

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25600060

研究課題名(和文)形態形成理解のためのマルチスケールマウス初期胚培養デバイス

研究課題名(英文)Microfluidic device to culture an early-stage mouse embryo for morphogenesis studies

研究代表者

横川 隆司(Yokokawa, Ryuji)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10411216

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)：本研究の目的は、マイクロデバイス内に再構成した血管内皮細胞による管路構造を、機能する三次元組織構造に自発的に連結させることで、組織の長期培養と観察を可能にした組織レベルの形態形成の解析用デバイスを開発することである。当該研究期間内に、1)微小流体デバイスを用いた血管新生、2)組織モデルとしてのスフェロイド作製、3)スフェロイドを用いたオンチップ血管新生を実現した。オンチップで形成した血管網にスフェロイドが融合し、内部を灌流できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a microfluidic system that provides a three-dimensional cell culture environment by the reconstituted vascularized networks. It enables long-term tissue culture on a chip for morphogenesis studies. We have developed an on-chip angiogenesis assay, optimized spheroid culture condition to be injected to the chip, and realized vascularized network with a spheroid embedded. Further, the network was found perfusable by injecting microspheres and fluorescent dyes.

研究分野：BioMEMS, MicroTAS

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織 自己組織化 生体機能利用 マイクロフルイディクス MicroTAS MEMS

1. 研究開始当初の背景

微小流体デバイスを用いた単一細胞から比較的少ない細胞数での細胞培養，解析技術が十分確立してきたことに伴い，近年ではよりボトムアップ的にデバイス内でスフェロイドを作製したり，細胞を積み上げ数 mm スケールの細胞塊を作製したりできるようになった．しかし，機能的な組織まで組み上げた例はなく，ボトムアップのみにより細胞から組織を組み上げることは現状では難しい．MEMS 技術に基づく細胞デバイス製作技術が，扱う対象を mm 以下の領域を専門にしてきたからである．

一方で，発生生物学の分野では *in vivo* の組織を直接取り出して培養する器官培養という技術により，その形態形成を理解する取り組みがある．例えばマウスの胚全体を培養することで生体に近い構造ができる．この器官のスケールは数 100 μm ~数 mm スケールであり，マイクロデバイスが得意とするスケールの 10~100 倍である．しかしながら，組織の構成細胞数が増えれば増えるほど，内部への酸素供給が不足し観察される形態形成現象が *in vivo* を反映したものにならないという問題がある．したがって，器官培養において毛細血管網を利用した十分な酸素供給が可能なシステムを構築することは，機能する組織を理解するうえで非常に重要な技術である．

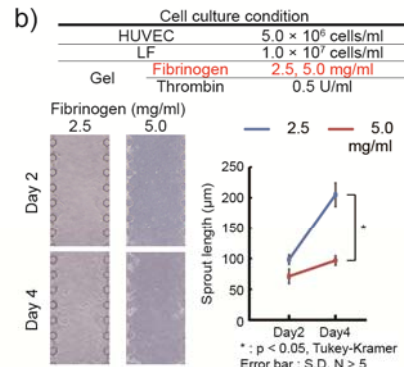
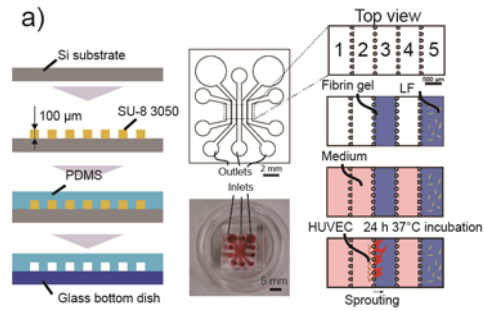
2. 研究の目的

