

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19887

研究課題名（和文）三次元組織の血管化と持続的な培養を実現する人工ヒト血管床の開発

研究課題名（英文）"Development of an Artificial Human Vascular Bed for Vascularization and Sustained Culture of Three-Dimensional Tissues"

研究代表者

三浦 重徳 (Miura, Shigenori)

広島大学・医系科学研究科（歯）・准教授

研究者番号：70511244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：生体外3次元培養組織への血管導入と灌流による長期培養を実現する人工ヒト血管床デバイスの開発を目的とした。マイクロポスト構造を介してマイクロ流路と円形オープンチャンバーが隣接して配置された血管床デバイスを独自に設計・作製した。本デバイスにハイドロゲル、ヒト血管内皮細胞等を導入して培養することで管腔構造を有する直径6mmの人工ヒト血管床の構築に成功した。また、血管床の細胞組成や培地導入法などを検討することで血管床の部分灌流を実現することができたが、組織への血管導入法については引き続き検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、組織工学やオルガノイドを用いた生体外組織モデルの研究が注目を集めているが、より大型の組織または発生後期の臓器を構築するためには、組織への血管導入および灌流培養の実現が喫緊の課題である。本研究で開発を進めてきた人工ヒト血管床デバイスは、マイクロ流路に連結された人工ヒト血管床をミリメートルサイズのオープンチャンバー内に構築したもので、マイクロ流路に送液することで血管床の灌流培養が可能である。今後、チャンバー内に設置した3次元組織と人工血管網との効果的な連結を実現できれば、生体外における“組織/臓器生育デバイス”としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop an artificial human vascular bed device capable of long-term culture through vascular integration and perfusion into three-dimensional cultured tissues. We designed and fabricated an original vascular bed device in which a microchannel and a circular open chamber were arranged adjacently via a micropost structure. By introducing and culturing human vascular endothelial cells in composite hydrogel into the device, we successfully constructed a 6 mm diameter artificial human vascular bed with a luminal structure. Furthermore, we achieved partial perfusion of the vascular bed by optimizing factors such as cellular composition and the method of medium introduction, though further investigation is needed regarding the method of vascular integration into the tissue.

研究分野：組織工学

キーワード：血管ベッド BioMEMS 灌流培養 血管導入 長期培養 オルガノイド 管腔形成 マイクロ流路

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、組織工学の目覚ましい進歩により様々な組織の構造や機能を *in vitro* で再現することが可能となった。スフェロイドや細胞シート、細胞ファイバなどを用いたボトムアップティッシュエンジニアリングをはじめ、幹細胞を用いて発生工学的に臓器形成を再現するオルガノイド培養など、多様なアプローチにより三次元組織の構築が試みられている。しかしながら、構築した3次元組織を生体外で成長または機能的に成熟させることは依然として困難であり、培養可能な組織の大きさや *in vitro* における生体機能の発現には大きな制約がある。多くの組織工学研究者は、構築組織内に人工的な管腔構造を導入するなどして、組織と灌流系との連結を試みているが、組織形成に付随した動的な血管網の形成はほとんど誘導されず、有機的な連結には成功していない。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞による脈管形成能を利用してミリメートルサイズの灌流可能な人工ヒト血管ネットワーク（血管床）をマイクロ流体デバイス内に構築し、その上で三次元組織を培養することで、組織形成と灌流系との連結および培養組織の三次元的な血管化の実現を目指す。血管床と組織の連結は、栄養供給性を飛躍的に改善し、培養組織のスケールアップを可能にするだけでなく、組織-血管相互作用に基づく複合的な組織形成が促進されると考えられ、組織工学またはオルガノイド研究が抱える既存の課題を打破する新たな基盤技術になると期待される。

3. 研究の方法

① マイクロポスト型血管床デバイスを用いた人工ヒト血管床構築

マイクロポスト型デバイスは、中央に円形のオープンチャンバー（直径 6 mm）があり、その周囲を取り囲むようにコネクティングチャンネル（1本）、培地灌流チャンネル（2本）、線維芽細胞チャンネル（2本）が配置され、流路間は連続的に設置されたマイクロポストで区切られた設計とした。マイクロ流路はいずれも高さ 200 μm である。血管床作製にあたり、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞と皮膚線維芽細胞および数種の細胞外マトリックスを特定の比率で混合して図 1 に示す該当チャンネルに注入し、ゲル固化後 CO₂ インキュベーター内で培養した。

