

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651134

研究課題名（和文） マイクロ血液脳関門の開発

研究課題名（英文） Development of micro blood-brain barrier

研究代表者

佐藤 記一 (SATO KIICHI)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50321906

研究成果の概要（和文）：血液脳関門のマイクロモデル開発をめざし、細胞培養支持体として多孔質膜を挟み込んだ PDMS マイクロチップを作製し、膜の両面にアカゲザル由来の血管内皮細胞株およびヒト由来の上皮様細胞株を共培養した。得られたデバイスを用いて蛍光色素の透過性試験を行い、デバイス内に形成された細胞シートが透過性バリアとして機能していることを確認した。

研究成果の概要（英文）：PDMS microchip with a porous membrane for cell culture support was developed as a micro model of the blood-brain barrier. Vascular endothelial cell line from monkey and human fibroblast-like cell line were co-cultured on both sides of the membrane. Permeability tests of fluorescent molecules were conducted with the microfluidic device. I confirmed the cell sheet in the device acted as a permeability barrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロチップ、血液脳関門、動物実験代替法

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品開発コストの高騰が世界的に問題となっており、コストと時間のかかる臨床試験の成功率を上げ、社会的に削減の要請が強い動物実験を減らすため、細胞レベルでのスクリーニングにおいて、優秀な候補物質のみを効率よく選定することが重要になっている。そのためには、薬理活性だけでなく、薬が効率よく標的組織に到達するかどうか調べる必要がある。

この問題は、脳に作用する薬剤、すなわち脳腫瘍に対する抗がん剤や、精神疾患などに用いられる中枢神経作用薬の開発時において特に重要である。それは脳の毛細血管にある

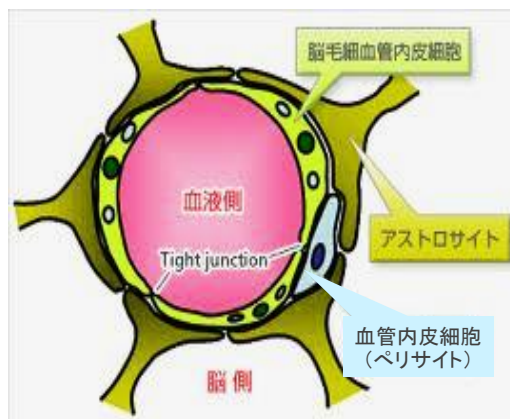


図1 血液脳関門の模式図

血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が血液から脳への物質移行を厳しく制限しているからであり、BBB 透過性を簡便迅速に検定するシステムの開発は脳に作用する薬剤開発にとって必須である。

しかしながら現時点において、動物実験以外で BBB 透過性を検定できる分析法は極めて限定的であり、性能や効率、コストの点で要求を満たしているとは言い難く、より効率的なシステムの開発が求められている。

私はこれまでにマイクロチップ内に模擬腸管を作製し、腸管吸収性を検定できるマイクロシステムの開発に成功しており、この考え方を応用することで効率的に BBB 透過性を試験できるシステムが開発できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

BBB 透過性を検定できるマイクロチップシステムを開発することを本研究の目的とした。すなわち、マイクロチップ内に毛細血管に見立てた微細流路を作製し、ここに血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト3種類の細胞を共培養することにより模擬的な BBB を構築し、このマイクロ BBB を用いて脳に作用させる薬剤の透過性試験を行い、システムの性能評価を行うことを目指した。

用いる細胞、培養部の構造や素材、流量や培養条件などを検討することにより、システムの最適化を行い、従来法よりもより実際の系に近い環境を作り出すことにより、適切な細胞間コミュニケーション系を構築させ、実際の BBB に近い透過性能を発揮させることを目指した。

以上を実現することにより、脳に作用させる薬剤の脳への移行性を検定するバイオアッセイシステムを実現することが可能となり、医薬品探索の性能および効率向上、コストダウンが期待され、医薬品開発の一助になると期待できるだろう。