本研究の目的は，マイクロデバイス内に再構成した血管内皮細胞による管路構造を，機能する三次元組織構造に自発的に連結させることで，組織の長期培養と観察を可能にした組織レベルの形態形成の解析用デバイスを開発することである．毛細血管網のネットワーク作りと *in vivo* から取り出した組織（マウス初期胚）の接続技術を確認することで，大きさ数 μm の血管内皮細胞から数 mm の組織までをマルチスケールでオンチップ培養可能なデバイスを製作する．これによって，従来長期間培養の困難さが課題となっていた発生生物学における立体組織構造形成のメカニズムの理解に資することを目指す．

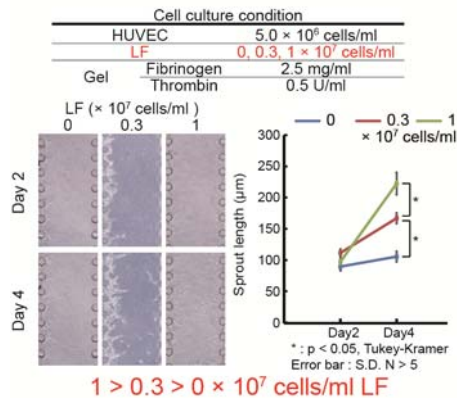
3. 研究の方法

3-1. 微小流体デバイスを用いた血管新生

本研究では，まずオンチップ血管新生技術を確認するため図 1 a のような PDMS-ガラス系のデバイスを製作した．長さ 1 mm，幅 200 μm ，高さ 100 μm のチャンネルは 5 本からなり，チャンネル 1 は培地，チャンネル 2 は血管内皮細胞の培養，チャンネル 3 はフィブリンゲルを導入した血管新生用，チャンネル 4 は培地，チャンネル 5 は血管新生誘導のための線維芽



Sprout length : 2.5 > 5.0 mg/ml fibrinogen



1 > 0.3 > 0 $\times 10^7$ cells/ml LF

図 1 : オンチップ血管新生技術の検討

細胞培養用とした．チャンネル 2-3 および 3-4 の間には毛細管網を模したマイクロピラーアレイ（間隔 100 μm ，高さ 100 μm ）を設け，ゲルがチャンネル 3 のみにとどまるよう工夫した．

3-2. 組織モデルとしてのスフェロイド作製

本研究が目指す組織への血管網の供給を見据えて，スフェロイドをモデルとした実験系を構築した．まず，デバイスに導入するスフェロイドのサイズを最適化するために $0.1\sim 2 \times 10^4$ cells/well で LF（ヒト肺線維芽細胞）を 96 穴ウェルで培養し直径を測定した．

LF と HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の共培養スフェロイドについては、以下の条件で準備した。①LF と HUVEC を LF 2×10^4 cells, HUVEC 5×10^3 cells/100 μ l EGM-2/well で播種した。②LF を 2×10^4 cells/100 μ l EGM-2/well で播種し、培養 2 日後に培地を除去し、HUVEC 5×10^3 cells/100 μ l EGM-2/well, 5×10^2 cells/100 μ l EGM-2/well を追加した。これらの場合について、スフェロイド中の HUVEC, LF の状態を観察するために、Hoechst 33342 10 μ g/ml, lectin from *Ulex europaeus* FITC conjugate 5 μ g/ml の EGM-2 をウェルへ導入し 2 時間 37°C インキュベートした。

3-3. スフェロイドを用いたオンチップ血管新生

本研究では、当初マウス初期胚を直接デバイスに導入することを予定していたが、*ex vivo* 組織との血管接続が報告されたこと、および上記の共培養スフェロイド内部に HUVEC の血管網形成が確認されたことから、スフェロイドへの血管新生と接続をおこなった。デバイス中央部のチャンネル 3 を幅 2 mm に変更して、その中央にスフェロイド導入用ウェルを設置した。

