

公益財団法人 寺岡記念育英会

2020年度 海外留学滞在費助成事業 研究活動報告書一覧

腎移植における慢性拒絶メカニズムの解明

岡山医療センター 泌尿器科 腫瘍・腎移植 光井洋介

・・・ 1

バイオ3Dプリンターを使用した人工心臓パッチによる心筋再生法の開発

川崎医科大学総合医療センター 外科 心臓外科 渡邊達也

・・・ 3

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

(表題)

(所属)岡山大学病院医歯薬総合研究科 泌尿器病態学

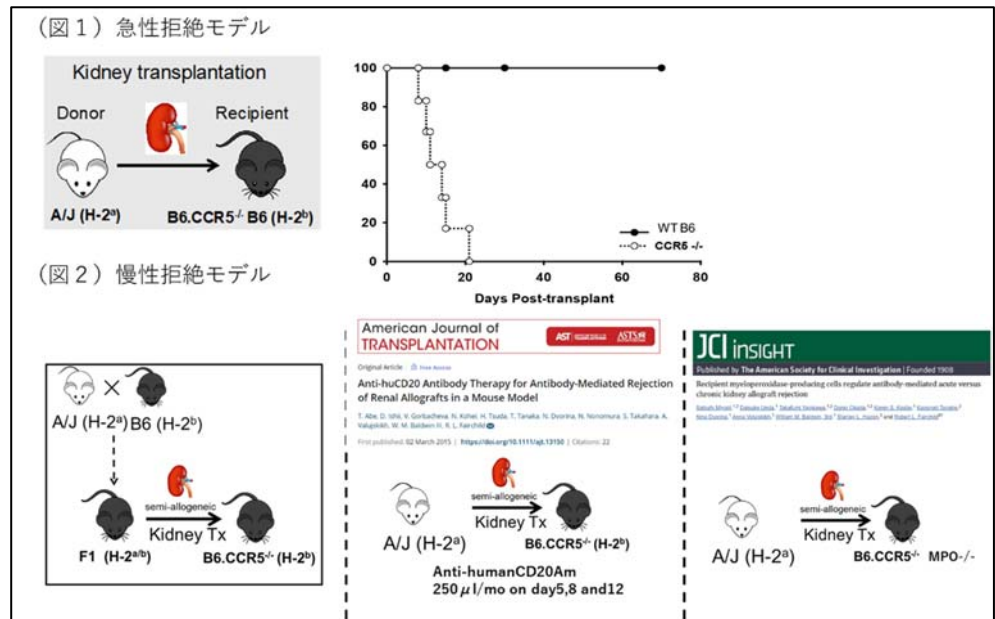
(氏名)光井 洋介

(概要)腎移植における慢性拒絶メカニズムの解明

1. 渡航先 Cleveland Clinic
2. 日程 2020年6月～2021年5月現在研究継続中(2024年まで予定)
3. 研究及びその成果の概要

研究の背景・目的

腎移植の拒絶メカニズムの解明にマウスを用いることは技術的にも難しく世界でも数か所しか行われていない。当研究室はマウス腎移植を確立している数少ない研究施設であり、さらに抗体関連急性拒絶を引き起こすマウスモデル(CCR5 knock out model)を確立している(図1)。このCCR5 KOマウスは急性拒絶



を惹起するモデルであるが、過去の研究過程でさらなる遺伝子のノックアウトや薬剤の投与を行うことで、結果的に慢性的な抗体関連拒絶を引き起こすことを報告している(図2)。しかし結果的に慢性拒絶を引き起こすことはわかっているが、その過程や詳細なメカニズムはわかっていない。今回の留学ではマウスの腎移植手技の習得と抗体関連拒絶メカニズムの解明を行った。

