

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12874

研究課題名(和文) 免疫再生治療に向けた胸腺模倣デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of a microfluidic device to mimic the function of the thymus for immunotherapy

研究代表者

鳥澤 勇介 (Torisawa, Yu-suke)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：10767354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞の分化・成熟に必要な臓器である胸腺の機能を模倣可能なシステムの開発を行った。ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)より誘導した血管内皮細胞をマイクロ流体デバイス内でゲルを用いて3次元的に培養を行うことで、管腔構造を有する機能的な血管網の作製に成功した。作製した血管網は細胞を灌流して培養することが可能であった。そこで、胸腺の構造を模倣して、3次元の細胞凝集塊に血管網を組み込んだシステムを構築した。これにより、ヒトiPS細胞由来の血管を介して3次元の細胞組織に血液細胞を灌流して培養することが可能となった。従って、胸腺に類似した組織構造を形成可能なデバイスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop a culture device to mimic the function of the thymus which is necessary to form functional T cells. Using human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived endothelial cells, we have successfully engineered a 3D vascular network in a hydrogel embedded within a microfluidic device. The engineered vascular network has open lumina connected to microchannels, which can deliver reagents and cells. Using this technique, we recapitulated a thymus-like microenvironment by culturing 3D cellular constructs containing thymus-like stromal cells with hiPSC-derived endothelial cells. This system enabled to perfuse blood cells through blood vessels connected to the tissue-like 3D cell constructs and to maintain blood cells inside the device. Thus, we have successfully developed a microfluidic device to mimic the structure and microenvironment of the thymus.

研究分野：生体医工学

キーワード：Organ-on-a-chip マイクロ流体デバイス iPS細胞 胸腺 血管 T細胞 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 技術により、免疫機能の中心的な役割を担っている T 細胞を若返らせ、増殖させることが可能となり、免疫再生治療が現実味を帯びている。しかしながら、現状では T 細胞から作製した限られた iPS 細胞でのみ、一部の T 細胞サブセットが誘導可能という状況であり、ヒト iPS 細胞から機能的な各種 T 細胞の作製にはまだまだ多くの課題がある。これは、現在の培養手法に原因があると考えられる。現行法では、細胞の微小環境を考慮したシステムに欠けており、生体内の環境とは大きく異なる。T 細胞の分化・成熟は胸腺でのみ行われており、胸腺機能の再現や胸腺内での分化機構の解明は T 細胞の作製に必要不可欠である。しかしながら、生体外でヒト胸腺の機能を再現可能なシステムは未だに例がない。一方で、マウスの生体内では胚性幹細胞より誘導した細胞から機能的な胸腺を形成できており、各種 T 細胞への分化誘導が可能となっている。従って、iPS 細胞技術を用い、生体内の環境が忠実に再現できれば、生体外においても胸腺の機能を再現できる可能性がある。そこで、マイクロ流体デバイス技術と iPS 細胞技術を組み合わせることで、これまでに例のない胸腺機能の再現に向けたデバイスの開発に取り組む。

2. 研究の目的

免疫再生治療の実現に向けて、T 細胞の分化・成熟に必要な臓器である胸腺の機能が模倣可能なデバイスの開発に取り組む。ヒト iPS 細胞を用い、マイクロ流体デバイス技術を用いて 3 次元的に胸腺環境の模倣を行うことで、生体内におけるヒト胸腺の機能の再現を目指す。機能的な T 細胞の作製および T 細胞機能の評価を目的とし、ヒト iPS 細胞由来の細胞を用いて 3 次元の細胞組織を形成・維持可能なマイクロ流体デバイスによる培養システムを確立する。

3. 研究の方法

胸腺の模倣デバイスの開発を目的として、まず、3 次元の細胞凝集塊を培養可能なマイクロ流体デバイスの開発を行う。特に、3 次元の細胞組織に血液細胞が灌流可能な血管網が導入可能なマイクロ流体デバイスの開発を行う。次に、胸腺の構造に欠かせない血管網をヒト iPS 細胞由来の細胞を用いて作製を行う。T 細胞の機能評価には、同一ドナー由来の血管網を作製する必要があるため、ヒト iPS 細胞を用いて機能的な血管網の作製を行う。これらを組み合わせることで、ヒト iPS 細胞由来の血管網を有する 3 次元の細胞組織が形成可能なデバイスを構築する。また、デバイス内で、血液細胞の培養および T 細胞の培養・評価を行うことで、デバイスの評価を行い、胸腺模倣デバイスの構築に向けた培養デバイスの確立に取り組む。

