

Title	新規腎臓再生治療に向けた組織再構築を担う浸潤細胞群の解析
Sub Title	Characterization of infiltrating cell populations contributing to renal tissue reconstruction
Author	櫛笥, 博子(Kushige, Hiroko) 小島, 英哲(Kojima, Hideaki)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	我々はブタ腎臓における脱細胞化骨格の縫着実験により骨格内で細胞浸潤・組織再構築が誘導されることを報告した (Tajima et al., 2022)。続いて別のアプローチとして脱細胞化骨格をゲル化し、ラット腎臓の部分切除部位へ注入することで領域内の細胞浸潤や組織再構築を評価した (Kushige et al., 2023, J Biomed Mater Res B Appl Biomater , 第24回日本再生医療学会総会にて発表)。さらに、ブタ腎臓へ縫着した骨格内の浸潤細胞群Single cell RNA-seq解析からは腎臓発生期の前駆細胞や成熟細胞と類似する特徴を持つ細胞群の存在が示唆された。 Our research focuses on regenerative medicine using decellularized extracellular matrix (dECM). In our previous study, we demonstrated that dECM scaffolds sutured to pig kidneys served as a scaffold for infiltrating cells and induced tissue reconstruction (Tajima et al., 2022, NPJ Regen Med). Building on this, we took a structurally different approach by injecting solubilized dECM into the partial resection sites of rat kidneys, where it formed a hydrogel in situ to fill the defect. We evaluated cell infiltration and tissue reconstruction in the hydrogel-injected areas and published the results in J Biomed Mater Res B Appl Biomater (Kushige et al., 2023). Furthermore, single-cell RNA-seq analysis of cells infiltrating dECM scaffolds sutured into pig kidneys suggested populations with characteristics similar to renal precursor/progenitor cells and mature cells. Collectively, these results may provide fundamental insights into renal regeneration and future therapies.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2020～2024 課題番号：20K17563 研究分野：生体医工学、発生学、幹細胞学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K17563seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 7 年 6 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2024

課題番号：20K17563

研究課題名（和文）新規腎臓再生治療に向けた組織再構築を担う浸潤細胞群の解析

研究課題名（英文）Characterization of infiltrating cell populations contributing to renal tissue reconstruction

研究代表者

櫛笥 博子 (Kushige, Hiroko)

慶應義塾大学・殿町先端研究教育連携スクエア・特任助教

研究者番号：90723065

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）：我々はブタ腎臓における脱細胞化骨格の縫着実験により骨格内で細胞浸潤・組織再構築が誘導されることを報告した (Tajima et al., 2022)。続いて別のアプローチとして脱細胞化骨格をゲル化し、ラット腎臓の部分切除部位へ注入することで領域内の細胞浸潤や組織再構築を評価した (Kushige et al., 2023, J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 第24回日本再生医療学会総会にて発表)。さらに、ブタ腎臓へ縫着した骨格内の浸潤細胞群Single cell RNA-seq解析からは腎臓発生期の前駆細胞や成熟細胞と類似する特徴を持つ細胞群の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は再生しないと考えられてきた腎臓において、脱細胞化により得られた細胞外マトリックス（骨格／ゲル）を細胞の足場とすることで細胞浸潤・組織再構築が促されることを見出した。さらに、個々の浸潤細胞群の特性や組織再構築の過程に関する結果は、腎臓再生機構の理解や新規の腎臓再生治療に向けた非常に重要な基礎的知見となった。

研究成果の概要（英文）：Our research focuses on regenerative medicine using decellularized extracellular matrix (dECM). In our previous study, we demonstrated that dECM scaffolds sutured to pig kidneys served as a scaffold for infiltrating cells and induced tissue reconstruction (Tajima et al., 2022, NPJ Regen Med). Building on this, we took a structurally different approach by injecting solubilized dECM into the partial resection sites of rat kidneys, where it formed a hydrogel in situ to fill the defect. We evaluated cell infiltration and tissue reconstruction in the hydrogel-injected areas and published the results in J Biomed Mater Res B Appl Biomater (Kushige et al., 2023). Furthermore, single-cell RNA-seq analysis of cells infiltrating dECM scaffolds sutured into pig kidneys suggested populations with characteristics similar to renal precursor/progenitor cells and mature cells. Collectively, these results may provide fundamental insights into renal regeneration and future therapies.

