

研究助成成果報告 研究助成 (S)

血液ろ過機構を評価可能なオールヒト iPS 細胞の
腎臓糸球体チップの開発

Development of an all-hiPSC glomerulus on a chip capable of evaluating filtration

2208001



研究代表者	京都大学 大学院工学研究科	教授	横 川 隆 司
共同研究者	理化学研究所 生命機能科学研究センター	チーム リーダー	高 里 実

[研究の目的]

現在、人工透析を受けている腎臓病患者は定期的な透析なしには生存できない上に、高血圧や動脈硬化などのさまざまな合併症を起こすなど、著しく QOL が低下している。この現状を改善して、人間らしい創造的な生活を送ることが可能になれば、透析医療費年間 1 兆 5 千億円の削減や、末期腎不全患者の健康寿命の延長に資することができ、膨れ上がる社会福祉費の削減という喫緊の課題の解決につながる。

本研究では、腎臓の糸球体が担う血液のろ過機構を生体外で再現することで、その機能解明を通して創薬につながる研究開発を進めてきた。具体的な研究目的は、機械工学的に作製した微小環境（細胞ニッチ）においてヒト由来 iPS 細胞（hiPSC）を培養することにより、未だ再生医療分野で実現していない腎臓ろ過機能の再構築という課題に挑戦することである。糸球体の構造と機能を模倣した生体模倣システム（糸球体チップ）は、血液側と尿側を模したマイクロ流路および細胞外基質からなる微小環境と、hiPSC から分化誘導した糸球体足細胞と血管内皮細胞を組み合わせることで再現する（図 1）。生体

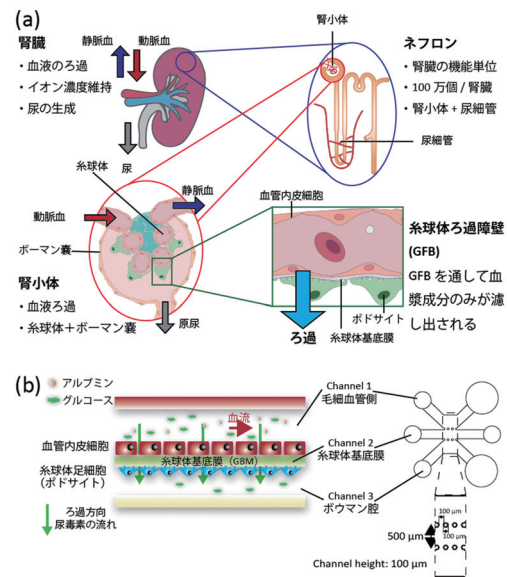


図 1 (a) 腎臓機能の背景, (b) 糸球体ろ過障壁モデル

内に近い糸球体ろ過機能を再現し、これまでの血液透析装置では担うことのできなかった腎生理学的機能を有する新たな細胞－機械融合型の血液ろ過システムを実現する。

[研究の内容, 成果]

