

491.342
011
(110)

再生医療用における腎臓組織の新規構築培養法及び機能評価

(A Novel Construction Culture for Kidney Tissue and Evaluation
for its Function in terms of Regeneration Therapy)

(研究課題番号 15360434)

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B)) 研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 王 碧昭

筑波大学・大学院生命環境科学研究科科学研究科・教授

寄贈
王 碧昭 氏

06003674

目 次

1.	はしがき	3
2.	研究組織	5
3.	研究経費	5
4.	研究発表	6
	4. 1 学会誌（原著論文）	
	4. 2 口頭発表（学会発表等）	
	4. 3 出版物（著書）	
5.	研究成果	10
	5. 1 概要	
	5. 2 原著論文および主要な講演要旨の写し	

1. はしがき

本冊子は平成 15 年度～平成 17 年度にかけて行われた基盤研究（B）「再生医療における腎臓組織の新規構築培養法及び機能評価」の成果を取りまとめたものである。

Tissue Engineering 技術が開発されてから、細胞、細胞の足場となる ECM（細胞外マトリックス）、細胞増殖活性因子の相互的な作用により、通常の生体では起こりえない再生現象を作り出すことができた。しかし、生物の再生能力は動物種によっても、其々の組織によっても異なっている。皮膚、心筋シート等の展開が著しくするんでいるが、腎臓細胞のような再生能力の低い細胞から濾過機能を持つ糸球体組織の Tissue engineering 技術はまだ樹立されていない。本研究は、腎疾患患者の腎糸球体の修復と再生を目指し、特に、ネフローゼ症候群に糖尿病や Finnish 病の糸球体上皮細胞の極性消失により糸球体濾過機能の低下を著目し、in vitro の細胞培養系で上皮細胞の極性復元に重点を置いた。

糖尿病由来ネフローゼ症候群や Finnish 病の典型的な特徴は糸球体上皮細胞の足突起癒合(foot process fusion)により、細胞間の slit diaphragm が消失し、細胞極性が欠乏し、細胞の形態が扁平を呈する。本研究は、糸球体細胞の足場を著目し、I 型コラーゲン、I V 型コラーゲン、V 型コラーゲンを基材として、コラーゲン薄膜とガーゼゲル薄膜を設計した。また、上皮細胞だけの単独培養ではなく、薄膜の両側に、糸球体メサンギウム細胞、内皮細胞を植え付け、異なる細胞と上皮細胞の共培養方法を開発した。

培養細胞としては、市販のガン化株化細胞を使わず、ヒトの腎臓に一番近似的なふた腎臓を材料とし、メッシュシービン法（mesh sieving method）と細かいミンス（fine mince method）を併用して、腎糸球体のボウマン嚢上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞、足細胞を単離する培養技術を確認し、同技術を応用して、ラット、マウス腎糸球体細胞の単離培養にも成功した。

様々な条件下でコラーゲンゲルの作成を試みた、ゲルが厚すぎて、培地中に浮ばないため、ゲルの厚みを極小に薄めながら、ゲル周辺にガーゼを導入して、ゲルの強度を増強することに達成した。ガーゼの代わりに通常の防水性濾紙を導入したことも成功した。

糸球体構成細胞の単独作用は知られているが、お互いの相互作用はまだ明らかにされていない。上皮細胞は ECM を分泌に、内皮細胞は毛細血管の基底膜合成因子

を分泌に対して、メサンギウム細胞はメサンギウム基質と様々な成長因子を分泌する。本研究は、*in vivo* 系の通常形態である上皮細胞と内皮細胞共培養および通常形態ではない上皮細胞とメサンギウム細胞の共培養を行った。興味深いことは、基底膜の両側に通常形態では存在しない上皮細胞とメサンギウム細胞の共培養だけは、上皮細胞の極性を復元できた。その原因をさらに突き止めて、メサンギウム細胞が細胞足場の基質である **fibronectin** を増強分泌したことが明らかにした。その結果、上皮細胞がゲル薄膜に対する接着斑 (**focal contact**) が強化されて、細胞と細胞の相互作用により、上皮細胞の極性が形成された。

In vitro の研究を進みながら、研究分担者が *in vivo* の移植条件の探求を進んでいた。中空糸モジュールの中空糸内面にコンフルエントな上皮細胞を単層に生着させ、急性腎不全患者に用い、治療効果の促進を確認した。

しかし、上皮細胞だけでは、多臓器不全のネフローゼ症候群を治癒することにまだ不十分であるため、平成 17 年度から全腎臓を形成する原器—発生腎を取り上げて、研究対象とした。発生腎を *in vitro* で培養する条件、発生腎の尿管芽分枝および糸球体の複雑な血管形成を *in vitro* で構築するため、尿管芽分枝と血管形成を同時に司る因子を探求しながら、発生腎の **vasculogenesis** と **angiogenesis** の形成期間の差、発生腎のダイナミクス足場を探索した。その結果、**TGF- β** は有用な液性因子であり、E16-17 の発生期に開放系血管から閉鎖系血管に転換することが明らかにした。また、ダイナミクス足場の一つとして V 型コラーゲンは有力な候補者であることが分かった。本研究から得られた知見に基づき、今後はさらに全腎の構築を進んでいく。

2. 研究組織

研究代表者： 王 碧昭 (筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授)
研究分担者： 斉藤 明 (東海大学・総合医学研究所第3部門・教授)

3. 研究経費

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 15 年度	5,600,000	0	5,600,000
平成 16 年度	5,100,000	0	5,100,000
平成 17 年度	2,600,000	0	2,600,000
総 計	13,300,000	0	13,300,000

4. 研究発表

4. 1 学会誌 (原著論文)

- 1) 王 碧昭 “腎細胞再生のための共培養法” バイオサイエンスとインダストリー、vol.6, pp. 9-10, 2003
- 2) 王 碧昭 “腎糸球体細胞を再生するための共培養法の開発” バイオサイエンスとインダストリー、vol.61, pp. 29-30, 2003
- 3) T. Kakuta, Y. Suzuki, F. Tadaki, R. Tanaka, S. Tanaka, H. Sakai, K. Kurokawa, A. Saito “Long-term prognosis of parathyroid function for chronic dialysis patients after minimally invasive radioguided parathyroidectomy (MIRP)” Nephrol Dial Transplant vol.18 (Suppl.3): pp.iii71-iii75, 2003
- 4) S.Y. Kim, T. Kanamori, Y. Noumi, P.C.Wang, T. Shinbo “Preparation of Porous Poly(D,L-lactide) and Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Membranes by a Phase Inversion Process and Investigation of Their Morphological Changes as Cell Culture Scaffolds” J. Appl. Polymer Science, vol.92, pp.2-82-2092, 2004
- 5) 王 碧昭 “腎細胞培養と足場設計による腎組織の構築” 最近の化学工学—先端医療における化学工学—、vol. 56, pp.110-118, 2004
- 6) Akira Saito “Research into the Development of a Wearable Bioartificial Kidney with a Continuous Hemofilter and a Bioartificial Tube Device using Tubular Epithelial Cells” Artificial Organs, vol.28(1), pp. 58-63, 2004
- 7) A. Okamura, M. Itayagoshi, T. Hagiwara, M. Yamaguchi, T. Kanamori, T. Shinbo, P.C.Wang “Poly(N-isopropylacrylamide)-graft-polypropylene membranes containing adsorbed antibody for cell separation” Biomaterials, vol.26, pp. 1287-1292 (2005)

8) S. Nakamura, M. Terashima, N. Kikuchi, M. Kimura, T. Maehara, A. Saito and M. Sato "A New Mouse Model for Renal Lesions Produced by Intravenous Injection of Diphtheria Toxin A-Chain Expression Plasmid" BMC Nephrology, vol. 5(4), pp. 1-14, 2005

9) A. A. Lopes, J.M. Albert, E. W. Young, S.Satayathum, R. L. Pisoni, V. E.Andreucci, D. L. Mapes, N. a. Mason, S. Fukuhara, B. Wikstrom, A.Saito, F.K. Port "Screening for depression in hemodialysis patients: Assoications with diagnosis, treatment, and outcomes in the DOPPS" Kidney Int. vol. 66, pp.2047-2053, 2005

10) M. Yamaguchi, Y. Shinbo, T. Kanamori, P.C. Wang, M. Niwa, H. Kawakami, s. Nagaoka, K. Hirakawa, M. Kamiya "Surface modification of poly(L-lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology and cell growth" J. Artif Organs, vol. 7, pp.187-193, 2004

11) T. Kakuta, R. Tanaka, Y. satoh, Y. Isuhara, r. Inagi, M. Nangaku, A.Saito, T. Miyata "Pydridoxamine improves functional, structural, and biochemical alterations of peritoneal membranes in uremic peritoneal dialysis rats" Kidney Int. vol. 68, pp. 1326-1336, 2005

12) P. C. Wang, T. Takezawa "Reconstruction of renal glomerular tissue Using Collagen Vitrigel Scaffold" J. Bioscience Bioengineering, vol. 99, pp. 529-540, 2005

13) 王 碧昭 "腎糸球体細胞の培養と組織化" 医工学治療、vol. 17(4), 213-218, 2005

4. 2 口頭発表 [学会発表]

1) 王 碧昭、竹沢俊明 "In vitro 培養系における細胞接着分子の変動および腎糸球体足突起の形成" 平成 15 年日本生物工学会大会講演要旨集 p.93, 2003

- 2) 王 碧昭、村澤裕介 “高透過性コラーゲンをを用いた腎糸球体細胞の共培養と極性形成” 第36回日本化学工学会大会講演要旨集 p47, 2003
- 3) 王 碧昭 “極性をもつ腎糸球体上皮細胞の構築” 細胞外環境設計シンポジウム要旨集 p.15-16, 2003
- 4) P.C.Wang “Cell-cell interaction between renal glomerular epithelial and endothelial cells in a co-culture system of collagen-gel membrane” 43rd Annual meeting of the American Society for Cell Biology. P. 2877, 2003
- 5) 千葉英之、岩崎紘子、竹澤俊明、王 碧昭 “I V型コラーゲン薄膜を用いた腎細胞培養系の構築” 平成16年日本生物工学会大会講演要旨集 p.191, 2004
- 6) 村澤裕介、王 碧昭 “V型コラーゲンの組織化誘導ECMとしての役割” 平成16年日本生物工学会大会講演要旨集 p.191, 2004
- 7) 野谷拓也、竹澤俊明、王 碧昭 “コラーゲン薄膜を用いた腎構成細胞の共培養” 平成16年日本生物工学会大会講演要旨集 p.191, 2004
- 8) 秋津真志、候 旭濱、王 碧昭 “腎糸球体上皮細胞SGE1のドーム形成機構の解析” 平成16年日本生物工学会大会講演要旨集 p.192, 2004
- 9) T. Notani, P.C.Wang “Novel Methods of Isolation nad Culture of Glomerular Podocyte and Mesangila Cells” 6th Asia Pacific Chemical and Mechenical BioEngineering Symposium. p95-97, 2005
- 10) 王 碧昭 “腎糸球体細胞の培養組織化” 日本医工学治療大会第21回学術大会. p 35, 2005
- 11) 斉藤 明 “バイオ人工腎臓開発の現状と展望” 平成17年度日本生物工学会, p.41, 2005

12) 川崎泰央、小嶋聡一、王 碧昭 “後腎発生期の尿管芽分枝における TGF- β の役割” 平成 17 年度日本生物工学会, p.228, 2005

13) 王 碧昭、村澤裕介 “アダルト腎糸球体と発生尿管芽の協調培養によるネフロン再生への試み”平成 18 年日本化学工学会春季大会, p.102, 2006

14) 岡本 愛、王 碧昭 “発生腎糸球体における毛細血管の形成—Vasculogenesis と Angiogenesis” 筑波技術研究会、p.22, 2006

4. 3 出版物（著書）

王 碧昭 “腎糸球体細胞培養を用いた腎組織の構築”、 生体防御医学事典、朝倉書店 2006（印刷中）

5 研究成果

5. 1 概要

1) メッシュシービン法 (mesh sieving method) と細かいミンス (fine mince method) の併用により、腎糸球体のボウマン嚢上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞、足細胞を迅速に単離する培養技術を確立した。

2) コラーゲンゲル薄膜の作成により、腎糸球体構成細胞の共培養系を樹立した。上皮細胞とメサンギウム細胞の共培養系では、上皮細胞の極性を復元できた。メサンギウム細胞が細胞足場の基質である fibronectin の分泌を増強するため、上皮細胞がゲル薄膜に対する接着斑 (focal contact) が強化され、細胞と細胞の相互作用により、上皮細胞の極性が形成された。

3) In vitro の研究を進みながら、研究分担者が in vivo の移植条件の探求を進んでいた。中空糸モジュールの中空糸内面にコンフルエントな上皮細胞を単層に生着させ、急性腎不全患者に用い、治療効果の促進を確認した。

4) 今後の研究方向は発生腎を in vitro で培養する条件、発生腎の尿管芽分枝および糸球体の複雑な血管形成に着目すべきである。

5. 2 原著論文および主要な講演要旨の写し

本研究に関連し公表した 4. 1 原著論文 1) - 14) の写し、およびと本研究に関連する学会口頭発表 1) - 14) を以下に掲載する。