

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02530

研究課題名（和文）微小血管循環培養システムの開発とインビトロ癌シミュレーターとしての応用

研究課題名（英文）Development of a microvascular circulation cultivation system and its application as an in vitro cancer simulator.

研究代表者

杉浦 慎治（Shinji, Sugiura）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副連携研究室長

研究者番号：10399496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、圧力駆動型の生体模倣システム（PD-MPS）を用いた微小血管組織の生体外培養における新しい方法を提案した。PD-MPSを使用することで、空気圧を用いてハイドロゲルに培養液を浸透させながら血管組織を形成することが可能であり、血管組織の形成を促進することが示された。HUVECとMSCを包埋したフィブリンゲルを用いて、2kPaの加圧で培養液を灌流し、血管組織の形成を確認した。また、血管組織の形成に伴い、培養液の流量の増加が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、圧力駆動型の生体模倣システム（PD-MPS）を使用して微小血管組織の生体外培養において新たな方法を提案した。この手法は、血管組織が確実に形成された後に灌流を行わないと、血管組織が破壊される恐れのある従来の方法よりも簡便かつ効果的であることが示された。この手法は、将来的に血液脳関門モデルやオルガノイド培養、がんの転移試験等への利用が期待される微小血管の生体外培養系の開発に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：This study proposed a new method for cultivating microvascular tissues in vitro using a pressure-driven biomimetic system (PD-MPS). By using the PD-MPS, blood vessels can be formed while the hydrogel is penetrated with the cultivation medium using air pressure. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and mesenchymal stem cells (MSCs) were embedded in fibrin gel and introduced into the PD-MPS. Perfusion of the cultivation solution at a pressure of 2 kPa resulted in spontaneous formation of blood vessels within the fibrin gel. An increase in flow rate was observed with the formation of the blood vessels. Blood vessel formation was not observed when cultivation was conducted without perfusion. These results suggest that the PD-MPS is a simpler and more effective method for promoting blood vessel formation in comparison to traditional methods.

研究分野：生物化学工学

キーワード：血管 組織工学 生体模倣システム 灌流培養 マイクロ流体デバイス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微小血管の生体外培養系は血液脳関門モデル、オルガノイド培養、がんの転移試験等への利用が検討されている。微小血管組織を生体外で構築するためにはマイクロ流路の中に形成されたフィブリンゲルやコラーゲンゲルといったハイドロゲルの中や近傍に血管内皮細胞を培養することで自発的に微小血管組織を構築できることが知られている。

このようにして形成した微小血管組織には、シリンジポンプやペリスタポンプにより培養液を灌流することができる。しかしながら、シリンジポンプやペリスタポンプのような流量を制御するポンプを用いて培養液を灌流する場合、血管組織が確実に形成された後に灌流を行わないと、送液のための強い力で形成途中の血管組織やハイドロゲル自体を破壊してしまう恐れがある。この場合、血管組織が形成されるまでの間、ハイドロゲル内の細胞への栄養供給は受動拡散に限定される。

研究開発代表者の杉浦らはこれまでに圧力駆動型の循環培養システム (PD-MPS) を独自に開発してきた。このシステムは、マイクロピペットによる液導入と簡便なアタッチメントによる空圧回路との接続で培養液の循環が可能であり、簡便な培地交換と循環培養のマルチスループット化を実現している。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに開発してきた圧力駆動型の循環培養システムを微小血管組織の培養に応用し、血管組織を生理学的なシェアストレス下で培養する。さらに、癌細胞と血管との相互作用を評価する培養モジュールを開発し、医薬品アッセイ試験のモデル実験を実施することを目的とする。

### 3. 研究の方法

PD-MPS にハイドロゲルチャンバー (灌流方向の長さ 5.6 mm) を設け、圧力駆動型の微小血管培養システムを構築した (図 1)。ヒト臍帯血由来血管内皮細胞 (HUVEC) と間葉系幹細胞 (MSC) を包埋したフィブリンゲルを導入した。フィブリンゲルに対して、0.5 ~ 2kPa の加圧で培養液を灌流した。血管組織の形成の様子を蛍光デキストラン溶液や蛍光微粒子の懸濁液を送液して確認した。対照として同様の実験を培養液の灌流を行わずに行った。

