

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02762

研究課題名（和文）高機能マイクロ腎モデルの開発とバイオアッセイへの応用

研究課題名（英文）Development of a highly functional microkidney model and its application to bioassays

研究代表者

佐藤 記一（Sato, Kiichi）

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：50321906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマイクロ流体デバイス内にヒトの腎臓由来の細胞を二次元および三次元共培養することで、糸球体モデルと尿細管モデルを開発することをめざした。各種培養条件を検討することで腎臓由来細胞のマイクロ流体デバイス内での培養条件の最適化を行った。また、培地流による剪断応力を印加したモデルを構築した。さらに、得られた正常モデルに疾患誘導因子を作用させることにより、疾患モデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した腎モデルを用いることにより、将来的には正常な腎排泄機能を維持するために必要な因子や、疾患を引き起こす因子、治療薬の探索が可能になり、腎臓病の治療法の開発や創薬につながることを期待される。さらに、本研究で検討した剪断応力下での共培養技術を応用することにより、将来的には他の臓器・組織の血管や消化管など、生体内のさまざまな管腔における物質透過性試験やその疾病モデルへの幅広い応用が可能となり、医学薬学への幅広い波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop glomerular and tubular models by 2- or 3-dimensional co-culture of human kidney-derived cells in a microfluidic device. Using the fabricated device, we optimized the culture conditions for kidney-derived cells by investigating different culture conditions. In addition, the characteristics of the models were clarified for the model in which shear stress due to medium flow was applied and for the disease model constructed by applying disease-inducing factors to the normal model.

研究分野：生物分析化学

キーワード：バイオアッセイ 腎臓 マイクロ流体デバイス マイクロ臓器モデル 生体模倣システム

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓の基本単位であるネフロンは主に糸球体と尿細管からなり、血液から尿を作り出す重要な働きをしている (図1)。糸球体は糸球体上皮細胞 (ポドサイト) と内皮細胞が高度に分化した濾過障壁を形成しており、血液から原尿を濾過する過程を担っている。一方、尿細管は尿細管細胞とそれを取り囲む毛細血管網からなり、原尿から必要な栄養分を再吸収し、逆に血中の不要成分を原尿側に分泌する役割を担っている。

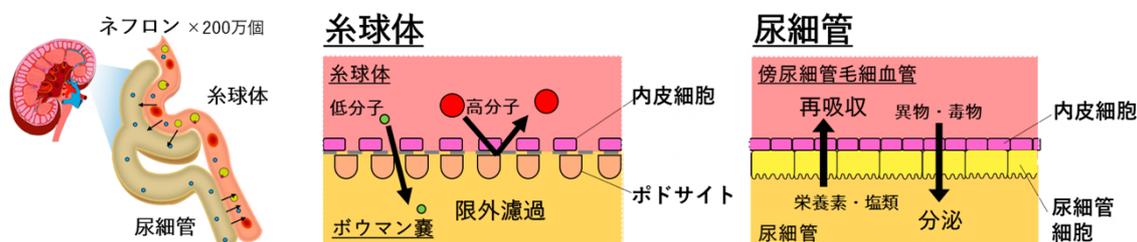


図1 腎臓を構成する糸球体と尿細管の模式図

本来、糸球体では低分子化合物のみが濾過されて排泄され、タンパク質や血球は血中に残る。この正常な濾過機能を維持するためにはポドサイトと内皮細胞の連携が重要であり、異常を来すと重篤な疾病を引き起こす。糸球体を構成する細胞に異常が生じ、通常は尿中に漏出しないタンパク質が糸球体を透過して尿中に漏出すると、ネフローゼ症候群など種々の腎疾患を発症する。また尿細管も同様で、炎症や薬の副作用などにより尿細管細胞が損傷を受けた場合にも種々の腎疾患を発症する。

これら発症機構を詳細に解析し、発症を誘発する因子や、逆に発症を抑制して腎臓の保護に働く治療薬を探索するためには、この過程を詳細にバイオアッセイ (生物学的な応答を利用した分析) することが可能な実験系が必要である。しかしながら、これまでに開発されてきた生体外腎モデルのほとんどは尿細管モデル細胞に対する薬剤の細胞毒性を調べるだけのものであり、腎排泄の機能を十分に発現したモデルや、その疾患モデルは未だ開発されていない。そのため、こういった解析は動物実験に頼らざるを得なかった。

