

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03173

研究課題名(和文) 流れ制御を基軸にした血管化組織工学

研究課題名(英文) Tissue engineering for vascularization based on flow regulation

研究代表者

須藤 亮 (SUDO, RYO)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：20407141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織工学の分野では生体外で構築した三次元組織に毛細血管を導入する血管化を実現する手法が望まれている。本研究では、マイクロ流体デバイスおよびゲルビーズを用いることで三次元肝組織の血管化に取り組んだ。その結果、肝細胞の組織化にゲルビーズのサイズが重要であることがわかったが、血管化に対する効果としては限定的であった。また、間葉系幹細胞を用いると、血管網の安定化に寄与するだけでなく、血管化の促進にも重要な役割を果たすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外で組織や臓器を再生しようとする組織工学の分野では、血管網を含む三次元組織の再生が実現していない。そこで、細胞から三次元組織を構築し、血管を導入する血管化の手法を確立することが大きな課題になっている。本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて細胞周囲の流れの環境を制御するとともに、ゲルビーズを導入することで血管化組織の構築手法を検討した。研究結果より血管化組織を再生するために必要な因子が明らかになり、血管化組織の再生手法の確立に貢献する点に学術的かつ社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：In the field of tissue engineering, it is desired to introduce capillaries into reconstructed three-dimensional (3D) tissues in vitro, which is called vascularization. In this study, we investigated vascularization of tissue-engineered constructs by using microfluidic devices and gel microbeads. Our results demonstrated that the size of gel microbeads was important for tissue organization of hepatocytes while the effect of gel microbeads on vascularization was limited. In addition, we found that mesenchymal stem cells not only contributed to the stabilization of capillary networks but also promoted vascularization of tissue-engineered constructs.

研究分野：組織工学、細胞バイオメカニクス

キーワード：血管化 マイクロ流体デバイス 肝臓 血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1993年 Science 誌に Tissue Engineering (組織工学) の概念が発表されてから、生体外で組織・臓器を再生する研究が国内外で盛んに行われてきた。その結果、皮膚や角膜などの二次元組織や軟骨のような血管を含まない三次元組織を再生することが可能になり、臨床応用も行われている。しかし、血管を含む三次元臓器に関しては未だに再生手法が確立されていない。特に、これらの臓器が毛細血管を含んでいることが、再生手法の確立を困難にしている。そのため、たとえば肝臓であれば、その実質細胞である肝細胞の三次元培養を行うだけでは不十分であり、別途血管内皮細胞から毛細血管網を再生し、肝細胞の三次元上皮組織に毛細血管網を導入する“血管化”が三次元臓器の再生を目指す組織工学・再生医療における最大の課題になっている。

研究代表者はこれまでに一貫して肝臓再生の組織工学に取り組んできた。特に、肝前駆細胞の三次元積層培養により肝組織の再生に成功し (Sudo et al., FASEB J, 2005)、胆管上皮細胞による機能的な胆管の再生にも成功した (Hashimoto et al., Am J Pathol, 2008)。さらに、細胞周囲の力学的因子によって毛細血管の再生を制御できることを見出した (Yamamura et al., Tissue Eng, 2007)。これらの成果により、全体システムである肝臓を構成するサブシステムとしての組織 (肝実質・胆管・毛細血管) を個別に再生させることが可能になり、次の段階としてこれらを融合する必要性を認識するに至った。今後の組織工学では細胞を組み合わせることで組織を再生するだけでなく、組織を組み合わせることで“複合組織”を再生することが必須であると考えている。

近年、研究代表者は複合組織を再生するためにマイクロ流体デバイスを用いた組織工学に取り組んでいる。マイクロ流体デバイスは、従来の培養法よりも微小培養環境を巧みに制御できるほか、イメージングにも優れている。これまでに、マイクロ流体デバイスを用いた血管新生モデルを考案し (Chung et al., Lab Chip, 2009)、さらに、間質流を制御することで三次元肝組織と毛細血管を再生することに世界に先駆けて成功した (Sudo et al., FASEB J, 2009)。これらの成果は、三次元複合組織を再生するためには、微小培養環境における対流・拡散・細胞配置などを時間的かつ空間的に制御する工学的手法が重要であることを示しており、研究代表者らのマイクロ流体デバイスを用いた工学に基づく培養手法は Nature Protocols 誌に掲載され (Shin et al., 2012)、表紙にも選抜され、反響を呼んでいる。

以上の経緯を経て、研究代表者はマイクロ流体デバイスを用いて毛細血管網を含む三次元肝組織を実現する血管化組織工学に着手し、三次元肝組織と毛細血管を融合するためには細胞間接着を制御することが重要であることを見出した。さらに、最近の研究から以下の課題が明らかになってきた。

課題 細胞間接着を制御することで三次元肝組織の血管化を誘導する必要がある。

課題 三次元肝組織の組織化・血管化には血流刺激と物質輸送の向上が必要である。

そこで、本研究では、以下の2つの対策に取り組むことで、これらの課題を解決し、血管化三次元肝組織の構築に取り組んだ。

対策 細胞サイズ (直径 20 μm) のコラーゲンゲル粒子を導入し、細胞間接着を制御する。

対策 間質流を利用した細胞培養を行うことで培養環境の向上を図る。

2. 研究の目的

現在、組織工学では再生した三次元組織に毛細血管網を導入する“血管化”の実現が大きな課題になっている。研究代表者はこれまでの研究から血管化の実現のためには細胞間接着を制御することが重要であることを見出した。この発見を足がかりとして本研究では、新しく開発した細胞サイズのコラーゲンゲル粒子を導入することで細胞間接着を調節し、三次元肝組織の血管化を誘導する。また、マイクロ流体デバイスを用いることで間質流を利用した細胞培養を行い、培養環境の向上を通して組織化・血管化を促進する。さらに、再生組織の構造と機能を解析すると共に、血管化複合組織を構築するための血管化組織工学の学術基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、コラーゲンゼラチン灌流法によって初代培養ラット肝細胞を分離し、マイクロ流体デバイスを用いて間質流のもとで培養することによって三次元肝細胞組織を形成した。また、血管に関しては血管内皮細胞や間葉系幹細胞を用いた培養を行い、毛細血管網を形成した。マイクロ流体デバイスのデザインは実験結果をフィードバックすることによって適宜修正を加え、フォトリソグラフィー法によってマイクロ流体デバイスの鋳型を作製した。この鋳型を PDMS とよばれるシリコーンゴムに転写し、カバーガラスとプラズマ接着することによってマイクロ流体デバイスを作製した。

細胞培養では、血管化および組織化の促進を図るために、異なるサイズに調整したコラーゲンゲル粒子と肝細胞の混合培養を行った。特に、ゲル粒子を足がかりとして毛細血管の伸長を促進され、三次元肝組織の血管化を誘導するかどうか検討した。また、マイクロ流体デバイスを用いて細胞周囲の流れ (間質流・せん断流) の環境を制御し、三次元肝組織の組織化・血管化の促進を図った。特に、培養初期は間質流によって肝細胞の三次元組織化を誘導し、培養経過に伴い流れの環境を変更することで、肝細胞の組織形成・機能発現を誘導した。

さらに、これらの培養条件において、肝細胞および血管内皮細胞の組織化・血管化を形態形成・細胞極性・機能発現の観点から多面的に解析した。細胞のイメージングには、位相差顕微鏡による経時観察に加え、免疫蛍光染色を施した培養細胞を共焦点レーザー顕微鏡で三次元的に観察し、三次元的な形態・極性・機能発現などを検討した。

4. 研究成果

(1) 2016年度の研究成果

本研究では、組織工学によって再生した三次元肝組織に毛細血管網を導入する「血管化」の実現に取り組んだ。特に、コラーゲン粒子および間質流を利用することで三次元肝組織の組織化および血管化の促進を図った。2016年度は、「コラーゲン粒子の導入」に関する課題に着目した研究実施計画を遂行し、具体的には以下の研究成果を得た。

マイクロ流体システムの作製：ソフトリソグラフィーによってマイクロ流路およびコラーゲンを有するマイクロ流体システムを作製した。培養の際には、マイクロ流路間に圧力差を形成することによってコラーゲンを浸透する間質流を起こし、微小培養環境における対流・拡散・三次元組織化を制御した。

細胞配置の時間的・空間的な制御：ラットの肝臓からコラーゲナーゼ灌流法によって分離した初代培養肝細胞をマイクロ流路で培養し、間質流を負荷することで三次元組織を形成した。一方、対面する流路に血管内皮細胞を播種し、毛細血管網を形成することで、三次元肝組織と毛細血管網を近接させた共培養モデルを実現した。

コラーゲン粒子の導入による血管化誘導効果の検討：乳化重合法によって細胞スケールの粒子径を有する微小なコラーゲン粒子を作製した。このコラーゲン粒子を肝細胞に混合してマイクロ流路へ流し込み、間質流で組織化を誘導することによって三次元組織内部にコラーゲン粒子が分布した三次元肝組織を形成することに成功した。さらに、コラーゲン領域を伸長していく毛細血管が三次元肝組織の内部に分布するコラーゲン粒子を足がかりとして組織内部に伸長し、組織の血管化が誘導されるかどうか検討した。その結果、毛細血管の先端が三次元肝組織に入り込んだ組織の再生に成功したが、血管化の効率が低く、さらなる培養条件の検討が必要であることが明らかになった。

(2) 2017年度の研究成果

2016年度に引き続き、組織工学によって再生した三次元肝組織に毛細血管網を導入する「血管化」の実現に取り組んだ。特に、2017年度は、コラーゲン粒子を導入した培養による肝組織の血管化を検討するとともに、マイクロポンプの導入による還流培養システムへの拡張に着目して研究を進め、具体的には以下の項目について取り組んだ。

マイクロ流体システムの作製：2016年度の細胞培養実験の結果を踏まえ、マイクロ流路やゲル領域のデザインに修正を加え、ソフトリソグラフィーによってマイクロ流路およびコラーゲンを有するマイクロ流体システムを作製した。

細胞配置の時間的・空間的な制御：ラットの肝臓からコラーゲナーゼ灌流法によって分離した初代培養肝細胞をマイクロ流路で培養し、間質流を負荷することで三次元組織を形成した。一方、対面する流路に血管内皮細胞を播種し、毛細血管網を形成することで、三次元肝組織と毛細血管網を近接させた共培養モデルを実現した。この時、一方の流路では血管内皮細胞に加えて間葉系幹細胞も同時に培養することで血管伸長が促進される現象を見出した。

コラーゲン粒子の導入による血管化誘導効果の検討：肝細胞の大きさと比較して同程度の大きさのゲル粒子に加え、相対的に大きいゲル粒子と小さいゲル粒子も作製し、肝細胞と混合して培養すると、特定の大きさのコラーゲン粒子を用いた時にだけ肝細胞の三次元組織化が起こることを見出した。その一方で、マイクロ流路における組織化プロセスにおいて血管化に与える影響は限定的であることが明らかになった。

マイクロポンプの導入による還流培養システムへの拡張：還流培養システムへ拡張する前段階として培養液の酸素環境が肝細胞の形態や機能に与える影響を評価した。その結果、酸素透過膜を用いることで肝細胞の機能が向上することを実証した。

(3) 2018年度の研究成果

研究計画の最終年度として、組織工学によって再生した三次元肝組織に毛細血管網を導入する「血管化」の実現に取り組んだ。特に、マイクロ流体システムを用いて三次元肝組織と毛細血管網の近接共培養モデルを構築し、「コラーゲン粒子の導入」と「還流システムへの拡張」を通して血管化・組織化を誘導した。2017年度までに、コラーゲン粒子を導入した培養による肝組織の培養法を確立するとともに、マイクロポンプの導入による還流培養システムへの拡張を開始した。そこで、2018年度は血管化組織の構築と、血管化複合組織における細胞極性や機能発現の検討を中心に研究を実施した。具体的には以下の研究成果が得られた。

血管化誘導効果の検討：まず、間葉系幹細胞を用いて血管形成を促進し、ゲル領域を伸長していく微小血管が三次元肝組織の内部に分布するコラーゲン粒子を足がかりとして組織内部に伸長し、組織の血管化が誘導されるかどうか検討した。次に、肝細胞・血管内皮細胞の多重蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって三次元組織内部における血管伸長を可視化することで、血管化肝組織が構築されていることを見出した。

血管化三次元肝組織における上皮-血管界面に着目した細胞極性の解析：まず、蛍光染色によって三次元肝組織に微小血管網が導入されたことを確認した。次に、血管に面した肝細胞膜が発現する極性マーカーの免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって三次元的な分布を明らかにした。

血管化三次元肝組織における肝細胞の機能発現：培養中の酸素供給条件を改善するために酸素透過性膜を用いた培養を検討した。特に、その際の肝細胞の機能発現を評価するために、アルブミン測定やアンモニア代謝測定を行った。その結果、三次元培養によって肝細胞の機能が向上することが明らかになった一方で、血管化組織の機能向上には培養条件の検討を要することを見出した。

