

宇宙環境を利用する3次元腎臓組織の創出

筑波大学 生命環境科学研究科 村沢裕介、王 碧昭

Constitution of three dimensional renal tissue utilizing space environment

Yusuka Murasawa and Pi-Chao Wang

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba City, Ibaraki, 305-8572

E-Mail: cogitate@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

Abstract: Type V collagen fiber was reconstituted *in vitro* and used as a new scaffold for cell and tissue culture in this study. We firstly proved that type V collagen fiber can not only provide a dynamic scaffold for renal glomerular endothelial cells but also can induce other ECM (extracellular matrix) such as type IV collagen and fibronectin which are the main components for glomerular basement membrane. By using type V collagen fiber, we challenged a new concept different from traditional tissue engineering in which stable scaffold such as collagen I was used. In our new experiment, embryonic tubular and adult glomeruli could be fused to constitute a new nephron *in vitro* and blood capillary could be induced around glomeruli when both developmental and aging tissues were co-cultured on type V collagen fiber.

Key words: Space Utilization, Space Station

筆者らはV型コラーゲン繊維を再構築し、V型コラーゲンは動的環境なECMの重要性を提示すると共に、既存の再生医工学の安定化ECM概念から脱却した新規細胞外マトリックスを提起した。また、V型コラーゲン繊維を用い、*in vitro*で発生腎尿管芽と成熟腎糸球体の融合と腎ネロン組織の形成を実現した。

臓器移植を超える再生医工学は、20世紀末から21世紀初頭にかけて、tissue Engineering技術の開発により、著しく進展している。再生医工学では、生体外で組織を再生させる方法と生体内で組織を修復させる方法に分けられる。前者は、細胞、液性因子と足場(scaffold)を用い、皮膚、角膜、骨などの組織を再生させる方法であり、後者は、組織成長因子の遺伝子導入や同種の幹細胞を用い、神経、脊髄組織を再生させる方法である。しかしながら、これらの技術が著しく進歩しているにもかかわらず、腎臓や肝臓のような複雑な器官の構築は、絵まだに実現できていない。

日本の腎不全患者の中で透析患者数は、2005年現在既に25万人まで増えていて、腎きのう低下の患者はやく480万人いると報告されている。今後さらに増えると予測されている。患者の生活の質(QOL)を向上するため、生体腎に代替する次世代人工腎臓の研究が至急となっている。本研究は、腎臓の濾過および再吸収を機能する二つのユニット—腎糸球体と尿細管—を結ぶ基礎的なメカニズムの解明と実用的な技術の開発を目的とする。

我々が新たな細胞足場(細胞外マトリックス、ECM)—V型コラーゲン—を着目し、コラーゲン繊維を再

構築した。この足場を用い、腎臓糸球体内皮細胞への役割を解明し、さらに腎ネロンを構築する足場として使用した。

V型コラーゲン繊維を用いた腎糸球体細胞の培養実験を行った結果、糸球体細胞に対しV型コラーゲン繊維が三つの役割を解明した。①細胞が自由運動しながら、接着している状態を作り出す、形態変化過渡期の環境を提供する。②細胞間相互作用を高め、組織化を進めるECMである。③早急に消化され、一過性で存在し、次環境にバトンタッチするECMでもある。

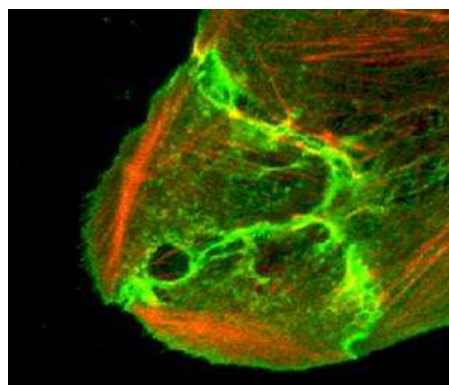


Fig. 1 Integrin is located at the leading edge of cell

この3役割において、V型コラーゲン繊維は細胞外シグナルをNG2, integrinのレセプターにより、細胞内に伝達した。タイムラプス観察の結果、I型コラーゲン上細胞の安定移動に対し、V型繊維上、細胞のフィロポディアを多用した速い不安定移動を観察した。この時、細胞内の adaptor 分子 paxillin,

