

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培養システムである。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注目されており、倫理的な観点から動物実験を代替する手段としても期待されている。MPSでは、マイクロ流路や多孔膜などを用いて、3D空間に細胞を取り巻く環境を忠実に再現する。これにより、従来の2D培養よりも生体組織に近い状態での研究が可能となる。すでに再生医療、医薬品開発、毒性評価、疾患研究などに利用されており、新たな*in vitro* 評価法として期待されている。

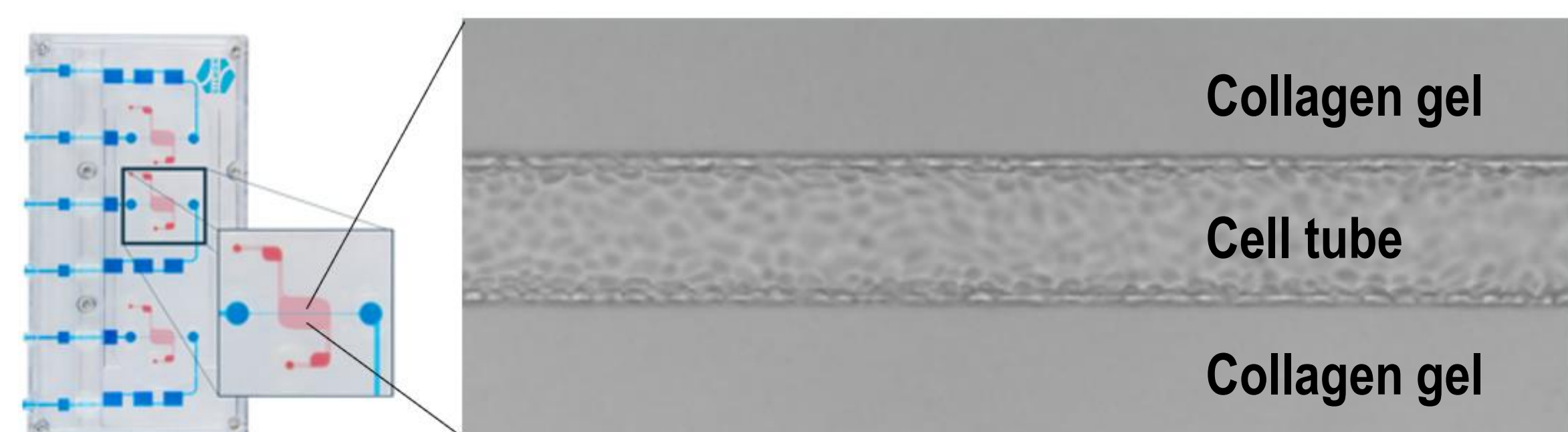
本アプリケーションノートでは、コラーゲンゲル流路を用いて構築された近位尿細管モデルにおいて、ヒト腎近位尿細管細胞上の一次繊毛 (primary cilia) を、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rにより観察した例を紹介する。AX Rは従来の共焦点顕微鏡よりも広範囲に、高解像度な3D構造を捉えられるため、一次繊毛のような直径約200 nm程度の小さな構造物を、組織全体で鮮明に観察することが可能である。

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

MPSチップに構築された近位尿細管モデルの3Dイメージング

MPSチップを用いて、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、一次繊毛マーカーのARL13Bと核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rと水浸対物レンズを用いて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 範囲の最大値投影 (Maximum intensity projection, MIP) 画像を比較したところ、Z位置が150 μm 以上離れていても同様に精細な画像が取得可能であることが示された (図1D)。

(A)



サンプル：細胞種: 不死化ヒト近位尿細管細胞株 RPTEC/TERT1 (Evercyte, CHT-003-0002)

青：細胞核 (Hoechst)、緑：一次繊毛 (ARL13B)

撮像条件：顕微鏡システム: Ti2 + AX R

対物レンズ: CFI Apo LWD Lambda S 40XC WI (NA=1.15)

