

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12602

研究課題名（和文）血管化腎臓オルガノイドのex vivo再構成と灌流による機能の再現

研究課題名（英文）Ex vivo functional of vascularized kidney by biomimetic perfusion

研究代表者

花田 三四郎（Hanada, Sanshiro）

群馬パース大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：40516811

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）：生体外で構築した腎組織の機能的な血管化と血流導入可能な腎組織デバイスの構築を試みた。本研究では、長期灌流可能な培養システムを新規に構築し、血流や間質流といった生体における流れの寄与に注目して腎組織の成熟化を試みたところ、間質を模したデバイスに導入した腎オルガノイドの血管化において流れが一定の寄与を示した。また、腎組織の形態形成には間質や細胞外マトリクスの関与が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的腎組織の構築において、流れが一定の寄与をすることが明らかとなった。また、組織形成には細胞外基質の重要性が明らかとなった。一方で、血管網と腎組織の共存によって、血流の付与を可能にするためには、いまだに技術的ブレークスルーが必要であることが明らかとなった。腎組織を構成する複数種の細胞の協調的な仕組みの理解により、今後オンチップ腎臓の開発などにつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aim to reconstruct a functional vascularized kidney chip capable of blood circulation ex vivo. In the present study, we focused on the contribution of biomimetic flow such as blood flow or interstitial flow in the vascularization and maturation of kidney organoid/spheroid using our newly established prolonged perfusion culture system. Flow introduced into the artificial interstitium showed a certain contribution in the vascularization of kidney organoids. In addition, stroma or extracellular matrix might be involved in renal morphogenesis.

研究分野：生体組織工学

キーワード：腎オルガノイド 血管化 灌流システム

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。

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト iPS 由来腎オルガノイド培養の発展により、腎ネフロン *ex vivo* 再構築の方法論が確立しつつあるが、糸球体の成熟化と機能的血管化の再現は未だ課題である。近年、間質流を模した流れをオルガノイドに付与すると内因性の血管新生を誘導するという報告があり、また、同オルガノイドを免疫不全マウスの腎皮膜下に移植すると宿主由来の血管により糸球体が血管化されることから、生体の流れとくに血流の意義が関心となっている。

(2) 腎機能を生体外で再現するために、糸球体が機能的に血管化された腎組織を外部血管と連結し灌流を実現する必要がある。その点において、申請者らのグループは三次元血管を再構築した微小流体デバイスに生体組織に見立てた細胞スフェアを導入し血管新生を促すことで血管化組織を灌流する技術を、世界に先駆けて確立している。

(3) 糸球体成熟化における流れの意義の理解し、腎機能の再現するためには、腎オルガノイドの発生を誘導する培養系、灌流システムを用いて付与した生体流れによる血管形成、外部血管との連結と血流の付与、という課題を同時に克服する方法論的なブレークスルーが必須である。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の項目を段階的にクリアすることで、微小流体デバイス上で血管灌流可能な成熟した糸球体構造への誘導と、そこへの灌流を通して血液から尿成分が濾過される腎糸球体の高次機能を *ex vivo* で再現し、それを通じて、糸球体成熟化における流れの必要性を問うことを目標とした。

(1) 申請者が開発した、生理的な間質流や血流の付与が可能な送液システムを用い、腎オルガノイドを微小流体デバイス上で成熟化し、血管形成を誘導する。

(2) 微小流体デバイス上に再構成された自己組織化血管網と腎オルガノイド血管を連結させ、血管内を灌流することで腎糸球体の成熟化を誘導する。

さらに、本評価系プラットフォームを、血流による糸球体成熟化メカニズム解明や薬剤の安全性評価などの医療応用へと発展させていくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト腎スフェロイド/オルガノイドを形成し、成熟化させる。微小流体デバイス内に形成したフィブリン・コラーゲンハイドロゲル中に腎スフェアを導入し、静水圧差を利用した新規灌流システム(図1)を用いて、間質流を模した流れを付与する。7 - 10日間の長期培養を実施し、流れ、培地組成、細胞外基質や間質細胞などのオルガノイド外環境を制御することで、腎オルガノイド成熟化と血管化の最適条件を検討する。糸球体のスリット膜を形成する足細胞と血管内皮細胞の蛍光免疫染色を実施し、共焦点レーザー顕微鏡による観察により、糸球体の成熟度と血管化を組織学的に評価した。

#### 開放系灌流システム

Micro-syringe pump  
0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Gap of hydrostatic pressure (5mm)

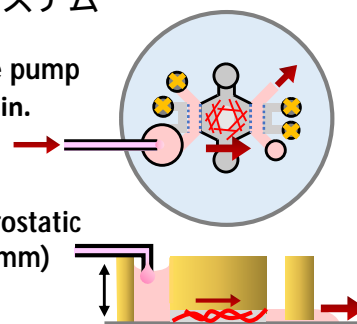


図1 新規長期灌流システム

(2) 微小流体デバイス上に、血管内皮細胞と線維芽細胞をハイドロゲル内で共存培養することで再構成した三次元血管網に腎オルガノイドを導入し、腎成熟化を誘導しながら血流を模した流れを付与する。

