

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02089

研究課題名(和文) 灌流培養系でのヒト胎児腎3次元組織培養による血流のヒト腎発生への影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of blood (liquid) flow effect on human renal development by renal organoid with perfusion culture system

研究代表者

清水 達也 (Shimizu, Tatsuya)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40318100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ヒトiPS細胞より誘導した腎オルガノイド(発生期)のかん流刺激に対する影響解明を目的とし、腎発生における血流との関連性について追求を行った。気液界面かん流培養システムを用いることで、適度なかん流速度での腎オルガノイド培養が組織内拡散を惹起、上皮細胞による組織化を向上、一方で適切な値を超えるかん流速度では組織化が減衰し、過剰な拡散が胎児腎発生組織誘導に必要なシグナル伝達の低下を生じた可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織工学研究の中で、かん流培養は3次元組織に栄養酸素を供給、長期間培養を可能にするとされ、心筋組織等の維持・発達が報告されている。このような中で、腎臓発生に対する適切なかん流刺激の必要性を提唱した本成果は、3次元組織かん流培養技術において、組織の種類、発達度を考慮した条件の重要性を示した。今後、生体外構築された様々な組織において、適正值の設定により長期維持、高機能化が可能になることが期待される。また情報の限られた胎児期発生への影響を、生体外で解析する本研究成果は、今後の創薬研究や医学研究に有効なツールに発展する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is establishment in vitro perfusion culture system and to elucidate the effects for renal organoids (developmental stage) originated from human iPS cells on perfusion stimulation. With the air-liquid interface perfusion culture system, renal organoid cultured at an adequate perfusion rate was caused liquid diffusion and improved the organization by epithelial cells, while decayed it at a perfusion range above the adequate value. It was suggested that high perfusion rate caused a decrease in signal transduction for renal development in renal organoids.

研究分野：再生医工学

キーワード：かん流培養 腎発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

母体環境の変化が胎児発育に影響を及ぼすことが知られており、特に、母体栄養・血圧の変化などが腎臓発生に影響を与え、胎児の発育とその後の成人後疾病にも関与する可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。しかしながら、母体の変化がどのように胎児の臓器発生に関与するのかを確かめることは難しく、具体的な関連性は未だ明らかではない。本課題は、組織工学により生体外にて作成した3次元組織でのかん流培養研究を進めるなかにおいて、胎児期レベルの構築組織を用いることによって、現在未解明の胎児期組織・臓器に対する影響を評価できる系が構築できるのではないかと考え、研究を提案した。

### 2. 研究の目的

組織工学技術を応用し、生体外にてヒト iPS 細胞から誘導した腎オルガノイドを用い、血流を模したかん流培養時の変化を解析することで、生体内での腎発生への流体(血流)の影響を評価・解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞(201B7)を用い、既存の手法を参照し<sup>2)</sup>発生期の状態にある腎オルガノイドを誘導した。具体的にはヒト iPS 細胞をフィーダーレス培養にし、その後 CHIR99021 を処理、次に FGF9 を処理した。その後多孔膜上の気相 液相界面にて3次元化して培養継続、およそ18日後に組織内でのネフリン遺伝子発現の上昇が確認された。各々の処理期間は遺伝子発現解析にてネフリン遺伝子の発現が高い条件にて調整した。

かん流培養は気相 液相界面を維持したまま培養組織下部に流路を設置するデバイスを3次元プリンター(EDEN)にて作製、37 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にてマイクロペリスタポンプにて流路内培養液のかん流することで培養を行った。また、2つの組織を同時にかん流し、底部より顕微観察の可能なシリコン製チャンパーについてはシリコン部(SK Co., Ltd)と底面のガラス(Matusnami)をプラズマ処理にて接合した。ポンプとの連結はシリコンチューブを用いた。

かん流培養液の多孔膜上における動態は液相をかん流させた状態で多孔膜上部(3次元組織設置部)に300 $\mu$ Lの蛍光ビーズを含む液体を添加し、下部かん流速度の変化による蛍光ビーズの動態をタイムラプス蛍光顕微鏡にて観察、ビーズの移動速度( $\mu$ m/s)を算出、グラフ化することで上部培養面におけるかん流培地の影響を観察した。

かん流培養液の動態を観察するために、蛍光標識デキストラン含有培養液をかん流し、組織に残存するデキストランを凍結切片として観察することで厚み方向の培養液の浸潤を確認した。また、組織内部の液体の動態を観察するために、蛍光標識デキストランを含有する培養液を組織上部に滴下し、蛍光標識デキストランの拡散状態を凍結切片後、蛍光顕微鏡にて観察した。

3次元構造の確認においてはOCTを用いて観察した。また、比較のための浸水培養については多孔膜ごと培養皿底部に設置し、上部に培養液を添加することで浸水し、培養を行った。

