

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12774

研究課題名（和文）マイクロ系球体モデルによるタンパク透過性亢進の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of protein permeability in glomerulus utilizing microfluidics model

研究代表者

池内 由果（Ikeuchi, Yuka）

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70420114

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）：腎臓の糸球体血管壁は上皮細胞と内皮細胞、その間にある基底膜の3層で構成され、尿を血液から濾し出す濾過障壁として働いています。本研究では株化ヒト糸球体上皮細胞や糸球体内皮細胞をマイクロ流体デバイス内に培養して濾過障壁モデルを作成し、静水圧だけでなく、血流を模した剪断応力を加えて、濾過障壁として重要なポドサイトの脱落を認めず、正常糸球体濾過障壁の再現や、有意な高分子蛋白の透過性亢進を認める濾過障壁破綻モデルの作成を達成しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種糸球体腎炎で見られる濾過障壁の破綻の原因や治療法を探索するためには糸球体血管係蹄壁構造を形成したモデルの構築が必須です。これまで株化糸球体上皮細胞や内皮細胞、実験腎炎動物モデルを利用した研究がなされてきましたが、in vitroでの糸球体血管係蹄壁モデルは樹立されていませんでした。本研究成果は糸球体係蹄壁のモデルをin vitroに確立し、正常または疾患における糸球体濾過及びその破綻のメカニズムの解明と新規治療法の開発に貢献します。

研究成果の概要（英文）：The wall of the glomerular loop in kidney plays a crucial role as a filtration barrier that filters out urine from the blood, and is composed of three layers: epithelial cells, endothelial cells, and the basement membrane between them. In this study, we created a filtration barrier model by culturing both of human glomerular epithelial (podocyte) cell line and glomerular endothelial cell line on each surface of the septal wall in a microfluidic device, and applied not only hydrostatic pressure but also shear stress that is mimicking blood and urine flow to the filtration barrier. We have achieved the reproduction of the normal glomerular filtration barrier model and the creation of a filtration barrier failure model that shows a significant increase in permeability of high molecular weight proteins without losing podocyte on the septal surface under the shear stress.

研究分野：小児腎疾患

キーワード：マイクロ系球体モデル タンパク透過性 ネフローゼ症候群 糸球体上皮細胞 糸球体血管内皮細胞
蛋白尿 濾過障壁

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎臓系球体の血管係蹄壁は血液から原尿の濾過において重要な役割を担っている。この高度に分化した濾過障壁は系球体上皮細胞(ポドサイト)、基底膜、系球体内皮細胞の3層で構成されており、上皮細胞と内皮細胞の連携は正常な濾過機能の維持に重要である。各種の系球体腎炎で見られる濾過障壁の破綻の原因や治療法を探索するためには系球体血管係蹄壁構造を形成したモデルの構築が必須である。これまでポドサイトや系球体内皮細胞の細胞株、実験腎炎動物モデルを利用した研究がなされてきたが、*in vitro*での系球体血管係蹄壁モデルは樹立されていない。3層構造としての実験は実験動物の腎臓から系球体を単離して行うよりなく、かつ単離した直径100~200 μm 程度の系球体の輸入及び輸出細動脈に再還流する技術はないため、リアルタイムに系球体濾過障壁の濾過能ないしは透過性を*in vitro*に計測することは不可能であった。近年、末期腎不全を来す慢性腎疾患(CKD)罹患率の増加は医療費の抑制のためにも世界的な懸念になっている。進行性のCKDを濾過障壁の破綻に始まる系球体硬化化によって末期腎不全に至らしめないためには、早期発見や病因の究明、効果的な治療法の開発が今後も必要である。血液ろ過装置である系球体における各種の系球体腎炎で見られる濾過障壁の破綻の原因や治療法を探索するためには系球体血管係蹄壁構造を形成した*in vitro*モデルの構築が必須であった。

2. 研究の目的

本研究課題ではヒトポドサイト細胞株及びヒト系球体内皮細胞株をマイクロ流体デバイス内に培養して系球体係蹄壁のモデルを*in vitro*に確立し、正常または疾患における系球体濾過及びその破綻のメカニズムの解明と新規治療法の開発への礎とすることを目的とした。

3. 研究の方法

1)系球体を模したマイクロ流体デバイスの作成:マイクロチップはスライドガラス大のデバイスで、内部に並行する2本の内径数百 μm 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有する。本研究では、メンブレンフィルターとなる多孔質膜をコラーゲンコーティングし、表裏に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を培養し、この細胞隔壁を介して平行な2本の流路をそれぞれ血管腔およびボウマン(原尿)腔とするマイクロデバイスを作成した。

2)透過性試験:正常系球体では35,000ダルトン(D)以下の分子は濾過されるため、この分子サイズを基準に、低分子物質として分子量622Dのカルセインを、高分子物質として66,000Dのテトラメチルローダミン-アルブミンを血流路に負荷し透過性試験を行った。生体に近い濾過障壁モデルとするために血管側流路を循環型にし、血管側流路を静水圧もしくは定圧ポンプによって加圧することにより細胞層を通り抜ける方向に剪断応力を印加した。透過係数 Pe は P ($10^3\text{cm}/\text{分}$) = 下流路の体積 \times 単位時間あたりの下流路の濃度上昇とし、 $1/Pe = 1/P_{total} - 1/P_{mem}$ (P_{total} :全体の透過係数(実験値)、 P_{mem} :メンブレンフィルターのための透過係数、 Pe :細胞層の透過係数)で求めた。

3)系球体腎炎モデルの作成:系球体腎炎モデルとして、ポドサイト障害により蛋白尿を誘発する物質である puromycin aminonucleoside(PAN)と Toll 様受容体4を介した生理作用を有するエンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS)を血管流路に負荷して、タンパク透過性試験を行った。

4. 研究成果

1) 糸球体を模したマイクロ流体デバイスの作成：メンブレンフィルターのコーティングを工夫し、メンブレンフィルターの表裏にそれぞれ内皮細胞単独培養、ポドサイト単独培養、2種細胞の共培養に成功した。

2) 透過性試験：内皮細胞単独培養、ポドサイト単独培養、2種細胞の共培養の系でそれぞれ透過性試験を行い、いずれも低分子物質は透過し、高分子物質は透過が抑制されたが、共培養で高分子透過性はより抑制された。剪断応力を印加した系では、内皮細胞は0.75dyne/cm以上で、ポドサイトは0.097dyne/cm以上で細胞の剥離を認めた。静水圧から細胞剥離を認めない範囲の剪断応力を加えても低分子物質は透過し、高分子物質は透過が抑制された状態を維持した。細胞剥離が認められた剪断応力を印加した系では、低分子物質の透過係数の上昇を認め、剪断応力の上昇に伴って高分子物質の透過係数も上昇する傾向を認めた。巣状糸球体硬化症は、過濾過をはじめとした様々な要因でポドサイト脱落が起こることが病因と考えられているが、剪断応力の上昇はこのモデルとなりうる。

3) 糸球体腎炎モデルの作成：PAN, LPS それぞれ0µg/mL, 0.05µg/mL, 0.5µg/mL, 5µg/mLを負荷し、いずれの刺激でも0.5µg/mL, 5µg/mL濃度で有意に高分子物質の透過性亢進を認めた。一方で、いずれの刺激物質の濃度負荷でも糸球体濾過障壁として重要な働きを担うポドサイトの著明な脱落を認めなかった。

以上より、ヒトポドサイト細胞株及びヒト糸球体内皮細胞株をマイクロ流体デバイス内に培養して糸球体糸球体壁のモデルを *in vitro* に確立し、正常または疾患モデルの作成を達成した。

今後の課題は、より生体に近い濃度のアルブミン負荷で、ポドサイトスリット膜関連蛋白のノックダウン、ノックアウト細胞や変異株を使用した透過性実験への応用や、透過性因子による蛋白透過性亢進が示唆されてきた特発性ネフローゼ症候群患者発症時の血清負荷による透過性実験を試みることである。また、根本的課題として平面培養におけるポドサイト細胞株では、生体の糸球体で認められるスリット膜形成がないことであるが、今後、平面培養においてスリット膜形成が可能な細胞株が樹立された際には、直ちに応用できる準備状況を維持することは重要である。

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 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蝸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 日本分析科学会 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次元マイクロ糸球体モデルの開発とその評価
3. 学会等名 日本分析科学会 第69年会
4. 発表年 2020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	小林 靖子 (Kobayashi Yasuko) (60451720)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	

	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
連携研究者	佐藤 記一 (Sato Kiichi) (50321906)	群馬大学・大学院理工学府・教授 (12301)	

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