

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16386

研究課題名(和文)"Body-on-a-chip"の実現に資する血管網による組織統合法の開発

研究課題名(英文) Integration of organ models by a perfusable vascular network in a microfluidic device

研究代表者

梨本 裕司 (Nashimoto, Yuji)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：80757617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、マイクロ流体デバイス内で、組織モデルを灌流可能な血管網で統合し、生体の薬理動態を模したBody-on-a-chipの構築を目指した。肺の間質組織、および腫瘍組織の血管導入法を確定させるとともに、抗がん剤を投与した際の応答を評価した。検討した結果、血管による栄養、酸素の送達効果に起因すると考えられる細胞機能の促進が観察され、本手法が既存手法には無い特徴を有していることが確認できた。また、各組織を統合するためのマイクロ流体デバイスを作製し、血管化を検討、実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の各組織は血管網で結ばれており、相互に作用している。これまで、肺、肝臓、腎臓といった各組織のモデルは報告されていたが、それらを結ぶ血管の構築は報告されていなかった。本研究では、マイクロ流体技術を利用して、組織の血管化技術を開発するとともに、それらを統合する新たなデバイスを開発、実現した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a microfluidic platform to integrate organ models by a perfusable vascular network, which enable to study in vivo-like ADME (adsorption, distribution, metabolism, and excretion) for drug screening. We realized the vascularization of a lung mesenchymal tissue model and a breast cancer model and evaluated the drug response in the constructed platform. The cell proliferation activity was enhanced by the intraluminal flow through the engineered vascular network, which is never reported until now, to my best of our knowledge. In addition, we developed a microfluidic device to culture multiple vascularized organ models in a single platform.

研究分野：生体医工学, 分析化学

キーワード：Body-on-a-chip 組織モデル マイクロ流体デバイス 血管 スフェロイド 細胞凝集塊 オルガノイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体外で再構築した臓器を1つに統合し、相互作用を再現できれば、ヒト個体の応答を評価可能なモデルとして利用できる。この概念は”Body-on-a-chip”と呼ばれ、特に創薬分野での応用が期待されている。しかし、これまで組織間の連結には、シリコンや樹脂など、生理的に不活性な管路が用いられてきた。生体で各組織を連結する血管は単なる管路では無い。血管自身が活発に組織と相互作用し、形状を最適化すると共に、透過する分子の選択を行う。つまり、真に個体機能を模した”Body-on-a-chip”の実現には、臓器間の血管網の再現が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究課題では、”Body-on-a-chip”の実現に向け、血管網による臓器モデルの統合技術の開発を検討した。これにより、臓器に合わせた供給・排出経路、および血管壁での選択的な物質授受の再現し、各臓器が相互に作用するためのネットワークを整えることを狙いとした。

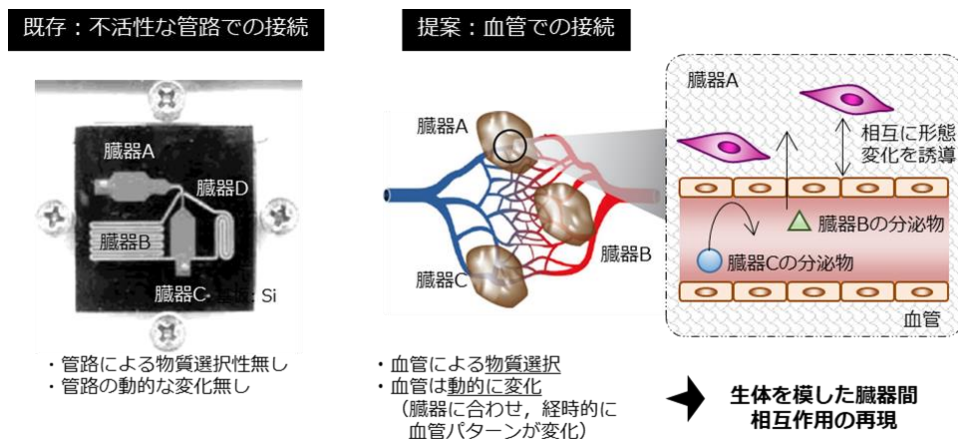


図1：本研究の概念図

3. 研究の方法

マイクロ流体デバイス内で、組織モデルを血管内皮細胞と共に培養することで、血管内皮細胞が血管形成を伴いながら、組織モデルに接続することを促す環境を整備した。これにより、血管と組織モデルの接続を行い、さらに、それらの統合を目指した。