研究分野：生体医工学、発生学、幹細胞学

キーワード：脱細胞化 細胞外マトリックス 浸潤細胞 組織再構築 腎臓

※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

腎臓では機能温存のため 4cm 未満の腎細胞がんの治療には部分切除が広く推奨されているが、切除部位は体内で再生することなく瘢痕化するため、腎機能低下は免れないという大きな課題がある。そこで我々は腎機能回復を目指した新規治療法の開発に向け、臓器から細胞を除去した脱細胞化骨格（脱細胞化により得られた細胞外マトリックス Decellularized Extracellular Matrix, dECM）を足場とした腎臓再生の研究に取り組んできた（図 1）。

興味深いことに、我々の研究では、ブタ腎臓の脱細胞化骨格を部分切除したブタ腎臓の切断面に縫着したところ、体内では再生しないと考えられてきた糸球体や尿細管構造が骨格内で再構築され、血流の再開が認められた (Tajima et al., 2022, NPJ Regen Med)。これらのデータは、縫着した腎組織から骨格内へ浸潤した細胞群が組織再構築を担ったことを示唆しており、腎臓再生治療に向けた重要な基礎的知見となった。

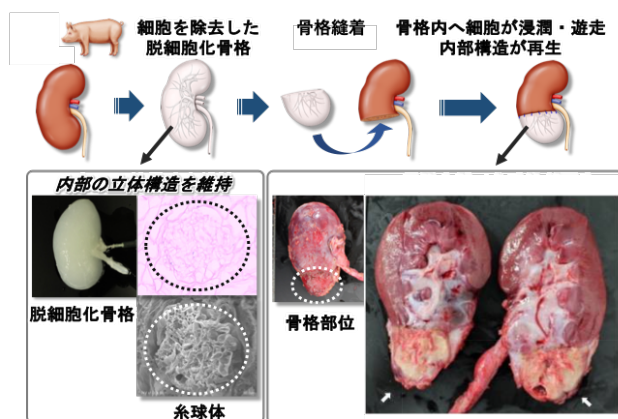


図1 脱細胞化骨格を足場とした腎臓再生

細胞外マトリックス (Extracellular matrix, ECM)

生体内で細胞に構造的な支持と機械的な刺激を与え、含有する様々な成分・成長因子等と細胞の相互作用を通して細胞の生存、増殖、移動、接着、分化などに影響を与えている。

2. 研究の目的

従来、腎臓は再生しないと考えられてきたが、近年では組織幹細胞や前駆細胞の性質を持つ細胞群や幹細胞ニッチの存在が報告・議論された。腎臓再生には、損傷部位に“幹細胞・前駆細胞が遊走し、分化する”、“分化した上皮細胞から新たな尿細管上皮細胞が分化する”などの可能性が考えられているが、これらの詳細な知見は蓄積されていない。上述の我々の先行研究は、損傷で惹起された自己再生シグナルにより幹細胞や前駆細胞、脱分化した細胞等が損傷部位へ遊走し、骨格の特性がこれらの細胞生着・浸潤や組織再構築を可能にしたことを示唆するものである。そこで本研究では、「どのような特性・多様性をもった細胞群が骨格内浸潤・組織再構築を担うのか?」、「どのように組織を再構築していくのか?」という学術的な問いに対して、腎臓再生を担う個々の細胞に着目し、浸潤細胞群の細胞特性と組織再構築過程の解析に取り組む（図 2）。これらの成果により、新規治療法の開発に向けた腎臓再生機構の理解や薬剤添加等による高度かつ安定的な再生促進技術の開発に繋げることを目指す。

