

令和元年9月20日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17501

研究課題名(和文) マイクロデバイスを用いた脳血管 神経の機能発現メカニズムの研究

研究課題名(英文) Development of a microdevice for the study of the interaction between endothelial cells and neuronal cells

研究代表者

オケヨ ケネディオモンディ (Okeyo, Kennedy Omondi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定講師

研究者番号：10634652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液脳関門(BBB)とは、密着結合した血管内皮細胞と神経細胞によって構成される機構で、脳内に入る物質を厳格に制限し、脳内環境の恒常性維持の役割を担っている。しかし、このBBBは殆どの薬を通さないため、神経変性疾患の治療薬開発の妨げとなっている。本研究では、微細加工技術を駆使し、特に血管内皮細胞と脳細胞の相互作用が可能なBBBモデルを構築し、BBBの選択的物質輸送の仕組み理解を目指した。具体的には、独自開発したマイクロメッシュ培養法を駆使し、BBB機能で主役となっている内皮細胞のシート状組織を開発した。内皮組織のシート化によって観察も、薬の評価も簡単にできるBBBの体外モデルの構築を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内環境は有害物質によって乱されると脳細胞の活動が阻害され、神経変性疾患の発端となる。このため、血液脳関門(BBB)という組織によって守られている。BBBは、脳内毛細血管を構成する内皮細胞が密着結合を形成し、血液から脳内への物質の出入を厳しく制限することで、脳内環境を安定に維持している。しかし、この厳しい物質通過の制限のせいで神経変性疾患をターゲットに開発された薬の殆どが失敗に終わっている。本研究は、このBBBの仕組み理解に役立つモデルを構築し、さらにそれを用いてBBBの働きである選択的物質輸送の仕組みを調べた。将来的には、このモデルを使って事前にBBBを通過できる薬の開発や評価に役立てたい。

研究成果の概要(英文)：The blood brain barrier (BBB) is barrier which strictly regulates the transport of substances into the brain, thereby contributing to the maintenance of brain homeostasis. Because BBB is highly selective, most molecules, including many promising drug candidates, cannot enter into the brain space from the blood, hindering the development of drugs for neurodegenerative diseases such as Alzheimer. Although the mechanism for the selective transport of BBB remains unknown, it is thought to be modulated by the interaction between endothelial cells and brain cells, specifically, astrocytes. In this study, employing our novel technology of micromesh culture, we focused on developing a microdevice which emulates the basic components of in vivo BBB for application in the study of the interaction between endothelial cells and brain cells (neural cells). Endothelial cell sheets were generated and a co-culture system established for future application to the study of BBB functionality.

研究分野：マイクロバイオシステムス

キーワード：3次元共培養デバイス 血管-神経相互作用 血液脳関門 メッシュ培養技術 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

近年、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用いて製作した細胞培養用マイクロデバイスにより、複雑で動的な生体内環境を生体外で再現し、器官や組織の機能を調べることが可能になりつつある (Bhatia N.S. & Ingber D.E, Nature Biotechnology, 32, 760-772, 2014; Jang, K. J. et al.: Lab on a Chip, 10, 36, 2010). このような組織・臓器の機能を再現したマイクロデバイスは“organ-on-a-chip”と呼ばれ、動物愛護活動によって減少傾向にある動物実験の代替法として、特に創薬分野において非常に注目されている。現在、organ-on-a-chipの研究は米国を中心に盛んに行われており、様々な生体組織をチップ上で再現する試みがなわれている (Huh, D. et al.: Science, 328, 1662, 2010). しかし、国内に目を向けるとこのような研究例がほとんどなく、欧米に遅れをとっていると言える。今後、organ-on-a-chipが創薬検査等の標準プラットフォームになりうることから、この分野を立ち上げる必要性に異論はない。創薬分野のみならず、病理学的・生物学的メカニズムの解明においても、細胞間相互作用や細胞分泌物の計測が容易にできる tissue/organ-on-chip が有用であると言える。

