

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4358621号  
(P4358621)

(45) 発行日 平成21年11月4日(2009.11.4)

(24) 登録日 平成21年8月14日(2009.8.14)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>A 6 1 L 27/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 L 27/00	Z
<b>A 6 1 K 35/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 35/12	

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-518592 (P2003-518592)	(73) 特許権者	599029420 田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
(86) (22) 出願日	平成14年8月6日(2002.8.6)	(73) 特許権者	501315197 小川 修 京都府京都市左京区下鴨水口町42-5
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/007995	(73) 特許権者	000124269 科研製薬株式会社 東京都文京区本駒込2丁目28番8号
(87) 国際公開番号	W02003/013588	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(87) 国際公開日	平成15年2月20日(2003.2.20)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
審査請求日	平成17年6月21日(2005.6.21)	(72) 発明者	田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3丁目8番16号 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2001-240491 (P2001-240491)		
(32) 優先日	平成13年8月8日(2001.8.8)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 細胞と細胞増殖因子とからなる腎臓の再生のための材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

未分化間葉系幹細胞、含水率が95%である架橋ゼラチンにより徐放化されているbFGF、及びコラーゲンを含むインビポでの系球体組織の再生及び尿細管の新生を伴う腎臓の再生のための材料。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせることを特徴とする腎臓のインビポでの再生のための材料に関する。

背景技術

人工臓器を用いた再建医療は、現在、臨床に大きく貢献しているものの、効果が一時的で、侵襲が大きく、補助できる機能が単一であるという大きな欠点がある。一方、移植医療もドナー不足に加えて、移植後の免疫抑制剤の副作用による感染症や発癌なども問題であり、理想的な治療とはいいがたい。このように現在の先端医療の二本柱がそれぞれに限界に達してきている。このような状況の中で、自己の組織を再生させることによって欠損あるいは荒廃した組織や臓器を復元するという、新しい治療の試みが行われている。これが再生医学である。すなわち、細胞を利用することによって、人為的に自己の組織や臓器を再び健全なものにしようという試みである。

ヒトを含む哺乳動物においては、高次に分化した臓器の再生能力は消失していると考えられてきた。しかしながら、近年、これらの動物でも再生能力を有するのではないかと考え

られるようになっている。つまり、哺乳動物では個体を守るための創傷治癒があまりにも早く進行する結果、臓器再生の場が奪われ、本来もっている再生能力が見失われている。例えば、骨髄移植は古くから行われている治療法でありよい臨床成績をあげている。これは骨髄細胞中の血液幹細胞が増殖分化できる天与の場、骨髄組織が体内に存在しているからこそ成功していると考えられる。つまり、ヒトといえども、個体が生存していくためには、組織、臓器に幹細胞が存在しなければ生存しえないはずであり、生体内に広く存在するであろう幹細胞に対して十分な再生の場を与えることができれば、自己組織を再生させることができる可能性がある。近年、神経系や肝臓などにも幹細胞の存在することがわかってきている。

そこで、このような考えのもとに、いろいろな組織再生の方法が研究開発されているが、現在のところ、再生のための足場、細胞増殖因子、および幹細胞の3者を組み合わせて利用する方法が最も現実的である。

再生場所における幹細胞や前駆細胞の接着・分化・形態形成の促進のためには再生のための足場が必要である。再生場所の生体組織が再生の足場となり得る場合もあるが、再生のための足場として足場マトリックスが必要となる場合もある。生体吸収性材料はこのマトリックスとして用いられている。

しかしながら、例えば、再生場所に足場マトリックスを埋め込んでも、再生に必要な幹細胞、前駆細胞、あるいは芽細胞の数が少なかったり、細胞を増殖分化させる生体因子の濃度が低すぎたりすれば、いかにマトリックスが優れていても、望む組織の再生は起こらない。そこで、補充するべきものとしてまず考えられるのは、細胞の増殖あるいは分化のための細胞増殖因子である。