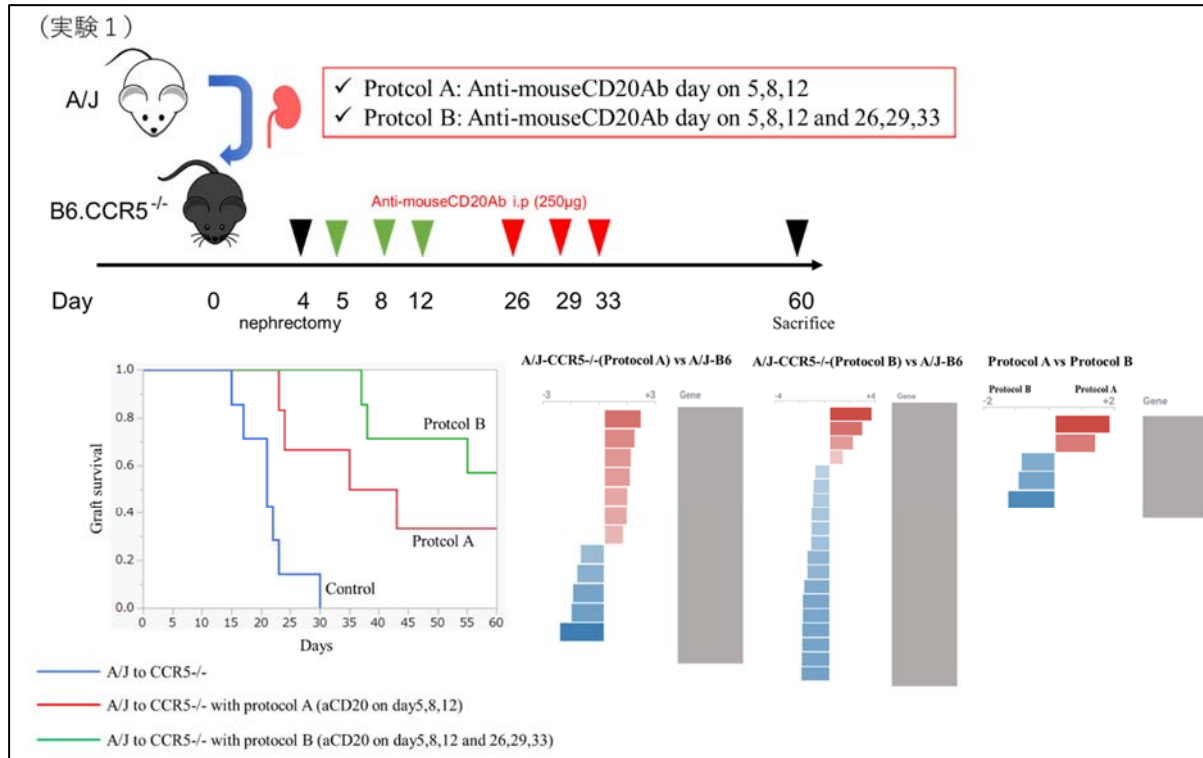
研究方法

まずはマウスの腎移植の手技の確立を行う。腎移植と比べると比較的簡単な心臓移植で血管縫合を練習しその後腎移植の手技の確立へと移行した。実験としては上記の慢性拒絶モデルマウスへの腎移植を行い、腎移植後の採血・検尿・腎組織の採取を行い、採血からは Donor specific antibody(DSA)・自己抗体の測定、組織からは RNA の抽出、遺伝子解析、病理学的組織の検討を行った。

