

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870904

研究課題名(和文) 4次元培養環境制御によるBBB in vitro 脳毛細血管組織の再構築

研究課題名(英文) in vitro BBB reconstruction based on controlling engineered 4D microenvironment

研究代表者

柳川 史樹 (Yanagawa, Fumiki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・産総研特別研究員

研究者番号：50645877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：4次元培養環境構築を確立するために、光開裂性架橋剤(NHS-PC-4armPEGおよびDBCO-PC-4armPEG)の開発および組成検討を行い、さらに灌流培養を実施するための「灌流型マイクロデバイスの流路設計・加工」を行った。その結果、細胞傷害を与えることなく灌流培養ができることが確認され、これらの知見を国際学会にて5件報告した。当初予定していた数種類の細胞を同デバイス内へ導入した後に長期灌流培養を遂行し、形成された組織の生理学的な機能評価を行うには、各細胞種に対するゲル組成の最適化およびデバイスのプロトタイプ改良を進める必要であり、本技術を実用化するうえで、長期なデバックが必須である。

研究成果の概要(英文)：To fabricate microengineered platforms for cell culturing, photocleavable crosslinkers (NHS-PC-4armPEG and DBCO-PC-4armPEG) were developed. The characterization of cell behavior on photodegradable hydrogels, which were composed of the photocleavable crosslinkers, was investigated. The culture was performed without any cell damages. Also, the microengineered devices were fabricated using photolithography techniques to perform 3D perfusion culture. The perfusion culture was also achieved using the fabricated microdevice. To commercialize the microdevices, they would need to be redesigned to evaluate the biological function of micro-engineered tissue.

研究分野：組織工学

キーワード：創薬スクリーニング バイオMEMS マイクロプロセス工学 三次元培養 灌流培養

1. 研究開始当初の背景

脳内には神経細胞をはじめとした様々な細胞が存在している。中でも脳内環境の恒常性維持や中枢神経系疾患の発症に関与している血液脳関門 (BBB) は、脳毛細血管上に局在化しており、末梢と中枢を隔てる重要な役割を果たしている。BBB 機能の発現や維持には、主としてグリオサイトの一種である星状膠細胞 (アストロサイト) および血管周皮細胞 (ペリサイト) の相互作用が必要不可欠であり、その中でもアストロサイトは脳血管内皮細胞とニューロン系の神経伝達を司る部位として3次元構造の核として考えられる。近年、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの3種類の細胞を trans-well にて共培養することで、BBB の特徴的な機能の一つである P-糖タンパク (MDR1, P-gp) やグルコーストランスポーター (GLUT1) の発現が上昇することが報告されている。またこれら3種類の細胞をスフェロイド培養をすることで、脳毛細血管に局在するトランスフォーミング増殖因子 (TGF-1) 受容体の発現が報告されており、BBB 機能を発現した培養環境を in vitro で再構築するには、3種類の細胞の時空間的な制御が必須となってくる。生体血管組織構造を模倣した in vitro 3次元培養モデルを作製するには、①細胞足場構造を空間的に制御した上で、②血管内皮細胞の管腔形成に必要な液性因子である「血管内皮増殖因子(VEGF)および線維芽細胞増殖因子(FGF)の供給」、そして③煎断応力を提供する3次元培養環境を構築することが必要であり、近年組織工学的なアプローチから心筋細胞と血管内皮細胞を積層培養することで、毛細血管網を有した3次元心筋組織構築が昨年報告されている。

2. 研究の目的

向精神薬やアルツハイマー治療薬をはじめとする「脳疾病治療薬の開発」および「脳機能障害の解明」には、in vitro での3次元脳毛細血管モデル作製が要求される。しかしながら、脳毛細血管構造を模倣した3次元組織を in vitro で再構築するには、「細胞足場構造を時空間的に制御」した上で、シーケンスプログラムと連動した「血管内皮細胞の管腔形成に必要な液性因子の供給」および「細胞伸展・配向性制御を目的とした煎断応力の負荷」を提供する細胞培養環境の4次元制御が必須である。近年我々は、4次元細胞制御を目的とした「光分解性ゼラチン基剤の開発」に成功しており、基剤上で培養した血管内皮細胞を時空間的に光制御できることを可能にした。そこで本研究では、4次元培養環境制御による血液脳関門 (BBB) 機能発現 in vitro 脳毛細血管モデルの再構築に挑戦した。

