

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19090

研究課題名（和文）バイオアッセイのためのマイクロ系球体モデルおよびその病態モデルの開発

研究課題名（英文）Development of a Micro-Glomerular Model and its Pathological Model for 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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：腎臓の糸球体は血液から原尿を濾過する重要な役割を担っており、この濾過障壁はポドサイト、基底膜、糸球体内皮細胞から構成されている。本研究ではマイクロ流体デバイス上に糸球体モデルを構築することを試みた。ポリジメチルシロキサン（PDMS）とメンブレンフィルターを用いて作製したデバイス内で、健常ヒトポドサイト細胞株および健常ヒト糸球体内皮細胞株を培養する条件を確立した。さらに、疾患因子の添加により疾患モデルの構築を実現し、細胞の観察と透過性試験により正常モデルとの比較を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物実験削減が推奨される中、臓器モデルやその疾病モデルは病態解析や創薬のための強力な分析ツールとして期待され、様々な臓器や組織のモデルの開発が注目されている。開発したシステムが実用化できれば腎疾患に関する治療・創薬研究の発展に大いに貢献できるものと期待され、さらには血管や消化管など、生体内のさまざまな管腔における物質透過性やその疾病に関するモデルへの幅広い応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The glomerulus of the kidney plays an important role in filtering primary urine from the blood, and this filtration barrier is composed of podocytes, basement membrane, and glomerular endothelial cells. In this study, we tried to construct a glomerular model on a microfluidic device. We established the conditions for culturing normal human podocyte cell lines and normal human glomerular endothelial cell lines in a device fabricated using polydimethylsiloxane (PDMS) and membrane filters. Furthermore, we realized the construction of a disease model by adding disease factors and compared it with the normal model by cell observation and permeability test.

研究分野：生物分析化学 マイクロナノデバイス

キーワード：マイクロ流体デバイス 臓器モデル 腎臓 腎モデル 糸球体 バイオアッセイ

1. 研究開始当初の背景

動物実験削減が推奨される中、臓器モデルやその疾病モデルは病態解析や創薬のための強力な分析ツールとして期待されている。近年、マイクロデバイス上に臓器モデルを構築する Organ-on-a-Chip に関する研究が世界的に注目されており、様々な臓器や組織のモデルが開発されてきた。しかし、これまでに糸球体内皮細胞と糸球体上皮細胞（ポドサイト）を用いて、マイクロ流体デバイス上に糸球体のモデルを構築した例はほとんど報告されていなかった。

糸球体は常に血液をろ過し続ける環境下であり、ポドサイト細胞株および糸球体内皮細胞株を通常の方法で培養しても、流れストレスが負荷されないために正しく分化状態を維持させることができないため、流体デバイス上に糸球体モデルを構築することは極めて重要であるにもかかわらず、透過性試験が行えるような、細胞を用いた糸球体のマイクロ流体モデルはこれまでに開発例は報告されていなかった。

技術的に見ると、膜上に細胞を培養する研究は少なくないが、細胞を培養した膜に圧力をかけて溶液をろ過することにより、細胞の分化を制御することは難易度が高い。また、医学生理学的な面から見ても、ポドサイト細胞株を分子量による物質分離が可能なレベルまで分化させながら各種実験を行うことはこれまでに十分に実現されておらず、本システムが開発できれば腎疾患に関する治療・創薬研究の発展に大いに貢献できるものと期待され、さらには血管や消化管など、生体内のさまざまな管腔における物質透過性やその疾病に関するモデルへの幅広い応用が期待される。

それに対し、研究代表者は10年以上にわたってマイクロ流体デバイス上に臓器モデルを構築する研究を行ってきており、これまでにいくつもの臓器についてマイクロモデルを構築してきた。腎臓のモデルとしては、細胞を用いずに透析膜を糸球体に見立てて透過性試験を実現したが、これは単なる透析による分子量分画デバイスであり、細胞が関与する過程や腎疾患による異常を再現できない。腎モデルについては腎疾患の機構解明や治療薬探索のためにも腎由来の細胞を用いたモデルが必要とされている。そのため、本研究によりポドサイトと内皮細胞を用いたモデルを構築し、よりヒト腎臓に近いモデルを構築することは極めて意義深いと考えた。

