

平成 30 年 4 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15464

研究課題名(和文) マイクロデバイスを利用した革新的培養系 kidney on chip の作成

研究課題名(英文) Establishment of innovative culture system, kidney-on-chip, utilizing microdevice

研究代表者

南学 正臣 (Nangaku, Masaomi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90311620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロデバイスを利用し、従来の培養系に欠如していた濾過流および原尿の尿流による物理的刺激を取り入れ、生体内の環境を正確に再現した腎臓の細胞の革新的培養系 kidney-on-chip を構築した。方法として、紫外線硬化性樹脂などを流路パターン状に直接描画し、紫外線を照射して硬化させた鋳型を用いてポリジメチルシロキサン性のマイクロデバイスに細胞外基質でコートした多孔質膜を組み合わせてコンパートメント構造を構築し、そこに細胞を培養する高次 podocyte 培養系および尿細管細胞培養系を樹立した。

研究成果の概要(英文)：We established an innovative culture system with microdevice, kidney-on-chip, which reproduces physical stress of glomerular filtrates and in vivo conditions. We established polydimethylsiloxane (PDMS)-based compartment microfluidic cocultivation system of podocytes and renal tubular cells on multi-pore membrane coated with extracellular matrix.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：マイクロデバイス organ on chip 医工連携 podocyte 尿細管

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は本邦で 1330 万人いるにも関わらず、その有効な治療法は未だになく、患者予後の観点からも医療経済の観点からも新規治療の開発が急務となっている。しかしながら、腎臓病においては臨床試験に上がってくる薬物すらほとんどないのが現状である。このように腎臓病の治療法開発が進まないのは、適切な培養系が欠如し臓器における *in vivo* の病態が再現できないため腎臓の病態解明が遅れていることが重要な原因と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロデバイスを利用して従来の培養系に欠如していた濾過流および原尿の尿流による物理的刺激を取り入れ、生体内の環境を正確に反映した腎臓の細胞の革新的培養系 kidney-on-chip を構築し、生理的濾過機能を維持した糸球体上皮細胞 podocyte の培養系および原尿の尿流による刺激を感知する尿細管細胞の培養系を確立し、それを用いて腎障害進展機構の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

【糸球体モデル】

糸球体モデルに関しては、既存のフォトリソグラフィの技術を利用し、スライドガラスの切削・超音波加工で製作したガラス部品や金属板切削加工により製作した金型を用いて型取ったポリジメチルシロキサン (PDMS) 製の部品、市販のカルチャーインサート (Cornig: C3413) を用いて製作した濾過流を負荷する培養器を制作した。

物理的刺激としては、基底側のチャンバーに接続したチューブから培養液を注入するという、従量式濾過流負荷や、基底側コンパートメントへ圧力制御機器より制御された送気を行う事で従圧式濾過流を負荷するようにした。また、多孔膜を介した基底・頂端側の圧格差を定量化できるよう、基底側の圧測定を行った。すなわち、基底側コンパートメント内に底面と平行な気液界面を置けるよう基底側コンパートメントを十分にとり、基底側コンパートメントの上端には送気用・圧測定用の送気チューブを接続し、圧測定用チューブの遠位終端に圧力センサーを接続する事で、基底側内圧を測定した。

細胞は、温度感受性不死化 podocyte (HSMP) を用い、デバイス培養基盤上への細胞外基質のコーティングに関しては、rLaminin 521 (Cornig) を使用した。

濾過流を負荷する際に培養基盤として使用する多孔膜は、位相差顕微鏡による明視野観察が著しく不良であるため、細胞の接着分布状況を把握するために PKH26 染色を実施した。In vivo ではスリット膜は podocyte 同士の細胞間接着部に局在し、その播種密度は confluent であることから、培養開始時より

confluent・均一に播種できる方法を検証した。

本デバイス・システムにおいて、多孔膜上の細胞へ基底側からの水圧 (濾過流) が作用しているか否かに関し、細胞を播種しないデバイス、播種したデバイス間の基底側圧を測定し、基底側圧の上昇の程度を比較する事で検証した。圧測定中の培地の灌流に関しては、従量式培地送液を実施した。

濾過流負荷による影響を評価するための比較対象群としては、Transwell culture insert で静置培養したものをを用いた。

濾過流負荷により podocyte の生体内形質が回復するか否かの評価項目に関しては、podocyte の形態 (走査型・透過型電子顕微鏡観察) ならびにスリット膜蛋白遺伝子・NPHS1 発現量 (qPCR) を評価した。

また、従来使用されてきた HSMP に対する RPMI 1640・10% FBS (基本培地) に加え、ATRA (all-trans retinoic acid), Vitamin D₃ (D₃), Dexamethasone (Dex), Heparin, VEGF, HGF, Y27632, FGF9 の培地への単体・混合添加を試行し、podocyte の形態、スリット膜蛋白遺伝子、成熟期の細胞骨格と関連して発現上昇を示すとされる中間径フィラメントについて成熟期 podocyte の形質を回復させる培養条件を検討した。

【尿細管モデル】

尿細管細胞培養系では、尿細管細胞に物理的刺激としてずり応力をかけるマイクロデバイスを作成した。デザインは 2 枚の PDMS からなり、上面 PDMS は主に細胞懸濁液のチャンネルとして、下面 PDMS は 4 つのチャンバー、薬剤濃度を調節するための micromixer、inlet から流入した気泡をトラップするための air trapper を有している。2 枚の PDMS を張り合わせ、PTFE チューブ (1.5×1mm) T 型ミニフィッティング及び 200 μl マイクロピペットチップを取り付け、cellmatrix I-A (新田ゼラチン) で流路内をコーティングした (接続部はシリコンチューブ (2×1mm))。細胞播種は、細胞懸濁液を suspension inlet に入れ、suspension aspiration outlet からシリンジポンプで 2 μl/min でアスピレートし、各チャンバーに導入した。細胞播種後 20 分静置し細胞接着が起きたら medium inlet から培養液を 1 μl/min/chamber で灌流することにより、尿細管細胞にずり応力をかけた。

一次繊毛の染色は Anti-Acetylated Tubulin antibody (SIGMA-ALDRICH) 及び Anti-ARL13B antibody (abcam) を使用し、核の染色は DAPI 溶液を使用した (結果 1、2)。

device inlet の内、片方に薬剤を導入した場合、各チャンバーの濃度勾配は設計上、1:0.75:0.25:0 に配分されるように micromixer をデザインした。薬剤濃度のチャンバー毎の配分を確認するため、medium inlet に接続したシリンジの片方に Fluorescein 入りの培養液を、もう片方には培養液のみを入れて灌流を行い、タイムラプ

顕微鏡 (CCM-1.3XYZ/CO2; ASTEC) で各チャンバーの蛍光輝度を測定した。また別のマイクロデバイス実験で drug inlet の片方に Fluorescein 入り培養液を、もう片方に培養液を入れて灌流し、タイムラプス顕微鏡にて各チャンバーの蛍光輝度を測定した。

生理的にも濃度勾配が形成されているかを検証するため、酸化ストレスによって一次繊毛が延長するという先行論文に基づき、培養液灌流 24 時間後に drug inlet から 80 μ M 過酸化水素水入り培養液、もしくは培養液のみを 200 μ l 入れて 1 μ l/min/chamber で灌流し、72 時間後に染色し、一次繊毛の長さを測定した。

4. 研究成果

【糸球体モデル】

・結果 1

基底側コンパートメント空気圧の測定に成功した。定常培地送液(従量式)における基底側定常圧のみならず、圧力制御機器より二つの空気圧を交互に繰り返しながら送気する(従圧式)事で糸球体内毛細血管内の脈動圧を再現する事も可能であった。

・結果 2

従来使用されてきた直線流路構造マイクロ流体デバイスでは、培養基盤上への均一・Confluent な細胞播種や培養後の細胞アッセイにおける細胞へのアクセスが困難であった。今回我々が開発した培養デバイスでは、細胞播種後にデバイス中のカルチャーインサート内へ細胞懸濁液を良くピペティングする事で、細胞を Confluent・均一に播種する事が出来た。

・結果 3

細胞を播種しないデバイスに比し、細胞を播種したデバイスの基底側内圧は高く、本デバイスにおいては細胞に対し基底側からの水圧が負荷できる事が確認できた。

・結果 4

濾過流刺激有りと静置コントロール間では、細胞の形態、スリット膜蛋白の発現において差は認めなかった。

・結果 5

ATRA・D₃・Dex の混合添加は qPCR においてスリット膜蛋白遺伝子(NPHS1・NPHS2)、WT1、PAX2 といった Positive な結果を示したが、day4 以降細胞死が顕著となった。Heparin, VEGF, HGF, FGF9 に関しては、有意な効果を認めなかった。Y27632 に関しては、位相差顕微鏡下で confluent 下においても突起形成傾向があったが、day5 以降細胞死が顕著であった。

[総括]

細胞へ濾過流を負荷する培養デバイス・システムは概ね完成したと言えるが、糸球体モデルの生理的濾過機能を再現させるためには、培養 podocyte に対し成熟期形質を回復させるための液性因子培養条件検索が不十分であり、今回の研究においては課題として残る結果となった。

【尿管モデル】

・結果 1

尿管細胞培養系において4チャンバーにおける細胞密度は均一であった。また灌流中に air trapper まで気泡が流入する事はあっても、チャンバー内まで流入する事はなかった。細胞はチャンバーの上面および下面に接着しているが、上面の細胞表面から下面の細胞表面までの距離は約 40 μ m だったため、灌流時のずり応力は 0.07 Pa と計算された。

・結果 2

一次繊毛は、in vitro のように serum starvation は必要とせず、in vivo like に灌流刺激のみで発現させることに成功した。

・結果 3

fluorescein を drug inlet から導入しても、シリンジに混合しても、各チャンバーで 1:0.75:0.25:0 に分配された。

・結果 4

drug inlet から片方に過酸化水素水入り培養液、もう片方に培養液を導入した場合、各チャンバーの濃度勾配に応じて一次繊毛が延長した。

生理的にも濃度勾配が実現されていることを確認した。

[総括]

in vivo と同様に、灌流刺激のみによって一次繊毛を発現させ、一回の実験で複数濃度の薬剤負荷試験を行うことが可能なマイクロデバイスを開発した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

木村啓志、南学正臣、藤井輝夫、Organ-on-a-chip の潮流と in vitro 腎臓モデルへの応用 腎臓内科・泌尿器科 5(5), 504-508, 2017

[学会発表](計1件)

藤井輝夫、Organ-on-a-Chip: マイクロ流体アプローチが招く新展開 第114回日本内科学会総会

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

特願 2017-173989

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

南学 正臣 (NANGAKU, Masaomi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 90311620

(2)研究分担者

藤井 輝夫 (FUJII, Teruo)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号： 30251474

稲城 玲子 (INAGI, Reiko)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号： 50232509

田中 哲洋 (TANAKA, Tetsuhiro)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 90508079

(3)連携研究者

(4)研究協力者

土肥 浩太郎 (DOI, Kotaro)
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生

近森 正智 (CHIKAMORI, Masatomo)
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生