

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32670

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2021

課題番号：16KK0116

研究課題名（和文）造血幹細胞・血管環境制御のためのバイオマテリアル組込マイクロデバイスの構築（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of microdevices containing biomaterials for environment control of hematopoietic stem cells and blood vessels(Fostering Joint International Research)

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） 11,100,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：血管を模倣し、細胞培養基板として伸縮性のある薄膜を組み込んだポリジメチルシロキサンPDMSを材料とした細胞培養デバイスを開発した。この薄膜に細胞外マトリックス成分を修飾した。間質細胞をフィーダー細胞として基板上に培養し有効性を確認した。別の試みとして、すべてが細胞外マトリックス由来の材料であるゼラチンで細胞培養デバイスを構築することを試みた。これらの開発したデバイスを用いて中胚葉細胞を血液細胞へと分化誘導する実験も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学および創薬の研究では、モデル動物とヒトの実験結果の違いを埋める技術として、ヒト細胞を使った新しい臓器モデルの要求がある。体外に取り出した細胞を組織に近づけるには、3次元的な構造を作り、細胞を培養する際に力学的な刺激を与えることが必要である。本研究では、微細加工技術で三次元培養容器を形作り、材料化学の技術から細胞の足場となるバイオマテリアルを組込、加えて細胞に力学的な刺激を負荷することを試みた。

研究成果の概要（英文）：A blood vessel mimicking microfluidic cell stretch device made of polydimethylsiloxane (PDMS) was developed. The microfluidic device harbors upper cell culture and lower control channels, separated by a stretchable poly(dimethylsiloxane) membrane that acts as a cell culture substrate. The PDMS substrates were modified with extracellular matrix. Stromal cells were cultured on the substrate as feeder cells to confirm surface modification efficacy. Another attempt was made to construct cell culture devices with gelatin, a material derived entirely from extracellular matrix. The developed devices were used to induce differentiation of mesoderm cells into blood cells.

研究分野：生物分析化学

キーワード：組織チップ 血管 血液細胞 バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

生命科学および創薬の研究では、モデル動物とヒトの実験結果の違いを埋める技術が求められている。その中で、幹細胞や iPS 細胞を使い臓器モデルや再生医療に役立てようという研究は世界中で盛んに行われている。幹細胞を組織に近づけるには、細胞を組織のように 3 次元に配置し、力学的な刺激を与えることが必要である。工学的な技術を細胞培養に取り入れることで、培養技術の向上が期待できる。そのような背景の中、生体機能を保ったまま *in vitro* でヒト由来培養細胞を培養し、生体機能を評価する技術として、マイクロタスの技術を用いた臓器・組織チップが活発に開発されている。この技術はシリコンゴムを使ったチップの中で細胞を平面培養したものに力学的な刺激を与えることで生体内の物理的環境を模倣したものである。現在のデバイスでは、生体内の細胞が細胞外マトリックスを含む間質に取り囲まれた環境にあるのは異なっており、今後さらなる改良と検証が必要と考えられている。

2. 研究の目的

本国際共同研究は、基盤研究 B [2016-2019]「革新的血管機能解析マイクロデバイスの開発」において、マイクロ流体デバイスの技術を用いて構築した流路にヒト正常血管内皮・平滑筋細胞を培養後、血流を模擬する環境下で生理的に適切な血管モデルを構築する研究を進展させ、造血幹細胞の微小環境を研究するためのバイオマテリアル組込マイクロデバイスを構築する。材料化学の技術から細胞の足場を構築し、microTAS の技術から三次元環境を形作り、加えて細胞に力学的な刺激を負荷することで、生体内の細胞環境に必要な物理化学的環境のほぼ全容を実現することを目指している。

3. 研究の方法

血管を模倣し、細胞培養基板として伸縮性のある薄膜を組み込んだポリジメチルシロキサン PDMS を材料としたデバイスを開発した。この薄膜に細胞外マトリックス成分を修飾し、間質細胞をフィーダー細胞として基板の上に培養した。最初の実験として細胞外マトリックスの修飾の有無が細胞の剥離にどのように影響するか調べた。別の試みとして、すべてが細胞外マトリックス由来の材料であるゼラチンで細胞培養デバイスを構築することを試みた。細胞の評価としては免疫染色を主に用いた。開発したデバイスを用いて、フィーダー細胞の上に中胚葉細胞を培養し血液細胞へと分化誘導する実験も行った。培養細胞を評価する方法として、Padlock probe rolling circle amplification (Padlock RCA) 法の研究も行った。

