

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02875

研究課題名（和文）新規生体素材による自己再生能を利用した新しい腎臓再生技術の開発

研究課題名（英文）Novel Renal Regeneration Technology based on Self-Remodeling Capacity using Innovative Biomaterial

研究代表者

八木 洋 (Yagi, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：20327547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は生体由来の細胞外マトリックスで構成された三次元骨格の有用性を示すために、脱細胞化処理によって作製した臓器の骨格を、部分切除術後の断面に合わせて縫合接着することで、骨格内部に細胞が浸潤・生着し欠損部分の組織再生を促す効果と、そのメカニズムを明らかにすることが目的である。本研究では腎臓再生をターゲットとして、疾患ラット・ブタモデルを用いて臨床病理学的検討を行うと共に、脱細胞化後の残存タンパクの網羅的解析を実施して有効性の根拠を明らかにし、本来は体内で自己再生しない腎臓が、新しい再生医療素材として機能し得るか様々な病理学的・画像診断ツールを応用し検証し得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本提案によって、これまででない腎臓修復用生体医療素材の有効性を検証すると共に、生体医療材料の品質分析技術を確立できれば、数万人以上が本技術の対象となり、透析患者減少による医療経済へのインパクトも絶大である。また体への負担が少ない低侵襲治療が可能である上、他臓器への汎用性が高く、将来更なる適応拡大が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：We developed an organ-derived acellular bio-scaffold that promoted glomerular and tubular regeneration after partial nephrectomy in pigs. We sutured a decellularised kidney-derived bio-scaffold onto the PN surface. Twenty-eight days later, a glomerulus-like structure, a Bowman's capsule, a foot process, and proximal- and distal tubule-like structures that expressed nephrin, AQP-1, and E-cadherin, were observed in the implanted bio-scaffold. CT and angiography revealed blood flow in the bio-scaffold. We detected Sall1- and Six2-positive cells near the boundary of the resected surface and the bio-scaffold, which served as a foothold for cells from the PN kidney surface and enhanced renal regeneration. To our knowledge, this is the first study reporting organ-derived bio-scaffold-induced glomerular regeneration in mammals. This novel organ-derived bio-scaffold paves the way for understanding kidney regeneration mechanisms and may reduce renal disease-associated mortality.

研究分野：臓器再生

キーワード：糸球体 腎臓再生 脱細胞化 細胞外マトリックス 腎臓部分切除

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

癌などによって臓器の切除手術を受ける患者は年間数十万人規模であるが、そのうち 1~5%は重篤な臓器不全によって不幸な転機をたどる。また最悪の転機に至らなくとも臓器機能低下は様々な合併症を併発させ、多くの患者の QOL (生活の質) を悪化させている。現在、手術中に使用可能な医療素材にはフィブリン糊・癒着防止シート等があるが、臓器機能を補助できる効果はなく、臓器機能不全に対してはほとんど代償的治療が限界である。体からすべての細胞を除去すると透明な細胞外骨格が残ることが知られている。体内のすべての組織・臓器は細胞外骨格に支えられ、その組成である細胞外マトリックス蛋白が組織再生に重要な役割を担うことが示されており、再生医療の三要素のうち「足場」と「生理活性物質」の二つに大きく関与すると考えられている。特に生体由来の足場骨格は「脱細胞化」という特殊な技術を用いて様々な組織で製品化され、その臨床的有用性が示されているが、臓器再生における細胞外骨格の役割については不明な点が多く、まして臨床応用可能な再生医療素材は未だ開発されていない。我々は、生体の三次元構造を損なうことなく臓器由来の骨格構造を得るために「臓器の脱細胞化技術」を開発し (Nat Med 2010, Cell Transplant 2013)、作製した臓器骨格が生体内で欠損臓器の自己再生力を惹起し、臓器を復元できる可能性を見出した (特許出願)。実際に異なる臓器 (心臓・小腸・肝臓・腎臓・膵臓) の脱細胞化を実施した結果、腎臓が短期間で最も明確に切除部分を構造的・機能的に復元させることを見出した。従って本研究では腎臓の再生に着目した上で、脱細胞化処理後の網羅的な蛋白組成解析によって腎臓再生における細胞外骨格の役割を明らかにし、実臨床の適応を考えた腎疾患モデル動物に対する組織再生力の有無を検証し、今後の臓器再生研究の新たなツールとして、また自然治癒を促す新しいコンセプトの再生医療素材の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では蛋白解析の第一人者である産総研の五島・足達と共同で、これまで詳細不明だった脱細胞処理後の臓器骨格の蛋白組成を解析し、臓器再生における細胞外骨格の役割を明らかにした上で、疾患モデル動物として、本邦で 3 万人以上が罹患し治療法のない多発性嚢胞腎ラットモデル、および数万人を超える腎癌患者と慢性腎不全を想定したブタ片腎部分切除 (慢性腎不全) モデルを採用し、部分切除した腎臓の欠損部に脱細胞化した腎臓骨格の断面を合わせて縫合接着し、その効果を 1 ヶ月にわたって経時的に観察することで、細胞外骨格の補助によって本来体内で自己再生しないはずの腎臓が構造的・機能的に復元するかを検証し、脱細胞化によって作製した細胞外骨格の新しい医療素材としての可能性を示すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脱細胞化後の蛋白組成解析から腎臓再生における細胞外骨格の役割を明らかにする