4. 研究成果

まず、3 次元の細胞凝集塊に血管網が形成可能なマイクロ流体デバイスを開発した。細胞凝集塊を用いた 3 次元培養がマイクロ流体デバイス内で実現可能なデバイスを作製、臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用い、血管新生が誘導可能な肺線維芽細胞 (LFs) と共に培養を行うことで、細胞凝集塊に血管網の導入を行った (図 1)。赤色に蛍光標識した間葉系幹細胞 (MSCs)、LFs、および GFP-HUVECs (緑色) を用いて細胞凝集塊を形成し、フィブリンゲルを用いてデバイス中央に固定化した後、ゲルの両端に血管内皮細胞 (GFP-HUVECs) を導入して培養を行うことで、新生血管同士が結合し、複数の細胞凝集塊を繋ぐ形で血管網が形成可能であった。形成した血管網は、管腔構造を有しており、溶液や血液細胞が灌流可能であった。従って、胸腺の小葉構造を模倣した 3 次元の細胞凝集組織に機能的な血管網を導入して培養可能なマイクロ流体デバイスの開発に成功した。

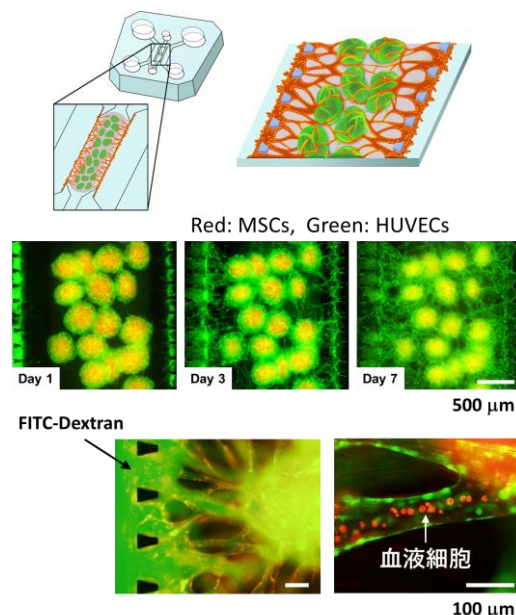


図 1. 細胞塊に灌流可能な血管網の形成

次にヒト iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞 (hiPSC-ECs) を用いて血管網の導入を行った。マイクロ流体デバイス内で肺線維芽細胞 (LFs) と共にフィブリンゲルを用いて 3 次元的に培養を行った結果、hiPSC-ECs が LFs に向かって血管新生を開始し、1 週間から 10 日程度の培養により管腔構造を有する血管網が形成可能であった (図 2)。作製した血管網は、血管内皮細胞を特異的に染色するレクチン染色により構造を確認でき、血管網内には溶液や血液細胞を灌流して培養することが可能であった。また、肺線維芽細胞との共培養ではなく、培養上清を灌流させた培養でも同様な血管網の形成が確認され、肺線維芽細胞から分泌される液性因子によって血管新生が誘導され、血管構造が形成することが