一般に、これらの因子の生体内寿命は短く不安定であり、必要な細胞増殖因子を、単に水に溶かして必要部位に注入するだけでは、期待する組織再生効果は得られない。そこで、再生の場における細胞増殖因子の濃度を必要な期間にわたって有効値に保たなければならない。例えば、細胞増殖因子を徐放キャリア内に含ませ、再生の場で持続的に放出させる技術である。細胞増殖因子の徐放により、細胞の増殖分化が高まり、自己組織の再生が促される。しかしながら、組織あるいは器官の種類によっては、細胞増殖因子のみでは再生が不十分である場合が多い。

腎臓は、血液濾過臓器であり、尿の形で身体の物質代謝の最終産物を排泄し、細胞外液中の水素、ナトリウム、カリウム、リンその他のイオン濃度を調節する。排泄と再吸収機構のバランスによって、水分、電解質、体液浸透圧、酸塩基平衡の調節などの機能を有する。腎臓の機能が不全になると、血圧が上昇し、尿素、クレアチンなどの窒素代謝物が血中に貯留し、生体廃棄物の血中濃度が有害な濃度にまで増加する。このような病理を解消するためには、不全の腎臓の機能を置き換える処置が必要になる。

血液透析は、腎臓機能不全状態にある血液を清浄化、そして濾過する処置である。当該処置によって、有害廃棄物等の濃度が減少する。しかし、この処置は、週に3回、1回2～4時間もかかるうえに、副作用及び合併症の危険があるという問題点がある。

腎移植は、ドナーからの健康な腎臓を腎不全に苦しむ個体内に植え付ける処置である。しかし、一生に渡る免疫抑制剤の投与を必要とし、その結果生ずる感染性、癌化などの副作用が問題となっている。また、移植を必要とする全ての個体に十分な量のドナーがないという問題点もある。

腎臓それ自体の移植ではなく、腎臓細胞の移植も報告されている(Pediatrics, 1996, 985, 615)。それによると、C57ブラックマウスの腎臓細胞を培養し、ポリカーボネート製チューブに封入後、無胸腺マウスの皮下に移植したところ、8週間後までの観察において、血管新生、糸球体及び尿細管様構造が認められた。尿細管様構造部位にはアルカリホスファターゼ及びフィブロネクチンが認められ、分泌された黄色の液体から尿酸が検出された。

また、別の報告によると、ニュージーランド白ウサギの腎臓細胞を遠位尿細管、糸球体、近位尿細管に分画し、それぞれをポリ乳酸-ポリグリコール酸シート上で培養し、無胸腺マウスの皮下に移植したところ、ネフロン形成が認められた(J. Urol, 1995

10

20

30

40

50

, 153 (suppl.), 4)。

WO98/09582は、上記技術を応用した人工腎臓を開示する。しかし、この人工腎臓は、ハイブリッド型人工腎臓、すなわち腎臓を摘出し、その細胞を培養した後に臓器様に再構築したものである。このような分化細胞は、その寿命に限りがあり、また腎臓細胞としての機能維持が困難であることから、人工腎臓の耐久性・信頼性に問題がある。また、異種動物からのような非自己の細胞を用いる場合においては、常に、免疫拒絶の問題がつきまとう。

組織器官の再生をインビボで行うためには、その組織あるいは器官を構成している細胞が必要であることは疑いない。しかしながら、単に細胞を再生させたい部位に注入するだけで、その場所に組織や器官を再生させることはきわめて難しい。その理由は加えられた細胞がその部位で増殖、分化することがほとんど期待できないからである。生体内で細胞の増殖および分化を積極的に促進させるためには細胞増殖因子の存在が不可欠である。すでに、多くのインビトロ実験によって、未分化間葉系幹細胞、前駆細胞、あるいは芽細胞が適当な細胞増殖因子の存在下でその数を増やし、分化していくことが証明されている。しかし、インビトロとインビボでは細胞の環境が全く異なっており、インビトロでの結果をインビボにおいて再現、予測するのは困難である場合が多い。

本発明者らはインビボにおける細胞の増殖分化に関する上記の問題点を解決するために鋭意検討した結果、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせることで、インビボにおける腎臓の再生が極めて有利となることを見出し、本発明を完成した。

発明の開示

したがって、本発明は、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせることで、腎臓をインビボで再生させるための材料を供給する。