スキャナー: ガルパノ

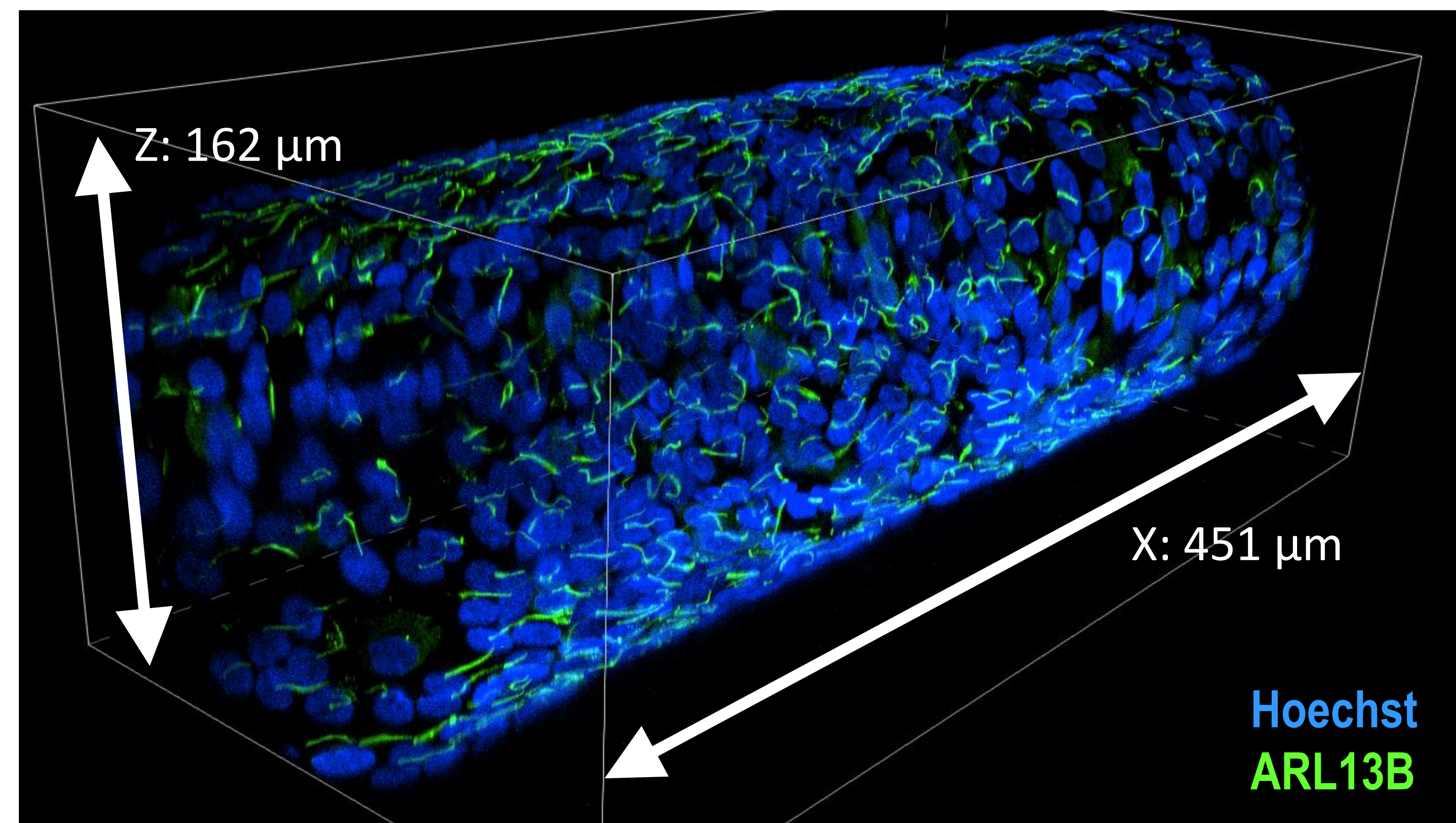
XY: 2048 x 990 画素 (0.22 μm /画素)

Z: 635 slices (Range: 162.44 μm , Step: 0.256 μm)