3. 研究の方法

開発した光分解性架橋剤を用いて、

本検討に適した「細胞接着性を有する光分解性基剤の開発」および「灌流型マイクロデバイスの流路設計および加工」を行い、①脳毛細血管内皮細胞の灌流培養に用いるマイクロデバイスのプロトタイプを確立、さらに②アストロサイト-ペリサイト共培養細胞層の積層工程を確立する。その際に、「光分解性ゼラチン流路」と「アストロサイト-ペリサイト共培養層」を連結するための「パターン照射による連結孔の作製」条件を検証し、本工程に関して問題が生じた際には、流路構造の再設計および共培養工程の再検討を行う。そして次年度には、作製した灌流型マイクロデバイスを用いた「脳毛細血管内皮細胞、アストロサイトおよびペリサイトによる4次元積層灌流共培養」を行い、血管内皮細胞上における BBB 機能の評価検討を試みる。最終的には、すべての問題点をフィードバックすることで、学術的かつ産業的に意義のある「4次元培養環境制御による BBB in vitro 脳毛細血管モデルの確立」を目指す。

4. 研究成果

光分解性ゲルの XY 平面分解能について検証するために、UV 照射装置 (365 nm) およびフィルムマスクを用いた二次元パターン分解について検討した。その結果、2.5mM ゼラチン溶液および 5mM amino-4armPEG 溶液より合成した光分解性

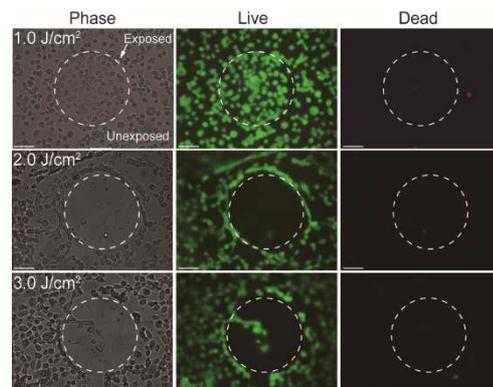


図 1 光分解性ゼラチンゲル上における HUVEC 細胞パターンニング (Bars=100 μ m)

ゲルの XY 平面分解能は、直径 20 μ m まで可能であることが明らかとなった (図 1)。また Z 軸分解能についても同様の検証を行うため、パターン分解したゲル表面に蛍光ビーズを局在化させ、共焦点レーザー顕微鏡にてゲル表面の分解形状および分解深度について検討した。5mM amino-4armPEG 溶液より合成した光分解性ゲルの Z 軸分解能について同様の検討を行った結果、照射強度に応じてゲル内部 150 μ m まで分解可能なことが明らかとなった。さらに同様の検討について HUVEC 細胞を用いて検討を行った。その結果、細胞への障害を与えることなく、細胞マイクロパターンニングが可能であることが明

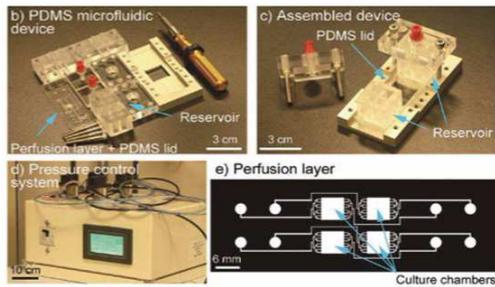


図2 電磁弁制御型の圧力駆動による灌流培養装置

らかとなった。よって本研究より基剤上で培養した血管内皮細胞を時空間的に光制御することを可能にした。さらに開発したゲルを用いて灌流培養を遂行するため、灌流培養に適したデバイスのプロトタイプ機の開発を行った。その結果、パターン化水素ゲルの導入が可能な開閉型マイクロデバイスの制作に成功した (図2)。しかしながら、本プロトタイプ機は、間質流による灌流培養を行う上では問題ないが、当初計画していたパターン化水素ゲル内における長期灌流培養をデバイス内で遂行するにあたり、さまざまな課題がある。その一例として、①ゲルデバイス間の密閉性向上した流路設計、②ゲル膨潤に影響されないパターン化ゲルの作成、③灌流培養下でパターン化ゲルの形状維持および細胞接着性向上のためのゲル組成最適化、④高濃度光開裂性架橋剤使用時の細胞障害性の影響などの課題が生じていた。そこで上記の課題を解決するために、新規ゲル素材の開発に着手した。

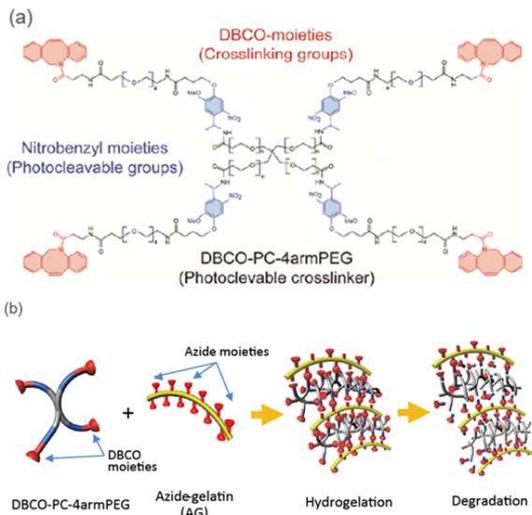


図3 (a) クリック型光開裂性架橋剤 (DBCO-PC-4armPEG) (b) 架橋反応および光分解反応機構

新たに開発した“クリック型光開裂性架橋剤 (DBCO-PC-4armPEG)”と、末端アミノ基をアジド化した“アジド修飾ゼラチン (AG)”を反応させた“クリック型光分解性水素ゲル” (図3) を用いて、灌流培養に適したマ

イクロデバイスのプロトタイプ開発を遂行した。その結果、NHS-PC-4armPEGを用いた際と同レベルのパターン分解能を有する光分解性水素ゲルの作成が可能 (図4) であることが明らかとなった。

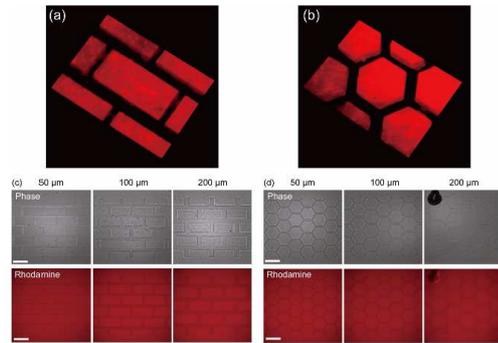


図4 クリック型架橋型光分解性ゼラチンゲル上における水素ゲルマイクロパターンニング (Bars=500 μ m)

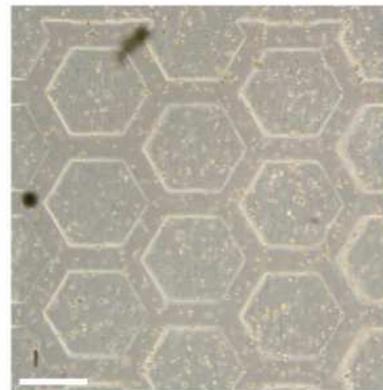


図5 クリック型架橋型光分解性ゼラチンゲル上における HepG2 細胞パターンニング (Bars=500 μ m)

また今回用いているゲル化は、高選択反応性のクリック反応に準じた架橋反応であるため、ゲル包埋した細胞に対しても、細胞障害性が皆無であることも同時に確認された。そこで次に作製したマイクロデバイスへゲル導入を行い、モデル細胞を用いて灌流培養工程を確認した (図5)。その結果、細胞傷害を与えることなく灌流培養できることが確認されたため、これら三次元パターン化ゲルの灌流培養に関する知見を国際学会にて報告した。しかしながら、当初予定していた数種類の細胞を同マイクロデバイス内へ導入した後に長期灌流培養を遂行し、形成された組織の生理学的な機能評価を行うには、各種細胞種に対するゲル組成の最適化およびデバイスのプロトタイプ改良を進める必要がある。将来的には一連工程の再現性を含めた長期なデバックを行うことが必須であり、本技術を実用化するために今後解決すべき課題と考えられる。

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)

[学会発表] (計5件)

①Micropatterning of click-crosslinked and photodegradable hydrogels for 3D perfusion culture. Yanagawa F., Tamura M., Sugiura S., Takagi T., Shin K., Sumaru K., Kanamori T., 2015/12, MicroTAS 2015, Gyeongju

②3D perfusion culture through patterned photodegradable hydrogels., Yanagawa F., Tamura M., Sugiura S., Takagi T., Sumaru K. and Kanamori T., 2015/12, Pacific Chem 2015, Honolulu

③Preparation of photodegradable hydrogels using activated-ester-type photocleavable crosslinker, Yanagawa F., Sugiura S., Takagi T., Sumaru K., Kanamori T., 2014/12, The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC2014), Tokyo

④Activated-ester-type photocleavable crosslinker for preparing micropatterned photodegradable hydrogel., Yanagawa F., Sugiura S., Takagi T., Sumaru K., Kanamori T. 2014/11, The 22nd Polymer Networks Group Meeting and the 10th Gel Symposium (PN&G2014), Tsukuba

⑤Characterization of cell behavior on patterned photodegradable hydrogels., Yanagawa F., Sugiura S., Takagi T., Sumaru K., Kanamori T., 2014/10, MicroTAS 2014, San Antonio

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 史樹 (YANAGAWA FUMIKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 産総研特別研究員

研究者番号：50645877

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：