

經典文獻「Nat. Biomed. Eng.」 Emulate器官晶片重建腎小球- 毛細血管壁結構和功能

nature
biomedical engineering

ARTICLES

PUBLISHED: 10 MAY 2017 | VOLUME: 1 | ARTICLE NUMBER: 0069

Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip

Samira Musah^{1,2,3}, Akiko Mammoto⁴, Thomas C. Ferrante¹, Sauveur S. F. Jeanty¹, Mariko Hirano-Kobayashi^{1,4}, Tadanori Mammoto⁴, Kristen Roberts¹, Seyoon Chung¹, Richard Novak¹, Miles Ingram¹, Tohid Fatanat-Didar¹, Sandeep Koshy¹, James A. Weaver¹, George M. Church^{1,2,3} and Donald E. Ingber^{1,3,4,5*}

Emulate器官芯片

主要亮點

1. 傳統方法難以構建腎小球的典型表型

- 腎小球是血液過濾的主要器官，其體外模型可促進藥物發現並闡明腎臟疾病的機理。器官晶片技術已被用於建立人類近端腎小管模型，但由於缺乏功能性足細胞（podocyte）（即腎小囊壁層上皮細胞，負責調節腎小球選擇性通透性的濾過屏障），還無法建立腎小球晶片模型。
- 如果能開發出再現人類腎小球功能的體外模型，將大大有助於加深我們對腎臟發育機制的理解，並促進疾病模型的建立，從而指導治療方法的發現。遺憾的是，由於缺乏功能性人類腎臟足細胞，人類腎小球體外模型的開發工作一直受阻。

2. Emulate器官晶片技術重現腎小球-毛細血管壁結構和功能

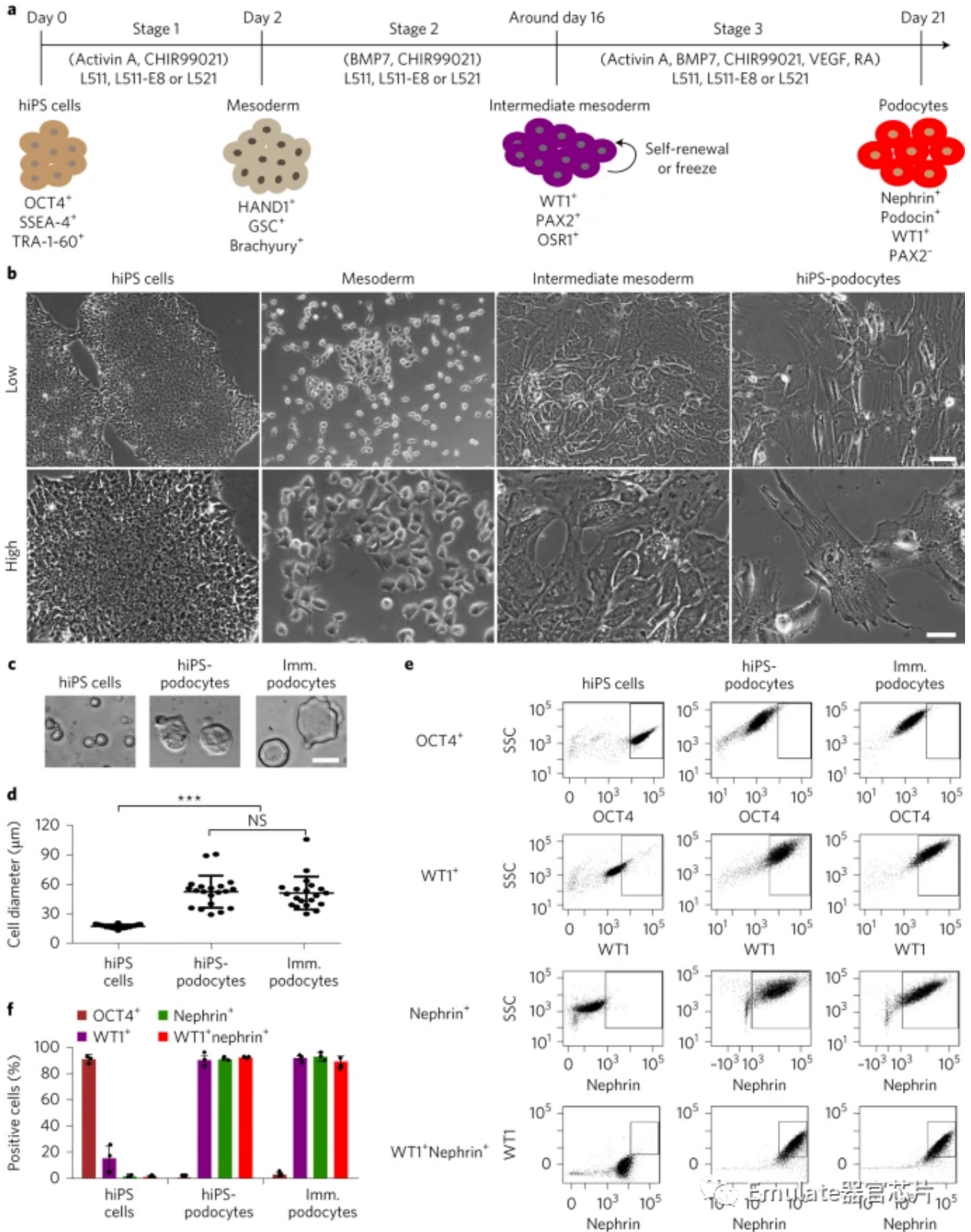
- 本研究中，Emulate學術創始人，哈佛大學WYSS研究所Donald E. Ingber院士團隊開發了一種高效（超過 90%）且化學定義明確的方法，用於誘導iPSCs分化成足細胞，這些細胞表達成熟表型的標記，並表現出初級和次級足過程。當iPSCs分化的足細胞與人類腎小球內皮細胞在Emulate器官晶片中共同培養時，它們能產生腎小球基底膜
- 膠原蛋白，並再現腎小球的天然組織-組織介面，以及白蛋白和菊粉的不同清除率。腎臟晶片還能類比阿黴素誘導的白蛋白尿和足細胞損傷。這種具有成熟人類足細胞的體外人類腎小球功能模型可促進藥物開發和個性化醫療應用。

