

令和元年6月12日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20165

研究課題名(和文) 貧血ラットに対する後腎移植および骨髄幹細胞移植の影響に関する検討

研究課題名(英文) Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transfer and metanephros transplantation into rats with nephrogenic anemia

研究代表者

勝岡 由一 (Katsuoka, Yuichi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10770109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全に伴う腎性貧血に対する新たな治療法として、腎不全患者の体内で半永久的に自己由来のエリスロポエチン(EPO)を産生する臓器を作成することを目的とした。その基盤研究として、後腎を移植したラットへの骨髄間葉系幹細胞(MSC)のより効果的な追加投与方法を検討することにより、EPO産生能を向上させる手法の開発を目指した。後腎移植+MSC経静脈的または被膜下投与と対照群間でEPO産生能についてヘマトクリット値を指標に比較したところ、各群間で差を認めなかった。これは血管からMSCを投与する方法ではしばしば血管や肺に塞栓を引き起こすことや、MSCが局所へ十分届かないことなどが原因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎不全に伴う腎性貧血に対して、現在はリコンビナントのEPO製剤によって治療が行われている。しかし、生涯にわたってEPO製剤を投与し続けるのは、莫大な医療費負担になる。さらに、自然災害などによってEPO製剤供給が絶たれば、腎不全患者は深刻な状況に追い込まれる。このような現況の中で、腎不全患者の体内で半永久的に自己由来のEPOを産生する臓器を作成することは大変意義がある。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop a transplantable organoid that produces erythropoietin (EPO) semi-permanently basis in the patients with chronic renal failure as a novel treatment for nephrogenic anemia. As a preliminary study, the author planned to establish a new technique to enhance EPO producibility in transplanted metanephros, based on the more efficient approaches to introduce bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) into rats transplanted with embryonic metanephros. The two methods, intravenous and renal subcapsular approaches, were tested, and neither of them was found to have difference in hematocrit compared to the control (metanephros alone). MSC intravenous injection is a frequent cause of vascular or pulmonary embolization, and MSCs are not easy to successfully arrive at the transplant site of metanephros. These issues may affect the outcome of this study.

研究分野：泌尿器科

キーワード：後腎移植 腎性貧血 エリスロポエチン

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

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

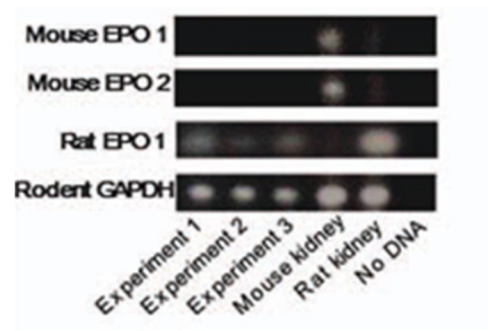
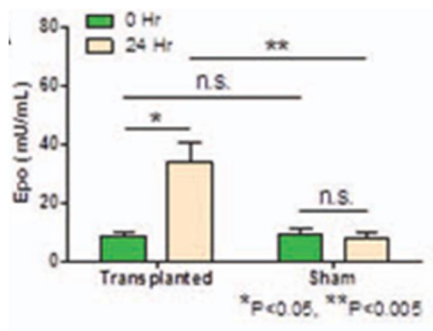
一度廃絶した腎機能の回復は不可能であり、現在では年間 3 万人以上が末期腎不全で透析導入になっている。現在の我が国の透析患者は約 30 万人といわれ、この数は今後も人口高齢化や糖尿病の拡大に伴い増大することが予想される。腎不全に伴う腎性貧血に対して、現在はリコンビナントのエリスロポエチン(EPO)製剤によって治療が行われている。しかし、生涯にわたって EPO 製剤を投与し続けるのは、莫大な医療費負担になる。さらに、自然災害などによって EPO 製剤供給が絶たれば、腎不全患者は深刻な状況に追い込まれる。このような現況の中で、腎不全患者の体内で半永久的に自己由来の EPO を産生する臓器を作成することは大変意義がある。我々は妊娠 15 日のラット胎仔の後腎を成熟ラットの腹部脂肪組織内に移植すると、移植後腎を核として自己の骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)が集まり、EPO 産生臓器へと分化することを発見した(Stem cells 2012;30:1228-1235)。

さらに、我々は後腎を移植したラットに他者由来の間葉系幹細胞(MSC)を追加投与することで、EPO 産生臓器への分化がより促進されることも確認している(論文未発表)。

この我々が新たに作り出した EPO 産生臓器のヒトへの臨床応用を考える上で、EPO 産生能の更なる向上が求められる。その過程において、後腎移植モデルを用いた *in vivo* 実験系(動物実験)を用いた比較検討実験が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

