




2021年度

大学院生が論文化の過程で学んだこと

(高村、齋藤、松本、松井、木下)



Techniques of orthotopic renal transplantation. II. Size-matched porcine grafts in monkey recipients

Tsuyoshi Takamura¹ , Hiroshi Sasaki² , Haruyuki Hirayama³ , Akihiko Kiyoshi⁴ , Makoto Inoue⁵ , Kenji Matsui¹ , Naoto Matsumoto¹ , Yatsumu Saito¹ , Toshinari Fujimoto¹ , Susumu Tajiri⁶ , Shuichiro Yamanaka⁶ , Kei Matsumoto⁶ , Takeshi Miyawaki⁷ , Takashi Yokoo⁶ , Eiji Kobayashi^{8,*} 

1. MD. Division of Nephrology and Hypertension – Department of Internal Medicine – The Jikei University School of Medicine – Tokyo, Japan.

2. PhD. Department of Urology – The Jikei University School of Medicine – Tokyo, Japan.

3. MD. Department of Plastic and Reconstructive Surgery – The Jikei University School of Medicine – Tokyo, Japan.

4. MS. Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd. – Osaka, Japan.

5. PhD. Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd. – Osaka, Japan.

6. PhD. Division of Nephrology and Hypertension – Department of Internal Medicine – The Jikei University School of Medicine – Tokyo, Japan.

7. PhD. Department of Plastic and Reconstructive Surgery – The Jikei University School of Medicine – Tokyo, Japan.

8. PhD. Department of Kidney Regenerative Medicine – The Jikei University School of Medicine – Tokyo, Japan.

ABSTRACT

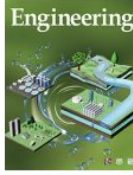
Purpose: As a classical xenotransplantation model, porcine kidneys have been transplanted into the lower abdomen of non-human primates. However, we have improved upon this model by using size-matched grafting in the orthotopic position. The beneficial aspects and surgical details of our method are reported herein. **Methods:** Donors were two newborn pigs (weighting 5 to 6 kg) and recipients were two cynomolgus monkeys (weighting, approximately, 7 kg). After bilateral nephrectomy, kidneys were cold-transported in Euro-Collins solution. The porcine kidney was transplanted to the site of a left nephrectomy and fixed to the peritoneum. **Results:** Kidneys transplanted to the lower abdomen by the conventional method were more susceptible to torsion of the renal vein (two cases). In contrast, early-stage blood flow insufficiency did not occur in orthotopic transplants of the left kidney. **Conclusions:** Size-matched porcine-primate renal grafting using our method of transplanting to the natural position of the kidneys contributes to stable post-transplant blood flow to the kidney.

Key words: Kidney Transplantation. Surgery. Swine. Primates.

DSPでの全体実験を成果として論文化するにあたり
まず手技的な面をまとめることに

(高村が当時大学院3年にもかかわらず論文を1本も
投稿できていなかったため練習の側面もあり)

- 2020/10/20～2020/10/31 日本語でまずver.5まで
全体実験の結果をもとに原案作成開始
→小林先生とやり取りしその都度改訂
- 2020/10/31～2021/1/16 英訳しver.7まで
過去の実験写真を元にFigureを作製すると共に雑誌の
形式に合わせて投稿
実験に関わる関係者が多く共著者や謝辞に加える
人の選定や連絡先、学位の有無等の確認に時間が
かかった
Figureで使用するシェーマをリファインしないまま
投稿してしまった(本来はプロに依頼すべき)
- 2021/3/11～2021/3/30 revise
期限間際での投稿/連絡だったため期限内にeditorに
認識されず、再投稿の手配をし返答を待つことに
→後になって認識され、reviseとして受理
- 2021/4/13 accept



Research
Immunology—Article

In Vivo Development of Fetal Pig Kidneys in Mature Monkeys Under Clinically Approved Immunosuppressant Drugs