腎小球是腎臟最基本的功能單元之一，迴圈血液通過腎小球毛細血管網過濾成尿液。腎小球毛細血管由內皮細胞襯裡並由足細胞包裹，足細胞是一種高度分化的上皮細胞類型，通過調節分隔血液和尿液空間的毛細血管壁的選擇性過濾，構成腎臟過濾屏障的主要部分。事實上，大多數獲得性和遺傳性腎小球疾病以及某些藥物中毒的特點都是足細胞喪失或功能障礙，從而導致蛋白尿和腎小球變性。如果能開發出再現人類腎小球功能的體外模型，將大大有助於加深我們對腎臟發育機制的理解，並促進疾病模型的建立，從而指導治療方法的發現。遺憾的是，由於缺乏功能性人類腎臟足細胞，人類腎小球體外模型的開發工作一直受阻。

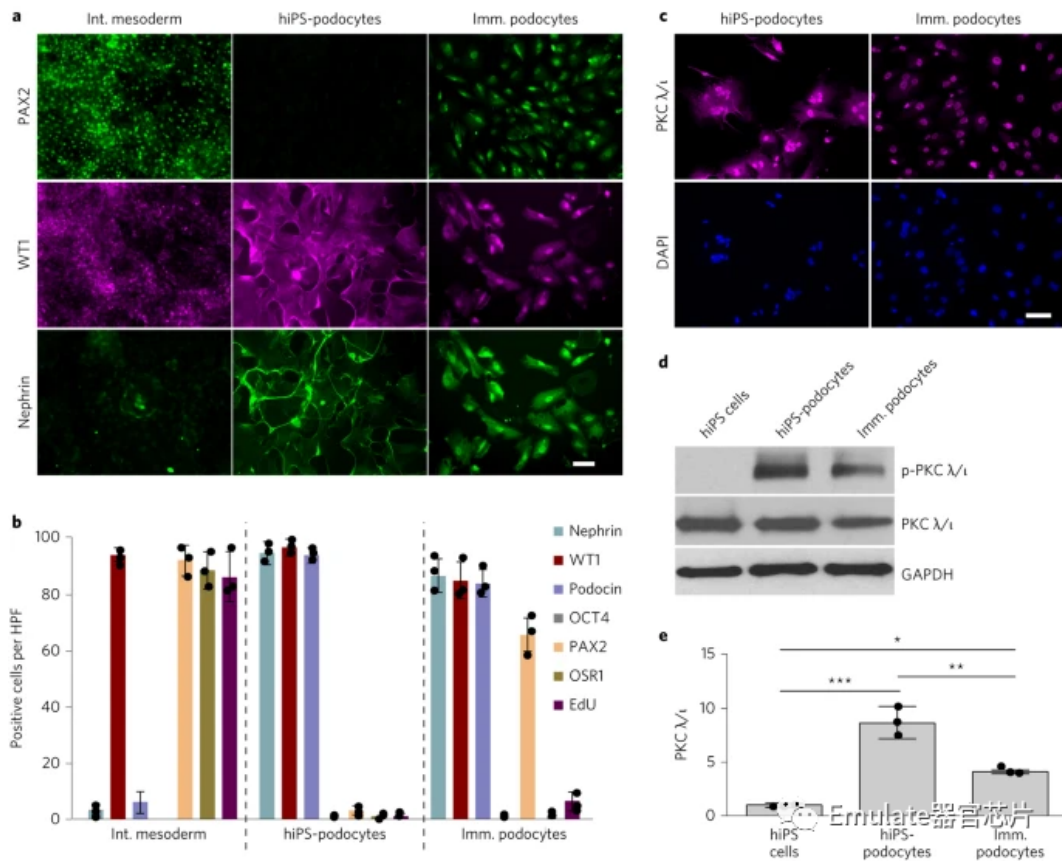
iPS細胞具有無限自我更新和在適當條件下分化成幾乎任何細胞類型的卓越能力。事實上，從iPS細胞中誘導成足細胞的嘗試越來越多。然而，將其特異性分化為足細胞（不含其他細胞類型）的高效方法仍然未知。以前從 iPS 細胞中提取足細胞的嘗試都依賴於通過胚狀體形成或與動物組織和血清成分共培養進行非特異性分化。但胚狀體分化法產生的細胞會同時分化成多個系，因此異質性高、可重複性差，而且無法產生與其他細胞類型分離的成熟足細胞。器官組織是研究組織分化的另一種重要方法，它也是由腎小球樣祖細胞形成的。雖然這種方法值得注意，但它在複製腎小球特異性功能方面有局限性，原因可能是未成熟的腎小球樣細胞數量少，而且存在高度異質性的細胞群，包括非腎小球衍生物。除了缺乏細胞系特異性外，腎臟器官組織對組織結構和功能的控制也很有限，無法形成腎小球濾過研究所需的功能性內皮襯裡血管回路。因此，目前仍不清楚細胞微環境中的哪些信號對足細胞系的分化和成熟有特異性作用，因此仍沒有純淨的成熟、功能性腎小球足細胞群可用來開發人類腎小球功能的體外模型。

本研究中，我們展示了同時調節幾種與腎小球發育有關的信號通路，能使 hiPS 細胞衍生物快速有效地轉化為終末分化細胞，這些細胞表現出成熟腎小球足細胞的形態、分子和功能特徵。通過Emulate器官晶片技術將 hiPS 細胞衍生的足細胞與一層人腎小球內皮共培養，我們還開發出了腎小球晶片模型，能類比腎小球毛細血管壁的組織-組織介面和分子過濾特性，並在體外再現藥物誘導的足細胞損傷和蛋白尿。這種人體腎小球晶片可為體外研究腎小球功能、腎毒性和腎病機制提供一種新方法。

