

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15415

研究課題名(和文) Living skin-section reconstructed on a microfluidic chip

研究課題名(英文) Living skin-section reconstructed on a microfluidic chip

研究代表者

聶 銘昊 (Nie, Minghao)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・助教

研究者番号：40816485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：厚み百マイクロン以下、真皮と表面から構成される皮膚モデル(皮膚切片チップ)を開発しました。これまでの皮膚モデルより薄いため、顕微鏡下の経時観察が可能となり、薬剤や化粧品の分析がしやすくなる可能性を示した。また、マイクロ加工方法を用いて、細胞やゲルなど皮膚モデルを構築する原材料の使用量の低減ができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚モデルは生体皮膚の機能を模倣できる人工組織で、試薬の有効性や安全性などを臨床試験の前段階で使用されている。これまでの皮膚モデルの皮膚組織の厚みは数百マイクロン以上の厚みがあるため、顕微鏡での観察が困難であり、皮膚組織を薄く切断することが必要となる。切断作業には時間や費用の消耗が生じる。本研究は切断作業が必要なく、顕微鏡観察可能な薄型(50マイクロン以下)皮膚モデルを開発しました。

研究成果の概要(英文)：A thin (<50 microns) skin model consisting of dermis and epidermis, a.k.a. skin-section chip, is developed. Comparing to the major type of skin models, this skin-section chip can be investigated using phase-contrast light microscopes without the need for sectioning and staining. The skin-section chip show to potential to be used for drug-screening and cosmetic development. In addition, the chip-style of construction requires less cells and hydrogels, which can reduce the cost of skin model fabrication.

研究分野：マイクロ加工

キーワード：組織工学 組織チップ 皮膚モデル マイクロ加工

1. 研究開始当初の背景

皮膚は人の最も大きな臓器の一つとも言われ、体内外環境のインターフェイスとなり、外界の環境を隔て人体の恒常性を維持するバリア機能を果たしている。生体の皮膚は真皮や表皮などを持つ多層な構造をもち、毛嚢・脂腺などの付属器を有する複雑な構造で多様なバリア機能を実現している。製薬や化粧品開発において、生体皮膚の構造とそのバリア機能を模倣できる皮膚モデルが求められている。これまでは様々な皮膚モデルが開発されていたが、作製された皮膚組織の厚みは数百マイクロン以上の厚みがあるため、位相差顕微鏡での組織形態の観察は困難である。さらに、表皮層と真皮層の厚みなどの情報を得るために、作成された皮膚組織を薄く(数十マイクロン以下)切断必要がある。この切断された皮膚組織は皮膚切片と呼ばれる。皮膚切片の作製に当たって、組織の固定、包埋、切断、染色などの作業手順が必要となる。上記の各手順の時間や費用のコストが高く、操作でサンプルの損失も生じている。

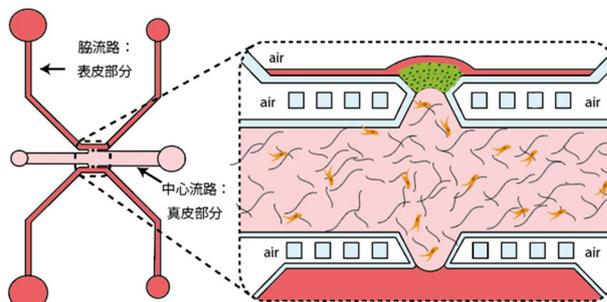


図1 本研究のコンセプト：従来の数百マイクロン以上の厚みがある皮膚モデルの作製原料である細胞やゲルを用いて、マイクロチップの中に数十マイクロンの厚みを有する薄型皮膚モデルを作製する。

2. 研究の目的

図1に示したように、本研究では、切断せずに位相差顕微鏡で観察可能な皮膚モデル(皮膚切片チップ)の開発を目的とする。従来の数百マイクロン以上の厚みがある皮膚モデルの作製原料である細胞やゲルを用いて、マイクロチップの中に数十マイクロンの厚みを有する薄型皮膚モデルを作製する。作製された皮膚モデルが位相差顕微鏡で観察可能とすることで、染色せずに皮膚組織の形態を長時間培養しながら観察する。具体的には、真皮部分の線維芽細胞(NHDF)の遊走や表皮部分の角化細胞(NHEK)の分化などを観察する、さらに、分化マーカーで免疫染色を行う、皮膚組織の形態を確認する。

