

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25600065

研究課題名(和文)造血幹細胞発生機構解明のためのマイクロデバイスの開発

研究課題名(英文)Blood cell generation system in a microfluidic device

研究代表者

佐藤 香枝 (Sato, Kae)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40373310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ES細胞から血液細胞への分化誘導をデバイス内の微細流路内で行い、シリンジポンプを用いてデバイス内の細胞に定量的に流れ刺激やNOによる化学刺激を与えることで、胎生期の造血を模擬した実験系の構築を試みた。

送液培養の影響を調べた結果、静置培養と比較して血液細胞産生数が多いことが示された。この結果は、既報のマウスやゼブラフィッシュ胚で血流が関与するという結果と一致する。次にNO濃度の血液細胞産生数への影響を調べた。NO発生剤を加えた場合産生数の増加が見られた。NO除去剤を加えたときには、予想通り血液細胞数の減少が見られ、NOは血液細胞産生に関与していることを裏付けた。

研究成果の概要(英文)：In this study, in vitro blood cell generation system was constructed on a microfluidic device, and yields of blood cells were investigated under various shear stress or NO conditions. Murine ES cells were seeded on OP9 cells cultured in a microchannel. The cells were cultured for 96 h and then the generated blood cells were counted.

Firstly, the effects of a fluidic culture were examined. Condition of  $3.3 \times 10^{-3}$  dyn/cm<sup>2</sup> brought the largest number of blood cells. We concluded the culture system close to microenvironment of a middle stage in embryonic development was successfully constructed by the shear stress. Secondly, the effects of NO concentration on yields of the blood cell generation were examined. The yield was increased with an NO donor reagent, SNAP, and reduced with higher concentrations. When an NO scavenger, Carboxy-PTIO, was added, yield of the blood cells were reduced. From these results, we concluded that NO affected the blood cell generation.

研究分野：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：血液細胞 マイクロ細胞培養システム シアストレス 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

すべての血液細胞の源となる造血幹細胞は、マウスでは胎生 10.5 日目ごろより背側大動脈腹側血管腔から発生する (図 1)。近年、ゼブラフィッシュやマウス胚を使った実験により血流による物理刺激が造血幹細胞発生を促すことが示唆された[1-2]。申請者は、この物理刺激に関わる造血幹細胞発生機構の解明には、マイクロ流体デバイスを用いる実験系が最適であると着想した。すなわち、マイクロ流体デバイス内の微細流路に背側大動脈に相当する細胞を培養し、培地をポンプで送液し細胞にシアストレスを与えることで、胎生期の背側大動脈における造血幹細胞発生部位を模擬した実験系を作ることができると考えた。

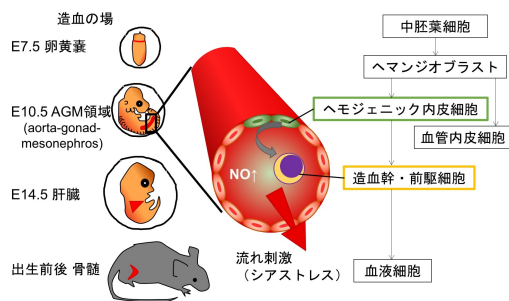


図 1 マウスの胎生期の造血

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流体デバイス内の微細流路に背側大動脈に相当する細胞を培養し、送液培養で細胞にシアストレスを与えることで、胎生期の背側大動脈における造血幹細胞発生部位を模擬した実験系を作り、将来的には造血幹細胞の発生へのシアストレスの影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

図 2 に実験の流れを示した。マウス胎生期の背側大動脈を模擬する I 字型のマイクロ流路を作製し、その中で、Nakano らにより確立された OP9 システムを用いて、マウス ES 細胞を血液細胞に分化させる。培養基板をマイクロ流路内に作製し、マウス胚の血流速である  $5 \text{ dyn/cm}^2$  付近で培地を流しながら培養し、シアストレスと一定量の ES 細胞から発生する造血前駆細胞および血液細胞の数の関係を調べる。これらの結果より、造血幹細胞の発生へのシアストレスの影響を明らかにする。具体的な研究項目は次の 3 点とする。