本実験では、スフェロイドはウェルサイズに適した 2×10^4 cells/100 μ l EGM-2/well の濃度ものを用いた。まず、ウェルに PDMS で栓をした状態でフィブリンゲルをチャンネル 3 に導入した。5 分間室温でインキュベートし、フィブリンゲルを固めた後、栓を抜きスフェロイド導入用のスペースを用意した。スフェロイドは、凝固前のフィブリンゲル中に移した後デバイスのウェル上部へ乗せ、シリジニードルによりウェルへ落とし込んだ。更にウェル部分のフィブリンゲルを固めるため 5 分室温でインキュベートした後、残りのチャンネルに培地を導入した。37°C で 24 時間インキュベートすることでフィブリンゲル、培地境界面の気泡を除去した後、培地を除去した。HUVEC 懸濁液をチャンネル 2 に導入し、90° 傾けた状態で 37°C でインキュベートし、HUVEC をフィブリンゲル表面に付着させた。チャンネル 4 にも HUVEC 懸濁液を導入し同様にフィブリンゲル表面に付着させた。培地交換は 3 日に一度おこなった。

4. 研究成果

4-1. 微小流体デバイスを用いた血管新生

管路形成をおこなう際の細胞外基質としてフィブリンゲル、マトリゲル、コラーゲンゲルなどゲルの種類、濃度、調整方法を最適化した。最終的にフィブリンゲルを 2.5% で用事調整することで HUVEC の安定した培養が可能になった (図 1b)。この知見を元に、チャンネル 3 のみにフィブリンゲルを導入して硬化させ、チャンネル 2 には HUVEC, チャンネル 5 には同条件のフィブリンゲルに LF を懸濁して導入した。最後に培地でその他のチャ

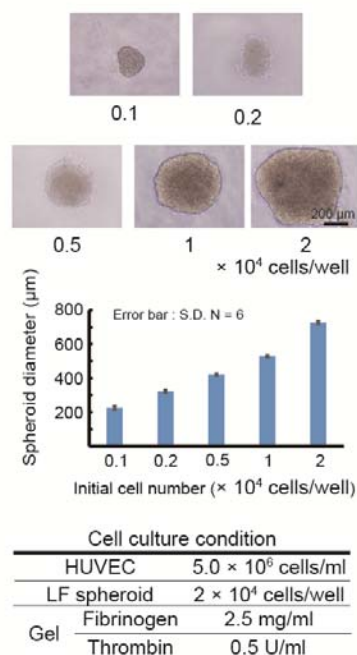


図 2 : スフェロイドサイズの最適化

ネルを満たして培養することで、HUVEC がチャンネル 3 のゲル内に向かって管路形成をおこないながら、進展してくる様子が確認された。ピラーの間隔、HUVEC および LF の導入時期や播種密度などについても最適化をおこなった。最も重要な知見は、LF が無ければ管路形成がおこなわれず、また播種密度の上昇に伴って管路形成に要する時間が短縮されたことである (図 1 b)。このことから、LF の共培養が管路形成には欠かせないことが確認された。

4-2. 組織モデルとしてのスフェロイド作製

培養 2 日目の各条件での LF スフェロイドの位相差観察像を図 2 に示す。スフェロイドの直径を計測し、播種細胞数と直径の関係をグラフに示した。播種数に依存的に直径が大きくなり、 2×10^4 cells/100 μ l EGM-2/well の播種密度でスフェロイド直径は $730 \pm 9 \mu$ m (N=6) となった。また、共培養スフェロイドでは、①②どちらの条件においても LF, HUVEC は分離することなく 1 つのスフェロイドを形成した。①の条件では、スフェロイド内部に HUVEC による緑色蛍光のネットワークが観察された。②の条件では、HUVEC の播種数にかかわらず緑色蛍光はスフェロイドを包み込むように観察された。これまで LF と HUVEC の共培養スフェロイド内部における血管網形成は報告されていなかったが、①の条件においては内部に血管網が確認できた。②の条件では、内部の血管網は観察されなかったものの、後から加えた HUVEC も LF スフェロイドと融合し、1 つのスフェロイドを形成することが確認できた。

