

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790034

研究課題名(和文) マイクロデバイスを用いた血管 神経相互作用とその生物学的メカニズムの研究

研究課題名(英文) Toward Developing a Microdevice for Elucidating the Mechanism of Blood-Nerve Interactions

研究代表者

オケヨ ケネディオモンディ (Okeyo, Kennedy Omondi)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10634652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織では、異種細胞間相互作用と物質輸送が組織機能発現に重要である。特に血管-神経システムでは、血管と神経の間における物質輸送の計測がその機能解明に重要である。本研究では、異種細胞間相互作用と物質輸送の計測を可能にするため、細胞シートの作製とその積層化による体外モデルの開発を目指した。この過程で、我々は、微細加工で作製したマイクロメッシュを培養液中に懸架し、その上に細胞を播種するというメッシュ培養法を新規に開発した。本法では、細胞の接着可能な面積を制限することで、細胞同士の結合と自己組織化を誘発し、細胞シートを作製する。現在、細胞シート積層化により、血管・神経モデルの構築に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Cell-cell interactions and cross-boundary transport of essential substances are important for the functioning of most body tissues. In order to measure cell-cell interaction and transport at the blood-nerve interface, we developed a novel technology for fabricating free standing cell sheets where cells are cultured on microfabricated mesh sheets set suspended in a culture medium. The mesh sheets have narrow mesh strands (3-5 μm in width) for cell adhesion and large apertures (100-200 μm in pitch) such that when suspended, cells cultured on them grow under the condition of highly minimized adhesion area. Minimization of cell-substrate interaction results in an increase in cell-cell adhesion and induces self-assembly organization of cells into cell sheets. We are currently using this method to develop cell sheets of epithelial and endothelial blood cells that will be stacked to create a blood vessel model for eventual integration with nerve cells to realize a blood-nerve system model.

研究分野：マイクロバイオシステム工学

キーワード：細胞接着制御 メッシュ培養法 細胞シート 血管-神経モデル 共培養システム 物質輸送計測 マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

近年、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用いて製作した細胞培養用マイクロデバイスにより、複雑で動的な生体内環境を生体外で再現し、器官や組織の機能を調べることが可能になりつつある[1]。このような組織・臓器の機能を再現したマイクロデバイスは“organ-on-a-chip”や“tissue-on-a-chip”と呼ばれ、動物愛護活動によって減少傾向にある動物実験の代替法として、特に創薬分野において非常に注目されている。現在、organ-on-a-chip の研究は米国を中心に盛んに行われており、特に米国ハーバード大学の Ingber 教授のグループが開発した、肺胞をチップ上で再現した“lung-on-chip”[2]がもっともエレガントで、この分野の可能性の高さを示した。しかし、国内に目を向けるとこのような研究例がほとんどなく、欧米に遅れをとっている。Organ-on-a-chip が新薬検査等の標準プラットフォームとなった時のことを考えると、この分野の研究を立ち上げる必要性に異論はない。創薬分野のみならず、病理学的・生物学的メカニズムの解明においても tissue/organ-on-chip の応用が効率的で、最適な手段であると考えられる。

血管—神経のシステムにおいて、それぞれの組織（血管および神経）を構築する複数の細胞がそれぞれ相互作用し（図1）、システムの機能を生み出している。生理学的状態において、血管を構成する血管内皮細胞（endothelium）や基底膜（basal lamina）、血

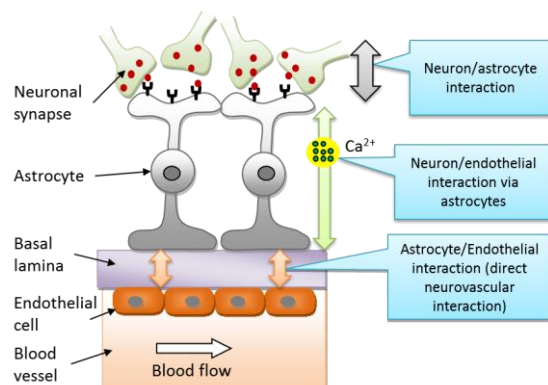


図1：血管—神経の機能ユニットの概略図

管外にあつてニューロンとの間に介在するアストロサイト（astrocyte）が neurovascular unit (NVU) という機能ユニットを構成し、血管と神経の活動がつねに連携している。この機能ユニット(NVU)をマイクロデバイス上で再現できれば、血管—神経の機能的連携機構を生み出す異種細胞間相互作用とその生物学的理解を図ることができる。

