., 第 60 回日本透析医学会学術集会. 総会. 2015年6月26日から28日. 神奈川県横浜市

崎山亮一, 大内奎, 清水聖也, 山下明泰, 峰島三千男. 腹膜モデルの作製と腹膜傷害因子による溶質透過亢進の評価. 化学工学会第 47 回秋季大会. 2015年9月9日-9月11日. 北海道札幌市

崎山亮一, 山本健一郎, 石森勇, 岡野一祥, 秋葉隆, 峰島三千男. on line 前希釈 HDF 条件下における ABH-P 溶質除去能の経時変化. 第 21 回日本 HDF 研究会学術集会・総会. 2015年9月26日から27日. 熊本県熊本市.

崎山亮一, 清水聖也, 山下明泰, 峰島三千男. 蛋白結合性尿毒素インドキシル硫酸の細胞への影響と細胞による解離特性., 第 53 回日本人工臓器学会. 2015年11月19日-11月21日. 東京都文京区.

Sakiyama Ryoichi, Kenichiro Yamamoto, Isamu Ishimori, Kazuhiro Okano, Takashi Akiba, Mineshima Michio. Performance Evaluation of a Super High Flux Dialyzer with Highly Enhanced Internal Filtration. 36rd Annual Dialysis Conference. 2016年2月27日-3月1日. Seattle(USA).

崎山亮一, 大内奎, 山下明泰, 大和雅之, 峰島三千男. 腹膜傷害評価の試みと3次元腹膜組織モデルの作製. 第 14 回日本再生医療学会総会. 2016年03月17日-3月19日. 大阪市大阪府.

崎山亮一, 大内奎, 山下明泰, 大和雅之, 峰島三千男. *In vitro* 腹膜組織モデルを用いた溶質透過試験. 日本医工学治療学会第 32 回学術大会. 2016年03月19日-3月20日. 山梨県甲府市.

〔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〕

ホームページ等

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臨床工学科・助教
研究者番号：30408471

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：