

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750157

研究課題名(和文)胎盤バリア制御機構の解明を目指したマイクロ流体システムの構築

研究課題名(英文)Construction of a microfluidic system for the analysis of human blood-placental barrier

研究代表者

三浦 重徳(Shigenori, MIURA)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70511244

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)：ヒト胎盤バリアの構造・機能をマイクロ流路内に再構築するため、適した細胞および足場材料について検討を行った。その結果、ヒト栄養膜細胞株であるBeWo細胞、ヒト臍帯静脈血管内皮(HUVEC)およびガラス化コラーゲン薄膜(ピトリゲル)を用いることで、極性のあるバリア構造を2つのマイクロ流路間に安定して構築することができた。作製したデバイスを用いて灌流培養を行うと、構築したバリア構造において微絨毛が誘導され、流路間での物質移行量も変化した。さらにこれらの現象は、流体シアストレスによって活性化されるカルシウムイオンチャンネルの作用を介して制御されていることを分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We constructed a microfluidic system that enabled us to analyze the function of human placental barrier under the fluid flow microenvironment. We used a human trophoblastic cell line, human umbilical vein endothelial cells and a vitrified collagen scaffold to reconstruct the polarized multi-layered barrier structure between two microfluidic channels. Using our device, we found that fluid flow induced the formation of microvilli in the placental barrier construct, as observed in the placental barrier tissue, whereas static culture failed to induce microvilli. Fluid shear stress also affected the material transfer through the barrier constructs. We further revealed that the microvilli are induced via a mechanosensitive activation of TRP channel.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：胎盤バリア 流体シアストレス 微絨毛 カルシウムイオン TRP channel

## 1. 研究開始当初の背景

母体および胎児の循環系を隔てる血液-胎盤関門(胎盤バリア)は、胎児の生育に必要な栄養因子の供給や代謝産物の排出だけでなく、薬剤をはじめとする種々の化学物質の透過障壁として重要な役割を果たしている。現在、胎盤バリアにおける物質透過性の評価は、バリアを構成する栄養膜細胞を用いたトランスウェルアッセイが主流である。しかしながら、血流によって生じる流体シェアストレスや輸送体タンパク質の細胞膜上での局在様式、バリアを構成する細胞間の相互作用など、*in vitro* では生体バリアの特徴を再現することが困難である。また、胎盤バリアの構造は動物種差が大きく、マウス等の動物実験において得られた結果は、ヒトにおける結果と相反することがしばしば報告されている。最近、出産直後のヒト胎盤を用いた灌流培養系が報告され、生体での薬物動態に近い実験結果が得られているが、倫理的問題から出産直後の胎盤しか用いることができず、その利用にも制限があるなど、汎用性の観点から十分な評価系ではない(Hutson *et al.*, Clin. Pharmacol. Ther., 2011年; Prouillac and Lecoeur, Drug Metab. Dispos., 2010年)。よって、ヒト胎盤バリアの特徴をよく再現し、広く利用可能な *in vitro* モデル系は存在しておらず、胎盤における薬物動態や物質透過性制御の分子メカニズムについても不明な点が多い。

ヒト胎盤バリアにおいては、合胞体栄養膜細胞と血管内皮細胞およびこれらの細胞が産生する基底膜細胞外マトリックス(ECM)からなる多層構造が母体血流と胎児の血流を隔てている(図1)。これらのバリア構成細胞は、様々なトランスポーターを細胞膜上で局在させ、方向性のある物質交換を行っている。また、母体血流によって生じる流体シェアストレスの下で効率良く栄養因子を取り込むため、合胞体栄養膜細胞は、微絨毛と呼ばれる微細細胞膜構造を発達させている。最近、流体シェアストレスが、アクチン骨格をはじめとする細胞の構造や配向性を制御するとともに、細胞機能に対して多様な影響を及ぼすことが報告されており、母体・胎児血流に常に接する胎盤バリアにおいても、流体シェアストレスがバリア機能に何らかの影響を及ぼしていると推察される。ところが、これまでに流体シェアを負荷できるよい胎盤バリアモデル系がなかったため、バリア機能の制御と流体シェアストレスの関わりについて十分な解析はなされていなかった。