また、本発明は、上記材料を用いることを含む、腎臓の再生方法にも関する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の技術的構成を説明する。

本発明で使用される細胞は、未分化間葉系幹細胞である。この細胞は、動物、ヒトから採取することにより、又はその採取細胞を培養系にて数を増やしたりすることができる。

本発明に用いる未分化間葉系幹細胞、その細胞増殖因子との混合、およびそれらの組織工學材料を用いた腎臓組織の再生は以下の方法によって行うことができる。

細胞単離法に若干の修飾点を加えることも可能であるが、それらは大きく細胞の分化性質に寄与するところはない。未分化間葉系幹細胞の採取法は常法によって行うことができる。例えば、大腿骨、頸骨等の骨髓から骨髓液を採取し、これをピペティング等によって細胞を分散させ、MEM等の適切な培地又は塩類溶液に懸濁し、骨髓細胞懸濁液を調製する。この細胞を37℃、5%炭酸ガスの条件下、インキュベーターにて、例えば、7～10日間培養し、その後接着細胞を、例えば、0.05%トリプシンを用いて剥離し、回収する。

得られた未分化間葉系幹細胞を37℃、5%炭酸ガスの条件下、インキュベーターにて培養し、細胞を増殖・継代することもできる。この細胞を培養液に分散させ、その中に適当な濃度の細胞増殖因子を混合する。得られた複合体を、例えば、SDラットの腎臓欠損に埋入する。36週間後、埋入部位に腎臓組織の再生が見られる。

採取する細胞は、未分化間葉系幹細胞であれば、採取する動物の種類、年齢、およびその部位に関係なく、いずれの組織も本発明に用いることができる。一般に、免疫拒絶は細胞成分に対する生体反応である。この免疫拒絶を回避する方法として、例えば、自己の組織から採取された未分化間葉系幹細胞を用いる方法がある。これによれば免疫反応の問題は解決することができると考えられる。すなわち、本発明においては、自己の細胞成分を利用することによって、自己の腎臓組織を再生することもできる。

本発明に用いる細胞増殖因子としては、特に限定されるものではないが、未分化間葉系幹細胞の数を増加させる作用をもつものが好ましい。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子(IGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、グリア誘導神経栄養因子(GDNF)、神経栄養因

10

20

30

40

50

子 (NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子 (BMP)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) などが挙げられる。これらのうち、本発明では、特に、bFGFが望ましい。その濃度は、細胞数  $10^5 \sim 10^8$  個当り  $0.0001 \sim 10 \mu\text{g}$ 、好ましくは  $0.001 \sim 1 \mu\text{g}$  である。

本発明に使用されるこれらの細胞増殖因子は、好ましくは適切な徐放用担体に含有させた状態で細胞と混合して用いる。適切な徐放用担体に含有させた状態で使用する場合には、その徐放期間は約 1 から 3 週間の範囲がよい。

細胞増殖因子の徐放用担体としては、生体内で分解吸収されていく性質をもつものが好ましい。例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ-  
-カプロラクトン、  
-カプロラクトンと乳酸あるいはグリコール酸との共重合体、ポリクエン酸、ポリリンゴ酸、ポリ-  
-シアノアクリレート、ポリ-  
-ヒドロキシ酪酸、ポリトリメチレンオキサレート、ポリテトラメチレンオキサレート、ポリオルソエステル、ポリオルソカーボネート、ポリエチレンカーボネート、ポリプロピレンカーボネート、ポリ-  
-ベンジル-L-グルタメート、ポリ-  
-メチル-L-グルタメート、ポリ-L-アラニンなどの合成高分子、デンプン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、ペクチン酸およびその誘導体などの多糖、あるいはゼラチン、コラーゲン (コラーゲンのタイプおよびその抽出法はいずれでもよい)、アルブミン、フィブリンなどのタンパク質などが挙げられる。これらの材料から細胞増殖因子の徐放用担体を作製できるが、その形態としては、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびペースト状などがあるが、これらに限定されるものではない。例えば、その中で基底膜成分との均一な混合を目的とする場合には、粒子状の担体が好ましい。また、粒子の直径は  $10 \sim 500 \mu\text{m}$ 、好ましくは  $20 \sim 100 \mu\text{m}$  である。

徐放性の調節は、徐放用担体の分解性を調節することにより行なうことができる。分解性の調節は、例えば、担体作製時における架橋度を変えることにより行なうことができる。徐放期間を 1 ~ 3 週間とするには、例えば、担体作製時の架橋剤濃度あるいは反応時間を調節し、含水率を  $98 \sim 94\%$  として、1 ~ 3 週間で分解吸収される徐放用担体を作製すればよい。

細胞と細胞増殖因子とからなる組織工学材料の作製条件は、特に限定されるものではないが、例えば、両者を単に混合するだけでもよく、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、あるいはコラーゲン溶液などの液体とともに混合してもよい。用いる細胞の数として  $10$  万 ~  $500$  万個が望ましい。さらに、細胞と細胞増殖因子との混合物を生体吸収性材料からなるスポンジ、メッシュ、不織布状成形物などの足場材料内へ注入、あるいはそれらの足場材料と混ぜ合わせた状態で用いることもできる。

この際に用いる足場材料としては生体吸収性であることが必須であると考えられ、非吸収性の場合には組織の再生を物理的に邪魔するので好ましくない。足場材料の分解吸収性は、組織の再生の邪魔にならないように適当なものを選択して用いる必要がある。足場材料が合成高分子の場合にはその分子量、化学組成により、天然高分子の場合には架橋の程度によりそれらの吸収性はコントロールできる。これらの方法については、公知の方法を用いることができる。

本発明にて用いられる細胞、細胞増殖因子の注入、混合のために用いられる足場材料としては、生体内で分解吸収されていく性質をもつことが必須であり、例えば、好ましくは上述の細胞増殖因子の徐放用担体に用いられる材料を利用できる。足場材料と徐放性担体は同一の材料を用いてもよいし、異なるものを用いてもよい。その形態としては、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびペースト状などがあるが、これらに限定されるものではない。

本発明の細胞と細胞増殖因子との混合物あるいはその足場材料との混合複合物は、皮膚を切開して埋入あるいは注射により注入することで体内へ投入できる。

#### 実施例

以下、実施例をあげて本発明について説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

10

20

30

40

50

### 実施例 1 足場の調製

140 で2時間の熱処理の後、0.2wt%のグルタルアルデヒド水溶液中で化学架橋を行った後、グリシン水溶液中にて未反応のアルデヒド基をブロックした。その後水洗いを行い凍結乾燥することによって得たコラーゲンスポンジを直径約5mm、厚さ3mmの円筒形に打ち抜いた。滅菌したポアサイズ200 $\mu$ mのポリプロピレンのメッシュでコラーゲンスポンジを巻き、その形状を維持するために7.0ナイロン糸で更にメッシュを固定した。これを腎臓に作製した円柱状欠損部へ埋入した。メッシュを入れた理由は、組織内において埋入コラーゲンスポンジ部位と腎組織部位とを隔離し、再生組織が欠損部に新生したものが、腎組織由来の組織なのかを明瞭化するためである。

### 実施例 2 未分化間葉系幹細胞の単離及び精製

6週齢の雌のSDラット(株式会社清水実験動物)の大腿骨及び脛骨を摘出し、清潔操作で骨髓を採取し、初期培地(MEM、GIBCO BRL)10.2wt%、炭酸水素ナトリウム(ナカライテスク)26.2mM、ペニシリン(500U/l)-ストレプトマイシン(500 $\mu$ g/l)合剤(SIGMA)、仔ウシ血清15%で培養した。7~10日後、接着した細胞を0.05%トリプシン/EDTA溶液で回収し、同じ培地を用いて継代した。