これまでに研究代表者は、糸球体として細胞の代わりに透析膜を、尿細管として尿細管細胞と類似のトランスポーターを発現している腸由来の細胞を用いてマイクロ腎モデルを構築する研究に従事してきた。開発したモデルは腎排泄機能を模倣したモデルとしては一定の性能を有しているものの、腎臓の生理的モデルとは言いがたい上、疾患モデルの構築には応用できないものであった。

そこで研究代表者は、腎疾患を誘発する因子の探索やそれを治療する新薬の探索のための、簡便かつ詳細なバイオアッセイを可能とする新たなマイクロ腎モデルの開発を着想した。開発するモデルでは、糸球体においてポドサイトと内皮細胞が分子量による物質分離能を有した濾過膜として機能する際に重要な細胞の形状や骨格の変化や、2種の細胞間の相互作用を簡便かつ詳細に調べることが可能になる。また同様に尿細管部位においても尿細管細胞と内皮細胞の形状や機能発現、相互作用を解析できるようになる。これにより、正常な排泄機能を維持するために必要な因子や、疾患を引き起こす因子、治療薬の探索が可能になり、治療法の開発や創薬の可能性につながる事が期待される。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、腎臓を構成する糸球体と尿細管2つの部位それぞれのマイクロ流体モデルを開発し、その性能を評価することを本研究の目的とした。どちらの部位も2種類の細胞の共培養により構築するが、メンブレンフィルター上での二次元培養とハイドロゲル中での三次元培養の2種類の方法で作製を試みることにした (図2)。

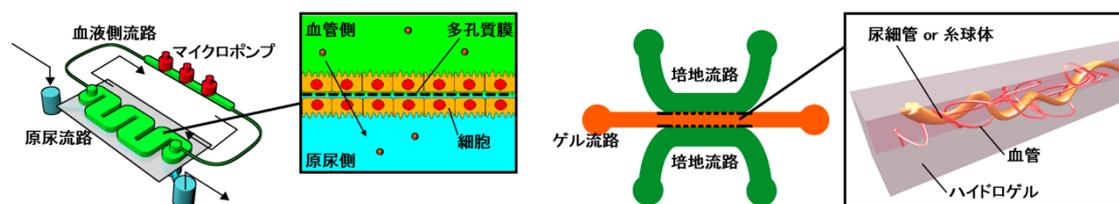


図2 マイクロデバイス内での二次元培養 (左) および三次元培養 (右) の模式図

マイクロ流路の中央に配置したメンブレンフィルターの両面に細胞を培養する二次元培養法では、細胞の観察、培地流による剪断応力の印加、細胞層を通過する物質の透過性試験を容易に行うことができるという長所がある一方で、平面培養された細胞を高度に分化させることは難しく、すべての機能を十分に発現させるのが困難であると言われている。一方、適切なハイドロゲル中で細胞を懸濁培養すると自発的に三次元的な微小臓器（オルガノイド）様の構造を形成することが可能であるといわれ、その活性は二次元培養されたものよりも高くなることが一般的である。しかし、形成したオルガノイドの内部を観察し、実際に溶液を流して透過性試験を行うことは技術的に極めて難しい。本研究ではこれら両方のアプローチで研究を進め、より優れたモデルを構築するとともに、モデル化合物による疾患モデルの構築をめざした。

### 3. 研究の方法

本研究では糸球体モデルと尿細管モデルの開発を別々に試みたが、どちらも二次元培養法および三次元培養法両方での構築を試み、その性能の評価を行った。最後に疾患モデルの構築を試みた。

#### (1) デバイスの作製

二次元培養法および三次元培養法のためのマイクロデバイスをそれぞれ設計し、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いて試作した。二次元培養デバイスについては、並行する2本の流路がメンブレンフィルターを介して接している構造を作製し、流路およびメンブレンフィルターの素材、膜厚、孔径、チップ基板と膜の貼り合わせの方法などについて最適化を試みた。