4. 研究成果

(1) 細胞外マトリックス組込 PDMS 細胞培養デバイスの構築

渡航前には、PDMS を材料として、「血流を模倣した流れ刺激を与えるためのデバイス」および「血管拡張を模倣した培養基板の伸展刺激を与えるためのデバイス」を構築した。ES 細胞から血液細胞への分化誘導を行ったところ、デバイス内で分化が確認出来た。渡航後は、PDMS を材料として作製したデバイスの細胞接着面へ細胞外マトリックスの組込を検討した。共同研究先のスイス連邦工科大学チューリッヒ校の Viola Vogel 研究室ですでに実施されていた細胞外マトリックスの PDMS 基板へ修飾方法を習い、実証した。細胞を伸展させる PDMS の薄膜の表面に細胞外マトリックスの成分であるフィブロネクチンを共有結合で修飾した。具体的には、3-(Trimethoxysilyl)propyl acrylate を気相修飾した。その後、Sulfosuccinimidyl 6-(4 -azido-2 -nitrophenylamino)hexanoate の水溶液を加え、紫外線照射して、3-(Trimethoxysilyl)propyl acrylate 表面へ結合させた。ここにフィブロネクチンを導入し、一晚反応させた。このフィブロネクチンを共有結合で修飾した PDMS 薄膜上でフィーダー細胞として使用する OP9 細胞の培養をした。OP9 細胞の接着の様子を物理吸着でフィブロネクチンを PDMS 薄膜に修飾した場合と比較したところ、物理吸着で修飾した薄膜表面では、3 日間の培養で細胞密度が高くなると剥がれる様子が見られたのに対し、共有結合で修飾した場合には、細胞が密に培養されていても剥がれなかった。伸展刺激を与えた場合にも共有結合でフィブロネクチンを修飾した PDMS 薄膜上の OP9 細胞は剥がれることは無かった。

共同研究先のスイスで検討した細胞外マトリックスのデバイス内への組込方法を帰国後自身の研究室で行ったところ、紫外線照射の操作で伸縮性細胞培養薄膜が破れやすくなることがわかった。そこで、紫外線照射を必要としない方法として、アミノシランを膜に修飾し、それにグルタルアルデヒドを結合させ、ここにフィブロネクチンを導入し共有結合させる方法に変更した。この方法でもフィブロネクチンは良好に結合することが免疫染色によって確認できた。これまで大動脈の血流と同等の流れ刺激を与えた条件で OP9 細胞を培養すると剥離する現象が見られたので、フィブロネクチンの共有結合することで剥離が防止できるかどうかどうかが調べた。期待に反し、どちらの場合も剥離したが、詳細に調べたところ、フィブロネクチンの共有結合がない場合は、フィブロネクチンと細胞の両方が薄膜から剥がれており、一方共有結合した場合は、フィブロネクチンと細胞の一部は薄膜に残っていることがわかった。薄膜に共有結合したフィブロネクチンを介して薄膜と細胞の結合は保たれており、細胞全体が剥がれるのではなく、細胞

表面が千切れ、破裂し、フィブロネクチンと結合していない部分が洗い流されていることがわかった。以上から、細胞外マトリックスの組込には成功しているが、流れ刺激に対する細胞の耐性については、今後さらに検討が必要ながわかった。

(2) ゼラチンを材料としたマイクロ流路デバイスの構築

PDMS を使用しないデバイスとして、バイオマテリアルとしてゼラチンを材料として用いた流路デバイスを開発した。これまで使用してきた PDMS デバイスと同じように OP9 細胞と ES 細胞の共培養で血液細胞への分化誘導ができるかどうか確かめたところ、同様に分化することが確認できた。ゼラチンゲル内へ低分子の物質は拡散するため、デバイスごと培地に浸しておけば、OP9 細胞から分泌される分化誘導因子を培地に残し、不要な老廃物のみ交換できる可能性がある。そこで流路内の培地を交換せずにデバイスの周囲の培地のみ交換した。しかし、次第に流路内の OP9 は脂肪細胞へと分化し、好ましくない環境へと変化した。ゼラチンのデバイスの場合でも流路内の培地交換が必要であることがわかった。一方、PDMS と比較してゼラチン表面はフィブロネクチンが強く接着することも免疫染色と共焦点顕微鏡を用いて明らかにすることができた。

次に、ゼラチンの凹凸構造を培養表面としたゼラチンデバイス内に、血管内皮細胞と線維芽細胞を 3 次元的に培養したところ、血管内皮細胞が自発的に管状になり毛細血管網を構築することができた。また、線維芽細胞とコラーゲンや卵殻膜パウダーを混合して、厚みがあり細胞外マトリックスに富んだ 3 次元組織の構築も試みた。

(3) Padlock probe rolling circle amplification 法 (Padlock RCA 法) によるイメージングによる mRNA の定量方法

一般的にマイクロデバイス内の細胞は取り出して定量 PCR を行うには数が少なく、新たな方法の開発が望まれている。細胞の形状を保ったまま mRNA を可視化出来る方法である Padlock RCA 法を開発者であるストックホルム大学の Mats Nilsson 教授の研究室で習った。基板に結合した組織切片、または細胞をパラホルムアルデヒドで固定したものに、mRNA を逆転写反応で cDNA とし、そこに目的配列に相補的な padlock probe を結合させ、プローブの両端をつなぐライゲーションの反応、形成した環状 DNA を鋳型とした RCA 反応、産物に検出用蛍光プローブを結合させて蛍光顕微鏡観察を行った。この方法は、検出に至るまでに、3 つの酵素反応が関わるため、難易度が高い操作である。各酵素の反応効率を高い状態に維持するために、酵素に付属している反応液を見直し、反応に影響すると考えられる DTT および塩濃度、pH の検討をした。一般に DTT は酵素の安定化のために添加されているものであるが、ライゲーションに使用する Ampligase の反応では、反応効率が下がることがわかった。Ampligase の場合には DTT を加えずに、KCl の濃度は 250 mM と高濃度にするのが良いことがわかった。同様にほかの酵素についても最適化し、各反応に使用する反応液の濃度を決定した。続いて、血管研究に用いるための Padlock probe の設計をした。今回は、細胞周期の進行を調節する Cyclin-D1、血管内皮細胞増殖因子 VEGF-A、そしてコントロールとして HPRT-1 の転写量を見るためのプローブを設計した。今後、これらのプローブを使用して、マイクロデバイス内の血管内皮細胞および平滑筋細胞の増殖の評価をする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

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 -
1. 著者名 SASAKI Naoki, KASE Chikako, SATO Kae	4. 巻 37
2. 論文標題 Bead-based Padlock Rolling Circle Amplification under Molecular Crowding Conditions: The Effects of Crowder Charge and Size	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 727～732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCP14	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 Sasaki Naoki, Kase Chikako, Chou Masaki, Nakazato Genki, Sato Kae	4. 巻 593
2. 論文標題 Mechanistic investigation of bead-based padlock rolling circle amplification under molecular crowding conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113596～113596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2020.113596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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, 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 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 Ishigaki Yuri, Sato Kae	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of Microchannel Shape and Ultrasonic Mixing on Microfluidic Padlock Probe Rolling Circle Amplification (RCA) Reactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 272 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi9060272	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 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	4. 巻 71
2. 論文標題 細胞培養のためのゼラチンウェルデバイスの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 289-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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, Maeda Momoko, Kamata Eriko, Ishii Sayaka, Yanagisawa Kanako, Kitajima Kenji, Hara Takahiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Nitric Oxide and a Conditioned Medium Affect the Hematopoietic Development in a Microfluidic Mouse Embryonic Stem Cell/OP9 Co-Cultivation System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/M111030305	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Satoko Sasaki, Kae Sato
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
2. 発表標題 Stretchable micropatterned membrane integrated in microfluidic devices for pulmonary artery smooth muscle cell culture
3. 学会等名 The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 別所 朋香, 佐藤 香枝
2. 発表標題 卵殻膜パウダーおよびコラーゲンをを用いた線維芽細胞の積層培養条件の検討
3. 学会等名 Chem-Bio Joint Seminar 2021
4. 発表年 2021年

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

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	フォーゲル ヴィオラ (VOGEL Viola)	スイス連邦工科大学チューリッヒ校・健康科学技術専攻・教授	

	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
その他の研究協力者	ニルソン マツ (NILSSON Mats)	ストックホルム大学・生化学・生物物理学専攻・教授	

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
---------	---------

スイス	スイス連邦工科大学チューリッヒ校			
スウェーデン	ストックホルム大学			