4. 研究成果

(1) 肺間質組織の血管化技術の構築

血管形成を促進する作用が知られている、線維芽細胞を中心とした組織モデルを、検討の出発点とした。線維芽細胞の細胞凝集体（スフェロイド）をマイクロ流体デバイス内で培養し、血管内皮細胞との相互作用を促すことで、血管化を試みた。その結果、左右のマイクロチャンネルから、スフェロイドに向かう血管が形成され、スフェロイドと接続をすることができた（図2, Integrative Biology, 2017）。

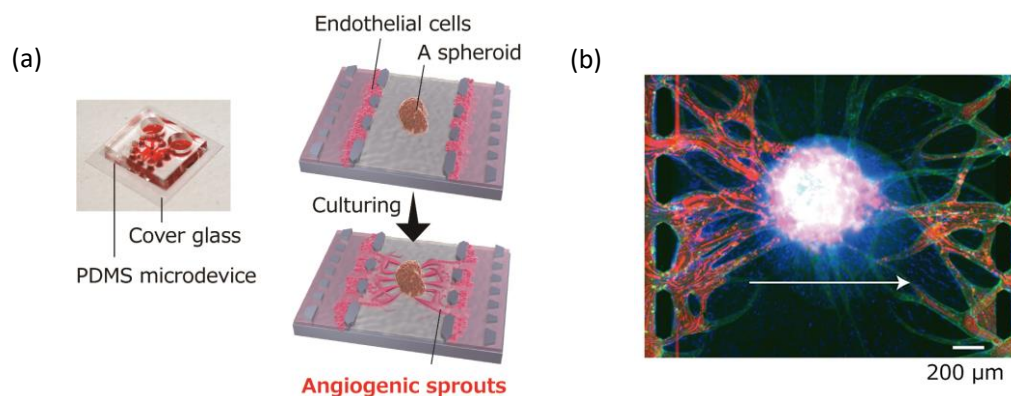


図2：線維芽細胞スフェロイドの血管化検討。(a) マイクロ流体デバイス写真と血管化の模式図、(b) 接続した血管を介したマイクロビーズの灌流。マイクロビーズが血管を通過してスフェロイド内を流れており、血管を線維芽細胞に接続できたことを示す。

(2) 腫瘍組織の血管化技術の構築と薬剤評価

(1) で開発したマイクロ流体デバイスを元に、第二の組織として、腫瘍モデルの血管化に取り組んだ。腫瘍モデルに混合する繊維芽細胞、血管内皮細胞の割合を最適化することで、腫瘍スフェロイドの血管化に成功した。構築した血管を通して、長期灌流培養を行ったところ、有意に腫瘍細胞の増殖活性が向上し、腫瘍環境における血管の重要性を示す結果を得ることができた。また構築した血管を介して薬剤投与を行ったところ、静置条件と灌流条件で薬剤効果に相違が生じ、薬剤評価における血管内灌流の重要性が示唆された。上記の結果は、現在学術論文として投稿準備中である。

(3) 臓器モデルを統合するためのマイクロ流体デバイスの構築

(1)、(2) で開発した組織モデルを統合するため、4つの組織モデルの血管化に利用できるマイクロ流体デバイスを作製した(図3a)。本デバイスは、細胞培養と灌流を行うチャンネルが設けられている。灌流チャンネルにフローを印加すると、全ての培養チャンパーに均等に流れが付与されることを確認した(図3b)。本デバイスを用いて、4つの繊維芽細胞スフェロイドを同時に血管化することを検討した。その結果、全てのスフェロイドに血管が伸長し(図3c)、スフェロイドの灌流培養が可能であった。