② セルカルチャーインサート型血管床の構築

市販のセルカルチャーインサートのフレームに独自に加工したパリレン細孔膜を張ったもので、膜上の貫通孔を起点としてインサート膜底面側からインサート内部のゲル層に向けて管腔形成が進行する設計とした。

③ 血管床の評価

血管床の構造は、光断層撮影（OCT）により非破壊的に観察した。血管ネットワークおよび管腔構造は、サンプルを PFA で固定後、CD31 抗体による免疫染色で評価した。必要に応じて透明化試薬にてサンプルを処理し、共焦点顕微鏡、ライトシート顕微鏡を用いて3次元構造を観察した。

④ 血管床の灌流

インクの培地灌流チャンネルへの注入や共焦点レーザー顕微鏡などにより、血管床の管腔が培地灌流チャンネルに連結していることを確認する。血管床の灌流は、培地灌流チャンネル A のインレットから送液し、同チャンネルのアウトレットおよび培地灌流チャンネル B のインレットを閉塞することで、血管床を介した流れが生じ培地灌流チャンネル B のアウトレットから排出されるよう送液路を限定して行った。

4. 研究成果

i) マイクロポスト型人工ヒト血管床の構築

PDMS (Polydimethyl siloxane) を用いてモールドイングすることによりマイクロポスト型血管床デバイス（図 1A）を作製し、血管床を構築した（図 1B）。マイクロ流路と人工血管網との吻合率は、血管床の灌流性に関わる重要な要素であるため、その向上を目指した条件検討を行った。共培養する線維芽細胞の播種密度の最適化や血管床に接する培地流路中に血管新生を促進する growth factor カクテルを添加することで、吻合部の形成効率に改善が認められた。また、HUVEC 以外の数種の血管内皮細胞についてもデバイス上で管腔構造を持つ自発的な血管網の形成が認められ、血管床構築に利用可能な内皮細胞を新たに見出した。ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞に

についても検討を行ったが、管腔形成能が低く iPS 細胞株の選別または分化誘導条件のさらなる検討などが必要であることが判明した。

ii) 人工ヒト血管床の管腔連続性の確認
項目 i) で作製した血管床において、連続した管腔構造が形成されているかを確認するために血管内皮マーカー CD31 抗体で免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて血管網を観察した。培地灌流チャネル-コネクティングリング間、コネクティングリング-血管床エリア間のマイクロポスト間隙には開口構造および管腔構造がそれぞれ確認され、血管様管腔構造を認めた。血管床中央部では、管腔径は小さいものの、血管ネットワークの顕著な不連続性は認められなかった。そこで、培地灌流チャネルに青色インクを注入することで管腔構造を可視化したところ、いずれのデバイスにおいても培地灌流チャネルから血管床外縁部（マイクロポストから血管床中央に向けて 1/3 程度）にかけて高い灌流性が確認できたが、血管網全体の可視化には至らなかった（図 2）。

iii) 血管床の評価と問題点の改善
血管床の灌流性向上を目的として、血管床中央部の灌流が困難であることの原因究明と改善策について検討を行った。まず、血管床内に形成された血管径の分布を明らかにするために、培養 7 日目において血管床を CD31 で免疫染色し、3 エリアに分けて血管径を計測した。血管床外縁部の血管径は約 62 μm 、内縁部では約 30 μm 、中央部では約 12 μm であり、血管床外縁部から中央部にかけて血管径が極端に小さくなっていることが判明した。一方、光干渉断層撮影(OCT)により培養期間中の血管床の厚さの変化を観察したところ、血管床中央部では厚みの減少が著しく、培養に伴って血管床中央部が陥没した凹型構造へと変形していることがわかった。この陥没により血管床中央部の細胞、ECM 密度が増加し、血管径が小さくなっていると推察された。そこで、血管床中央部の陥没を物理的に防止するため、ピラーを環状に配置したインサート（ピラーインサート）を 3D プリンタで造形し、血管床エリアに設置して培養を行った（図 3A）。その結果、ピラーインサートを用いない場合、培養 15 日目の血管床中央部の厚みは約 0.84 mm であったのに対し、ピラーインサートを配置した場合は約 1.9 mm に維持されていた（図 3B, C）。これに伴って、血管床中央部にはより太い血管網が形成される傾向が見られ、灌流性の改善に向け大きく前進した。

