

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15311

研究課題名（和文）腎毒性薬剤スクリーニングに向けた近位尿細管オンチップに対する電気特性評価手法

研究課題名（英文）Electrical characterization of renal proximal tubule epithelial cell on-a-chip for a nephrotoxic drug screening technology

研究代表者

上野 遼平（Ueno, Ryohei）

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号：80842195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究を通して経上皮電気抵抗(Trans-epithelial electrical resistance; TEER)をマイクロ流体デバイス内で測定可能なシステムを開発した。不死化した近位尿細管上皮細胞のタイトジャンクションの測定と腎毒性薬剤スクリーニングへの応用実現性を示した。さらに静電容量による上皮細胞モノレイヤーの空隙検出による細胞障害評価の可能性を示すことに成功した。これらの成果はOrgan-on-a-chipを用いた腎毒性薬剤スクリーニング技術の開発につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ流体デバイス内の細胞層に対する薬剤毒性をTEER測定によって詳細に研究した例は少なく、薬剤評価にTEER測定が実用的に利用できることを示せたことは学術的意義がある。  
社会的意義としては、次世代薬剤評価技術の発展につながることである。具体的には近年、創薬研究において動物実験に代替する薬剤評価技術として期待されているOrgan-on-a-chip技術がある。本研究では薬剤評価に電気測定を用いることで高効率な薬剤スクリーニング技術の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a microfluidic system to measure a trans-pithelial electrical resistance (TEER). Immortalized renal proximal tubule epithelial cells were cultured and the TEER of the monolayer was measured in real-time. After the formation of the monolayer, nephrotoxic drugs were introduced and the decrease in TEER was monitored due to a drug induced cellular damage on the monolayer of RPTEC.  
Moreover, we monitored capacitance of the monolayer and found that capacitance drastically changed due to a void in the monolayer caused by cellular toxicity of the drugs. These results indicated that capacitance as well as TEER were possibly considered as a biomarker for nephrotoxicity. We beleive that these results will promote the drug screening technology with organ-on-a-chips.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：経上皮電気抵抗 腎毒性薬剤スクリーニング 腎臓チップ Organ-on-a-chip タイトジャンクション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、マイクロ流体デバイスを用いた細胞培養技術によって高度に生理機能を発現した培養細胞を使用した薬剤評価技術に関する研究開発が盛んに行われている。研究開始当初、日本医療研究開発機構が主導する国プロの中に上記のようなマイクロ流体システムを用いた次世代創薬基盤技術に関するプロジェクトが行われていた。このような薬剤評価のためのマイクロ流体システムを Microphysiological system (MPS) と呼び、薬剤評価において特に重要な、血液脳関門、小腸、肝臓、腎臓の四つの組織の MPS が研究されていた。

MPS を用いた薬剤評価において、従来の手法を用いた場合は各システムがマイクロスケールであるため操作が煩雑になり、効率が著しく低下することは容易に想像がつく。このような課題を解決するためにマイクロ流体デバイスに電極を製作し、電氣的に細胞を評価する手法が研究されている。特に薬剤評価において重要な組織は生体内と外を隔てるバリア機能を有するために上皮細胞層が細胞と細胞の間にタイトジャンクションと呼ばれる細胞間結合を形成して物質輸送を制限している。このバリア機能を電気抵抗から評価する、経上皮電気抵抗 (Trans-epithelial electrical resistance; TEER) 測定と呼ばれる手法がある。これをマイクロ流体デバイス内に培養した細胞層に対して行うことで高効率に細胞の状態を評価することが可能となる。

今までは上皮細胞のバリアが十分に成熟したか確認するために TEER を用いることが多かったが、最近の MPS 分野の研究では薬剤による細胞毒性を評価するために用いられるケースも増えてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では経上皮電気抵抗 (Trans-epithelial electrical resistance; TEER) をマイクロ流体デバイス内で測定可能なシステムを開発し、近位尿細管上皮細胞の TEER 測定から腎毒性薬剤の細胞毒性を評価する技術の開発を目的とした。さらに TEER と一緒に測定される静電容量を用いて細胞の立体構造に関する情報も抽出することを目的とした。これら二つの測定結果を十分に活用することで、次世代創薬基盤技術の創出に貢献できると考える。

