

86. ヒト腎糸球体ろ過機能の生体外再現と医療応用

西山 功一

宮崎大学 医学部 機能制御学講座 血管動態生化学

Key words : ヒト腎糸球体オルガノイド, ヒト iPS 細胞, マイクロ流路デバイス, 血管化, 灌流

緒言

慢性腎臓病 (CKD) は、心血管疾患など多くの疾患において死亡率を押し上げる重大なリスク因子である。我が国の CKD 患者は生活習慣病の増加や高齢化に伴い年々増加傾向にあり、国民の生命と健康にとって極めて重大な問題となっている。また、重症化した CKD は最終的に腎代替療法が必要となるが、その数は増え続け我が国の医療経済に多大な影響を与えており、CKD 病態の新たな理解に基づいた革新的な医療創生による早期解決が喫緊の課題である。重要な腎臓機能の一つは、糸球体で血液から原尿をろ過することであり、CKD 本態の大半はその破綻に起因する。糸球体のろ過機能発現には、糸球体上皮細胞 (ポドサイト) で構成されるスリット膜の成熟化が重要であり、メサンギウム細胞や血管内皮細胞との複雑な相互作用で形成される。さらにその成熟化と維持においては血流が重要であることが示唆されているが、そのメカニズムはよく分かっていない。

近年のオルガノイド技術は、ヒト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。腎臓においても、共同研究者である熊本大学発生医学研究所の西中村隆一博士らを始め [1] 様々な研究者により、オルガノイド形成手法が開発されてきた [2~4]。しかし、これらの方法で誘導された腎オルガノイドでは、ネフロン構成要素である尿細管構造に加えて、部分的な糸球体構造は形成されるものの、糸球体は血管化されず、スリット膜構造を持つ成熟した糸球体構造は誘導されていない。一方で、同オルガノイドを、免疫不全マウス腎皮膜化に移植すると、血管化・灌流され成熟化した糸球体が形成される [5]。この事実は、同オルガノイドは成熟した糸球体が形成されるポテンシャルを有しており、何らかの方法で血管化を誘導し灌流することで生体外においても糸球体成熟化が誘導でき、有用な解析ツールになることを示唆している。

最近、森實らは、オルガノイドを細胞外基質に固定し流れを付与すると、生体外においても糸球体内に一定程度血管を誘導できることを報告した [6]。我々も最近、腎オルガノイドの発生誘導後、培地内浮遊下に回転培養を行うことにより糸球体内の血管形成が惹起されうること示唆する予備的知見を得た。しかし、いずれの方法においてもオルガノイド内血管への十分な灌流は実現できておらず、糸球体構造の成熟化とろ過機能を再現できるに至っていない。一方、我々は、これまでの血管形成メカニズム解明に関する研究で得た知識と技術を生かして、共同研究者の京都大学工学部の横川隆司博士、九州大学医学部の三浦岳博士らと共に、微小流路デバイス上に組織を血管化・灌流し長期培養を行う技術を開発してきた [7~9]。その中で、今回提案する血管灌流チップのプロトタイプと静水圧差を利用した持続的血管灌流システムを構築した。したがって、本研究では、回転浮遊培養と血管灌流チップ技術をうまく組み合わせることで、腎オルガノイド糸球体の成熟化・維持とろ過機能を生体外で再現し、その血流依存的メカニズムを解明することを目的とした。その結果、回転浮遊培養と血管灌流チップのいずれの方法においても、気液界面培養にてある一定程度糸球体発生とオルガノイド内の血管網形成を進めた状態で、オルガノイドに培地による流れ負荷をかけると、糸球体内への血管の侵入が開始することがわかった。しかし、回転浮遊培養と血管灌流チップを組み合わせた方法でも、糸球体内血管が成熟化するところまでは実現することはできず、今後の課題として残った。

