

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15045

研究課題名(和文)ブタ胎子後腎の異種間移植によるネコ腎組織の体内再生技術の挑戦

研究課題名(英文)Methodological trial of the xenotransplantation of pig embryonic kidney to cats

研究代表者

米澤 智洋(Yonezawa, Tomohiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10433715

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):腎臓病の根本的な治療法は確立されていない。腎臓移植術は有用な一手であるが、ドナー確保が困難なことなどからほとんど実施されていない。胎生組織ニッチ法を用いるにしてもネコの胎子の獲得は容易ではない。そこで本研究では、ネコ胎子の代わりにブタ胎子の後腎を用い、異種間移植によるネコ腎組織の体内再生技術を検討した。まずレシピエントの拒絶反応の多寡を予想するELISA評価系を作出した。次に安全性や着床期間について実施の実現可能性を検討した。さらに実験ネコを用いてブタ後腎の再生・分化応答性を検討するとともに、免疫抑制剤の使用プロトコルの策定を行った。これらの知見は腎臓再生医療の発展に役立つものと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は胎生組織ニッチ法の成功例の一つとして、再生医療に革新的な変化をもたらす可能性がある。また、胎生組織ニッチ法には胎子が必要であるが、ネコの胎子を安定して入手するのは困難を極めるのに対し、ブタの胎子後腎を用いることでドナー確保の困難を解決することができる可能性がある。ブタはこれまで異種間移植の研究に用いられてきた経緯があり、拒絶反応を防ぐノウハウについて多くの先行研究があること、実験動物であるため遺伝子組み換え技術が確立していることなど、多くの利点がある。さらに、本応募の再生組織から産生されるエリスロポエチンは自己由来であるため、腎性貧血の治療にも役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文):No good therapy for the kidney disease has been established. Kidney transplantation is one of the treatments, but it is too difficult to perform it because it is too hard to find the donor. Therefore, we have focused on xenotransplanted embryonic kidney which provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. In this study, we investigated the possibility of xenotransplantation of the pig fetal kidney to the cat. First, we have established the ELISA method to assess the immune intensity against the pig antigens in the recipient. Second, we made the protocols for operation of xenotransplantation using the fundamental data. Third, we have investigated the immune-suppressing method to the donor during operation. These findings lead to establishment of the new therapy for the kidney disease.

研究分野：獣医学

キーワード：再生医療 腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネコにおいて腎臓病は罹患率の極めて高い疾患のひとつで、寿命に大きく関わっている。一度機能を失った腎組織は基本的には回復しないため、これまで腎臓病には姑息的治療法が主流であった。近年では腎臓移植手術が施されることもあるが、ドナー確保が困難なことなどから実用化には至っていない。

そこで新たな治療法として、研究代表者は研究分担者である東京慈恵医科大学の横尾隆教授、明治大学の長嶋比呂志教授らとともに胎子後腎の移植による腎組織の体内再生技術(胎生組織ニッチ法)の確立を目指して研究を進めた。胎生組織ニッチ法は、胎子の後腎組織を成熟個体の腹腔内に移植することで、成熟個体内で腎臓発生時の微小環境を再現し、新たな腎組織を分化誘導するという新しい発想による移植技術である。

小動物への臨床応用を考えた場合、ネコの胎子後腎組織を用意するのは困難を極める。そこで研究代表者らは、ネコ胎子の代わりにブタ胎子の後腎を用いた異種間移植による胎生組織ニッチ法の開発を考えた。予備実験によって、ブタ胎子後腎をネコの腹腔内に移植すると、その周辺に腎糸球体様の再生組織が分化誘導され、ネコ由来のエリスロポエチン(EPO)の産生もあることを明らかにした。

2. 研究の目的

以上より本課題では、補体制御因子導入ブタの胎子後腎の異種間移植によるネコ腎組織の体内再生技術の確立と臨床応用を目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究では実験段階を3つに分けて遂行した。まず実験 1 では、補体制御因子導入ブタ細胞に対するネコの免疫応答の観察を行うこととした。ブタ後腎培養細胞にネコ補体制御因子を遺伝子導入し、異種免疫応答の抑制を目指した。実験 2 では、実験ネコに移植したブタ後腎と再生組織の安全性、生着期間、機能性を検討した。健常ネコを用い、免疫応答や感染症に対する安全性、再生組織の生着期間について評価した。実験 3 では、実験ネコに移植したブタ後腎と再生組織による治療反応性を検討した。

4. 研究成果

初年度~2年度目にかけて、「実験 1 : 補体制御因子導入ブタ細胞に対するネコの免疫応答の観察」を実施した。胎生組織ニッチ法を実施する前に、症例がブタ後腎培養細胞に対する抗体を事前に持つかどうかを調べられるようにするためである。予備実験において、急性拒絶反応はあらかじめ抗ブタ抗体を獲得しているネコでのみ生じたことから、補体の活性化を抑えれば急性拒絶反応の大部分は避けることができると考えられた。蛍光発色エライザによる抗原抗体反応の有無の評価系の作出を目指した。健常個体とブタ抗原に対する抗体を保持する個体との間で500~1万倍の反応性の違いをもつ測定系の確立に成功し、カットオフ値を設定した。補体制御因子の候補にはDAF(decay accelerating factor, CD55)、MCP(membrane cofactor protein, CD46)、CR1(complement receptor type 1, CD35)、CD59が考えられた。ネコにおけるこれらの遺伝子のクローニング、コンストラクトの作製には既に着手しており、一部は完了している。

