

近位尿細管の生体模倣システムの3Dイメージング

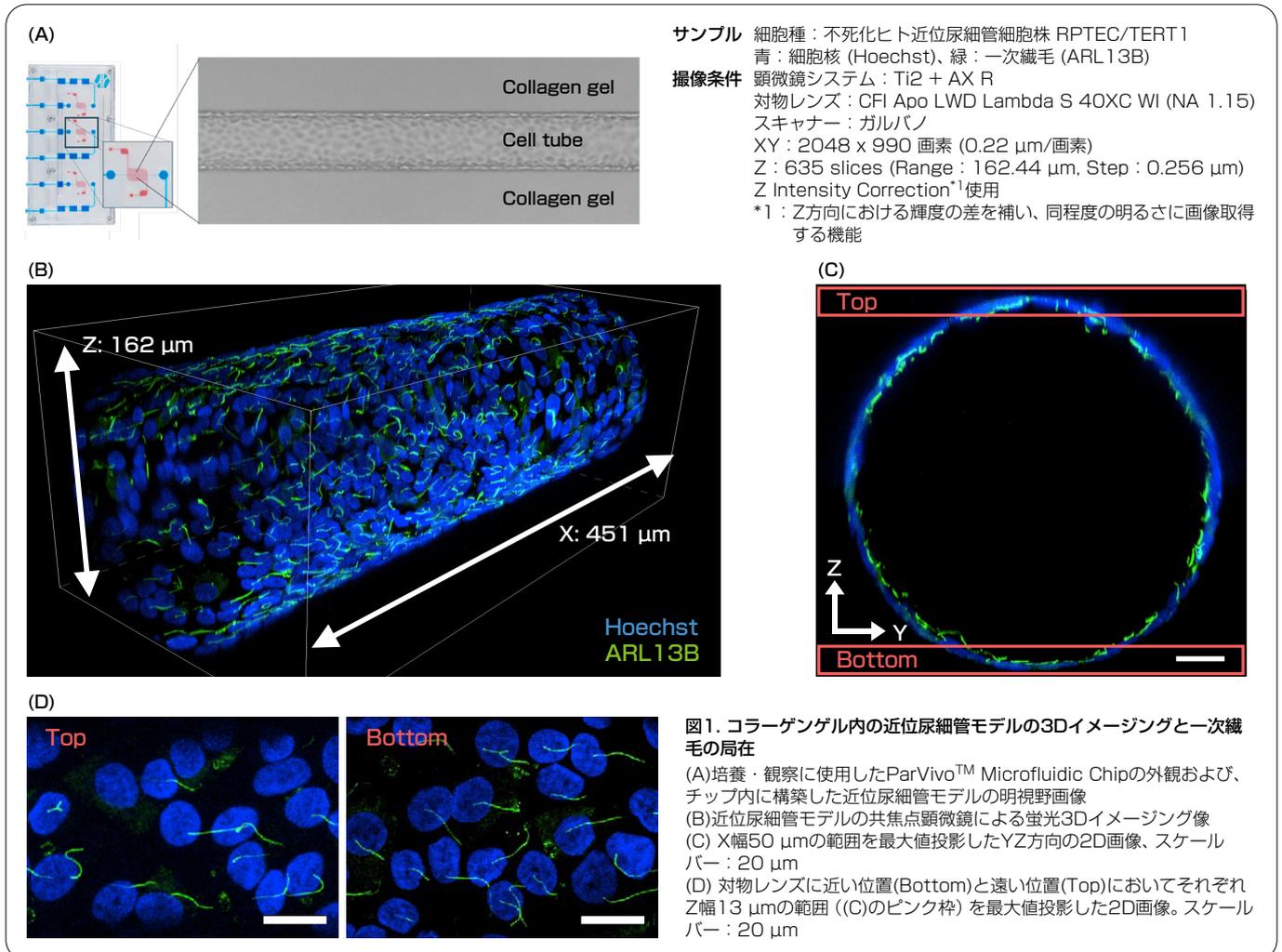
生体模倣システム (Microphysiological System: MPS) は生体内を模した環境を構築した3D培養システムであり、医薬品の前臨床試験においてヒトの生体内環境を考慮した評価を可能にするツールとして、また倫理的な観点から動物実験を代替する手段として近年注目されている。Nortis社のParVivo™ Platformは、血管や尿細管などの液体が内部を流れる管状組織を、灌流培養下で構築可能なMPSである。3D空間に細胞を取り巻く環境を忠実に再現することで、従来の2D培養よりも生体組織に近い状態の研究が可能になる。すでに再生医療、医薬品開発、毒性評価、疾患研究など、さまざまな研究分野で利用されており、新たな *in vitro* 評価法として期待されている。