2. 研究の目的

腎臓の糸球体は血液から原尿をろ過する重要な役割を担っている。この高度に分化したろ過障壁はポドサイト、基底膜、糸球体内皮細胞から構成されている（図1）。ポドサイトと内皮細胞の連携は正常なる過機能の維持に重要であり、異常を来すと重篤な疾病を引き起こす。本研究ではヒトポドサイト細胞株及びヒト糸球体内皮細胞株を使用して、マイクロデバイス上に糸球体モデルを構築し（図2）、正常な糸球体ろ過及び疾患におけるその破綻の機構解明と新規治療法開発への礎とすることを目的とした。

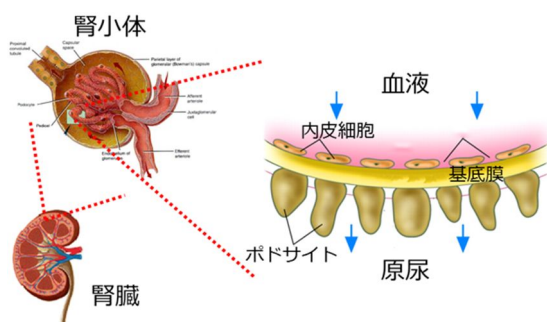


図1 腎臓の糸球体の構造

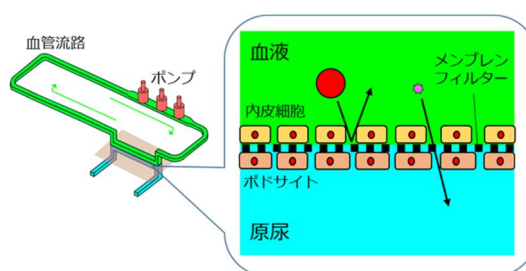


図2 マイクロ糸球体モデルの模式図

本来、糸球体では低分子化合物のみがろ過されて排泄され、高分子タンパク質は血中に残る。しかし、ネフローゼ症候群など種々の腎疾患では、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高分子タンパク質が糸球体を透過して尿中に漏出する。この現象を詳細に解析し、発症を誘発する因子を探索したり、逆に発症を抑制して糸球体保護に働く新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することが可能なモデル系が必要である。しかしながら、これまでに分子量に応じた物質分離を行うという糸球体の機能を十分に発現した生体外組織モデルは開発されておらず、動物実験に頼らざるを得なかった。

それに対し、マイクロ糸球体モデルを開発することで、糸球体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が可能になると考えた。このデバイスを用いることにより、膜の表裏に培養された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ろ過膜として機能する際に重要である細胞の形状や骨格の変化、2種の細胞間での相互作用を簡便かつ詳細に調べることが可能になる。これにより、将来的に正常なる過機能を維持するために必要な細胞内因子や、発症を抑える新薬候補物質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ことを期待される。

3. 研究の方法

(1) デバイスの作製

マイクロ系球体モデルのためのマイクロ流体デバイスを設計、試作した。ポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて、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のデバイスを作製し、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。

(2) デバイス内での細胞の共培養法の確立

作製したデバイス内で健常ヒトポドサイト細胞株および健常ヒト系球体内皮細胞株の培養を試みた。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表面修飾条件などを検討し、培養条件の最適化を試みた。

(3) マイクロ系球体モデルを用いた透過性試験法の確立

低分子化合物、あるいはアルブミンなど高分子タンパク質を血管側流路に添加し、原尿側流路に漏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を用いることで、流路内での定量を試みた。各流路での溶液の流速を検討することにより、よりヒト系球体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。

(4) 細胞の状態の解析

構築したマイクロ系球体モデルについて、免疫染色を含めた細胞形態の顕微観察により、各細胞の状態の解析を試み、細胞の分化状態を確認した。

(5) 液性因子による腎疾患モデルの開発

系球体の透過性を亢進させることが知られている Vascular endothelial growth factor (VEGF) や Lipopolysaccharide (LPS)、Puromycin aminonucleoside (PAN) などの化合物を系球体モデルの血管側流路に添加することで系球体疾患モデルを構築し、タンパク質透過性が亢進されるか調べることにより、その特性を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) デバイスの作製