2年度~3年度にかけては「実験 2 : 実験ネコに移植したブタ後腎と再生組織の安全性、生着期間、機能性の検討」を実施した。北里大学で後腎移植を実施した実験猫の研究と照らし合わせ、今後実施予定の実験猫らが去年度作製したブタ後腎培養細胞に対する抗体を持つかどうかを調べ、安全性や生着期間について実施の実現可能性を検討した。この結果を受け、次年度は副作用の認められない最大容量の免疫抑制剤を使った状態で後腎を植える実験を行い、実験ネコに移植したブタ後腎と再生組織による治療反応性の検討に着手することとした。

3年目では、副作用の認められない最大容量の免疫抑制剤を使った状態で後腎を植える実験を行い、実験ネコに移植したブタ後腎と再生組織による反応性の検討に着手した。実験の結果から、タクロリムスの高用量によって拒絶反応を抑制できるものの、タクロリム

スの長期投与による心筋の線維化や肺水腫が認められ、予後を長く得るためには免疫抑制剤の使用プロトコルの改善が必要であることが示唆された。最終的にブタの胎子後腎の異種間移植によるネコ腎組織の体内再生技術の確立には至らなかったものの、それに至るための重要な知見を得ることができたと考えられる。本研究で行う胎生組織ニッチ法は、個体発生時の微小環境をレシピエントの体内に再現することで体内を一種の培養装置とし、臓器そのものの再生を目指す新しい再生医療のストラテジーであり、本研究の成功は、再生医療に革新的な変化をもたらすと期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Sakai K, Maeda S, Saeki K, Nakagawa T, Murakami M, Endo Y, Yonezawa T, Kadosawa T, Mori T, Nishimura R, Matsuki N. Anti-tumour effect of lapatinib in canine transitional cell carcinoma cell lines. *Vet Comp Oncol*. 2018 16(4):642-649.
2. Maeda S, Tomiyasu H, Tsuboi M, Inoue A, Ishihara G, Uchikai T, Chambers JK, Uchida K, Yonezawa T, Matsuki N. Comprehensive gene expression analysis of canine invasive urothelial bladder carcinoma by RNA-Seq. *BMC Cancer*. 2018 18(1):472.
3. Sugimoto S, Maeda S, Tsuboi M, Saeki K, Chambers JK, Yonezawa T, Fukushima K, Fujiwara R, Uchida K, Tsujimoto H, Matsuki N, Ohno K. Multiple acquired portosystemic shunts secondary to primary hypoplasia of the portal vein in a cat. *J Vet Med Sci*. 2018 80(6):874-877.
4. Sakai K, Maeda S, Yamada Y, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Yonezawa T, Matsuki N. Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. *Vet Comp Oncol*. 2018 16(3):330-336.
5. Sakai K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N. Decreased plasma amino acid concentrations in cats with chronic gastrointestinal diseases and their possible contribution in the inflammatory response. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018 195:1-6.
6. Omori M, Maeda S, Igarashi H, Ohno K, Sakai K, Yonezawa T, Horigome A, Odamaki T, Matsuki N. Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *J Vet Med Sci*. 2017 79(11):1840-1847.
7. Inoue A, Maeda S, Kinoshita R, Tsuboi M, Yonezawa T, Matsuki N. Density of tumor-infiltrating granzyme B-positive cells predicts favorable prognosis in dogs with transitional cell carcinoma. *Vet Immunol Immunopathol*. 2017 190:53-56.
8. Maeda S, Tsuboi M, Sakai K, Ohno K, Fukushima K, Kanemoto H, Hiyoshi-Kanemoto S, Goto-Koshino Y, Chambers JK, Yonezawa T, Uchida K, Matsuki N. Endoscopic Cytology for the Diagnosis of Chronic Enteritis and Intestinal Lymphoma in Dogs. *Vet Pathol*. 2017 54(4):595-604.
9. Yonezawa T*, Sato K, Uchida M, Matsuki N, Yamazaki A. Presence of contagious yawning in sheep. *Anim Sci J*. 2017 88(1):195-200.
10. Yonezawa T*, Uchida M, Tomioka M, Matsuki N. Lunar cycle influences spontaneous delivery in cows. *PLoS One*. 2016 11(8):e0161735.
11. Uchida M, Saeki K, Maeda S, Tamahara S, Yonezawa T*, Matsuki N. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) reduces cell number in canine histiocytic sarcoma cell lines. *J Vet Med Sci*. 2016 78(9):1515-1520.
12. Rieanrakwong D, Laoharatchathanin T, Terashima R, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Kawaminami M. Prolactin suppression of Gonadotropin releasing hormone initiation of mammary gland involution in female rats. *Endocrinol*. 2016 157(7):2750-2758.
13. Murakami K, Maeda S, Yonezawa T, Matsuki N. Synovial fluid matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in dogs suffering from joint disorders. *J Vet Med Sci*. 2016 78(6):1051-1054.

14. Murakami K, Yonezawa T, Matsuki N. Synovial fluid total protein concentration as a possible marker for canine idiopathic polyarthritis. J Vet Med Sci. 2016 77(12):1715-1717.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vn.a.u-tokyo.ac.jp/vcpb/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：横尾隆

ローマ字氏名：Yokoo, Takeshi

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70301538

研究分担者氏名：長嶋比呂志

ローマ字氏名：Nagashima, Hiroshi

所属研究機関名：明治大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50318664

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩井聡美

ローマ字氏名：Iwai, Satomi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。