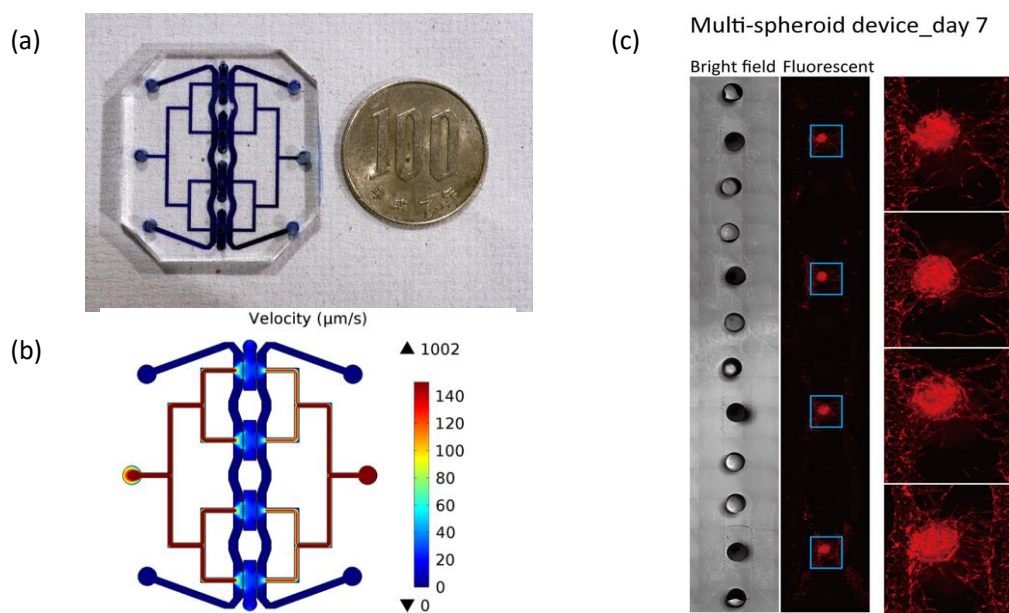


図3 血管化された組織を統合するためのマイクロ流体デバイス。(a) デバイス写真。チャンネルを青インクで可視化。4つの組織モデルの培養エリアが1枚のチップ内に設けられており、相互作用が評価できる。(b) 灌流チャンネルから流れを付与した際の数値シミュレーション。全てのチャンパーにほぼ均等に流れ負荷をかけることが可能。(c) 作製したデバイス内で4つのスフェロイド(繊維芽細胞)を血管化した際の様子。全てのスフェロイドに血管が伸長し、灌流を行うことが可能であった。

以上、本研究プロジェクトでは、複数の組織モデルの血管化条件の探索と、それらを統合するマイクロ流体デバイスの開発を行った。今後、本研究を用いた組織モデル間相互作用の研究の発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

[1] Kosuke Ino, Yuji Nashimoto, Noriko Taira, Javier Ramon Azcon and Hitoshi Shiku. "Intracellular electrochemical sensing" *Electroanalysis*, 30, 2195-2209 (2018).

[2] Emi Sano, Chihiro Mori, Yuji Nashimoto, Ryuji Yokokawa, Hidetoshi Kotera and Yu-suke Torisawa. "Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network" *Biomicrofluidics* 12, 042204 (2018).

[3] Yuji Nashimoto, Yukako Teraoka, Ramin Banan Sadeghian, Akiko Nakamasu, Yuichiro Arima, Sanshiro Hanada, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa. "Perfusable vascular network with a tissue model in a microfluidic device" *Journal of Visualized Experiments*, 134

e57242 (2018).