### 実施例 3 ゼラチン粒子の調製

1000ml容の丸底フラスコにオリーブ油375mlを加え、固定した攪拌用モーター(新東科学社製、スリーワンモーター)にテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した。オリーブ油を30、420rpmにて攪拌しながら等電点4.9のアルカリ処理ゼラチン(新田ゼラチン社製)の水溶液(10wt%、10ml)を滴下し、W/O型エマルジョンを調製した。10分間の攪拌後、フラスコを10~20に冷却し、さらに、30分間攪拌した。エマルジョンへ100mlのアセトンを加え、さらに1時間攪拌した後、遠心分離(5000rpm、4、5分間)によりゼラチン粒子を回収した。アセトンさらに2-プロパノールを用いて粒子を遠心洗浄することによって、未架橋のゼラチン粒子を得た。得られた未架橋ゼラチン粒子(500mg)を0.01wt%濃度のグルタルアルデヒドを含む、0.1wt%Tween80の水溶液(100ml)に懸濁させ、4、15時間緩やかに攪拌することによってゼラチンの架橋反応を行った。その後、粒子を0.1wt%Tween80の水溶液、2-プロパノール、蒸留水で2回ずつ洗浄した後、凍結乾燥した。2-プロパノールからの風乾時あるいはPBS中、37での平衡膨潤時における粒子の直径を、それぞれ100個粒子について顕微鏡にて測定し、膨潤状態の粒子の体積に対する粒子に含まれる水の体積の比として含水率を算出したところ、その含水率は約95vol%であった。また、膨潤時における粒子の平均粒径は40 $\mu$ mであった。

<sup>125</sup>Iにより標識した後、この含水率95%の粒子をマウス皮下に投与したところ、投与部位での放射活性は時間とともに減少した。その放射活性は14日後にゼロとなった。次に、bFGFを<sup>125</sup>Iにより標識し、ゼラチン粒子に含浸した後、上記と同様にインビボ投与して、放射活性の時間的変化を調べたところ、その放射活性の残存の時間依存性は粒子の場合とほぼ同じであった。このように、この粒子の分解とともにbFGFはインビボで徐放化された。この粒子からのbFGFの徐放化期間は14日であった。

### 実施例 4 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の徐放化

実施例3で作製した凍結乾燥ゼラチン粒子(2mg)に0 $\mu$ gおよび100 $\mu$ gのbFGF(科研製薬株式会社より供与)を含む水溶液10 $\mu$ lを滴下、25で1時間放置することによってbFGFを粒子内に含浸させた。その後、100 $\mu$ lのPBSを加えbFGF含浸ゼラチン粒子を分散させた。

### 実施例 5 細胞及び徐放化因子の封入

実施例2で調製した細胞(2 $\times$ 10<sup>4</sup>個)を含む細胞懸濁液50 $\mu$ lを22ゲージの注射針をつけた注射器を用いて実施例1で調製したコラーゲン足場内に注意深く注入した。この足場を37のCO<sub>2</sub>インキュベーター内で3時間放置し、細胞をコラーゲンスポンジ内に定着させた。その後、実施例3で調製した徐放化したbFGF含浸ゼラチン粒子懸濁

10

20

30

40

50

液 50  $\mu$ l を加えた。コントロールとして、細胞のみあるいは bFGF 含浸ゼラチン粒子のみを注入した足場を調製した。

#### 実施例 6 足場の移植

SD ラットを体重あたり 15 mg/kg のフェントバルビタールで麻酔し、左 11 肋骨付近より腹腔に達するまで切開した。左腎をガーゼで保護しながら露出させた。出血防止のため腎動脈部をクランプした上で、左腎の中腎盂の外側皮質部にピンセットで欠損 (defect: 直径 5 mm、深さ 5 mm の円柱状) をつくり、細胞及び徐放体を含んだ足場を埋め込んだ。腎外側皮膜を 7.0 ナイロンで 1 針縫合して脱離を防いだ。腎を元に戻した後、腹膜筋層、外皮を縫合した。36 週間後ジエチルエーテルで犠死させ、左腎を回収した。左腎に切開を加えるときは、ポリプロピレンで被覆された足場の長径中央で切断するように留意した。この組織切片を作製し、組織学的評価を行った。染色は通常のヘマトキシリンエオジン染色で行った。