一方、三次元培養デバイスについては、細胞を培養するハイドロゲル流路と培地流路が平行に隣接した構造を作製し、両流路の境界面については連続した柱構造や類似の微細構造、メンブレンフィルター等で隔てる方法や、ゲルから棒状構造を引き抜いて培地流路を作製する方法などについて検討した。

#### (2) 細胞の共培養法の確立

(1)で作製したデバイス内で細胞培養を試みた。糸球体については不死化健常ヒトポドサイトおよび不死化健常ヒト糸球体内皮細胞の共培養を試み、尿細管については不死化ヒト腎近位尿細管細胞と不死化健常ヒト糸球体内皮細胞の共培養を試みた。

二次元培養の場合は、メンブレンフィルターを基底膜に見立て、その表側に内皮細胞、裏側にポドサイトもしくは尿細管細胞を培養し、その生育と分化の状態を確認した。培地組成、培地流速、培養温度、血管側流路への印加圧力、メンブレンフィルターのコーティング条件などを検討し、培養条件の最適化を試みた。

三次元培養の場合は、コラーゲンやマトリゲルなど細胞外マトリックスハイドロゲル内に細胞を懸濁した状態で培養を行った。共培養する細胞とともにゲルに懸濁させる方法に加え、片方の細胞をゲルの外側にも播種する方法などについて、ハイドロゲルの種類や組成、培地組成、培地流速、培養温度を検討し、培養条件の最適化を試みた。どちらの場合も分化が不十分な場合には線維芽細胞などを加えた3種共培養についても検討した。

二次元培養の場合は高い機能を発現するように細胞の分化状態を保つ工夫が必要とされており、培地中の液性成分、細胞外マトリックスゲル、分化を促す細胞との共培養などについて重点的に検討する一方、三次元培養の場合は自発的に形成した管状構造に溶液を流すためのマイクロ流路との接続部分の難易度が高く、これを実現する細胞の誘因方法と流路形状の工夫について重点的に検討した。

#### (3) 細胞の状態の解析

構築したマイクロモデルについて、免疫染色を含めた細胞形態の共焦点顕微観察により、各細胞の状態の解析を行った。具体的には内皮細胞による毛細血管網、尿細管の管状構造、ポドサイトの細胞骨格の変化などについて解析し、細胞層の物質透過性との相関について考察した。

#### (4) 透過性試験による二次元モデルの機能評価

低分子化合物、あるいはアルブミンやデキストランなど高分子化合物を血管側流路に添加し、もう一方の流路に漏出してきた量をはかることにより透過率を算出した。試料として蛍光物質や蛍光標識物質を用いることで定量を行った。各流路での溶液の流速と流路間の圧力差を検討することにより、より実際の腎臓に近い透過率が得られるようにシステムの最適化を試みた。

#### (5) 液性因子による二次元腎疾患モデルの開発

糸球体の透過性を亢進させ、ネフローゼ症候群の原因となることが知られている化合物などを血管側流路に添加することにより腎疾患モデルを構築し、実際にタンパク質透過性が亢進されるか定量的に評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) デバイスの作製

二次元培養デバイスとして、孔径 1  $\mu\text{m}$  の PET 製メンブレンフィルターを挟んで上下に2本の流

路が並行するマイクロデバイスを、PDMS を用いて作製した。未硬化 PDMS をヘキサンで希釈したものを接着剤として使用することで、漏れのないデバイスの安定的な作製を実現した。三次元培養デバイスについては、細胞を培養するハイドロゲル流路の隣に培地流路を 2 本平行に配置したデバイスを作製した。両流路の境界面については連続した柱構造で隔てる方法に加え、ゲル流路と培地流路の高さを変えることで表面張力を生み出し、ハイドロゲルをゲル流路内のみにとどめる方法についても確立した。また、あらかじめハイドロゲルの内部に配置したナイロン製の糸を引き抜くことで培地流路を作製する方法についても検討したが、直線的な流路をゲルの中央に再現よく配置することが困難であったため、これについては細胞培養には用いなかった。

