

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17722

研究課題名（和文）SWPU systemを用いた新規腎臓再生法の構築

研究課題名（英文）Development of a novel kidney regeneration using the SWPU system

研究代表者

横手 伸也（Yokote, Shinya）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30459656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：1) HIF-PH阻害薬が再生腎臓に与える影響 膀胱付き後腎（クロアカ）を雄性ラットに移植。2群に分け、HIF-PH群にはRoxadustatを、コントロール群は偽薬を投与。移植4週後にSWPUを施行。移植8週後で新規腎臓の重量及び腎組織所見を評価した。HIF-PH群では、新規腎臓の重量は増加していたが、統計学的有意差を認めなかった。2) Tolvaptanが再生腎臓に与える影響 クロアカを雄性ラットに移植。2群に分け、tolvaptan群にはを tolvaptan投与、コントロール群は偽薬を投与し、再生腎の尿排泄量を検討した。tolvaptan群ではクロアカ尿量の増加する傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SWPUを用いた再生腎臓の大型化、尿量の増加を可能にする薬剤についての検討を行った。ある種の薬剤には再生腎臓の大型化や尿量の増加が期待できるという本研究の結果は、SWPUを用いた腎臓再生が臨床応用するために重要な所見であったと思われる。今後、研究を継続し、これらの知見を用いて実際にSWPUを用いた腎臓再生により腎不全動物の予後を改善することができれば、さらにSWPUを用いた腎臓再生の臨床応用に近づくと思われる。

研究成果の概要（英文）：1) Analysis of the effect of HIF-PH inhibitor administration on the development of regenerated kidneys.

Metanephroi with a bladder (cloaca) was transplanted into LEWIS rats. Rats were divided into two groups. The HIF-PH group received Roxadustat and the control group received a sham drug. SWPU was performed 4 weeks after transplantation. 8 weeks after transplantation new kidney weights and renal histology were evaluated. Although new kidney weight was increased in the HIF-PH group compared to the control group, there was no obvious significant difference in new kidney weight between the two groups. 2) Effect of Tolvaptan on regenerating kidneys. LEWIS cloaca is transplanted into rats. Rats were divided into 2 groups. The tolvaptan group received oral administration of tolvaptan, while the control group received received a sham drug orally. At 4 weeks after transplantation, SWPU was performed. tolvaptan group showed a trend toward increased urinary cloaca volume.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎臓再生

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

近年、世界中で腎臓病患者は増加しており、日本においても透析療法を受ける末期腎不全患者は増加傾向である。透析関連医療費は全体で1兆円以上を占め、医療費増大の一因となっている。また、腎臓は移植可能な臓器であるが、慢性的なドナー不足の状態である。もし腎臓再生が可能となり透析患者を減らすことができれば、医療費を大幅に削減することが可能と考えられる。

我々の研究室では、ヒト幹細胞をラット後腎(胎仔の腎臓)に注入し、幹細胞の足場として用いて腎臓への分化誘導を促すことにより、尿産生能力を持つヒト細胞由来の新規腎臓の作成に成功している(胎生臓器ニッチ法)(Yokoo T, et al. PNAS. 2005)。また、申請者は再生腎臓から産生する尿を持続的に体外に排泄するシステム(SWPU system)の構築に成功した(Yokote S, et al. PNAS. 2015)。しかし、申請者の新規腎臓は、無腎ラットの短期的な生命予後を改善するが、長期的な予後改善には至っていない。その原因としては、新規腎臓の大きさや、新規腎臓の排泄する尿量が不十分であることが推察される。そのため、このSWPU systemを用いた新規腎臓をいかにして大型化するか、新規腎臓の尿排泄量を増加させてゆくか、は腎臓再生を臨床応用してゆく上で重要な課題である。

### 2. 研究の目的

WPU systemを用いて再生した新規腎臓をさらに大型化し尿量を増加させる方法を開発し、臨床応用に向けての研究基盤を確立することを目標とし、以下の研究を行なった。

間葉系幹細胞やVEGFなどの増殖因子の投与が再生腎臓の大きさに与える影響の解析。

利尿剤Tolvaptanが再生腎臓の尿量増加に寄与するかの検討。

### 3. 研究の方法

間葉系幹細胞やVEGFなどの増殖因子の投与が再生腎臓の大きさに与える影響の解析。

LEWIS 雄性ラット(n=16)より皮下脂肪を摘出し、間葉系幹細胞 ADMSC を抽出。ADMSCs は FCM により、表面マーカー(CD90 陽性、CD29 陽性、CD34 陰性、CD45 陰性)を確認した。