Tsuyoshi Takamura^a, Kenji Matsui^a, Naoto Matsumoto^a, Yatsumu Saito^a, Toshinari Fujimoto^a, Susumu Tajiri^a, Shuichiro Yamanaka^a, Kei Matsumoto^a, Akimitsu Kobayashi^a, Izumi Yamamoto^a, Hiroshi Sasaki^b, Haruyuki Hirayama^c, Hitomi Matsunari^d, Kazuaki Nakano^d, Hiroshi Nagashima^d, Akihiko Kiyoshi^e, Takao Kuroda^e, Makoto Inoue^e, Takeshi Miyawaki^c, Takashi Yokoo^a, Eiji Kobayashi^{f,*}

^a Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan

^b Department of Urology, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan

^c Department of Plastic and Reconstructive Surgery, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan

^d Meiji University International Institute for Bio-Resource Research, Kanagawa 214-8571, Japan

^e Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., Osaka-fu 564-0053, Japan

^f Department of Kidney Regenerative Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Cynomolgus monkey
Pig
Kidney
Fetal kidney
Immunosuppression

ABSTRACT

Controlling the immune response with only clinically approved immunosuppressant drugs is difficult in renal heterotransplantation from pigs to nonhuman primates. Moreover, to the best of our knowledge, no reports exist on the use of fetal pigs as kidney donors. This study aimed to compare the degree of transplant rejection between neonatal and fetal kidneys, with genetically unmodified pigs as donors and cynomolgus monkeys as recipients. The left kidneys of the recipient monkeys were removed, followed by transplantation of neonatally examined fetal pig kidneys, which had undergone vascular anastomosis at the same site, into the retroperitoneum. Immunosuppression was performed with only US Food and Drug Administration-approved drugs. The fetal kidneys were transplanted into the omentum and para-aortic regions of cynomolgus monkeys. Consequently, the engraftment and development of the transplanted tissues were pathologically examined by sampling over time (twice in each experiment). An acute rejection was observed after a few weeks in neonatal renal grafts with vascular anastomosis. However, fetal pig kidneys were spared from rejection despite the administration of the same immunosuppressive protocol to the monkeys and the recipient blood vessels flowing into the fetal kidneys. The immunogenicity of fetal kidneys in pig-monkey renal heterotransplantation was lower than that of neonatal kidneys.

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

異種胎仔臓器の非血管付き移植法と従来の異種臓器移植の免疫反応の違いを明らかにした「横尾法」の重要な点を前臨床モデルでしめした。

- 2021/1/1～2021/2/10 日本語でver.10まで
Actaと同様、小林先生とやりとりしながら原案を作成
- 2021/2/11～2021/5/12 英訳しver.13まで
知財の整理が終わるのを待ってから投稿
- 2021/6/1 Transplantationにreject
 - ①グループサイズが小さすぎる
 - ②実験内容がわかりづらい
 - ③免疫学的評価が不足している
 →Engineering誌からの招待あり2021/7/7再投稿
- 2021/10/9～2021/11/5 major revise
 - ②③について指摘あり
 →実験シエーマ、Banff分類評価とEPO PCRを追加
- 2021/11/30～2021/12/24 minor revise
CD31染色像をさらに追加
- 2022/2/8 accept

Beneficial Impact of Interspecies Chimeric Renal Organoids Against a Xenogeneic Immune Response

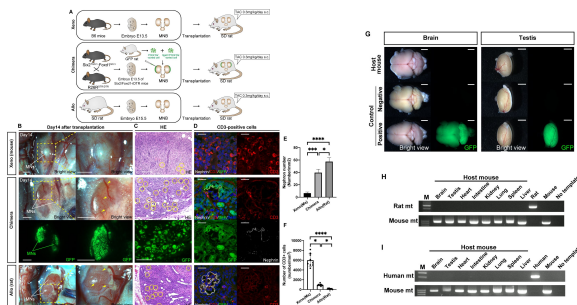
Yatsumu Saito¹, Naoto Matsumoto¹, Shuichiro Yamanaka¹, Takashi Yokoo¹ and Eiji Kobayashi^{2*}