項目 1. マイクロウェル、マイクロ流路中での OP9 細胞の培養法の確立

項目 2. マイクロウェル中での造血前駆細胞および血液細胞の発生の観察

項目 3. マイクロ流路中での造血前駆細胞および血液細胞の観察

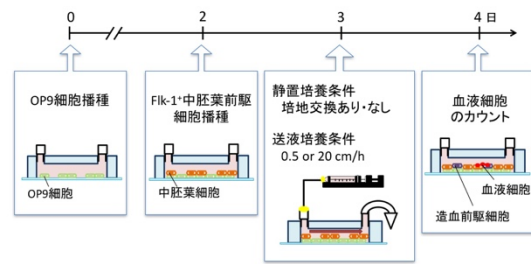


図 2 マイクロデバイスを用いた実験系

## 4. 研究成果

### [研究項目 1] OP9 細胞の培養法の確立

最初にフィーダー細胞として用いるストロマ細胞株 OP9 細胞のマイクロデバイス内での培養法を確立した。PDMS を材料に通常の培養皿より小さい数 mm 径のマイクロウェルを作製し、その中で OP9 細胞を培養した。続いてマウス胎生期の大動脈を模擬する I 字型のマイクロ流路内での培養も検討した。播種密度と培養日数を検討し細胞生存アッセイで評価した結果、流路深さ 1.0 mm のデバイス内では、OP9 細胞の播種密度  $3.0 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup> で 2 日培養が適していた。

### [研究項目 2] マイクロウェル中での血液細胞の発生の観察

研究項目 1 で開発した数 mm 径のマイクロウェル内で血液細胞発生の観察をした。マイクロデバイス内に OP9 細胞をフィーダー細胞として培養し、その上に分化誘導をした ES 細胞を一定量播種し共培養した。3 日目以降に造血前駆細胞および血液細胞の発生の有無を観察した。発生した細胞は、血液細胞のマーカー分子である CD41 を免疫染色することで血液細胞か否か確かめた。マイクロウェルに播種した ES 細胞の数と発生した血液細胞の数の関係を調べたところ、従来の 60 mm の培養皿を用いた場合と同様の効率で血液細胞が産生することが示された。

### [研究項目 3] マイクロ流路中での血液細胞の発生の観察

マイクロウェルで確立した技術を元に、マイクロ流路内に OP9 細胞と ES 細胞を共培養した。マイクロウェルと同様に 3 日目以降に造血前駆細胞および血液細胞の発生の有無を

観察した(図3)。静置条件では、従来の60mmの培養皿を用いた場合と同様の効率で血液細胞が産生することが示された。

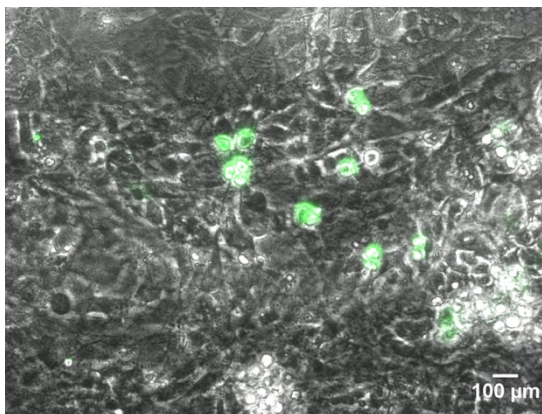


図3 デバイス内で産生した血液細胞(緑色に着色した細胞がCD41陽性である)

ES細胞から血液細胞への分化における送液培養の影響を調べた結果、静置培養と比較して $3.3 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$ の送液培養で産生数が多いことが示された(図4)。この結果は、既報のマウス[1]やゼブラフィッシュ胚[2]で血流が分化に関与するという結果と一致する。一方、流量が早いと流路内の細胞が剝離してしまい、マウス胚の血流速と同等なシアストレスを与えることはできなかった。