2.5 $\mu$ L/min ~ 200 $\mu$ L/minの速度を2~3日行うことでの組織像を確認後、組織の維持可能な速度を絞り込み、その後2.5 $\mu$ L/min, 10 $\mu$ L/minにて各々かん流培養を3日間行うことで、組織像と遺伝子発現の比較を行った。組織染色には、ファロイジンによるアクチン染色と、CK8, Laminin, CD34, CD31 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。管状組織の定量化はFijiを用いて行った。

高血圧ラット(SHR/1zm)と標準ラット(WKY/1zm)の胎児腎(ED16)形成状態の比較  
各々のホルマリン固定した胎児ラット10匹の重量を測定後、後腎を摘出、パラフィン切片としてHE染色を行うことで組織の発達の違いを確認した。

### 4. 研究成果

#### 1) iPS 細胞からの3次元腎組織の誘導と液浸培養による変化

iPS 細胞より誘導した組織において、9日後からネフリン遺伝子の増加が観察され、12日後前後にピークになるため、この時点の3次元化組織を腎オルガノイドとして解析に用いた。

かん流デバイスの設計を考える上で、液浸培養が可能か確認するため、腎オルガノイドを培養液に沈めて培養した結果、72時間後において組織像が大きく崩れることで3次元構造が崩壊していた。

## 2) かん流培養デバイスの作製と解析

当初は液中でのかん流を考えていたが、本研究でのかん流培養は気液相を維持した状態にて行う必要があったため、多孔膜に培養した状態で設置、かん流可能なデバイスの設計を行い3次元プリンタにて作製を行った。模擬的に多孔膜上に設置した蛍光ビーズの動態を観察した結果、多孔膜下部のかん流速度が増加すると多孔膜上部の蛍光ビーズの移動速度が増加し、多孔膜の孔径の変化にも影響を受けることが明らかになった。

## 3) 腎オルガノイドのかん流培養試験

腎オルガノイドを用いて 200 $\mu$ L/min から 2.5 $\mu$ L/min の範囲でかん流速度を変えて組織像を観察したところ、予想に反して速度が高いものでは上皮細胞による組織化がなくなっており、10 $\mu$ L/min, 2.5 $\mu$ L/min の速度で組織が維持、もしくは発達することが明らかになった。

組織維持が可能な速度でのかん流培養液に蛍光標識デキストランを添加し、静置培養時と比較したところ、静置培養よりも3次的に組織上部まで、かん流された組織において培養液が浸潤・通過していることが確認された。これらは静置培養でも数十 $\mu$ m までは厚み方向の上部への浸潤が見られることから、かん流速度そのもので培養液が入る以外にも細胞動態によって浸潤が加速する可能性が考えられ、かん流刺激によって、腎オルガノイド内の細胞動態が増加することが考察された。

かん流培養による物理刺激の影響を確認するため、物理刺激にตอบสนองして変化する細胞骨

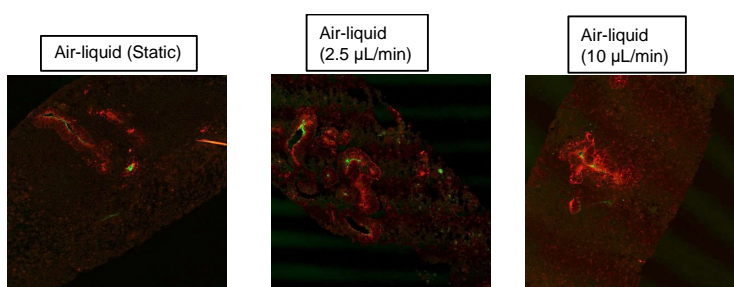


図1. 各条件での組織化 (赤: 上皮細胞, 緑: 近位尿管細胞)

格をファロイジン染色でのアクチン可視化で観察した。その結果、静置培養と比較するといずれのかん流培養された腎オルガノイドにおいて、管状構造内のアクチン染色強度の増加が観察された。

そこで、静置培養、2.5 $\mu$ L/min, 10 $\mu$ L/min のかん流速度で培養した腎オルガノイドの上皮細胞

による管状構造の程度を定量化したところ、2.5 $\mu$ L/min において管状構造が多く観察され、また 10 $\mu$ L/min では静置培養と同程度の組織化となっていた。また分岐に関わるオルガノイド内の遺伝子発現(PAX8, LHX1)を比較したが、有意差は無いものの、10 $\mu$ L/min において減少傾向が観察された。