iv) 血管床の灌流

マイクロポスト型デバイスを用いた血管床灌流法について引続き検討を行った。血管床を構成する血管内皮細胞と線維芽細胞の混合比を変えることで、培養後期に問題となる血管床の収縮と血管径の制御が可能であることがわかった。そこで、培養 5 日目までに灌流可能な径をもつ血

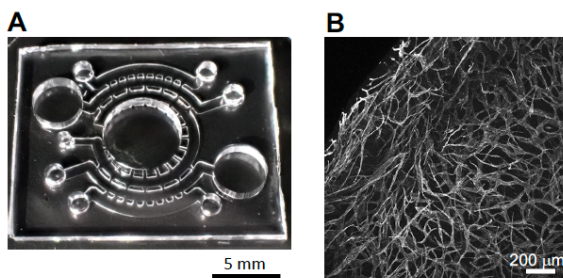


図 1. (A) マイクロポスト型血管床デバイス. (B) 血管床外縁付近の血管網 (CD31 染色)

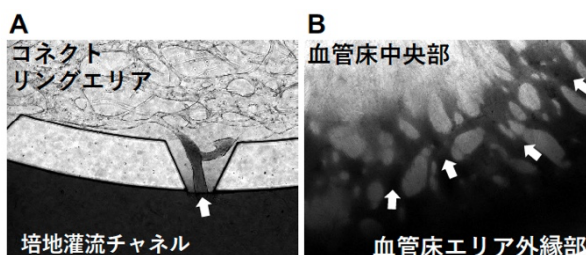


図 2. 血管床灌流性の確認. (A) 培地灌流チャネルに青色インクを注入すると、マイクロポスト間隙に形成された血管開口部からインクが入る様子が観察される. (B) 血管床外縁部から中央部へとインクが入っていく様子. インクは中央部には到達しなかった.

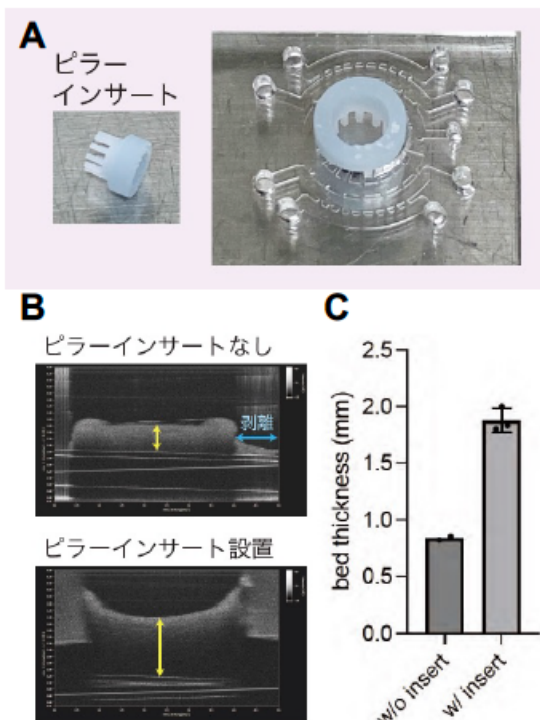


図 3. ピラーインサートによる血管床陥没防止効果. (A) ピラーインサート. (B) 培養 15 日目血管床の OCT 像. インサートを設置すると、血管床のチャンバー側面からの剥離と陥没が防止されている. (C) 培養 15 日目血管床厚の定量結果.