妊娠 15 日の LEWIS 妊娠ラット(n=3)より胎仔を摘出し、顕微鏡的に腎原器(膀胱付後腎:以下クロアカ)採取。そのクロアカを先ほど雄性ラットの傍大動脈領域に1体につき1個移植した。ラットは3群(ADMSCs 群:n=4、VEGF 群:n=4、HGF 群:n=4、コントロール群:n=4)に分け、移植時より1週間おきに計6回(移植時、移植後1,2,3,4,5週目)ADMSCs 群にはADMSCs 1×10<sup>6</sup>個/PBS 1mLを、VEGF 群にはVEGF 3µg/PBS1mLを、HGF 群にはHGF 300µg/PBS 1mLを、コントロール群はPBS 1mLを尾静脈より投与した。移植後3週目に左腎摘出及びクロアカ膀胱と左尿管吻合を施行(SWPU 施行)。移植後6週間目(SWPU 後3週間)で安楽殺し、新規腎臓の重量、腎組織(Masson、TUMEL、CD68、collagen I 染色)を評価した。

HIF-PH 阻害薬の投与が再生腎臓の発育に与える影響の解析

妊娠 15 日の妊娠 LEWIS ラットの子宮より胎仔を摘出し、胎仔から膀胱付き後腎(クロアカ)を採取。採取したクロアカを、LEWIS 雄性ラットの傍大動脈領域に1体につき1個移植した。ラットは2群(HIF-PH 群、コントロール群)に分け、HIF-PH 群にはRoxadustat 50mg/kg 体重/隔日を経口投与し、コントロール群は偽薬を隔日経口投与した。移植4週後にSWPU(左腎摘出及びクロアカ膀胱と左尿管吻合術)を施行。移植8週後で安楽殺し、新規腎臓の重量及び腎組織所見を評価した。

利尿剤Tolvaptanが再生腎臓の尿量増加に寄与するかの検討。

妊娠 15 日の LEWIS 妊娠ラット(n=3)より胎仔を摘出し、顕微鏡的に腎原器(膀胱付後腎:以下クロアカ)採取。そのクロアカを先ほど雄性ラットの傍大動脈領域に 1 体につき 1 個移植し同時に左腎摘出施行した。ラットは 2 群(tolvaptan 群:n=4、コントロール群:n=4)に分け、移植時より、tolvaptan 群にはを tolvaptan 経口投与、コントロール群は偽薬を経口投与した。移植後 4 週目に左腎摘出及びクロアカ膀胱と左尿管吻合を施行(SWPU 施行)。その後のクロアカ腎からの尿排泄量を代謝ゲージで検討した。

#### 4 . 研究成果

間葉系幹細胞やVEGFなどの増殖因子の投与が再生腎臓の大きさに与える影響の解析。

ADMSCs 群、VEGF 群、HGF 群、コントロール群で再生腎臓の大きさを評価したが、4 群間で明らかな再生腎臓重量の差を認めなかった。腎組織学的評価も行ったが、4 群間で明らかな差を認めず、ADMSC や増殖因子投与による再生腎臓への影響は明らかではなかった。

HIF-PH 阻害薬の投与が再生腎臓の発育に与える影響の解析

HIF-PH 群では、コントロール群に比べ新規腎臓の重量は増加していたが、データにばらつきがあり両群間で新規腎臓重量に明らかな統計学的有意差を認めるに至らなかった( $P>0.05$ )。今後、投与条件の変更 や実験動物数を増やすなどさらなる検討が必要であると思われた。

また、腎組織所見についても解析を行なった。両群とも糸球体・尿細管などの nephron の発育は良好であった。

利尿剤Tolvaptanが再生腎臓の尿量増加に寄与するかの検討。

tolvaptan 群ではコントロール群に比べ、再生腎臓尿量の増加する傾向を認めた。そこで、tolvaptan 使用により SWPU 再生腎臓が無腎ラットの生命予後を改善しうるかを評価するため、以下追加実験を行った。LEWIS 雄性ラットを 2 群 (tolvaptan 群、コントロール群) に分け、tolvaptan 群には妊娠ラットの胎仔よりクロアカを摘出し移植する。移植後 4 週目に左腎摘出及びクロアカ膀胱と左尿管吻合を施行 (SWPU 施行)。移植後 6 週間目 (SWPU 後 2 週間) に右腎を摘出し無腎状態とし、tolvaptan 群には tolvaptan 内服開始し、代謝ゲージにて新規腎臓から排泄される尿量を測定し、両群間で生存時間の比較検討を行った。しかしながら、結果的に tolvaptan 群で生存期間の延長は認めなかった。

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〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------