方法

1. 回転浮遊培養による腎糸球体血管化誘導法の開発

共同研究者の西中村隆一博士らから提供を受ける、神経管との共培養で発生誘導をかけたヒト iPS 由来腎臓前駆細胞スフィア（腎糸球体オルガノイド）を、培地内に浮遊させ、3日に一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。また、気液界面培養にて一定期間さらに発生を誘導した後に、回転浮遊培養を行い、最も腎糸球体血管化を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. 血管灌流チップの開発とそれを用いた腎糸球体オルガノイド血管化・灌流による成熟化誘導法の構築

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. オルガノイドへのチップ血管連結・灌流の最適条件の決定

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するため、これまでの検討から重要と予想される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。①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）②灌流の制御（付与タイミング等）③オルガノイド糸球体の血管化程度の制御（回転培養期間）④培地内酸素分圧の制御。

4. オルガノイド腎糸球体血管成熟化の評価

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。

結果および考察

1. 回転浮遊培養による腎糸球体血管化の誘導

神経管との共培養で約10日間発生誘導をかけたヒト 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、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（図1）。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。

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 [6]、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を示唆する。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する。

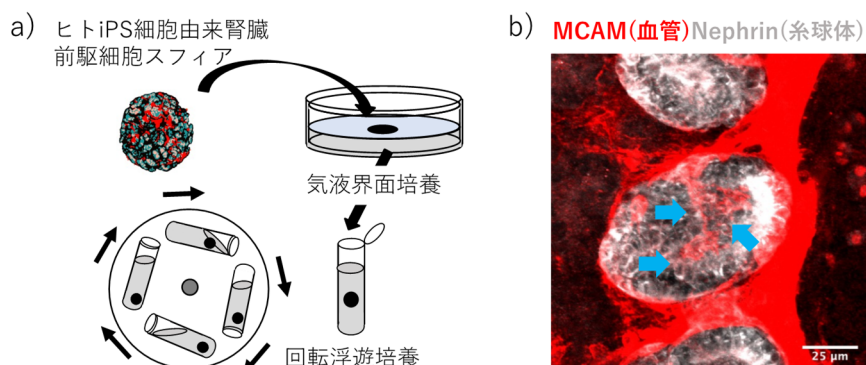


図 1. 回転浮遊培養による腎糸球体内血管化の誘導

- a) 培養法。ヒト iPS 細胞由来腎臓前駆細胞スフィアを発生誘導後、7 日間の気液界面培養で、さらに糸球体細胞への上皮化とスフィア内の血管化を誘導し、続いて回転浮遊培養を行なった。
- b) 回転浮遊培養 10 日後のホールマウント免疫染色を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した z-stack 画像。糸球体様構造 (Nephritin 陽性) の中に、血管 (MCAM) が侵入していた (青矢印)。スケールバー：25 μ m。

2. 血管灌流チップを用いた腎糸球体血管化の誘導

7 日間の気液界面培養にて、ヒト iPS 細胞由来腎臓前駆細胞スフィア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 (腎糸球体オルガノイド)、血管灌流チップに腎糸球体オルガノイドを移植、その後 3 日間血管内灌流の有無で培養し、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。血管灌流を行い、移植 5 日間の培養後に、ホー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結果、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 2)。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んだ。

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構造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。血管灌流チップを用いた場合、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言える。

3. 回転浮遊培養と血管灌流チップとの組み合わせ、および、他の培養最適条件の検討

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 日間行ったが、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。したがって、付加的な他の培養条件の必要性を探った。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はあまり変化がなかった。

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

らなかつたが、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ブル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。

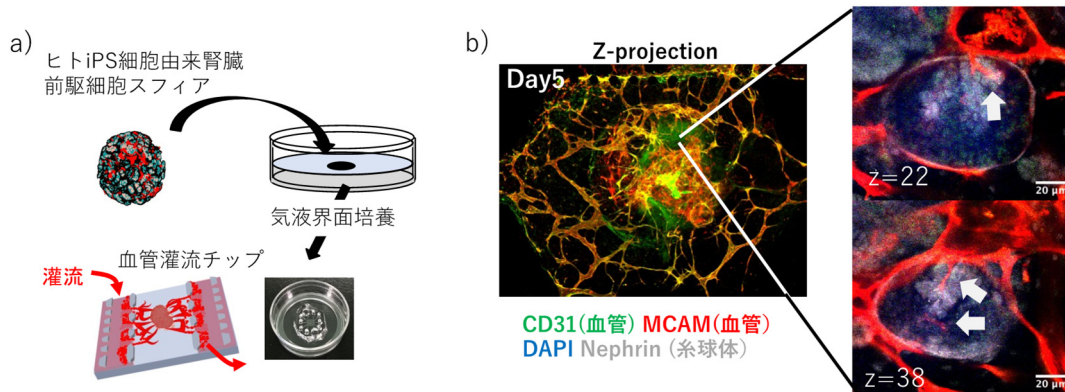


図 2. 血管灌流チップを用いた腎糸球体の血管化誘導

- 培養法。ヒトiPS細胞由来腎臓前駆細胞スフィアを発生誘導後、7日間の気液界面培養で、さらに糸球体細胞への上皮化とスフィア内の血管化を誘導し、続いて同スフィア（腎糸球体オルガノイド）を血管灌流チップに導入して血管内灌流下に培養した。
- 血管灌流チップ導入後培養 5 日後のホルマウント免疫染色像。共焦点レーザー顕微鏡で撮影したチップ内血管とそれに連結したオルガノイド内血管網（緑および赤）全体の stack 画像（左）。その中の、糸球体様構造を拡大した confocal 画像（z スライス 22 と 38）（右）。糸球体様構造（Nephrin 陽性）の中に、血管（MCAM、赤）が侵入していた（白矢印）。スケールバー：20 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学発生医学研究所器官構築部門腎臓発生分野の西中村隆一教授、京都大学大学院工学研究科ナノシステム創成工学講座ナノメトリクス工学分野の横川隆司教授、および九州大学大学院医学研究院生体制御学講座系統解剖学分野三浦岳教授である。ここに感謝の意を表します。

文 献

- Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014 Jan 2;14(1):53-67. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.010. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24332837
- Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Chuva de Sousa Lopes SM, Little MH. Cite SharKidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *sa Lopes SM, Little MH. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Nature.* 2015 Oct 22;526(7574):564-8. doi: 10.1038/nature15695. Epub 2015 Oct 7. PMID: 26444236

- 3) Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, Saad AF, Li MK, Hughes MR, Werff RV, Peters DT, Lu J, Baccei A, Siedlecki AM, Valerius MT, Musunuru K, McNagny KM, Steinman TI, Zhou J, Lerou PH, Bonventre JV. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun.* 2015 Oct 23;6:8715. doi: 10.1038/ncomms9715. PMID: 26493500
- 4) Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, Kishi S, Valerius MT, Bonventre JV. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol.* 2015 Nov;33(11):1193-200. doi: 10.1038/nbt.3392. PMID: 26458176.
- 5) Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, Yoshimura Y, Ohmori T, Sakuma T, Mukoyama M, Yamamoto T, Kurihara H, Nishinakamura R. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Podocytes Mature into Vascularized Glomeruli upon Experimental Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Jun;27(6):1778-91. doi: 10.1681/ASN.2015010096. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26586691.
- 6) 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.
- 7) Nashimoto Y, Hayashi T, Kunita I, Nakamasu A, Torisawa YS, Nakayama M, Takigawa-Imamura H, Kotera H, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integr Biol (Camb).* 2017 Jun 19;9(6):506-518. doi: 10.1039/c7ib00024c. PMID: 28561127.
- 8) Nashimoto Y, Teraoka Y, Banan Sadeghian R, Nakamasu A, Arima Y, Hanada S, Kotera H, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R. Perfusable Vascular Network with a Tissue Model in a Microfluidic Device. *J Vis Exp.* 2018 Apr 4;(134):57242. doi: 10.3791/57242. PMID: 29683439.
- 9) Nashimoto Y, Okada R, Hanada S, Arima Y, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R. Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials.* 2020 Jan;229:119547. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119547. Epub 2019 Oct 17. PMID: 31710953.