

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12500

研究課題名(和文) ヒト胎盤チップ開発の挑戦

研究課題名(英文) Challenge for development of placenta-on-a-chip

研究代表者

船本 健一 (Funamoto, Kenichi)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授

研究者番号：70451630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胎盤内の微小環境の構造と機能を再現するためにヒト胎盤チップを開発した。ヒト胎盤内の絨毛間腔と胎児血管を模擬するメディア流路の間に、生体外マトリクスを模擬する3本のゲル流路を並べて配置した。また、チップ内の酸素濃度を制御するために、メディア流路の鉛直上方に混合ガスを供給するガス流路を配置した。チップ内でヒト絨毛がん細胞(JEG3)とヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の単層を形成する方法と、その物質透過性を計測する方法を確立した。さらに、JEG3とHUVECの共存培養下で酸素濃度を制御した結果、細胞の形態と細胞間接着の変化が観察され、酸素濃度が細胞間の相互作用に影響を与える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：A placenta-on-a-chip was developed in this study in order to reproduce the structure and function of the microenvironment of a human placenta. Media channels, which model intervillous space and fetal blood vessel, were placed flanking the three parallel gel channels which mimic the extracellular matrix. Gas channels through which gas mixtures are supplied to control the oxygen tension inside the chip were placed above the media channels. A method to form monolayers of human choriocarcinoma cells (JEG3s) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in the media channels, and a method to measure the permeability of the monolayers were established. The co-culture of JEG3s and HUVECs under a controlled oxygen tension at different concentrations showed variations of cell morphology and cell junctions, implying that oxygen tension can influence the cell-cell interaction.

研究分野：生体工学、流体工学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織 生物・生体工学 流体工学 ナノバイオ マイクロ流体デバイス
胎盤 低酸素

1. 研究開始当初の背景

出生率が低下しているわが国において、生まれ来る生命を如何に安全に迎えるかは、非常に重要な課題である。子宮内の胎児は、母体と胎児をつなぐ唯一の生体組織である胎盤を介し、酸素や栄養の供給を受け、代謝物を母体へと返す。そのため、胎児の健やかな発育と母体の健康状態の維持には、胎盤の正常な機能が不可欠である。ヒト胎盤内では、主に細胞性栄養膜細胞と合胞体性栄養膜細胞、血管内皮細胞が共存して特徴的な3次元の層構造を形成している(図1)。その微小環境では、母体血液と胎児血液が交わることなく、両者の間で上述の物質交換が行われている。また、胎盤内は母体側と比較して胎児側の酸素濃度が低く、酸素濃度勾配が存在する。母体の栄養・健康状態が胎盤と胎児に与える影響については、動物実験による研究が行われてきた。しかし、胎盤の構造は種によって異なり、ヒト胎盤を忠実に再現するモデルは存在しないという根本的な問題があった。

近年、高分子材料であるポリジメチルシロキサン(PDMS)内に高さ数百ミクロンの流路構造を形成したマイクロ流体デバイスを、細胞実験に用いる研究が盛んに行われている。これにより、細胞の3次元培養や、化学的・機械的な刺激に対する個々の細胞の応答、異なる種類の細胞間の相互作用をリアルタイムかつ高解像度に観察することが可能になった。さらに、肺や心臓、腎臓などの臓器・器官内の微小環境の構造と機能を模倣する人工臓器チップ(Organ-on-a-chip)の開発が国内外で試みられている。

研究代表者は、生体内微小環境における低酸素環境を再現して細胞群の挙動を解明するため、3次元培養した細胞周囲の酸素濃度を制御しながら細胞の観察を可能にするマイクロ流体デバイスを開発してきた(Funamoto, et al., Lab Chip, 2012)。このような背景の下、研究代表者独自の酸素濃度を制御するマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養技術を応用することにより、ヒト胎盤の微小環境の構造と機能を有するヒト胎盤チップ(Placenta-on-a-chip)を開発するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト胎盤の基礎研究に不可欠な生体外モデルとして、ヒト胎盤チップを開発する。研究代表者独自の微小環境の酸素濃度を制御するマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養技術を応用し、ヒト胎盤を構成する細胞群の共存培養方法を確立する。また、開発したチップ内でヒト胎盤を構成する細胞性栄養膜細胞と血管内皮細胞を共存培養し、胎盤の形成過程と低酸素・低栄養状態が胎盤の機能に与える影響を細胞レベルで解明するための検討を行う。