[4] Yuji Nashimoto, Tomoya Hayashi, Itsuki Kunita, Akiko Nakamasu, Yu-suke Torisawa, Masamune Nakayama, Hisako Takigawa-Imamura, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura and Ryuji Yokokawa. “Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device” *Integrative Biology*, 9, 506-518 (2017). **Selected as the cover.**

〔学会発表〕(計 21 件)

国際学会 7 件

[1] Kosuke Ino, Akichika Kumatani, Yuji Nashimoto, Yoko Kai

“Electrochemical detection in micro/nano-systems: from cell analysis to characterization of energy materials”, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018), Kaohsiung, Taiwan, 2018/11.

[2] Yuji Nashimoto, Yukako Teraoka, Akiko Nakamasu, Sanshiro Hanada, Yuichiro Arima, Yu-suke Torisawa, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa

“Perfusion culture through a vasculature constructed in a tumor spheroid”, The 21st International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), Savannah, Georgia, USA, 2017/10.

[3] Masamune Nakayama, Yukako Teraoka, Yuji Nashimoto, Akiko Nakamasu, Sanshiro Hanada, Yuichiro Arima, Yu-suke Torisawa, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa

“Investigation for the effect of shear stress on angiogenesis using on-chip 3D vasculature”, 2017 Biomedical Engineering Society (BMES) Annual Meeting, Phoenix, Arizona, USA, 2017/10.

[4] Yuji Nashimoto, Yukako Teraoka, Yuichiro Arima, Akiko Nakamasu, Yu-suke Torisawa, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa

“Development of three-dimensional tumor model with a perfusable vasculature using a microfluidic device”, 18th International Congress of Developmental Biology (ISDB 2017), Singapore, 2017/6.

[5] Yuji Nashimoto, Itsuki Kunita, Akiko Nakamasu, Yu-suke Torisawa, Masamune Nakayama, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, and Ryuji Yokokawa

“ENGINEERING A THREE-DIMENSIONAL TISSUE MODEL WITH A PERFUSABLE VASCULATURE IN A MICROFLUIDIC DEVICE”, The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), Las Vegas, Nevada, USA, 2017/01.

[6] Yuji Nashimoto, Itsuki Kunita, Akiko Nakamasu, Yu-suke Torisawa, Masamune Nakayama, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura and Ryuji Yokokawa

“Development of a perfusable vascularization method for organoid culture using a microfluidic device”, Organoid symposium, Organoid: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture, Heidelberg, Germany, 2016/10.

[7] Yuji Nashimoto, Itsuki Kunita, Akiko Nakamasu, Yu-suke Torisawa, Masamune Nakayama, Hisako Takigawa-Imamura, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura and Ryuji Yokokawa

“Angiogenic sprouts reconstitute perfusable vascular networks inside a three-dimensional spheroid”, The 8th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB 2016), Seoul, Korea, 2016/4.

国内学会 14 件

[1] Tatsuki Kumagai, Kosuke Ino, Noriko Taira, Yuji Nashimoto, and Hitoshi Shiku “Electrochemical formation of biocompatible hydrogels for cell culture”, 第 99 回日本化学会春季大会, 兵庫, 2019/3.

[2] Takato Terai, Yuji Nashimoto, Kosuke Ino, Koichi Nishiyama, Ryuji Yokokawa, Takashi Miura, Hitoshi Shiku “Engineering a vascularized spheroid and optimizing conditions for vasculogenesis in a microfluidic device”, 第 99 回日本化学会春季大会, 兵庫, 2019/3.

[3] 日野翔太、伊野浩介、梨本裕司、珠玖仁 「電気化学デバイスを用いた血管内皮細胞培養」, 電気化学会第 86 回大会, 京都, 2019/3.

[4] 日野翔太、伊野浩介、梨本裕司、珠玖仁 「電気化学デバイス上での血管内皮細胞培養」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 38 回研究会 (38th CHEMINAS), 北海道, 2018/10.