3. 研究の方法

本研究が提案した薄型皮膚モデルの作製するために、厚み数十マイクロンのマイクロ流路を有するマイクロ流路チップが必要となる。チップ中のマイクロ流路は表皮流路、真皮流路、血管流路の三つの並行している流路から構成されている。真皮流路は中心に配置されており、真皮流路の両側には表皮流路と血管流路がある。隣の流路の間は120マイクロン幅の開き口があることで、流路間の物質拡散は可能である。

皮膚切片チップの作製手順は図2に示している。まず、真皮流路に線維芽細胞が混ぜたゲルを流し込み、ゲル化までインキュベーター内で数分程度培養する。真皮部分のゲルはフィブリン、コ

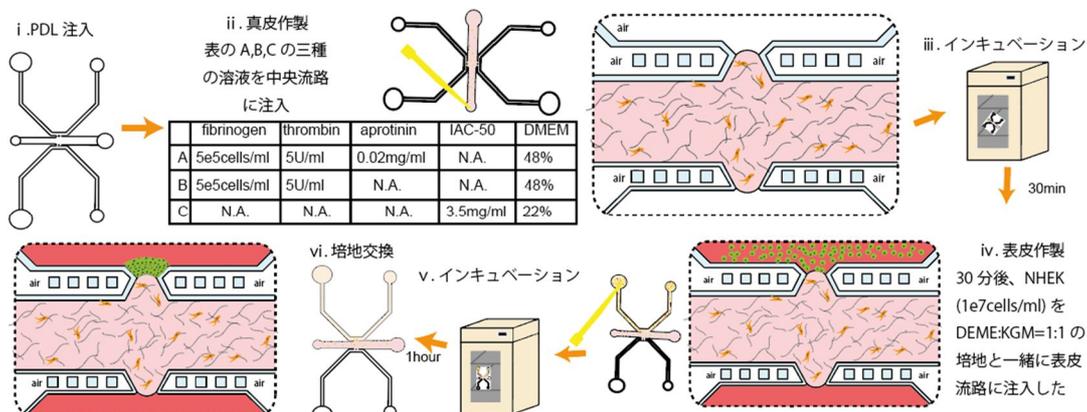


図2 皮膚切片チップの作製手順。

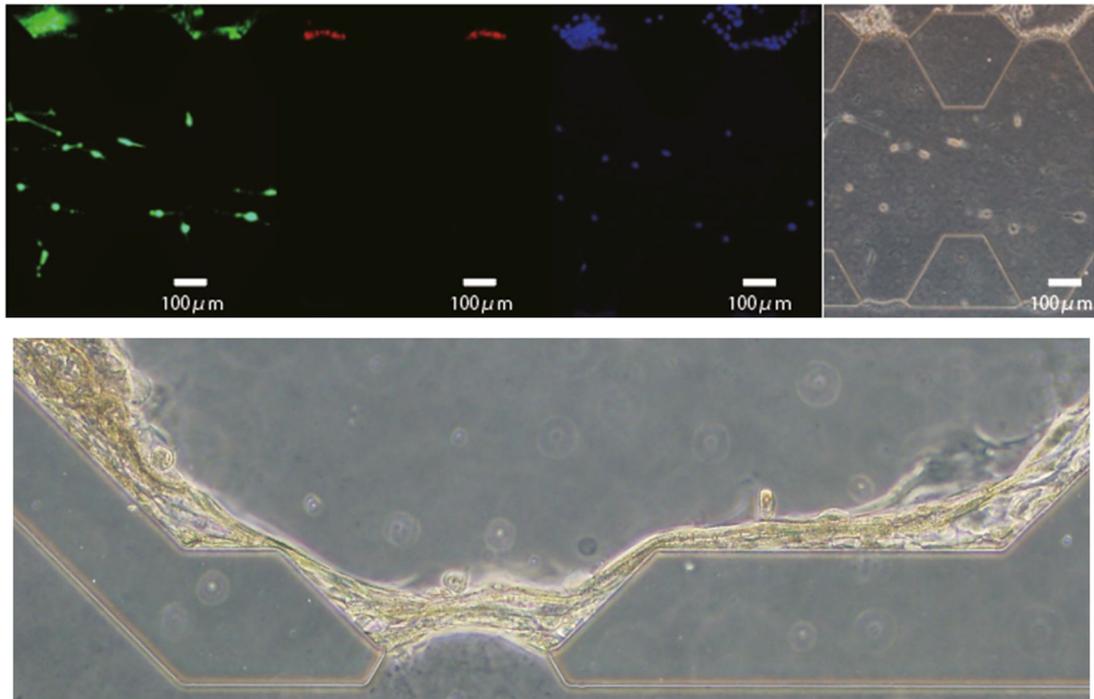


図3 作製された皮膚切片チップ。上：細胞の生存率を評価するための Live/dead assay。緑/赤/青：Live/Dead/DAPI。下：角化細胞の伸びている形態が観察された。