¹ Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan, ² Department of Kidney Regenerative Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

投稿: 1月4日
Revise受け取り 1月13日
Revise提出 1月19日
Accepted: 1月24日
Published: 2月15日

キメラが
拒絶を低減

前駆細胞は
散らばらない



- 学会抄録(論文)の**題名**が大事!! (端的に**目的,結論**を表す題名にする)
⇒私: Generation of Interspecies Chimeric Organoids from Animal Fetal Kidney and Exogenous Renal Progenitor Cells
⇒改: Beneficial impact of Interspecies Chimeric renal Organoid against xenogeneic immune response

- 学会抄録の**イントロの最初**が大事!! (端的に**何の内容か**を表すようにする)
⇒私: Background: 近年、再生医療の研究が飛躍的に進み、ヒトiPS細胞から脳、眼杯、腎臓などのミニチュア臓器であるオルガノイドの作製が報告されている。しかし、臓器の発生メカニズムを模倣し、移植用臓器の再生は困難である。
⇒改: Background: 豚の胎仔の腎臓を使って、生体内でヒトの腎臓を作ることを計画しています。キメラ腎臓の優性自己成分は、異種免疫反応を起こす可能性がある。

- 実験計画(**期間**:11月-1月頭と短かった)も大事!! (**実験期間とそれに見合った計画**を立てる)
⇒私: 妊娠13.5日齢のネフロン前駆細胞を特異的に除去できる遺伝子改変マウス(Six2-DTRマウス)胎仔より腎臓を採取
⇒改: 置き換えをしなくとも、マウスとラットの胎仔腎臓の混ぜ物でいい

- 実験計画(比較する**グループ数**に関して)も大事!!(**余計な実験や時間**が省かれる)
⇒私: マウスオルガノイド、1:1マウスラット入替キメラオルガノイド、ラットオルガノイド、の3群で比較
⇒改: マウスオルガノイド(6:0)、キメラオルガノイド(5:1、3:3、1:5)、ラットオルガノイド(0:6)、の6群で比較

- 実験しながら直ぐにFigure化することが大事!! (**足りない**ところも見えてくる)

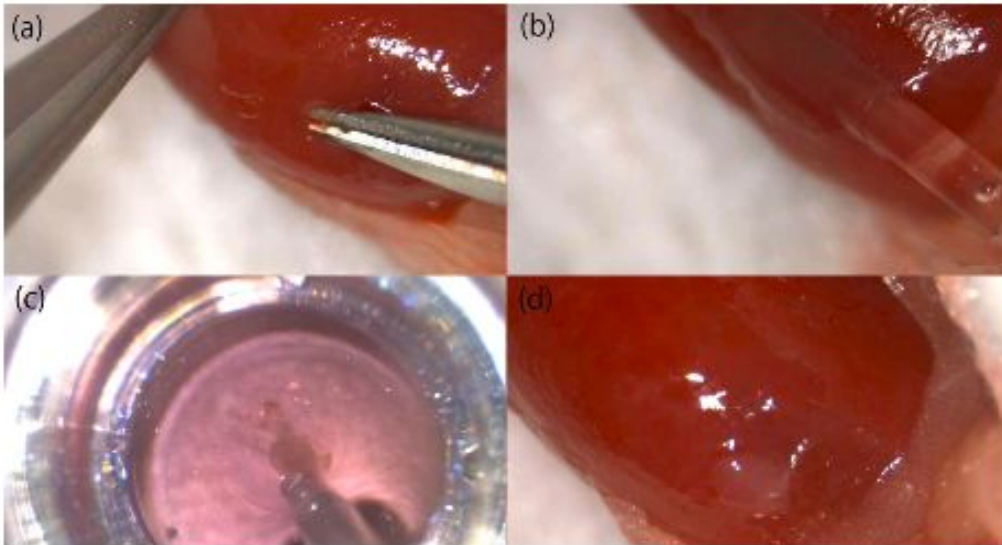
- 現在投稿中の論文に関して:**論文の目玉言いたいこと**(**読者,その業界で興味を引くこと**)は何か考える (**特にキメラが拒絶を低減、前駆細胞が散らばらないデータを追加できた!**)