我々は、腎不全患者の体内で半永久的に自己由来のエリスロポエチンを産生する臓器を作成し、腎不全に伴う腎性貧血に対して新たな治療法を提案することを目的としている。我々はラット胎仔の後腎を成熟ラットの脂肪組織内に移植すると、移植後腎を核として自己の骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)が集まり、エリスロポエチン産生臓器へと分化することを発見した。さらに、後腎を移植したラットに他者由来の間葉系幹細胞(MSC)を追加投与することで、エリスロポエチン産生臓器への分化がより促進されることも確認している。本研究では後腎を移植したラットへのMSCの追加投与方法について、経静脈的投与、経動脈的投与、後腎組織への被膜下注入の3通りの方法でEPO産生臓器への分化促進作用がどのように変化するかを評価し、後腎移植を用いたEPO産生臓器作成法において、よりEPO産生能を向上させる方法を見出すことを目的とする。



## 3. 研究の方法

1) 妊娠 15 日のラット胎仔の後腎を摘出し、摘出した後腎を成熟ラットの脂肪組織内に移植した。また、移植後にラットの片腎摘出および下大静脈より瀉血することで貧血状態にして、これを腎性貧血モデルの代わりとする。移植を受けるラットは 4 群(後腎移植 + MSC の経静脈的投与群, 後腎移植 + MSC の経動脈的投与群, 後腎移植 + MSC の後腎被膜下投与群, 比較対照群(後腎移植のみ, MSC の追加投与なし))に分ける。この 4 群でのエリスロポエチン産生能の違いを比較検討する。群は、移植前に後腎組織の被膜下に MSC を投与した上で移植した。その他の群は後腎に操作を加えずに移植した。群は術後 2 日おき MSC を尾静脈より経静脈的に投与した。全ての群は移植当日から 2 日おきに採血をしてヘマトクリット値の改善度を評価した。

2) 予めラットの片腎を 5/6 切除し (対側はそのまま) 2 週間の回復期間を置いた後に開腹し、後腎移植・未処理の対側腎摘出・瀉血・閉腹の手順で 1 と同様の病態モデルを作製した。また、MSC 投与方法として経静脈的投与と経腎動脈投与を試みた。後腎被膜下への投与方法は、後腎組織の損傷が生着率の低下を招くことが明らかになったので除外した。

#### 4. 研究成果

1) 経静脈的投与群 (n = 3), 後腎被膜下投与群 (n = 4), 比較対照群 (n = 4) の 3 群間について、全ての群で移植当日から 2 日おきに採血をしてヘマトクリット値の改善度を評価した。結果は各群間でヘマトクリット値の改善度に差は見られなかった。

各群間で差が見られなかった理由は、大きく 2 つの原因を考えている。ひとつは実験モデルそのものの問題、もうひとつは後腎移植および MSC 投与時の手技バイアスである。

・実験モデル：貧血モデルを作成するにあたり、瀉血および片腎摘をおこなった。ホストの片腎は残した状態だった。移植後腎がせいぜい長径 2 mm 程度まで大きさをのに対して、ホストのラット腎は長径 2 cm を超える大きさである。ホストのラット腎から分泌させるエリスロポエチン量は、移植後腎からのエリスロポエチン量を大きく上回る。したがって、ホストの片腎から分泌されるエリスロポエチンの影響により、移植後腎からの僅かなエリスロポエチン分泌の差が打ち消されてしまったと思われる。正確に移植後腎からのエリスロポエチン分泌のみを調べるには、ホストヘマトクリット値やホスト血中エリスロポエチン濃度を評価項目にするべきではないことが判明した。

・手技バイアス：本研究では、後腎の移植、後腎被膜下への MSC 注入、ホストへの経静脈的 MSC 投与といった手技を要する。本実験では、移植後腎の生着率は 50 - 60 % 程度にとどまった。また被膜下への MSC 注入により損傷した後腎は、さらに生着率が下がってしまった。手技バイアスを無くすだけの安定した技術の習得に時間をとられてしまい、比較検討に用いる事の出来る検体を十分に得る事が出来なかった。

MSC の後腎への直接投与は、その操作が加わるにより摘出から移植までの時間が延長し、組織の劣化を招くことで成功率低下につながった。そのため、経静脈的または経動脈的に投与する方法に限定することにしたが、血管経由での投与では、細胞塊が血管を塞ぐことがあり、その結果、肺塞栓を起こすことや、MSC が局所へ十分届かない可能性が考えられた。したがって、さらに注入液の細胞濃度や投与に用いる血管の吟味などが必要となった。

動物実験系の確立と EPO 測定法の検討に終始し、MSC 投与方法の比較検討を行うまでに至らなかった。しかし、問題点が明確となり、具体的な改善策を提示することができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

横尾 隆 (Yokoo, Takashi)

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。