ラーゲン(I-AC 50)やアルギン酸などが選ばれる。真皮流路内のゲルが固まったら、血管流路に線維芽細胞用の培地を流し込み、培地の栄養を流路の間の開口部より供給されながら、線維芽細胞を2-4日間培養する。次に、表皮流路にコーティング剤(Pluronic F-127, 0.2 wt% in PBS(+))を流しこみ、インキュベーター内で1時間位培養し、流路の壁を親水性になることで細胞が接着し難くなる。その後、コーティングを除去し、角化細胞が混ざった角化細胞分化培地を入れ替える。表皮流路が真皮流路の上になるようにマイクロチップを立てながら一晩培養することで角化細胞が真皮ゲルの開口部に接着させて表皮組織を形成する。

4. 研究成果

中心に真皮の流路、上サイドに表皮、下サイドに培地の流路を持つマイクロ流路デバイスを作製した。この際、表面張力により真皮部分が中心の流路から漏れ出ないだけの間隙を両サイド2つずつ、2種類の流路の境界に作成した。この部分が陥没することから、上サイドの流路に表皮細胞を注入した際、間隙部分に集まり、表皮が形成されると考えられた。この流体デバイスはフォトリソグラフィ技術により作製した。

次に真皮部分(5U/ml スロンピン、5mg/ml フィブリン、0.02mg/ml アプロチニン、5e5cells/ml NHDF)を作製し、冷却下で中心流路に注入し、湿潤に保ちながら30分インキュベートした。流路の厚みが25 μm, 45 μm, 100 μmの流路を比較した結果、25 μmのときだけ中心の流路から漏れ出たのが多いため、以降の実験では流路の厚みを45 μmのみにした。真皮組織の注入後、表皮細胞(NHEK)の入った培地(KGM)を上部の流路に注入し、デバイスを垂直に立て1時間インキュベートし、染色をして蛍光顕微鏡で観察した。図3(上)はLive/dead assay染色をした後の写真を示した(10倍)。緑に染まったのが生きた細胞、赤に染まったのが死んだ細胞であり、細胞が生きていることが確認できる。図3(下)は角化細胞播種後4日目の写真を示している。角化細胞は伸びている形態が観察され、未分化のcobblestone様な形態と違って、分化へ進めたと考えられる。

このマイクロナノデバイスにより、この方法で皮膚切片モデルを作製することが可能なことがわかった。また、この方法では作製する皮膚モデルは小さいためより低コストで大量に作製できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Wei Sun, Binil Starly, Andrew C Daly, Jason A Burdick, Jurgen Groll, Gregor Skeldon, Wenmiao Shu, Yasuyuki Sakai, Marie Shinohara, Masaki Nishikawa, Jinah Jang, Dong-Woo Cho, Minghao Nie, Shoji Takeuchi, Serge Ostrovidov, Ali Khademhosseini, Roger D Kamm, Vladimir Mironov, Lorenzo Moroni and Ibrahim T Ozbolat | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 The bioprinting roadmap | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biofabrication | 6. 最初と最後の頁 Number 2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ab5158 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Nie Minghao, Nagata Shogo, Aoyagi Hoshimi, Itou Akane, Shima Ai, Takeuchi Shoji | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Cell-laden microfibers fabricated using μ l cell-suspension | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biofabrication | 6. 最初と最後の頁 045021 ~ 045021 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ab89cb | 査読の有無 有 |
| 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 Nie Minghao, Takeuchi Shoji | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Luer-lock valve: A pre-fabricated pneumatic valve for 3D printed microfluidic automation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomicrofluidics | 6. 最初と最後の頁 044115 ~ 044115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0020531 | 査読の有無 有 |
| 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Minghao Nie, Shoji Takeuchi |
| 2. 発表標題 LIVING SKIN-SECTION ON A CHIP |
| 3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 人工多層組織培養デバイスと人工多層組織の製造方法 | 発明者 二エ ミンハオ 池村 美咲 竹内 昌治 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/042253 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|