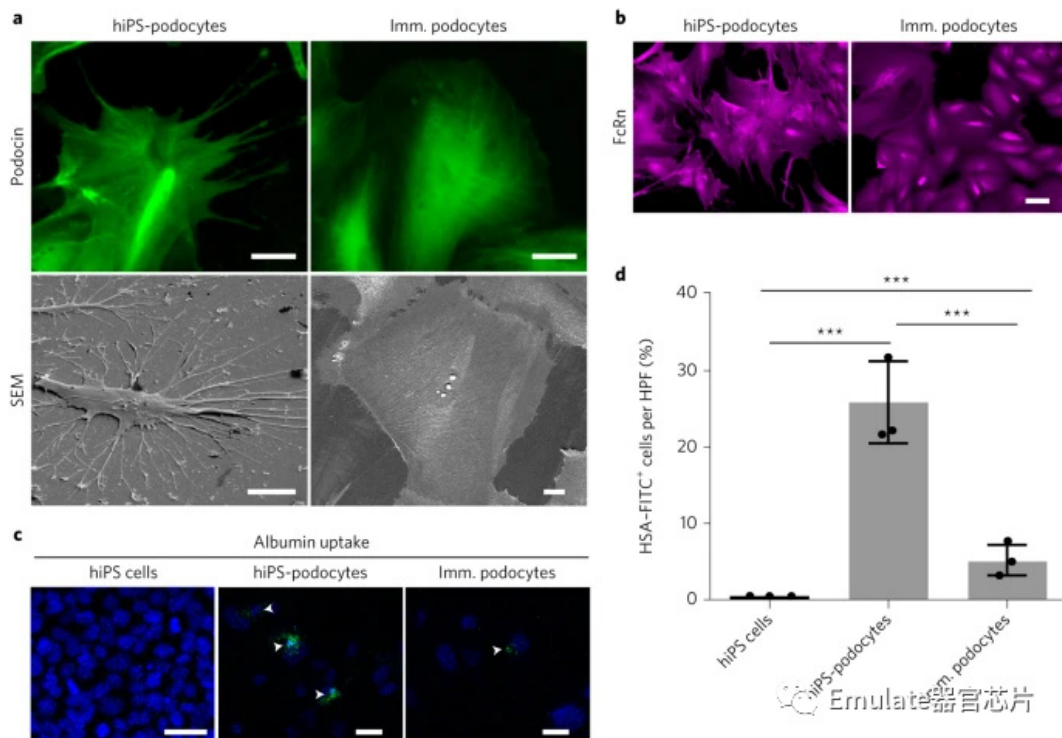
iPS 細胞中高效屏分化出腎臟足細胞



iPS 來源的腎臟足細胞表達成熟表型的特徵標記

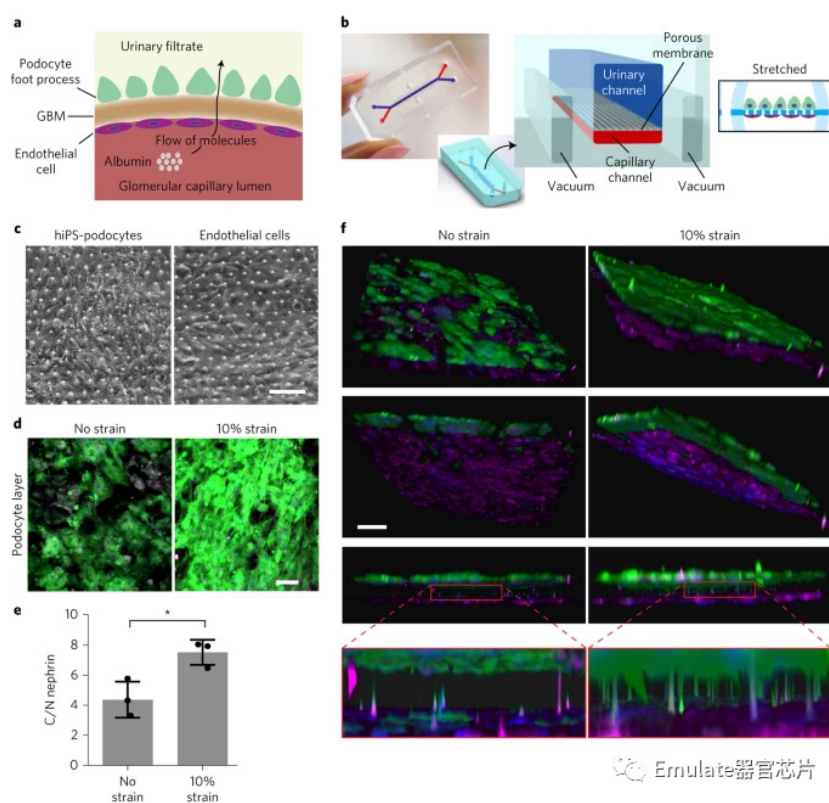


iPS 來源的腎臟足細胞表現出初級和次級細胞過程



與所有活體器官一樣，腎臟的腎小球功能對器官生理和腎病進展的影響對局部組織微環境中的多種因素高度敏感。這些因素包括組織與組織之間的相互作用（如足細胞與血管內皮之間）、細胞與細胞間質之間的相互作用（與中間的 GBM），以及腎小球血流和尿流產生的週期性機械力和剪切應力。由於傳統的組織培養方法無法再現腎小球的結構和功能特徵，因此對膜生物學和腎臟疾病機制的系統級分析主要依賴於動物實驗。然而，動物實驗的結果往往不能再現人體的生理反應。因此，人們開發了器官晶片培養模型，該模型能更好地類比人體器官的功能單元，具有器官級結構和微環境，包括組織與組織（如上皮-內皮）介面、流體流動以及肺和腸道中觀察到的週期性機械變形。**Emulate已經成功搭建了人類腎臟近端小管晶片**，它再現了活體近端小管的多種功能，但由於缺乏功能性人類足細胞，還無法開發人類腎小球模型。