

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12594

研究課題名（和文）スフェロイドを用いた血液脳関門（BBB）モデルの作製

研究課題名（英文）Spheroid-based blood-brain barrier (BBB) model

研究代表者

島 亜衣 (Shima, Ai)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任助教

研究者番号：50757309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、血液脳関門（BBB）構成細胞からなるBBBスフェロイドをマイクロアレイ内に配置し、ハイスループットな薬剤透過性試験を実現することであった。市販のヒト初代脳血管内皮細胞を用いてスフェロイドを作製し、これをマイクロアレイに捕捉することに成功した。マイクロアレイ内のスフェロイドに対して蛍光標識したデキストラン溶液を投与し、経時的に同一スフェロイドの断面画像を撮影して蛍光輝度を測定したところ、取り込み量の増加を認めた。また、流れ刺激存在下でも蛍光試薬の取り込み試験が可能であった。ただし、BBBのバリア機能の生理学的特徴を再現するまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BBBは高いバリア機能によって、血液中から脳内への有害物質の侵入を防いでいるが、医薬品の移行が阻害される場合も多い。そこで、中枢神経系を標的とした医薬品の開発においてはヒトBBBの透過性を調べるのが重要である。動物モデルやカルチャーインサートなどの多孔質メンブレンを利用したBBBモデルが一般に用いられるが、透過性試験の効率は高くない。本研究では、より効率的な透過性試験の実施を目指して、BBBスフェロイドとマイクロアレイを組み合わせることで、簡便に、多数のサンプルを一度に評価可能な系を提案し、実現可能性を検証した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to arrange blood-brain barrier (BBB) spheroids, which consist of cells that constitute BBB, in a microarray and demonstrate a high-throughput drug permeability test using them. I prepared spheroids using commercially available human primary brain endothelial cells and succeeded in capturing them on a microarray. A fluorescently labeled dextran solution was administered to the spheroids in the microarray, cross-sectional images of the identified spheroid were taken by confocal microscope over time, and the fluorescence intensity of the images were measured. An increase of fluorescence intensity was observed. In addition, the uptake test of the fluorescent substrate was possible on the microarray even in the presence of flow stimulation. However, the physiological characteristics of barrier function of BBB were not reproduced.

研究分野：細胞生物学

キーワード：組織工学 organ-on-a-chip マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) は脳の微小血管に見られる構造で、脳血管内皮細胞のタイトジャンクションと排出系トランスポータの血管側への局在により、血液中から脳内への物質の移行を制限している。BBB は脳への有害物質や病原体の侵入を阻止して、中枢神経系を保護しているが、医薬品の脳への取り込みも阻害することがあるため、中枢神経系をターゲットとした創薬においては動物モデルや *in vitro* モデルを用いて BBB の透過性を調べるのが必須である。

これまでに提唱されてきた *in vitro* BBB モデルは、カルチャーインサートなどの多孔質メンブレンを利用して二次元的に血管構造を再現するものや、マイクロ流路内に管腔構造を形成させるものがある。前者は一般的な生物学の研究室で取り扱い可能であるため、製薬業界を含めて広く利用されているが、実際の BBB のような BBB 構成細胞同士の直接的接触が困難であり、生体模倣性が低い。後者はカルチャーインサートモデルに比べて、3次元組織である点、血流を模した流れ刺激を負荷可能である点から生体環境に近いが、構築が煩雑であり、薬剤透過性試験のようなアッセイには適していない。