近年、マイクロ加工技術と培養細胞を組合せて組織機能の一部をマイクロデバイス内に再現する“Organ-on-a-chip”研究が注目されている。MEMS (micro electro mechanical systems)技術を用いて作製した組織特有の幾何学的構造に細胞を配置して培養したり、流体工学を利用して流体シェアストレスやメカニカルストレスを負荷したりすることに

よって、静置培養系では再現できない組織機能をチップ上で再現するものである。例えば、肺上皮細胞を伸展可能な細胞培養足場で培養し、肺胞の伸展刺激を模倣したメカニカルストレスを負荷することによって、肺胞毛細血管機能の一部を再構築したバイオミメティックデバイスが報告されている(Huh *et al.*, Science, 2010年)。このような最近の研究動向から、流体デバイス内にヒト胎盤バリア構造を再構築することで、静置培養評価系よりも生体組織に近いバリア特性を示す評価系の開発が可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト胎盤バリアにおける物質透過性を流体シェアストレス存在下で評価することができる新たなマイクロ流体デバイスを開発するとともに、胎盤バリア機能の制御において流体シェアストレスがどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とする。そのために、以下の点について検討を行い、目的を達成する。

(1) 図1に示すように、細胞およびECMから成る多層バリア構造を2つのマイクロ流路間に構築するために、適した細胞および足場材料を選定し、灌流培養および物質透過アッセイが可能な“ヒト胎盤バリアチップ”を開発する。

(2) 灌流培養を行うことで流体シェアストレスを負荷し、構築した胎盤バリアコンストラクトの形態や物質輸送性にどのような変化が起こるかを分子レベルで明らかにする。

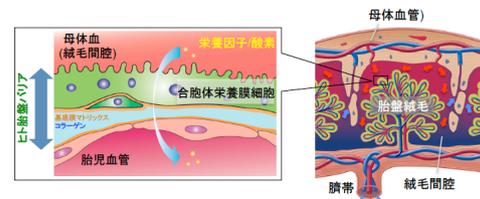


図1. ヒト血液-胎盤関門の構造

## 3. 研究の方法

## (1) ヒト胎盤バリア細胞コンストラクトの作製

母体血側のバリア細胞である合胞体栄養膜細胞は、多核融合細胞であるためヒト胎盤組織より単離・培養することが困難である。そのため、それらの前駆細胞を含むヒト初代絨毛細胞(市販)またはヒト絨毛がんより樹立されたBeWo細胞(理研細胞バンクより分与)を用いた。胎児側バリア細胞である血管内皮細胞には、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いた。これらの細胞を、細孔(0.4  $\mu\text{m}$ , 厚さ10  $\mu\text{m}$ )を有するポリエステル膜またはガラス化コーラゲン膜(ビトリゲル:VC膜、厚さ10  $\mu\text{m}$ )の上下両面でそれ

ぞれ共培養した。胎盤バリア特有の ECM の蓄積と層状構造の形成を免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡により評価した。

#### (2) 胎盤バリアチップの構築

マイクロ流路は、光硬化性樹脂 SU-8 によりパターンニングしたモールドを用いて polydimethylsiloxane (PDMS) で作製した。幅 1 mm、高さ 200  $\mu\text{m}$  の流路 (図 2) を作製し、上記で選定した足場材料を 2 つの流路間に配置した後、酸素プラズマにより bonding した。得られたマイクロ流路デバイスの足場材料の上下面に細胞を播種後、シリンジポンプに接続して、流速 0.3~5  $\mu\text{l}/\text{min}$  にて灌流培養を行った。

#### (3) 物質輸送アッセイ

胎盤バリアコンストラクトを介した物質輸送または細胞内への取込みは、グルコースの蛍光誘導体である 2-NBDG (2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose) を用いて定量的に評価した。

#### (4) 流体シェアを負荷した胎盤バリアコンストラクトの解析

灌流培養後の胎盤コンストラクトの解析は、形態学および分子生物学的/生化学的手法により解析した。胎盤バリアを構成する絨毛細胞に特徴的な微絨毛の観察は、走査型電子顕微鏡を用いた。グルコーストランスポーター、微絨毛特異的タンパク質である Ezrin, actin, villin などの細胞内局在は免疫染色を行い、透過型電子顕微鏡を用いた免疫電子顕微鏡解析または共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。胎盤コンストラクト細胞における遺伝子発現または流体シェアに対する細胞内シグナル伝達は、リアルタイム PCR、ウェスタンブロット法および siRNA 遺伝子ノックダウンにより解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト胎盤バリアチップの作製

前述の細胞を足場材料上で培養し、バリア構成成分である基底膜マトリックスの蓄積・産生について評価した。VC 膜を用いた場合には、ラミニンや IV 型コラーゲンなどの基底膜マトリックスの蓄積・産生が顕著に認められ、多層構造が形成されたが、細孔膜ではそれらの ECM の蓄積がほとんど検出されず、足場材料としてはポリマー細孔膜よりも VC 膜が適切であった。また、BeWo 細胞は、VC 膜上で単一細胞層を形成したが、ヒト初代絨毛細胞は、単一細胞層を形成することができず、母体側バリア細胞としては不適切であった。以上の結果から、本研究では、母体側バリア細胞には BeWo 細胞、胎児側バリア細胞は HUVEC、足場材料には生体材料である VC 膜

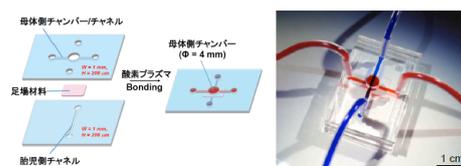


図 2. 胎盤バリアチップの作製

を用いて胎盤バリアコンストラクトを作製した。図 2 に示すような 2 層構造のマイクロ流路デバイスをデザインすることにより、胎盤バリアコンストラクトを介した物質移行を評価した。

(2) 流体シェアによる機能的な微絨毛の誘導。胎盤バリアの重要な機能は、母体血中に含まれるグルコースやアミノ酸などの栄養素を微絨毛と呼ばれる微細細胞膜構造を介して取込み、胎児側へと輸送することである。そこで、構築した胎盤コンストラクトの細胞表面を走査型電子顕微鏡で観察したが、その表面にはほとんど微絨毛が認められなかった。ところが、灌流培養を行った胎盤コンストラクトでは、BeWo 細胞表面に微絨毛が顕著に誘導されており、流れによって生じる流体シェアストレス (Fluid shear stress; FSS) が微絨毛を誘導していることが示唆された (図 3)。

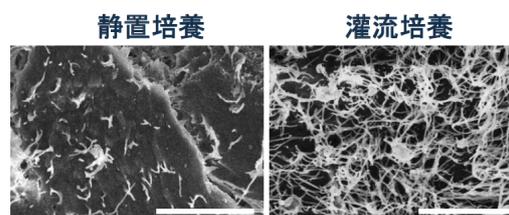


図 3. BeWo 細胞の灌流培養による微絨毛の誘導。スケールバー、5  $\mu\text{m}$ 。

次に、2-NBDG (グルコースの蛍光誘導体) を用いてグルコース輸送能を測定したところ、流体シェアによる細胞へのグルコースの取込み (図 4: Uptake)、胎児チャンネルへの輸送量 (図 4: Fetal channel) の増加が有意に認められた。この効果は、ポリエステル細孔膜では認められないため、VC 膜を足場材料として用いる本デバイスは、胎盤バリア細胞に対する FSS の影響を評価する新たな評価系になり得ると考えられた。

母体側バリア細胞である合胞体栄養膜細胞の微絨毛にはグルコーストランスポーター GLUT1 が局在していることが知られている。そこで、GLUT1 抗体を用いて免疫電子顕微鏡解析を行ったところ、GLUT1 は細胞頂端部、特に微絨毛に局在化していることが確認され、生体組織と類似した局在様式を示した。したがって、以上の実験結果から、FSS により誘導された微絨毛はグルコーストランスポーターをはじめとする種々の輸送体タン