Techniques of fragile renal organoids transplantation in mice

Naoto Matsumoto¹ , Kenji Matsui² , Yatsumu Saitou² , Tsuyoshi Takamura² , Shuichiro Yamanaka³ , Takashi Yokoo⁴ , Eiji Kobayashi^{5*} 

1. MD. Division of Nephrology and Hypertension - Department of Internal Medicine - The Jikei University School of Medicine - Tokyo, Japan.
2. MD. Division of Nephrology and Hypertension - Department of Internal Medicine - The Jikei University School of Medicine - Tokyo, Japan.
3. MD, PhD. Division of Nephrology and Hypertension - Department of Internal Medicine - The Jikei University School of Medicine - Tokyo, Japan.
4. MD, PhD. Division of Nephrology and Hypertension - Department of Internal Medicine - The Jikei University School of Medicine - Tokyo, Japan.
5. MD, PhD. Department of Kidney Regenerative Medicine - The Jikei University School of Medicine - Tokyo, Japan.



実験の普段のやり方

- ・実験をやりながら文献をしっかり読み込み、論文のストーリーを練っていく！
- ・論文のFigureを作るつもりで一回一回の実験結果を大切にしていく。

まとめ方に関して

- ・方法を比較していい方法を開発したとまとめる際に、評価系が不安定な要素が多い場合、M&Mに現在一番いいと思われる方法を記載して（他はサプリメントに持っていく）、
「あることをやり遂げた」とする論文としてまとめるといい。