### 3. 研究の方法

上下二層構造のマイクロ流体デバイス内に不死化した近位尿細管上皮細胞 (Renal proximal tubule epithelial cell; RPTEC) を培養し、その TEER を日ごとに測定した。RPTEC の細胞層がコンフルエントに達し、十分にタイトジャンクションが形成されると、TEER 値が一定値に安定する。十分に安定するのに細胞を播種してから 10 日から 14 日程度かかった。その後、腎毒性薬剤として知られているシスプラチン、オキサリプラチン、ゲンタマイシン、シクロスポリン A を投与して各薬剤の細胞毒性を TEER の減少から評価した。

さらに上皮細胞に発現するカルシウムイオン受容体とタイトジャンクションの制御に関して研究するために、マイクロ流体デバイス内のカルシウムイオン濃度を変化させた場合の TEER 測定を行なった。

### 4. 研究成果

細胞間結合が十分に成熟化した RPTEC モノレイヤーに対して腎毒性薬剤であるシスプラチン、オキサリプラチン、ゲンタマイシン、シクロスポリン A を投与したところ、シスプラチンとゲンタマイシンを投与した場合には TEER 値の減少が測定されたが、オキサリプラチンとシクロスポリン A では再現性が得られなかった。前者の薬剤は親水性であるのでマイクロ流体デバイスに使用したシリコンゴムに吸着されず、細胞毒性を発現できた。一方、後者の薬剤は比較的疎水性であるため、シリコンゴムに吸着しやすく、細胞毒性を十分に発現できなかったと考えられた。次に薬剤性細胞障害によるダメージによって TEER 値が減少過程における細胞組織を固定し、免疫染色によって細胞間結合を構成するタンパク質の一種である ZO-1 を観察したところ、実際に細胞間結合にギャップが生じていることが確認された。つまり薬剤による細胞毒性が細胞間結合の破壊を誘導し、TEER 値の減少としてリアルタイムに測定できたことを証明した。以上の結果を国内学会に発表した。

このように近位尿細管上皮細胞の TEER 値の減少から薬剤の細胞毒性をモニタリングすることに成功したが、一方で上皮組織の静電容量を利用した立体構造のモニタリングは実現できていない。この主たる原因として元々近位尿細管上皮細胞の静電容量が非常に小さく、変化を捉えることが困難であることが挙げられる。しかしインピーダンス測定から静電容量を計算する手法を改善したことで RPTEC モノレイヤーの静電容量を安定して測定することに成功した。また薬剤性細胞障害によってモノレイヤー中に空隙が発生すると静電容量値の計算結果が跳ね上がることから、新しい組織障害マーカーとして静電容量が利用できることが示唆された。今後も TEER のモニタリングと共に静電容量に関するデータを蓄積して薬剤評価に役立てたいと考える。

腎毒性薬剤スクリーニングに関しては薬剤の種類を増やしただけでなく、シスプラチンの濃度依存的細胞毒性や投与方向依存的細胞毒性の測定にも成功した。またシスプラチンを途中で除去することで組織が回復する過程も TEER モニタリングから測定できており、シスプラチ

ン投与濃度や期間の最適化に本システムが有用であることがわかった。

最後にマイクロ流体デバイス内のカルシウムイオン濃度を变化させた場合のタイトジャンクションの変化と TEER 測定結果について述べる。簡潔に述べると上皮細胞のカルシウムイオン受容体が存在する頂端膜側のイオン濃度を变化させた場合にのみ、TEER 値の変化が見られ、受容体が存在しない基底外側膜側のイオン濃度を变化させた場合は変化が見られなかった。このような結果は先行研究と合致し、本システムが薬剤スクリーニング技術だけでなく、上皮細胞の生理機能解明にも役立つことが示された。

本研究成果を通して、TEER 測定および静電容量評価による薬剤性細胞障害のリアルタイムモニタリングの実用性が示された。この結果は次世代創薬基盤技術に貢献するものである。