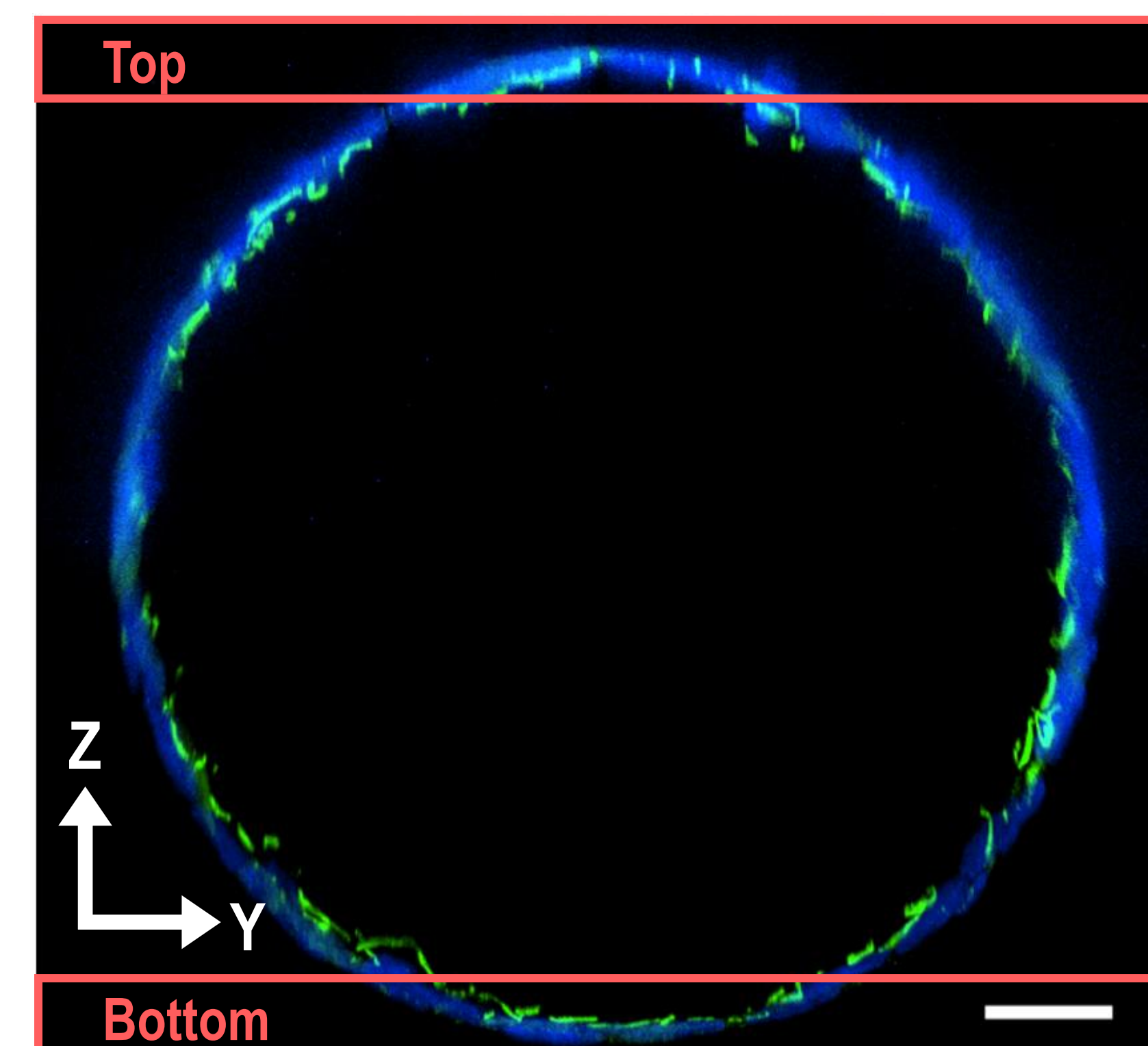
Z Intensity Correction* 使用

*Z方向の輝度の差を補い、全体を同程度の明るさに撮像する機能

(B)



(C)



(D)

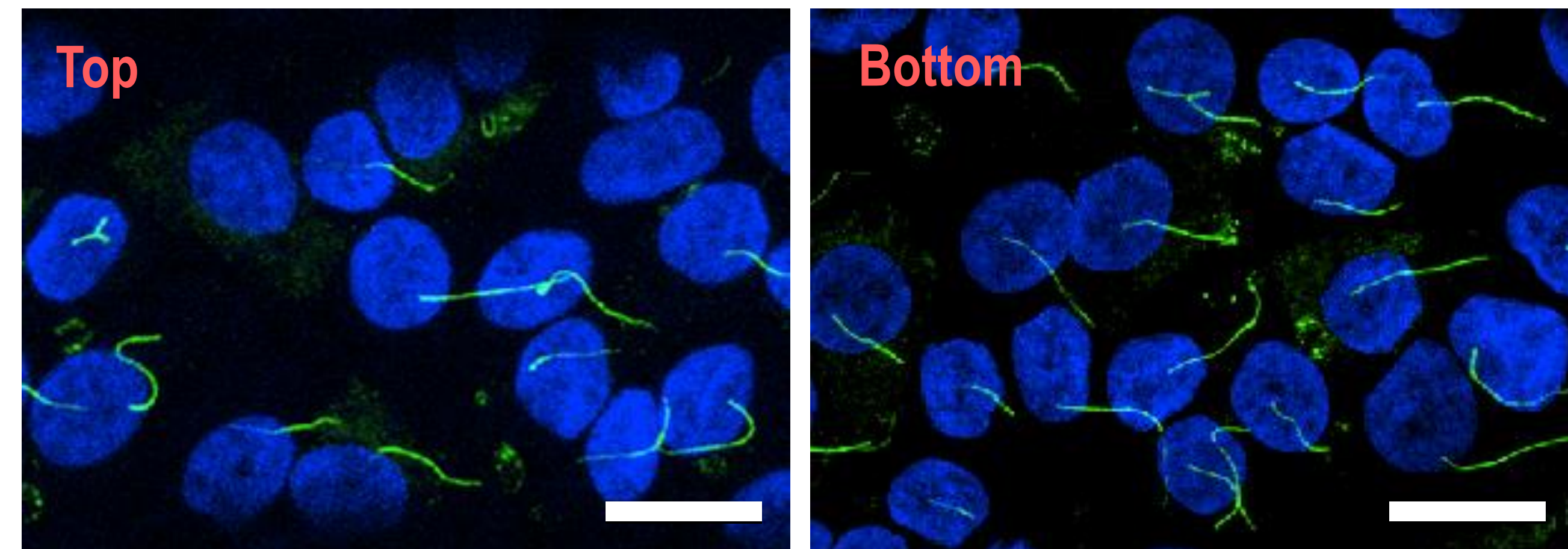


図1. コラーゲンゲル内の近位尿細管モデルの3Dイメージングと一次繊毛

(A) 培養・観察に使用したMPSチップ (Nortis社) の外観および、チップ内に構築した近位尿細管モデルの明視野画像。

(B) 近位尿細管モデルの共焦点顕微鏡による蛍光3Dイメージング像

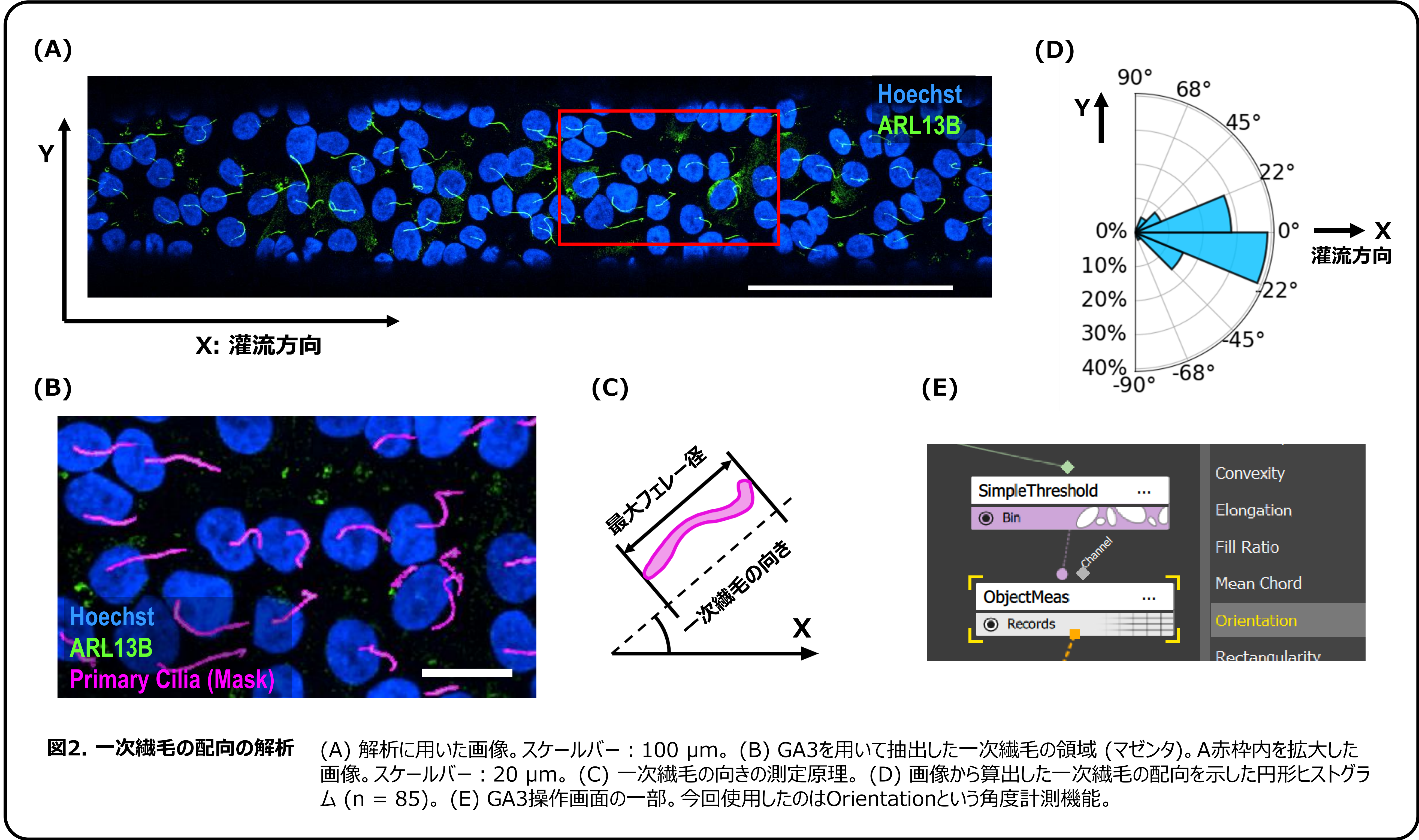
(C) X幅50 μm の範囲を最大値投影したYZ平面の2D画像。スケールバー：20 μm 。

(D) 対物レンズ側に近い位置 (Bottom) と遠い位置 (Top) においてそれぞれZ幅13 μm の範囲 (C赤枠) を最大値投影したXY方向の2D画像。スケールバー：20 μm 。

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、様々な画像解析レシピが簡単な操作で作成可能である。このGA3を用いて一次繊毛の配向について解析を行った。底面側の部位における最大値投影 (MIP) 画像内の一次繊毛を領域抽出した後、それぞれの一次繊毛領域のフェレー径*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2A, 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定量的に示すことができた (図2D)。GA3にはこのようなオブジェクトの角度計測やそれらの統計量の計算など、様々な特徴量について容易に解析できる機能が備わっている (図2E)。

*フェレー径とは、対象を2本の平行線で挟み込んだ際の平行線間の距離のこと。



まとめ

MPSを用いて構築した近位尿細管モデルを、共焦点レーザー顕微鏡システムAX Rと水浸対物レンズを用いて撮像した。その結果、コラーゲンゲル中に形成された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。

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像や定量的な解析を実現する優れた性能を持つ。様々な組織を生体に忠実な形で再現するMPSの観察に用いることで、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).

著者 株式会社ニコン 中村岳広 名川信吾

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。尿細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。

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 8 K (ガルバノ) / 2 K (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](#)