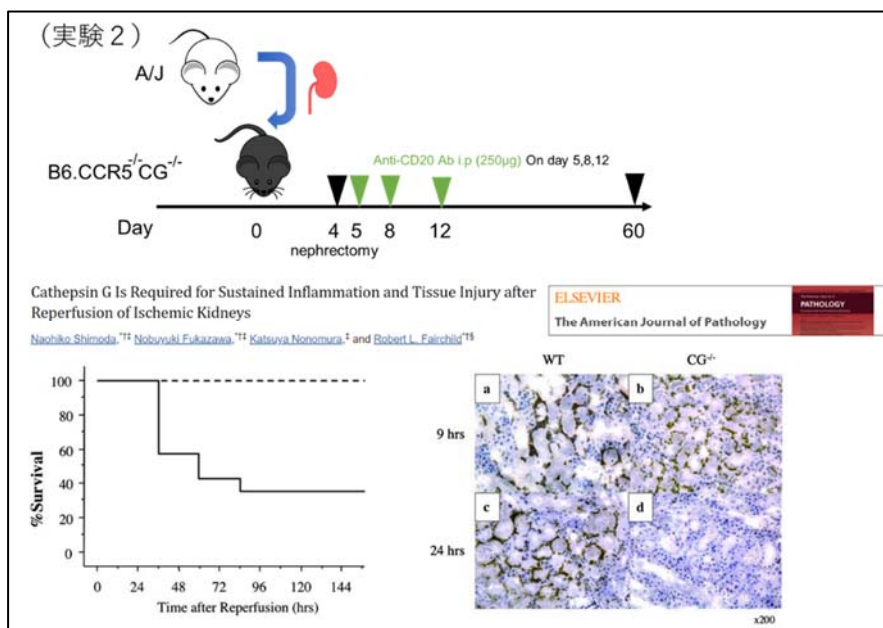
研究成果

実験1: anti CD20 ab を用いた慢性拒絶モデルを使用した。今回は Protocol A と B と 2 通りの投与量を用いて実験を行った。Protocol A(過去の報告)で慢性拒絶を惹起し、Protocol B で慢性拒絶の改善する

のではないかとこの仮説のもとに実験を行っている。実際に薬剤を追加投与した群では生存率が改善し、ナノストリングを用いた遺伝子解析でも 2 群に有意な差を認めている（未発表データのため特定の遺伝子は伏せている）。今後は 2 群における病理所見の検討や追加治療によるさらなる拒絶の抑制が可能かどうかを検討予定である。



実験 2 : CCR5 と Cathepsin G(CG)を Double Knock out したマウスモデルを使用した実験を並行して行っている。CG は好中球から放出される因子であり腎臓の虚血再灌流時の線維化に関連しているとされている。今回このダブルノックアウトマウスを用いることで慢性拒絶時の CG の線維化への関与、メカニズム、新しい治療戦略の開発を予定している。



(概要)

1. 渡航先

The University of Chicago, Department of Surgery, Section of Cardiac Surgery

2. 日程

2021年9月1日より研究開始。2022年4月現在研究継続中。

3. 研究及びその成果の概要

研究の背景

心不全は、心筋梗塞発症後の生存率の上昇、生存期間の延長から頻度が増加しており、より重要な疾患である。年間鬱血性心不全に関連する志望者は53,000人にのぼる。現在米国では、重症心不全に対して第一選択となる治療は心移植であるが、ドナー臓器の数の問題から年間約2,000件に限られる。

LVAD(left ventricular assist device)のような機械的補助技術は重症心不全に対する心移植の代替治療として発展してきている。しかし、LVADは左心不全を治療するためにデザインされた治療であるため右心不全が重大な問題点となる。現在は右心不全に対する長期使用可能なデバイスは開発されていない。LVADの有効性を高めるために右心機能を改善させる技術の開発が急務である。

心機能の改善や移植の代替療法となることを目指して心筋パッチ移植治療が多くの施設で取り込まれてきているが、大きな成果が出ているものは少ない。当ラボではbFGF(basic fibroblast growth factor)を添加したECM(extracellular matrix patch)を使用した右室移植実験で心機能の改善効果を報告している。しかし、十分な心機能改善効果が得られにくい原因として、scaffoldを使用していることが細胞収縮を阻害している可能性、またscaffoldを使用していない場合でも血管形成が不十分となるため十分な厚さ、強度のパッチが作成できないことにあると予想される。Scaffoldを使用しない心筋パッチ内での血管形成の仕組みを明らかにし、内部での血管形成を改善する方法を確立することで、臨床使用可能で有用な心筋パッチ作成の開発につながると期待される。

研究の目的

本研究では、spheroid間の血管形成について、spheroidを基とし、spheroid間の血管形成の評価を、バイオ3Dプリンターで作成したパッチを用いて明らかにすることを目的とした。