1) 糸球体足細胞（ポドサイト）の開発

ポドサイトは、市販の不死化細胞と hiPSC

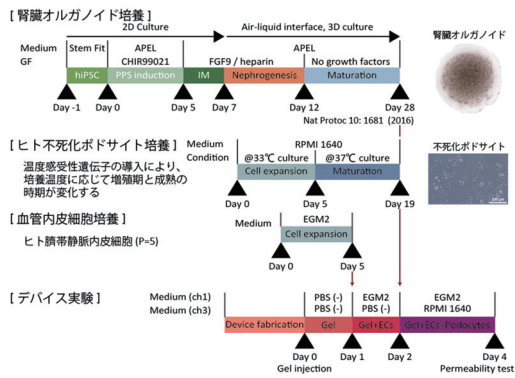


図2 本研究で確立したポドサイト比較プロトコル

から分化誘導した細胞を並行して用いることで、hiPSCの有用性を検討した。まず、各種hiPSCから誘導したポドサイトを作製するため、201B7株、585A1株、23C27株、CRL1502.3株などから高里らの分化誘導方法を用いて腎オルガノイドを作製した。細胞分離溶液であるAccumaxを用いてオルガノイドを分散し、単一浮遊細胞の懸濁液を作製した後、抗podocalyxin抗体を用いて、FACS法あるいはMACS法より糸球体上皮細胞を単離した(図2)。単離直後および培養後の糸球体上皮細胞は、qPCRによりNPHS1、NPHS2、PODXLなどマーカー遺伝子発現を評価した。さらに、免疫染色により同遺伝子産物のタンパク質マーカーNephrin、Podocin、Podocalyxinの発現を評価した。その結果、Podocalyxin+細胞は生体内の糸球体上皮細胞と類似な形態を持つこと、糸球体上皮細胞マーカー遺伝子およびタンパク質の発現量が高いことがわかった。しかし、培養したPodocalyxin細胞では単離直後と比較し、マーカー遺伝子およびタンパク質の発現量が減少したことから、単離直後の機能的な細胞をチップに搭載することが必須であることがわかった。

そこで、hiPSCはCRL1502.3株を用いることとし、ポドサイトの単離方法を最適化した。培養26日目のオルガノイドを細胞分離溶液により分散して細胞集合体の懸濁液を作製した。更に、70 μ mと40 μ mのセルストレイナーを用

い、サイズごとに細胞集合体を分画した。ポドサイトが、細胞分離溶液やセルストレイナーのせん断応力の影響を受けても細胞塊状態を保持する特長を活かし、得られた直径40–70 μ mの細胞集合体をポドサイト塊として分取した。これとMACS法で得たPodocalyxin+細胞を比較したところ、NPHS1とSYNPOの発現量はほぼ同じレベルであることが分かった。さらに、不死化ポドサイトに比べても複数のマーカー遺伝子の発現上昇が見られ、オルガノイド由来のポドサイトがより生理学的機能を有することが示された。FACS法やMACS法で単離した細胞と異なり、ポドサイト塊が高い生存性と接着性を持つことも分かった。そこで、本研究では以降の実験においてサイズソーティングを用いた単離法を採用することとした。

本研究項目では、共同研究者の高里らの協力によりオルガノイド作製技術を京大に移転した後、複数のhiPSCに適用しポドサイト塊の分取プロトコルを最適化した。結果的に、サイズソーティングにより得られるポドサイトの量は少ないものの、ポドサイト特異的な遺伝子やタンパク質発現を保ったまま培養することが可能となった。以上より、不死化ポドサイトに加え、iPS細胞由来ポドサイト塊を用いてオンチップ化する実験を進めることとした。

2) 腎臓糸球体チップの作製

ソフトリソグラフィにより3流路(血管側、糸球体基底膜(GBM)、原尿側)を有するマイクロ流体デバイスを作製し、ポドサイト塊と血管内皮細胞HUVECあるいは糸球体由来血管内皮細胞hGMECの共培養を実現した(図1b)。中央の流路内にFibrin、Collagen IV、Laminin 521の混合ゲルを入れ、ポドサイト塊とHUVECをそれぞれ両側の流路を介してゲルの両側に播種した。Phalloidin、Synaptopodin、Podocin等の免疫染色により評価し、チップ内に培養した細胞についてもこれらのマーカータンパク質の発現が維持されており、ポドサイト

様の構造を有することも確認できた（図3）。

二種類の内皮細胞のバリア機能を評価したところ、hGMEC の場合は蛍光強度が緩やかに上昇し7分間ほどで最大となった。一方、HUVEC の場合においては測定時間内では蛍光強度の変化は見られなかった。HUVEC は密なバリアを形成するのに対し、hGMEC は糸球体特有の有窓性を持つためと考えられる。

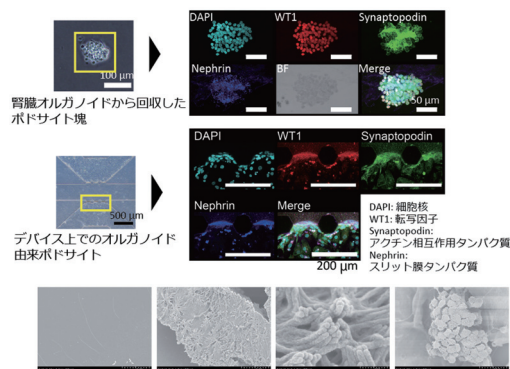


図3 hiPSC から単離したポドサイトと糸球体チップ

3) 腎臓糸球体チップを用いたろ過機能評価

ポドサイト塊と HUVEC 共培養系を用いて、二日間の培養後、Alexa Fluor 488 標識されたアルブミンあるいは FITC 標識されたイヌリンを HUVEC 側の流路に入れてろ過実験をおこなった（図4）。3 流路それぞれについて ROI

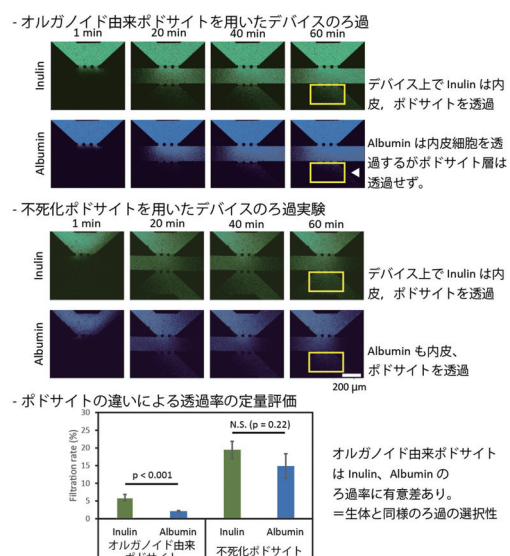


図4 hiPSC ポドサイトと不死化ポドサイトを用いた糸球体チップの機能比較

を設定し、蛍光強度の経時変化を測定した。アルブミンろ過量の経時変化を評価したところ、ろ過実験開始から15分後には HUVEC 層を完全に通過し、アルブミン溶液が ECM ゲル内に侵入するが、ポドサイト塊側ではバリア形成により30～45分後においてもほとんどアルブミンの通過が見られなかった。また、イヌリンがアルブミンの10倍程度透過しアルブミンの透過量は1%程度であったことから、本デバイス上でイヌリンとアルブミンの選択的ろ過を実現することができた。

さらに、本共培養系を用いたアルブミンとイヌリンのろ過実験について、複数回 ($n > 3$) の実験を行いイヌリン (60分で2%) がアルブミン (60分で6%) の3倍程度透過することを安定的に確認することができた。hiPSC 由来ポドサイトを用いた場合に、不死化ポドサイトに比べより選択的にイヌリンとアルブミンをろ過することも明らかになった（図4）。よって、アルブミンに対して糸球体ろ過障壁特有のろ過障壁機能を生体外で再構築することができた。

次に、選択的なろ過機能が確立した糸球体チップを用いて、PAN によるろ過障壁の崩壊を評価した。hiPSC 由来のポドサイトのみが感受性を有する濃度 $200 \mu\text{g/mL}$ において PAN を24時間投与すると、イヌリンとアルブミンのろ過量が一致し、その選択性がなくなった（図5）。また、そのろ過量 (60分で25%) は、PAN による障害を受ける前に比べイヌリンが13倍、アルブミンが4倍に増加しておりバリア機能が低下していることがわかった。

PAN に加え、アドリアマイシン (ADR) に対する感受性も評価した（図6）。不死化ポドサイトの IC_{50} が $30.7 \mu\text{g/mL}$ であったのに対し、hiPSC ポドサイトでは $12.4 \mu\text{g/mL}$ と感受性が高く PAN と同様の傾向が見られた。 IC_{50} よりも低い濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ においてポドサイトに暴露したところ、ADR 障害時に見られる Semaphorin 3A の発現上昇が見られた。ろ過

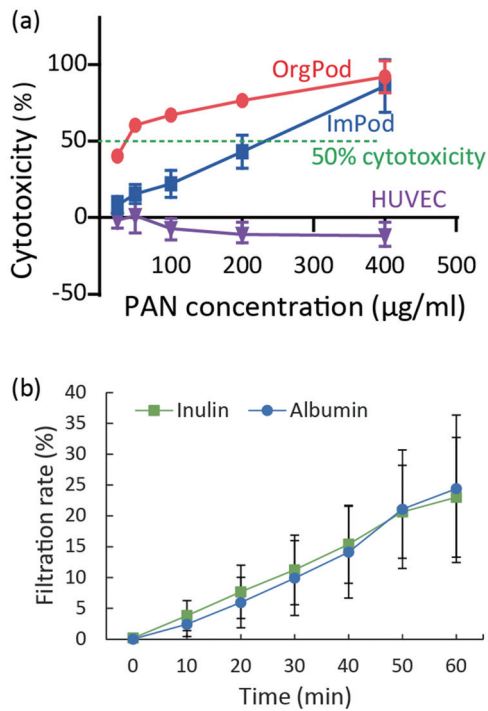


図5 (a) hiPSC と不死化ポドサイトの PAN 感受性の違い。
(b) PAN 処理によりイヌリンとアルブミンに透過性の違いがなくなることを示した

実験においても、PAN と同様に ADR 暴露によりイヌリンとアルブミンのろ過に差が見られなくなることを示した。

以上のろ過実験を通して、ポドサイトを共培養した場合に HUVEC 層の透過性が上昇することに気付いた。そこで、共培養によりポドサイトから内皮細胞の形質を変えることで、糸球体内皮細胞が有する有窓性を向上させているのではないかと仮説を元に HUVEC の網羅的な遺伝子解析を実施した。GO 解析の結果、細胞内で生じるイベントに注目した biological process に関わる遺伝子の内、48 時間後に共培養により発現量の変化が生じた遺伝子は 74 であった。その内、細胞の成長速度調節等に関わるメタロチオネインファミリーの発現低下が抽出され、この遺伝子発現変化が HUVEC の透過性を向上させているのではないかと結論に至った。今後は、共培養が HUVEC の形態に与える影響を SEM で評価すること、関連するシグナル経路を調査することによりポドサイトの効果を明らかにする。

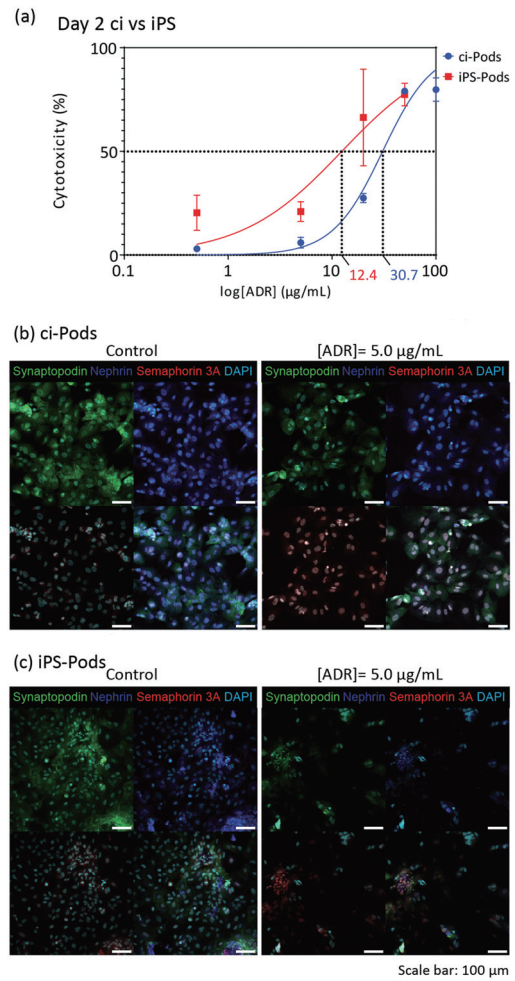


図6 (a) hiPSC と不死化ポドサイトの ADR 感受性の違い。
(b-c) ADR 処理により Semaphorin 3A の発生量が上昇することを示した

[今後の研究の方向、課題]

本研究では、hiPSC 由来のポドサイトを用いて糸球体チップを作製し、不死化細胞に対する薬剤感受性の高さ、選択的なろ過機能の高さを実証することができた。一方、HUVEC を hiPSC 由来の血管内皮細胞に置き換えて、更なる高機能性を実証するには至らなかった。また、生体内に比べるとイヌリンとアルブミンのろ過比が小さく、血流に対応したろ過量についても検証はこれからである。今後は、糸球体の構造と機能の相関を検証しながら、糸球体チップの機能性を高めることを目指す。