なお、本研究は萌芽的研究段階にあるため、動作原理の検証が目的である。そのため、本来用いるべきヒト由来初代細胞の代わりにより安価で実験しやすい細胞株を用いてシステム開発を試みることにした。

3. 研究の方法

(1) チップの作製と表面処理

毛細血管に模したマイクロ流路を設計した。2枚の PDMS シートに血管側、脳側2本の流路が上下に接するように造形し、その

間に多孔質支持膜を挟み込むことでチップを作製した。その膜の両面に、あわせて3種類の細胞を培養し、これをマイクロ BBB とした。多孔質膜には細胞の配置、接着性、分化の制御のために必要な表面修飾をあらかじめ施した。この部位での細胞培養の制御が本研究の最も重要な要素技術となるため、膜の素材や表面修飾方法、流路構造や細胞播種方法、細胞培養条件など、時間をかけて検討することにより、実際の BBB により近い性質を有したマイクロ BBB の構築を目指した。

(2) 細胞の選定

BBB 透過試験を行うのに適した細胞を選定した。ヒトの体内では、血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト3種類の細胞が BBB を形成している。作製するデバイスで培養する細胞についてこの3者の代わりとなる細胞の組み合わせを選定した。培養しやすさ、安定性、入手しやすさ、分化状態などを考慮に入れ、研究初期に用いる培養しやすい組み合わせや、薬物透過の選択性がヒトの体内になるべく近くなる組み合わせなど、いくつかを候補として選定した。同時に、培地組成など各細胞の培養条件についても検討した。

(3) 培養及びアッセイ操作の確立と簡便化

実際にバイオアッセイで利用するためには操作が容易であることと、再現性が高いことが必要である。BBB の性能を妨げない範囲で、細胞培養工程を簡略化できるか、試料導入の送液系を簡便化できるかについて検討した。

4. 研究成果

(1) チップの作製、表面処理と細胞の選定

PDMS マイクロチップ内に毛細血管に見立てた微細流路を作製し、ここに血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト3種類の細胞を配置し、共培養することにより、実際の BBB を模倣したマイクロ BBB を構築することを目指してデバイス開発を行った。チップはスライドガラス上にマイクロ流路を造形したポリジメチルシロキサン (PDMS) シートを貼り合わせて作製した。

その際、PDMS シート間に多孔質ポリカーボネート膜を挟み込み、これを細胞培養の支持膜とした。フィブロネクチンやコラーゲンなど細胞外マトリックスをコーティング後、実際にモデル細胞の培養を試みた。開発するマ

マイクロモデルでは最終的には血管モデルとしてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) または正常ヒト脳毛細血管内皮細胞と、正常ヒト脳毛細血管周皮細胞を用いることが最適であると考えられたが、これらの細胞はかなり高価であり、取り扱いが容易でないため、本研究においてはアカゲザル由来の血管内皮細胞株およびヒト由来の上皮様細胞株を用いた。

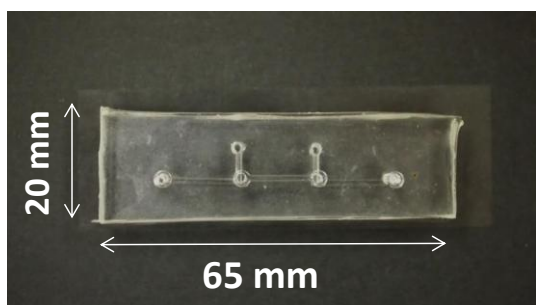


図2 マイクロBBBチップ

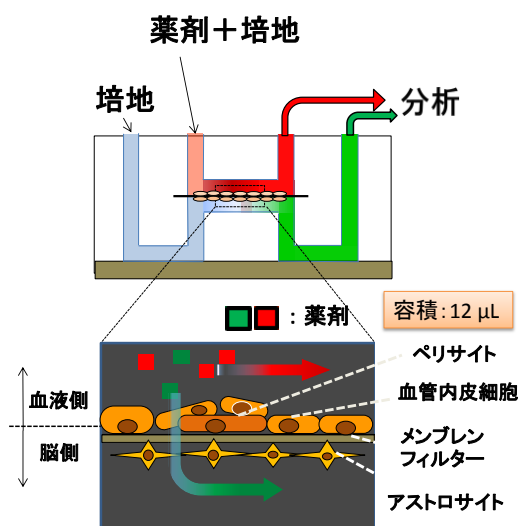


図3 マイクロBBBチップの断面模式図

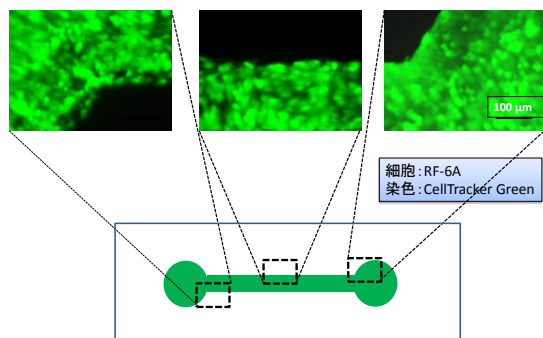


図4 チップ内に培養した細胞の蛍光顕微鏡写真

(2) 培養及びアッセイ方法の確立

検討の結果、通常のフォトリソグラフィで作製する深さ 200 ミクロン以下の流路ではコンフルエントな細胞培養は難しいことが分かった。そのため、新たに裏面照射フォトリソグラフィ法を開発し、深さ 500 ミクロン以上の鑄型を簡便に作製することに成功した。これにより深い流路を構築してこれを培養槽とした。また、細胞支持膜と PDMS の接着が十分ではないことが多く見られた。支持膜の端を流路が通過すると液漏れをおこす危険性があったため、膜の端を回避する設計を採用した。また、コンフルエントな細胞培養を実現するためには、細胞の播種時には通常よりも高密度の細胞懸濁液を用いる必要があった。細胞が接着後、極めてゆっくりの速度で培地を連続的に供給しながら培養することにより、細胞を良好に増殖させることに成功した。これにより、細胞支持膜の上面と下面に異種の動物細胞を培養することに成功した。

また、得られたデバイスを用いて蛍光色素の透過性試験を行い、デバイス内に形成された細胞シートが透過性バリアとして機能していることを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yuki IMURA, Etsuro YOSHIMURA, Kiichi SATO, Microcirculation System with a Dialysis Part for Bioassays Evaluating Anticancer Activity and Retention, *Analytical Chemistry*, 85, 1683-1688 (2013) DOI: 10.1021/ac302938q (査読有)
- ② Yuki IMURA, Etsuro YOSHIMURA, Kiichi SATO, Micro Total Bioassay System for Oral Drugs: Evaluation of Gastrointestinal Degradation, Intestinal Absorption, Hepatic Metabolism, and Bioactivity, *Analytical Sciences*, 28, 197-199 (2012) DOI: 10.2116/analsci.28.197 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yu Sakuta, Kin-ichi TSUNODA, Kiichi

SATO, Simultaneous measurement of dialysate and sample solution in a microdialysis system, RSC Tokyo International Conference, 2012 年 09 月 06 日, 幕張メッセ (千葉市)

② 作田 悠、角田 欣一、佐藤 記一、空気圧駆動ポンプを組み込んだマイクロ透析システムの開発、第 25 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2012 年 05 月 18 日、崇城大学 (熊本市)

③ 佐藤 記一、マイクロチップを用いたバイオアベイラビリティ評価法の開発、第 25 回動物細胞工学シンポジウム (招待講演)、2011 年 5 月 30 日、キャンパス・イノベーションセンター国際会議室 (東京)

④ Kiichi SATO, Yuki IMURA, Etsuro YOSHIMURA, Development of a Micro Cardiovascular System for Bioassay of Anticancer Activity and Renal Clearance, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), 2011 年 5 月 25 日, 国立京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 記一 (SATO KIICHI)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号 : 50321906

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし