

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13719

研究課題名（和文）複雑な血管網を有するマイクロ三次元組織の開発

研究課題名（英文）Development of micro-3D tissues having capillary vessel network

研究代表者

佐藤 記一（Sato, Kiichi）

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：50321906

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）：薬剤の体内分布に関わる筋肉や脂肪組織，ドラッグデリバリーに関わる末梢組織のモデル化を実現するために，毛細血管網を有した筋肉や脂肪などの三次元組織，およびハイドロゲルを用いた血管の構築を目指した．市販のヒト初代細胞を利用し，内部に毛細血管網を有したマイクロ三次元組織を構築することを実現した．本研究の成果は将来的に，創薬や有毒化学物質等のリスク評価など，様々な分野に応用可能であると期待される．

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed 3D tissues of muscle and fat having capillary network inside and blood vessels built in a hydrogel to realize muscle, fat, and peripheral tissue models for drug delivery and distribution studies. By using commercially available human primary cells, micro-3D tissues having capillary vessel network inside were realized. The results of this work will be applicable to various fields including drug development and risk evaluation of toxic chemicals.

研究分野：マイクロ分析化学

キーワード：マイクロ流体デバイス マイクロチップ 血管模倣デバイス 生体模倣デバイス 動物実験代替法

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに腸管と肝臓、腎排泄を含めた循環器系、薬剤の標的組織をチップ化し、経口投与された薬の効果を検定するマイクロデバイスのプロトタイプを開発してきた^[1-4]。腸上皮など一部の臓器モデルは、単層培養細胞によって機能を模倣することができたが、より高い機能を有した臓器モデルの実現や薬剤の組織への移行や分布などのアッセイには、単層ではなく三次元培養された細胞群が必要である。また、この細胞群の生命を維持し、物質移行性を正しく評価するためには内部に毛細血管網を構築することも必要である。

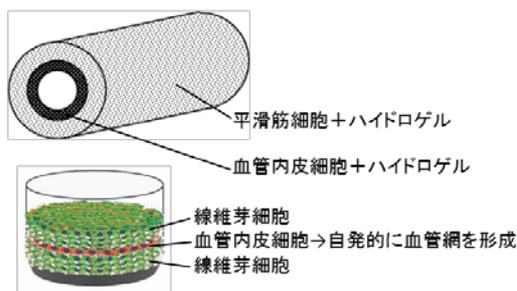
しかしながら内部に毛細血管網を有した組織のマイクロデバイス内での三次元培養法は開発途上の段階にあり、バイオアッセイへの応用例は存在しない。それに対し、マイクロデバイス内でこれを実現すれば効率的なアッセイの実現に大いに寄与すると考えた。

2. 研究の目的

外部から導入した薬剤等の移行性試験を実現するための、内部に毛細血管網を有した、ヒト由来細胞の三次元集積培養をマイクロデバイス内で実現することを本研究の目的とした。

細胞の三次元培養法としては、フィブロネクチンとゼラチンのナノ薄膜多層コーティングした細胞を一度に大量に播種する集積培養法^[5]を参考に、これをマイクロ空間内で実現することをめざして、マイクロデバイスの設計・試作と培養手順の最適化を試みた。

一方、内部に構築する血管網については3種類の作製方法について検討した。一つは上述の細胞の三次元集積培養時に血管内皮細胞を共培養することにより、血管内皮細胞が自発的に毛細血管網を構築することを期待する方法で、二つめはハイドロゲルとマイクロデバイスの特性を活かした管腔構造作製法により構築した、血管内皮細胞と平滑筋細胞から比較的太い血管を作製する方法で、三つめは抗がん剤の患部移行性に重要な間質ゲル中での毛細血管網の自発的構築をめざす方法である。

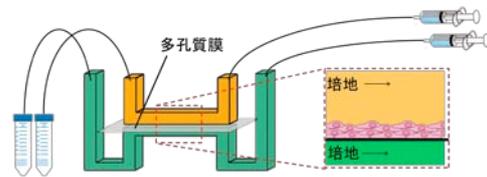


3. 研究の方法

(1) 細胞培養のためのマイクロデバイスの設計・試作

研究代表者の過去の研究により、チップ内の微小な培養槽で細胞を三次元培養する場合、細胞量に対して培地量が少なく、栄養欠乏に陥りやすいことを見いだしていた。そのため、細胞の接着面側からの培地供給も必須であり、多孔質膜上に細胞を培養することを着想した。

そこで、上下に接する2本の流路の間を多孔質膜で仕切るようなチップを作製し、多孔質膜の上側を培養槽とすることを考えた。チップはソフトリソグラフィによってPDMSを用いて作製し、流路の形状及びサイズについて最適化を試みた。多孔質膜としてはいくつかの種類の種類メンブレンフィルターについて検討し、孔径 0.4 μm のPET 膜を細胞外マトリクスでコーティングしたものが最適であった。

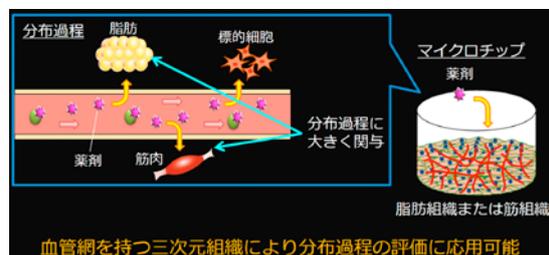


(2) 細胞の集積培養法の検討

フィブロネクチンとゼラチンのナノ薄膜多層コーティングした細胞を一度に大量に播種するという集積培養法^[5]を参考に、これをマイクロ空間内で実現するための培養手順の最適化を試みた。細胞懸濁液の細胞数密度、導入方法、培養時間、培地の供給方法などについて検討しつつ、ヒト由来の初代線維芽細胞の三次元培養を試みた。

(3) 自発的毛細血管網の構築

(2)の三次元培養している線維芽細胞層の間に血管内皮細胞を1層共培養することにより、自発的に管腔構造を形成し、血管として機能する可能性が有ることが示唆されていた。そこで、本研究では線維芽細胞を集積培養したのち、血管内皮細胞を1層培養し、その上にさらに線維芽細胞を集積培養する方法で内部に血管構造を有した三次元組織の開発を試みた。細胞数や培養時間、培養方法などを検討しながら、細胞の各種蛍光染色や生死判定などで、管構造の存在と細胞の生育状態を確認した。



(4) マイクロ流体デバイスを用いた太い模擬血管の作製

マイクロ流体デバイスを用いることにより管腔構造を有したハイドロゲルを造形する手法が考案されている。本研究では、この方法を応用してハイドロゲル内部に2種類の細胞を共培養することにより模擬血管を作製することを試みた。

管腔構造内に培養する細胞としては内側に血管内皮細胞、外側に平滑筋細胞を用いた。用いるハイドロゲル素材についてはアルギン酸を中心に検討し、ハイドロゲルへの細胞外マトリックスや接着因子添加の効果についても検討した。

模擬血管の作製手順としては、細胞を懸濁したアルギン酸溶液にマイクロ流路内で外側から Ca^{2+} を作用させる事により、外側のみゲル化させることで環状構造を作製した。

(5) 間質ゲル中での毛細血管網の構築

連続する柱状構造で仕切られながら接する3つの流路をもつマイクロデバイスを作製した。作製した3本の流路のうち、中央の流路のみに細胞外マトリックスゲルを導入し、残り2つの流路には培地を充填した。各流路に血管内皮細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞などを共培養することにより相互作用を観察した。

4. 研究成果

(1) 三次元組織の培養

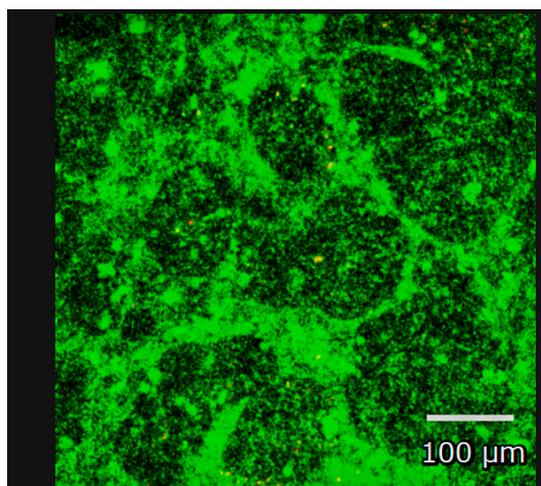
脂肪組織の基となる細胞（マウス由来脂肪前駆細胞 3T3-L1）と筋組織の基となる細胞（マウス由来筋芽細胞 C2C12）について、フィブロネクチン及びゼラチンの多層ナノ薄膜コーティング（FN-G コーティング）を施し、マイクロデバイス内の培養槽で積層培養を行った。どちらの細胞も増殖時は未分化の状態であるため、播種した細胞の十分な接着と増殖が見られたのちに、それぞれ分化させる必要がある。本研究においては、脂肪前駆細胞は $10 \mu\text{g/mL}$ のインスリンを含む DMEM、筋芽細胞は血清濃度を低くした DMEM を用いて分化誘導を行った。蛍光顕微鏡観察の結果、脂肪滴の生成と筋芽細胞の形状変化から三次元脂肪組織と筋組織を構築したと結論した。

(2) 三次元組織内自発的毛細血管網の構築

次に組織内部に毛細血管網の構築を試みた。血管網の構築には線維芽細胞と血管内皮細胞の共培養に関する研究例を参考に、サンドイッチ培養と混合積層培養の2つの方法を検討した。線維芽細胞を含む細胞層間に血管内皮細胞層を挟み込んだサンドイッチ培養を行った結果、脂肪前駆細胞、筋芽細胞どちらについても組織の中央に血管内皮細胞層を挟み込んで培養を行うことができた。しかし、培養を続けても血管内皮細胞が伸展した様子を確認することができなかった。これは、

血管内皮細胞の伸展には線維芽細胞が出す成長因子が必要であるが、サンドイッチ培養では血管内皮細胞の周囲に十分に線維芽細胞がいきわたらず、血管内皮細胞の伸展を促すことができなかつたためであると考えた。

それに対し、混合共培養を行った場合では、脂肪前駆細胞、線維芽細胞と血管内皮細胞の混合共培養において血管内皮細胞の顕著な伸展が見られた。このような差が見られたのは細胞を混合して播種することで線維芽細胞が分泌する増殖因子が血管内皮細胞に十分にいきわたることができたためであると考えられた。一方、筋芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の混合共培養においては、血管内皮細胞が凝集した様子は観察されたものの、血管様構造の形成には至らなかった。この原因として、用いた細胞の由来が異なること、また十分な増殖因子が血管内皮細胞にいきわたらなかつたことが考えられる。



細胞: 血管内皮細胞、線維芽細胞
脂肪前駆細胞
染色: 免疫染色
培養期間: 13日
培養: マイクロチップ

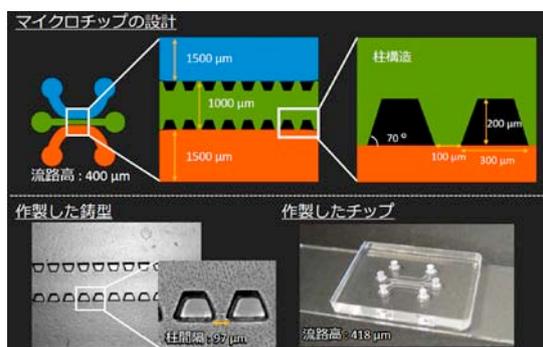
(3) 太い模擬血管の作製

管腔状ハイドロゲル内部に細胞培養することにより模擬血管を作製することを試みた。管腔構造内に培養する細胞としては動脈由来の血管平滑筋細胞を用いた。用いるハイドロゲル素材についてはアルギン酸を中心に検討し、細胞外マトリックスや接着因子添加の効果についても検討したが、十分な平滑筋細胞の伸展は見られなかつた。そのため、ハイドロゲル材料としてコラーゲンをを用い、pH変化によってゲル化させることにより、より優れた平滑筋細胞の管腔状培養構造体を構築することに成功した。

(4) 間質ゲル中での毛細血管網の構築

ゲルを担持した状態で細胞培養可能なマイクロ流体デバイスとして、連続する柱状構造に仕切られた3つの流路をもつデバイス

を設計、作製した。柱構造の大きさ、形状、間隔などについて条件検討を行い、ゲルの導入や共培養が容易にできるように最適化を試みた。中央の流路に導入するゲルとしては市販の細胞外マトリックスゲルであるマトリゲルを用いた。

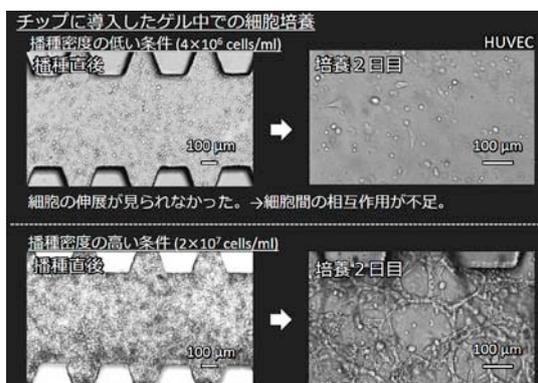


マイクロチップ内で細胞を共培養するにあたり、細胞培養に適した流路表面修飾について検討した。修飾剤にはコラーゲン、フィブロネクチン、マトリゲルを用いた。その結果、乳癌由来細胞株 MCF-7 はコラーゲンおよびフィブロネクチン修飾で最もよく成長した、ヒト初代血管内皮細胞 HUVEC はフィブロネクチン修飾で最もよく成長が確認できた。

1本の培地流路に MCF-7 を、他方の培地流路に HUVEC を播種し、中央流路のゲル中には細胞や増殖因子などは添加しない状態で共培養を試みたところ、両細胞ともに順調に生育し、84時間培養したところで MCF-7 のゲル中への伸展は確認できたが、HUVEC の伸展は確認できなかった。この結果は、MCF-7 が血管をあまり誘引しないという報告と一致していると考えられる。

一方、HUVEC をゲル内に懸濁して培養を行ったところ、播種密度が低い条件下では細胞の伸展が見られなかった。これは、ゲル中における細胞間の距離が遠く、細胞間の相互作用が不足していることが原因であると考えられる。それに対し、細胞密度を高めて培養を行ったところ、培養2日目において細胞が伸展している様子が見られた。

構築した血管様ネットワークを詳細に解析するため、4日間培養した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、ゲル中で三次元的に血管内皮細胞がネットワークを形成している様子が観察できた。スライス画像を撮影し、合成した断面図を見ると中空状の構造が連なっていることが確認できた。これにより、本実験で培養した HUVEC は管状構造を形成していると結論した。



(5) まとめ

本研究では、脂肪組織、筋組織について三次元培養を実現した。また、線維芽細胞と血管内皮細胞を用いて血管ネットワークを持つ三次元組織の構築を実現した。このように血管ネットワークを持つ三次元組織は、組織内部の血管ネットワークを利用することで、薬剤の分布過程の評価に応用することが可能であると考えられる。これにより、従来のバイオアッセイでは不可能であった、流れのある環境下で毛細血管から組織への移行性や、組織内の薬剤の分布を試験することが可能となり、薬物動態の他の過程とともにマイクロチップに集積化することで、薬物動態のすべての過程を1枚のマイクロチップ上で評価することが可能となり、実験動物の代替となる新たな実験手段として期待できるだろう。

一方、ゲル中に作製した毛細血管網については管状構造をとっていることが確認できた。今後、線維芽細胞や各種腫瘍細胞などとの共培養を試みることにより、腫瘍における血管新生モデルの開発や、腫瘍組織への薬剤送達モデルの開発に有用であると考えられる。

以上、本研究の成果は将来的に、創薬や有毒化学物質等のリスク評価など、様々な分野に応用可能であると期待される。

<引用文献>

- [1] Yuki Imura, Yasuyuki Asano, Kiichi Sato, Etsuro Yoshimura, 2009, *Anal. Sci.* **25**, 1403-1407.
- [2] Yuki Imura, Kiichi Sato, and Etsuro Yoshimura, 2010, *Anal. Chem.*, **82**, 9983-9988.
- [3] Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, Kiichi Sato, 2012, *Anal. Sci.*, **28**, 197-199.
- [4] Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, Kiichi Sato, 2013, *Anal. Chem.*, **85**, 1683-1688.
- [5] A. Nishiguchi, et al., 2011, *Adv. Mater.*, **23**: 3506-3510.