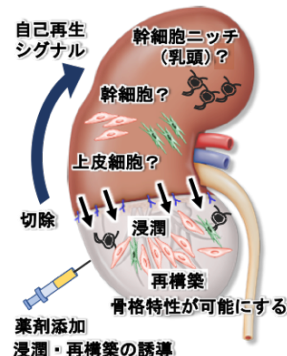


図2 自己再生治療に向けた研究

3. 研究の方法

(1) ラット腎臓における部分切除部位への dECM ハイドロゲル注入実験

我々はこれまでに脱細胞化骨格の縫着実験により骨格内への細胞浸潤や組織再構築を解析してきたが、別のアプローチとして、脱細胞化骨格を酵素処理することにより得られた可溶化 dECM を部分切除したラット腎臓に注入することで dECM ハイドロゲル内への細胞浸潤や組織再構築過程の解析を試みた。(これらの成果は、Kushige et al., 2023, J Biomed Mater Res B Appl Biomater にて論文発表を行なった。)

① 脱細胞化骨格ゲル (dECM ハイドロゲル) の作製と性状解析

dECM ハイドロゲルは、ゲッティンゲンミニブタの腎臓を界面活性剤による洗浄と酵素消化することにより作製した。dECM ハイドロゲルの作製プロセスでは脱細胞化および可溶化の際に ECM 構造が過度に破壊されることが懸念されるため、ゲル化能や微細多孔構造の評価、粘性・弾性の測定、プロテオミクス解析、血管内皮細胞や腎上皮細胞を用いた細胞遊走の評価等により浸潤細胞の足場となる dECM ハイドロゲルの性状解析を行い、生体適合性・細胞親和性を評価した。

② ラット腎臓における部分切除部位への dECM ハイドロゲル注入

ラット腎臓の上部と下部の両極で腎部分切除を行い、作製した可溶化 dECM を注入した (図 3)。8 および 16 mg/ml の可溶化 dECM はどちらも欠損部位を十分に満たし、注入後 30 分以内にゲル化した。そこで、ゲル化後に腎臓を体内に戻し、2, 3, 4 週間後に腎臓を摘出した。正常組織、ハイドロゲル注入領域、注入なしの部分切除部位に対して HE 染色および血管内皮細胞マーカー CD31、近位尿細管マーカー AQP1、糸球体マーカー Nephritin、遠位尿細管マーカー E-cadherin、間葉系マーカー Vimentin、増殖マーカー Ki-67 等の抗体を用いた免疫染色を行なった。

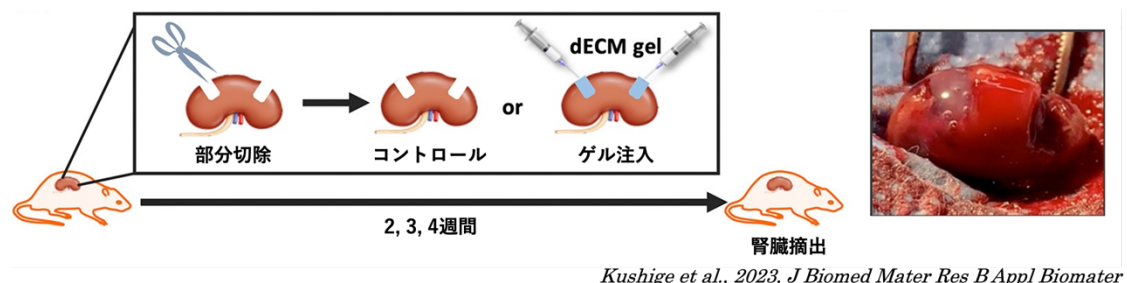


図3 ラット腎臓におけるdECMハイドロゲル注入実験

(2) ブタ腎臓における部分切除部位への脱細胞化骨格の縫着実験

上述の先行研究 (Tajima et al., 2022, NPJ Regen Med) と同様に脱細胞化骨格をブタ腎臓の部分切除部位に縫着し、4 週間後に腎臓を摘出して骨格内細胞の Single cell RNA-seq 解析と組織学的な解析を行うことで浸潤細胞群の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) ラット腎臓における部分切除部位への dECM ハイドロゲル注入実験

① 脱細胞化骨格ゲル (dECM ハイドロゲル) の作製と性状解析

図 4 に示した手順で dECM ハイドロゲルを作製した。得られた可溶化 dECM から調製した 8 および 16 mg/ml dECM ハイドロゲルは、市販の 3 mg/ml コラーゲン I ハイドロゲルと同様に 37℃ で自己集合してゲル化した。ハイドロゲルの多孔性は、細胞の生存に必要な栄養素、ガス、老廃物の交換を可能とする。そこで、Cryo-SEM 画像から構造を評価したところ、すべてのハイドロゲル

ルでランダムに配向した線維状の構造と微細多孔構造を有していることが示された（図 5）。また、プロテオミクス解析からは腎臓 ECM の主要な構成成分が検出され、ハイドロゲル作製プロセスにおいて ECM 成分が保持されていたことが確認された。さらに、作製した dECM ハイドロゲルの弾性は生体腎臓と同程度であり、dECM ハイドロゲルに包埋した腎上皮細胞および血管内皮細胞はランダムな細胞遊走を示した。これらの結果より、作製した dECM ハイドロゲルは生化学的および物理学的に生体内に近い環境を提供する生体適合性・細胞親和性を有していることが示唆された。

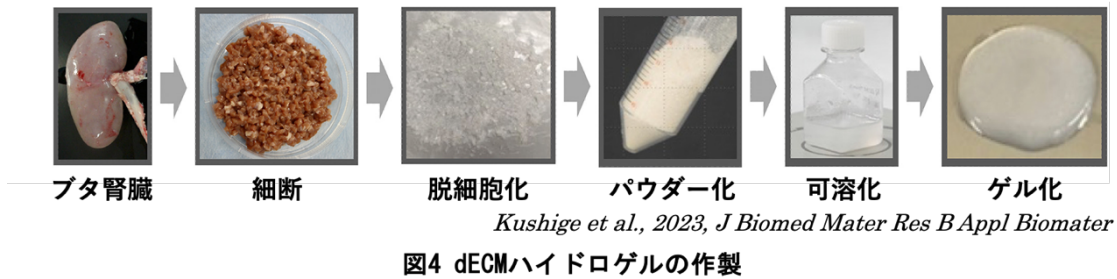


図4 dECMハイドロゲルの作製

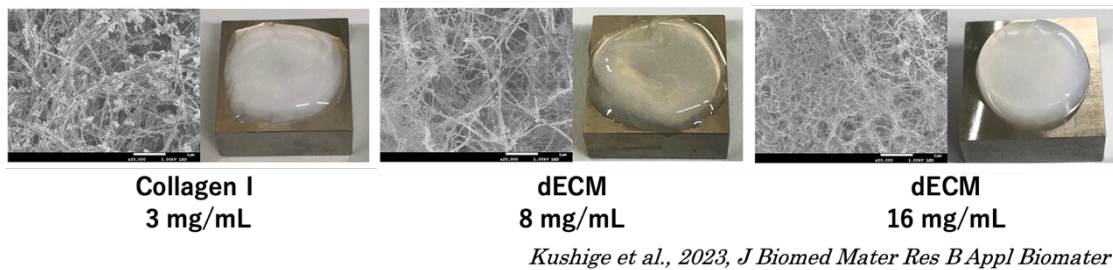
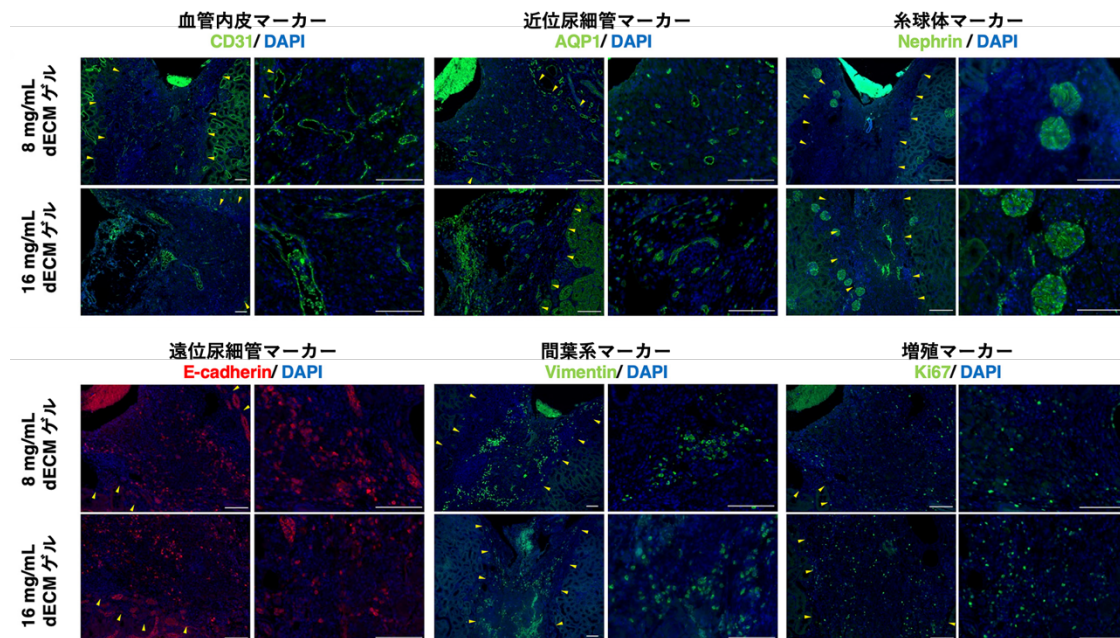


図5 ハイドロゲルの微細多孔構造

② ラット腎臓における部分切除部位への dECM ハイドロゲル注入