脳内には、密着結合した血管内皮細胞と神経細胞によって構成される血液脳関門 (Blood Brain Barrier; BBB) が存在し、脳内に入る物質を厳格に制限して脳内環境の恒常性維持において、大きな役割を果たしている。しかし、この BBB は殆どの薬を通さないことから、アルツハイマー病等の脳疾患の治療薬の開発を妨げている。本研究では、BBB 機構における血管内皮細胞と脳細胞 (神経細胞) の相互作用に着目し、BBB が担う選択的物質輸送の仕組み理解を目指すことで、創薬に役立てる。

血液脳関門の構成を図 1A に示す。密着結合した血管内皮細胞とその裏に接着しているペリサイト (pericytes) が血管側にあり、血管側と相互作用するアストロサイト (astrocyte) およびニューロンが脳側にあって neurovascular unit (NVU) という機能ユニットを構成している (図 1A)。本研究では、血液脳関門を再現した 3 次元共培養マイクロデバイスを開発し、刺激応答計測や物質輸送計測を行うことで、血管細胞と脳細胞の相

互作用によって生み出される血液脳関門の機構を明らかにする。図 1B に示すように、機能ユニット (NVU) をマイクロデバイス上で再現する

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発したモノレイヤー細胞シート作製技術及びマイクロ流体技術を駆使し、血管細胞と神経細胞の 3 次元共培養を可能にするマイクロデバイスを開発することにより、血液脳関門 (blood-brain barrier) の基礎機能ユニットを生体外で再現することを目指した。これにより、複雑な生体内では研究が難しい血管-神経における異種細胞間相互作用をより高分解能で、かつリアルタイムで計測できるようになり、血管-神経相互作用に関連する疾患の病理学的メカニズムの理解に役立てる。さらに、脳細胞と血管細胞の異種細胞間相互作用によって生み出される血液脳関門の物質輸送の機構とその破綻メカニズムの理解にも貢献でき、脳環境の恒常性維持において重要な役割を果たす血管脳関門の機構の解明と、その破綻に起因するアルツハイマー病等の疾患の学理解明を図る。

3. 研究の方法

血管内皮細胞による密着結合が血液脳関門の機能において最も重要である (図 1B)。しかし、通常のディッシュ培養やマトリゲル培養では血管内皮細胞は密着結合を形成しにくい。この課題に対応するため、我々は、「マイクロメッシュ培養法」という、細胞同士の相互接着と自己組織化を誘導し、層状な細胞シートの形成を誘起する手法を開発した (Okeyo et al., Biomedical Physics & Engineering Express: 2, 065019, 2016) (図 2)。本法では、線幅が狭く (5 μm 未満)、開口部の広い (100 μm 以上) ことが特徴の微細構造メッシュシートを培養液中に吊るし、その上に直接細胞を播種して培養することにより、細胞同士の接着と自己集合的組織形成を誘導し、メッシュ上で層状な細胞レイヤーを作製する (図 3)。本研究では、この技術を生かし、脳毛細血管の内皮細胞をメッシュ培養することで、密着結合を維持した血管内皮細胞のモノレイヤー組織を構築することを目指した。つまり、血管内皮細胞と相互作用する