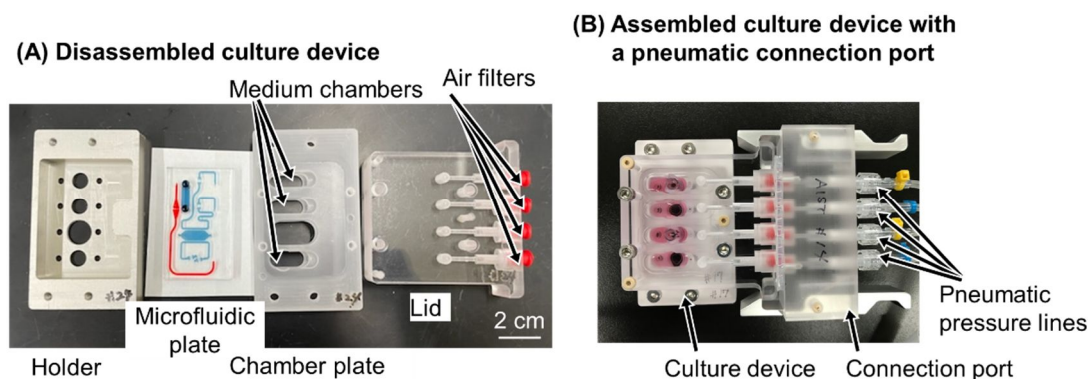


図 1. 圧力駆動型微小血管培養システム。(A) 培養デバイスの構成部品。(B) 組み立て後の培養デバイス。

### 4. 研究成果

培養液の加圧灌流を数日間行ったところ、フィブリンゲル内に内包された HUVEC が自発的に血管組織を構築する様子が確認された (図 2)。また、血管組織の形成に伴い、培養液の流量の増加が確認された (図 3)。一方、同様の構成で培養液を灌流せず、静置培養した場合は血管組織の形成は確認されなかった。形成された血管組織に蛍光デキストラン溶液および蛍光微粒子の懸濁液を流したところ、血管組織に蛍光デキストラン溶液が導入され、蛍光微粒子が流れていく様子が観察された。(図 4)

本研究の圧力駆動型の微小血管組織培養システムを用いると、フィブリンゲルに培養液を加圧灌流することで、培地成分をフィブリンゲルに浸透させることが可能となり、血管組織の形成が促進されたと考えられる。また、本研究で採用したハイドロゲルチャンバーの大きさは灌流方向に対して長さ 5.6 mm と、従来の報告より大きなチャンバーであり、加圧灌流によって、より大きな血管組織の形成が可能となることが示唆された。

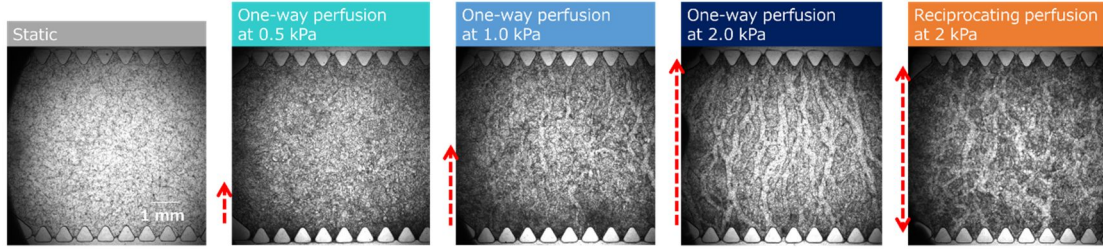


図 2 . 異なる灌流条件下の 6 日目の微小血管形態

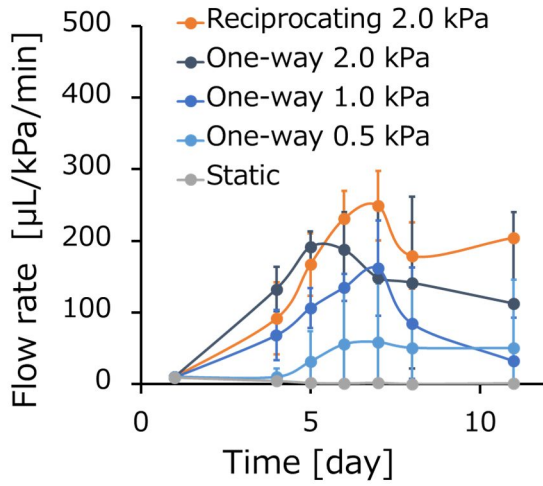


図 3 . 異なる灌流条件における流量変化

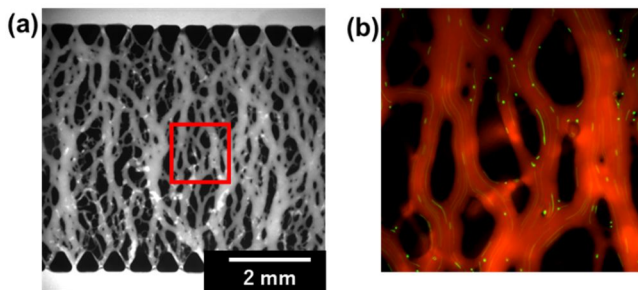


図 4 . 加圧灌流 7 日目の血管組織の蛍光観察像 . (a) 蛍光デキストラン溶液を流した様子 . (b) 蛍光微粒子 (緑) を流した様子 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Uran, Sugiura Shinji, Kakehata Masayuki, Yanagawa Fumiki, Takagi Toshiyuki, Sumaru Kimio, Satoh Taku, Tamura Masato, Hosokawa Yoichiroh, Torizuka Kenji, Kanamori Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Fabrication of Hollow Structures in Photodegradable Hydrogels Using a Multi-Photon Excitation Process for Blood Vessel Tissue Engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 679 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11070679	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamahira Shinya, Satoh Taku, Yanagawa Fumiki, Tamura Masato, Takagi Toshiyuki, Nakatani Eri, Kusama Yuta, Sumaru Kimio, Sugiura Shinji, Kanamori Toshiyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Stepwise construction of dynamic microscale concentration gradients around hydrogel-encapsulated cells in a microfluidic perfusion culture device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 200027 ~ 200027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.200027	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉浦 慎治、進 和美
2. 発表標題 圧力駆動型生体模倣システムによる微小血管組織の構築
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦 慎治
2. 発表標題 圧力駆動型生体模倣システム (PD-MPS) の開発
3. 学会等名 第17回 PhotoLIFEワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	松阪 諭  (Matsusaka Satoshi)  (00372665)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------