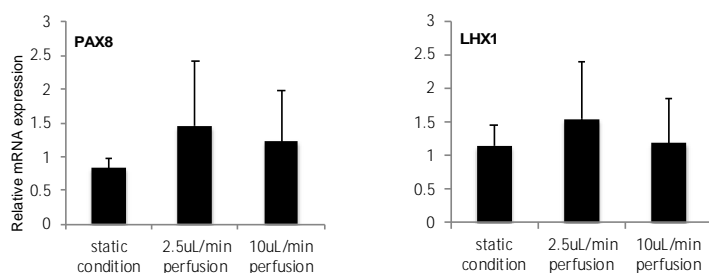


図2 3日間のかん流培養後の腎オルガノイドにおける遺伝子発現

この管状構造は腎発生時の尿管芽構造の分岐の可能性があり、この尿管芽分岐の発達には後腎間葉細胞との GDNF-ret でのコミュニケーションが必要である<sup>3)</sup>。そのため、本解析による結果は、2.5 $\mu$ L/min の速度でのかん流によって組織内の液体成分の拡散が向上し、分岐が発達したが、10 $\mu$ L/min の速度ではコミュニケーションに必要な因子の拡散まで高まり、分岐の発

達低下したのではないかと考察された。また、かん流刺激の上皮細胞に対する影響と血管内皮細胞に対する影響が同程度の刺激では異なることから、近年報告されたゲル内に包埋した腎オルガノイド還流培養研究<sup>4)</sup>のように、オルガノイドと還流刺激の間に干渉する物質の介入を行い、また血管内還流を可能にすると、より生体に近い反応が観察される系になることが期待された。本研究のかん流培養に関する成果は BMC Biomedical engineering へ掲載されている<sup>5)</sup>。

## 4) 高血圧ラットにおける胎児期の腎発生の標準ラットとの比較

かん流と胎児血流の関連性については今回の解析では明確化できなかった。しかしながら、本研究において、SHY/1zm 高血圧ラットと標準ラット WKY/1zm の胎児腎を比較したところ WKY の胎児腎は分岐が多く観察されるが、SHY の胎児腎は分岐が少なく、発達が同時期で少ないことが確認された。

胎児の高血圧ラットでの発達低下は胎盤血流の低下が原因とされており<sup>6)</sup>、本研究でも胎児

自体の重量も高血圧ラットの方が小さく同様な結果が得られた。だが、未発達な胎児の循環では、実際に胎児の内部で血流の実測は難しい。一方で本解析では体外でコントロール自在なかん流解析を行うことで、胎児の血流（もしくは胎児内の液体の流れ）の増加に伴い、組織内過剰な拡散が、一部の胎児組織・臓器の発達障害の生じるのではないかとということが考察された。今後、胎児発育計測の発達や、生体外の腎オルガノイド発達のかん流培養による向上が進むことで、より明確化することが期待される。

< 参考文献 >

- 1) Kanda T.et.al., Hypertens Res. 2020.
- 2) Takasato M. et.al., Nature 2015
- 3) Constantini F., Organogenesis. 2010
- 4) Homan KA.,et al., Nature Med. 2019
- 5) Sekiya S.et.al., BMC Biomedical Engineering 2019
- 6) Dias-Junior CA.et.al.,Biochem Pharmacol. 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Sekiya S, Morikawa S, Ezaki T, Shimizu T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Pathological Process of Prompt Connection between Host and Donor Tissue Vasculature Causing Rapid Perfusion of the Engineered Donor Tissue after Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E4102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19124102	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 関谷佐智子、杉浦直子	4. 巻 86
2. 論文標題 間葉系幹細胞：総論	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 257-259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekiya Sachiko, Shimizu Tatsuya	4. 巻 37
2. 論文標題 Induction of vasculature in engineered three-dimensional tissue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-017-0055-4.	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 Sekiya.S.,Kikuchi T.,Shimizu T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Perfusion culture maintained with an airliquid interface to stimulate epithelial cell organization in renal organoids in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Biomedical Engineering	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) org/10.1186/s42490-019-0017-9	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sachiko Sekiya
2. 発表標題 Development of perfusion cultivation system of renal organoid for regulation self-organization.
3. 学会等名 5th TERMIS-World congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関谷佐智子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞誘導した腎オルガノイドの気-液相界面灌流培養法の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷佐智子
2. 発表標題 組織工学による新規腎臓治療開発研究
3. 学会等名 第48回日本腎臓学会東部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オルガノイドの培養方法、並びにオルガノイド培養デバイス及びシステム	発明者 関谷佐智子、菊地鉄太郎、清水達也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-129993	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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 分担者	関谷 佐智子  (Sekiya Sachiko)  (00398801)	東京女子医科大学・医学部・助教    (32653)	
研究 分担者	菊地 鉄太郎  (Kikuchi Tetsutaro)  (00650805)	東京女子医科大学・医学部・助教    (32653)	