示唆された。本研究により、ヒト iPS 細胞を用いて、再現性良く 3 次元の血管網が作製可能となる分化・培養条件が確立できた。

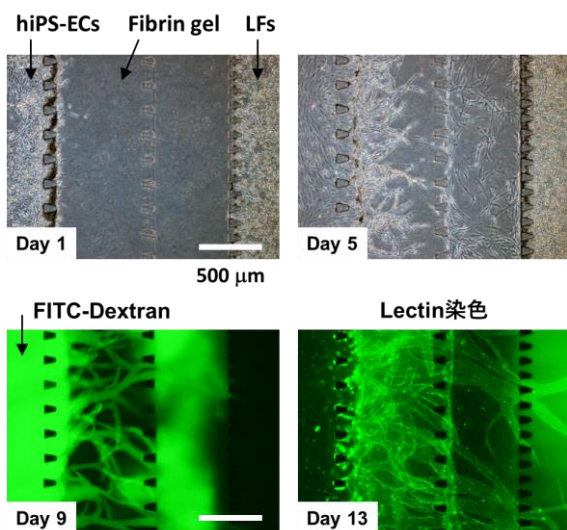


図 2. hiPS-ECs による血管網形成

そこで、血管内皮細胞と同一ドナー由来の T 細胞を用いて細胞傷害性の評価を行った。細胞傷害性の評価は 2 次元培養した血管内皮細胞に対し、標的の血管内皮細胞と共に一定期間培養した CD8 陽性 T 細胞を用いて行った。その結果、市販の血管内皮細胞 (HUVECs) を用いた場合は、T 細胞が顕著な細胞傷害を示したのに対し、同一ドナー由来の hiPSC-ECs を用いた場合には、低い細胞傷害を示した。従って、hiPSC-ECs を用いるとことで、血管を介する T 細胞の機能評価が実現可能であることが示唆された。次に、hiPSC-ECs を用いて上述の細胞凝集塊への血管網の導入を行った結果、3 次元の細胞凝集塊への血管網の形成に成功し、細胞塊内に血液細胞が灌流可能であった。これにより、ヒト iPS 細胞由来の血管網を介して、3 次元の細胞凝集塊内に細胞や薬剤を灌流することが可能となった。

次に、胸腺の環境を模倣するために、胸腺の上皮細胞に類似した機能を持つストローマ細胞 (MS-5) を用いて細胞凝集塊を作製し、血管網の導入を行った。その結果、各細胞塊とマイクロ流路間を繋げる形で血管網の導入が可能であった。また、骨髓由来の造血前駆細胞 (CD34+細胞) を細胞塊内に導入してデバイス内で培養を行った結果、造血前駆細胞の増加と分化した血液細胞の増加が良好に確認でき、血液細胞が培養可能であった。MS-5 細胞を用いる事によって、造血前駆細胞を効率良く維持する事が可能であった。このように、本研究により開発したマイクロ流体デバイスにより、3 次元の機能的な血管網を備えた、細胞組織に似た構造が形成可能となり、生体内に類似した環境の再現が可能となった。本システムは、様々な細胞の凝集塊や組織などが利用可能であり、生体内の様々な臓器の模倣デバイスへの応用が可能である。

また、ヒト iPS 細胞を用いて血管網が作製可能であるため、ヒト iPS 細胞由来のオルガノイドなどの利用が容易になり、同一ドナー由来の iPS 細胞を用いることで、免疫細胞の評価が可能となる。以上のように、本研究で開発したデバイスにより、胸腺の構造に類似した複数の細胞凝集塊が血管網を介して繋がった 3 次元組織様の構造が形成可能となり、血液細胞の培養および T 細胞の機能評価が可能となった。今後、iPS 細胞から胸腺上皮細胞の作製が可能となれば、胸腺機能の再現が実現できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Sano E, Mori C, Nashimoto Y, Yokokawa R, Kotera H, Torisawa Y, “Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network”, *Biomicrofluidics*, 12, 2018, 042204. doi: 10.1063/1.5027183 (査読有)

② 鳥澤勇介、“Organ-on-a-chip 技術と骨髄模倣デバイスの開発” *化学とマイクロ・ナノシステム*, 17, 2018, 7-12.

③ 鳥澤勇介、“生体臓器の機能再現に向けた Organ-on-a-chip 技術の開発” *バイオサイエンスとインダストリー*, 75, 2017, 390-395.

④ 鳥澤勇介、梨本裕司、横川隆司、“Organ-on-a-chip: 動物実験に代わる薬物の新たな評価手法の開発”、*ぶんせき*, 8, 2017, 349-356.

⑤ 鳥澤勇介、“メカニカルデバイスと iPS 細胞を用いた新しい再生医療” *医薬ジャーナル*, 53, 2017, 105-109.

⑥ 鳥澤勇介、“Organ-on-a-Chip” 再生医療, 15, 2016, 20-24.

⑦ 鳥澤勇介、“マイクロデバイスによる生体臓器の機能再現” *感染炎症免疫*, 46, 2016, 62-65.

[学会発表] (計 14 件)

① Torisawa Y, Mishima Y, Sano E, Waseda M, Takakubo H, Mori C, Iriguchi S, Kaneko S, “Microfluidic tissue engineering of a 3D vascularized tissue-on-a-chip using human iPSC-derived cells to study cancer immunotherapy”, 5th Tissue Engineering

and Regenerative Medicine International Society World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

② Mishima Y, Waseda M, Sano E, Iriguchi S, Yasui Y, Kaneko S, Torisawa Y, “Microfluidic tissue engineering of perfusable 3D vascular networks on a chip using human iPS cells”, International Society of Stem Cell Research 2017 Annual Meeting, Boston, USA, June 14-17, 2017.

③ Nashimoto Y, Teraoka Y, Arima Y, Nakamasu A, Torisawa Y, Kotera H, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R, “Development of three-dimensional tumor model with a perfusable vasculature using a microfluidic device” 18th International Congress of Developmental Biology, Singapore, Jun 18-22, 2017.

④ Nashimoto Y, Kunita I, Nakamasu A, Torisawa Y, Nakayama M, Kotera H, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R, “Engineering a three-dimensional tissue model with a perfusable vasculature in a microfluidic device”, 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Las Vegas, USA, January 22-26, 2017.

⑤ Torisawa Y (invited), “Development of organ-on-a-chip microdevices to reconstitute bone marrow function”, Pacific Rim Nano Medicine Symposium 2018, Kobe, January 25-26, 2018.

⑥ Torisawa Y (invited), “Cell-generated niches for organ-on-a-chip microdevices”, 27th Hot Spring Harbor International Symposium: Frontiers in Stem Cell Research and Reprogramming, Fukuoka, October 31-November 1, 2017.

⑦ Torisawa Y (invited), “Development of biomimetic microdevices to reconstitute bone marrow function”, 2017 Workshop on Advanced Cell Culture and Analysis Technology, Taiwan, September 18, 2017.

⑧ Torisawa Y (invited), “Development of biomimetic microdevices to reconstitute bone marrow function”, 16th International Conference on Biomedical Engineering, Singapore, December 7-10, 2016.

⑨ Torisawa Y (invited), “Cell-generated niches for organ-on-a-chip microdevices”, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Kyoto,

November 8-11, 2016.

⑩ Torisawa Y (invited), “Cell-generated niches for organ-on-a-chip microdevices”, Organs-on-chips International Workshop, Hog Kong, October 3, 2016.

⑪ 鳥澤勇介 (招待講演)、“Organ-on-a-chip 技術の開発と骨髄機能の再現への応用”、第5回細胞凝集研究会、岡山、2017年11月17日

⑫ 鳥澤勇介 (招待講演)、“Organ-on-a-chip 技術：骨髄模倣デバイスの開発”、化学とマイクロ・ナノシステム研究会第36回研究会、群馬、2017年10月4~5日

⑬ 鳥澤勇介 (招待講演)、“Organ-on-a-Chip 技術と骨髄機能の再現に向けた取り組み”、日本化学会第97春季年会、神奈川、2017年3月16~19日

⑭ 鳥澤勇介 (招待講演)、“骨髄機能を持つ Organ-on-a-Chip の創製とその応用” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016、福岡国際会議場、2016年11月21~22日

[図書] (計 3 件)

① Torisawa Y, “Microfluidic organs-on-chips to reconstitute cellular microenvironments”, Medical and Biological Applications of Microfluidic Devices, (Springer), in press.

② 鳥澤勇介、“骨髄機能の再現に向けた Organ-on-a-chip”、臓器チップの技術と開発動向、(シーエムシー出版)、pp. 208-214

③ 鳥澤勇介、“マイクロエンジニアリング技術を用いた生体模倣デバイスの開発”、歯科再生医学、(医歯薬出版)、印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥澤 勇介 (TORISAWA, Yu-suke)
京都大学・白眉センター・特定准教授
研究者番号：10767354

(2) 研究分担者

金子 新 (KANEKO, Shin)
京都大学・iPS細胞研究所・准教授
研究者番号：40361331

三嶋 雄太 (Mishima, Yuta)
京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員(PD)
研究者番号：80770263