因此，我們研究了使用上述方法從iPS 細胞定向誘導分化形成的足細胞是否可用於設計人體腎小球毛細血管壁的體外功能模型，如果可以，我們是否可以使用這種人體腎小球晶片在體外分析人體足細胞的功能及其對微環境線索和腎毒性藥物的敏感性。

我們利用之前發表的**Emulate器官晶片製造方案**再現了人體腎小球毛細血管壁三維橫截面的結構、功能和機械特性（圖4a）。該晶片由柔性聚二甲基矽氧烷（PDMS）彈性體組成，包含兩個緊密相對的平行微通道（分別為頂部和底部通道），中間由層粘蛋白包被的多孔柔性PDMS膜隔開（膜厚 $50\mu\text{m}$ ，孔徑 $7\mu\text{m}$ ，間距 $40\mu\text{m}$ ）。我們的目標是在覆有層粘蛋白的膜頂部培養來源於 hiPS 細胞的足細胞，並在同一膜的另一側培養原代人類腎小球內皮細胞，以再現足細胞-GBM-內皮介面，並分別類比腎小球的尿液區和毛細血管區（圖 4b）。為了模擬在活體腎小球中觀察到的因腎血流週期性脈動而產生的動態機械應變，我們還在中央微流控通道兩側加入了兩個中空腔室（圖 4b），並施加週期性抽吸（1 Hz，-85 kPa）以產生週期性拉伸（10%應變）以及層粘連柔性膜和粘附細胞層的鬆弛，就像之前在其他機械活動器官晶片上所做的那樣⁴⁵。

