

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 25 年 4 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590883

研究課題名（和文）急性腎障害に対する脂肪由来肝細胞による治療および網羅的バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Therapeutic approaches of AKI by adipose-derived mesenchymal cells, and urinary biomarker search in AKI

研究代表者

古市 賢吾（FURUICHI KENGO）

金沢大学・大学病院・准教授

研究者番号：50432125

研究成果の概要（和文）：

ヒト検体を用いた、バイオマーカー検索に関しては、収集した急性腎障害症例の経時的な検体を質量分析計で検討し再現性の高いバイオマーカー候補分子を確認した。また、炎症関連物質の測定を行い、病態や予後と関連する因子を同定した。一方、脂肪由来間葉系細胞による検討では、細胞の多分化能と自己複製能を示した。また、尾静脈より投与した脂肪由来間葉系細胞は腎臓には生着しないものの、腎における抗炎症作用を持つことが示された。バイオマーカーに関しては、特許申請の準備中であり、脂肪由来間葉系細胞に関しては、論文として発表した。

研究成果の概要（英文）：

Several urinary biomarker candidates of acute kidney injury were detected by mass spectrometry. We also detected several urinary biomarker candidates of acute kidney injury by multiple cytokine/chemokine detection methods.

In this study, we explored the effects of adipose-derived mesenchymal cells on a mouse model of AKI. The effects of adipose-derived mesenchymal cells were evaluated in AKI mouse model. Although, administered adipose-derived mesenchymal cells were tend to home into lung, repeated administration of adipose-derived mesenchymal cells reduced acute tubular necrosis and interstitial macrophage infiltration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腎臓内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・急性腎障害

キーワード：バイオマーカー，虚血腎障害，脂肪由来間葉系細胞，質量分析計，IP-10，再生

1. 研究開始当初の背景

これまで急性腎不全として扱われていた腎機能障害は、集中治療室での重要な生命予

後規定因子である。一方、急性腎不全は生命を脅かす程でない軽微なものは、心不全，出

血あるいは脱水など種々の原因による循環不全、または薬剤（解熱鎮痛剤、造影剤や抗癌剤など）でも容易に引き起こされ、日常臨床でも頻繁に見られる病態である。最近、このような軽度の急性腎機能障害においても、長期の腎機能障害進展や、心血管イベントあるいは生命予後にも関与する事が報告されている（AJKD、2009、53、928-31）。このような観点から、軽微な腎障害も含めて、急性の腎機能障害を acute kidney injury (AKI, 急性腎障害) と総称し、注目を集めている。このような臨床的注目度に呼応して、国際的な重症度の基準となる AKI network 分類が広く用いられるようになり、その臨床的重要性が徐々に明らかになりつつある。

2. 研究の目的

研究の背景に示したような臨床的重要性に比し、この AKI の病態、診断および治療においては不明な点や不十分な点が多い。そこで我々は、AKI 症例の長期予後の改善を目的に、本研究では、

- (1) 腎障害、修復の程度あるいはその予後を的確に示す尿バイオマーカーの開発
- (2) 脂肪由来肝細胞を用いた細胞治療の開発を進める。

3. 研究の方法

腎障害、修復の程度あるいはその予後を的確に示すマーカーの開発に関しては、ヒト尿検体を用いた、臨床データの解析を主体とする。サイトカイン・ケモカインなど既存のマーカーにくわえて、網羅的タンパク解析に関しては、質量分析計などの機器を使用して、未知のタンパクも含め幅広く有用なマーカーの検索を行う。脂肪由来幹細胞を用いた治療に関しては、脂肪由来幹細胞の腎へのデリバリーシステムの開発から、具体的な急性腎

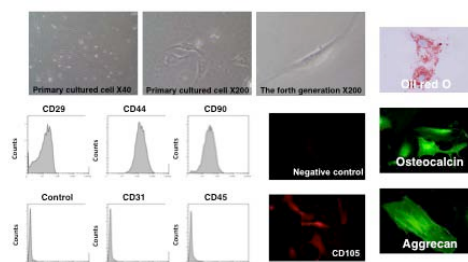
障害モデルでの修復・再生における治療効果確認の検討を行う。

4. 研究成果

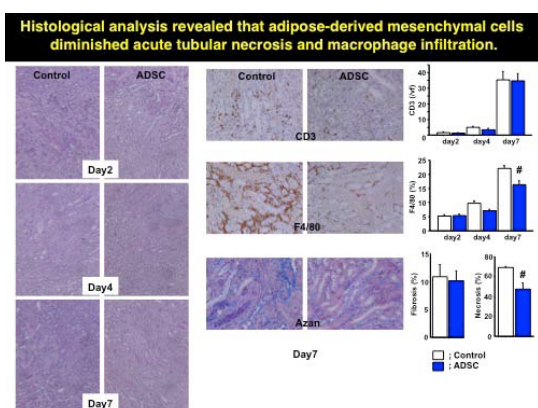
ヒト尿サンプルを使った尿バイオマーカーの検討に関しては検体収集も進め16例の経時的な尿検体、約200検体を収集できた。これら検体に対して、十数種類のケモカイン・サイトカインを中心とした炎症関連物質の測定を行った。経時的な変化と臨床情報との検討から、病態や予後と関連する因子が同定されており、その感度、特異度などから臨床的な有用性が期待される。現在特許申請の準備を行っている。また、得られた結果の validation のためのサンプル収集も順調に進んだ。さらに、質量分析計で検討した網羅的な検索では、再現性の高いバイオマーカー候補分子を確認した。

一方、動物実験におけるそれら因子の検証も進めた。虚血ストレス後の腎および培養尿細管上皮細胞からの遺伝子発現を網羅的に検討し、これまで臨床サンプルで候補に上がった因子、あるいはその関連因子の発現について検討を行った。この基礎的検討からは、虚血障害に関連した既知及び未知の分子が vivo および vitro の両面から抽出された。既知の分子の一部に関しては、これまで挙げてきた候補因子との関連が明らかになった。未知の因子に関しては、今後の検討における候補分子として、今後とも検討を続ける事とする。

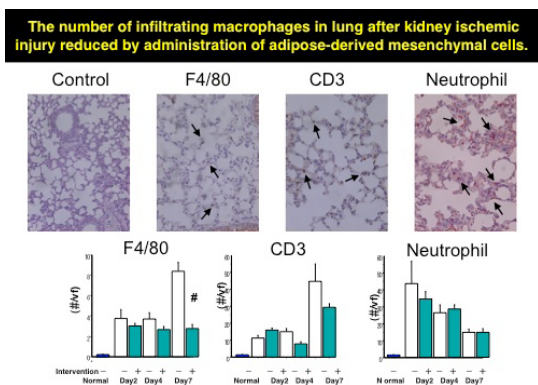
Adipose-derived mesenchymal cells had reproductive and multi-lineage differentiating potentials.



脂肪由来間葉系細胞に関しては、初代培養細胞は紡錘形を呈しており、皮下あるいは腹腔といった由来の違いによる形態の差はなかった。また、初代培養細胞から少なくとも第4世代の継代培養細胞まで同様の細胞表面マーカーの発現を認めた。脂肪、骨細胞及び軟骨細胞への分化能が有り、自己複製能および多分化能を持つ事が示された。尾静脈より投与した脂肪由来間葉系細胞は腎臓には生着しないものの、腎における抗炎症作用を持つことが示された。



また、マウス虚血性腎障害モデルにおいて腎のみならず、肺においても炎症細胞浸潤が確認された。



これらの成果は、論文化し受理された。

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 8 件)

1. Furuichi K, Kokubo S, Hara A, Imamura R, Wang Q, Kitajima S, Toyama T, Okumura T, Matsushima K, Suda T, Mukaida N, Kaneko S, Wada T. Fas Ligand Has a Greater Impact than TNF- α on Apoptosis and Inflammation in Ischemic Acute Kidney Injury. *Nephron Extra.* 2012 Jan;2(1):27-38. doi: 10.1159/000335533. Epub 2012 Feb 3. 【査読有】
2. Furuichi K, Shintani H, Sakai Y, Ochiya T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Oct;16(5):679-89. doi: 10.1007/s10157-012-0614-6. Epub 2012 Mar 8. 【査読有】
3. Ito M, Sugihara K, Asaka T, Toyama T, Yoshihara T, Furuichi K, Wada T, Asano M. Glycoprotein hyposialylation gives rise to a nephrotic-like syndrome that is prevented by sialic acid administration in GNE V572L point-mutant mice. *PLoS One.* 2012;7(1):e29873. doi: 10.1371/journal.pone.0029873. Epub 2012 Jan 13. 【査読有】
4. Iwata Y, Furuichi K, Kaneko S, Wada T. The role of cytokine in the lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:594809. doi: 10.1155/2011/594809. Epub 2011 Oct 18. Review. 【査読有】
5. Kokubo S, Sakai N, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Activation of p38

mitogen-activated protein kinase promotes peritoneal fibrosis by regulating fibrocytes. *Perit Dial Int.* 2012 Jan-Feb;32(1):10-9. doi: 10.3747/pdi.2010.00200. Epub 2011 Jun 30. 【査読有】

6. Furuichi K, Hisada Y, Shimizu M, Okumura T, Kitagawa K, Yoshimoto K, Iwata Y, Yokoyama H, Kaneko S, Wada T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic. *Nephrol Dial Transplant* 0, 1-8, 2011 【査読有】
7. Shimizu K, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Matsushima K, Mukaida N, Kaneko S, Wada T. Fractalkine and its receptor, CX3CR1, promote hypertensive interstitial fibrosis in the kidney. *Hypertens Res* 34, 747-752, 2011 【査読有】
8. 古市賢吾, 和田隆志, AKI と CKD—2 つの疾患の密接な関連, *内科* 2012, 110, 350-356. 【査読無】

[学会発表] (計 2 件)

1. Kengo Furuichi, Yasuyuki Shinozaki, Shuichi Kaneko, Takashi Wada, Effects of adipose-Derived Mesenchymal Cells on Ischemia-Reperfusion Injury in Kidney. 米国腎臓学会, 2011. 11. 12, ペンシルバニアコンベンションセンター (アメリカ、フィラデルフィア)
2. 古市賢吾, 和田隆志, 腎虚血障害に対する抗サイトカイン、ケモカイン療法, 日本炎症・再生医学会, 平成 22 年 8 月

6 日, 京王プラザホテル (東京)

[図書] (計 1 件)

1. 古市賢吾・和田隆志(編集), 南江堂, AKI のすべて, 2012, 総ページ数 210

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI KENGO)
金沢大学・大学病院・准教授
研究者番号: 50432125

(2) 研究分担者

和田 隆志 (WADA TAKASHI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 40334784