近年、BBB 構成細胞を混合してスフェロイドを形成させると自発的に脳血管内皮細胞が表層に移動し、階層的な構造を構築することがわかってきた。BBB スフェロイドは簡単に数多く構築できる3次元組織であり、表層の脳血管内皮細胞をターゲットとした流れ刺激負荷や薬剤透過性試験が可能であることから、従来のモデルの欠点を補う新たな *in vitro* BBB モデルになると考えられる。ただし、多数の BBB スフェロイドを効率よくアッセイしたり、同一スフェロイドについて経時的に観察したりするための工夫が必要である。そこで、本研究では、3次元組織である BBB スフェロイドを構築し、マイクロ流路と組み合わせてスフェロイドの制御や薬剤投与を効果的に行うことで、ハイスループットな透過性試験の実現を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトから構成される血液脳関門 (BBB) スフェロイドを、マイクロ流路内のアレイに配置して制御することで、ハイスループットに薬剤透過性試験を行える系を構築することである。医薬品の開発においてヒト BBB の透過性を調べることは重要であるが、3次元の血管構造を持ち、かつ高効率に透過性試験を行えるモデルは存在しない。本研究では、BBB スフェロイドをマイクロアレイ内に配置し、蛍光試薬を投与することで、顕微鏡観察により同時に多数の BBB スフェロイドの透過性を評価可能であることを示す。

3. 研究の方法

(1) BBB スフェロイドの作製

BBB 構成細胞として、市販の初代ヒト脳血管内皮細胞 (iXCells Biotechnologies 社)、ペリサイト (ScienCell Research Laboratories 社)、アストロサイト (ScienCell Research Laboratories 社) を用いた。脳血管内皮細胞のみ、または3種類の細胞を混合して、低接着性 U 底 96 ウェルプレートに播種し、内皮細胞用培養液でスフェロイドを作製した。細胞数や培養日数とスフェロイドの大きさの関係を調べて、マイクロアレイに配置しやすい大きさのスフェロイドの作製条件を決定した。また、スフェロイド作製時の脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの細胞数の比を変化させて、構築したスフェロイドの表面を脳血管内皮細胞が完全に覆う条件を検討した。この時、脳血管内皮細胞の CD31 や VE-cadherin に対する免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡で観察することで評価した。さらに、脳血管内皮細胞のバリア機能の評価として、ZO-1 についての染色も行った。

(2) マイクロアレイの設計と作製

マイクロアレイは研究代表者の所属する、東京大学・竹内研究室が開発した、ビーズやリポソームを捕捉可能なダイナミックマイクロアレイ (Tan and Takeuchi, PNAS, 2008) のデザインをベースとし、(1) で作製したスフェロイドの大きさに合わせて、流路の径と高さを変更した。設計したマイクロアレイは当初、光硬化性樹脂 SU-8 を用いてモールドを作製したが、スフェロイドを破損させることなく流路内に配置するためには想定より高い流路が必要であったため、途中より高精度 3D プリンタを用いた作製に切り替えた。モールドをパリレンコーティング後、シリコーンゴム (PDMS) に転写して流路を作製し、表面をプラズマ処理することでガラスにボンディングした。実際に作製したスフェロイドを用いながら、スフェロイドの破損などの失敗なくマイクロアレイに配置するために、流路入口の距離等を最後に調整した。

(3) 透過性試験

(1) で作製した BBB スフェロイドを、ヘキスト 33342 で核染色後、(2) のマイクロアレイに配置し、緑色蛍光色素 FITC で標識された 10 kDa デキストランを 1 μ M 濃度で投与した。まずは流れ

刺激を与えず、流路内を FITC-デキストラン溶液で満たした状態（静置条件）で、37°Cの湿室にマイクロアレイを置き、0分（FITC-デキストラン溶液投与前）、投与後 30分、60分の時点で、共焦点顕微鏡でスフェロイドの断面写真を撮影した。スフェロイド内部への FITC-デキストランの経時的な移行（透過性）を評価するため、スフェロイド内部に関心領域（ROI）を定め（なお、これは細胞核の染色画像により決定した）、緑色蛍光輝度を ImageJ で測定した。次に、シリンジポンプを用いて FITC-デキストラン溶液を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で投与し、静置条件と比較した。

4. 研究成果

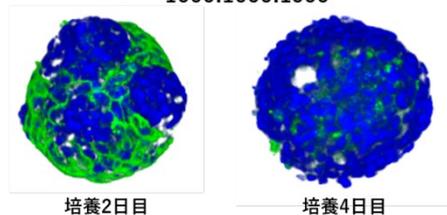
(1) BBB スフェロイドの構築

まず、先行研究（Cho et al., Nat. Commun., 8: 15623, 2017）にならって、脳血管内皮細胞:アストロサイト:ペリサイト=1000:1000:1000 で、合計 3000 細胞のスフェロイドを作製した。内皮細胞マーカー CD31 に対する免疫蛍光染色を行ったところ、この BBB 構成細胞混合スフェロイドでは、培養 2 日目の段階で、最表面の脳血管内皮細胞層に部分的に穴が空いていることがわかった（図 1）。また、培養 4 日目には脳血管内皮細胞が最表面から消失した。これは、アストロサイトやペリサイトが増殖あるいは移動したためと考えられる。脳血管内皮細胞で表面が完全に覆われていないと、正確な透過性試験が行えないことから、アストロサイト、ペリサイト数を徐々に減らしてスフェロイドを作製したところ、脳血管内皮細胞:アストロサイト:ペリサイト=1000:100:100 にしたときに、最表面を完全に脳血管細胞が覆った。しかし、この条件のスフェロイドでは、アストロサイトマーカー S100 や GFAP、ペリサイトマーカー calponin を免疫蛍光染色で検出できず、スフェロイド形成過程でこれらの少数細胞が排斥されている可能性が示唆された。細胞数比の検討のほか、アストロサイトやペリサイトの増殖を抑制する目的で無血清培養液を使用したり、初代培養細胞に代えてヒト脳血管内皮細胞株である hCMEC/D3 でスフェロイドを作製したりしたが、最表面を脳血管内皮細胞で完全に覆う 3 種類の BBB 構成細胞からなるスフェロイドの構築条件を確立するには至らなかった。

そこで、脳血管内皮細胞のみからなるスフェロイドを作製した。細胞数を 1400, 1800, 2200 と変化させると、スフェロイド径はそれぞれ平均 207, 225, 243 μm となった（図 2）。タイムラプス観察をすると、細胞播種後 4 時間ほどで細胞は凝集して集合体を作り始め、その後はスフェロイドの大きさが継続して縮小した。培養 1 日目のスフェロイドは縁がはっきりとして形状もスムーズだったが、培養 2 日目には形状が崩れ始めた。96 ウェルプレートから途中で 24 ウェルプレートへスフェロイドを移動させたり、培地交換の量や頻度を増やしたりしても改善されず、長期間形状の整ったスフェロイドを維持することはできなかったため、以下の実験において、脳血管内皮細胞スフェロイドは構築後 1 日目に使用することとした。

作製後 1 日目の 1800 細胞脳血管内皮細胞スフェロイドを固定し、内皮細胞マーカー CD31 と VE-cadherin について免疫蛍光染色を行うと、発現が確認された（図 3）。また、バリア機能を有するかどうかを調べるために、タイトジャンクションに発現する ZO-1 についても免疫蛍光染色をおこなったところ、細胞同士の接着部位に発現していた。

脳血管内皮細胞:アストロサイト:ペリサイト
=1000:1000:1000



脳血管内皮細胞:アストロサイト:ペリサイト
=2000:100:100

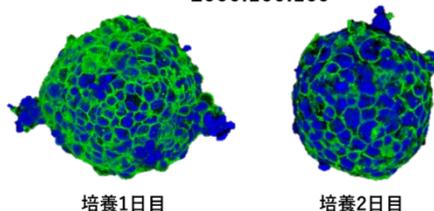


図 1. BBB スフェロイド作製のための脳血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトの細胞数の検討。内皮細胞マーカー CD31（緑）と細胞核（青）を染色後、共焦点顕微鏡で撮影した Z-stack 画像から三次元イメージを構築した。

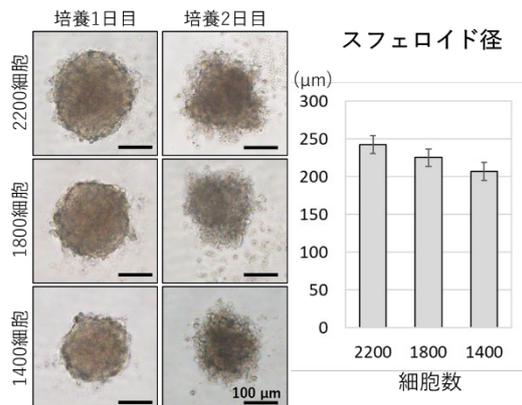


図 2. 脳血管内皮細胞スフェロイドの細胞数とスフェロイド径の関係。

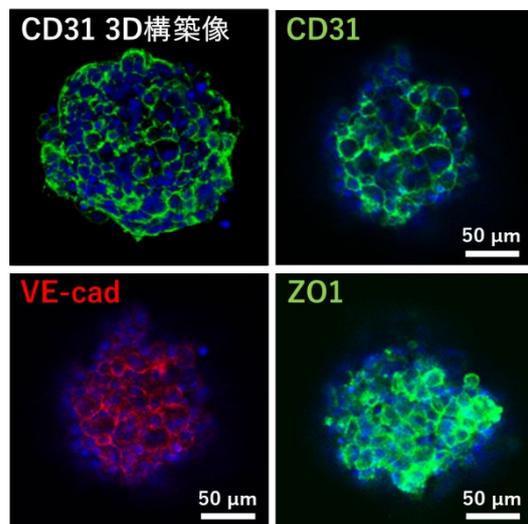


図 3. 脳血管内皮細胞スフェロイドの免疫染色。内皮細胞マーカー CD31, VE-cadherin, タイトジャンクションに発現する ZO-1 の発現を共焦点顕微鏡で観察した。左上は Z-stack 画像からの三次元構築像。

(2) マイクロアレイへの BBB スフェロイドの配置

マイクロアレイの作製にあたり、流路は 200 μm 、流路の高さは 180 μm とした (図 4)。マイクロアレイは一度に 10 個のスフェロイドを捕捉可能で、それぞれのスフェロイドの位置を特定しながら、蛍光試薬や流れ刺激をスフェロイドに与えることができる。1400、1800、2200 細胞からなる脳血管内皮細胞スフェロイド (培養 1 日目) については、図 2 で示したような細胞数とスフェロイド径の関係が得られている。マイクロアレイを脱気し、血清を含有した培養液で一度内側を洗った後に、これらの 3 種類のスフェロイドを、それぞれマイクロピペットを使って導入した。その結果、1800 細胞からなるスフェロイド ($225 \pm 12 \mu\text{m}$) だと、破損や詰まりなどの問題なく補足されることがわかった (図 5: 10 カ所の補足部位のうち、9 カ所にスフェロイドが補足された様子)。2200 細胞からなるスフェロイド ($243 \pm 12 \mu\text{m}$) は流路の途中で詰まったり、無理に流そうとして破損したりするなどの問題があった。よって、次の透過性試験は 1800 細胞からなる脳血管内皮細胞スフェロイドを用いた。

(3) 透過性試験

培養 1 日目のヒト脳血管内皮細胞スフェロイドをヘキスト 33342 で核染色後、マイクロアレイに捕捉して、共焦点顕微鏡でスフェロイドの断面画像を撮影した。その後、アレイ内に FITC 標識した 10 kDa デキストランを 1 μM 濃度で投与し、37°C で 30 分、60 分反応後に同様に断面画像を撮影した (図 6)。マイクロアレイを用いることで、同一スフェロイドについて 0、30、60 分時点の画像を取得することが可能であった。図 6 では例として 4 つのスフェロイドについて、経時変化の写真を示す。合計 10 個のスフェロイドについて観察し、それぞれの蛍光輝度を測定したところ、反応時間が長くなるにつれて、蛍光輝度が増加する傾向が認められた。ただし、増加の割合はスフェロイドごとにばらつきが見られた。60 分以上の透過性試験も試みたが、FITC デキストラン含有ハンクス栄養塩溶液中では、次第にスフェロイドの形状が崩れてきたため、バリア機能が維持されていないと判断した。また、今回は VEGF の有無による透過度の違いなどを検出できておらず、現段階では生理的な BBB のバリア機能を再現できているとはいえない。これが、用いた脳血管内皮細胞やスフェロイドの構築条件によるものなのか、画像解析による透過性の評価によるものなのかは今後検証する必要がある。