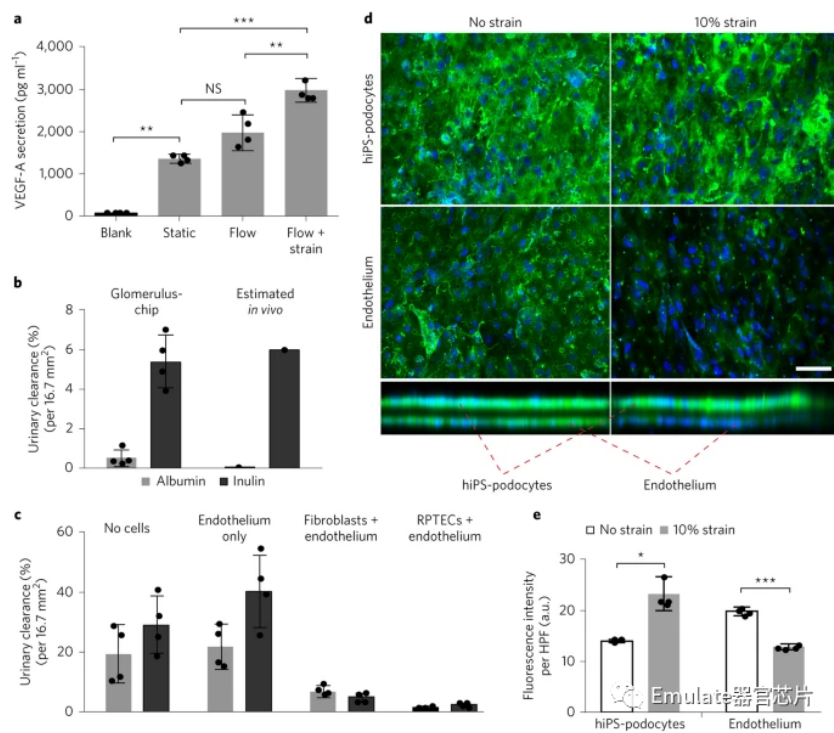


為了形成分化的足細胞層，我們將源自 hiPS 細胞的中間中胚層細胞播種到裝置的頂部通道中，並在有或無液體流動的情況下，或在液體流動和迴圈機械應變相結合的情況下，使用足細胞誘導分化培養基原位分化足細胞，以模擬生理條件。值得注意的是，與靜態對照培養的細胞相比，在液流或液流與機械應變相結合的條件下分化的細胞擴散程度更高，細胞質腎素的表達水準也更高。無論單獨培養 ($P < 0.05$) 還是在有腎小球內皮細胞存在的情況下培養 ($P < 0.0001$)，**施加週期性機械應變也會顯著提高已分化的 hiPS 細胞衍生足細胞中腎素的表達水準**，這表明機械力可以通過提高系特異性標記物的表達來影響足細胞的分化。此外，根據乳酸脫氫酶 (LDH) 低水準釋放的維持情況，這些細胞在器官晶片中培養至少兩周後仍可存活。這些結果表明，在晶片上誘導 hiPS 細胞衍生的細胞分化為腎小球足細胞是可行的，而且這些細胞在培養過程中可保持較長時間的活力，這使得腎小球器官晶片在未來可用于患者特異性分析。

我們在Emulate器官晶片上再現了人類腎小球毛細血管壁的組織-組織介面，將原代腎小球內皮細胞播種到下層通道，並在上層通道誘導來源於 hiPS 細胞的足細胞分化。足細胞誘導分化培養基通過微流控晶片的上部通道灌注，內襯是 hiPS 細胞衍生的足細胞，而標準內皮培養基則通過下部血管通道灌注，內襯是腎小球內皮細胞 (圖 4c)。在微流控裝置中培養八天后，我們發現在流體剪切應力 (頂部和底部通道分別為 0.0007 和 $0.017 \text{ dyn cm}^{-2}$) 和 10% 迴圈應變 (1 Hz) 作用下分化的 hiPS 細胞衍生的足細胞表現出顯著的 ($P < 0.0001$) 細胞腎素染色強度增加 (圖 4d)，並且與僅在流體流動下分化的 hiPS 細胞衍生足相比，細胞質與細胞核的腎素染色比率更高 ($P < 0.05$) (圖 4e)，這再次表明足細胞成熟度更高。

值得注意的是，共聚焦免疫螢光顯微鏡分析表明，在單獨的液流條件下培養時，源於 hiPS 細胞的足細胞和腎小球內皮細胞仍留在層粘連膜相對表面的各自通道中，而組織-組織介面的週期性拉伸與液流相結合，導致足細胞突觸數量顯著增加，這些突觸穿過膜上的孔隙，與內皮的層粘連基底 (腔底) 表面形成接觸 (圖 4f)。這與在體內完整腎小球組織中觀察到的情況類似。

我們還發現，在Emulate器官晶片中分化的 hiPS 細胞衍生的足細胞會分泌 VEGF-A (圖 5a)。值得注意的是，在生理機械應變下培養的 hiPS 細胞衍生足細胞與在活體腎臟⁴³ 中觀察到的應變類似，與僅在靜態或液流條件下培養的足細胞相比，分泌的 VEGF-A 水準顯著增加。眾所周知，足細胞分泌的 VEGF-A 是體內腎小球血管形態和發育所必需的，因此生理週期性變形可能也有助於控制胚胎腎臟的這種反應，Emulate腎小球器官晶片技術有助於未來針對這一假設進行研究。

