

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282135

研究課題名(和文) 間質流制御に基づく血管化組織工学の展開

研究課題名(英文) Development of Tissue Engineering for Vascularization based on regulation of interstitial flow

研究代表者

須藤 亮 (SUDO, RYO)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：20407141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在の組織工学では複雑な三次元臓器の再生手法が必要とされている。特に、毛細血管を含む三次元複合組織の再生が課題であり、本研究は生体工学の立場から三次元肝細胞組織に毛細血管を導入する血管化の技術を検討した。具体的には、3チャンネル型マイクロ流体デバイスにおいて血管形成と三次元肝組織形成の時期を調節することで、三次元肝組織に血管組織を導入することに成功し、再現性を確認した。さらに、肝細胞調整培養液やコーゲンゲル粒子を用いることによって効率を高める可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to reconstruct three-dimensional (3D) complex organs in current tissue engineering. In particular, construction 3D complex tissues including microvascular networks is a big challenge. In this study, we investigated a technology to vascularize 3D hepatocyte tissues. Specifically, we could construct 3D hepatocyte tissues with microvessels by controlling the timing of vascular formation and hepatocyte tissue formation in 3-channel microfluidic devices. Furthermore, we demonstrated hepatocyte-conditioned medium and collagen gel microspheres could promote vascularization of hepatocyte tissues.

研究分野：組織工学、生体工学

キーワード：マイクロ流体デバイス 肝臓 血管

1. 研究開始当初の背景

現在の組織工学では角膜・皮膚などの再生に成功しているが、これは組織構造が単純であるために再生が比較的容易であることに起因する。一方、肝臓や膵臓などは数種類の細胞が複雑な三次元構造を形成しているため、再生手法が確立されていない。特に、再生した組織に毛細血管を導入すること(血管化)が三次元臓器再生における最大の課題になっている。

研究代表者はこれまで一貫して肝臓再生の組織工学に従事してきた。特に、肝前駆細胞を用いて肝臓の再生に成功し(Sudo et al., FASEB J, 2005)、胆管上皮細胞から機能的な胆管を再生させることに成功した(Hashimoto et al., Am J Pathol, 2008)。さらに、細胞周囲の力学的環境要因によって毛細血管の再生を制御できることを報告してきた(Yamamura, et al., Tissue Eng, 2007)。これらの成果により、肝臓を構成する3つの組織(肝臓・胆管・毛細血管)を個別に再生させることが可能になり、次の段階としてこれらを融合させる必要性を認識するに至った。研究代表者は、今後の組織工学では細胞を組み合わせる組織を再生させるだけでなく、組織と組織を融合して「複合組織」を再生させることが必須であると考えている。

近年、研究代表者は複合組織を再生するためにマイクロ流体デバイスを用いた組織工学に取り組んでいる。この手法は研究代表者が米国MITにて開発に携わったデバイスを基本としており、従来の培養法よりも微小培養環境を精緻に制御できるほか、イメージングに優れている利点がある。これまでに、マイクロ流体デバイスを用いた血管新生モデルを考案し、MEMS分野で定評のあるLab on a Chipに報告した(Chung et al., 2009)。さらに、間質流を制御することで三次元肝臓と毛細血管を再生させることに世界に先駆けて成功した(Sudo et al., FASEB J, 2009)。これらの成果は、三次元複合組織を再生するためには、細胞周囲の微小環境における対流・拡散・細胞配置などを時間的・空間的に制御する工学的手法が必須であることを示唆しており、研究代表者の取り組みは大きな反響を呼んでいる。さらに最近の研究では、研究代表者らのマイクロ流体デバイスを用いた培養技術と実験成果がNature Protocols誌の表紙に掲載された(Shin et al., 2012)。

以上の経緯を経て、研究代表者はマイクロ流体デバイスを用いて肝臓と毛細血管を融合させる血管化組織工学に着手し、三次元肝臓と毛細血管を融合させるためには細胞間接着の制御が重要であることを示す知見を得ている。しかしながら、これまでの培養手法では実験効率が低く、組織工学的手法のさらなる改良が必要であると考えている。そこで、マイクロ流体デバイスの設計および培養手順に改良を加え、間質流を制御することで微小培養環境の対流・拡散状態を時々