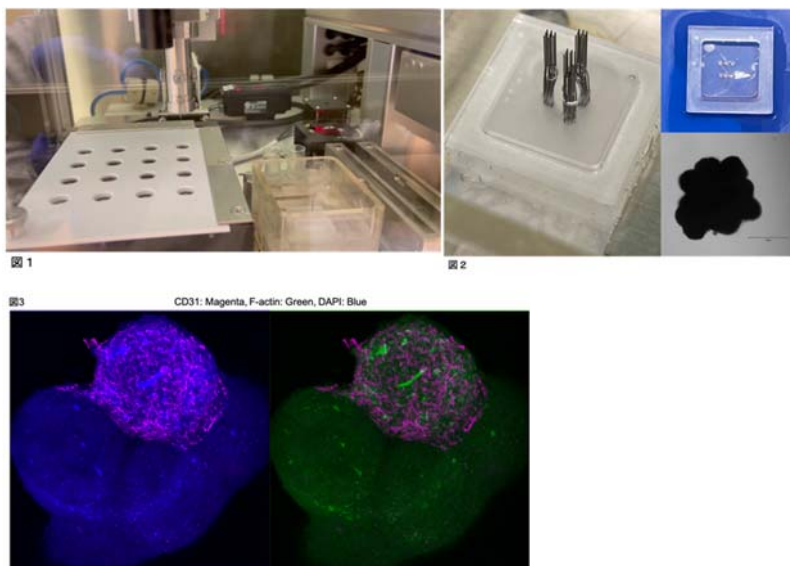
研究の方法

今回の実験では、spheroidを基とし作成したパッチ内での血管形成を評価するため、正確な間隔でspheroidを配列し、パッチを作成することが可能な3Dバイオプリンターを使用した。また、血管形成の評価には血管内皮細胞を使用した。

Cardiomyocyteに応用する前段階として、mMSC(mouse Mesenchymal stem cells)、HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)のspheroidを使用した。また、3Dバイオプリンターの設定条件の検討を行った。また、バイオプリンターでのプリントと併行して96well plate内でのspheroid間の融合による血管形成の評価を行った。

175ml flask を使用し、 1.0×10^6 cells/flask (mMSC), 2.0×10^6 cells/flask (HUVEC) の細胞を播種し、70-80% confluence となった後、TrypLE を添加、遠心分離し、細胞を回収した。細胞数を計測し、一定数の細胞を 96well plate に播種した。2 日間の培養ののち spheroid を 96well plate から回収し、3D バイオプリンターにセットした (図 1)。プリント後、needle 上で spheroid を培養し、needle から decannulate した (図 2)。Decannulate 後に 6well plate 内で数日間培養し、評価を行った。

96well 内での spheroid 融合実験では、3D バイオプリンターで使用した spheroid と同様の方法で作成し、mMSC spheroid と HUVEC spheroid を同一 well 内に混在させて培養し、融合させたのち 4,7,10 日の培養を行い、免疫組織学的評価を行った。免疫組織学的染色を行ったサンプルは confocal microscope を使用して撮影を行った (図 3)。Confocal microscope を使用して得られた 3次元データから、Fiji を使用して解析した。



研究の成果

3D バイオプリンターの機能異常や修理に時間を要したため、現在のところプリントして得られたサンプルは限られているが、mMSC を使用した予備実験では、overlap を 10%-15% に設定することで spheroid 間の癒合が十分となり、decannulation の際にパッチが離開してしまうことがなくなった。現在は、mMSC で使用したデザイン、設定条件を用いて human cell 同士の spheroid を使用したパッチを作成し、評価を継続している。

Spheroid 融合実験においては、培養日数が長くなるにつれて、CD31(血管内皮細胞)陽性となる範囲が有意に拡大することがわかった (図 4)。一方で CD31 陽性の領域に関しては培養期間が長いほど縮小していくことがわかった。陽性領域の縮小に関しては、培養期間が延長するほど、spheroid 間の結合が強くなり密度が濃くなり、パッチ全体のサイズが縮小していることを反映していると考えられる。この血管形成が spheroid 内の細胞の viability にどのように影響を与えるのか、また、培養方法の変更による血管形成の変化、viability の改善効果に関して、研究を進めていく予定である。

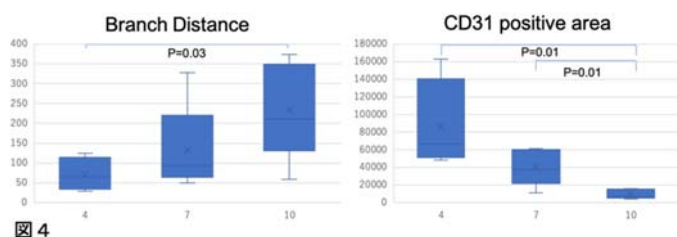


図 4