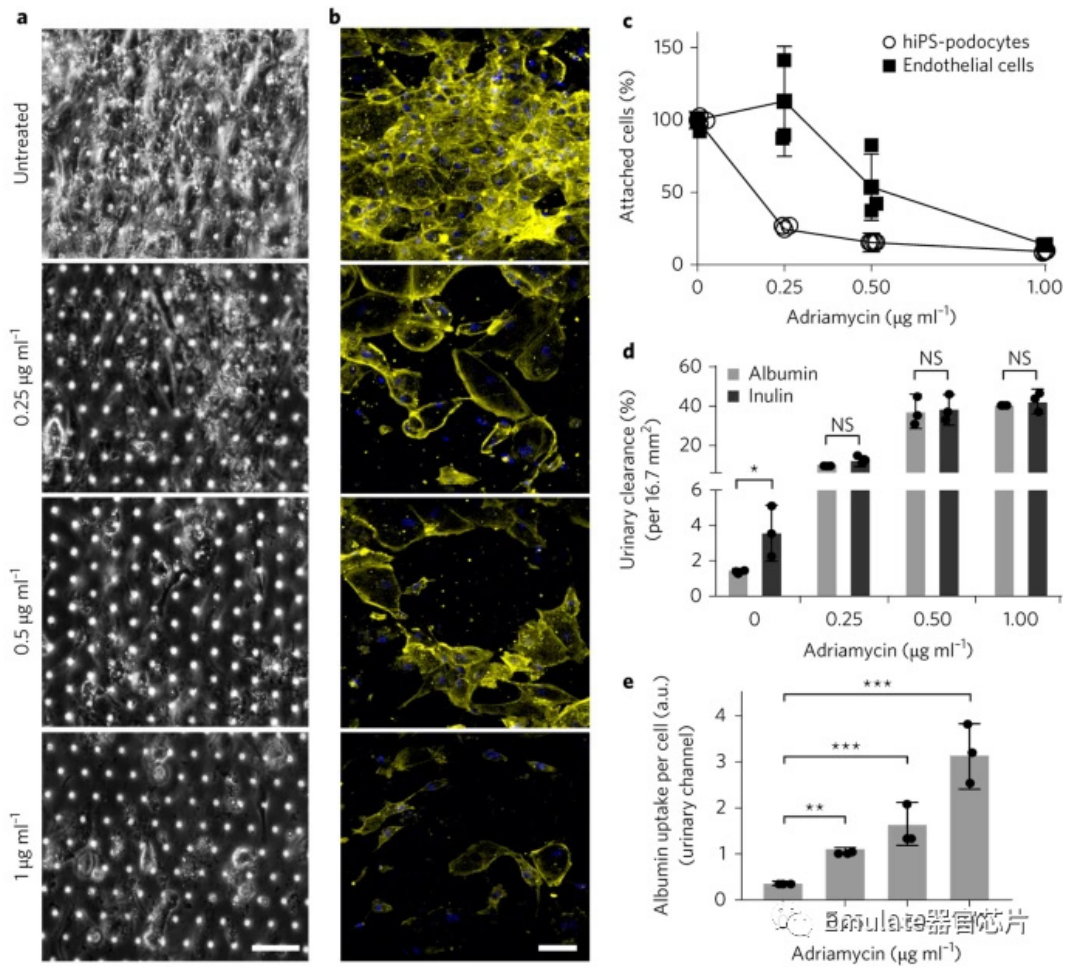


總之，這些結果表明，在生理流體流動和迴圈機械應變的條件下，在Emulate器官晶片中共同培養來源於 hiPS 細胞的足細胞和人類腎小球內皮細胞，可以形成器官級結構，這種結構與腎小球毛細血管壁的正常組織-組織介面非常相似，而以前使用傳統的細胞培養模型無法再現這種介面。鑒於我們有能力在晶片上類比人類腎小球的活體部分，我們隨後探討了Emulate器官晶片是否也能重建腎臟的關鍵功能，如腎小球濾過屏障，它限制了大分子（如白蛋白）的通透性，但能自由過濾血漿中的外源性小分子（如菊粉）。由於腎小球在每個心動週期都會發生週期性機械變形，因此我們在對微流控人體腎小球晶片施加週期性應變（10%，1 Hz）的同時進行了這些過濾研究。我們發現，即使通過晶片腎小球的微血管通道連續灌流 6 小時後，99% 以上的白蛋白仍被保留在毛細血管通道中，而大約 5%的菊粉（根據多孔膜的表面積與體內腎小球毛細血管的表面積之比，預計最大效率為 6%）被過濾到了尿液通道中（圖 5b）。

更重要的是，當我們將成纖維細胞或腎近曲小管上皮細胞與腎小球內皮細胞（即替代足細胞）共培養時，或者當我們使用僅有腎小球內皮細胞襯裡的晶片或沒有任何附著細胞的ECM 塗層晶片時，菊粉和白蛋白的清除率並沒有出現這種差異（圖 5c）。我們還觀察到，內襯僅有 hiPS 細胞衍生足的晶片（圖 6b，對照組）沒有形成緊密的單層，對白蛋白和菊粉的分子過濾只有適度的選擇性（未顯示）。因此，通過共同培養 hiPS 細胞衍生的足細胞和原代人類腎小球內皮細胞而創建的腎小球晶片特異性地類比了體外功能性腎小球的正常過濾屏障，至少在白蛋白和菊粉的差異清除方面是如此。

