

[研究助成 (C)]

iPS 細胞を用いた糸球体 MPS による高血糖, 脂質異常症,
高血圧の相乗効果の評価

2247013



研究代表者
(助成金受領者)
共同研究者

京都大学 大学院工学研究科
理化学研究所
生命機能科学研究センター

大学院生 田 渕 史
チーム リーダー 高 里 実

[研究の目的]

本研究は、生体外で糸球体濾過障壁の構造を模倣したデバイスを開発し、その機能の評価することを目的とする。糸球体はヒトの腎臓にある組織であり、血液を濾過し尿の元となる原尿を生成する機能を有する。この血液濾過の過程において、生体から余分な水分や老廃物、各種イオンなどを取り除くことによって、体内の恒常性維持を担っている。しかしながら、一部の薬物や生活習慣病などの病気によって糸球体を構成する細胞が障害され、その機能が低下することが知られている。そのため、新薬開発においては、新薬候補物質が対象とする病態に有効であることを確認するとともに、糸球体への毒性が抑えられていることを確かめる必要がある。しかしながら、現在の創薬プロセスにおいては主に動物実験によって糸球体への毒性を評価するが、ヒトと動物との種差が課題となり、正しく毒性が評価できない。そこで、本研究では、ヒト由来の細胞を用いたオンチップ糸球体を構築することによって、従来の種差という課題を解決可能なデバイスを開発することを目的とした。さらに、ヒト iPS 細胞の細胞ソースとしての有用性を検証するため、これまで広く糸球体研究に用いられてきたヒト不死化ポドサイトを用了。また、デバイスにおける濾過機能の評価を定量可能な手法の開発をおこなった。開発したデバイスにおいて、糸球体濾過機能の障害

性が知られている薬物の投与によってその機能が実際に低下するかどうかを評価することで、今後の創薬の過程において動物試験の大体手法として利用できる可能性を示すことを目的とした。

[研究の内容、成果]

実験においては、まず CAD を用いてデバイス設計をおこない、微細加工技術によって PDMS 製のマイクロ流路をもつデバイスを作製した (図 1a, b)。次に、デバイス中のマイクロ流路に細胞や細胞外マトリクスを模倣した物質、培地などを導入することでデバイス中で細胞培養を可能とした。本実験においては、糸球体上皮細胞としてヒト iPS 細胞由来のポドサイ

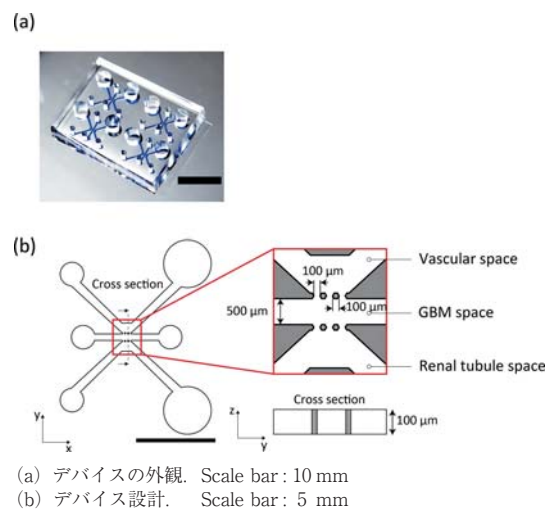
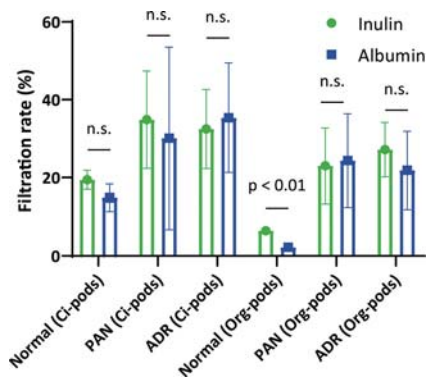


図1 デバイス概要



Ci-Pods : ヒト不死化ポドサイト
Org-Pods : iPS 細胞由来ポドサイト

図2 濾過機能の評価実験の結果

ト、血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。これらの細胞を、実際の糸球体の濾過構造の様に層状となるようにデバイス内に配置し、糸球体濾過障壁の構造を模倣した。数日間の培養によってデバイスを安定させたのち、濾過機能の評価実験をおこなった。ヒト生体においては、分子量の大きな物質は濾過障壁を透過できない一方、比較的分子量の小さなものは透過できることが知られている。そこで本研究では、分子量の大きな血中タンパク質であるアルブミンと、濾過機能測定に使われるイヌリンを指標物質として用いた。これらの指標物質には蛍光タンパク質が付与されているため、デバイス中の透過の様子を蛍光顕微鏡下で観察した。さらに、実際の糸球体薬物障害をモデル化可能か検証するため、すでに糸球体への毒性が知られているピューロマイシンアミノヌクレオシド (PAN) とドキシソルビシン (ADR) を用いた。これらの薬物をデバイス中に投与し、数日間培養後、同様にアルブミンとイヌリンを用いて濾過機能の評価した。

さらに、以上の実験において iPS 細胞由来ポドサイトのコントロールとしてヒト不死化ポドサイトを用いた実験をおこなった。

作製したデバイスの機能評価実験において、通常の毒性薬物を加えていないデバイスにおい

ては、アルブミンとイヌリンの透過に違いがみられ、それらの透過には分子量依存的な差があることが確認できた。この結果は、構築した糸球体模倣デバイスが生体と同様の選択的濾過機能を持つことを示すと考えられる。また、PAN と ADR による薬物障害モデルでは、デバイスの濾過機能が低下するとともにアルブミンとイヌリンの濾過選択性もなくなる様子が観察された。この結果は、薬物障害による機能低下をデバイスを用いて表現できた結果であると考えられる。さらにヒト不死化ポドサイトにおいては、障害性物質を投与していない健常モデルにおいて、本来生体で見られるはずのアルブミンとイヌリンの間の選択性が見られないことが明らかとなった。以上の結果より、糸球体の濾過機能を模倣するデバイス構築には iPS 細胞由来ポドサイトが適することが示された。

本研究においては、微細加工技術と細胞培養技術を組み合わせ、生体の濾過機能を模倣するデバイスを開発してその実証をおこなった。デバイスの機能は濾過指標物質の透過を評価することで測定され、生体と同様の濾過選択性や、薬物による機能障害へ反応することを示した。一方で、その濾過機能は生体と同等とまでは至らなかった。これは、用いている細胞の成熟が低いことやデバイス中での培養期間の短さが一因として考えられる。今後は、これらの課題を工学的、生物学的両方の観点から解決へと取り組む必要があると思われる。

[成果の発表, 論文など]

Ayumu Tabuchi, Darryl Koh, Kensuke Yabuuchi, Yoshiaki Sahara, Minoru Takasato, Kazuya Fujimoto, and Ryuji Yokokawa. "Enhanced Glomerular Filtration and Podocyte Expression in Human iPSC-Derived On-Chip Glomerular Barriers with Spontaneous GBM Formation". The 19th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems. May 2-5, 2024, Kyoto.