2. 研究の目的

本研究では、血管—神経を再現したマイクロデバイスを開発し、それを用いて血管—神経の相互的依存性を明らかにすることが当初の目的であった。特に、血管—神経の連携機構を再現するのに重要な同種・異種細胞間相互作用を実現させるため、層状な細胞組織の新しい作製技術の開発とその応用展開に注力した。

3. 研究の方法

(1) 研究のアプローチ

多くの生体組織は、二層細胞構造の基本的なモチーフに単純化できる。例えば、血管の場合、内皮細胞と上皮細胞の二層構造の構造となっており、それぞれの細胞の層状な組織を重層化すれば、マイクロデバイス上で血管の基本的な構造を模擬できる。さらに、これに神経細胞と合わせて共培養することで、血管—神経のオンチップモデルを構築できる。ここで、血管の内皮細胞と上皮細胞の間における血管細胞同士の相互作用（区別のため、以下、同種細胞相互作用と呼ぶ）と、血管細胞と神経細胞の間における異種細胞間相互作用が存在することがオンチップモデルの再現性に重要である。つまり、同種・異種細胞間インタフェースが細胞間相互作用を妨げては正しく組織機能の再現ができないということを意味する。従来の共培養システムでは、ミクロンオーダーのポアを有する多孔質材料、例えば PDMS (Polydimethylsiloxane)

や PET (Polyethylene Terephthalate) の薄膜を層と層を隔てるインタフェースとして異種細胞の共培養システムに用いられてきた。しかし、このようなインタフェースでは、両側の細胞が直接的に接触できないため、ギャップジャンクション等を介した細胞間相互作用は生じにくい。そこで、本研究では、層状の細胞組織を作製し、積層化することにより、細胞同士が直接相互作用できる共培養システムをマイクロデバイス内で構築するアプローチを取った。そのため、フリースタンディングな細胞組織を作製できる技術として、マイクロメッシュ培養法を新たに開発した。次項でこの技法について説明する。

(2) 微細構造マイクロメッシュを用いた細胞培養法の開発

本研究では、細胞の自己組織化の性質を利用し、層状の細胞シートを作製する方法として、上述のマイクロメッシュ培養法を開発した。本技法では、開口部が 100~200 μm 、枠の幅が 3~5 μm のマイクロメッシュを細胞培養支持体として培養液中に懸架し、その上に細胞を播種する (図 2)。メッシュシートはフォトリソグラフィ法により、光硬化性樹脂 SU-8 を用いて様々な形状のものを作製できる。メッシュシートは厚み 0.5~1 mm のスペーサーを用いて浮かせ、播種する細胞がディッシュ底面に触れないようにする。

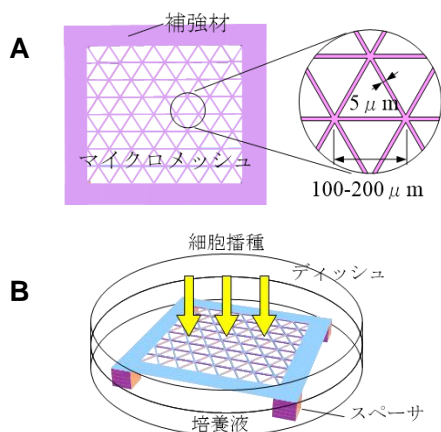


図 2 : マイクロメッシュの形状(A)と細胞播種時の設置方法(B)

5. 研究成果

(1) メッシュ細胞培養技術による単層細胞組織の作製

通常のディッシュ培養では、すべての細胞がディッシュ底面と強い相互作用をしながら培養される。これに対し、メッシュ培養法では、メッシュ枠の幅が、細胞のアドヒージョンスポットが並列に並ぶことができないほど細いため、細胞は、まずメッシュ枠に沿って伸長展開し (図 3A)、次に細胞間の接着により細胞同士の組織化が生じ、メッシュ上で平面状組織が形成される (図 3D)。得られた組織のアクチン構造 (図 3E 緑) と細胞