在腎臟發育過程中，GBM 的合成量大幅增加，足細胞和腎小球內皮細胞都對 GBM 的組成做出了貢獻。IV型膠原是 GBM 的主要成分，雖然在腎小球生成的早期階段，足細胞和內皮細胞都會產生IV型膠原，但在完全成熟的 GBM 中，IV型膠原主要由腎小球足細胞產生。因此，GBM 的分子組成和不同類型細胞的貢獻與腎小球的發育狀況相關。因此，我們研究了在微流控晶片上培養的 hiPS 細胞衍生的足細胞和腎小球內皮細胞是否會產生 IV 型膠原蛋白。這些研究發現，雖然微流控裝置內襯的兩種細胞類型都會沉積膠原蛋白 IV 型（圖 5d），但在生理相關機械應變下培養的Emulate器官晶片中，主要是 hiPS 細胞衍生的足細胞產生膠原蛋白 IV 型（圖 5d,e），這種微流控晶片也表現出類似腎小球毛細血管的活體分子清除特性（圖 5b）。這些結果進一步強調了機械拉伸力在腎小球發育過程中的重要性，並提示了機械拉伸在控制腎細胞特異性反應中的潛在作用。這些發現還表明，生理機械應變是建立模擬器官晶片的關鍵條件。

Emulate 腎絲球晶片模擬阿黴素誘導的腎絲球損傷



鑒於能近似模擬人類腎小球功能和疾病狀態的體外模型有限，我們探討了襯有 hiPS 細胞衍生的足和腎小球內皮細胞的微流控腎小球晶片能否類比腎損傷狀態。為了驗證這一點，我們將腎小球晶片暴露在抗癌藥物阿黴素（又稱多柔比星）中，通過內襯血管通道持續輸注，就像病人靜脈注射一樣。顯微成像顯示，尿道中的足細胞層和細胞脫落呈劑量依賴性破壞（圖6a）。類磷脂染色細胞的定量證實，阿黴素處理過的足細胞與分隔泌尿道和血管的柔性 ECM 包膜有明顯的劑量依賴性脫落（圖6b、c），這與使用 CCK-8 細胞毒性測定法確定的細胞活力下降有關（補充圖12a）。值得注意的是，在臨床相關濃度 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 和較低劑量 (0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) 下都觀察到了明顯的足細胞分層現象（圖6b、c），剩餘的粘附足細胞表現出正常伸長細胞過程的回縮（補充圖 12b）。

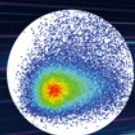
與這一觀察結果一致的是，經阿黴素處理的腎小球晶片顯示白蛋白從血管通道大量流失，進入尿液區的白蛋白增加（圖6d），這與阿黴素誘導體內足細胞損傷時觀察到的情況一樣。此外，阿黴素誘導的白蛋白通過腎小球濾過屏障的非選擇性滲漏導致 hiPS 細胞衍生足細胞對白蛋白的吸收增加（圖6e）。這些結果表明，本研究開發的微流控人體腎小球晶片類比了腎小球毛細血管壁的發育、功能和疾病表現。

關於 Emulate

器官晶片的開創性工作是由哈佛大學 WYSS 研究所的系主任 Donald E. Ingber 院士團隊完成的，其在 *Science* 發表了器官晶片領域具有里程碑意義的第一個成功的模型：肺晶片。之後，Donald E. Ingber 院士作為共同創始人，成立了 Emulate 公司，將器官晶片技術商業化運行，與更廣泛的生命科學界同仁分享這一精妙的器官晶片技術。自成立以來，我們致力於開發高度類比人體生理特徵的器官晶片技術和不同類型的創新應用，以全面瞭解疾病發生規律和幫助評估藥物的真實反應，改善人類健康。目前，Emulate 提供經過驗證的肝、腎、十二指腸、結腸、肺、腦等器官晶片解決方案的同時支援客戶定制化的研究需求，是全球市場佔有率領先的器官晶片品牌。全球系統裝機量超過 400 台，已經被全球排名前 20 的藥企全部合作引入，採用 Emulate 人體模擬系統發表的文章數已超過 100 篇，在同類產品中大幅領先。Emulate 相信，人類生物學和器官晶片技術的結合能夠點燃人類健康的新時代。

THE FUTURE LAB | FUTURE CMC

進階與您一同邁入新未來



Multi-color Flow



Confocal Live Image



Energy Metabolism



Bioreactor



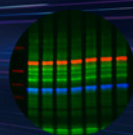
Organ Chip



Digital PCR



Multiplex Assay



IP Western



進階生物科技股份有限公司

台北總公司 02-26959935

免付費專線 0800251302

傳真 02-26958373

www.level.com.tw



進階官網



FB 粉絲團