

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04499

研究課題名（和文）移植可能な腎オルガノイドの構築

研究課題名（英文）Development of implantable kidney organoids

研究代表者

西川 昌輝（Nishikawa, Masaki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：40843149

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）：腎臓オルガノイドは、創薬毒性試験や疾患モデル、さらには移植用組織として期待されている。しかし、尿排泄経路と血管網が未整備で、かつ構成細胞の一部の培養法が未確立であったことから、局所的かつ不完全な腎構造の再現に止まっていた。本研究では、腎臓の3種類の前駆細胞のうち、これまで未確立であったストローマ前駆細胞の分化誘導法および拡大培養法をマウスとヒトの両細胞で開発した。これにより、3種類の前駆細胞すべてについて、高純度・高品質・高効率な前駆細胞の供給が可能となった。さらに、工学的・生物学的な知見とアプローチの融合により、外部灌流回路とつながった血管様組織から腎臓組織への毛細血管網の伸展を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓オルガノイドは、尿排泄経路と血管網が未整備で、かつ構成細胞の一部の培養法が未確立であったことから、局所的かつ不完全な腎構造の再現に止まっていた。本研究では、これまで未確立であったストローマ前駆細胞の分化誘導法および拡大培養法をマウスとヒトの両細胞で開発した。さらに、外部灌流回路とつながった血管様組織から腎臓組織への毛細血管網の伸展を達成した。これにより、高品質な腎臓オルガノイドの高効率な作成が可能となり、灌流や異所移植による成熟化と尿排泄が期待される。本研究によって達成可能となった精緻な腎臓オルガノイドは、創薬・疾患モデルのみならず再生医療への応用が大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：Kidney organoids have shown promise in drug discovery, toxicity studies, disease models, and even as transplant tissue. However, the constructed structure only represented incomplete and local kidney structure due to the lack of urinary excretory pathway and vascular network, as well as the unestablished culture methods for some of the component cells. In this study, we developed a culture method for induction and expansion of stromal progenitor cells in both mouse and human cells. This has made it possible to supply all three types of renal progenitor cells at high-purity and high-quality in a highly efficient manner. Furthermore, by combining engineering and biological findings and approaches, we have achieved the extension of capillary networks to renal tissue from vascular-like tissue connected to external perfusion circuits.

研究分野：再生医工学

キーワード：腎臓 創薬支援デバイス 再生医療 オルガノイド 前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

腎臓は20種類以上の細胞が適切に配置されることで機能を発揮しており、それを直接再構築することは非常に困難であると考えられている。そこで、腎臓オルガノイドを利用して腎臓の再構築を試み、再生医療への応用を目指す研究が進んでいる。オルガノイドとは、多能性幹細胞 (iPS細胞等) や組織幹細胞が *in vitro* (生体外) で発生過程を一部模倣する形で増殖、分化、自己組織化することで形成される三次元的な臓器様組織体のことである。腎臓は、その発生過程で①ネフロン前駆細胞、②尿管芽細胞、③ストローマ前駆細胞、の3種類の前駆細胞から形成されることが明らかになっている。つまり、この3種類の前駆細胞の自己組織化を *in vitro* で適切に制御することで腎臓オルガノイドが作製可能となる。

よって、腎臓オルガノイドを再生医療や創薬スクリーニングに応用するためには、効率よく大量に前駆細胞を準備する必要がある。ネフロン前駆・尿管芽細胞に関しては iPS 細胞からの分化誘導・拡大培養法が確立されていたのに対し、ストローマ前駆細胞については、ごく最近分化誘導法が報告されたものの、拡大培養法に関しては未確立であった。

また、腎臓オルガノイドでは、臓器の機能維持のためにも糸球体への血管侵入が重要となる。しかし、血管様組織からオルガノイドへの血管新生を試みる手法については、構想自体はあるものの報告例は少なく、特に糸球体への血管侵入は生体内への移植以外には達成されていない。

これを達成するためには、血管が作られる機構の一つである血管新生が重要となる。血管新生を促進する要因は、ゲル組成、酸素分圧など様々な報告がある。しかし、これらは血管様組織やオルガノイドについて個別に検討されているものの、両者を複合した系での最適化の検討例は少ない。また、発生段階の胎児腎臓と比べて現状のオルガノイド自体に何らかの問題があり、血管新生が適切に起こらない可能性も考えられるが、詳細な比較や検証はなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、移植可能な腎臓オルガノイドの構築に向け、必要となる細胞の準備とオルガノイドへの血管導入法の確立を試みた。細胞の準備では、腎臓ストローマ前駆細胞の拡大培養法の開発を目的とした。血管導入法の確立については、まずは工学的に血管を構築し、そこからまずマウス胎児腎臓への血管新生を試みた。

