

学 位 論 文 の 要 旨

論 文 名 糸球体及び尿細管の機能を模倣したマイクロ腎排泄モデルの開発
(Development of a micro renal excretion model mimicking functions of glomerulus and renal tubule)

氏名 作田 悠 印

体内における腎臓での排泄過程は、薬剤の残留性、薬効、副作用に大きく関与するため、新薬開発において非常に重要な過程である。血中の薬剤のうち、アルブミンなどの血漿タンパク質との結合率が低く遊離して存在しているものは、糸球体からろ過されて排泄されやすく（糸球体ろ過）、結合率が高いものはろ過されにくい。また、ろ過されずに糸球体を通過した薬剤の一部は傍尿細管毛細血管から尿細管細胞に移行し、その頂端側に発現する P 糖タンパク質（P-gp）による能動輸送などを受け、尿細管側へと排泄される事が知られている（腎分泌）。従って、薬剤の残留性評価のためには、血漿タンパク質との結合性や、尿細管における能動輸送を受ける基質であるかといったことは解析すべき重要な性質である。薬剤の腎排泄については *in vitro* や *in vivo* で様々な試験が行われるが、動物実験が最も重要である。しかし、近年動物実験が削減傾向にある事に加えて、実験動物とヒトとの種差により前臨床試験による予測と臨床試験の結果に大きな差異が生じることが少なくない。

最近、この問題の解決策として、マイクロ流体の技術を用いてヒト体内で起こるさまざまなプロセスを模倣する臓器モデルを開発する研究が世界的に注目されはじめている。マイクロチップを用いた腎臓のモデル開発としては、人体組み込み型の人工透析用腎小体モデルや、腎毒性のアッセイのための尿細管モデルなどが多く研究されている。しかし、腎排泄の過程を模倣したチップで効率的にアッセイを実現した研究や腎分泌のプロセスに着目したものは非常に少ない。

以上の背景を踏まえ、本論文は、糸球体の排泄過程をより実用的なアッセイに応用するためのマイクロチップの開発、さらに糸球体ろ過と腎分泌を組み合わせた腎排泄過程を模倣したマイクロシステムの開発について述べたものである。

【第 1 章】

序論として、これまでの当該分野の研究背景と本論文の目的を明確にした。

【第 2 章】

本論文で用いた実験材料と方法についてまとめて記載した。

【第 3 章】

溶液を循環させるマイクロポンプ、糸球体ろ過を模倣して分子量分画を行う透析部、薬剤の標的細胞を培養する培養槽とそれらをつなぐ循環流路から成るマイクロ糸球体ろ過モデルを設計・試作した。より実用的で効率的なアッセイを実現するため、1枚のチップ内に糸球体モデルを3ユニット集積化したモデルを開発した。マイクロポンプを改良することで、3ユニットを並列循環させ、 $0.3\sim 7.4\ \mu\text{L/h}$ の幅広い範囲での流速制御を実現することで、実験の効率化に成功した。高分子モデル化合物（FITC-アルブミン）、低分子モデル化合物（フルオレセイン）を循環流路内で循環させる事により透析実験を行ったところ、低分子化合物のみが循環流路内から再現良く排泄される結果が得られ、並列化による実験の効率化と低分子化合物排泄の計測に成功した。

開発したモデルを用いて血漿タンパク質結合性の異なる抗がん剤のバイオアッセイを行った。血漿タンパク質非結合型薬剤であるチオテパ、もしくは血漿タンパク質結合型薬剤であるドセタキセルを流路内で36時間循環させ、Live/Dead染色による死細胞率を基に抗がん活性を評価した。その結果、ドセタキセルでは死細胞率が高く、チオテパでは死細胞率が低くなり、各抗がん剤の性質に一致した結果が得られた。また、再現性は従来のモデルよりも高く、実用的で効率的なバイオアッセイを実現したと結論した。

【第 4 章】

開発した糸球体モデルについて排泄速度を求め、人体での排泄速度との比較を行った。その結果、速度の向上が必要であることがわかり、透析膜面積を拡大した蛇行式流路を新たに開発し、排泄速度の向上を実現した。

【第 5 章】

糸球体を模倣した透析部に加え、尿細管における腎分泌を模倣した分泌部を備えたモデルを開発した。分泌部には P-gp の発現が良好に確認されている Caco-2 細胞を尿細管のモデル細胞として用い、分泌部のメンブレンフィルター裏面に18日間培養した。その後、P-gp の基質のローダミン 123 (Rh123)、もしくは Rh123 に P-gp の阻害剤であるキノジンを添加した試料を高分子のローダミンデキストランと共に循環させ、循環流路と透析流路で濃度変化を測定した。その結果、循環流路では低分子の Rh123 のみ徐々に排泄流路へと排泄された。また、透析流路では Rh123 が分泌部通過後に濃度が上昇し、阻害剤の有無で有意