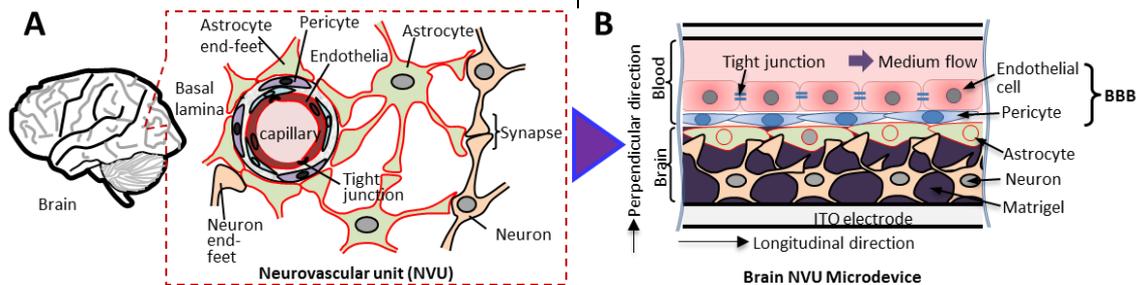


図 1. 血管-神経の機能ユニット(A)およびそれを再現したマイクロデバイスの概略図(B)

脳細胞群（アストロサイトとニューロン）を、細胞イメージングや刺激付与の器具を備えたマイクロ流体デバイス内に組み込むことで、血液脳関門の生体内構成と機能を厳密に再現した生体外モデルを実現することが本研究の最終目標である。

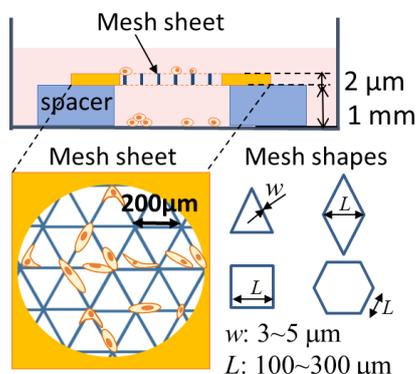


図 2：メッシュ培養法

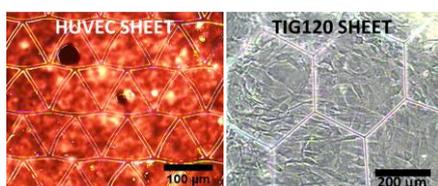


図 3:メッシュ培養法で得られた細胞シートの一例

4. 研究成果

4.1. 内皮細胞シートの作製

血液脳関門では、血管内皮細胞が形成するタイトジャンクションが物質の選択的輸送において重要な機構であるため、本研究で目指したデバイスにおいても、その形成が得られる条件の検討に注力した。血管内皮細胞として、比較的入手しやすく、一般的に広く使われている HUVEC (human umbilical vascular endothelial cell) を使用した。前述の通り、HUVEC は通常のディッシュ培養では滅多に密着結合を形成しない。そのため、本研究では、細胞間接着を促すマイクロメッシュ培養を用い、密着結合が形成される培養条件の検討を行った。

HUVEC をメッシュ培養した結果を図 4 に示す。図 4 より明らかなように、細胞接着が

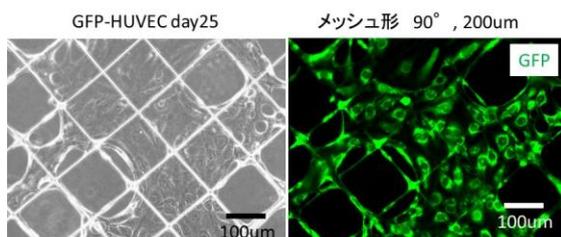


図 4.培養条件改善前のメッシュ上の HUVEC

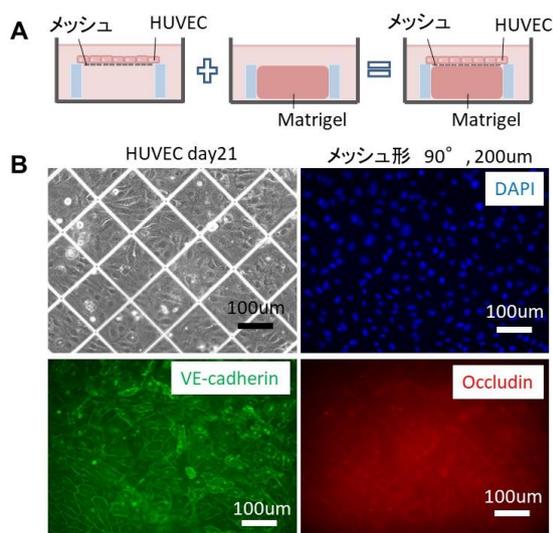


図 5 改善培養環境下における HUVEC 細胞シート

幅僅か $5 \mu\text{m}$ の線に限定されるメッシュ上でも HUVEC が接着し、進展して部分的にシートを形成することが分かった。しかし、細胞増殖が 4~5 日で減少し、25 日が経過してもメッシュ全面 ($\phi=4 \text{ mm}$) が完全に覆われることはない。完全な HUVEC 細胞シートを得るために、次に説明するように、培養環境の改善を図った。

培養環境の改善策として、メッシュとマトリゲルを組み合わせた 3 次元培養を導入した。これを改善メッシュ培養法とよび、図 5A に示す。この方法では、まずメッシュ上に HUVEC を播種し、細胞の接着と伸展を確認した後、メッシュごとを引越し、予めゲル化させた 40%マトリゲルの上にオーバーレイするように配置し、培養を行う。この方法で得られた HUVEC 細胞シートを図 5B に示す。この図より、メッシュ単体に比べ、HUVEC が伸展してメッシュ全面に細胞シートが形成されていることが明らかである。また、VE-Cadherin の免疫染色結果より、接着結合の形成が確認された。これは、マトリゲルは HUVEC の培養に必要な栄養要素やサイトカインを豊富に含んでいるため、メッシュ単体で HUVEC を培養した時に比べて、オーバーレイ培養のほうが伸展も増殖も長時間維持されるためである。しかしながら、図 5B に示すように、免染ではタイトジャンクションを示す Occludin の結果が思わしくなかったため、その原因を引き続き調査中である。血管内皮細胞が血流によるせん断応力に敏感なことから、今後、せん断流れを付与した培養環境下でタイトジャンクションの形成条件を継続して検討して行く予定である。

4.2. 内皮細胞・脳細胞の 3 次元培養の検討

上記のマトリゲルオーバーレイ培養は脳細胞の 3 次元培養との組み合わせにも有用な改善策であった。ここでは、血管・脳細胞の

3次元共培養システムの確立を目指した。脳幹細胞をマトリゲル層内で培養し、さらに分化誘導試薬を導入することで、アストロサイト、神経細胞、およびオリゴデンドロサイトへの分化誘導を試みた。

ディッシュ上での分化誘導の結果より、神経細胞への分化が比較的高い確率で得られた一方で、アストロサイトへの分化効率が極めて低かった。そこで、神経幹細胞(Neural stem cells)をマトリゲル層内で3次元培養を行いながら、その上部にメッシュ上に接着した内皮細胞(HUVEC)を配置するという共培養システムを新たに作った。HUVECの挙動観察を行ったところ、HUVEC単体を培養した時に比べ、共培養システムではHUVECシートが顕著に凝集し、密着した塊を取った(図6)。さらに、神経幹細胞の増殖が改善したに加え、神経細胞への分化も顕著に改善した。しかし、アストロサイト分化には特に影響はなかった。これを受け、現在、BMP4のアストロサイト分化誘導に用いられるサイトカインを用いて改善を図っている。