(4) 3年間の研究成果のまとめ

本研究では、マイクロ流体デバイスにおいて再生した三次元肝組織に毛細血管網を導入する「血管化」の実現に取り組んだ。特に、培養における流れの環境とゲル粒子を導入することで血管化を図った。その結果、肝細胞の組織化にゲル粒子の肝細胞に対する相対的なサイズが重要であり、特に細胞と同程度のサイズのゲル粒子を用いる肝細胞とゲル粒子からなる三次元組織が自己組織的に形成されることを見出した。このようにして形成された三次元組織と血管新生モデルをマイクロ流体デバイスにおいて融合することを実現したが、血管網が三次元組織に侵入する現象に対する効果としては限定的であることがわかった。その一方で、血管形成時に間葉系幹細胞を用いると、血管網の安定化に寄与するだけでなく、血管化の促進にも重要な役割を果たすことがわかった。

<引用文献>

Ryo Sudo, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on microporous membranes, *FASEB Journal*, Vol. 19, No. 12, 2005, 1695-1697

Wataru Hashimoto, Ryo Sudo, Kazutomo Fukasawa, Mariko Ikeda, Toshihiro Mitaka, Kazuo Tanishita, Ductular network formation by rat biliary epithelial cells in the dynamical culture with collagen gel and dimethylsulfoxide stimulation, *American Journal of Pathology*, Vol. 173, No. 2, 2008, 494-506

Nahoko Yamamura, Ryo Sudo, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Effects of the mechanical properties of collagen gel on the in vitro formation of microvessel networks by endothelial cells, *Tissue Engineering*, Vol. 13, No. 7, 2007, pp. 1443-1453

Seok Chung, Ryo Sudo, Peter J. Mack, Chen-Rei Wan, Vernella Vickerman, Roger D. Kamm, A new microfluidic platform to study cell migration, *Lab on a Chip*, Vol. 9, No. 2, 2009, pp. 269-275

Ryo Sudo, Seok Chung, Ioannis K. Zervantonakis, Vernella Vickerman, Yasuko Toshimitsu, Linda G. Griffith, Roger D. Kamm, Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial co-culture, *FASEB Journal*, Vol. 23, No. 7, 2009, pp. 2155-2564

Yoojin Shin, Sewoon Han, Jessie S. Jeon, Kyoko Yamamoto, Ioannis K. Zervantonakis, Ryo Sudo, Roger D. Kamm, Seok Chung, Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels, *Nature Protocols*, Vol. 7, No. 7, 2012, pp. 1247-1259

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Masafumi Watanabe, Koki Yano, Koki Okawa, Tadahiro Yamashita, Kazuki Tajima, Kazuaki Sawada, Hiroshi Yagi, Yuko Kitagawa, Kazuo Tanishita, Ryo Sudo, Construction of sinusoid-scale microvessels in perfusion culture of a decellularized liver, *Acta Biomaterialia*, 査読有, in press, 12 pages
DOI: 10.1016/j.actbio.2018.12.042

Masafumi Watanabe, Ryo Sudo, Establishment of an in vitro vascular anastomosis model in a microfluidic device, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 査読有, in press, 17 pages
DOI: 10.1299/jbse.18-00521

Mohammad Ajoudanian, Keita Enomoto, Yasuaki Tokunaga, Hiroshi Minami, Seok Chung, Kazuo Tanishita, Roger D. Kamm, Ryo Sudo, Self-organization of hepatocyte morphogenesis depending on the size of collagen microbeads relative to hepatocytes, *Biofabrication*, 査読有, Vol. 11, No. 3, 2019, 11 pages
DOI: 10.1088/1758-5090/ab145d

Kyoko Yamamoto, Kohei Tanimura, Masafumi Watanabe, Hiromu Sano, Hiroyuki Uwamori, Yo Mabuchi, Yumi Matsuzaki, Seok Chung, Roger D. Kamm, Kazuo Tanishita, Ryo Sudo, Construction of continuous capillary networks stabilized by pericyte-like perivascular cells, *Tissue Engineering Part A*, 査読有, Vol. 25, No. 5-6, 2019, pp.

499-510

DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0186

Hiroyuki Uwamori, Yuuichi Ono, Tadahiro Yamashita, Ken Arai, Ryo Sudo, Comparison of organ-specific endothelial cells in terms of microvascular formation and endothelial barrier functions, *Microvascular Research*, 査読有, Vol. 122, 2019, pp. 60-70

DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0186

Ryo Sudo, Reconstruction of Hepatic Tissue Structures Using Interstitial Flow in a Microfluidic Device, *Methods in Molecular Biology*, 査読無, Vol. 1905, 2019, pp. 167-174

DOI: 10.1007/978-1-4939-8961-4_15

Junghyo Yoon, Jaehoon Kim, Hyo Eun Jeong, Ryo Sudo, Myung-Jin Park, Seok Chung, Fabrication of type I collagen microcarrier using a microfluidic 3D T-junction device and its application for the quantitative analysis of cell-ECM interactions, *Biofabrication*, 査読有, Vol. 8, No. 3, 2016, 10 pages

DOI: 10.1088/1758-5090/8/3/035014

[学会発表](計32件)

須藤 亮、微小血管網と三次元肝細胞組織を組み合わせた組織工学的手法、第18回日本再生医療学会総会、シンポジウム18「Ex vivoでの機能的な肝組織の再構築」、兵庫県神戸市、2019

Ryo Sudo, In vitro tissue engineering using 3D microfluidic devices, International Symposium on SSS Laser Processing, Yokohama, Japan, 2019

大川 航輝、三場 詩織、須藤 亮、肝スフェロイドと血管の相互作用調査のための培養モデル、日本機械学会 第31回バイオエンジニアリング講演会、福島県郡山市、2018

保谷 高明、須藤 亮、マイクロ流体デバイスを用いた血管化肝組織の構築、日本機械学会 第31回バイオエンジニアリング講演会、福島県郡山市、2018

Masafumi Watanabe, Koki Yano, Koki Okawa, Ryo Sudo, Construction of in vitro hierarchical vascular networks using tissue-derived microchannels of a decellularized liver scaffold, EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, Koloa, USA, 2018

Masafumi Watanabe, Ryosuke Murai, Ryo Sudo, Microfluidic-based application of an in vitro microvessel model: investigation of vascular morphology and corresponding wall shear stress during vascular remodeling, Lab-on-a-Chip and Microfluidics World Congress 2018, Coronado, USA, 2018

Masafumi Watanabe, Ryosuke Murai, Ryo Sudo, Investigation of microvessel morphological change and corresponding vascular wall shear stress distribution during in vitro vascular remodeling in a microfluidic device, World Congress of Biomechanics 2018, Dublin, Ireland, 2018

須藤 亮、バイオエンジニアリングに基づく3次元組織工学、日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会、京都府京都市、2017

須藤 亮、マイクロ流体デバイスを用いた三次元肝組織構築の取り組み、日本薬物動態学会 第32回年会、東京都江戸川区、2017

Ryo Sudo, Keita Enomoto, Mohammad Ajoudanian, Yasuaki Tokunaga, Hiroshi Minami, Self-organization of hepatocyte morphogenesis depending on the size of collagen microbeads, 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics SJB 2017, Zermatt, Switzerland, 2017

Ryo Sudo, Multiscale tissue engineering for liver reconstruction, 1st International Symposium on Applied Abstraction and Integrated Design, Yokohama, Japan, 2017

南 拓志、保谷 高明、須藤 亮、肝細胞-コラーゲンマイクロゲルビーズ混成組織の血管化に向けた検討、日本機械学会 第29回バイオエンジニアリング講演会、愛知県名古屋市、2017

Yasuaki Tokunaga, Hiroshi Minami, Ryo Sudo, Reconstruction of vascularized hepatocyte tissues by hepatocyte-conditioned medium in a microfluidic device, 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Orlando, USA, 2016

徳永 康明、南 拓志、須藤 亮、マイクロ流体デバイスにおける肝細胞調製培養液を使用した血管化肝組織構築の試み、第23回肝細胞研究会、大阪府大阪市、2016

[図書](計3件)

須藤 亮(酒井 康行、金森 敏幸 監修)、シーエムシー出版、第7章 マイクロ流体システムによる血管形成モデルと肝細胞3次元培養モデルの融合(臓器チップの技術と開発動向)、2018、193-200

谷下 一夫、須藤 亮(佐藤正明 編著)、森北出版、第6章 細胞の力学刺激にともなう器官形成(細胞のマルチスケールメカノバイオロジー)、2017、119-149

Ryo Sudo, Seok Chung, Yoojin Shin, Kazuo Tanishita (Editors: Kazuo Tanishita, Kimiko

Yamamoto), Springer, Chapter 16 Integrated vascular engineering: vascularization of reconstructed tissue (Vascular Engineering), 2016, 297-332

〔その他〕

慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科須藤研究室ホームページ
<http://www.sudo.sd.keio.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷下 一夫

ローマ字氏名：(TANISHITA, kazuo)

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：理工学部

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 10101776

研究分担者氏名：三高 俊広

ローマ字氏名：(MITAKA, toshihiro)

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50231618

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。