FAK, JNK のチロシン、セリンがリン酸化により、細胞内シグナルが細胞外シグナルに変遷し、細胞の運動を駆動する。また、長期培養後、V型コラーゲン繊維が消化され、代わりにIV型コラーゲンとfibronectinが細胞外に分泌され、細胞の超高次構造が形成され、細胞の組織化を促進した。

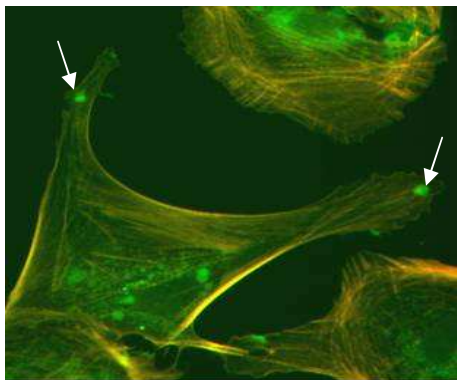


Fig. 2 Phosphorylated FAK is located at the migrating tip of cells.

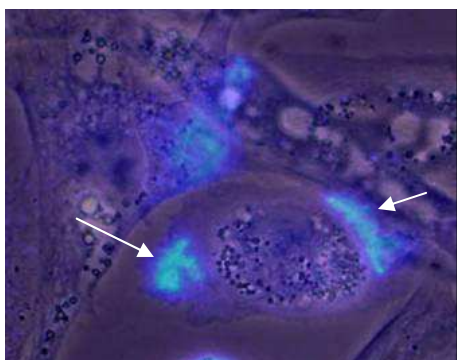


Fig. 3 Phosphorylated paxillin is located at the pole of cells.

細胞内シグナルが細胞外シグナルに変遷し、細胞の運動を駆動する。また、長期培養後、V型コラーゲン繊維が消化され、代わりにIV型コラーゲンとfibronectinが細胞外に分泌され、細胞の超高次構造が形成され、細胞の組織化を促進した。

In vitro で発生腎（後腎）を培養すると、上皮系で構築された尿管は形成されるが、高度分化した血管系を含む腎糸球体の形成ができない。本研究は、V型コラーゲン繊維を用い、アダルト糸球体内皮細胞を動的に誘導し、高次V型コラーゲン繊維中で細胞同士の相互作用を高めて、発生腎尿管細胞の2者間で相互作用し、*In vitro*での腎臓ネフロンの構築を試みた。

明視野顕微鏡と蛍光抗体染色法で観察した結果、共培養3日後、アダルト糸球体が発生期後腎の尿管

先端に融合した。*In vivo* 発生初期に尿管芽周辺にV型コラーゲンの存在を実証しただけではなく、V型コラーゲンが発生期間により、尿管芽から糸球体周辺に遷移し、糸球体内に侵入する微小血管の形成を促進することも証明した。また、アダルト糸球体と発生尿管先端に融合する際、V型コラーゲンが帯状を形成し、糸球体を尿管芽に連れ寄せることが観察される。



Fig. 4. Adult glomeruli were fused to the tip of developmental ureteric buds.

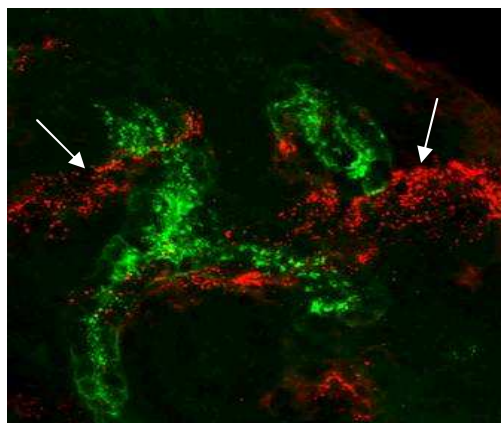


Fig. 5 Type V collagen is surrounding the ureteric bud.

以上の結果により、*in vitro*でのネフロン構築が新規足場V型コラーゲンにより実現が可能である。今回の結果は1本のネフロンだけの形成となっているが、今後は擬微小重力装置を用い、複数のネフロンの構築を目指したい。