3. 研究の方法

3.1 細胞の準備

本研究で扱う腎臓ストローマ前駆細胞は、Foxd1 に GFP をノックインしたマウスを利用し、胎生 13.5 日のマウス胎児より FACS で分取した。

3.2 培養系の開発

細胞の準備方法や培養条件をすべて再検討し、細胞への潜在的ダメージの軽減を試みた結果、ストローマ前駆細胞を増殖させることに成功した。残る課題は分化マーカーの一つである α SMA の発現が抑えきれないことである。まず、細胞準備から培養までの全工程において、FBS を KSR (Knockout Serum Replacement) に変更した。また、RNA-seq による遺伝子発現解析結果を検討したところ、培養細胞で過剰に発現しているパスウェイは①脂質代謝系のパスウェイ、②炎症系のパスウェイ、③酸化系のパスウェイ、の3種類に大別されることがわかった。これらの抑制を目的として PPAR シグナル伝達経路阻害剤と抗炎症、抗酸化剤の添加を試みた。qPCR を行い、 α SMA の発現量を比較した。

3.3 細胞機能の検証

培養したストローマ前駆細胞の分化能の検証を試みた。

①分取直後の3種類の腎臓前駆細胞、②分取直後のネフロン前駆細胞と尿管芽細胞に加えて数日培養を行ったストローマ前駆細胞を混ぜ合わせたもの、③分取直後のネフロン前駆細胞と尿管芽細胞のみ、の3条件で凝集体を作成し、7日間培養して比較検討を行った。

3.4 血管様組織の作製

デバイス内に I 型コラーゲンゲルを入れ、翌日にゲル中に作られた管内壁へ蛍光色素でラベルしたヒト臍帯静脈内皮細胞 (RFP-HUVEC) を播種した。14日間培養した後、VE-cadherin を免疫染色した。また、培養2日目には FITC-dextran の灌流を行い、血管様組織の構築を確認した。

3.5 腎臓への血管新生

上記と同様に作成された血管様組織の培養1~3日目に、妊娠12.5日目のマウス胎児腎臓をゲル中に配置した。その後培養を14日行い、ポドサイトマーカー WT1、血管内皮細胞マーカー CD31 の免疫染色を行った。

3.6 血管新生に関わる条件の比較

腎臓への血管新生に、酸素濃度、腎臓のゲル包埋、ゲルの種類が与える影響を調べた。酸素濃

度 20、10、5%で培養し、10、5%で培養したものの一部は 4 日後から 20%の酸素濃度で培養した。ゲル包埋については、腎臓配置後デバイス上面に 50 μ l の I 型コラーゲンを入れたものとそうでないものを比較した。ゲルの種類については、デバイス内に入れるゲルが I 型コラーゲンのものと、コラーゲン・フィブリンを 1:1 で混合したものを比較した。

4. 研究成果

4.1 拡大培養

まず、培養前の細胞準備段階の条件として、FBS と KSR を比較した。qPCR の結果、KSR を用いて準備した培養サンプルにおける結果が FBS を用いて準備した培養サンプルの結果と比べて 1/20 ほどの発現量を示した (Fig. 1)。

次に、細胞準備時に KSR を用いた上で、培養条件での PPAR γ 阻害剤の有無、細胞準備時での抗炎症剤と抗炎症剤の添加の有無による α SMA の発現量比較をした結果を示す (Fig. 2)。抗炎症剤へパリンナトリウム、抗酸化剤 N-アセチルシステインともに添加なしの条件に比べ、どちらか片方を添加しただけでも α SMA の発現量を大幅に抑制することができた。