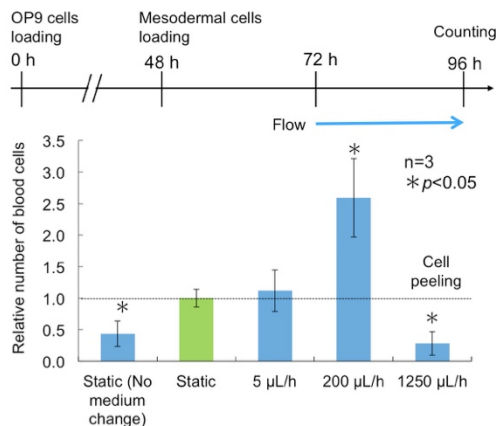


図4 静置/送液培養で産生した血液細胞数

次にマイクロ流路を用いてNO濃度の血液細胞産生数への影響を調べた。NO発生剤SNAPを5μM加えた場合、産生数の増加が見られた(図5)。薬剤を加える時期は、ES細胞播種と同時に与えるよりも、1日後から与えたほうが高い効果が得られた。NO消去剤Carboxy-PTIOを加えたときには、予想通り血液細胞数の減少が見られ、NOは血液細胞産生に関与していることを裏付けた。

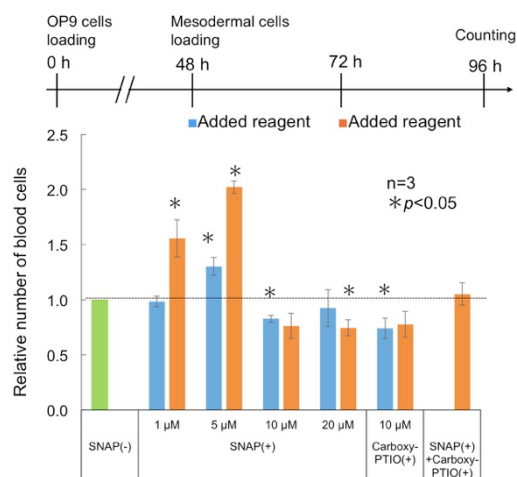


図5 NO発生剤および消去剤添加による血液細胞産生数への影響

#### <引用文献>

- ① "Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis," Adamo L *et al.*, Nature. 2009 Jun 25;459(7250):1131-5.
- ② "Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow." North TE *et al.*, Cell. 2009 May 15;137(4):736-48.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

- ① 石井 沙弥香、三輪 涼子、鎌田 絵里子、北島 健二、原 孝彦、佐藤 香枝、マイクロデバイス内血液細胞産生における一酸化窒素濃度の影響、第5回CSJ化学フェスタ2015、東京都江戸川区 タワーホール船堀、2015/10/13
- ② 石井 沙弥香、三輪 涼子、北島 健二、原 孝彦、佐藤 香枝、マイクロ流体デバイスにおけるES細胞から血液細胞への分化誘導、日本化学会第95春季年会2015、千葉県習志野市 日大習志野キャンパス、2015/3/26
- ③ 石井 沙弥香、三輪 涼子、北島 健二、原 孝彦、佐藤 香枝、マイクロ流体デバイスにおけるOP9システムを用いたマウス由来ES細胞の造血分化、第4回CSJ化学フェスタ2014、東京都江戸川区 タワーホール船堀、2014/10/16
- ④ Sayaka Ishii, Ryoko Miwa, Kenji Kitajima, Takahiko Hara, Kae Sato, Hematopoietic differentiation of mouse ES cells using OP-9 coculture system in microfluidic devices. RSC Tokyo International Conference 2014, 千葉県千葉市幕張メッセ国際会議場、2014/9/5

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 香枝 (SATO, Kae)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40373310

### (2)研究協力者

原 孝彦 (HARA, Takahiko)

### (3)研究協力者

北島 健二 (KITAJIMA, Kenji)