

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04170

研究課題名(和文) 革新的血管機能解析マイクロデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of microfluidic vascular models to study vascular function

研究代表者

佐藤 香枝 (SATO, Kae)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：40373310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管バイオアッセイに用いるマイクロデバイスを開発した。血液の流れを模倣して送液培養できるデバイス、血管拡張を模倣した細胞伸展培養デバイス、またゼラチンを材料としたデバイスを開発した。このデバイス培養は、組み込む細胞を換えることで、様々な血管モデルを作り出すことができる。応用例として、1.哺乳類の発生初期での造血形成、2.肺高血圧症における平滑筋細胞の増殖の研究に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞バイオアッセイは、動物を使わずに物質が生物に及ぼす影響を細胞で評価する分析方法である。近年、ヒトの細胞微小環境を正確に反映する組織モデルによるアッセイの開発が求められている。本研究では、血管内皮細胞の培養条件を詳細に調べ周囲の細胞や間質とともに再構成することで、生理的に適切な血管モデルの構築を試みた。開発したモデルは発生学から難治疾患解明まで広く血管研究に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed microdevices for use in vascular bioassays. We have developed a device that mimics blood flow and can be used for fluid culture, a cell-stretching device that mimics vasodilation, and a device made of gelatin. By changing the cells to be cultured in these devices, various vascular models can be created. Applications include: 1) hematopoiesis during early mammalian development, and 2) smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension.

研究分野：生物分析化学

キーワード：マイクロデバイス 血管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞バイオアッセイは、動物を使わずに物質が生物に及ぼす影響を細胞で評価する分析方法である。動物実験と比較して実験が容易、信頼性があり、自動化も可能である。現状のアッセイは、静置で平面培養した単一種の細胞による単純な系である。これでわかることには限界があり、近年、ヒトの細胞微小環境を正確に反映する組織モデルによるアッセイの開発が求められている。そこで、欧米を中心に Organ-on-a-chip と呼ばれる microTAS を利用したモデル開発が急速に進められ、革新的な方法への展開が期待されている。血管に着目すると、血管内皮細胞のみの静置培養では、生体内と同等の機能を評価できないことが指摘されており、血管を構築する複数の細胞を組み込み、血流を模倣する条件下でのモデルが求められている。高血圧やがんなど血管に関わる病態を調べる高い要求があるが、現在のアッセイ系は難病解明には機能的に不十分である。

### 2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞の培養条件を詳細に調べ周囲の細胞や間質とともに再構成することで、生理的に適切な血管モデルを構築する。このデバイス培養は、組み込む細胞を換えることで、様々な血管モデルを作り出すことができる。応用例として、1.哺乳類の発生初期での造血形成、2.肺高血圧症での血管リモデリングの解明を課題として、発生学から難治疾患解明まで広く血管研究に貢献する技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

デバイス作製：微小血管やリンパ管に相当する深さ・幅の流路を有するデバイスをポリジメチルシロキサン PDMS またはゼラチンとカバーガラスを材料として作製した。PDMS のデバイスでは血管の拡張を模倣する伸展する培養基板を組み込んだデバイスを構築した。

デバイス内細胞培養法の確立：デバイス内に臍帯静脈内皮細胞 HUVEC または肺の血管平滑筋細胞を培養した。内壁に吸着させる間質成分としてはフィブロネクチンを用いた。肺の血管平滑筋細胞は伸展する培養基板上で剥がれずに培養が出来ることを確認した。ゼラチンデバイス内に流路内壁全体にコンフルエントに HUVEC を培養することが出来、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現を免疫染色で確認した。デバイス内での細胞の代謝を調べるために、流路から回収した培地中のグルコースおよび乳酸を定量した。

送液法の検討：血管の流れに対応する送液システムとして、シリンジポンプを用いて、吐出流量や周期などを制御した送液および空気圧ポンプで拍動流を模倣した送液を試みた。

応用：開発したデバイスを用いて、血液細胞産生モデルおよび肺高血圧症モデルを構築した。

### 4. 研究成果

デバイス作製：

送液培養用に単純な 1 本の流路を持つ PDMS デバイスを作製した。また、伸展培養用として、細胞培養流路の下に制御用のチャンバーを設置し、両者の間に細胞培養基板として機能する伸縮性の PDMS 薄膜を挟み込んだデバイスを作製した。制御用のチャンバーを減圧にすることにより、PDMS 薄膜がチャンバー内に引き込まれ、膜が伸びる仕組みで、真空ポンプとチャンバーの間にデジタルスイッチと接続したバルブを設けることで、このバルブの開閉で周期的に細胞に伸展刺激を与えることができた。蛍光マイクロビーズを使って伸展デバイス内の細胞接着基板となる薄膜の動きを解析したところ、膜の Z 軸位置は毎回初期位置に戻り、十分な弾力性を保持していた。一方、より生体環境に近い材料としてゼラチンを用いたデバイスも開発した。ゼラチンとカバーガラスの接合は、ガラス表面をアミノ修飾してグルタルアルデヒドによりゼラチンと共有結合させた。ゼラチンデバイスの流路導入孔に PTFE の管を液漏れせずに配管する方法を開発した。送液してもカバーガラスとゼラチンは剥がれず、PDMS のデバイスと同様に扱えることを確認した。

デバイス内細胞培養法の確立：

PDMS デバイス内の細胞は、フラスコ培養の細胞より増殖が遅く、乳酸の定量結果から代謝廃棄物の蓄積が速いことが示された。特に深さ 100  $\mu\text{m}$  以下のマイクロ流路の場合には、初代の血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞は静置条件でほぼ増殖しなかった。低いシアストレスで培地交換を連続的に行うことで改善することができた。深さ 500  $\mu\text{m}$  以上の場合には、フラスコ培養と同等にはならないものの、細胞数は増加し、培養容器として適切であることがわかった。以降の培養は、深さ 500  $\mu\text{m}$  以上のもので行うことに決定した。一方、ゼラチンデバイスでは、PDMS と比較して細胞接着が良好であった。引き続き、PDMS デバイスとの違いを調べて行く予定である。

#### [応用 1] 血液細胞産生モデル：

哺乳類の発生初期において胚の大動脈で産生する血液細胞は、中胚葉、造血幹細胞、造血前駆細胞を経て各種血液細胞に分化する。このプロセスに血流が関わっていることが示唆されている (Nature 2009)。そこでマイクロデバイス内で ES 細胞を血液細胞に分化させる際に血流に見立て培地を送液して、分化効率へ影響するかどうか調べた。PDMS で作製したマイクロデバイスの流路内にマウスのストロマ OP9 細胞をフィーダー細胞として培養し、そこに ES 細胞から分化誘導した中胚葉細胞を一定量播種し共培養した。培地をシリンジポンプで送液し 3 日目以降に血液細胞の産生の有無を観察したところ、送液の有無で産生数はほぼ変わらず、仮説と異なり送液の刺激で分化誘導は促進されないことがわかった。拍動流を与えるポンプで培養した場合にも、血液細胞数は増えなかった。一方、OP9 細胞の馴らし培地を ES 細胞の分化誘導に用いると血液細胞の産生数が増加することが示された。さらに細胞に伸展刺激を与えるデバイスで培養して得た OP9 細胞の培養上清を用いると、静置培養と比較して多くの血液細胞が得られた。伸展刺激により OP9 細胞の分泌する分化誘導因子が増加する可能性が示唆された。

次に OP9 細胞を伸展培養することで増加する mRNA を調べたところ、3 種類の遺伝子が見つかった。これらのノックダウン細胞を作製し、培養上清で血液細胞への分化誘導を行った。ノックダウン OP9 細胞の培養上清で分化誘導を行うと、未使用培地を用いたときとほぼ同レベルの血液細胞数となった。ノックダウン OP9 細胞をフィーダー細胞として用いた場合は、血液細胞分化活性が下がることがわかった。以上によりこれらの遺伝子が分化誘導因子の分泌に関与する可能性が示唆された。次にこれらの遺伝子を過剰発現させた OP9 細胞の作製を試みた。伸展刺激を与えた OP9 細胞から抽出した mRNA と相補的な DNA を鋳型として用い目的遺伝子を増幅させた。レトロウイルスベクターに目的遺伝子を組込、これを OP9 細胞へ導入した。3 つの遺伝子のうち、2 つについては過剰発現 OP9 細胞が作製できた。残り 1 つについては、目的遺伝子の増幅まではできており、今後、同様の手順で過剰発現 OP9 細胞を作製する予定である。その後、これらの細胞を用いて血液細胞への分化誘導への影響を調べる予定である。

また、血液細胞への分化誘導には、血流に伴って生じる血管拡張因子、一酸化窒素 NO の関与が知られている。そこで、中胚葉細胞播種から 24 時間後に NO 供与体 SNAP、NO 阻害剤である L-NAME または Carboxy-PTI を培地に添加した。SNAP 刺激下で予想通り血液細胞数が増加した。L-NAME または Carboxy-PTIO で NO シグナルを阻害すると、血液細胞の生成数は減少した。以上より、本結果は Adamo らのマウスの細胞による報告 (Nature 2009) および North らのゼブラフィッシュでの報告 (Cell 2009) と一致し、OP9 を用いた分化誘導システムにおいて NO の産生が血液細胞の生成を支えている可能性がある」と結論づけた。

