

腎臓再構築に向けた脱細胞化腎臓の細胞マトリクス残存性への影響

*1 芝浦工業大学大学院理工学研究科システム理工学専攻,

*2 東京医科歯科大学生体材料工学研究所, *3 芝浦工業大学システム理工学部

松浦 黎*1, 木村 剛*2, 岸田 晶夫*2, 中村 奈緒子*3

Rei MATSUURA, Tsuyoshi KIMURA, Akio KISHIDA, Naoko NAKAMURA

1. 目的

腎臓の濾過機能は、3層で構成される血液尿関門が働き、特に糸球体基底膜 (GBM) が重要な役割を果たすことに注目した。また、従来の脱細胞化処理で用いられるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は強い洗浄力を有しているため、構造破壊を起こすことも懸念されている¹⁾。本研究では、構造保持の役割を果たすと考えられる高静水圧 (HHP) 処理を SDS 処理と併用することで、基底膜および細胞の接着に寄与する細胞外マトリクス (ECM) を多く保持した脱細胞化腎臓の作製を目指した。また、ECM 残存性が血管内皮細胞の接着性および局在に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

ラットから腎臓を摘出し、脱血処理後、構造保持のために HHP 印加した。その後、SDS および DNase (deoxyribonuclease) 溶液で脱細胞化処理を灌流によって行い (24 hr, 1.6 ml/min), 脱細胞化腎臓を作製した。脱細胞化の定量評価として残存 DNA 定量, 残存タンパク質定量, 組織学的評価として HE (hematoxylin eosin) 染色, Laminin の免疫蛍光染色を行った。

次に、ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) を用いて ECM 残存性の異なる脱細胞化腎臓に細胞播種を行った。細胞接着性を HE 染色および Calcein-AM 染色, DNA 定量で評価した。

3. 結果・考察

脱細胞化評価の残存 DNA 定量, 残存タンパク質定量から HHP 処理を併用することで、タンパク質を保持し, DNA 量を減少させることができたといえる。

次に、HE 染色では HHP 条件下でタンパク質を染色するエオジンが濃く染色されたことから、HHP 処理が高圧であるほど ECM 構造が保持されていることが示唆された。Laminin の免疫蛍光染色において SDS のみの処理では糸球体のみが Laminin 陽性であったことから、HHP 条件下では全体的に Laminin 陽性であることがわかった。以上から、

細胞接着に關与する Laminin 分布の異なる種々の脱細胞化腎臓を作製できたといえる。

ECM 残存性の異なる脱細胞化腎臓に細胞播種を行い、Calcein-AM 染色から、SDS のみの処理では HUVEC の接着が観察された。一方、HHP 条件下では糸球体内には観察されなかったものの、血管部への接着がより多く観察された。HE 染色でも同様に、SDS のみでは糸球体内に HUVEC の接着が多く、HHP 条件下では接着が少なかった。この理由として、HHP 条件下では全体的に Laminin を含む ECM が多く保持されており、HUVEC が糸球体に到達する前に細胞脈に接着したためであると考えられる。以上より、ECM 残存性が細胞接着性および細胞局在に影響することが示唆された。

4. まとめ

SDS 処理と HHP 処理を併用して腎臓の脱細胞化処理を行い、ECM 残存性や細胞接着に關与する Laminin 分布の異なる脱細胞化腎臓を作製できた。また、播種した HUVEC が Laminin の分布の違いによって、細胞局在が異なるとわかった。以上より、ECM の残存程度によって細胞接着性と細胞局在が異なることが明らかとなった。

5. 独創性

腎臓の濾過機能を担う血液尿関門の再構築には、GBM を構成する ECM を保持した脱細胞化腎臓の作製が必要である。従来、SDS を用いて脱細胞化腎臓を作製し、腎臓の再構築を行っており、SDS のみの脱細胞化処理では ECM が減少することがわかっている。そのため、HHP は構造保持の役割があると考えられていることから、SDS と併用することで、細胞成分を除去しつつ、ECM を保持した脱細胞化腎臓を作製できると考えた。以上から、HHP を利用することで ECM 残存性・構造保持性の異なる脱細胞化腎臓を作製、比較することができ、この点が本研究の独自性である。

本稿のすべての著者には規定された COI はない。

文 献

- 1) Kobayashi M, Ohara M, Hashimoto Y, et al: Effect of luminal surface structure of decellularized aorta on thrombus formation and cell behavior. *PLoS One* **16**: e0246221, 2021

■ 著者連絡先

芝浦工業大学大宮キャンパス
(〒337-8570 埼玉県さいたま市見沼区深作307)
E-mail. mf21116@shibaura-it.ac.jp