パク質を有する機能的な微絨毛であると推察され、薬剤などの透過性を評価するための有用なアッセイツールになると期待される。

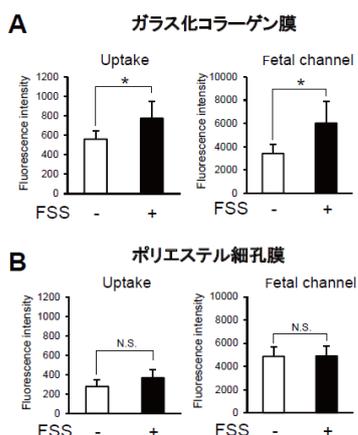


図4. 流体シェア存在下におけるグルコースの輸送の増加。

### (3) 流体シェアストレスによる微絨毛誘導メカニズムの検証

流体シェアによる微絨毛誘導現象はこれまでに報告例がなく、胎盤バリアにおける物質透過性制御に関わる分子メカニズムを知る上でも極めて興味深い。これまでの研究から、流体シェアストレスは、細胞内カルシウムイオン濃度を増加させることが知られている。そこで、胎盤バリアコンストラクトにおいて Fura-2-AM を用いたカルシウムイメージングを行ったところ、流れに応じた細胞内カルシウムイオン濃度の素早い上昇が観察された。灌流培養の際、カルシウムキレート剤である EGTA または BAPTA-AM を添加すると、流体シェアによる微絨毛の誘導が有意に阻害された。これらの結果から、流体シェアストレスによる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が微絨毛形成を誘導していることが示唆された。

微絨毛には種々のカルシウムイオンチャネルが発現している。なかでも、TRP (transient receptor potential) に属する TRPV6 イオンチャネルは、BeWo 細胞だけでなく、胎盤、腎上皮、小腸上皮のような微絨毛を有する組織において発現しており、その関与が示唆された。そこで、TRPV6 siRNA を用いて、TRPV6 をノックダウンし、流体シェア誘導性の微絨毛形成において TRPV6 が必要であるかを調べた (図5)。RT-PCR により TRPV6 のノックダウンを確認した後、TRPV6 ノックダウン細胞を用いてカルシウムイメージングを行った。その結果、流れによる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は著しく阻害され、BeWo 細胞において TRPV6 は流体シェア反応性に活性化するカルシウムイオンチャネルであることが明らかとなった。次に、微絨毛特異的なタンパク質である Ezrin で免疫染

色を行った。FSS により微絨毛が誘導されると、Ezrin は細胞-細胞間接着部位から細胞膜頂端部へと移行し、Ezrin 陽性領域が約4倍に増加した。ところが、TRPV6 ノックダウン細胞では Ezrin 陽性領域が大幅に低減し、FSS による微絨毛の形成が顕著に阻害されていることが示唆された。さらに、微絨毛形成にかかわる遺伝子 *EZR* および *SLC9A3R1* (*EBP-50*)の発現量をリアルタイム PCR により定量的に評価したところ、TRPV6 ノックダウン細胞においては、これらの遺伝子の発現レベルはコントロール siRNA 導入細胞と比較して 54%, 60%にまで低下していた。したがって、TRPV6 は BeWo 細胞において、FSS 反応性に活性化し、微絨毛形成に必要な遺伝子の発現維持に関与していると考えられた。以上の結果から、胎盤バリア組織における微絨毛の形成および微絨毛を介した物質輸送は、TRPV6 を介して流体シェア反応性に制御されている可能性があることが示唆された。本研究成果は、現在国際誌に投稿中である。

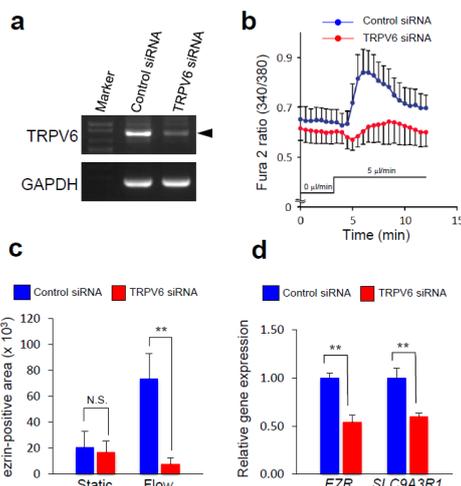


図5. TRPV6 ノックダウンによる流体シェア誘導性微絨毛の低形成。

### 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)

[学会発表] (計2件)

- ① S. Miura, T. Teshima, S. Takeuchi : Reconstitution of the human placental barrier on a chip. JST ERATO International Symposium on 3D Tissue Fabrication, Tokyo, 2014. 5. 21.
- ② 三浦重徳, 手島哲彦, 竹内昌治: マイクロ流路デバイスを利用した胎盤バリア構造の in vitro 再構築. 第13回日本再生医療学会、京都、2014年3月5日

〔その他〕

研究室のホームページ

<http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp/>

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01/index-j.htm>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三浦 重徳 (Miura Shigenori)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70511244

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし