

**【目的】**慢性腎臓病（CKD）は、多くの疾患の死亡率を押し上げる重大なリスク因子である。我が国において、CKD は年々増加傾向にあり、国民の生命と健康にとって、CKD 病態の新たな理解に基づいた革新的な医療を創生していくことが喫緊の課題である。そのために、CKD 病態の本体である糸球体ろ過機能が破綻するメカニズムを、これまででない角度から解明する研究が切望される。近年のオルガノイド技術は、それを可能にする有用な研究ツールとして期待されている。しかし、これまで確立されてき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、十分成熟した糸球体構造は誘導されていない。最近、腎オルガノイドに流れを付与すると、糸球体内に一定程度血管を誘導できることが報告された。一方、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への血管侵入が惹起される可能性が、我々の研究から示唆されてきた。しかし、いずれの方法においても十分成熟した糸球体血管はこれまで誘導できていない。本研究では、回転浮遊培養法と、別途我々が確立してきた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、その構造および機能の成立メカニズムを解明することを目的とした。

**【方法】**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、ガス交換を行いながら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、腎糸球体血管化を最も効率よく誘導できる培養法を探索した。一方、ヒト肺繊維芽細胞と隔離共培養を行うことで、微小流体デバイス上の細胞外基質内に血管内皮細胞による3次元血管網を誘導し（血管灌流チップ）、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、血管内培地灌流下に培養した。それにより、チップ血管とオルガノイド内血管の連結と糸球体血管の成熟化を誘導する最適培養条件を探索した。糸球体の成熟化は、ホールマウント免疫染色によって組織学的に評価した。

**【結果】**腎糸球体オルガノイドを、7日間気液界面培養後に回転浮遊培養に移行すると、3日後には糸球体様構造内に血管が侵入していた。また、10日後に最も血管侵入が進んでいた（図 a）。しかし、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した。一方、同様に7日間の気液界面培養後に血管灌流チップ内に腎糸球体オルガノイドを埋め込むことで、オルガノイド内血管網とチップ内の血管網が連結し、血管内灌流をかけ5日間培養後には、オルガノイド内糸球体様構造内へ血管が侵入していた（図 b）。しかし、その後の培養期間延長のみでは、成熟した糸球体血管網は形成されなかった。また、浮遊回転培養後に、血管灌流チップに導入しても、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。さらに、ペリサイトとの共培養、血管新生因子（Angiopoietin-1、S1P）、低酸素状態等、付加的な培養条件での糸球体血管化誘導法の改善を試みたが、いずれも付加しても、糸球体内の血管侵入度と成熟化にはあまり変化はなかった。

回転浮遊培養と血管灌流チップによる腎糸球体オルガノイドの血管化誘導

