

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19487

研究課題名（和文）血管化灌流によるヒト腎系球体構造・機能の生体外再現と応用

研究課題名（英文）Reproduction of kidney glomerulus structure and function using human iPS cells-derived organoid and vascular chip

研究代表者

西山 功一（Koichi, Nishiyama）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：80398221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微小流体デバイス上での組織灌流の再現、回転浮遊培養、そしてオルガノイド形成の3つの技術を統合し、ヒトiPS細胞由来腎オルガノイドを血管化・灌流し、糸球体高次構造と機能を生体外で再現する方法の開発を試みた。オルガノイドへの血管化・灌流、回転培養いずれにおいても、糸球体内への血管侵入は誘導できたものの、糸球体構造および糸球体血管の十分な成熟化には至らなかった。更なる技術革新が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管化・灌流や回転培養という新しい方法論は、オルガノイド糸球体内の血管侵入という、腎系球体・糸球体血管網の成熟化誘導ために重要な最初のステップの達成に有用であることを示した。更なる技術革新の足がかりとなる基盤データを提供している点において、学術的および社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a method which enables to reproduce the higher order structure and function of kidney glomerulus ex vivo by using an integrated techniques that include microfluidic device, rotating culture and organoid creation. Both vascularized organoid with perfusion and rotating culture induced vascular invasion into the glomerulus structure of iPS cell derived kidney organoid at some extent, however it was not sufficient to induce mature glomerulus structure and vasculature. These suggest that additional technical development to reproduce kidney glomerulus structure and function.

研究分野：血管生物医学

キーワード：オルガノイド 腎系球体 血管灌流 微小流体デバイス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病 (CKD) は、様々な疾患死亡のリスク因子であり、また重症化例は最終的に腎代替療法が必要となるなど、国民の生命と健康そして我が国の医療経済にとって克服すべき重大な課題である。そのためには、CKD 病態をよく理解しその解決に挑む研究が望まれる。

(2) CKD 本態の大半は糸球体濾過機能の破綻に起因する、濾過機能発現には、糸球体ポドサイト構成されるスリット膜の成熟化と維持が必須であり、メサンギウム細胞や血管内皮細胞との相互作用、さらに血流が重要であることが示唆されるが、そのしくみは十分理解されていなかった。一方、近年のオルガノイド技術は、ヒトの体内で生じる複雑な生命現象を理解する有用なツールとして期待される。しかし、血管循環が欠如しているなどの理由から、糸球体濾過といった器官レベルでの機能を体外で再現できるまでに至っていなかった。

2. 研究の目的

(1) 申請者らが開発した微小流体デバイス上で 3 次元血管網を自己組織化的に誘導し、組織灌流を生体外で再現する技術、および最近開発を進めている回転浮遊培養を、オルガノイド技術と統合することで、ヒト iPS 細胞由来腎臓オルガノイドを血管化・灌流し、糸球体高次構造と機能を生体外で再現する方法を開発することを目的とした。

(2) さらに、本システムにて、腎糸球体が成熟化し維持されるしくみを理解することを意図した。将来的には病態モデルの作出などを通して、CKD 病態の理解と画期的治療の開発に展開し、我が国の医療・再生医療の発展に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来腎臓前駆細胞のスフィアを形成後、CHIR 刺激により発生誘導し、2 日間気液界面培養を行った。その後、一定程度発生した腎臓オルガノイドを培地内に浮遊させ、3 日に 1 回ガス交換を行いながらエッペンチューブ内で回転培養した。気液界面培養期間を変えることで、腎糸球体血管化を最も効率よく誘導する移行タイミングを探索した。気液界面培養、回転浮遊培養とも、10% FCS DMEM 培地と EGM-2 培地を 1:1 で混ぜた培地を使用した。

(2) ヒト肺繊維芽細胞と隔離共培養をすることで、微小流体デバイス上のフィブリン-コラーゲン細胞外基質内に血管内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞; HUVECs) による 3 次元自己組織化血管網を誘導した (血管灌流チップ)。次に、自己組織化血管網外の細胞外基質内に、気液界面培養、そして、回転浮遊培養の併用により適度に血管化を進めたオルガノイドを移植後培養することで、チップ血管とオルガノイド内血管の連結を図った。また、培地の静水圧差により持続的に血管内灌流し糸球体成熟化を誘導した。

(3) オルガノイドの発生状態を良好に維持したままチップ血管を連結し灌流できると予想された、以下の条件を解析することで、糸球体成熟化のための最適条件を検討した。灌流の制御 (付与タイミング等) 血管および血管外環境因子の制御 (ペリサイト等との共培養) オルガノイド糸球体の血管化程度の制御 (回転培養期間) 培地内酸素分圧の制御。オルガノイド腎糸球体血管成熟化の評価として、血管配置、スリット膜構造をホールマウント免疫染色によって可視化後、共焦点レーザー顕微鏡を用いた 3 次元組織学的手法により評価した。

4. 研究成果

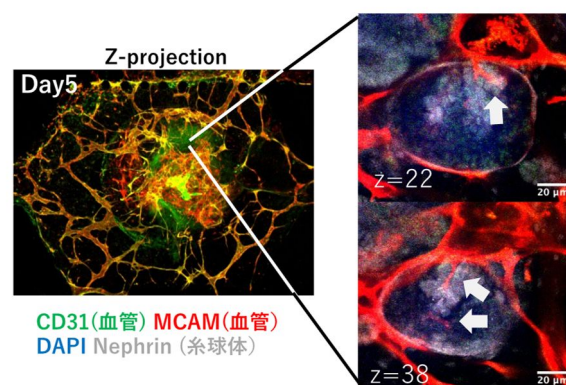
(1) CHIR 刺激により発生誘導し、2 日間気液界面培養を行ったヒト iPS 細胞由来腎臓前駆細胞スフィア (腎糸球体オルガノイド) を、その後、気液界面培養のみ 17 日間、気液界面培養 3 日間 回転浮遊培養 14 日間、気液界面培養 7 日間 回転浮遊培養 10 日間そして回転浮遊培養のみ 17 日間の 4 群で、最も糸球体内に血管が誘導される条件を比較検討した。その結果、7 日間の気液界面培養にて、ある程度オルガノイド内の血管網構築を進めた後に、回転浮遊培養に移行すると、上皮化した糸球体内に最も血管化が起こることがわかった。また、気液界面培養 7 日後に回転浮遊培養に移行し、その培養 3 日目に糸球体内に血管がすでに侵入していることがわかった。しかし、その後回転浮遊培養で 14 日間まで培養を継続しても、糸球体内血管の成熟化は進まず、むしろ糸球体構造が崩壊することがわかった。

(2) 発生誘導をかけたオルガノイドを気液界面培養ではなく、培地に沈めた状態で数日間培養すると、上皮化方向へ発生を進める細胞は発生を止め、むしろ細胞死に向かう。今回の結果から、培地に沈めておいても、回転させて培養することで、少なくとも上皮化した細胞の細胞死は抑制できることがわかった。さらに、同時に気液界面培養では全く起こらなかった糸球体への血管侵入が開始した。一般的に、ある特定の発生時期のマウス胎仔は、培地に

浸かった状態でも、ガス交換を行いながら回転培養することで、ある一定期間は発生を進めることができることが知られている。これまで、回転させることで気液界面付近の培地内酸素の速やかな拡散と気液界面の面積が広がることで、培地内の酸素分圧が上がるため、気液界面培養同等の効果が得られるからであると、その機序が解釈されていた。今回、加えて、回転浮遊培養を行うと気液界面培養では全く見られない糸球体内への血管侵入が開始した。このことは、培地の酸素化とともに、最近の報告が示唆するように(1)、回転させることによって生じる培地からオルガノイドへの力学的刺激が、なんらかの形で関与している可能性が考えられた。しかし、糸球体内への侵入が進み十分な血管の成熟化が起こらなかったことは、血管内への直接的な培地灌流など、さらなる力学刺激の必要性やその他の因子の必要性を示唆した。

(3) 7日間の気液界面培養にて腎糸球体オルガノイド内に上皮化による糸球体様構造と血管網形成を誘導した後に、血管灌流チップに腎糸球体オルガノイドを移植し、その後1日間もしくは3日間血管内灌流の有無下に培養し、血管灌流チップ内の血管網と腎糸球体オルガノイド内血管網との連結状態と腎糸球体オルガノイドの発生状態を検討した。結果、血管灌流がない状態において、血管の連結は若干進んでいたが、逆に糸球体構成細胞へ上皮化した細胞の細胞死により糸球体様構造の破壊が進んだ。この傾向は、オルガノイド移植後、1日あるいは3日後から血管内灌流を行なった場合とも、同等であった。血管灌流を行い、移植5日間もしくは7日間の培養後に、ホルマウント免疫染色により、糸球体構造とその血管化状態を解析した。5日間の灌流により血管が内部に侵入している糸球体様構造が散見された(図1)。しかし、成熟した糸球体血管網は形成されず、培養を7日間に伸ばしても変化なく、むしろ糸球体様構造を構成する上皮細胞の細胞死と糸球体様構造の崩壊が進む結果となった。