最後に、マイクロアレイに配置したスフェロイドに、流れ刺激下で蛍光試薬を投与可能であることを確認した。蛍光試薬はシリンジポンプを用いて流速を調整して流路入口から投入した (図 7)。このとき、ヒータを用いてマイクロアレイが 37°C に維持されるようにした。流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 20 分間、FITC 標識した 10 kDa デキストランを投与したところ、スフェロイドの破損は見られず、流れ刺激を付加可能であることが示された。ただし、今回は静置条件と比べて、流れ刺激付加による差は認められず (図 8)、流速や反応時間についてはさらなる検討が必要である。

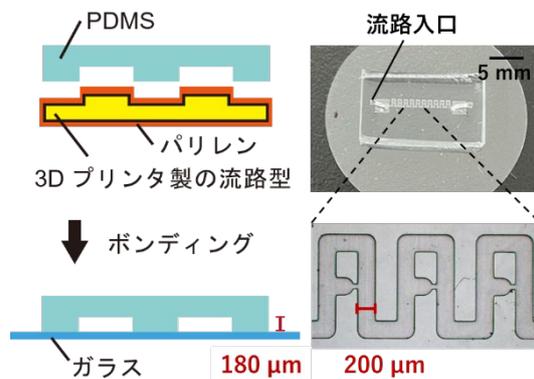


図 4. 作製したマイクロアレイ

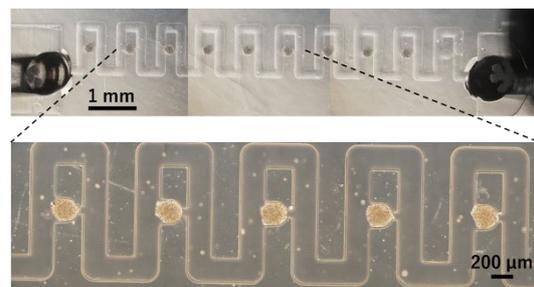


図 5. マイクロアレイへの脳血管内皮細胞スフェロイドの配置

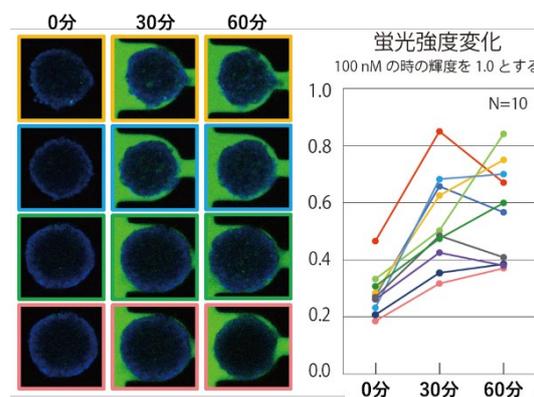


図 6. FITC-10 kDa デキストラン溶液添加前後のマイクロアレイに配置されたスフェロイドの断面画像および緑色蛍光輝度値。左写真の各スフェロイドの枠線の色は右グラフの輝度値に一致する。



図 7. 流れ刺激下の蛍光試薬の透過性試験

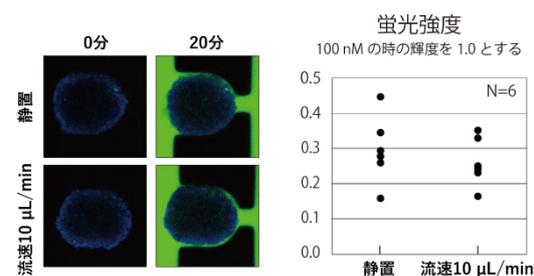


図 8. FITC-10 kDa デキストラン溶液を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で添加した際のマイクロアレイに配置されたスフェロイドの断面画像および緑色蛍光輝度値。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島垂衣、竹内昌治
2. 発表標題 マイクロ流路を利用した血液脳関門（BBB）スフェロイドチップ
3. 学会等名 第22回再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ai Shima, Minghao Nie, and Shoji Takeuchi
2. 発表標題 BLOOD-BRAIN BARRIER SPHEROID ARRAY FOR DRUG-UPTAKE ASSAY
3. 学会等名 MicroTAS 2021（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------