

令和 元年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05906

研究課題名(和文)3-in-1生体模擬チップによる細胞群の挙動制御

研究課題名(英文)Control of Cellular Responses with 3-in-1 Chip Mimicking In Vivo Microenvironment

研究代表者

船本 健一 (Funamoto, Kenichi)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：70451630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸素分圧・力学的刺激・化学的刺激的3つの因子を同時制御し、細胞群に対する複合作用の観察を可能にする3-in-1生体模擬チップを開発した。チップ内のガス流路に酸素濃度を調整した混合ガスを供給することで、酸素濃度0.3%までの一様な酸素状態や酸素濃度勾配を15分以内に生成することが可能になった。がん微小環境を研究対象として、ヒト乳がん細胞をコラーゲンゲルに混合し、開発したチップ内のゲル流路に配置して挙動を観察した。乳がん細胞の増殖率と遊走速度は低酸素状態において増加した。また、血管内皮細胞との共存培養下では、細胞間の相互作用により乳がん細胞の挙動の酸素濃度依存性が変化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内は大気中と比較して低酸素状態にあるにも関わらず、簡便性の観点から多くの細胞実験は常酸素条件下で行われてきた。開発した3-in-1生体模擬チップは、細胞周囲の酸素分圧を任意の分布に短時間内に制御し、細胞に力学的刺激と化学的刺激を負荷することで生理的環境と病的環境の両方を再現でき、細胞群の即時的応答の観察を可能にした。本研究で実施したがんの増殖と転移の機序の解明の研究に限らず、血管新生や幹細胞の分化と増殖の制御、低酸素負荷が関係する循環器系疾患の予防法の確立における革新的な研究技術であり、重要な知見をもたらすと期待される。再生医療や薬剤の開発などの先進医療の発展にも寄与する技術である。

研究成果の概要(英文)：3-in-1 chip mimicking in vivo microenvironment was developed to simultaneously control oxygen tension and mechanical and chemical stimuli to cells. The microfluidic chip enabled to generate a uniform oxygen state down to 0.3% or a linear oxygen gradient within 15 minutes by supplying gas mixtures into the gas channels in the chip. Behavior of the human breast cancer cells suspended in type I collagen gel were then observed while controlling oxygen tension using the developed chip. As the results, it was revealed that the hypoxic environment promoted the proliferation and migration of the cancer cells. Moreover, the hypoxic response of breast cancer cells was changed by cell-cell interaction when co-cultured with vascular endothelial cells.

研究分野：生体工学、流体工学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織 生物・生体工学 流体工学 ナノバイオ マイクロ流体デバイス
がん微小環境 低酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の細胞は運動や血流による力学的刺激と生化学物質による化学的刺激を感知して応答する。その正常な機能が形態形成や生体恒常性の維持に寄与する一方、機能の破綻は生体の病的な状態を招く。また、生理的および病的状態のいずれの生体組織においてもみられる低酸素状態は、その組織を構成する細胞の力学的刺激と化学的刺激に対する応答に影響を与える。例えば、がん組織内部では細胞の過剰な増殖と未熟な血管網の形成により、酸素濃度の不均一な空間分布（空間変化）と数分間隔の急性の低酸素負荷と再酸素化（時間変化）が生じ、がん細胞の遊走と血管新生が活発化してがんの成長と転移が促進される。従って、生理現象の解明と疾患の治療技術の向上には、時空間変化する低酸素環境における力学的刺激と化学的刺激に対する細胞群の即時的な応答の解明と制御が必要である。最近では、環境変化で即座に発現を変える最初期遺伝子の環境応答への関与が示唆されているが、3次元性を加味した環境最適化に関する即時的な遺伝子発現の調節の機序は不明である。また、近年、細胞を3次元培養し、リアルタイムかつ高解像度の観察を可能にするマイクロ流体デバイスにより、力学的刺激や化学的刺激に対する細胞の応答を観察することが可能になった。研究代表者は、3次元培養した細胞周囲の酸素分圧を制御する低酸素マイクロ流体デバイスを世界に先駆けて開発し、デバイス内に設けたガス流路に酸素濃度を調整したガスを供給することで、酸素濃度3%までの一様な低酸素状態や酸素濃度勾配下における細胞観察を可能にした。実際に開発したデバイスを用いて細胞実験を行い、低酸素負荷により乳がん細胞（MDA-MB-231）の指向性のある遊走が促進されることと、血管内皮細胞（HUVEC）の単層の物質透過性が亢進することを個別の実験により示した。このような背景から、最初期遺伝子が大きく変化する低酸素負荷の時空間変化に焦点を当て、酸素分圧・力学的刺激・化学的刺激の3つの因子を同時制御する3-in-1生体模擬チップにより個々の細胞の即時的な応答と細胞間の相互作用を解明し、細胞群の制御法を確立する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、酸素分圧・力学的刺激・化学的刺激の3つの因子を同時制御し、細胞群に対する複合作用の観察を可能にする3-in-1生体模擬チップを開発する。開発したチップを用い、がん微小環境を研究対象として、酸素濃度の時空間的な変化により誘起されるがんの増殖と転移の機構を解明するための細胞実験を行う。チップ内でがん細胞を単一培養または血管内皮細胞と共存培養し、酸素分圧の時空間変化に対する細胞群の即時的な応答を解明する。そして、がんの治療において極めて重要な、がん細胞の遊走の抑制と血管内皮細胞による血管新生の抑制のための細胞群の挙動の制御法について検討する。

3. 研究の方法

(1) 3-in-1 生体模擬チップ

開発した3-in-1生体模擬チップの概略図を図1に示す。本チップ内には、細胞外マトリクスを模擬してハイドロゲルを配置するゲル流路（幅1,300 μm ）が底面の中央にあり、それを挟むように細胞培養液で満たすメディア流路（幅500 μm ）が存在する。デバイス内の酸素濃度はメディア流路の鉛直上方500 μm の位置にあるガス流路（幅1,000 μm ）に酸素濃度を調整した混合ガスを供給することにより制御する。デバイスは直径35 mm、高さ4 mmであり、いずれの流路の高さも150 μm である。また、チップ内には周囲環境からの酸素の拡散による流入の影響を防ぐ目的で、高さ1 mmの位置にポリカーボネートフィルムを内包している。本チップはポリジメチルシロキサン（PDMS, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, USA）を用いて作製した。PDMSの主剤と硬化剤を10:1の割合で混合し、メディア流路およびゲル流路の流路パターンとガス流路の流路パターンを積層した各シリコンウェハー上に、それぞれ厚さ0.5 mmとなるようにPDMSを注いだ。その後、シリコンウェハーを70°Cのオーブンに4時間以上静置してPDMSを硬化させた。ガス流路のPDMS層の上面には、各流路の出入口に合わせて穴を開けた直径32 mm、厚さ0.5 mmのポリカーボネートフィルムを設置後、さらに全体で厚さが3.5 mmとなるようにPDMSを追加し、オーブン内で硬化させた。各ウェハーからそれぞれのPDMS層を切り出した後、直径35 mmの円形に切り出した。ガス流路が転写されたPDMS層に対して流路にアクセスするための穴（直径2 mm）を開け、その流路が転写された面と、ゲル流路とメディア流路が転写されたPDMS層の流路が転写されていない面をプラズマ処理して接着させた。接着したPDMS層に対してゲル流路とメディア流路にアクセスするために、それぞれ直径1 mmと直径2 mmの穴を開け、カバーガラスと共にプラズマ処理して接着させた。その後、形成したゲル流路内にコラーゲンゲルを安定して配置できるように、ゲル流路とメディア流路に1 mg/mlのポリ-D-リジン（PDL, P7886, Sigma-Aldrich, USA）溶液を注入してコーティング処理を行った。

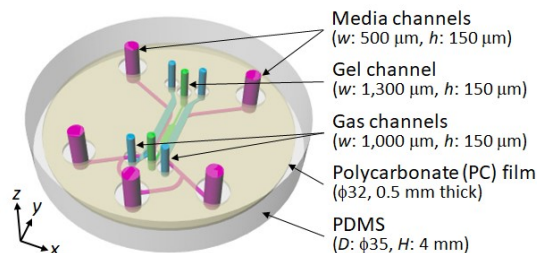


図1 3-in-1生体模擬チップの概観図。

(2) 検証実験方法

デバイス内の酸素濃度の計測には、酸素センシングビーズ (MitoImage MM2 Probe, Luxcel Biosciences, Ireland) を用いた。このマイクロビーズは、380-405 nm の波長の励起光 (UV 光) を照射することにより、430-450 nm の波長を有する青色の蛍光と、630-670 nm の波長を有する赤色の燐光を発する。蛍光は、励起光の強度や照射時間に応じて一定の強度を示すことから、光退色の有無や発光のゆらぎの指標となる。一方、赤色の燐光は酸素依存性があり、低酸素環境下では強く光る。酸素濃度に対する燐光強度はシュテルン-フォルマーの式により記述することができる。検証実験においては、酸素センシングビーズを 0.1 mg/ml の濃度で、1.5 mg/ml, pH 7.4 の I 型コラーゲン溶液 (354236, BD Bioscience, USA) に混合し、デバイス内のゲル流路内に注入した。インキュベーター (5% CO₂, 37°C) 内でコラーゲンゲルをゲル化させ、乾燥を防ぐためにメディア流路に細胞培養液を注入した後、インキュベーター内に一晚静置することでゲルを安定化させた。その後、スピニングディスク走査顕微鏡 (IX83-DSU, Olympus, Japan) に装着したステージインキュベーター (37°C) (INUBSF-ZILCS, TokaiHit, Japan) 内にデバイスを設置した。ステージインキュベーターとデバイスのガス流路に酸素濃度を調整した混合ガスを供給し、常酸素状態、低酸素状態、無酸素状態、酸素濃度勾配を生成し、酸素センシングビーズの蛍光と燐光の顕微鏡画像を取得した。まず、ステージインキュベーター内に二酸化炭素を 5% 含む空気を供給すると共に、ガス流路に酸素濃度 21% の混合ガス (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) を供給し、デバイス内に常酸素状態を生成した。その後、ガス流路に酸素濃度 0% の混合ガス (5% CO₂, 95% N₂) を供給してデバイス内に低酸素状態を生成した。さらに、ステージインキュベーターに供給するガスを無酸素の混合ガス (5% CO₂, 95% N₂) に変え、デバイス内に無酸素状態を生成した。最後に、ステージインキュベーターに二酸化炭素を 5% 含む空気を供給し、左右のガス流路にそれぞれ酸素濃度 0% と 21% の混合ガスを供給し、デバイス内に酸素濃度勾配を生成した。各酸素条件下において取得した顕微鏡画像に対し、ゲルを横断する方向を x 方向、ゲル流路に沿う方向を y 方向と定義し、ゲル流路を保持するために設置されている PDMS の柱を避けてゲル流路を横断する 1,024×50 pixel (1,331×65 μm) に関心領域を設けた。画像解析ソフトウェア (ImageJ, NIH, USA) を用いて関心領域における蛍光および燐光の強度を定量化し、酸素濃度 $c(x)$ を算出した。実験には 3 個のデバイスを用いた。

(3) 細胞実験方法

デバイス内のゲル流路にヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231/GFP cell line, AKR-201, Cell Biolabs, USA) をコラーゲンゲルに混ぜて配置し、ガス流路に混合ガスを供給することで酸素濃度を制御してタイムラプス観察を行った。乳がん細胞の培養にはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, D5671, Sigma-Aldrich, USA) に熱非働化済ウシ胎仔血清 (FBS, F7524, Sigma-Aldrich, USA) を体積割合で 10%、ペニシリン・ストレプトマイシン (G6784, Sigma-Aldrich, USA) を体積割合で 1% 添加した培養液を用いた。細胞はディッシュ上で培養し、コンフルエントの状態に達する前に回収して細胞懸濁液を作成した。1.5 mg/ml, pH 7.4 の I 型コラーゲン溶液に乳がん細胞を 2×10^5 個/ml の密度で混合し、ゲル流路に注入した後、インキュベーター内に 30 分間静置してコラーゲンをゲル化させた。その後、ゲル内の乳がん細胞の活動を活発化させるために、50 ng/ml の上皮成長因子を含む培養液 (以後、実験用培地と記す) をメディア流路に注入した。さらに、血管内皮細胞と共存培養させる場合は、2 時間後にデバイスをインキュベーターから取り出し、血管内皮細胞がメディア流路上に定着し易くなるように、メディア流路をマトリゲルでコーティングした。コーティングは氷上で行い、実験用培地を用いて 2.0 mg/ml の濃度に調整したマトリゲル溶液 (356230, CORNING, USA) をメディア流路に注入した後、実験用培地でメディア流路を 1 度洗浄し、デバイスをインキュベーター内に戻した。続いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, C2519A, Lonza, Switzerland) をディッシュ上から回収し、DMEM に熱非働化済 FBS を体積割合で 20%、ペニシリン・ストレプトマイシンを体積割合で 1%、ヒト塩基線維芽細胞増殖因子 (GF-030-3, AUSTRAL Biologicals, USA) を 10 μg/ml の濃度で添加した培養液 (以後、血管内皮細胞用培地と記す) を用いて密度 5.0×10^5 個/ml の細胞懸濁液を作成し、メディア流路に注入して播種した。インキュベーター内で 1 日間培養した後、培養液を実験用培地に交換し、スピニングディスク共焦点顕微鏡上のステージインキュベーター (5% CO₂, 37°C) 内にデバイスを設置した。デバイス内のガス流路に混合ガスを供給することで酸素状態を制御し、10 分毎に 24 時間、ゲル流路を鉛直方向に 2.1 μm 間隔でスライスした約 70 枚の共焦点顕微鏡画像と、ゲル流路の水平断面の位相差顕微鏡画像を 1 枚取得した。酸素条件には、酸素濃度 0.3% までの一様な酸素状態の条件、ゲル流路に酸素濃度 3% から 17% の線形の濃度勾配を生成した条件、8 時間毎に酸素濃度 21% と 0.3% の酸素状態を切り替える時間変化を有する条件を用いた。いずれの条件においても二酸化炭素濃度は 5% とした。実験終了時には、Live/Dead assay kit (R37601, Invitrogen, USA) を用いてデバイス内の細胞の生存率を計測した。また、顕微鏡画像中でゲル領域を横切る方向に 300 μm 毎に分割した 3 つの各領域において実験前後の細胞数を計測し、増加率を求めた。さらに、取得した時系列の顕微鏡画像に対し、画像解析ソフトウェア (MetaMorph, Molecular Devices, USA) を用いて細胞の 3 次元トラッキングを行い、各時刻の細胞の遊走距離を求めた。ここで、時系列の位相差画像に PIV (Particle Image Velocimetry) 解析を行って実験中に生じたデバイスのずれによる移動量を求め、細胞の遊走距離を補正した。実験は各酸素条件についてデバイスを 3-4 個用いて行った。

4. 研究成果

(1) 3-in-1 生体模擬チップの酸素濃度制御性能の検証実験結果

デバイス内に常酸素状態、低酸素状態、無酸素状態、酸素濃度勾配を生成し、定常状態に達したときのゲル流路内の酸素センシングビーズの燐光を図2に示す。各図において、複数の粒状の明るい点が分散しているのは、酸素ビーズの局所的な塊によるものである。また、酸素センシングビーズはコラーゲンゲルに吸着する性質があり、完全に均一に分散させることが困難であったため、PDMSの柱の近傍において局所的に濃度が薄くなっている箇所が観察された。燐光は酸素濃度に依存して変化し、常酸素状態において最も暗く、無酸素状態において最も明るい。酸素濃度勾配の結果においては、ゲル流路の左右で燐光の明るさに明確な差が表れた。このように、酸素依存性がある酸素センシングビーズの燐光は、酸素濃度が低い条件下において強度が上がることを確認できた。低酸素条件と酸素濃度勾配条件について、定常状態における酸素濃度分布を図3に示す。開発したデバイスにより、低酸素条件下では、0.3%の様な低酸素環境を生成することができた。また、左側のガス流路に酸素濃度0%の混合ガス、右側のガス流路に酸素濃度21%の混合ガスを供給した場合には、ゲル領域の内で3%から17%までの線形の酸素濃度勾配を生成することができた。これらの計測結果は別に行った数値解析結果と良く一致した。デバイス内の酸素濃度はガス流路に供給するガスを酸素濃度0%の混合ガスに切り替えた後に急激に減少し、15分後には酸素濃度0.3%の定常状態に達した。従来のデバイスでは、酸素濃度を3%未満にすることが困難であり、定常状態に達するまでに数時間を要していたのに対し、開発したチップでは酸素濃度のレベルと応答性の観点で酸素濃度制御性能が向上した。

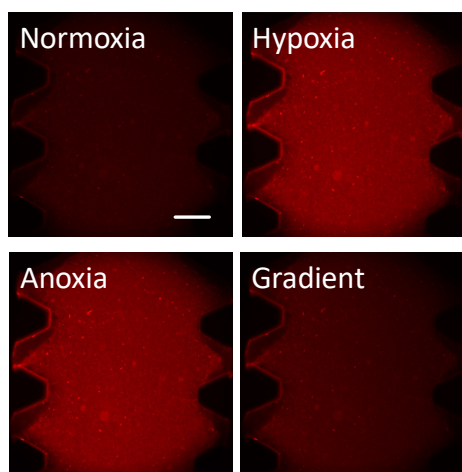


図2 酸素センシングビーズの燐光の顕微鏡画像。スケールバーは200 μm 。

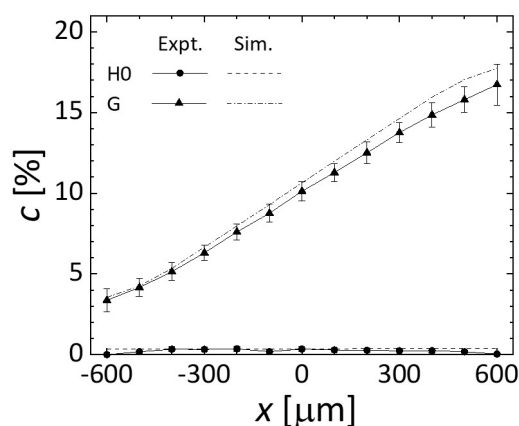


図3 ゲル流路に生成される酸素濃度分布。H0は酸素濃度0%の混合ガスを両側のガス流路に供給した場合、Gは左右のガス流路に酸素濃度0%と21%の混合ガスをそれぞれ供給した場合を示す。

(2) 乳がん細胞の挙動の酸素濃度依存性に関する実験結果

各酸素条件下の乳がん細胞をタイムラプス観察し、生存率や増加率、遊走速度を計測して評価した。乳がん細胞の生存率の酸素濃度に対する依存性は見られなかったが、増加率と遊走速度は低酸素状態において増加した(図4)。特に、酸素濃度5%の様な低酸素状態において増加率と遊走速度は極大値を示し、本研究における酸素条件のうち、この値が乳がん細胞にとって活動し易い酸素濃度であることが示唆された。様な酸素状態を生成した場合は、メディア流路に接するゲル流路の両側の領域において細胞数がより増加した。一方、デバイス内に酸素濃度勾配を生成した場合は、ゲル中央の領域において、細胞数がより増加する傾向が見られた。これは、酸素濃度勾配下における乳がん細胞の遊走方向の変化を反映していると考えられる。すなわち、乳がん細胞はゲル流路の低酸素状態に近い側(左側)から常酸素状態の方向(右側)へ遊走する傾向を示し、特に、ゲル流路中央付近に生成されたある酸素濃度の領域に向けて遊走したと考えられた。このことから、乳がん細胞は酸素濃度の空間変化を認識する能力があることが示唆された。酸素濃度を時間変化させた実験においては、デバイスに供給する混合ガスの酸素濃度の変化に伴って乳がん細胞の遊走速度が増減した。様な常酸素状態を保持した場合、遊走速度は徐々に減少した。これに対し、低酸素状態を保持した場合、遊走速度は一旦増加した後、12時間後以降に徐々に低下した。得られた結果から、乳がん細胞が周囲の酸素濃度を感知して応答するまでに数時間を要することと、周囲の酸素濃度に徐々に適応することが示唆された。

乳がん細胞を血管内皮細胞と共存培養して行った実験では、デバイス内に酸素濃度0.3%または5%の様な低酸素状態と常酸素状態(酸素濃度21%)を生成し、乳がん細胞の遊走を調べた。血管内皮細胞と共に乳がん細胞を培養することにより、常酸素状態における乳がん細胞の遊走速度は増加した。酸素濃度5%の低酸素状態においては、乳がん細胞を単一培養して行った実験結果と比較して遊走速度はほとんど変化しなかった。一方、酸素濃度0.3%の低酸素状態における乳がん細胞の遊走速度は血管内皮細胞と共存培養することで低下した。共存培養下で酸素濃

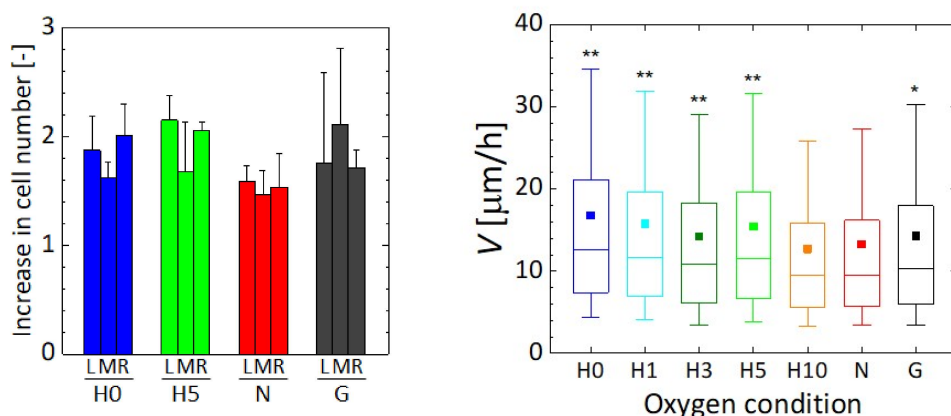


図4 各酸素条件における乳がん細胞の増加率と遊走速度. Hは低酸素条件, Nは常酸素条件, Gは酸素勾配条件を示し, 隣接する数字はガス流路に供給した混合ガス中の酸素濃度を示す. 左図中のL, M, Rはゲル流路を横断する方向に均等に分割したときの左側・中央・右側の領域内の結果であることを示す. 右図の箱ひげ図の上下端は90と10パーセントイル, 箱の上下端は75と25パーセントイル, 中央の線は中央値を表し, プロットは平均値を示す.

度 0.3%と 5%の低酸素状態を生成したときの乳がん細胞の平均遊走速度にはほとんど差がなかった。ここで、血管内皮細胞をメディア流路に培養した際のコラーゲンゲル内の酸素濃度を計測したが、共存培養による酸素濃度の減少は観察されなかった。すなわち、共存培養下において観察されたがん細胞の遊走速度の変化は、血管内皮細胞の酸素の消費に起因するものではないと考えられた。これらのことから、乳がん細胞と血管内皮細胞の共存培養下では、細胞間の相互作用により、乳がん細胞の挙動の酸素濃度依存性が変化することが明らかになった。

<引用文献>

- ① Kenichi Funamoto, Ioannis K. Zervantonakis, Yuchun Liu, Christopher J. Ochs, Choong Kim, Roger D. Kamm, A novel microfluidic platform for high-resolution imaging of a three-dimensional cell culture under a controlled hypoxic environment, Lab on a Chip, Vol. 12, No. 22, 2012, pp. 4855-4863

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yoshino Daisuke, Funamoto Kenichi, Oxygen-dependent contraction and degradation of the extracellular matrix mediated by interaction between tumor and endothelial cells, AIP Advances, 査読有, Vol. 9, 045215, 2019
DOI:10.1063/1.5089772

[学会発表] (計8件)

- ① 船本健一, 吉野大輔, がん微小環境チップによる酸素濃度制御下の細胞外マトリクスの変化の観察, 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会, 2018
- ② Yugo Tabata, Daisuke Yoshino, Kiyoe Funamoto, Rei Koens, Kenichi Funamoto, Influence of hypoxic environment on vascular endothelial cell migration, The 15th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2018), 2018
- ③ Rei Koens, Yugo Tabata, Daisuke Yoshino, Kenichi Funamoto, Breast cancer cell migration under controlled oxygen tensions, The 15th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2018), 2018
- ④ 田端優吾, 吉野大輔, 船本聖絵, コーエンズ礼, 船本健一, マイクロ流体デバイスを用いた酸素制御下の血管内皮細胞単層の遊走の評価, 日本機械学会第29回バイオフィロンティア講演会, 2018
- ⑤ コーエンズ礼, 田端優吾, 吉野大輔, Roger D. Kamm, 船本健一, 乳がん細胞の遊走と増殖の酸素依存性, 日本機械学会第29回バイオフィロンティア講演会, 2018
- ⑥ 船本健一, 地球の裏側で, 日本機械学会第29回バイオフィロンティア講演会, 2018
- ⑦ Kenichi Funamoto, Daisuke Yoshino, Microfluidic device for co-culture under controlled oxygen tension, The 3rd International Symposium on Mechanobiology (ISMB2017), 2017
- ⑧ コーエンズ礼, 田端優吾, 吉野大輔, Roger D. Kamm, 船本健一, 生体内低酸素環境を再現するマイクロ流体デバイスの酸素濃度制御性能の向上, 日本機械学会第28回バイオフィロンティア講演会, 2017

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：カム ロジャー
ローマ字氏名：(KAMM, Roger)

研究協力者氏名：吉野 大輔
ローマ字氏名：(YOSHINO, Daisuke)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。