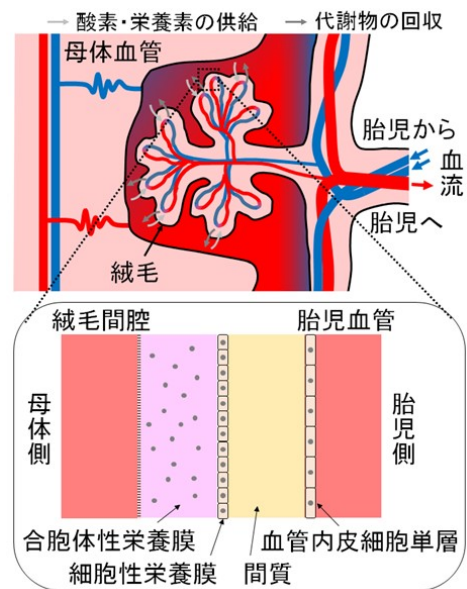


図1 ヒト胎盤の構造と微小環境の概略図

3. 研究の方法

ヒト胎盤チップの設計においては、細胞性栄養膜細胞と合胞体性栄養膜細胞、血管内皮細胞が形成するヒト胎盤内に特徴的な3次元の層構造(図1参照)を可能な限り忠実に再現するようにした。特に、各細胞を培養することで層構造を形成すると共に、母体血液と胎児血液中の酸素濃度の差を模倣した酸素濃度勾配を生成できるようにした。まず、2本の細胞培養液の流路(メディア流路)により、絨毛間腔(母体血貯留)と胎児血管を模倣した。それらの流路の間には、生体外マトリクスを模倣してハイドロゲルを配置するゲル流路を設置した。2本のメディア流路を独立させることで、異なる細胞培養液の還流とゲルの左右の間に圧力差を発生させることが可能になる。また、チップ内部の酸素濃度を制御して一様な低酸素状態や酸素濃度勾配を生成するため、2本のガス流路をメディア流路やゲル流路と並行させて設け、それぞれに酸素濃度を予め調整した混合ガスを供給することにした。このとき、チップ内の酸素濃度は、ガス流路の位置やサイズ、流路パターン、供給する混合ガス中の酸素濃度、メディア流路とガス流路に供給する各流体(細胞培養液およびガス)の流量に応じて変化する。これらの条件に対する酸素濃度の変化を明らかにするため、汎用有限要素法解析ソフトウェア(COMSOL Multiphysics 4.2a, COMSOL, USA)を用いて解析を行った。各流路内の流体解析を行い、酸素濃度に関する対流拡散方程式を解くことでチップ内に生成される酸素濃度分布を求めた。ここで、各流路の寸法は、過去の研究やヒト胎盤内の各層の厚さを参考に、幅500 μm、高さ150 μmを基本として適宜変更を加えた。

ヒト胎盤チップ内の流路構造を設計後、実際に流路パターンをシリコンウェハー上に積層した。その上に主剤と硬化剤を10:1の

割合で混合した PDMS (Silgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, USA) を注入し、70 °C のオーブン内で硬化させて流路パターンを PDMS に転写した。その後、流路パターンを転写した PDMS とカバーガラスをプラズマ処理して接着させ、チップを作製した。

ヒト胎盤チップの作製後、実際に細胞性栄養膜細胞と血管内皮細胞を播種して細胞性栄養膜と血管内皮細胞単層をチップ内で形成する方法を検討した。細胞性栄養膜細胞のモデル細胞としてヒト妊娠性絨毛がん細胞 (JEG3, ATCC HTB-36, ATCC, USA) を用い、血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, C2519A, Lonza, USA) を用いた。JEG3 と HUVEC は別々のディッシュ上で培養し、コンフルエントの状態に達する前に回収して左右のメディア流路にそれぞれ播種した。常酸素条件下で、細胞培養液の種類と交換のタイミング、細胞播種時の細胞密度、メディア流路表面のコートイング、ゲルの密度と pH、細胞培養日数を変えて培養し、細胞の様子を観察した。