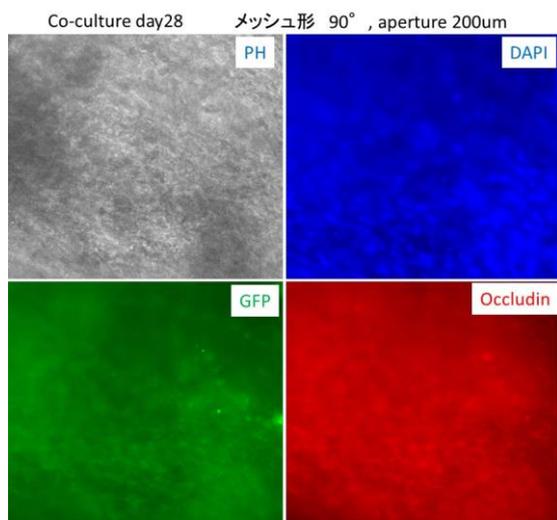


図6 脳神経と内皮細胞の共培養システムより得られたHUVEC総の様子

6. まとめ

本研究では、BBBの3次元モデルの樹立を目指し、血管内皮細胞シートの作製手法の確立、および脳細胞の3次元培養は達成できた。しかし、最終目的の相互作用の検討にはまだ至っておらず、今後、脳細胞の培養環境を模擬するため、マトリゲルの濃度を変更しつつ、神経細胞の分化効率改善を行うとともに、原子間力顕微鏡などの手法を用い、アストロサイトと血管内皮細胞の相互作用の検討を行う。さらに、メッシュ培養法で得られた血管内皮細胞のモノレイヤー組織を積層化することで、生体内と同様の二層構造の構成で再度血管・脳細胞の相互作用の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- [1] Kennedy O. Okeyo, Maiko Tanabe, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Masao Washizu, Self-organization of human iPS cells into trophectoderm mimicking cysts induced by adhesion restriction using microstructured mesh scaffolds, *Growth, Development & Differentiation*, 00:1-13 (2018). DOI: 10.1111/dgd.12430
- [2] Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, and Hidehiro Oana, Nucleosomes Exhibit Non-uniform Unwrapping Along Native Chromatin Fibers with Increasing Salt Concentration as Revealed by Direct Imaging in a Microfluidic Channel, *Journal of Biotechnology*, 13, 1700245 (2018). DOI: 10.1002/biot.201700245.
- [3] Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu, Minimization of cell-substrate interaction using suspended microstructured meshes initiates cell sheet formation by self-assembly organization, *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2, 065019 (2016).

[学会発表] (計 19 件)

- [1] Osamu Kurosawa, Kennedy O. Okeyo, H. Iwata, and M. Washizu, Novel micromesh culture method enables self-assembly cell sheet formation and mechanotransduction, *International Symposium on Nanomedicine 2017, School of Medicine Centennial Hall, Tohoku University, Sendai, Japan. December 13-15, 2017.*
- [2] Hidehiro Oana, Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Jun Ueda, Masao Washizu, "Direct observation-based analysis of compaction stability of individual chromosomes isolated from single mammalian cells" *MiroTAS 2017, October 22-26, Savannah, Atlanta USA.*
- [3] Maiko Tanabe, Kennedy O. Okeyo, Masahiro Okanojo, Hiroko Hanzawa, Masao Washizu, Shizu Takeda, Basic Study of iPS Cell Culture Substrate by using Metal Micro Mesh Device, *Lab-on-a-Chip and Microfluidics World Congress 2017, Coronado Island, California, USA. October, 2-4, 2017.*
- [4] Yuta Ando, Kennedy O. Okeyo, and Taiji Adachi, Self-organized Morphological Changes in ES Cells on Adhesion-restricted Substrates. *5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland, September, 14-17, 2017.*
- [5] Kennedy O. Okeyo, Fabrication of in vitro tissue/organ models for disease modeling and drug development, *The 3rd Africa*