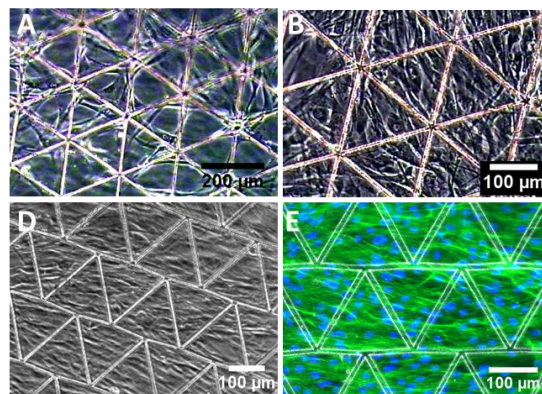


図 3 : 三角形状のマイクロメッシュ上での 2 次元細胞組織の形成. (A) 播種 1 日後で、細胞が伸展している様子、(B) 播種 3 日後で、メッシュが埋まっている様子、(D) 作製された細胞シート、(E) 細胞シートのアクチン骨格構造および核の染色画像。

核 (図 3E 青) より、アクチン構造が組織全体に広がり、細胞間接着ができていること、また殆どの核が焦点面内にあることから単層な細胞シートであることがわかる。

つまり、メッシュ培養法では、細胞と固体表面とを絶縁することにより、細胞間相互作用の効果を顕在化させ、かつ、配列した細胞を観察しながら一様な刺激を与えることが可能である。さらに、細胞シートを重層化する・作製した単層シートの上に他種細胞を播種する、等の方法により、例えば血管細胞と神経細胞からなる、異種細胞間相互作用を行っている細胞群の機能ユニット (NVU) を再現できる。

(2)細胞の配向性制御

心筋細胞の収縮に見られるように、配向性が組織の機能発現に重要な場合がある。このような組織の機能を *in vitro* で再現するため、人為的に細胞の一方向配列化を行う必要がある。研究開発提案者らは、メッシュ形状の設計のみで、図4に示すように、細胞の配向性制御を達成できた。これにより、血管細胞組織や骨格筋細胞、心筋組織)の機能をマイクロ流体デバイス内で再現できる。

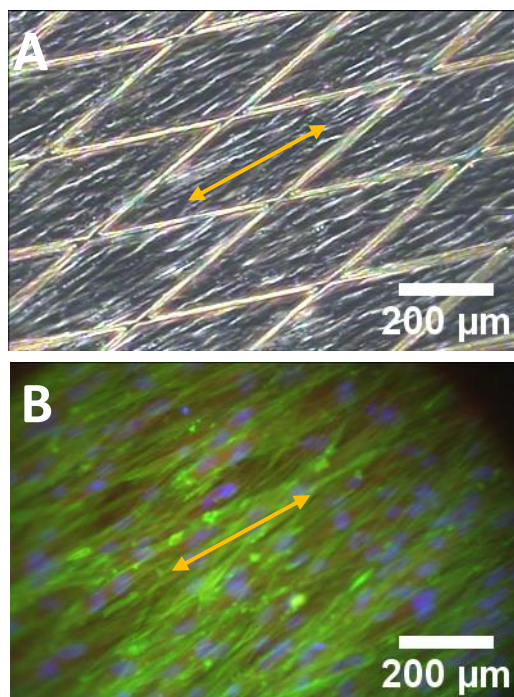


図4：菱形形状のメッシュシート上で方向に配向した TIG120 細胞。(A) 明視野画像、(B) アクチン骨格構造 (緑色) と細胞核 (青色) の染色画像

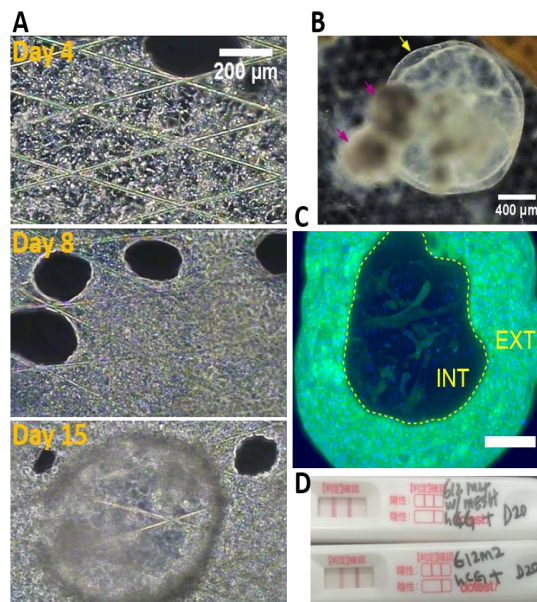


図5：ヒト iPS 細胞のメッシュ培養によるトロフォブラスト分化誘導と胞胚形成。(A) 菱形形状のメッシュシート上での iPS 細胞シートの形成と形成 2 日後の透明な胞胚、(B) 40 日後の胞胚、(C) 胞胚内部における細胞ネットワーク。INT：内部，EXT：外部。Scale bar: 100 μm。(D) 妊娠検査薬による hCG ホルモン検出

(4)メッシュ培養法による iPS 細胞のトロフォブラスト分化誘導

本研究では、幹細胞を活用した組織形成の検討の一環として、メッシュ培養法をヒト iPS 細胞の培養に適用した。上述の方法で、ヒト iPS 細胞を懸架した菱形形状のメッシュシート上で培養したところ、最初は、繊維芽細胞の場合と同様に、細胞がメッシュ構造を埋めるように広がり (図6A, 上と中央)、一様な iPS 細胞シートを形成した。播種 8 日の時点で行った免疫染色と定量 PCR (RT-PCR) の結果より、メッシュ上の iPS 細胞が、ディッシュ培養されたコントロールと同程度の OCT4 発現を示すことが確認された。つまり、この時点ではメッシュシート上の細胞が未分化であることが示唆された。しかし、興味深いことに播種から 10 日後、メッシュ上で形成された iPS 細胞シートの所々に気泡のよ

うな細胞構造体が現れ、時間とともに球状の細胞体に成長した。播種から 15 日後の時点では直径 400 μm の透明な構造であったものが (図 6A,下), 40 日後は, 直径 800 μm の球体に成長していた (図 6B)。また, 構造の内部に血管のようなネットワークが存在することが分かった (図 6C)。さらに, ELISA や RT-PCR による解析の結果, hCG ホルモン (妊娠時に分泌される) の分泌, また, トロフォブラスト細胞にしか発現しない CDX2 遺伝子の発現を確認した。つまり, 誘導試薬を用いずに, メッシュの幾何学的形状がもたらす細胞接着機能制御のみで, トロフォブラスト分化誘導に成功したのである。

ヒト iPS 細胞のトロフォブラスト分化はまれな現象であり, メッシュ培養が作り出す特殊な培養環境によって, 生物学的セレンディピティを抽出できることを証明する画期的な結果である。

参考文献:

1] Jang, K. J. et al.: Lab on a Chip, 10, 36 (2010).

[2] Huh, D. et al.: Science, 328, 1662 (2010).

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 4 件)

- ① Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Hiromitsu Nakauchi, and Masao Washizu. Cell Adhesion Minimization by a Novel Mesh Culture Method Mechanically Directs Trophoblast Differentiation and Self-Assembly Organization of Human Pluripotent Stem Cells, Tissue Engineering Part C: Methods. (2015)
doi:10.1089/ten.TEC.2015.0038.
- ② オケヨ ケネディ オモンディ, 西垣内康宏, 近藤 武宏, 黒澤 修, 小穴 英廣, 小寺 秀俊, 鷺津 正夫: 「電界集中型細胞融合法による抗体産生細胞のこう収率取得」, 静電気学会誌, Vol.38, No.1, p.40-45 (2014)
<http://www.iesj.org/html/journal/articles/papers/38/38-1-40.pdf>
- ③ 阪本祥太, オケヨ ケネディ オモンディ, 鷺津正夫, 「電界集中を用いた超高収率細

胞融合技術」 Electrochemistry Vol. 82, No. 11, p.1-5 (2014).

https://www.jstage.jst.go.jp/pub/pdfpreview/electrochemistry/82/11_82_14-11-FE0091.jpg

- ④ 黒澤修, オケヨ ケネディ オモンディ, 小穴英廣, 沖田圭介, 小寺秀俊, 鷺津正夫: 「オンチップエレクトロポレーションを用いた接着細胞核への遺伝子直接送達法の開発」, 静電気学会誌, Vol.38, No.1, p.28-33 (2014)
<http://www.iesj.org/html/journal/articles/papers/38/38-1-28.pdf>

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kennedy Omondi Okeyo, Rina Yanaru, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: "Generation of epithelial cell sheets with defined cell orientation using microstructured mesh sheets as a substrate for cell culture", Proceedings of Micro TAS 2014, San Antonio USA, p.1128-1130 (2014) .
- ② Kennedy Omondi Okeyo, Taisuke Isozaki, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: "Stable and long term culture of stem cells under shear flow on a microstructured mesh sheet embedded in a fluidic chamber", Proceedings of Micro TAS 2014, San Antonio USA, p.907-909 (2014)
- ③ Yutaro Itagaki, Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Miwako Narita, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: "Cytoplasmic transfer without nuclei mixing between dentritic cells and tomour cells achieved by one-to-one electrofusion via microorifices in a microfluidic device", Proceedings of Micro TAS 2014, San Antonio USA, p.814-816 (2014)
- ④ Kennedy Omondi Okeyo, Yukako Hayashi, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu, "On-Chip Electroporation Device for Direct Introduction of Plasmids into Cell Nucleus and Observation of Cell Reprogramming Process", Proc.17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro TAS 2013), 113-115 (2013).
- ⑤ Rina Yanaru, Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu: "Control of Cell Orientation in Mesenchymal Cell Sheets Fabricated

Using Microstructured Mesh Sheet", Proceedings of IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science 2014, Nagoya, p.230-234 (2014).

- ⑥ Shota Sakamoto, Kennedy Omondi Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu: "Narrowing slit device for high yield one-to-one electrofusion and culture of fusants without gene mixing", Proceedings of IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science 2014, Nagoya, p.291-294 (2014).
- ⑦ Kennedy Omondi Okeyo, Naoya Omasa, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu: "Cell Adhesion Control Initiate Cell Sheet Formation in a Medium Suspension", Proc. 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), 1057-1059 (2013)

[図書] (計 1 件)

Kennedy Omondi Okeyo (著), Hiromi Miyoshi (著), Taiji Adachi (著), "Innovative Approaches to Cell Biomechanics: From Cell Migration to On-Chip Manipulation (Frontiers of Biomechanics)", Springer; ISBN-13: 978-4431551621, 2015 版 (2015/3/14)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ① 名称:連続的な濃度勾配を用いた密度による粒子分離用装置
発明者: , 鷲津正夫, 黒沢修, オケヨ・ケネディ, 馬杉和秀, 青木大一郎 (2014.9.9).
権利者: , 鷲津正夫, 黒沢修, オケヨ・ケネディ, 馬杉和秀, 青木大一郎
種類: 特許案
番号: 特願 2014-183735
出願年月日: 2014.9.9
国内外の別: 国内
- ② 名称:細胞培養支持体, 細胞培養装置, 細胞培養キット, 及び細胞シート
発明者: オケヨ・ケネディ, 鷲津正夫, 秀俊小寺
権利者: 東京大学・京都大学
種類: 特許案
番号: 特願 2013-143706
出願年月日: 2013.7.09

国内外の別: 国内

- ③ 名称:液体分析デバイス, 液体分析システム及び液体分析方法
発明者: オケヨ・ケネディ, 足立作一郎, 原田邦夫
権利者: 日立製作所中央研究所
種類: 特許案
番号: 特開 2013-250205
出願年月日: 2012.6.01
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bntl.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

オケヨ ケネディ (Kennedy Okeyo)
東京大学工学系研究科 助教
研究者番号: 10634652

(3)研究協力者

鷲津 正夫 (Masao Washizu)
東京大学工学系研究科 教授
研究者番号: 10201162

(4)研究協力者

小穴 英廣 (Hidehiro Oana)
東京大学工学系研究科 准教授
研究者番号: 20314172

(5)研究協力者

矢鳴 里奈 (Rina Yanaru)
東京大学工学系研究科 修士課程2年