[5] 寺井崇人、梨本裕司、伊野浩介、西山功一、横川隆司、三浦岳、珠玖仁 「マイクロ流体デバイスにおける血管化スフェロイドの作製と培養条件の検討」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 38 回研究会 (38th CHEMINAS), 北海道, 2018/10.

[6] 熊谷樹、伊野浩介、松本知明、平典子、梨本裕司、珠玖仁 「電気化学を用いて生成した生体適合性ハイドロゲルの機能評価」, 日本分析化学会第 67 年会, 宮城, 2018/9.

[7] Tatsuki Kumagai, Kosuke Ino, Tomoaki Matsumoto, Noriko Taira, Yuji Nashimoto, Hitoshi Shiku “Electrochemical formation of biocompatible hydrogels for cell culture”, 平成 30 年度化学系学協会東北大会, 秋田, 2018/9.

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

[8] Takato Terai, Yuji Nashimoto, Kosuke Ino, Koichi Nishiyama, Ryuji Yokokawa, Takashi Miura, Hitoshi Shiku “Optimizing conditions for electrochemical evaluation of vascularized spheroid in a microfluidic device”, 平成 30 年度化学系学協会東北大会, 秋田, 2018/9. ポスター賞

[9] Syoudai Hino, Kosuke Ino, Yuji Nashimoto, Hitoshi Shiku “Vascular network formation on electrochemical devices”, 平成 30 年度化学系学協会東北大会, 秋田, 2018/9.

[10] 招待, 梨本裕司 「マイクロ・ナノデバイスを用いた血管機能制御/評価法の開発」, 細胞凝集研究会, 山形, 2018/6.

[11] 招待, 梨本裕司 「マイクロ・ナノシステムを利用した血管機能解析技術の創出」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 37 回研究会, 茨城, 2018/5.

[12] 梨本裕司, 寺岡佑佳子, 有馬勇一郎, 花田三四郎, 中益朗子, 鳥澤勇介, 小寺秀俊, 西山功一, 三浦岳, 横川隆司「灌流可能な血管を有するオンチップ腫瘍モデルの創出」, 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 広島, 2017/10

[13] Yuji Nashimoto, Masamune Nakayama, Yukako Teraoka, Akiko Nakamasu, Yuichiro Arima, Yu-suke Torisawa, Hidetoshi Kotera, Koichi Nishiyama, Takashi Miura, Ryuji Yokokawa

“Perfusion culture of a three-dimensional tumor model with vasculature using a microfluidic device”, 日本化学会 春季年会, 東京, 2017/3.

[14] 梨本裕司, 中益朗子, 有馬勇一郎, 鳥澤勇介, 中山雅宗, 寺岡佑佳子, 小寺秀俊, 西山功一, 三浦岳, 横川隆司

「灌流可能な血管網を利用した腫瘍環境の模倣」, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京, 2017/1.

〔図書〕(計 3 件)

[1] 梨本裕司, 伊野浩介, 平典子, 珠玖仁

情報機構, 「三次元培養における培養手法と周辺技術動向」, 2019, p.83-97.

[2] 梨本裕司, 横川隆司

シーエムシー出版, 「臓器チップの技術と開発動向」(酒井康行, 金森敏幸 監修) 第 8 章 微小流体デバイス内における生体組織と血管網の融合, 2018, p.91-103.

[3] 鳥澤勇介, 梨本裕司, 横川隆司

ぶんせき, 「Organ-on-a-chip ー動物実験に代わる薬物の新たな評価法と効果予測法の開発ー」, 2017, p.348-356.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 横川 隆司

ローマ字氏名: Ryuji Yokokawa

研究協力者氏名: 鳥澤 勇介

ローマ字氏名: Yu-suke Torisawa

研究協力者氏名: 珠玖 仁

ローマ字氏名: Hitoshi Shiku

※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。