- International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC 2017), Sino Africa Joint Research Center, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology (JKUAT), Juja, Kenya, September 12-15, 2017.
- [6] Yamada Kai, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, and Masao Washizu, “Direct observation-based analysis of compaction stability of individual chromosomes isolated from single mammalian cells”, Transducers 2017 - June 18-22, 2017 - Kaohsiung, Taiwan.
- [7] Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Jun Ueda, Hidehiro Oana, “Optical Mapping of Epigenetic Information along Intact Chromatin Fibers isolated from Single Cells in a Microchannel”, International Symposium on Micro-Nano Science and Technology 2016, Tokyo, 2016/12/16-18.
- [8] Kai Yamada, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, and Masao Washizu, “Fabrication of bilayer cell sheet structures with direct cross-layer cell-cell contact using the mesh culture technique”, International Symposium on Micro-Nano Science and Technology 2016, Tokyo, 2016/12/16-18.
- [9] Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Hidehiro Oana, “Direct Acquisition of Epigenetic Information along Chromatin Fibers Isolated from Single Mammalian Cell”, International Conference on Single Cell Research 2016, Tokyo, pp. 128, (November 17, 2016).
- [10] Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Hiromitsu Nakauchi, and Masao Washizu: “Mechanical induction of trophoblast-like differentiation in human iPSC cells”, Cell Symposium, 10 years of iPSCs, Berkeley, California, USA. September 25-27, 2016.
- [11] Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Masao Washizu, Jun Ueda, Hidehiro Oana, “Direct Observation of Epigenetic Modifications along Intact Chromatin Fibers of Individual Chromosomes Isolated from Single Cells in a Microfluidic Channel”, The 2016 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2016), Tsukuba, pp. 407-408, September. 26-29, 2016
- [12] Kennedy O. Okeyo, Induction of stem cell self-assembly by adhesion restriction, Lab-on-a-Chip, Microfluidics & Biosensors Asia 2017, November 30- December 1, 2017, Taipei, Taiwan.
- [13] Kennedy O. Okeyo, Integrating Microfluidics and Tissue Engineering for Organ-on-a Chip Applications, Lab-on-a-Chip and Microfluidics World Congress 2017, Coronado Island, California, USA. October, 2-4, 2017.
- [14] Kennedy O. Okeyo, Step by step fabrication of biomaterials based on cell adhesion control, Lab-on-a-Chip, Microfluidics & Microarrays World Congress, Marriott Hotel Mission Valley, San Diego, USA, 2016.9.26-28 (2016).
- [15] Kennedy O. Okeyo, Kai Yamada, Rina Yanaru, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, and Masao Washizu, The shoji technique for cell adhesion control and fabrication of cell sheets, The 77 Japan Society of Applied Physics Autumn Meeting, Niigata Mese, Niigata, Japan, September 13-16, 2016
- [16] オケヨ・ケネディ・オモンディ, 山田快, 小穴英廣, 鷺津正夫, マイクロメッシュを基板とする共培養システムを用いた生体内組織挙動の再現, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 広島国際会議場, 広島市, 2017年, 10月31日—11月2日.
- [17] 岡野定 雅弘、オケヨ・ケネディ・オモンディ, 半澤 宏子, 武田 志津, 鷺津 正夫, 細胞初期化に向けた電界集中型細胞融合による細胞核交換, 平成29年電気学会全国大会, 富山大学 五福キャンパス, 富山市, 2017年3月15-17日.
- [18] 高橋智博, オケヨ・ケネディ オモンディ, 鷺津正夫, 上田潤, 小穴英廣 「動物細胞クロマチンファイバーに対する化学修飾および凝縮部の光マッピング」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会, 千葉・幕張, pp. 5, (2016 年 9 月 6 日)
- [19] 高橋智博, オケヨ・ケネディ オモンディ, 鷺津正夫, 小穴英廣 「マイクロ流体デバイスを用いた動物細胞染色体の凝縮構造安定性の解析」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 33 回研究会, 東京・駒場, pp. 8, (2016 年 4 月 25 日)

[産業財産権]

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞製造装置

発明者：岡野定雅弘，武田志津，オケヨ・ケ
ネディ・オモンディ，鷺津正夫，

権利者：日立製作所

種類：特許願

番号：34800036

出願年月日：H303 月 30 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/bf05/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：

オケヨ・ケネディ・オモンディ

(Kennedy Omondi OKEYO)

所属機関名・部局名・職名：

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・講
師

研究者番号：10634652