産総研の TripleTOF® 5600+システムおよび QTRAP® 5500 LC/MS/MS システムを用いて脱細胞化後の腎骨格の網羅的解析を実施し定量分析を行うことで、正常腎臓と比較した残存蛋白の量的な変化を捉え、各種蛋白機能を元に層別化した上で、腎臓由来の各種細胞 (尿細管上皮細胞、血管内皮細胞、メサングウム細胞) に与える影響を *in vitro* の培養系を用いて検証する。

### (2) 多発性嚢胞腎ラットモデルを用いて脱細胞化腎骨格の臓器再生能を検証する

多発性嚢胞腎ラットモデル (PCK ラット) に腎部分切除を施し、切除断面に合わせて成形したラットの脱細胞化腎骨格を縫合接着し、経時的に腎臓の再生を評価する。評価項目は、1) 機能的評価: ドップラーエコー・ICG 色素注入による血流評価、CCr、eGFR、尿量 (排尿モニター)、尿中電解質、体重、腎重量、2) 病理組織学的評価: 骨格接着後 3 日、7 日、1 ヶ月で犠牲死させ、電子顕微鏡による構造解析、H&E、アザン染色、免疫染色 (近位尿細管マーカー AQP1、内皮細胞マーカー CD31、糸球体濾過膜マーカー Nephritin 等) をそれぞれ 3 例に実施する。

### (3) 片腎部分切除 (慢性腎不全) ブタモデルを用いて脱細胞化腎骨格の臓器再生能を検証する

ブタに片腎摘出+片腎 40%部分切除を実施し慢性腎不全状態を再現する。部分切除した断面に合わせて成形したブタの脱細胞化腎骨格を縫合接着し、経時的に腎臓の再生を評価する。評価項目は、1) 機能的評価: 腎動脈造影 (C アーム)・ドップラーエコー・ICG 色素注入による血流評価、CCr、eGFR、尿量 (腎瘻造設)、尿中電解質、体重、腎重量、2) 病理組織学的評価: 骨格接着後 3 日、7 日、1 ヶ月で犠牲死させ、電子顕微鏡による構造解析、H&E、アザン染色、免疫染色 (近位尿細管マーカー AQP1、内皮細胞マーカー CD31、糸球体濾過膜マーカー Nephritin 等) をそれぞれ 3 例に実施する。

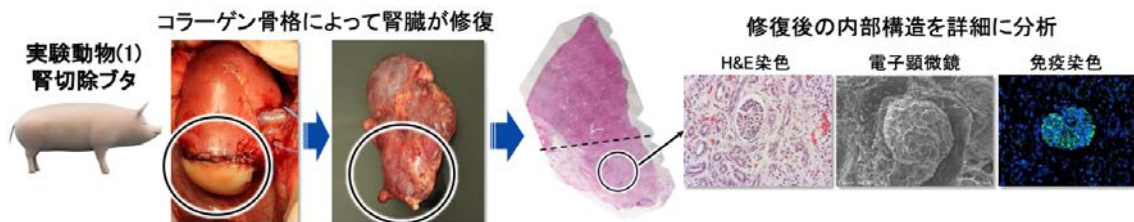
## 4. 研究成果

### 有効性試験データ (1) 腎臓部分切除後の修復機能 (ブタモデル)

脱細胞化処理によって無細胞化した細胞外骨格が、腎臓の修復機能を持つこと (有効性) を検証するため、実臨床でがん治療のために実施される「腎臓部分切除」手術をブタで再現し、腎臓の欠損部分にこの細胞外骨格を貼り付け、一ヶ月に渡って経時的に評価したところ、図 (1) に示

すように体内で腎臓の細胞が入り込み、糸球体構造を始め腎臓の構造が細部に渡って復元することが示された。

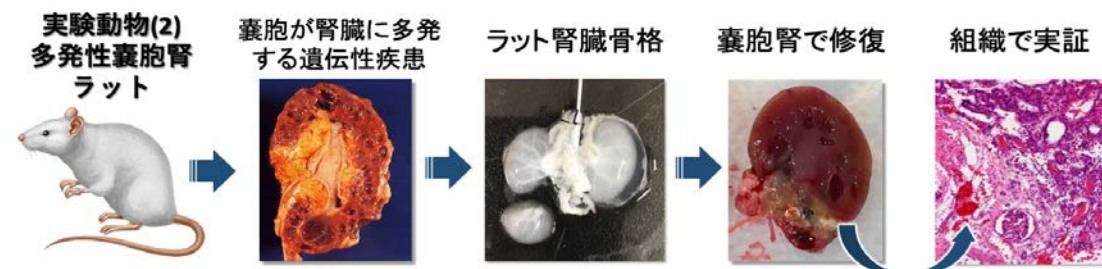
図1 脱細胞化骨格が示す腎臓修復機能



有効性試験データ (2) 多発性嚢胞腎に対する修復機能 (ラットモデル)

前述の実験で脱細胞化した細胞外骨格が強い腎臓修復・自己組織化機能を持つことが示されたが、病腎臓の場合の有効性を検証するため、次に現在難病指定を受けており透析導入率の高い遺伝性疾患である「多発性嚢胞腎」のモデルラットを用いて、同様の1ヶ月の観察実験を行なったところ、同じように糸球体を含む腎臓修復機能が示されたが、一方で細胞外骨格内に嚢胞も出現しており、本効果が体内に残った腎臓機能にも影響を受ける可能性が示された (図2)。

図2 多発性嚢胞腎ラットに対する腎臓修復効果



有効性試験データ (3) 注入用ゲル材加工法の確立と有効性検証 (ラットモデル)

「脱細胞化細胞外骨格」が腎臓修復機能というかつてない重要な効果を持つことが明らかになったが、これを手術ではなく簡単に投与できる剤型にし、より多くの患者がその効果を楽しむことができるよう、注射可能なゲル材を開発した (図3)。ゲル材の硬度と内部のポア構造を最適化した製造方法を確立し、豊富な細胞浸潤と自己組織化機能を実現した。実際にラットの腎臓を損傷させ、ブタ組織由来のゲル化材を注入した結果、腎臓組織の修復効果が認められた (図4)。以上の有効性試験の積み上げを元に、脱細胞化腎臓骨格が腎臓修復効果を持った新しい医療機器としても十分有用であると考えられた。

図3 ゲル状加工の実際と内部構造

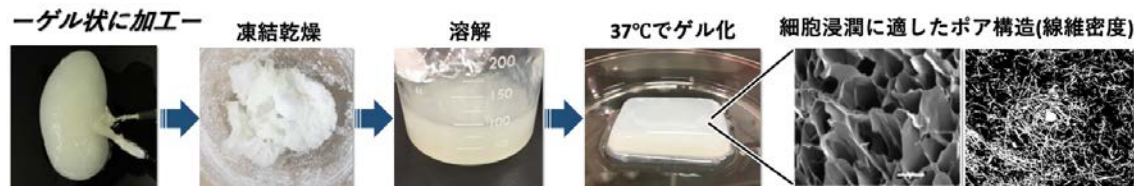
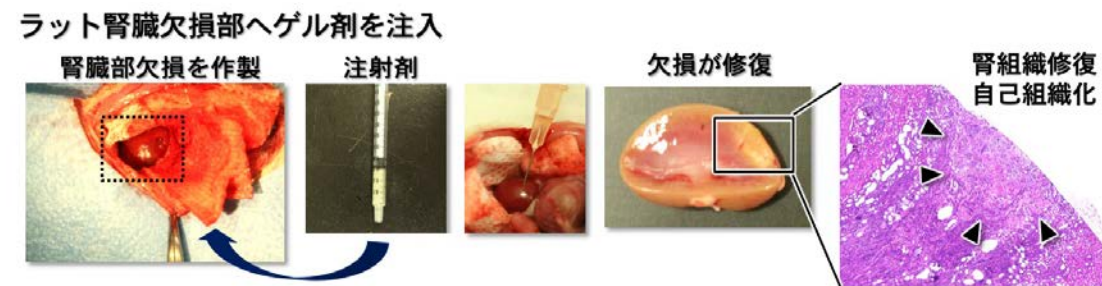


図4 ゲル剤による腎臓修復効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木 洋、黒田康平、田島一樹、榑笥博子、足達俊吾、篠田昌宏、北川雄光
2. 発表標題 生体由来細胞外骨格を用いた臓器再生機能製品の開発の現状と展望
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 洋
2. 発表標題 医療機器と再生医療の融合を目指して 外科医が担う役割
3. 学会等名 第一回医療機器シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田晃平、八木洋、田島一樹、蛭川和也、北川雄光
2. 発表標題 脱細胞化骨格を用いた腎臓再生
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島一樹、八木 洋、東 尚伸、黒田 晃平、金井 一享、北川 雄光
2. 発表標題 猫の三頭に一頭は腎臓病-脱細胞化骨格を利用した腎臓再生への挑戦-
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部外科学（一般・消化器） 肝胆膵移植班 スタッフ紹介 八木洋 <a href="https://www.keio-hpbts.jp/about/surgeons-DrYagi">https://www.keio-hpbts.jp/about/surgeons-DrYagi</a> 慶應義塾大学医学部外科学（一般・消化器） 肝胆膵移植班 スタッフ紹介 八木洋 <a href="https://www.keio-hpbts.jp/about/surgeons-DrYagi">https://www.keio-hpbts.jp/about/surgeons-DrYagi</a>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松本 一宏  (Matsumoto Kazuhiro)  (80366153)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師   (32612)	
研究分担者	足達 俊吾  (Adachi Shungo)  (90783803)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究チーム長   (82626)	
研究分担者	五島 直樹  (Goshima Naoki)  (70215482)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究チーム長   (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------