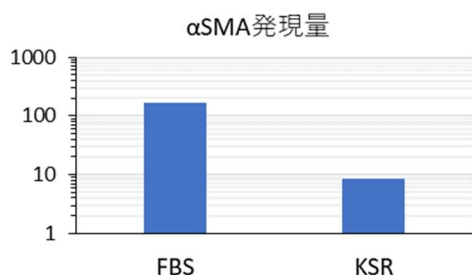


Fig. 1 FBS と KSR の α SMA 発現量比較

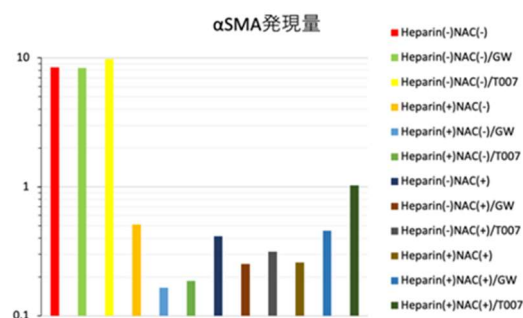


Fig. 2 各種添加剤による α SMA 発現変化

4.2 細胞機能の検証

各条件で 7 日間培養した各凝集体の形態を示す (Fig. 3)。

①陽性コントロール、②サンプルについては内部で構造化が進んでおり、③陰性コントロールでは進んでいないことがわかった。

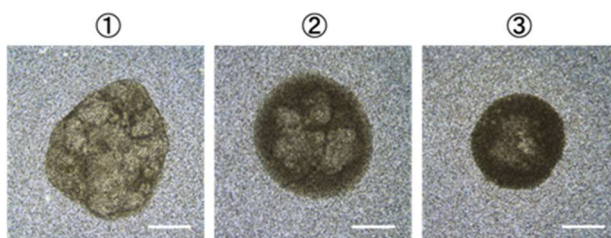


Fig. 3 各凝集体の形態観察 (①: 陽性 Ctrl ②: サンプル、③: 陰性 Ctrl) Scale bar: 200 μ m

4.3 血管様組織の作製

共焦点顕微鏡で観察した血管様組織の画像を Fig. 4 に示す。Fig. 4A より、内壁に播種された HUVEC により管が形成されていることが分かった。また Fig. 4B で示された通り血管内皮細胞に特有の細胞間接着タンパクである VE-cadherin が発現しており、管内での細胞活性が確認できた。

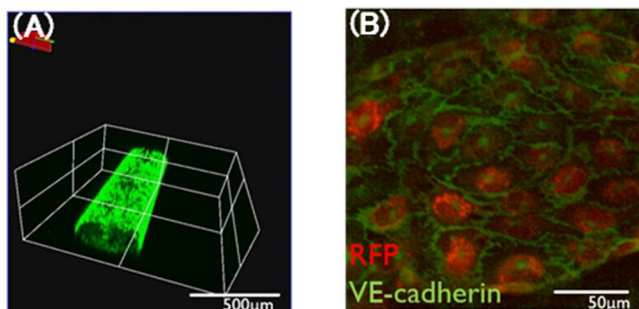


Fig. 4 血管様組織 (A) 3次元構造 (B) 密な細胞間接着

4.4 腎臓への血管新生

培養 14 日目での HUVEC の様子、及び WT1 を染色した画像を Fig. 5 に示す。Fig. 5A より、血管様組織から腎臓に向かって血管新生が起きている様子が観察された。また Fig. 5B より、これら新生した血管のうち、WT1 で染色された糸球体近くまで侵入している血管が存在することが確認された。今後の糸球体内への血管侵入と灌流が期待される一方、この血管新生が始まったのは妊娠 12.5 日目の腎臓培養開始から 6 日後であり、生体内で血管網の構築が始まる 11.5 日付近とは乖離していた。各条件での血管新生の本数を Fig. 6 に示す。Fig. 6A, B より、酸素濃度が低い状態から 20%に戻した条件と、フィブリンを混ぜた条件で血管新生の本数が増える様子が確認された。また、低酸素濃度やフィブリンの混合が血管新生の開始時期を早める様子も見られた。一方、Fig. 6C から腎臓をゲルに包埋すると本数が減少する様子も見られた。

4.5 まとめと展望

ストローマ前駆細胞の拡大培養法確立のために、2つの方針をもとに研究を進めた。1つ目の培養系の開発に関しては、分化マーカー α SMAの発現抑制について、細胞準備時の培地添加物の有無によるストローマ前駆細胞への影響について検討したところ、KSR、抗炎症剤へパリンナトリウム、抗酸化剤 N-アセチル-L-システインの添加を行うことで大幅な発現抑制を達成し、分取直後のストローマ前駆細胞と限りなく近い発現量を示した。2つ目の細胞機能の検証に関しては、3種類の前駆細胞を混ぜた凝集体、培養したストローマ前駆細胞をネフロン前駆細胞、尿管芽細胞に混ぜた凝集体で構造化がみられた。

血管網の構築については、工学的に作られた血管から腎臓内の糸球体近傍までの血管新生が達成され、また新生に関する条件間の比較検討も行うことができた。これら結果より、本実験系は、生体外での腎組織への血管新生の評価系として機能することが認められた。

一方、本実験系では血管新生が始まる日数に生体内との乖離が見られ、培養条件等にさらなる向上の余地がある。このため、今後の展望としては腎臓を配置してから1日程度の短期間で血管新生を開始する培養系の構築を目指す必要があると考える。