刻々と調節し、肝臓・毛細血管の形態形成に影響を与え、血管化複合組織を再生させる着想に至った。

2. 研究の目的

現在、組織工学では「再生した三次元組織に毛細血管網を導入すること(血管化)」が大きな課題になっている。研究代表者はこれまでの研究から血管化の実現のためには細胞間接着を制御することが重要であることを見出した。この発見を足掛かりとして、本研究では、独自のマイクロ流体システムを用いて微小培養環境における間質流および細胞配置などを時間的・空間的に制御することによって細胞間接着を中心とした多細胞の形態形成を最適化し、毛細血管網を含む三次元複合肝臓を世界に先駆けて再構築する。また、再構築した血管化複合肝臓の構造および機能を実験によって明らかにし、工学を基盤とした複合組織再生のための組織工学的手法(血管化組織工学)として展開するための学術基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、2チャンネルおよび3チャンネル型のマイクロ流体デバイスを用いて間質流を時間的・空間的に制御することによって3次元肝臓の血管化を試みた。特に、2チャンネルの場合には間質流によって血管形成を誘導してから肝細胞を導入する点、3チャンネルの場合には間質流によってコラーゲンゲルを修飾してから2度目の肝細胞を導入する点が肝細胞の細胞間接着を制御する上で重要となることを考慮した。この時、細胞導入のタイミングや間質流の強さなどを実験により組織化・血管化の観点から最適化を試みた。また、マイクロ流体デバイスの利点を生かしたタイムラプス顕微鏡撮影によって多細胞ダイナミクス(遊走・走化作用・形態形成・細胞接着)を記録し、肝臓組織と毛細血管網の組織間相互作用を定量的に解析した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて再構築された血管化複合肝臓の三次元微細構造を中心に解析した。

4. 研究成果

(1) 2013年度の研究成果

本研究では、組織工学・再生医学において課題となっている毛細血管網を有する三次元組織の再生に関して、マイクロ流体システムを用いて生体工学の立場から取り組んでいる。2013年度は、2チャンネルおよび3チャンネル型のマイクロ流体システムを用いて間質流を制御し、3次元肝臓を血管化する最適な微小環境構成法を検討した。具体的には以下の研究成果が得られた。

マイクロ流体システムの作製：ソフトリソグラフィーによってマイクロ流路およびコラーゲンゲルを有するマイクロ流体システムを作製した。特に、培養の際には、

マイクロ流路間に圧力差を形成することによってコラーゲンを浸透する間質流を起こし、微小培養環境における対流・拡散を制御した。その結果、間質流によって毛細血管網を誘導できることを見出した。

細胞配置の時間的・空間的な制御：マイクロ流体システムにおいて肝細胞と血管内皮細胞の共培養に取り組んだ。肝細胞については三次元組織形成の観点から、血管内皮細胞については毛細血管網形成の観点から培養条件の最適化を行った。特に、間質流によって毛細血管網の形成を誘導し、その後で肝細胞をマイクロ流路に追加する手法によって細胞配置を時間的・空間的に制御することで、毛細血管網と三次元肝組織を融合させるための共培養モデルを作成することができた。

2チャンネル型および3チャンネル型マイクロ流体システムにおける三次元肝組織血管化の検討：2チャンネル型および3チャンネル型のマイクロ流体システムを作製し、上記の実験を行い、2チャンネル型と3チャンネル型での血管形成および血管化のプロセスについて比較検討した。その結果、2チャンネル型システムでは間質流によって血管形成を誘導し、3チャンネル型システムでは肝細胞からの分泌物によって血管形成を誘導できることを見出した。

(2) 2014年度の研究成果

2014年度は、前年度に引き続き2チャンネルおよび3チャンネル型のマイクロ流体システムを用いて間質流を制御し、3次元肝組織を血管化する最適な微小環境構成法を検討した。具体的には以下の研究成果が得られた。

タイムラプス顕微鏡ビデオ撮影法と多細胞ダイナミクスの定量的解析：マイクロ流体システムでライブセルイメージングを行い、3チャンネル型マイクロ流体システムにおいて異なる細胞播種条件において血管スプラウト形成や血管伸張距離などを定量的に解析し、血管化三次元肝組織を再構築するために最適な細胞配置を明らかにした。

間質流の強さが組織化へ及ぼす影響：間質流は肝細胞の三次元組織形成やコラーゲンの修飾、血管形成の誘導など様々な役割をもつ。そこで、2チャンネル型マイクロ流体システムにおいて間質流の強さを変更することで、ラット微小血管内皮細胞の血管形成を誘導しうることを見出した。また、コラーゲンゲルだけでなく、フィブリンゲルを用いた実験も検討し、血管形成の観点からはフィブリンゲルがより適した条件であることが分かった。

再生された三次元複合肝組織の解析：2チャンネル型マイクロ流体デバイスでは、間質流によって血管形成を誘導し、その後

で肝細胞を追加することで三次元複合肝組織を構築した。一方、3チャンネル型マイクロ流体システムでは肝細胞との相互作用によって血管形成を誘導し、その後で肝細胞を追加することで三次元複合肝組織を構築した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的に組織を観察し、特に、3チャンネル型による手法において毛細血管様構造が肝細胞組織内部に伸張する様子が確認された。

(3) 2015年度の研究成果

2015年度は、2チャンネル及び3チャンネル型マイクロ流体デバイスを用いて血管化肝細胞組織を構築するプロセスの再現性の確認と効率化に取り組み、三次元組織の内部構造を検討した。具体的には以下の研究成果が得られた。

再生された三次元複合組織における上皮組織-毛細血管界面の解析：三次元肝組織に毛細血管網が導入されたかどうか免疫蛍光染色法によって詳細に検討した。特に、3チャンネル型マイクロ流体デバイスにおいて血管形成と三次元肝組織形成の時期を調節することで、三次元肝組織に血管組織を導入しうることを見出し、共焦点レーザー顕微鏡によって三次元肝組織内部における血管組織の構造を三次元的に解析し、複合肝組織の構造を明らかにした。肝細胞調整培養液による血管化組織形成効率化の検討：3チャンネル型マイクロ流体デバイスを用いることで血管化組織の構築に成功したが、さらに効率を高める必要がある。そこで、肝細胞調整培養液を利用することで血管形成を誘導し、最終的に血管化組織を構築する手法を確立した。コラーゲンゲル粒子による血管化組織形成効率化の検討：三次元肝組織の血管化の効率を高めるためには、三次元肝組織内部の細胞外基質の分布が重要となる。そこで、細胞スケールのゲル粒子を作製し、肝細胞と混合した三次元肝組織を構築することに成功した。

(4) 3年間の研究成果のまとめ

本研究では、3チャンネル型マイクロ流体デバイスにおいて血管形成と三次元肝組織形成の時期を調節することで、三次元肝組織に血管組織を導入することに成功し、再現性を確認した。さらに、肝細胞調整培養液やコラーゲンゲル粒子を用いることによって効率を高める可能性を示した。今後これらの実験条件をより詳細に検討することで毛細血管網を含む三次元肝組織を効率的に再構築することが期待できる。

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 17 件)

Ryo Sudo. Multiscale tissue engineering for liver reconstruction. *Organogenesis* Vol. 10, 216-224, 2014, 査読有, DOI: 10.4161/org.27968
Yoshinori Abe, Ryo Sudo, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita. Steady and pulsatile shear stress induce different three-dimensional endothelial networks through pseudopodium formation. *Journal of Biorheology* Vol. 27, 38-48, 2013, 査読有, DOI: 10.1007/s12573-012-0056-5
Kyoko Yamamoto, Kohei Tanimura, Yo Mabuchi, Yumi Matsuzaki, Seok Chung, Roger D. Kamm, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Ryo Sudo. The stabilization effect of mesenchymal stem cells on the formation of microvascular networks in a microfluidic device. *Journal of Biomechanical Science and Engineering* Vol. 8, 114-128, 2013, 査読有, DOI: 10.1299/jbse.8.114

〔学会発表〕(計 63 件)

Mohammad Ajoudanian, Ryo Sudo. Preparation and culture of collagen microspheres as a scaffold for liver tissue engineering. 4th TERMIS World Congress, 2015 年 9 月 8~11 日, Boston (USA)
Hiroshi Minami, Ryo Sudo. The evaluation of interactions between hepatocytes and vascular networks in microenvironments. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015 年 8 月 25~29 日, Milano (Italy)
Masafumi Watanabe, Ryo Sudo. Construction of capillary anastomosis in a microfluidic device. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015 年 8 月 25~29 日, Milano (Italy)
Ryosuke Murai, Ryo Sudo. The effects of cell arrangement and growth factor gradient on vessel diameter in a microfluidic angiogenesis model. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015 年 8 月 25~29 日, Milano (Italy)
Ryo Sudo. Construction of stable capillary networks using a microfluidic device. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015 年 8 月 25~29 日, Milano

(Italy)

Ryo Sudo. Vascular tissue engineering with microfluidic technology. 1st Japan-Korea Biomedical Technology Symposium, 2015 年 6 月 12 日, 東京農工大学 (東京都小金井市)
南拓志, 須藤 亮. 血管化肝組織構築プロセスにおける肝細胞と血管伸長の定量的評価. 第 22 回 肝細胞研究会, 2015 年 6 月 4~5 日, 米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)
須藤 亮. 積層型共培養およびマイクロ流体デバイスを用いた血管化三次元肝組織構築の試み. 第 22 回 肝細胞研究会, 2015 年 6 月 4~5 日, 米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)
南拓志, 須藤 亮. 微小培養環境における肝細胞供給因子と血管ネットワークの相互作用の定量的評価. 第 54 回 日本生体医工学会大会, 2015 年 5 月 7~9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋)

〔図書〕(計 1 件)

Ryo Sudo, Seok Chung, Yoojin Shin, Kazuo Tanishita. "Chapter 16 Integrated Vascular Engineering: Vascularization of Reconstructed Tissue" in "Vascular Engineering", Springer, 36 pages, 2016

〔その他〕

慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科須藤研究室ホームページ
<http://www.sudo.sd.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 亮 (SUDO RYO)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号: 20407141

(2) 研究分担者

谷下 一夫 (TANISHITA KAZUO)
早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・
上級研究員 (研究院教授)
研究者番号: 10101776

(3) 研究分担者

三高 俊広 (MITAKA TOSHIHIRO)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50231618

(4) 研究分担者

牛山 明 (USHIYAMA AKIRA)
国立保健医療科学院・生活環境研究部・
席主任研究官
研究者番号: 60291118