さらに、ヒト胎盤の形成過程を観察するため、酸素濃度制御下で JEG3 と HUVEC の相互作用を観察を行った。それぞれの細胞を流路内で培養し、相互作用がある状態で 2 本のガス流路に酸素濃度 21% または 0% の混合ガスを供給して常酸素状態または低酸素状態を生成した。24 時間以上共存培養を行った後に細胞を固定し、細胞間接着や細胞骨格を担うタンパク質の免疫蛍光染色を行うことで、酸素濃度がヒト胎盤の形成に与える影響を観察した。

4. 研究成果

ヒト胎盤内の微小環境を再現するための流路パターンと構造を設計し、ヒト胎盤チップを作製した (図 2)。左右のメディア流路により絨毛間腔と胎児血管をそれぞれ模擬し、3 本のゲル流路①、②、③を挟むように配置した。2 本のメディア流路は、実験内容に応じて下流側で合流または分離できる構造とした。それらを合流させることで、ゲル内の圧力を一定にすることができる。一方、それらを分離させることで、各メディア流路に異なる細胞培養液を還流させたり、ゲルの左右の間に圧力差を発生させたりすることができる。また、左右のメディア流路を分離させ、ゲル流路①と③にハイドロゲルを配置し、中央のゲル流路②を空洞のままにしておくことで、各メディア流路内に異なる細胞を相互作用がない状態で別々に培養することができる。メディア流路の幅は 500 μm 、ゲル流路①および③の幅は 500 μm 、ゲル流路②の幅は 300 μm とした。また、いずれの流路の高さも 150 μm とした。

ヒト胎盤チップ内の酸素濃度を制御するため、内部に設ける 2 本のガス流路の位置やサイズ、流路パターン、供給する混合ガス中の酸素濃度、各流体の流量を変えた場合に、

チップ内に生成される酸素濃度の変化について数値解析を行った。生成可能な酸素濃度の最小値と、常酸素状態から最終的な低酸素状態を生成するまでに要する時間 (制御応答時間) の観点から、ガス流路はメディア流路の鉛直上方または下方に 3 次元的に配置することが好ましいことが明らかになった (図 2 参照)。すなわち、他の流路と接する面積を増やすことで PDMS を介したガス交換が促進され、より低い酸素濃度をより速やかに生成することができた。ただし、ガス流路を下方に設置した場合は顕微鏡の焦点距離の制限により、細胞の観察が困難になる可能性があるため、ガス流路はメディア流路の上方に設置する構造を採用した。ガス流路の幅は 1,000 μm 、高さは 150 μm とした。さらに、酸素濃度を確実に制御するためには、周囲の環境から拡散によりチップ内に流入してくる酸素を遮断することが重要であり、チップ内にガス透過性の低いフィルムとしてポリカーボネート (PC) フィルムをガス流路の上方に設置することにした (図 2 参照)。以上の数値解析の結果、酸素濃度 1% 未満の均一な低酸素状態を生成できることや、ゲル流路を横切る方向に線形の酸素濃度勾配を生成できることが示された (図 3)。

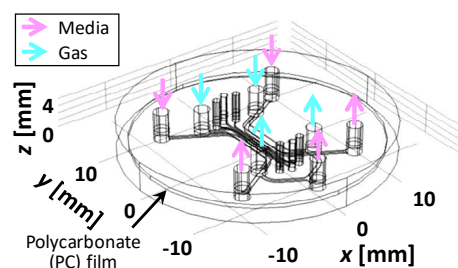


図 2 ヒト胎盤チップの概略図

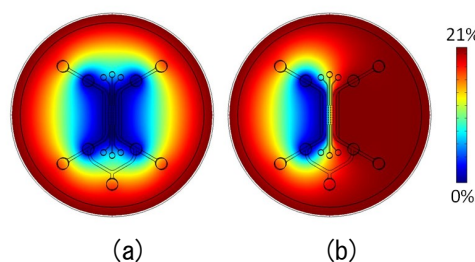


図 3 数値解析によるヒト胎盤チップ内のガラス底面上の酸素濃度分布 : (a) 両側のガス流路に酸素濃度 0% の混合ガスを供給した場合, (b) 左右のガス流路に酸素濃度 0% と 21% の混合ガスをそれぞれ供給した場合

