

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22914

研究課題名（和文）腎臓再生医療の社会実装に向けた再生腎芽の凍結・融解法の確立

研究課題名（英文）Development of a cryopreservation technique for regenerated renal products to realize kidney regenerative medicine.

研究代表者

藤本 俊成（Fujimoto, Toshinari）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50818507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は以前に腎前駆細胞を注入した異種胎生期腎臓を移植することで、移植細胞由来の腎臓を再生する新たな異種再生治療法を開発した。臨床応用に向けて、異種胎生期腎臓の移植と腎前駆細胞の注入のタイミングを調整するために、異種後腎や腎前駆細胞などの腎再産物の凍結保存技術の確立が必須である。本研究では腎前駆細胞を注入した後腎を一塊にまとめて凍結保存する方法を確立した。凍結保存したキメラ後腎においても、移植した細胞由来のネフロンからなる腎臓が再生することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透析・移植治療の限界から、慢性腎不全に対する新規治療として腎臓再生医療の実現が求められている。実験室レベルではマウス-ラット間での腎臓再生に成功しているが、ヒト臨床応用にはいくつかハードルがある。その中で再生腎臓の凍結・融解技術の確立は根本的な課題であり、本研究成果は腎臓再生医療の実現化の重要な基盤となる。

研究成果の概要（英文）：Previously, we developed a novel method of xenogeneic regenerative medicine for patients with chronic kidney disease by grafting xeno-fetal kidneys injected with renal progenitor cells. To align the xeno-metanephros and renal progenitor cell timing for transplantation treatments, cryopreservation techniques of regenerated renal products such as xeno-metanephroi and renal progenitor cells should be established. In this study, we established a new method for simultaneously cryopreserving metanephroi injected with progenitor cells. We confirmed that even in cryopreserved chimeric metanephroi, transplanted cell-derived nephrons as well as fresh transplants grew.

研究分野：再生医学

キーワード：腎臓再生 再生医療 腎不全 胎生臓器補充法 凍結 前駆細胞 後腎

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

申請者は、げっ歯類間においてネフロン前駆細胞を除去した後腎に、外来性にネフロン前駆細胞を移植することで、移植細胞由来のネフロンを有する腎臓の再生に成功した (Yamanaka S, Nat. Commun., 2017, Fujimoto T, Sci Rep., 2019)。iPS 細胞からネフロン前駆細胞を誘導する手法は確立されており、CKD 患者由来 iPS 細胞から誘導したネフロン前駆細胞を細胞源として用いれば、患者自身のネフロンを有する腎臓を再生することが可能である。しかし本法は動物交配と胎仔の入手、iPS 細胞から前駆細胞の誘導、前駆細胞移植、そして患者への再生腎芽移植を同時に同所で行わざるを得ず、時間的・空間的制約が大きい。そのため本法の臨床応用を考えた場合、必要に応じ時間・場所を問わず供給可能である必要があり、再生腎芽の凍結・融解技術は必須である。

2. 研究の目的

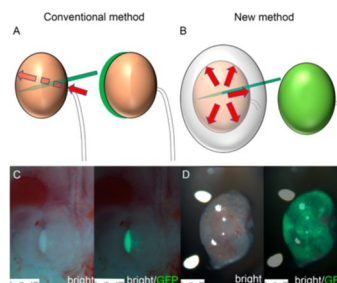
後腎単独もしくはネフロン前駆細胞単独での凍結保存法は過去に報告があるが、各々の凍結法は異なる。しかし後腎とネフロン前駆細胞を組み合わせた再生腎芽の凍結保存が試みられたことはない。本研究ではマウス再生腎芽で分化・再生能を保持可能な凍結・融解手法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以前に報告した腎発生ニッチ内のネフロン前駆細胞を薬剤投与にて特異的に除去可能な遺伝子組換えマウスを用いた。具体的には Six2-CreERT2 マウスおよび Floxed-stop-DTA (ジフテリア毒素 A フラグメント) マウスを交配し、その胎仔 (Six2-DTA マウス) を得た。同マウス後腎はタモキシフェン投与により Six2 陽性ネフロン前駆細胞除去が可能である。またここに他マウス腎前駆細胞を移植すると移植細胞由来のネフロンが再生することを確認している (Fujimoto T, Cell Rep., 2020)。

(1) ネフロン再生効率上昇に向けて新規細胞移植法の検討

従来は腎盂側からガラス針を穿刺し、腎被膜下へ細胞移植を行っていたが、技術的に困難かつ移植可能部位が限定していた。本研究では単離した後腎をゼラチン固定し、より細い穿刺針で後腎表層から細胞を注入する方法に改良することで、腎被膜下全域への細胞移植が可能となった。実際に Six2-DTA マウス後腎に従来法および新法で最大限の細胞移植を行い、各々を器官培養することで、ネフロン再生効率を評価した。



(2) 再生腎芽の凍結・融解法と最適な凍結保存のタイミングの検討

ガラス化凍結法を修正して適応することで再生腎芽の凍結・融解法を確立した。具体的には 7.5% エチレングリコール (EG) および 7.5% DMSO の基礎培地中に氷上で 15 分間平衡化、続いて 15% EG および 15% DMSO の基本培地にさらに 15 分間浸漬した後、速やかに液体窒素に浸漬し凍結した。解凍時は、1M スクロースの基礎培地に 42 °C で 1 分間浸漬し、0.5M スクロースの培地に移して室温に 3 分間置き、最後に基礎培地で 5 分間、2 回洗浄をした。さらに凍結・融解後の後腎に細胞を移植した群、細胞移植後の後腎を凍結・融解した群、凍結・融解をしないコントロール群で移植細胞数を揃えて器官培養を行うことで、再生ネフロン数を比較することで最適な凍結保存のタイミングを検討した。