血管内皮細胞のソースとして、ヒト臍帯静脈内皮細胞およびヒト臍帯動脈内皮細胞、マウス血管内皮細胞などを用いること、また、(1)で最適化した条件をベースに、腎オルガノイドの血管化と外部血管網への連結を達成する最適条件を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管灌流システムの開発と血管内送液の実現

オンチップデバイス上に HUVEC を用いた三次元血管網を作製し、申請者が新規に開発した静水圧差を利用した血管灌流システムを用いて、7 日間の血管灌流の実現に成功した。7 日間の灌流により、灌流なしと比較してコラーゲン、ラミニン、パールカンなどの基底膜成分が有意に発達し、血管形態の安定化が確認された。蛍光デキストラン等を用いた流れの解析(図2)では、速い血管内の流れ(血流)と間質を模したフィブリンハイドロゲルを流れる遅い間質流が再現されることを確認した。また、デバイス中心部に組織を導入する無血管領域を作成し、実際にがん細胞によるモデル組織を導入し、灌流の実現に成功した。

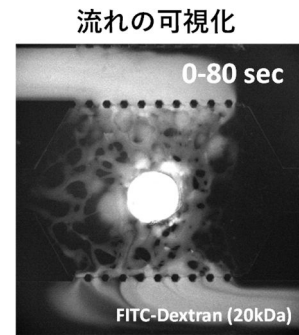


図2 生体流の模擬

##### (2) ヒト iPS 細胞由来腎オルガノイドによる間質流の付与と糸球体血管化に関する検討

ネフロン前駆細胞により誘導された腎オルガノイドを、間質を模したハイドロゲルとともに微小流体デバイスに導入し、(1)の新規灌流システムを用いてオルガノイドに流れを付与した。

流れの付与により、分岐状の三次元血管が微小流体デバイスのハイドロゲル層に増殖し、血管網が形成された。また、流れによりオルガノイドの細胞生存状態が良好となることが確認された。オルガノイドの糸球体構造をホールマウント蛍光染色により丹念に観察したところ、部分的にはあるが、血管マーカー(レクチン)陽性細胞が糸球体内部で確認され、糸球体外の間質へと連結していた。流れのない条件では、腎ネフロンの組織形成が低下していた。

以前より実施していた、気液界面培養系では、培養液の組成などの条件検討により、オルガノイド内に旺盛な血管マーカー陽性細胞を観察することはできたが、糸球体内の血管形成は見られず、血管内皮細胞はむしろオルガノイドから離れていく傾向が見られた。一方で、流れがある条件下では、オルガノイド内に血管細胞が保持される糸球体近傍に局在する傾向があったことから、流れによる血管誘導因子の亢進や低下、オルガノイド内に血管を保持する間質の周囲環境の寄与などが考えられる。以上については今後メカニズムの特定が必要である。

##### (5) ヒト初代細胞を用いた腎スフェア形成と灌流の効果の検討

当初の計画を変更し、複数種の商用初代ヒト腎細胞を用いて、三次元腎スフェアを作製する、新たな腎組織モデルの構築を試みた。糸球体上皮細胞、近位尿細管細胞、血管内皮細胞などを加えて、メチルセルロースを用いた高粘性培地を用いた三次元スフェア形成法を採用し、腎スフェアを形成した。単に複数種の細胞が共存したスフェアでは血管内皮細胞の三次元形成が実現せず、血管化された腎組織形成は実現しなかった。一方で、細胞外基質を充填した三次元形成において、腎スフェアは、細胞外基質の再構成にとともに部分的に近位尿細管や血管内皮細胞の管腔構造などの形態形成が確認され、細胞外基質の重要性が示唆された(図3)。

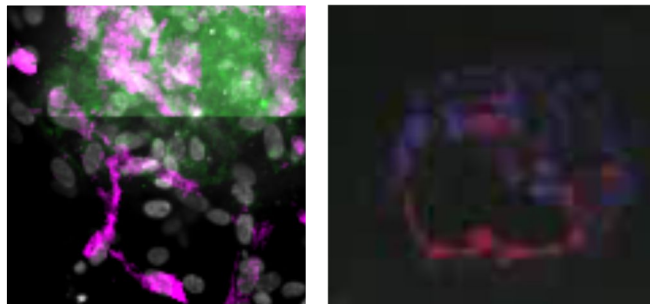


図3 血管形成と管腔形成

##### (4) 三次元再構成血管への腎オルガノイドの導入と血管化の検討

外部血管と血管化オルガノイドの連結と灌流を目指し、HUVEC を用いて再構成した三次元血管を微小流体デバイス内に作成し、あらかじめ作成しおいたデバイス内の無血管領域にオルガノイドを導入した。結果、外部血管域には間質細胞が旺盛に増殖していくが、腎オルガノイドの発生はむしろ低下した。血流を模した流れの付与によっても、腎成熟化には至らなかった。血管を斥ける要因の可能性を考え、動・静脈の特異性、マウス血管内皮細胞について検討したが、同様に糸球体の成熟化と血管化には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩田拓輝
2. 発表標題 生体外での腎組織への血管新生
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 諸角光祐
2. 発表標題 近位尿管上皮細胞 (RPTEC) スフェロイドの作製
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会シンポジウム2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花田三四郎
2. 発表標題 スフェロイドを基盤とした高機能組織モデルの構築
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
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
---------	---------