次に、設計したヒト胎盤チップを実際に作製した。メディア流路とゲル流路のパターンとガス流路のパターンを積層したウェハを別々に用意し、それらの上に PDMS を厚さ 0.5 mm になるように注入して硬化させた。ガス流路の PDMS 層には、その上面に各流路に

アクセスするための穴を開けた厚さ 0.5 mm の PC フィルムを設置し、全体で厚さが 3.5 mm となるように PDMS を追加して硬化させた。各流路パターンを転写した PDMS 層を直径 35 mm の円形に切り出し、ガス流路の PDMS 層に対してガス流路にアクセスするための穴を開けた後、もう一方の PDMS 層と共にプラズマ処理を行い、重ね合わせて接着させた。その後、メディア流路とゲル流路にアクセスするための穴を開け、さらにカバーガラスと共にプラズマ処理を行い、接着させることでチップを作製した。最終的なチップの厚さは 4 mm とした。

開発したヒト胎盤チップ内で JEG3 と HUVEC を培養し、細胞性栄養膜と血管内皮細胞単層を形成する方法について研究を行った。各細胞の細胞培養液には、ウシ胎仔血清を 20%、ペニシリン-ストレプトマイシンを 1% の割合で混合し、ヒト線維芽細胞増殖因子を 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ の濃度で添加した Medium 199 (M199, Gibco, USA) を用いた。チップ内での細胞培養条件として、細胞播種時の細胞密度、メディア流路のコーティング、ゲルの密度と pH、細胞培養日数を変えて細胞を培養し、各細胞層を形成するためのノウハウを蓄積した。最終的な手順として、まず、母体側のゲル流路①と胎児側のゲル流路③にそれぞれ 2.5 mg/ml, pH7.4 に調整した I 型コラーゲンゲル溶液を注入し、インキュベーター内でゲル化させた。メディア流路に細胞培養液を注入した後、インキュベーター内に一晩静置することでゲルを安定させた。中央のゲル流路②は、この時点では空洞の状態のままにした。播種する細胞の接着性を高めると共に、細胞培養の過程で各細胞がゲル内に侵入することを防ぐ目的で、メディア流路を 2 mg/ml のマトリゲルでコーティングした。その後、母体側（左側）のメディア流路に JEG3 を、胎児側（右側）のメディア流路に HUVEC をそれぞれ播種した。このとき、各細胞の密度 (5×10^6 個/ml) と細胞が流路内腔上に接着したタイミング（1 時間以内）で細胞培養液を交換することが各細胞層の形成にとって非常に重要であることがわかった。それぞれ 1 晩以上培養することでメディア流路壁面上に各細胞層を形成することができた。本実験方法により、同一チップ内で異なる細胞を相互作用のない状態で単一培養し、各細胞層を形成することが可能になった（図 4）。

また、メディア流路に蛍光デキストランを注入し、そのゲル内への拡散を解析することで細胞層の物質透過性を定量評価する方法を確立した。ここでは、ゲル流路に注入したコラーゲンゲルの鉛直方向の表面に形成した HUVEC の単層を対象に、常酸素状態と低酸素状態を生成して検討を行った。デキストランを注入した直後と 2 時間後に撮影した蛍光顕微鏡画像中のメディア流路とゲル内の蛍光強度分布を求め、ゲル内の蛍光強度の増加に基づいて血管内皮細胞単層の物質透過率

を算出した。算出方法について考察した結果、デキストランのゲル内への拡散が準定常状態にあることを仮定して評価する方法よりも、デキストランの拡散の時間変化に基づいて評価する方法が、より信頼性のある値を提供することを示した。また、低酸素負荷に暴露されることで血管内皮細胞単層の物質透過性が向上し、透過する物質の分子サイズに対する選択性が不明瞭になることを示した。