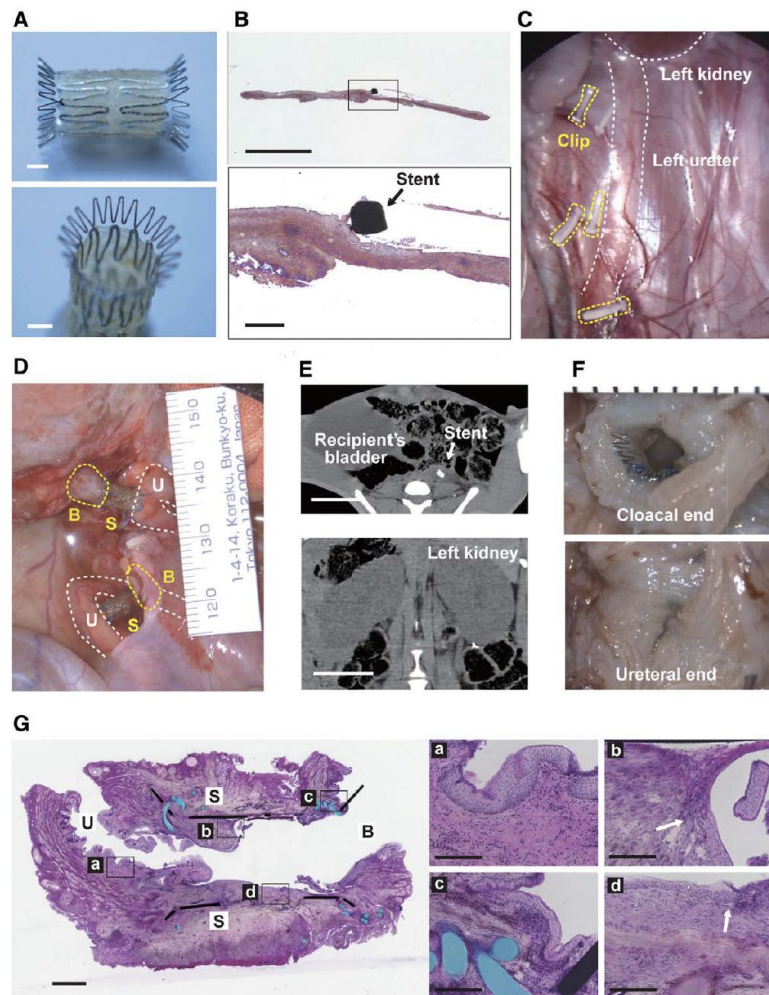
論文対応に関して

- ・投稿したら、リバイスに備えて、レフリーが指摘してくるであろうことを実験して、実験を止めない。
- ・リバイスは、時間をおかない（時間をおくことは査読してくれた人に失礼であり、査読に不利である）

OPEN

A Novel Method for Urinary Tract Reconstruction in Transplanted Embryonic Kidneys Using the Hybrid Stent: A Pig Study

Kenji Matsui, MD,¹ Satomi Iwai, DVM, PhD,² Hiroshi Sasaki, MD, PhD,³ Tsuyoshi Takamura, MD,¹ Yoshitaka Kinoshita, MD,^{1,4} Yatsumu Saito, MD,¹ Toshinari Fujimoto, MD, PhD,¹ Yasuhide Nakayama, PhD,⁵ Yohei Suzuki, BE,⁶ Hitomi Matsunari, PhD,⁷ Hiroshi Nagashima, PhD,⁷ Eiji Kobayashi, MD, PhD,⁸ and Takashi Yokoo, MD, PhD¹



- 2021/10/21 Transplantationへの投稿
- 2021/11/18 Decision:TXDへのトランスファーの指示
(実験数、フォロー期間が不足しており、技術レポートとしてレターで投稿するように)
- 2021/12/8 短縮してTXDへ投稿
(進行中だった実験の長期データが良くなかったため含めず)
- 2022/1/7 受理

●ドラフトの進め方

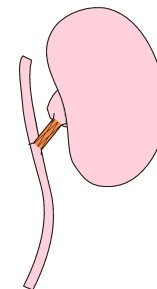
日本語でVer.2まで、英語でVer.12までやり取りして練り上げた。

●過去の実験の組み込み

2019頃のハムリーやDSPでの実験(ステントなし)を無駄にせず、ステント開発の経緯としてメソッドとして組み込んだ。

●富士マイクラでの事前実験

成獣ブタの尿管吻合で4匹検証したが(右図)、よい結果が出ず、早めに北里に場所を移してクロアカ吻合で実際に検証する方針にした。



●論文の全体像

関係者が多い(ブタ管理:北里大学、ステント作製:バイオチューブ株式会社・日本ライフライン、凍結融解:明治大学)ため、移植クロアカの成長・生命予後改善のことは切り離して、ハイブリッドステントを前臨床でテストしたことに絞って論文をまとめる方針とした。