以上の知見を踏まえ、今後も継続してiPS細胞由来の前駆細胞のみからなる精緻で移植可能な腎オルガノイド構築を試みたい。

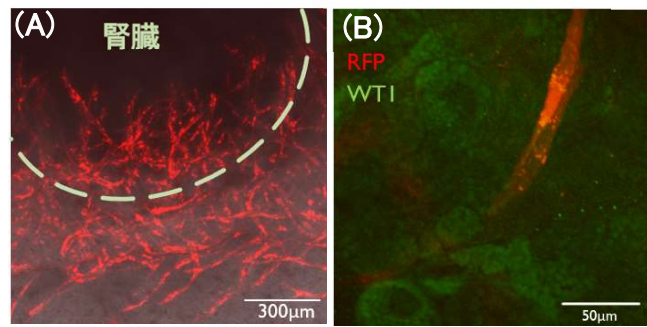


Fig. 5 血管様組織から腎臓・糸球体への血管新生
(A)腎臓への血管新生 (B)糸球体付近への侵入

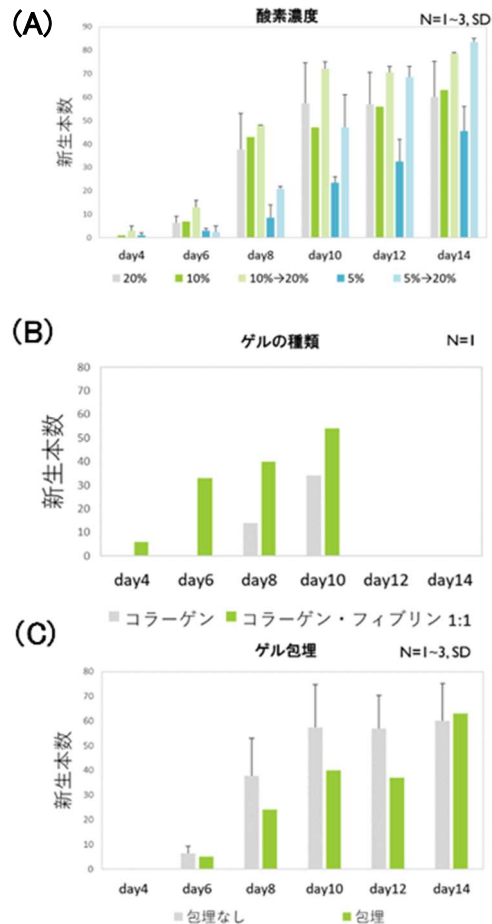


Fig. 6 各条件での新生本数
(A)酸素濃度 (B)ゲルの種類 (C)ゲル包埋

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hauser Peter Viktor, Chang Hsiao-Min, Nishikawa Masaki, Kimura Hiroshi, Yanagawa Norimoto, Hamon Morgan	4. 巻 8
2. 論文標題 Bioprinting Scaffolds for Vascular Tissues and Tissue Vascularization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 178 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering8110178	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 該当する

1. 著者名 Raykhel Irina, Nishikawa Masaki, Sakai Yasuyuki, Vainio Seppo J., Skovorodkin Ilya	4. 巻 4
2. 論文標題 Vascularization of kidney organoids: different strategies and perspectives	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Urology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fruro.2024.1355042	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 該当する

1. 著者名 西川昌輝	4. 巻 101
2. 論文標題 培養細胞は炭鉱のカナリアとなれるか	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川昌輝
2. 発表標題 肝・腎マイクロ臓器デバイスの開発
3. 学会等名 第21回再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川昌輝
2. 発表標題 前駆細胞を活用したKidney-on-a-Chipの開発と応用
3. 学会等名 日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kobayashi, T.; Chang, HM.; Danoy, M.; Nishikawa, M.; Sakai, Y.; Yanagawa, N.:
2. 発表標題 腎ストローマ前駆細胞培養法の開発.
3. 学会等名 再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shioda, H.; Myasnikova, D.; Takeuchi, S.; Hanada, S.; Danoy, M.; Nishikawa, M.; Sakai, Y.:
2. 発表標題 生体外での腎組織への血管新生
3. 学会等名 再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林拓真, チャン シャオミン, ヤナガワ ノリモト, 西川昌輝, 酒井康行
2. 発表標題 精緻な腎オルガノイド構築を目指した腎ストローマ前駆細胞培養法
3. 学会等名 日本人工臓器学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 塩田拓輝, 酒井康行, 西川昌輝, 竹内昌治, Dina Myasnikova, 花田三四郎
2. 発表標題 生体外での腎組織への血管新生
3. 学会等名 日本人工臓器学会
4. 発表年 2024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 分担 者	酒井 康行 (Sakai Yasuyuki) (00235128)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	

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		
米国	カリフォルニア大学ロサンゼルス校	ロサンゼルス在郷軍人病院	
フィンランド	Oulu大学		