差が得られた。この事から、従来の糸球体ろ過モデルに加えて、腎分泌を受ける物質を選択的に排泄する分泌部を備えたモデルの開発に成功したと結論した。

【第6章】

本研究の成果について総合考察を記した。本論文では糸球体の排泄過程を模倣したモデルでのバイオアッセイの効率化と、糸球体ろ過と腎分泌を組み合わせたマイクロ腎排泄モデルの開発を実現した。糸球体を模倣した集積化モデルでの抗がん剤試験では、体内での薬剤濃度の減衰を考慮した高度なバイオアッセイを実現でき、従来のモデルと比べて再現性の向上や大幅な効率化に成功した。マイクロ腎排泄モデルの開発では、糸球体ろ過と腎分泌の2つの過程を組み合わせたマイクロモデルの概念実証に成功した。このモデルは腎分泌を受ける薬剤の相互作用の解析や、様々な薬剤のバイオアッセイに応用できる事が期待される。

学 位 論 文 の 要 旨 (英 訳)

Title Development of a micro renal excretion model mimicking functions of glomerulus and renal tubule

(糸球体及び尿細管の機能を模倣したマイクロ腎排泄モデルの開発)

Name Yu Sakuta 印

In drug development, excretion in the kidney is a very important process because the process strongly influences efficacy and side effects of drugs. In the renal excretion of drugs, drugs weakly bound to plasma proteins are excreted by the glomerular filtration, while drugs strongly bound to plasma proteins are not excreted. In the renal tubule, some drugs that are substrates of transporters (e.g. P-glycoproteins (P-gp)) are secreted from the peritubular capillaries to the renal tubule and the process is known as a tubular secretion. Therefore, analysis of plasma protein binding rates and transport rates mediated by the transporters are important for drug development.

Although the excretion processes of drugs in the kidney have been conventionally estimated mainly with whole animals or animal kidney slices, animal experiments have been reduced because of cost and species difference between test animals and human. A microchip-based organ model, named organ-on-a-chip or human-on-a-chip, which mimics microenvironment of the human organs and pharmacokinetic processes in the human body, is expected as a novel assay tool that is substitute for a part of animal experiments.

While several microchip-based kidney models have been reported so far, most models were artificial kidneys for implantation or disease models of the renal tubule, and then kidney models for excretion assay to estimate drugs residence time have not been reported. Additionally, renal secretion models have not been developed even though the renal secretion is a very important process for understanding drug excretion.

In this thesis, development of a micro kidney model for efficient excretion assay mimicking the glomerular filtration is described. Moreover, improvement of a micro kidney model combining the glomerular filtration and tubular secretion processes is also described.

Chapter 1.

Background and aim of this work are described as introduction.

Chapter 2.

Materials and methods used in this work are summarized.

Chapter 3.

A micro glomerular model, which is consisted of a peristaltic micropump, a circulation channel, a dialysis component mimicking the glomerular filtration and a cell culture chamber, was designed and fabricated. To realize efficient and practical bioassay with the model, an integrated micro glomerular filtration model comprised of three units of the micro glomerular model was developed. A modified micropump realized a control of flow rates in three channels at 0.3 - 7.4 $\mu\text{L}/\text{min}$. A macromolecule (FITC-albumin) or a small compound (fluorescein) was circulated in the circulation channel. Fluorescein was reproducibly separated from albumin at the dialysis components in parallel. Efficient dialysis and monitoring of the excretion process were realized.

Anticancer drugs having different plasma protein binding rates were tested with the integrated model. Thio-TEPA, which is weakly bound to plasma proteins, and Docetaxel, which is strongly bound to plasma proteins, was circulated in the circulation channel for 36 h and then anticancer activities were evaluated by measurement of cell death rates in the cell culture chambers based on Live/Dead staining. In case of Thio-TEPA, the cell death rates were low, while Docetaxel showed high cell death rates. These results reflected both plasma protein-binding nature and bioactivity of the drugs.

Chapter 4.

The excretion rate of the glomerular model was measured and then compared with that of the human body. To increase the excretion rate, a meandered microchamber was developed to enlarge the dialysis area.

Chapter 5.

The A micro kidney model in which a secretion component was added to the glomerular model was developed. Caco-2 cells expressing a transporter, P-gp, were cultured on a porous membrane in the excretion channel for 18 days. A macromolecule, tetramethylrhodamine isothiocyanate dextran, P-gp substrate, Rhodamine 123 (Rh123), or Rh123 with a P-gp inhibitor, quinidine sulfate was circulated in the circulation channel. As a result, only Rh123 were excreted from the circulation channel. And concentration of Rh123 were

increased after passing the secretion component. In addition, significant difference was obtained with and without addition of inhibitor. From these results, I conclude that the kidney model mimicking the glomerular filtration and the tubular secretion was successfully developed.

Chapter 6.

The thesis is summarized. The efficient bioassay with the integrated glomerular filtration model and development of the micro kidney model combining the glomerular filtration and tubular secretion were realized. In the glomerular model, anticancer tests taking the renal excretion into consideration was realized and the model was more efficient and reproducible than the previous model. The micro kidney model having glomerular filtration and the tubular secretion components was realized as a proof of concept. These models have potential to be applied to drug interaction analysis and more complex bioassays.