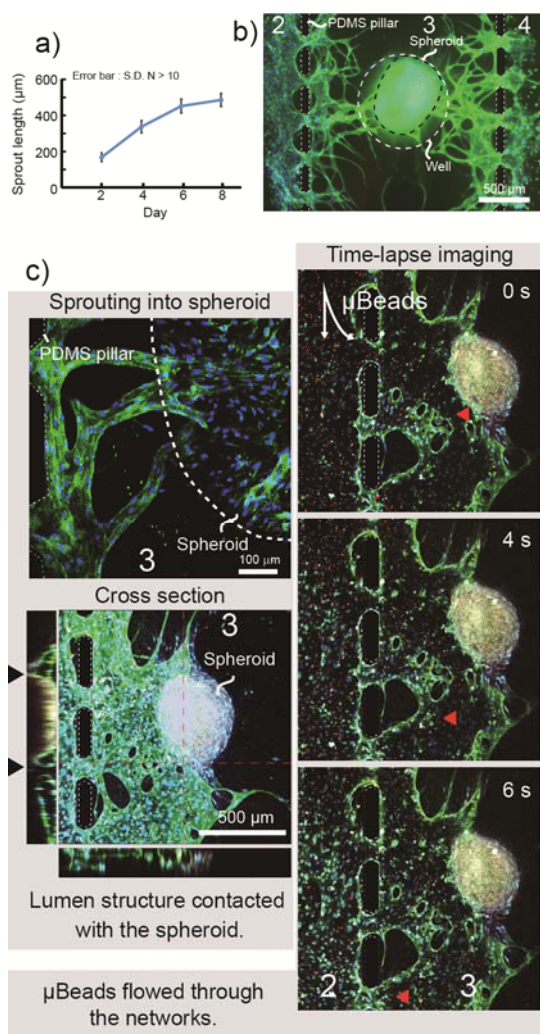


図3：スフェロイドへの血管新生

4-3. スフェロイドを用いたオンチップ血管新生

スフェロイド導入用ウェル中の LF スフェロイドへの HUVEC による血管新生が観察された。培養 2, 4, 6, 8 日目のチャンネル 3 へのスプラウト長さ（フィブリンゲル-培地境界面から先端までの長さ）を定量した結果を図 3a に示す。エラーバーは標準誤差を示している。スプラウト長さは培養 8 日目に平均 485 μm になり、組織培養ウェル近傍まで到達した。培養 9 日目に染色をおこない、蛍光観察をおこなった。チャンネル 3 の蛍光観察像を図 3b に示す。緑色蛍光のスプラウトがスフェロイドまで到達していることが分かる。

スフェロイドとスプラウトの三次元構造をより詳細に観察するため、共焦点レーザー走査型顕微鏡による観察をおこなった。培養 8 日目の共焦点観察画像を図 3c に示す。これはデバイスのチャンネル 3 内部の様子を示しており、図中上の白い破線は PDMS による六角形の柱である。HUVEC によるスプラウトが点線で囲まれた LF が密集する部分へ侵入している様子が分かる。

この構造が灌流可能であるかを確認するため、チャンネル 2 へ直径 1 μm の赤色蛍光マイクロビーズを流し込んだ。共焦点レーザー走査型顕微鏡によるタイムラプス画像を図 3c 右側に示す。白い破線は PDMS の柱を示しており、蛍光ビーズがチャンネル 2 から HUVEC による構造の外へ漏れることなくスフェロイド近傍の血管網へ流れている様子が分かる。

以上の成果から、LF によるオンチップ血管新生技術が確立し、さらに LF と HUVEC の共培養スフェロイドへの血管新生と接合技術が確立した。前述の理由から、当初予定していた *ex vivo* 組織への血管新生ではなく、全てボトムアップで *in vitro* で細胞をくみ上げる手法により、血管網を有する組織モデルを提案した。今後は、*ex vivo* 組織の長期培養や腫瘍モデルへオンチップ血管新生を適用していく。

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 1 件)

T. Miura, R. Yokokawa, "Tissue culture on a chip: Developmental biology applications of self-organized capillary networks in microfluidic devices," *Dev. Growth Differ.*, Published online, 2016. DOI: 10.1111/dgd.12292