#### [応用 2] 肺高血圧症モデル：

肺高血圧は血管平滑筋細胞 PSMCs の増殖による中膜肥大を特徴とする。心拍数が高い患者の予後が悪いことから、細胞の伸展刺激が細胞増殖と間質の異常増殖の引き金になると仮説をたて、デバイス内に培養された肺血管平滑筋細胞に伸展刺激の影響を調べた。

正常細胞および患者細胞は静置状態で異なる増殖率を示し、24 時間培養後、患者細胞の細胞密度は正常細胞の 1.9 倍であった。その後、細胞を心拍数 (80 bpm、各バルブの開閉時間は 0.38 秒に設定) での周期的伸展培養したところ、48 時間の伸展培養後、正常細胞は 1.5 倍に増殖した。また、患者細胞も 24 時間の伸展培養で 2.5 倍に増加した。

次に細胞周期進行の制御に関与する Cyclin D1 と PDGF/VEGF 成長因子ファミリーの一員である VEGF-A の転写レベルを解析した。予想どおり、伸展条件下で 24 時間培養した正常細胞では、Cyclin D1 は静置培養の 15 倍、および VEGF-A は 40 倍と有意に増加した。一方、患者細胞は、静置と伸展で同程度のレベルで Cyclin D1 を発現し、伸展条件下での VEGF-A の転写レベルは静置条件下よりもわずかに低かった。患者細胞の増殖は正常細胞よりも速く、Cyclin D1 および VEGF-A の転写レベルは伸展刺激の有無に関わらず試料間でほとんど差がなかったと推測される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sato Kae, Nitta Manami, Ogawa Aiko	4. 巻 4
2. 論文標題 A Microfluidic Cell Stretch Device to Investigate the Effects of Stretching Stress on Artery Smooth Muscle Cell Proliferation in Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inventions	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/inventions4010001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 SATO Kae, SATO Miwa, YOKOYAMA Mizuho, HIRAI Mai, FURUTA Aya	4. 巻 35
2. 論文標題 Influence of Culture Conditions on Cell Proliferation in a Microfluidic Channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 49~56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18SDP04	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 SATO Kae, SATO Kiichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Recent Progress in the Development of Microfluidic Vascular Models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 755~764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.17R006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 SATO Kae, KODAMA Ayuki, KASE Chikako, HIRAKAWA Satoshi, ATO Manabu	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of a Simple Permeability Assay Method for Snake Venom-induced Vascular Damage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 323~327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.34.323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 SATO Kae	4. 巻 71
2. 論文標題 Development of Microvascular Devices and Their Application to Bioanalytical Chemistry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 53～58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.71.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Momoko Maeda, Eriko Kamata, Kenji Kitajima, Takahiko Hara, and Kae Sato
2. 発表標題 Effects of bone marrow-derived OP9 stromal cells stimulated in a cell stretching device on hematopoietic differentiation
3. 学会等名 The 23rd International Conference on. Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 涼音、関根 詩乃、別所 朋香、大月 陽香、柴田 紗希、中野 実紅、佐藤 香枝
2. 発表標題 ゼラチンを用いた3ウェル連結型細胞培養デバイスの作製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 涼音、前田 桃子、北島 健二、原 孝彦、佐藤 香枝
2. 発表標題 伸展培養したOP9細胞が血液細胞分化に及ぼす影響：伸展培養で活性化される遺伝子の解明
3. 学会等名 Chem-Bio Joint Seminar 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関根 詩乃, 佐藤 香枝
2. 発表標題 共焦点顕微鏡で観察可能な再剥離式細胞培養デバイスの作製
3. 学会等名 Chem-Bio Joint Seminar 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sasaki, S., Sato, K
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF CELL CULTURE MICRODEVICE USING GELATIN GEL
3. 学会等名 The 23rd International Conference on. Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kae Sato, Yuka Misawa, Kyojiro Morikawa, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori
2. 発表標題 STRETCHABLE MICROPATTERNED MEMBRANE INTEGRATED IN MICROFLUIDIC DEVICES FOR PULMONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELL CULTURE
3. 学会等名 microTAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤香枝
2. 発表標題 生体環境を模倣した血管マイクロ実験室の構築
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Manami Nitta, Aiko Ogawa, and Kae Sato
2. 発表標題 Development of cell stretching device for pulmonary hypertension studies
3. 学会等名 MiroTAS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eriko Kamata, Kanako Yanagisawa, Kenji Kitajima, Takahiko Hara, and Kae Sato
2. 発表標題 Mechanical stress-induced blood cell production in a microfluidic device
3. 学会等名 MiroTAS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原 孝彦  (HARA Takahiko)		
研究協力者	小川 愛子  (OGAWA Aiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------