HE 染色法を用いて正常腎組織、2, 3, 4 週間後の dECM ハイドロゲル注入領域、注入なしの部分切除部位の組織学的解析を行なった。注入なしの組織では切除部位の外観は欠損したままの状態に近く、組織や細胞の存在はほとんど認められなかった。一方、dECM ハイドロゲルを注入した組織では切除部位に領域が保たれ、細胞浸潤が認められた。興味深いことに、2, 3 週間後の注入領域では腎臓の発生初期に類似すると考えられる細胞凝集や構造体が観察された。そこで、レーザーマイクロダイセクションによる特徴的な領域の切り出しおよび RNA-seq 解析を行う準備を進めたが、機器故障により中断となっている。一方、4 週間後の注入領域（図 6）では、血管内皮細胞マーカー CD31 陽性細胞および近位尿細管マーカー AQP1 陽性細胞は注入領域の中心部に多く存在して管状構造を形成し、CD31 陽性細胞の周辺には血球が観察された。これらの結果は、注入領域において血管新生と尿細管構成細胞の浸潤が誘導されたことを示唆した。糸球体マーカー Nephron 陽性細胞は中心部では観察されなかったものの、介入部位の周辺で糸球体構造を維持していることが観察された。また、遠位尿細管マーカーである E-cadherin 陽性細胞は介入部位の周囲に管状構造を形成していた他、注入領域の中心部に多く観察された。間葉系マーカー Vimentin 陽性細胞および増殖マーカー Ki67 陽性細胞も注入領域の中心部に多く観察された。



Kushige et al., 2023, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*

図6 ラット腎臓におけるdECMハイドロゲル注入領域(4週間後)