## (2) 二次元糸球体モデルの開発

二次元糸球体モデル構築のため、二次元培養デバイスの膜の表面に不死化健常ヒト糸球体内皮細胞を、裏面に不死化健常ヒトポドサイトを播種し、33°Cで3日、37°Cで7日間培養を行った。基底膜に見立てたメンブレンフィルターの表面をフィブロネクチン、裏面を Type-1 コラーゲンでコーティングしたときに両細胞が良好に生育した。ポドサイトについては足突起の形成が一部不十分であったが、培地組成を検討した結果、ポドサイト用培地に含まれる血清濃度を 10% から 2% に低下させることで足突起の形成が改善し、より良好な培養を実現した (図 3)。構築したモデルについて、透過性試験により濾過機能評価を行った。低分子化合物としてカルセイン、高分子化合物としてアルブミン、中性および負に帯電した化合物としてデキストラン誘導体を用いた。その結果、低分子であるカルセインは透過し、高分子であるアルブミンは透過が大幅に抑制された。また、有意差は得られなかったものの、中性化合物に比べ負に帯電した化合物は透過が抑制される傾向が見られた。この結果は生体内の糸球体における選択性と矛盾しないことから、糸球体の濾過機能を評価できるモデルの構築が行えたと判断した。

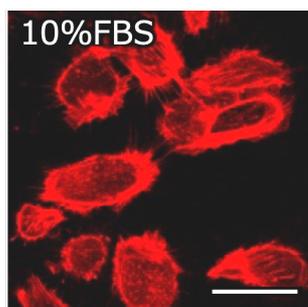


図 3 ポドサイトに対する血清濃度の影響

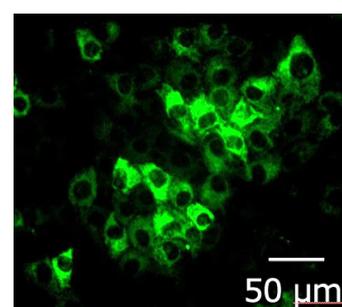
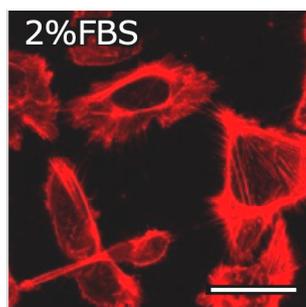


図 4 細胞内への色素の蓄積

## (3) 二次元尿細管モデルの開発

二次元尿細管モデル構築のため、二次元培養デバイスの膜の表面に不死化健常ヒト糸球体内皮細胞を、裏面に不死化ヒト腎近位尿細管細胞を播種し、33°Cで3日、37°Cで7日間培養を行った。メンブレンフィルターの表面をフィブロネクチン、裏面をマトリゲルでコーティングしたときに両細胞が良好に生育した。構築したモデルについて、細胞によって輸送されない高分子化合物および低分子化合物に対するバリア機能を評価したところ、良好なバリア機能を有することがわかった。一方、細胞によって輸送されるモデル化合物であるローダミン 123 の輸送試験を試みたところ、細胞内への取り込みは確認できたものの、反対側に排泄されず、細胞内に蓄積した (図 4)。これは本実験で用いた細胞が十分に排出側のトランスポーターを十分に発現していないことが原因と考えられ、用いる細胞種の変更もしくは培養条件のさらなる検討が必要であると考えられる。

## (4) 三次元糸球体モデルの開発

三次元糸球体モデル構築のため、マトリゲルとフィブリンゲルの混合ゲルに不死化健常ヒト糸球体内皮細胞および不死化健常ヒトポドサイトを懸濁し、三次元デバイスのゲル流路に導入して培養を行った。その結果、試みた全てのゲル組成でゲルの崩壊が見られたため、培地を変更することで最適な培養条件を検討した。その結果、培養の前半では内皮細胞用培地とポドサイト用培地を 3:1 で混合した培地を用い、後半では血清濃度を 2% に下げたポドサイト用培地を用いることで、ゲルが崩壊せず、細胞がより良好に伸展することを見いだした。さらに、より太い血管を形成させるため、血管内皮細胞増殖因子およびヒト皮膚線維芽細胞をゲル内に懸濁したところ、血管ネットワークが密になり、血管がわずかに太くなることが分かった。

## (5) 三次元尿細管モデルの開発

三次元尿細管モデル構築のため、マトリゲルもしくはフィブリンとの混合ゲルに不死化健常ヒト糸球体内皮細胞および不死化ヒト腎近位尿細管細胞を懸濁し、三次元デバイスのゲル流路に導入して培養を行った。まず、マトリゲル濃度および細胞播種密度を検討し、尿細管細胞を 4 日

間単独培養したところ良好なネットワーク構造の形成を確認した。内皮細胞単独培養においては、培養中に重力の影響で細胞がゲルの下部に局在化する問題が見られた。そこで、内皮細胞の誘引作用をもつ線維芽細胞を、ハイドロゲルの上に培養可能とする新たなマイクロチップを開発した。そのマイクロチップを用いて、マトリゲルとフィブリンゲルの混合ゲル中に内皮細胞を懸濁し、ゲルの上に線維芽細胞を播種して7日間共培養した。その結果、ハイドロゲル全体に広がる内皮細胞ネットワークの構築を実現した。これらの結果をもとに尿細管細胞と内皮細胞の共培養条件を検討したところ、細胞ネットワークの形成が見られたが、培養3日目にはネットワークが衰退してしまうことが明らかとなった。そこで、内皮細胞の安定に寄与する間葉系幹細胞をさらに追加して共培養することで、培養日数を伸ばすことを試みた。その結果、培養3日目においても尿細管細胞と内皮細胞の細胞ネットワークが維持されることを見いだした。

#### (6) 灌流培養二次元モデルの開発

糸球体にかかる剪断応力を再現するために灌流培養を行った。内皮細胞およびポドサイトを播種し、シリンジポンプを用いて培地を流すことで、内皮細胞に0.75、1.0、1.2 dyne cm<sup>-2</sup>の剪断応力を印加しながら培養した。灌流培養後に蛍光観察した細胞の様子から、0.75、1.0 dyne cm<sup>-2</sup>の剪断応力を印加することで、内皮細胞が灌流方向の向きに沿って配向する様子やポドサイトが伸展している様子が見られた。一方、1.2 dyne cm<sup>-2</sup>の剪断応力を印加した条件では、内皮細胞の配向は見られず、ポドサイトは一部剥離している様子が見られた(図5)。一方、灌流培養して剪断応力を印加しながら構築した尿細管モデルについては、灌流培養により、細胞密度が向上し、また細胞間の密着結合が顕著に増加することがわかった(図6)。今後、バリア機能およびトランスポーターの輸送能の変化についても検討を続ける予定である。

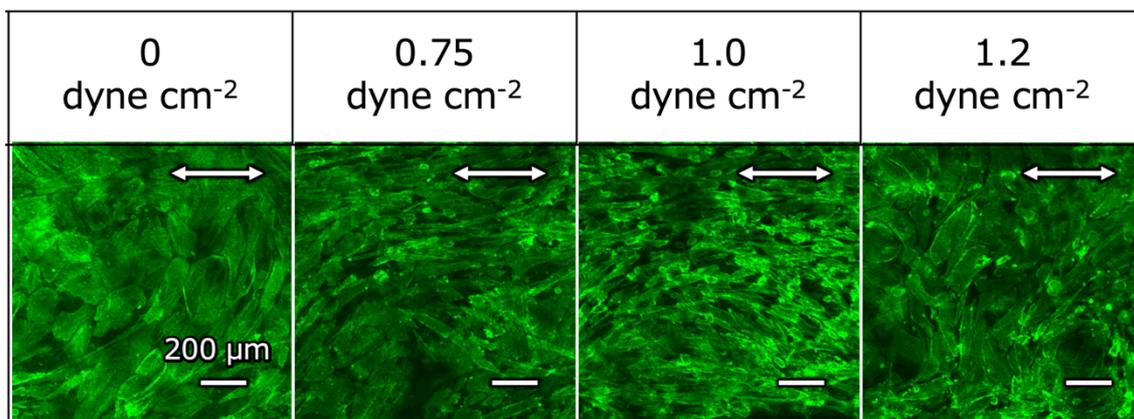


図5 内皮細胞に対する剪断応力の影響

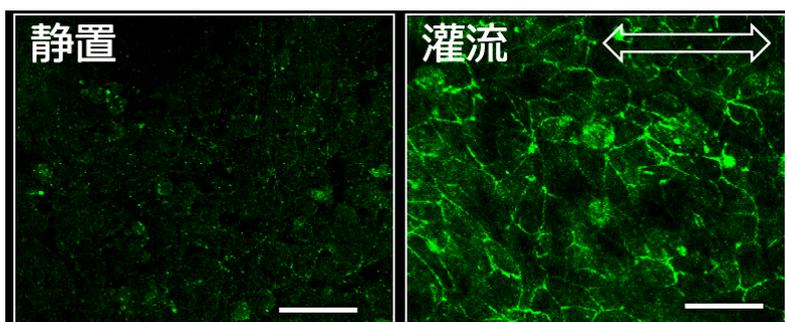


図6 密着結合に対する剪断応力の影響(ZO-1の免疫染色結果)