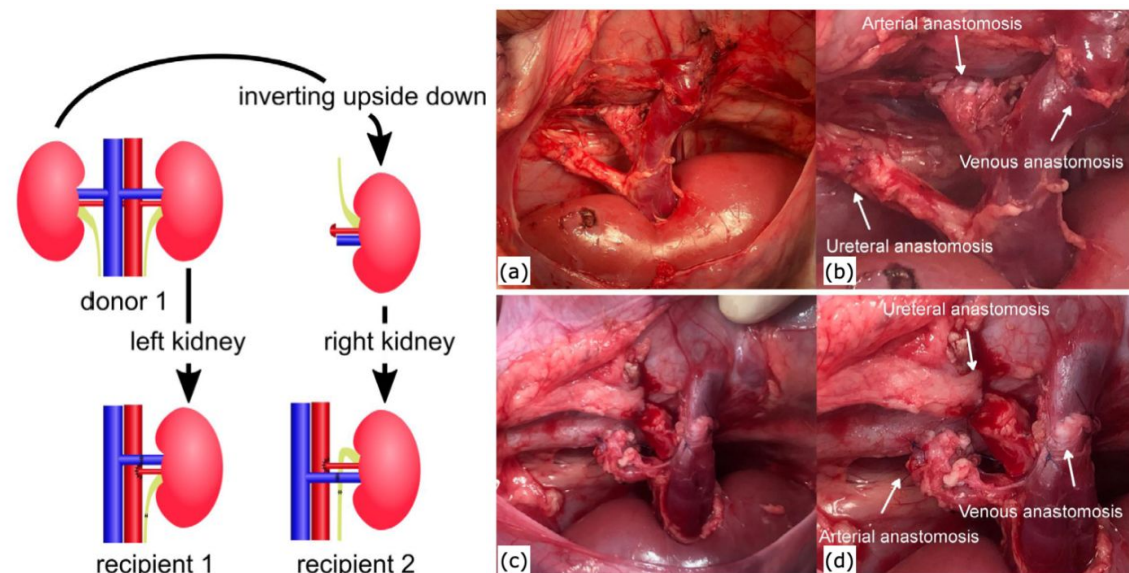
●知財について

端側吻合のSWPU技術自体は上流特許として慈恵で押さえていた。ハイブリッドステントについて知財申請した方がよいかを、バイオチューブ、ライフライン、明治大学で事前 MTGLし、申請しない方針で同意された。

Techniques of orthotopic renal transplantation in pigs. One donor to two recipients via inverted grafting

Yoshitaka Kinoshita¹, Daiki Iwami², Tetsuya Fujimura³, Haruki Kume⁴, Takashi Yokoo⁵, Eiji Kobayashi^{6,*}

- 1.MD. Jichi Medical University – Department of Urology – Division of Renal Surgery and Transplantation – Tochigi, Japan.
Jichi Medical University – Department of Urology – Division of Urology – Tochigi, Japan.
- 2.MD, PhD. Jichi Medical University – Department of Urology – Division of Renal Surgery and Transplantation – Tochigi, Japan.
- 3.MD, PhD. Jichi Medical University – Department of Urology – Division of Urology – Tochigi, Japan.
- 4.MD, PhD. The University of Tokyo – Graduate School of Medicine – Department of Urology – Tokyo, Japan.
- 5.MD, PhD. The Jikei University School of Medicine – Department of Internal Medicine – Division of Nephrology and Hypertension – Tokyo, Japan.
- 6.MD, PhD. The Jikei University School of Medicine – Department of Kidney Regenerative Medicine; Keio University School of Medicine – Department of Organ Fabrication – Tokyo, Japan.



日本語ドラフト2回、英語3回やりとり

2020/11/12 Acta Cir Braz投稿

2020/12/21 minor revision

2020/12/25 再投稿

2021/1/15 accept

- 小林先生が他企業と拒絶反応関係の仕事をする中で、同所性腎移植の手術手技についてfocusして論文化。
- 木下は1回の手術見学のみポイントを押さえれば、最小限の労力でも論文化できる。
- 動物モデルそのものに大きな価値がある。安全で安定したモデルを作成したということで論文になる。