[成果の発表, 論文など]

〈論文発表〉

- [1] 田渕史, 渡部祥山, Stanislav L. Karsten, 藪内研佑, 佐原義基, 高里実, 藤本和也, 横川隆司「血管内皮細胞とポドサイトの共培養により構築した糸球体濾過障壁における透過性評価」*電気学会E部門誌*, 143, 9, 2023 (掲載決定済)
- [2] Trush Olena, Minoru Takasato “Kidney organoid research: current status and applications” *Curr Opin Genet Dev*, 75, 101944, 2022
- [3] Antigoni Gogolou, Celine Souilhol, Ilaria Granata, Filip J Wymeersch, Ichcha Manipur, Matthew Wind, Thomas JR Frith, Maria Guarini, Alessandro Bertero, Christoph Bock, Florian Halbritter, Minoru Takasato, Mario R Guarracino, Anestis Tsakiridis, “Early anteroposterior regionalisation of human neural crest is shaped by a pro-mesodermal factor” *eLife*, 11, e74263, 2022
- [4] Joan Li, Minoru Takasato, Qihe Xu, Roel Bijkerk “Editorial: Epithelial plasticity and complexity in development, disease and regeneration” *Front Cell Dev Biol*, 10, 1105402, 2023

〈国際会議発表〉

- [1] A. Tabuchi, K. Yabuuchi, Y. Sahara, M. Takasato, K. Fujimoto, R. Yokokawa. “Comparison of Selective Filtration of On-Chip Glomerulus Comprised of Organoid-Derived and Immortalized Podocytes.” *The 36th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2023)*, 301-304, Munich, Germany, 2023/01/15-19 (Poster)
- [2] A. Tabuchi, S. Watabe, K. Yabuuchi, Y. Sahara, M. Takasato, K. Fujimoto, S.L. Karsten, R. Yokokawa. “Building On-Chip Glomerular Barrier from Human iPSCs Derived Podocytes for Rapid Evaluation of Filtration Function and Nephrotoxicity Studies.” *ISSCR/JSRM Tokyo 2021 International Symposium*, Poster #308, Tokyo, 2021/10/27-29 (Poster)
- [3] A. Tabuchi, S. Watabe, K. Yabuuchi, Y. Sahara, M. Takasato, K. Fujimoto, S.L. Karsten, R. Yokokawa. “Evaluation of Permeability and Pan Toxicity of Cell Barriers Constituted of Kidney Organoid-Derived Glomerulus.” *The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021)*, 473-474, Online, 2021/10/10-14 (Poster)
- [4] A. Tabuchi, K. Yabuuchi, Y. Sahara, M. Takasato, R. Yokokawa. “Evaluation of the Permeability of Cell Barriers Constituted of Kidney Organoid-Derived Glomerulus.” *The 34th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2021)*, 536-539, Online, 2021/1/25-29 (Poster)
- [5] Wei Zhao, Minoru Takasato “A single-cell transcriptome approach to investigate the mechanism of mesoderm lineage-specification using human iPSCs” *55th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*, 2022. 06. 01, 金沢文化ホール, 金沢市
- [6] Olena Trush, Minoru Takasato “Towards understanding the mechanism of early nephron morphogenesis” *55th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*, 2022. 06. 01, 金沢文化ホール, 金沢市
- [7] Filip Wymeersch, Ukari Usuda, Minoru Takasato “Understanding the cell origin and developmental signals during mammalian bladder development.” *55th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*, 2022. 06. 01, 金沢文化ホール, 金沢市
- [8] Yukari Usuda, Yuya Aoto, Tomoko Horinouchi, Tomohiko Yamamura, Kandai Nozu, Kazumoto Iijima, Minoru Takasato “Generating Kidney Organoids from Nephrotic Syndrome Patients-derived iPSCs” *55th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists*, 2022. 06. 01, 金沢文化ホール, 金沢市