得られた埋入部位の標本を観察したところ、bFGF を含浸したゼラチン粒子と未分化間葉系幹細胞とを含むコラーゲンスポンジを埋入した群においてのみ、腎組織の再生が認められた (図 1 A、1 B)。写真よりあきらかなように、この実験群においては、プロピレンメッシュの内側に、糸球体組織の再生が確認された。血管新生ならびに尿細管の新生も見られた。コントロールである未分化間葉系幹細胞のみをスポンジに入れたもの (図 2 A、2 B)、bFGF 含浸ゼラチン粒子のみをスポンジに入れたもの (図 3 A、3 B) では血管新生、時として尿細管の形成は確認されたが、糸球体の再生は見られなかった。ここには示していないが、スポンジのみの埋入では、繊維性組織の侵入も他のグループと比較して軽微であり、血管新生などは全く誘導されていなかった。この結果は、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子との混合が腎組織の再生に不可欠であることを示している。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、未分化間葉系幹細胞と細胞増殖因子とを組み合わせることで、腎臓をインビボで再生させることができる材料を得ることができる。また、本発明では、自己組織からの細胞を用いることができることから、免疫拒絶の問題も解消され、その医療への利用性は非常に大きいといえる。

#### 【図面の簡単な説明】

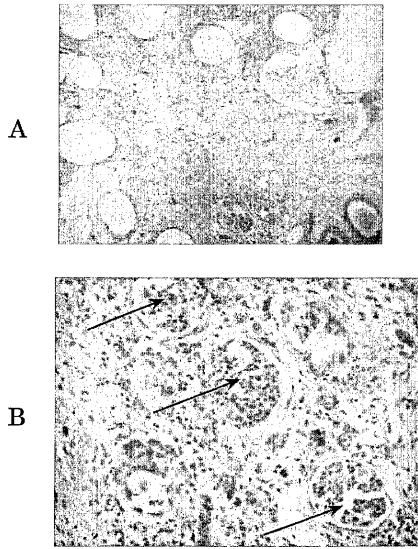
図 1 未分化間葉系幹細胞と bFGF 含浸ゼラチン粒子とを含むコラーゲンスポンジ埋入群。A:  $\times 100$ 、B:  $\times 400$ 、矢印が再生した糸球体を示す (埋入 36 週間後)。

図 2 未分化間葉系幹細胞を含むコラーゲンスポンジ埋入群。A:  $\times 100$ 、B:  $\times 400$  (埋入 36 週間後)。

図 3 bFGF 含浸ゼラチン粒子を含むコラーゲンスポンジ埋入群。A:  $\times 100$ 、B:  $\times 400$ 、(埋入 40 週間後)。

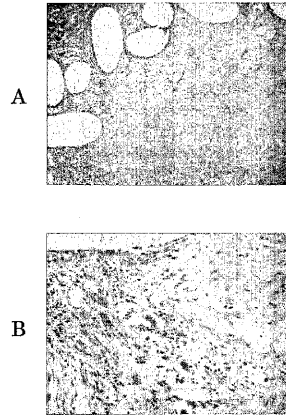
【 図 1 】

図 1



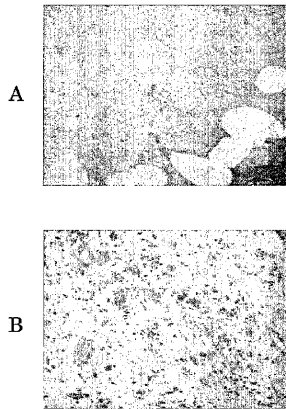
【 図 2 】

図 2



【 図 3 】

図 3



---

フロントページの続き

(72)発明者 小川 修

京都府京都市左京区下鴨水口町4 2 - 5

審査官 安川 聡

(56)参考文献 林松彦 他, 腎糸球体および尿管細胞再生の腎疾患治療への応用, 日本腎臓学会誌, 2001年, Vol.43, No.3, p.163

田畑泰彦, 再生医学における材料学の役割, 医学のあゆみ, 2001年 2月, Vol.196, No.5, p.301-306

TABATA, Y., J. BIOMATER. SCI. POLYM. ED., 2000年, V11N8, P891-901

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61L 27/00-27/60

A61K 35/00-35/76

A61K 38/00-38/58

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDream2)