#### (7) 液性因子による二次元糸球体疾患モデルの開発

糸球体疾患因子を添加することで疾患モデルの構築を試みた。マイクロチップ内で培養した内皮細胞およびポドサイトに、糸球体疾患を招くことが知られている lipopolysaccharide (LPS)、puromycin aminonucleoside (PAN)、polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) を5、25、50 μg mL<sup>-1</sup>の濃度で24 h作用させて疾患モデルの構築を試みた。疾患因子モデル構築後、透過性試験によって濾過機能を評価した結果、疾患因子を添加していない条件と比較して、疾患因子を一定以上の濃度で添加した条件において高分子化合物であるアルブミンの透過率が上昇する傾向が見られ、疾患モデルが構築できたと判断した。今後、治療薬のバイオアッセイに使用可能か検討を行う予定である。

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 1件）

1. 著者名 SATO Kae, SATO Kiichi	4. 巻 72
2. 論文標題 Angiogenesis Evaluation Techniques Developed by Using Microfluidic Devices	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 73～78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.72.73	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13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山崎実優、佐藤記一
2. 発表標題 尿細管モデル開発のための尿細管細胞と血管内皮細胞の三次元共培養
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 毛利真桜、高橋拓巳、小林靖子、佐藤記一
2. 発表標題 正常および疾患マイクロ系球体モデルの開発とその濾過機能評価
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤記一
2. 発表標題 バイオアッセイのためのマイクロ臓器モデルの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎実優、佐藤記一
2. 発表標題 尿細管モデル開発のための尿細管細胞と血管内皮細胞の三次元共培養
3. 学会等名 日本化学会 第12回 CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉謙、小林靖子、佐藤記一
2. 発表標題 ハイドロゲルを用いた三次元マイクロ系球体モデルの構築
3. 学会等名 日本化学会 第12回 CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎実優、佐藤記一
2. 発表標題 三次元尿細管モデル開発のための尿細管細胞と内皮細胞の共培養と線維芽細胞の効果
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎実優、佐藤記一
2. 発表標題 三次元尿細管モデル開発のための尿細管細胞と内皮細胞の共培養における線維芽細胞導入の検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuzuru Chiba, Yasuko Kobayashi, Kiichi Sato
2. 発表標題 Development of a three-dimensional micro glomerular model for drug excretion assays
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyu Yamazaki, Kiichi Sato
2. 発表標題 Three-dimensional co-culture to construct a microtubule model for renal excretion assays
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 毛利眞桜、高橋拓巳、小林靖子、佐藤記一
2. 発表標題 生体内の流れ刺激を模倣したマイクロ系球体モデル開発のための培養条件の検討
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 毛利眞桜、高橋拓巳、小林靖子、佐藤記一
2. 発表標題 マイクロ系球体モデルの開発と濾過障壁機能の評価
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mao Mori, Takumi Takahashi, Yasuko Kobayashi, Kiichi Sato
2. 発表標題 Development of a micro-glomerular model and evaluation of its filtration barrier function for pathological analysis of glomerular diseases
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋拓巳、小林靖子、佐藤記一
2. 発表標題 ヒト糸球体内皮細胞株およびヒト蝟足細胞株を用いたマイクロ糸球体モデルの開発と糸球体透過試験への応用
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Masoud Mozafari (Eds.)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Woodhead Publishing	5. 総ページ数 490
3. 書名 Principles of Human Organs-on-Chips	

1. 著者名 日本分析化学会、渡慶次 学、真栄城 正寿、佐藤 記一、佐藤 香枝、火原 彰秀、石田 晃彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 156
3. 書名 マイクロ流体分析	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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