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 3件)

- ① Yu Sakuta, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, 2017, *Anal. Sci.*, 33, 391-394, 査読あり
doi.org/10.2116/analsci.33.391.
- ② Kiichi Sato, Sayaka Kikuchi, Eri Yoshida, Reina Ishh, Naoki Sasaki, Kin-ichi Tsunoda, and Kae Sato, 2016, *Anal. Sci.*, 32, 113-116, 査読あり
doi.org/10.2116/analsci.32.113.
- ③ Miwa Sato, Naoki Sasaki, Manabu Ato, Satoshi Hirakawa, Kiichi Sato, and Kae Sato, 2015, *PLOS ONE*, 10(9), e0137301, 査読あり
doi.org/10.1371/journal.pone.0137301.

[学会発表] (計 12件)

- ① 佐藤記一, 薬物動態解析のためのマイクロ人体モデルの開発(シンポジウム依頼講演), 日本化学会第97春季年会, 2017年3月18日, 慶応大学日吉キャンパス(横浜市).
- ② 小野寺杏花・角田欣一・佐藤記一, 毛細血管網を持つマイクロ三次元組織構築の基礎検討, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月16日, 北海道大学(札幌市).
- ③ 福田隼也, 角田欣一, 佐藤記一, マイクロデバイスを用いたバイオアッセイのための血管モデル開発, 日本分析化学会第65年会, 2016年9月15日, 北海道大学(札幌市).
- ④ Satoshi Okazaki, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Development of co-culture and permeation assay method for microfluidic blood-brain barrier model, RSC Tokyo International Conference 2016, 2016年9月8日, 幕張メッセ(千葉市).
- ⑤ 佐藤記一, 高機能バイオアッセイのためのマイクロデバイスの開発(シンポジウム依頼講演), 日本化学会第96春季年会, 2016年3月27日, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市).
- ⑥ 福田隼也, 角田欣一, 佐藤記一, 人工血管モデル開発のための中空状ハイドロゲル内での細胞培養, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会(CHEMINAS32), 2015年11月26日~27日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市).
- ⑦ 小野寺杏花・角田欣一・佐藤記一, マイクロチップ内での三次元脂肪組織及び筋組織の構築, 5th CSJ 化学フェスタ, 2015年10月13日, タワーホール船堀(東京都江戸川区).
- ⑧ 福田隼也・角田欣一・佐藤記一, 人工血管モデル開発のための中空状ハイドロゲルの作製とハイドロゲル内での細胞

培養, 5th CSJ 化学フェスタ, 2015年10月13日, タワーホール船堀(東京都江戸川区).

- ⑨ 町田昇亮, 角田欣一, 佐藤記一, 腫瘍組織における血管新生マイクロモデルの開発, 日本分析化学会第64年会, 2015年9月10日, 九州大学伊都キャンパス(福岡市).
- ⑩ 小野寺杏花, 角田欣一, 佐藤記一, 三次元マイクロ脂肪組織及び筋組織の開発のための基礎検討, 日本分析化学会第64年会, 2015年9月9日, 九州大学伊都キャンパス(福岡市).
- ⑪ Kyoka Onodera, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, 3D culture of fat and muscle cells in a microchip, RSC Tokyo International Conference 2015, Sep. 3&4, Makuhari Messe, Chiba, Japan.
- ⑫ Shunya Fukuda, Kin-ichi Tsunoda, Kiichi Sato, Fabrication of a tubular hydrogel structure and cell culture in the tube for development of a vascular model, RSC Tokyo International Conference 2015, Sep. 3&4, Makuhari Messe, Chiba, Japan.

[図書] (計 1件)

- ① 佐藤香枝, 佐藤記一: 薬物評価のためのマイクロ人体モデル, バイオチップの基礎と応用(伊藤嘉浩監修), pp. 240-246, シーエムシー出版(2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 記一 (SATO, Kiichi)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号: 50321906

(2) 連携研究者

角田 欣一 (TSUNODA, Kin-ichi)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号: 30175468