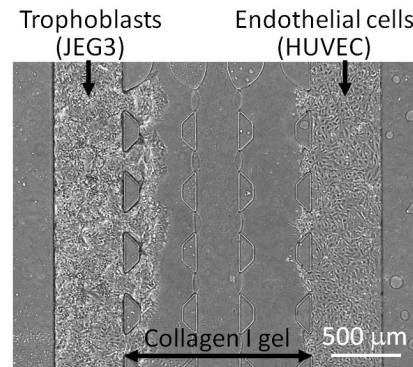
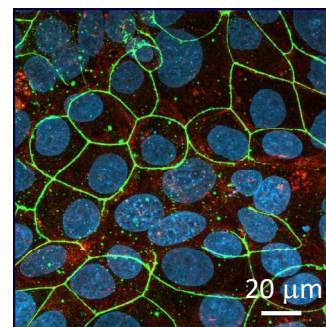
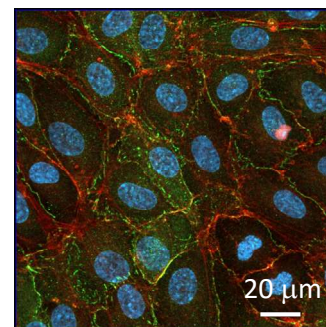


図 4 ヒト胎盤チップ内での細胞性栄養膜細胞と血管内皮細胞の共存培養の様子



(a)



(b)

図 5 ヒト胎盤チップ内で低酸素状態を生成して 24 時間培養したときの (a) 細胞性栄養膜細胞と (b) 血管内皮細胞の共焦点顕微鏡画像。赤色：アクチン繊維，緑色：ZO-1，青色：核

さらに、母体側と胎児側のメディア流路で JEG3 と HUVEC を培養して各細胞層を形成した後、中央のゲル流路②にコラーゲンゲルを注入してゲル化させ、細胞間の相互作用がある

条件で培養を行った。このとき、ガス流路に酸素濃度 21%または 0%の混合ガスを供給してチップ内に常酸素状態または低酸素状態を生成した。24 時間以上培養を行った後、細胞を固定して細胞間の密着接合を担うタンパク質の ZO-1 と、アクチン繊維および核を染色して顕微鏡観察を行った。低酸素状態を生成して共存培養した JEG3 と HUVEC の共焦点顕微鏡画像の一例を図 5 に示す。ヒト胎盤内の合胞体性栄養膜の形成過程で生じる細胞性栄養膜細胞同士の融合がヒト胎盤チップ内でも観察された。すなわち、JEG3 の細胞間の ZO-1 が消失することで融合が生じ、多核化した合胞体性栄養膜細胞が観察された (図 5(a))。また、HUVEC の単層では、細胞周囲を囲む ZO-1 が、低酸素負荷時に断続的になる様子が観察された (図 5(b))。酸素濃度によって細胞の形態と細胞間接着の変化が観察され、酸素濃度は細胞間の相互作用にも影響を与えているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kenichi Funamoto, Daisuke Yoshino, Kento Matsubara, Ioannis K. Zervantonakis, Kiyoe Funamoto, Masafumi Nakayama, Jun Masamune, Yoshitaka Kimura, Roger D. Kamm, Endothelial monolayer permeability under controlled oxygen tension, Integrative Biology, 査読有, Vol. 9, Issue6, 2017, pp. 529-538
DOI: 10.1039/c7ib00068e

[学会発表] (計 3 件)

- ① 船本 健一、吉野 大輔、中山 勝文、低酸素ストレスに対する血管内皮細胞単層の細胞間結合の初期応答、日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、2017
- ② 船本 健一、吉野 大輔、松原 健人、船本 聖絵、木村 芳孝、Roger D. Kamm、低酸素負荷による血管内皮細胞単層の物質透過性と接着結合の変化、日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会、2017
- ③ Kenichi Funamoto, Microfluidic experiments of cellular response to hypoxia, The 13th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2016), 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船本 健一 (FUNAMOTO, Kenichi)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授
研究者番号：70451630

(2) 研究協力者

吉野 大輔 (YOSHINO, Daisuke)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

伊藤 拓哉 (ITO, Takuya)
自治医科大学・先端医療技術開発センター・講師

杉林 里佳 (SUGIBAYASHI, Rika)
国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・医員

船本 聖絵 (FUNAMOTO, Kiyoe)
東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員