細胞への剪断応力の印加および系球体ろ過機能の評価が可能である、2つの平行なマイクロ流路がメンブレンフィルターを介して接触している設計をしたマイクロチップを作製した。細胞接着の足場となるメンブレンフィルターの検討を行い、孔径 1 μm の多孔質 PET 薄膜を用いることとした。

(2) デバイス内での細胞の共培養法の確立

作製したマイクロチップ内のメンブレンフィルターの表面と裏面にそれぞれ内皮細胞とポドサイトを共培養した。メンブレンフィルターのコーティング条件などの培養条件を検討することにより、両細胞をコンフルエントに培養することができた。

(3) マイクロ系球体モデルを用いた透過性試験法の確立

構築したこれらのモデルを用いて透過性試験を行った。蛍光物質として低分子化合物であるカルセインおよび高分子化合物であるローダミン標識アルブミンを用いた。試験条件を検討することにより、カルセインは透過し、アルブミンは透過が抑制されるという、人体での透過特性と同様の結果が得られた。これにより、開発したマイクロ系球体モデルが人体の系球体ろ過のモデルとしてふさわしい性能を有していると結論した。

(4) 細胞の状態と剪断応力の影響

培養した細胞層について、密着結合の形成を確認するために密着結合に関わる ZO-1 の免疫染色を行ったところ、静置培養した内皮細胞において十分な密着結合の形成が確認された。それに対し、内皮細胞に血流に相当する剪断応力を印加したところ、弱い剪断応力を印加すると流れの向きに細胞が配向し、バリア機能が向上する傾向が見られたものの、剪断応力を大きくすると細胞間に一部間隙を生じ、バリア機能の低下が見られた(図3)。そのため、開発したモデルでは 0.75 dyne cm^{-2} 程度の剪断応力を印加するのが最適培養条件であると結論した。

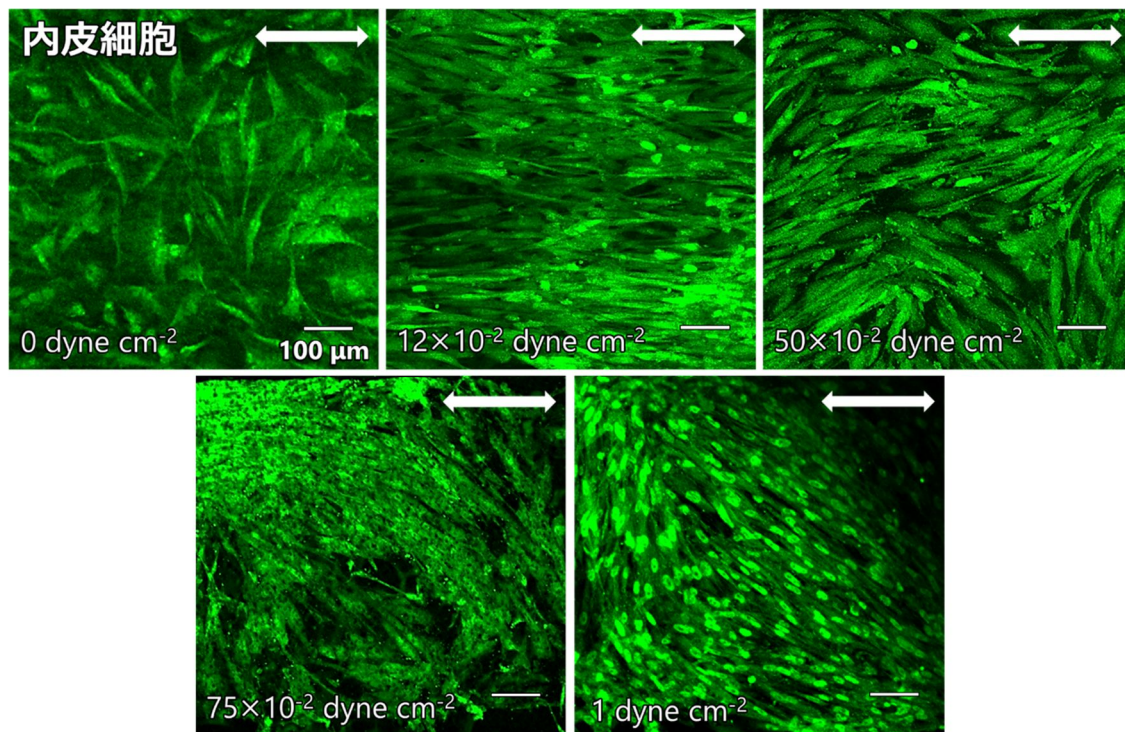


図3 剪断応力下で培養した糸球体内皮細胞（矢印は剪断応力の向き）

(5) 液性因子による腎疾患モデルの開発

糸球体疾患因子である PAN および LPS を $0\sim 5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ の範囲で 48 h 作用させた条件において疾患モデルを作製し、透過性試験を行うことでモデルの評価を試みた。その結果、正常モデルと比較して、両因子とも作用濃度の上昇により、カルセインおよびアルブミンの透過率が上昇した。さらに高濃度で因子を作用させた細胞では細胞間に多数の間隙が確認され、このことから低分子および高分子化合物の透過率の上昇は各糸球体細胞の剥離および損傷が原因であると判断した。各疾患モデルにおいて、タンパク質の有意な透過が確認されたため、糸球体疾患の症状を模倣した疾患モデルの構築が実現できたと結論した。一方、VEGF を添加した系では、今回実験した条件では明瞭な効果は得られなかった。

本研究では疾患モデルの構築に PAN および LPS といった因子を用いたが、将来的には糸球体疾患の患者血清を用いた疾患モデルの構築や治療薬候補物質の添加による疾患治癒モデルの開発等を行うことで、糸球体ろ過および疾患におけるその破綻のメカニズムの解明や腎疾患の診断や治療薬の探索、スクリーニングへの応用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 SAKUTA Yu, TAKEHARA Issey, TSUNODA Kin-ichi, SATO Kiichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of a Microfluidic System Comprising Dialysis and Secretion Components for a Bioassay of Renal Clearance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1073 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.18P141	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 SATO Kae, SATO Kiichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Recent Progress in the Development of Microfluidic Vascular Models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 755 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.17R006	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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takumi Takahashi, Seiya Kawaguchi, Yasuko Kobayashi, Kiichi Sato
2. 発表標題 Co-culture of glomerular endothelial cells and podocytes for development of micro glomerular model
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shotaro Genda, Yasuko Kobayashi, Kiichi Sato
2. 発表標題 Construction of a three-dimensional glomerular micromodel using hydrogel
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayuko Izumi, Kiichi Sato
2. 発表標題 Development of a three-dimensional renal tubule micromodel using hydrogel
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 源田尚太郎・佐藤記一・小林靖子
2. 発表標題 ハイドロゲルを用いた3次元マイクロ系球体モデルの構築
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋拓巳・川口聖矢・小林靖子・佐藤記一
2. 発表標題 系球体内皮細胞株と系球体上皮細胞株を用いたマイクロ系球体モデルの開発とその評価
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉万祐子・佐藤記一
2. 発表標題 ハイドロゲルを用いた3次元マイクロ尿管モデルの開発
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 万祐子、佐藤 記一
2. 発表標題 ハイドロゲルを用いた3次元マイクロ尿管モデル開発のための共培養法の検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 聖矢・小林 靖子・角田 欣一・佐藤 記一
2. 発表標題 マイクロ糸球体モデルの開発とバイオアッセイへの応用
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seiya Kawaguchi, Yasuko Kobayashi, Kiichi Sato
2. 発表標題 Coculture of Endothelial Cells and Podocytes in a Microfluidic Device for Development of a Microfluidic Glomerulus Model
3. 学会等名 5th International Symposium of Gunma University Medical Innovation (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 万祐子・佐藤 記一
2. 発表標題 マイクロ尿管モデルの開発に向けたハイドロゲル中での三次元組織の構築
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 拓巳・小林 靖子・佐藤 記一
2. 発表標題 ヒト系球体内皮細胞株およびヒト蛸足細胞株を用いたマイクロ系球体モデルの開発と系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

1. 発表者名 源田 尚太郎・小林 靖子・佐藤 記一
2. 発表標題 3次元マイクロ系球体モデルの開発とその評価
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 酒井康行ら	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 293
3. 書名 臓器チップの技術と開発動向	

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