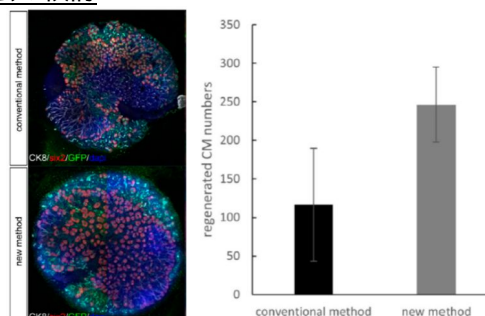
(3) 凍結・融解後の再生腎芽による in vivo での腎臓再生

(1)、(2) で最適化した条件で前駆細胞移植、凍結・融解した再生腎芽を免疫不全マウスに移植することで、in vivo で移植細胞由来ネフロンを有する腎臓の再生を試みた。

4. 研究成果

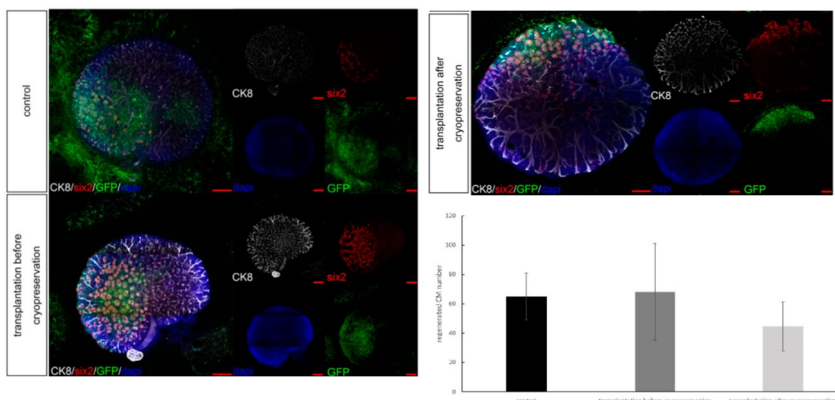
(1) ネフロン再生効率上昇に向けて新規細胞移植法の検討

従来法で移植した場合には腎臓辺縁にのみ細胞が定着、分化しているのに対して、新法では腎臓中央部を含む腎全域に細胞が定着、分化することを確認した。移植細胞により再生したネフロン数をカウントしたところ、新法において有意に多くのネフロンが再生していた。再生腎の機能に直結するであろうネフロン再生の効率を高める新規の細胞移植法を確立した。



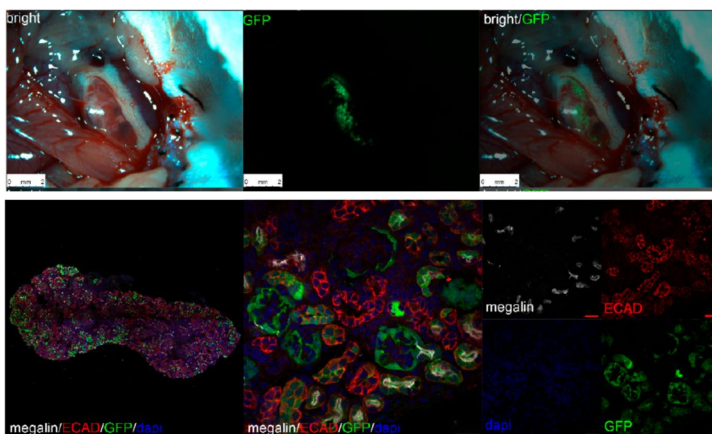
(2) 再生腎芽の凍結・融解法の確立と最適な凍結保存のタイミングの検討

各々の群で再生ネフロン数をカウントして評価したところ、移植手技による若干のバラつきは存在するものの、いずれの群でも再生ネフロン数に有意差はなかった。即ち任意のタイミングで凍結・融解をして問題ないことを示した。特に前駆細胞を移植した後の後腎である再生腎芽をネフロン再生能を保持したまま凍結・融解できたことは、臨床応用を考慮した際に有益な結果であった。



(3) 凍結・融解後の再生腎芽による in vivo での腎臓再生

新法で前駆細胞移植した Six2-DTA マウス後腎を凍結・融解し、NOG マウスに移植した。これにより再生腎芽は分化・発育し、移植細胞由来ネフロンを有する腎臓を再生した。再生した糸球体には NOG マウスの血管が侵入しており、再生腎芽が NOG マウスの循環系に組み込まれていることを確認した。即ち凍結・融解後の再生腎芽を用いて in vivo で腎臓再生をすることに成功した。



5. 結論

再生腎芽の凍結・融解法を確立した。凍結・融解後の再生腎芽より in vivo での腎臓再生に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takamura Tsuyoshi, Nagashima Hiroshi, Matsunari Hitomi, Yamanaka Shuichiro, Saito Yatsumu, Kinoshita Yoshitaka, Fujimoto Toshinari, Matsumoto Kei, Nakano Kazuaki, Okano Hirotaka James, Kobayashi Eiji, Yokoo Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a Cryopreservation Technique for Xenogeneic Kidney Grafts: Evaluation Using a Mouse Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 7237 ~ 7237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11237237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshinari Fujimoto, Shuichiro Yamanaka, Susumu Tajiri, Tsuyoshi Takamura, Yatsumu Saito, Naoto Matsumoto, Kei Matsumoto, Naoki Sugano, Takashi Yokoo
2. 発表標題 Development of a new nephron progenitor cell replacement system for application in human iPSCs-derived nephron progenitor cells
3. 学会等名 Japan Kidney Council
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本俊成
2. 発表標題 腎臓再生医療の現状
3. 学会等名 日本泌尿器科学会群馬地方会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------