本アプリケーションノートでは、ParVivo™ Platformを用いて構築した近位尿細管モデルにおいて、ヒト腎近位尿細管細胞上の一次繊毛 (primary cilia) を、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rにより観察した例を紹介する。AX/AX Rは従来の共焦点顕微鏡よりも広範囲に、高解像度な3D構造を捉えられるため、直径約200 nm程度である一次繊毛のような、小さな構造物を鮮明に観察することが可能である。

キーワード：生体模倣システム (MPS)、Organ-on-a-chip、3D培養、共焦点顕微鏡、近位尿細管、一次繊毛、再生医療、医薬品開発、毒性評価、疾患研究

ParVivo™ Platformを用いて構築した近位尿細管モデルの3Dイメージング

ParVivo™ Platformを用いて、コラーゲンゲル中に形成した管腔にヒト腎近位尿細管細胞 (RPTEC/TERT1) を播種し、灌流培養することで、近位尿細管モデルを構築した (図1A)。固定処理後、一次繊毛のマーカーであるARL13Bと核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rを用いて3Dイメージングを行ったところ、RPTEC/TERT1が管腔構造を形成していることが確認できた (図1B)。また、YZ方向の2D画像により、一次繊毛が管腔の内側表面に局在することが確認できた (図1C)。さらに、管腔構造の上下それぞれ13 μm範囲の二次元最大値投影 (MIP) 画像を比較したところ、Z距離が150 μm以上異なっても同様に精度の高い画像が取得可能であることが示された (図1D)。



General Analysis 3を用いた一次繊毛の解析例

General Analysis 3 (GA3) は画像統合ソフトウェア NIS-Elementsの画像処理・計測モジュールであり、様々な画像解析をGUIで簡単にカスタマイズ可能である。このGA3を用いて一次繊毛の配向について解析を行った。底面側の部位で二次元最大値投影画像内の一次繊毛の領域を抽出し、培地が流れていた方向 (X軸) に対してフェレー径が最大となる角度を算出し、その角度を一次繊毛の向きとした (図2 A, B, C)。その結果、画像中の一次繊毛が灌流方向に沿って配向していることを数値的に示すことができた (図2 D)。

ParVivo™ Platform

ParVivo™ Platformは生体組織の再現や生理学的環境の模倣を可能にする革新的技術であり、Microfluidic Chip、Perfusion Module、Perfusion Systemから構成される。近位尿管の他にも血管や血液脳関門などの様々な組織をMicrofluidic Chip内に容易に再現できる。さらに、Perfusion ModuleとPerfusion Systemにより、組織に合わせた灌流量を一定に制御することで、生体組織内の流量とせん断応力をより正確に再現しながら細胞の生存や機能を長期間保持することが可能になる。

また、顕微鏡観察がしやすいようにデザインされており、実験終了後に固定したMicrofluidic Chipの観察だけでなく、Perfusion Moduleにセットした状態、すなわち培養期間中でも蛍光観察が可能である (図3)。

まとめ

Nortis社のParVivo™ Platformにより構築した近位尿管モデルを、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いて撮影した。その結果、コラーゲン中に形成されたRPTEC/TERT1の管状構造や一次繊毛の構造およびその灌流方向に沿った配向を、管腔構造の全領域において鮮明に捉えることができた。

ParVivo™ Platformは様々な組織をより生体に忠実な形で再現することが可能である。また、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rおよび画像統合ソフトウェア NIS-Elementsは、高解像度で詳細な撮影や定量的な解析を実現する優れた性能を持つ。これらを組み合わせることで、疾患メカニズムや治療法の開発においてより正確なデータの取得が可能になり、医学・生物学の研究分野や医薬品開発において強力な研究ツールとなることが期待される。

参考文献

- 石田 誠一, 金森 敏幸, Microphysiological system (MPS) の期待と現状, *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*, 154, 345-351. (2019).
 Anna Tourovskaia *et al.* Brief Communication: Tissue-engineered Microenvironment Systems for Modeling Human Vasculature, *Exp. Biol. Med.*, 239(9): 1264-1271. (2014).
 Elijah J. Weber *et al.* Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function, *Kidney Int.*, 90(3): 627-637. (2016).