管網を作製し、培地灌流チャネルの出入口にカップ状の培地供給部を設置して振とう器上で培養することで静水圧による血管床の灌流を試みた。しかしながら、培養早期から培地チャネルを灌流すると、培地チャネルに接続されるべき血管網開口部の形成率が大幅に低下する傾向（ほとんど形成されない）が認められた。これは、線維芽細胞チャネルから培地灌流チャネルに放出される分泌因子が灌流によってデバイス外に流出したため、開口部形成率低下したと推察している。今後、灌流開始時期についても慎重に検討を要することが新たに判明した。

v) トランズウェル型血管床の構築

代替案として、トランズウェル型血管床についても検討を行った。市販のセルカルチャーインサートのフレームに独自に加工したパリレン細孔膜を装着したもので、インサート内には血管床の足場となるハイドロゲルを、膜外側に血管内皮細胞を播種した。パリレン膜細孔の大きさ、形状、貫通孔面積について検討することで血管形成条件を最適化した。CD31 で免疫染色、組織透明化処理後、ライトシート顕微鏡を用いてインサート内に形成された3次元血管網可視化した。その結果、xy平面上に広がって血管網が形成されるマイクロポスト型血管床とは異なり、パリレン膜上の細孔を起点として垂直方向(z軸方向)に伸びた血管床の形成を認めた(図4)。本血管床構築法は、我々が先行研究で開発したトランズウェル型灌流デバイスと組み合わせることで、血管の走行方向に効果的に送液できると考えられ、新たな血管床構築法を見出すことに成功した。

vi) 組織への血管導入に関する検討

血管床が3次元組織の長期培養に有用であることを実証するため、培養ヒト皮膚組織の構築に関する検討を行った。これまでに、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて構築した真皮組織内に血管網を形成することに成功しており、同組織にケラチノサイトを重層して表皮の階層構造を形成することで、血管床と気-液界面培養皮膚モデルとの統合を進めている。

本研究を通じて、血管走行性の異なる2通りの血管床構築法を開発し、灌流法、血管床への皮膚組織積層法についても基盤となる技術開発に取組み、血管床を利用した3次元組織の長期培養法の確立に向け新たな方向性を見出すことができた。

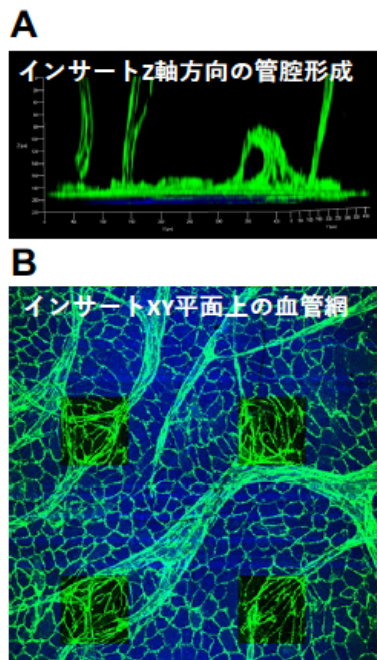


図4. トランズウェル型血管床.
(A) インサート内に形成された培養14日目血管床のCD31染色像. 3次元構築像.
(B) インサート膜上に形成された血管内皮層とインサート側に萌出した血管管腔構造.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shigenori Miura, Yuya Morimoto, Tomomi Furihata, Shoji Takeuchi	4. 巻 6
2. 論文標題 Functional analysis of human brain endothelium using a microfluidic device integrating a cell culture insert	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 16103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0085564	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Morita T, Nie M, Miura S and Takeuchi S
2. 発表標題 Bioprinting soft collagen tissues embedded with perfusable branching channels.
3. 学会等名 MicroTAS 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦 重徳、轟 銘昊、竹内 昌治
2. 発表標題 3次元組織の血管化と灌流系への連結を可能とする人工ヒト血管床デバイスの開発.
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 智博、轟 銘昊、三浦 重徳、竹内 昌治
2. 発表標題 3Dプリンティングによる灌流可能な分岐チャンネルが埋め込まれた軟質コラーゲン組織.
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 聶 銘昊
2. 発表標題 バイオハイブリッドロボットのためのバイオファブリケーション技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会第47回研究会（招待講演）
4. 発表年 2023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	聶 銘昊 (Nie Minghao) (40816485)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・講師 (12601)	

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