このように、ラット腎部分切除部位への dECM ハイドロゲル注入実験では 4 週間後の注入領域において尿細管の構成細胞群や高い増殖活性を持つ宿主細胞群の浸潤、血管新生が観察された。現時点では 2, 3 週間後に見られた細胞集団や構造体のプロファイルは不明であり、また 4 週間後の組織では糸球体の再構築には至らなかったが、本研究は複雑な構造を持つ腎臓において dECM ハイドロゲルを足場として臓器特異的な細胞群の浸潤や血管新生が誘導され、組織修復に寄与することを示唆した。

(2) ブタ腎臓における部分切除部位への脱細胞化骨格の縫着実験

部分切除したブタ腎臓へ縫着した dECM 骨格を 4 週間後に摘出し、骨格内に存在する浸潤細胞群の Single cell RNA-seq 解析を行なった。ヒト等における腎臓発生期や成熟期のデータを基に特徴的な遺伝子群について発現解析を行った結果、今回抽出した骨格領域における浸潤細胞群は全ての腎臓構成細胞を網羅的に満たしたわけではないものの、種々の前駆細胞や成熟細胞の遺伝子発現と類似する特徴を持つ細胞群の存在が示唆された。今後、組織学的解析と合わせて更なる解析を進め、論文化することを目指す。

<引用文献>

Tajima K, Yagi H, Morisaku T, Nishi K, Kushige H, Kojima H, Higashi H, Kuroda K, Kitago M, Adachi S, Natsume T, Nishimura K, Oya M, Kitagawa Y.

An organ-derived extracellular matrix triggers in situ kidney regeneration in a preclinical model., *NPJ Regen Med.* 2022 28;7(1):18. doi: 10.1038/s41536-022-00213-y.

Kushige H, Amano Y, Yagi H, Morisaku T, Kojima H, Satou A, Hamada KI, Kitagawa Y.

Injectable extracellular matrix hydrogels contribute to native cell infiltration in a rat partial nephrectomy model., *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2023 ;111(1):184-193. doi: 10.1002/jbm.b.35144.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hideaki Kojima*, Hiroko Kushige*, Hiroshi Yagi, Takayuki Nishijima, Nobuko Moritoki, Narihito Nagoshi, Yutaka Nakano, Masayuki Tanaka, Shutaro Hori, Yasushi Hasegawa, Yuta Abe, Minoru Kitago, Masaya Nakamura, Yuko Kitagawa (*These two authors contributed equally to this work.)	4. 巻 32
2. 論文標題 Combinational Treatment Involving Decellularized Extracellular Matrix Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells Increased the Efficacy of Cell Therapy in Pancreatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09636897231170437	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 —

1. 著者名 Hiroko Kushige, Yuki Amano, Hiroshi Yagi, Toshinori Morisaku, Hideaki Kojima, Akiko Satou, Ken-Ichi Hamada, Yuko Kitagawa	4. 巻 111(1)
2. 論文標題 Injectable extracellular matrix hydrogels contribute to native cell infiltration in a rat partial nephrectomy model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 184-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.35144	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 —

1. 著者名 Kazuki Tajima, Hiroshi Yagi, Toshinori Morisaku, Kotaro Nishi, Hiroko Kushige, Hideaki Kojima, Hisanobu Higashi, Kohei Kuroda, Minoru Kitago, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Kumiko Nishimura, Mototsugu Oya, Yuko Kitagawa	4. 巻 7:18
2. 論文標題 An organ-derived extracellular matrix triggers in situ kidney regeneration in a preclinical model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj regenerative medicine	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-022-00213-y	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 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫛笥 博子
2. 発表標題 脱細胞化により得られた細胞外マトリックス(dECM)を用いた腎組織再構築の解析
3. 学会等名 第24回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 榑筒 博子
2. 発表標題 脱細胞化により得られた細胞外マトリックスハイドロゲルと間葉系幹細胞を組み合わせた痔炎の細胞治療
3. 学会等名 第24回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2025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
研究協力者	小島 英哲	慶應義塾大学・医学部	
	(Kojima Hideaki)	(32612)	

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