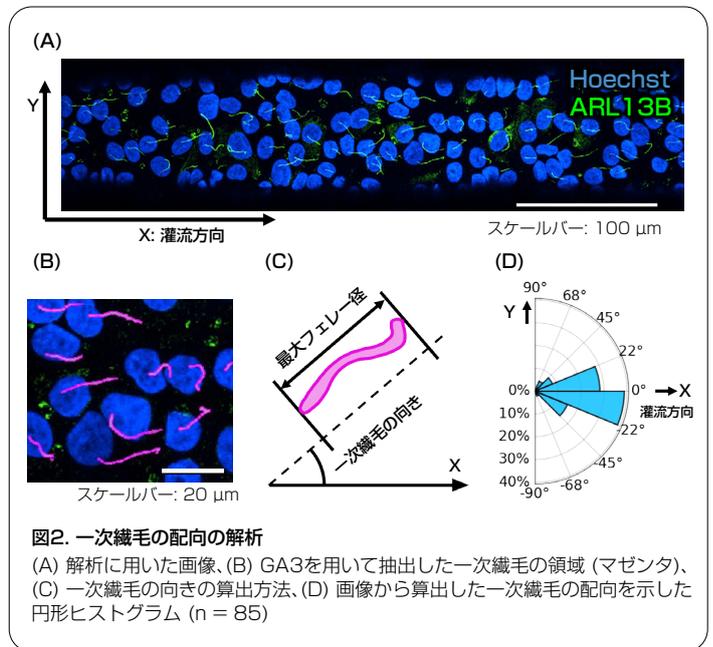


図2. 一次繊毛の配向の解析

(A) 解析に用いた画像、(B) GA3を用いて抽出した一次繊毛の領域 (マゼンタ)、(C) 一次繊毛の向きの算出方法、(D) 画像から算出した一次繊毛の配向を示した円形ヒストグラム (n = 85)

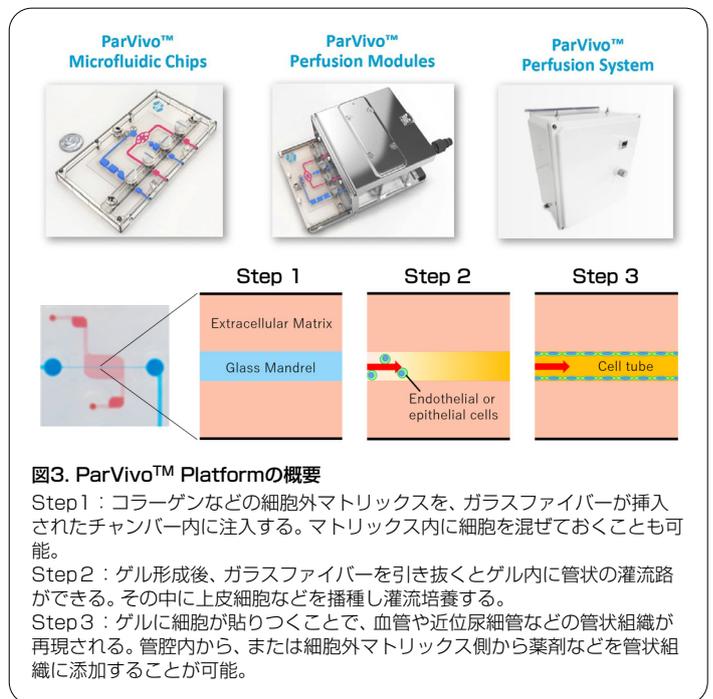


図3. ParVivo™ Platformの概要

Step1: コラーゲンなどの細胞外マトリックスを、ガラスファイバーが挿入されたチャンバー内に注入する。マトリックス内に細胞を混ぜておくことも可能。
 Step2: ゲル形成後、ガラスファイバーを引き抜くとゲル内に管状の灌流路ができる。その中に上皮細胞などを播種し灌流培養する。
 Step3: ゲルに細胞が貼りつくことで、血管や近位尿管などの管状組織が再現される。管腔内から、または細胞外マトリックス側から薬剤などを管状組織に添加することが可能。

用語解説

一次繊毛 (Primary cilia)

細胞表面から突出している、長さ数μm、直径約200 nmの毛状の構造体。様々なシグナル伝達に関わる重要な細胞小器官である。尿管にある一次繊毛は、尿流を感知し、腎臓の器官形成と維持に関わる。一次繊毛の異常は、さまざまな腎疾患の原因となることが知られており、疾患メカニズムや腎臓の形態形成の観点から研究されている。

使用デバイスのご紹介

ParVivo™ Platform (製造元: Nortis)

微小流路チップ、灌流モジュール、空気圧ポンプの組み合わせで、生体模倣システムの作成・培養維持・観察をサポート。テスト化合物の灌流や、灌流しながらのライブイメージングも可能です。



製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

広視野と高解像度で、広範囲にわたる生命現象を逃さず捉えます。AX Rは高速スキャンにより、生体試料に与える光毒性を低減します。

- 高速: 最速毎秒720フレーム (レゾナント 2048 × 16画素)
- 高解像度: 最高8K (ガルバノ) / 2K (レゾナント)
- 高スループット: 視野数25 mmの超広視野



製品情報は[こちら](#)