図1 血管灌流チップによる腎オルガノイド糸球体内の血管化



(4) 血管灌流チップを用いることで回転浮遊培養と同様に、オルガノイドの糸球体様構造の中に、血管の侵入が観察され、成熟した糸球体血管網には至らなかったものの、血管内培地灌流によりその血管化は進んだ。血管灌流チップの場合、チップ血管網とオルガノイド内血管網は一定期間の培養後に連結する。したがって、少なくとも血管内の灌流は実現しており、力学刺激を含めた直接の血管灌流の効果が見られていると考えられる。血管連結まで多少のタイムラグがあり、その間のオルガノイド細胞へのダメージが、血管成熟化に影響を与えていることが十分に考えられ、この点は今後の改善点と考えられた。

(5) 7日間の気液界面培養後に10日間の回転浮遊培養を行った腎糸球体オルガノイドを血管灌流チップに導入し、灌流下に同様に培養を最大約7日間行った。しかし、糸球体構造内に血管は侵入するものの、成熟した糸球体血管網は形成されなかった。この結果は、回転培養の時間を短縮(3日間)、延長(14日間)しても同様であった。したがって、他の付加的な必要培養条件を検討した。まず、ペリサイトを覆わせた血管網を誘導し血管内の灌流を試みたが、ペリサイト存在により血管網が狭小化し、十分な血管灌流を得る条件が見出せなかった。また、血管新生因子としてAngiopoietin-1(Comp-Ang1)やS1Pを培地に加えて、血管新生を刺激することを試みたが、糸球体内の血管侵入と成熟化には大きな影響を与えなかった。最後に、低酸素(5%)培養により、内因性の血管新生因子 VEGF の発現誘導により血管新生の促進を図ったが、糸球体内の血管侵入度と成熟化にはあまり変化を認めなかった。

(6) 今回、研究期間の関係上、血管灌流に最適化したペリサイトと血管内皮細胞による血管網の誘導ができるまでには至らなかった。しかしながら、最近の我々の血管研究からも、ペリサイトは、オルガノイド糸球体への血管化にとって必要な要素であることが考えられ、今後引き続き検討を加えていく予定である。また、移植したオルガノイドを、チップの血管網に連結し灌流できるまで、いかに発生誘導をかけたオルガノイドの状態を良いままで維持するかが一つの鍵と考えられる。気液界面培養と同様に、高い酸素化を維持するためのデバイス構造の改良やナノバルブなどにより灌流培地自体の酸素分圧を上げる工夫など、次の一手が必要であると思われる。

<参考文献>

Homan KA, Gupta N, Kroll KT, Kolesky DB, Skylar-Scott M, Miyoshi T, Mau D, Valerius

MT, Ferrante T, Bonventre JV, Lewis JA, Morizane R. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat Methods*. 2019 Mar;16(3):255-262. doi: 10.1038/s41592-019-0325-y. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30742039.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujimoto K, Erickson S, Nakayama M, Ihara H, Sugihara K, Nashimoto Y, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R.	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 Pericytes and shear stress each alter the shape of a self-assembled vascular network	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lab Chip	6. 最初と最後の頁 306-317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2lc00605g.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuge Shinya, Nishiyama Koichi, Arima Yuichiro, Hanada Yasuyuki, Oguri-Nakamura Eri, Hanada Sanshiro, Ishii Tomohiro, Wakayama Yuki, Hasegawa Urara, Tsujita Kazuya, Yokokawa Ryuji, Miura Takashi, Itoh Toshiki, Tsujita Kenichi, Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30197-8	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学医学部 機能制御学講座 血管動態生化学分野 ホームページ
<http://kumamoto-ircms-nishiyama.jp>

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
研究協力者	西中村 隆一 (Nishinakamura Ryuichi)		
研究協力者	田中 悦子 (Tanaka Etsuko)		
研究協力者	横川 隆司 (Yokokawa Ryuji)		
研究協力者	三浦 岳 (Miura Takashi)		

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