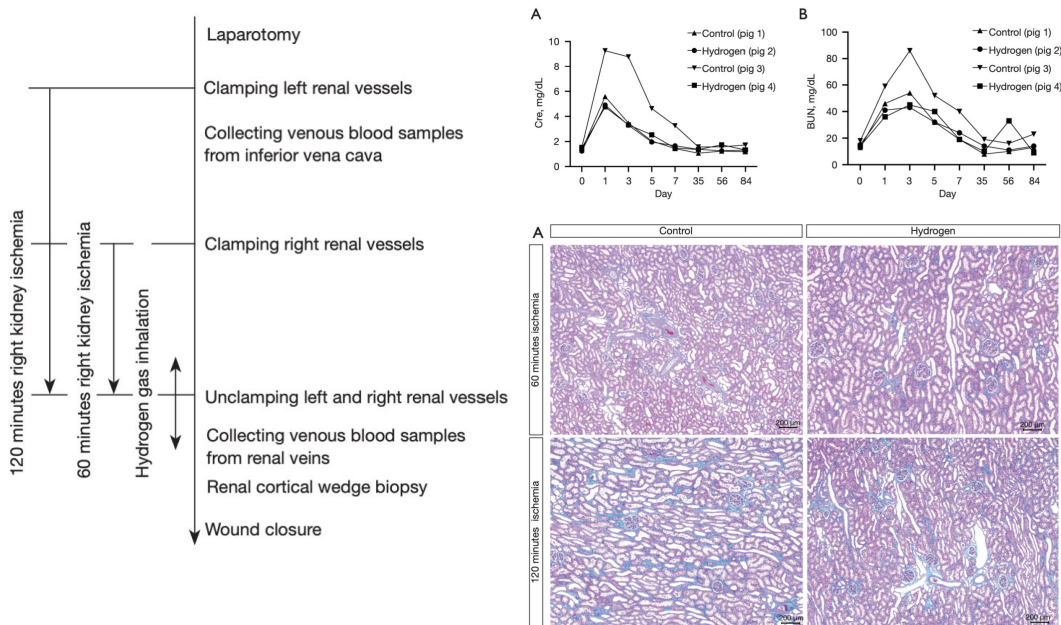
Development of a novel porcine ischemia/reperfusion model inducing different ischemia times in bilateral kidneys-effects of hydrogen gas inhalation

Yoshitaka Kinoshita^{1,2}, Kohsuke Shirakawa³, Motoaki Sano⁴, Takashi Yokoo², Haruki Kume¹, Eiji Kobayashi^{5^}

¹Department of Urology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; ³Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan; ⁴Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Center for Molecular Hydrogen Medicine, Keio University, Tokyo, Japan; ⁵Department of Kidney Regenerative Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

Contributions: (I) Conception and design: All authors; (II) Administrative support: Y Kinoshita, E Kobayashi; (III) Provision of study materials or patients: Y Kinoshita, E Kobayashi; (IV) Collection and assembly of data: K Shirakawa, Y Kinoshita, E Kobayashi; (V) Data analysis and interpretation: Y Kinoshita, E Kobayashi; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Eiji Kobayashi, MD, PhD. Department of Kidney Regenerative Medicine, The Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan. Email: eijkoba@jikei.ac.jp.



日本語ドラフト9回、英語2回やりとり
 2022/12/17 Lab Investigation投稿
 2022/12/22 reject
 2022/12/30 Transl Androl Urol投稿
 2022/1/26 major revision
 2022/2/4 再投稿
 2022/2/25 minor revision
 2022/2/26 再投稿
 2022/3/14 minor revision
 2022/3/16 再投稿
 2022/3/21 accept

- 企業からの出資で水素ガスの腎RI軽減効果を検討。
- 事前検討で1時間虚血腎で僅かな差を見出していたため、さらなる差を出すために2時間虚血に変更。2時間虚血+対側腎摘では死亡率が高いことが文献にあったので、1時間+2時間の左右異なる阻血時間を与えるモデルとした。
- 水素ガスの効果は明らかとならなかったため、安全なブタRIモデル作製、という切り口に切り替えて論文化。切り口を変えることで、実験を無駄にせず論文化することができた。
- 大動物モデルでは数を稼げないが、small numberでも書き方次第で論文化は可能(統計なしも可)。ただし、ばらつきを無くするための手技・事前準備が必要。
- 企業側のメリットにもなる結果を出すことの重要性。