

京都大学	博士（工学）	氏名	亀田 良一
論文題目	オンチップ血管網と腎臓オルガノイドの接続に向けた基盤技術の構築		
（論文内容の要旨） 本論文は、血流が腎臓オルガノイドの成熟化に与える影響を解明することを目的とし、オルガノイドに血流を付与できる実験系の開発を目指している。その実験系の構築に向け、オンチップ血管網とオルガノイドを接続するための実験条件を最適化し、接続に必要な条件を明らかにしたものであり、6章で構成されている。 第1章は緒論であり、背景、目的、論文全体の構成について述べている。現在の腎臓オルガノイドは遺伝子発現パターンによると、First trimester (0~13 週齢)のヒト胎児腎に相当する未熟な状態にとどまっている。そのため、生体内の腎臓の構造を完全に模倣できていない。これまでに用いられてきたオルガノイドの培養環境は静的である一方、生体内の腎臓は、絶えず血流によるせん断刺激を受けている。よって、オルガノイドに対し血流を介したせん断刺激を付与することにより、血管構造の発達、血管との相互作用の促進による腎細胞の成熟化が期待できる。しかし、オルガノイドに対して血流を付与し、その影響を調べる方法がなかった。 本論文では、オルガノイドに血流を付与する方法としてオンチップ血管網を利用した手法を提案している。血管網とオルガノイドを接続できれば、血管網を介してオルガノイド内に血流を模した流れを付与できる。しかし、血管網とオルガノイドの接続には下記 3 つの課題がある。まず、現在のオルガノイドは内在性の血管が培養の経過とともに縮退するため、外部のオンチップ血管網との接続機会が少なくなり接続が困難である（課題 1）。次に、血管網の構築は従来、線維芽細胞と共培養し、線維芽細胞から分泌される成長因子を利用していた。しかし、その成長因子は不特定多数であるため、オルガノイドの分化誘導を阻害する因子含む可能性がある。また、血管網の形成が細胞の自己組織化に依存しているため、その形態が実験ごとの細胞の状態によりばらつく。そのばらつきは共培養しているオルガノイドにも影響を及ぼし、血管網とオルガノイドとの接続の有無やオルガノイドの成熟度に関する再現性が乏しくなる（課題 2）。さらに、血管網とオルガノイドを共培養する際、従来法ではオルガノイドをゲル中で培養していた。一方、十分な酸素をオルガノイドに供給するため、気液界面上でオルガノイドを培養するのが好ましく、ゲル中での培養は不適切である（課題 3）。本研究では上記の 3 課題、(1)オルガノイド内部の血管の縮退、(2)オンチップ血管網の構築に用いる線維芽細胞の悪影響と血管網形態の不安定性、(3)オンチップ血管網と共培養したオルガノイドに対する不適切な培養環境、の解決策をそれぞれ実証することにより、血管網とオルガノイドの接続を試みている。 第2章では、課題 1 の解決手法について述べている。オルガノイド内部の血管が縮退する要因として、オルガノイドの基礎培地である APEL2 が腎細胞に最適化されている一方、血管内皮細胞には適していないことを挙げている。本研究では、血管内皮細胞の維持培養に用いられる無血清培地 Human endothelial serum free medium (SFM)を APEL2 に混ぜた培地(APEL2/SFM)を用いることにより、血管内皮細胞を豊富に含むオルガノイドを作製した。APEL2/SFM で培養したオルガノイドでは、血管内皮細胞が糸球体周囲に網目構造を形成し、培養日数が経過してもその構造は維持されていた。ま			

京都大学	博士（工学）	氏名	亀田 良一
た、マイクロアレイ解析の結果、APEL2/SFM での培養による血管新生に関連する遺伝子発現の上昇が、血管内皮細胞を豊富にした理由であることを明らかにしている。 第 3 章では、課題 2 の解決手法について述べている。繊維芽細胞を使わずに血管網を構築する方法として、VEGF、bFGF を培地に添加する方法を提案している。血管網形態を安定化させるためには、実験初期に形成される血管網形態を予測し、その予測に基づきオルガノイドとの共培養に用いるかを選別すればよい。本研究では、成長因子の有無や異なる血管内皮細胞を用い、血管形成初期 24 時間の細胞形態の時間変化を解析した。初期段階では、血管内皮細胞は突起を伸ばし、細胞全体から突起を除外した部分である細胞体の面積が時間と共に増加した。その細胞体面積の増加率が成長因子の有無や細胞種によって異なり、その増加率の違いは Cell body expansion (CBE) score というパラメータによって表すことができた。また、その値と最終的に形成される血管網の接続率や血管径に相関があった。以上より、CBE score の値を元に形態を予測できると結論づけている。 第 4 章では、課題 3 の解決手法について述べている。気液界面上でのオルガノイド培養に向け、オンチップ血管網を「血管床」と見立て、その上にオルガノイドを導入し共培養する方法を開発した。活発に血管新生を誘導するがん細胞や線維芽細胞で構築したスフェロイドを血管床上で培養したところ、血管床から新たな血管がスフェロイドに向かって伸長し、スフェロイドと接続した。また、血管床を通じてスフェロイド内に送液可能であることを実証した。以上より、オルガノイドが十分に血管新生を誘導すれば、血管床と接続可能であることを確かめている。さらに、血管床上で気液界面を維持する方法として、オルガノイド上面を少量の培地で覆いながら培養する方法を試し、血管床上でもオルガノイドが分化可能であることを確認している。 第 5 章では、前章までで報告した方法を組み合わせ、血管床上で腎臓オルガノイドを培養している。血管床内への培地の灌流も試みたが、前章でのスフェロイドとは異なり、血管床から伸長した新生血管がオルガノイドに接続する様子は見られなかった。そこで、マイクロアレイ解析によりその原因を探ったところ、血管床側の培地に含まれる EGM-2 がオルガノイドの血管新生に関する遺伝子の発現を低下させていることを突き止めた。また、EGM-2 の影響の大きい培養条件では、オルガノイド内部の血管の量が減っていた。以上より、血管床とオルガノイドを接続する新たな課題として、血管床を維持可能でかつ、オルガノイドの血管形成能を阻害しない培地の開発が必要であることを明らかにしている。 第 6 章はまとめであり、本論文における研究の成果とその意義について示すとともに、今後の展望について述べている。			