

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12763

研究課題名(和文)腎オルガノイドにおける自己血管化必要因子の探索・解明

研究課題名(英文)Elucidation factors of self-vascularization in human renal organoid

研究代表者

関谷 佐智子 (Sekiya, Sachiko)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00398801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から誘導する腎オルガノイドは内部に血管様構造を有するものの、糸球体・傍尿細管血管への発達は乏しい。そこで、本研究課題は、腎オルガノイドでの自己血管化要因の探索を目的とし、オルガノイド内血管内皮細胞に対するオルガノイド内の共存細胞が与える影響およびメカニカルストレスに着目して検討した。その結果、腎オルガノイド内には腎特異的血管内皮細胞が発生し、その増殖・維持がオルガノイド内の間葉系細胞分泌因子で促進され、かん流刺激付与が構造発達と外部血管内皮細胞との連結を促進した。したがって、自己血管化因子として、共培養する細胞側要因およびメカニカルストレス双方が重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は腎オルガノイド内部に誘導される血管ソースの重要性とその活用のためのメカニカルストレスの必要性を示唆した。PericyteはPDGF-PDGFRを介して血管内皮細胞に作用し、維持に必須であり、さらには血管内皮細胞もしくはpericyteへのかん流刺激に反応するPEZOやplexin等の因子がこれらの発達に不可欠であることが推測され、今後の生体内外での腎オルガノイドの成熟化に必要な知見が得られた。また、これらは生体外での腎血管に対する薬剤試験モデルの開発や、腎血管に関わる病態解明・治療開発研究への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The self-vascularization of renal organoid-derived human iPS cells was few that contributed to a glomerular vasculature in vivo after transplantation. Therefore, this study aims to elucidate factors of self-vascularization in human renal organoids by focusing on pericytes derived from organoids and mechanical stress. The result indicated endothelial cells derived from renal organoid expressed genes which specific renal vasculature. Moreover, these endothelial cells maintained their proliferation by the secretion factor from mesenchymal cells in renal organoids. Furthermore, culture medium perfusion also stimulates pre-vasculature structure in renal organoids. Thus, the self-vascularization factor of renal organoids was both the co-cultured cells and mechanical stress in culture conditions.

研究分野：再生医工学

キーワード：腎オルガノイド 血管化 メカニカルストレス pericyte

1. 研究開始当初の背景

再生医療において、組織工学的に構築した組織を移植・機能的発現させるために速やかに血管化する手法として pre-vasculature structure を形成させ、移植することが検討され、移植組織由来の血管が構築されることが報告されている。一方で、数多く報告されている各種ヒト ES/iPS 細胞からのオルガノイド誘導研究の中、腎オルガノイドは中間中胚葉を誘導することで形成され、オルガノイド内部には血管内皮細胞のネットワーク構造が含まれる。しかしながら、移植後にオルガノイド内部に誘導されるのは宿主由来の血管であり、オルガノイド内に誘導される血管内皮細胞のネットワーク構造の組織・臓器特異的血管として発達の頻度が低い。ヒト腎オルガノイドは遺伝的疾患や線維化のモデルとして応用が期待されているが、腎血管は腎機能に直結する構造であり、機能的構造がヒト細胞により得られることは医薬品の有効性・毒性試験に大きな貢献が期待される。他臓器オルガノイドにおいても同様に、組織特異的な血管構築の要因を明らかにし、効率的誘導を可能にすることはオルガノイド応用においても肝要と考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究において、pre-vasculature structure には血管内皮細胞のみならず、共存する周皮細胞 (Pericyte) が血管連結と血管機能化に必要であり、宿主血管からの血流付与が重要であることが明らかになっている。そこで、本研究課題は、ヒト iPS 細胞から誘導する腎オルガノイドでの自己血管化のための因子として、オルガノイド内における pericyte 等の細胞の種類・量の影響、もしくは適切なメカノストレスが重要なのかを検討し、自己血管化因子を明確化することを目的としている。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞より Takasato ら報告 (2015 Nature) を参考に、腎オルガノイドを分化誘導する。得られる腎オルガノイド内に誘導される CD34/CD31 陽性細胞 (血管内皮細胞)、および PDGFR 陽性 (間葉系細胞) を採取し、単培養や共培養によって生じる増殖能や形態変化の解析およびマイクロアレイ解析による CD34/CD31 陽性細胞 (血管内皮細胞) と血管内皮細胞株の遺伝子発現の違いについて解析を行った。また、生体外かん流培養装置を用い、腎オルガノイドと pre-vasculature structure を有する細胞シートとの共培養をかん流培養にて行い、血管構造の変化と血管連結について免疫抗体染色にて解析を行った。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞を用いて腎オルガノイドを Air liquid interphase 培養にて行った。腎オルガノイドは Air liquid interphase 培養開始 9 日後から腎臓特異的な管状の構造が位相差像、組織学的解析によって確認され、Nephrin 遺伝子発現が観察される (Sekiya 2019 BMC Bioengineering)。一方で、CD34/CD31 陽性細胞は Air liquid interphase 培養開始 5 日目前後に最も増加するが、その後は徐々に減衰することが観察された。そこで CD34/CD31 陽性細胞の増殖に関係する培養法を検討するために CD34 Magnetic beads を用いて腎オルガノイド誘導中に誘導される CD34 陽性細胞を回収、単培養を試みた。培養基材のラミニンやフィブロネクチン等細胞外マトリックスによるコーティングや培養液、および酸素濃度の調整を行なった。しかしながら増殖能が乏しく、1~2回の分裂にて増殖停止が生じた。

一方で腎オルガノイドから得られる PDGFR 陽性細胞によるコンディショナル培養液による培養が維持・増殖に効果的であることが示唆された。

得られた CD34 陽性細胞が腎臓特異的な血管のソースであるのかを確認するために汎用されている血管内皮細胞株 HUVEC との遺伝子発現の相違をマイクロアレイ解析にて行った。その結果、CAV1, ANGPT2, SOX17 など血管内皮細胞特有の遺伝子発現は示すものの、Angiogenesis 関与する PECAM1, TIE1, DLL4 の発現は HUVEC と比較して低い、糸球体血管の発生に関わる SEMA3C および、腎発生にも関わる GREM1 発現が高いことが確認され、HUVEC とは異なり、腎臓に特異的な血管内皮細胞のソースである可能性が示唆された。

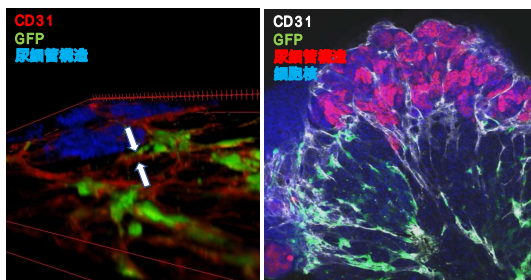


Figure 1: renal organoid coculture with pre-vasculature cell sheet

次に腎オルガノイドへのメカニカルストレス付与を行う目的で腎オルガノイド内の CD34 陽性の血管内皮細胞構造の他の血管構造である ex vivo の CAM(Chick Chorioallantoic Membrane) の血流または in vitro の HUVEC を用いた血管網細胞シートとのかん流共培養にて確認した。

CAM 血管との共培養においては腎オルガノイド内への CAM 血管浸潤が確認されたものの、腎オルガノイド内の血管構造との連結は確認されず、腎オルガノイド内の血管構造の衰退が確認された。このような腎オルガノイドを HUVEC を含む血管網細胞シートとの静置共培養を行ったところ、CAM 血管移植時とは異なり、細胞シート内の HUVEC が共培養により衰退した。一方でかん流刺激を負荷することで腎オルガノイド内血管の発達とおよび HUVEC による血管様構造維持が確認され、オルガノイド内血管と HUVEC 構造との一部連結が確認された(図1)。

したがって、腎オルガノイド内の CD34 陽性血管内皮細胞は腎臓に特異的な腎臓内部を由来とする血管ソースであること、その増殖・維持に PDGFR 陽性の間葉系細胞が関与することが明らかになった。さらに、かん流刺激によって、発達と外部血管との連結促進が可能になることが示唆され、自己血管化因子としては、腎オルガノイド内の血管内皮細胞ソースの維持と増殖が重要であり、腎オルガノイドに含有される間葉系細胞の分泌因子および外部から付与されるメカニカルストレスが重要であることが明らかになった。

腎オルガノイドはかん流培養することによって尿細管構造の増加が確認されている (Sekiya 2019 BMC Bioengineering)。尿細管上皮細胞と血管内皮細胞の共培養は尿細管上皮細胞の増殖やトランスポーター発現を向上させることが報告 (Tasnim 2012 AJP) されていることから、本研究結果の血管内皮細胞のオルガノイド内血管構造の維持・促進には内部の尿細管構造との関連も示唆された。

胎児腎では、外部血管構造との連結が生じることが知られており、マウス胎児を用いた検討により、腎発生初期(E12.5)は胎児腎に対して血流が総腸骨動脈(common iliac artery)から付与されるがその後大動脈にも連結され(E13.5)血流が動脈から供給されることが報告されている。本研究解析成果の自己血管化因子である、細胞成分とメカニカルストレス因子が、動脈血管の性質(細胞種や流量)を再現することで、自己血管化をより促進する可能性が示唆された。

本研究結果は腎オルガノイド内部に誘導される血管ソースの重要性と維持発達に際するメカニカルストレスの重要性を示唆した。Pericyte は PDGF-PDGFR を介して血管内皮細胞に作用し、維持に必須であり、さらには血管内皮細胞もしくは pericyte へのかん流刺激に応答する PEZO や

plexin 等の因子がこれらの発達に不可欠であることが推測され、今後の生体内外での腎オルガノイドの成熟化に必要な知見が得られた。また、生体外での腎血管に対する薬剤試験モデルの開発や腎血管に関する病態解明と治療法開発にも重要な情報と考えられる。しかしながら、連結・血管化後に腎臓特異的な糸球体血管構造の成熟が可能であるかは未だ明らかではない。糸球体血管の構築は未だ不明なことが多く、今後の構築メカニズムを解明することにより糸球体血管への毒性や有効性の試験を可能なモデル構築が期待され、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関谷佐智子、Irina Raykhel, 清水達也
2. 発表標題 生体外腎オルガノイド血管機能化のための血管内かん流培養の検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sekiya Sachiko
2. 発表標題 Fabrication of functional vasculature in human renal organoid in vitro
3. 学会等名 ISSCR/JSRM
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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