

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

藤本 瑛介

専攻分野：腎泌尿器外科学

コース：

指導教授：力石 辰也

主論文の題目：

Embryonic Kidney Function in a Chronic Renal Failure Model in Rodents

(慢性腎不全モデルでの胎生腎臓の検討)

共著者：

Shuichiro Yamanaka, Sho Kurihara, Susumu Tajiri, Luna Izuhara, Yuichi Katsuoka, Shinya Yokote, Kei Matsumoto, Eiji Kobayashi, Hiroataka James Okano, Tatsuya Chikaraishi, Takashi Yokoo

緒言

近年、腎代替療法は目覚ましい進歩を遂げている。腎臓再生領域における我々の目標は、機能的なヒト由来細胞に構成された腎臓を作ることである。以前に我々はヒト骨髄由来間葉系幹細胞をラット胎仔の腎臓発生領域に注入し、同調的にくみ込ませることで、尿やエリスロポエチンを産生する機能を持った腎組織を作り上げた。今回は、胎生期のラット腎臓と膀胱を一塊として摘出し、代替腎臓として用いた。将来的に透析患者へのヒト由来再生腎臓移植を視野に入れ、移植腎臓は腎不全環境でも機能しうるのかを検討した。

方法・対象

慢性腎不全環境の再現は5/6腎梗塞モデルを用いた。妊娠15日目の雌Lewisラットの胎仔(ドナー)の腎臓と膀胱を一塊として摘出し、10-15週齢の雄Lewisラット(レシピエント)の腹腔内に移植した。その後レシピエントの血管を巻き込み、成長した移植腎臓と膀胱を実体顕微

鏡下でレシピエントの左尿管と吻合し、排泄路を確立した。同時に、レシピエントの左腎摘出、右腎動脈分枝の一部を結紮し、5/6腎梗塞環境を再現した。最終的にレシピエント由来の尿は作られないよう、右側のレシピエント尿管は結紮し、移植腎由来の尿を回収し、移植腎のみによる生命予後延長時間を測定した。その際フロセミドの負荷の検討と、移植腎の mRNA 解析を行った。続いて、luciferase 全身発現ラット(自治医科大学)の胎生腎を雄 Lewis ラット(レシピエント)に移植し、吻合群(Rat1)と非吻合群(Rat2, 3)にわけ、IVIS(In vivo imaging system)で信号強度を測定した。データは mean ± standard error で示した。統計解析は Student T test、one-way ANOVA with Turkey's post hoc test、Kaplan-Meier 法(log-rank test)で行った。なお本研究は、東京慈恵会医科大学動物実験規程に則り、同委員会の審査を経て行った(実験番号 2015-032)

結果

非腎不全環境下で成長した移植腎群(n=5)と腎不全環境下で成長した移植腎群(n=8)の生存期間に有意な差は見られなかった(median survival:70.5 h vs 74.5 h; p=0.331)。フロセミド投与群(n=9)と Phosphate buffered saline 投与群(n=7)を比較すると、有意にフロセミド投与群で尿量は増加した(p<0.05)。移植腎の mRNA 解析は、尿細管マーカーである、Na-K-Cl cotransporter 2、Aquaporin 2 だけでなく、Ca 代謝に関わる Cyp27b1 を発現していた。さらに IVIS を用いることで、移植腎の生着をモニタリングすることが可能であった。移植腎尿管吻合群で高い信号強度の持続を認め、非吻合群では排泄路が確立していないために水腎症となり、信号強度が減弱した。病理学的にも吻合群において、移植腎の尿細管構造は保たれていることがわかった。

考察

新生腎臓は将来的に慢性腎不全環境においても機能しなくてはならない。慢性腎不全環境は、幹細胞などの未分化な細胞の新生血管能の低下をもたらすとされている。また、腎不全の母体からの胎仔腎臓の糸球体数が少ないことも知られている。今回我々は 5/6 腎梗塞モデルを用いて尿毒症環境を再現することで、胎生腎臓の機能、発育を検討した。まず、5/6 腎梗塞モデルは血清クレアチニン、尿素窒素の値から腎不全環

境を安定して再現できた。そして、適切な移植腎尿管吻合を行うことで、移植腎は水腎症を回避でき、尿を産生し続けた。また、移植腎は利尿薬に良好に反応するだけでなく、Ca 代謝に関わる *cyp27b1* を発現しており、内分泌能も有している可能性が示唆された。移植腎の生命予後改善効果は、以前に報告した非腎不全環境下で成長した移植腎のモデルと有意な差は見られず、これは慢性腎不全環境であっても移植腎は機能することを示している。さらに胎生腎を追加し移植することで生命予後の延長を図った。しかし、追加した移植腎は適切な吻合時期を検討しなければ十分に能力を発揮できない可能性が示唆された。そこで、我々は *luciferase* を全身発現する *transgenic rat* を移植腎として用いることで、移植腎の *viability* を予測することに成功した。これにより、個々の移植腎の発育に合わせて適切な時期に移植腎機能を評価することが可能となった。今後は移植腎をモニタリングしながら、より適切な移植時期を検討する必要がある。

結論

胎生期の腎臓と膀胱は、慢性腎不全環境下においても機能することが明らかとなり、移植腎機能を IVIS でモニタリングすることが可能であった。