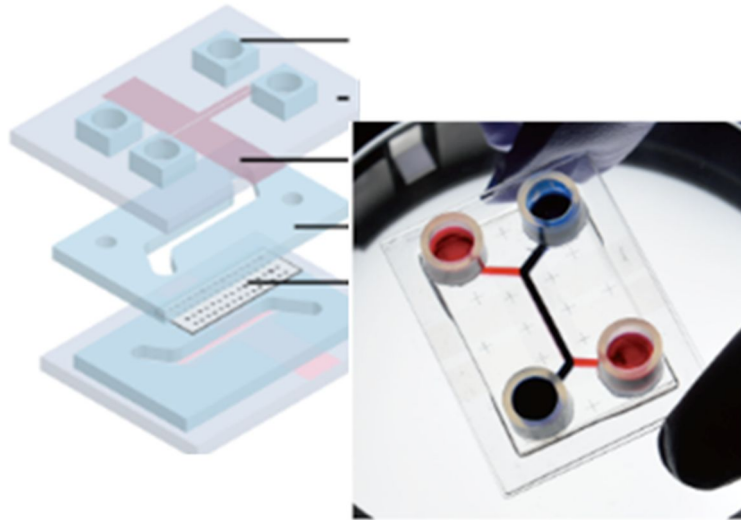


図 1 本研究で開発したマイクロ流体デバイス内で TEER 測定可能なシステム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takata Yuji, Ueno Ryohei, Sadeghian Ramin Banan, Naganuma Kaori, Tsuji Kiyotaka, Fujimoto Kazuya, Yokokawa Ryuji	4. 巻 142
2. 論文標題 Evaluation of Trans-epithelial Electrical Resistance by Removal and Replenishment of Extracellular Ca <sup>2+</sup> ;	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 21～28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejmmas.142.21	査読の有無 有
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9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Y. Takata, R. Ueno, R. B. Sadeghian, K. Naganuma, K. Tsuji, R. Yokokawa
2. 発表標題 Evaluation of Trans-Epithelial Electrical Resistance of Proximal Tubule Tissue by Inclusion and Removal of Extracellular Calcium Ion.
3. 学会等名 MEMS2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. B. Sadeghian, R. Ueno, T. Araoka, J. K. Yamashita, T. Enoki, M. Takasato, R. Yokokawa
2. 発表標題 Effect of Perfusion Culture on Localization, Intensity, and Functionality of Transporter Proteins in a Bilayer Proximal Tubule-on-a Chip.
3. 学会等名 MEMS2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Kawakami, R. Ueno, R. B. Sadeghian, T. Araoka, J. Yamashita, M. Takasato, R. Yokokawa
2. 発表標題 Proximal Tubule on a Chip for Evaluating P-Glycoprotein Transport Property.
3. 学会等名 MEMS2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1．発表者名 R. B. Sadeghian, R. Ueno, T. Araoka, J. K. Yamashita, T. Enoki, M. Takasato, R. Yokokawa
2．発表標題 Effect of Shear Stress on the Expression of Functional Proteins in a Bilayer Proximal Tubule-on-a-Chip.
3．学会等名 microTAS2020 (国際学会)
4．発表年 2020年

1．発表者名 高田 裕司, 上野 遼平, Ramin Banan Sadeghian, 永沼 香織, 辻 清孝, 横川 隆司
2．発表標題 細胞外カルシウムイオンON/OFFに対する経上皮電気抵抗変化の評価.
3．学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4．発表年 2020年

1．発表者名 上野 遼平, 高田 裕司, Ramin Banan Sadeghian, 永沼 香織, 辻 清孝, 横川 隆司
2．発表標題 近位尿細管上皮細胞のバリア機能とシスプラチンによる細胞毒性の電気測定.
3．学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4．発表年 2020年

1．発表者名 R. B. Sadeghian, Q. Du, R. Ueno, K. Yabuuchi, Y. Sahara, M. Takasato, R. Yokokawa
2．発表標題 Evaluation of Proximal Tubule Cells Extracted from hiPSC-Derived Kidney Organoids Using a Microphysiological System.
3．学会等名 第42回化学とマイクロナノシステム研究会
4．発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Takata, R. Ueno, R. B. Sadeghian, K. Fujimoto, R. Yokokawa.
2. 発表標題 Monitoring Nephrotoxicity on a Proximal Tubule Mycrophysiological System by Trans-Epithelial Electrical Resistance Measurements.
3. 学会等名 The 35th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田 裕司, 上野 遼平, Ramin Banan Sadeghian, 永沼 香織, 辻 清孝, 横川 隆司.
2. 発表標題 近位尿細管上皮細胞のカルシウム受容体活性化による経上皮電気抵抗変化の評価
3. 学会等名 第38回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻横川研究室 <a href="https://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/">https://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/</a>
--

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

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
---------	---------