[学会発表] (計 9 件)

- [1] Y. Nashimoto, I. Kunita, A. Nakamasu, Y. Torisawa, M. Nakayama, H. Takigawa-Imamura, H. Kotera, K. Nishiyama, T. Miura, R. Yokokawa, "Angiogenic Sprouts Reconstitute Perfusible Vascular Networks inside a Three-Dimensional Spheroid," *The 8th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology*, pp. Seoul, Korea, April 20-22, 2016, 2016.
- [2] M. Nakayama, Y. Nashimoto, I. Kunita, A. Nakamasu, Y.-s. Torisawa, H. Shintaku, H. Kotera, K. Nishiyama, T. Miura, R. Yokokawa, "Flow Control of a Microfluidic Device for Studying Vascular Network Morphology," *The 11th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, pp. Matsushima Bay and Sendai MEMS City, Japan, April 17-20, 2016.
- [3] Y. Nashimoto, A. Nakamasu, Y. Torisawa, H. Takigawa-Imamura, H. Kotera, K. Nishiyama, T. Miura, R. Yokokawa, "Anastomosis of Vascular Network between Spheroid and Microchannel Using the Angiogenesis-Based Vascularization," *2015 MRS Fall Meeting and Exhibit*, pp. Boston,

- USA, 2015/11/30-12/4, 2015.
- [4] Y. Nashimoto, I. Kunita, A. Nakamasu, Y. Torisawa, H. Takigawa-Imamura, H. Kotera, K. Nishiyama, T. Miura, R. Yokokawa, "Angiogenic Sprouts Form Perfusible Vascular Networks inside Multicellular Spheroid," *Japan-China-Korea MEMS/NEMS Conference 2015*, pp. 95-96, Xi'an, China, 2015/9/23-25, 2015.
- [5] T. Hayashi, H. Takigawa-Imamura, K. Nishiyama, H. Shimokawa, H. Kotera, T. Miura, R. Yokokawa, "Vascular Network Formation for a Long-Term Spheroid Culture by Co-Culturing Endothelial Cells and Fibroblasts," *The 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2015)*, pp. 476-479, Estoril, Portugal, 2015/01/18-22, 2015.
- [6] 梨本 裕司, 國田 樹, 中益 朗子, 鳥澤 勇介, 中山 雅宗, 小寺 秀俊, 西山 功一, 三浦 岳, 横川 隆司, "血管内皮細胞の自発的管形成能力を利用した *in vitro* 組織培養システムの構築," 第 53 回日本生物物理学会年会, S299, 金沢, 2015/9/13-15.
- [7] 梨本 裕司, 國田 樹, 中益 朗子, 鳥澤 勇介, 中山 雅宗, 今村 (滝川) 寿子, 小寺 秀俊, 西山 功一, 三浦 岳, 横川 隆司, "血管新生現象を利用した組織-マイクロ流路間の接続と灌流培養への取り組み," 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会, 115, 小倉 北九州国際会議場, 2015/11/26-27.
- [8] 梨本 裕司, 中益 朗子, 鳥澤 勇介, 今村 (滝川) 寿子, 小寺 秀俊, 西山 功一, 三浦 岳, 横川 隆司, "生体組織のオンチップ培養に向けた Spheroid 内血管の外部流路との接続," 第 32 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 新潟, 2015/10/28-30.
- [9] 林 智也, 今村 寿子, 西山 功一, 新宅 博文, 小寺 秀俊, 三浦 岳, 横川 隆司, "LF と HUVEC の共培養によるマイクロ流体デバイス内での血管形成," 平成 26 年度 電気学会 E 部門総合研究会 バイオ・マイクロシステム研究会, BMS-14-17, 35-38, 東京, 2014 年 5 月 27-8 日.

[その他]

ホームページ

<http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/ry/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横川 隆司 (YOKOKAWA, Ryuji)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10411216

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

三浦 岳 (MIURA, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10324617