

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18991

研究課題名(和文)物質移行性を評価可能な骨格筋血管構造モデルの創出

研究課題名(英文)in vitro model for interaction of skeletal muscle fiber and vessel

研究代表者

森本 雄矢(Morimoto, Yuya)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・准教授

研究者番号：60739233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：市販のコラーゲンビトリゲル膜付きカルチャーインサートを組み合わせ可能なマイクロ流路を実現し、ビトリゲル膜上で培養した細胞に培養液の流れを負荷することで、生体における血流にともなうメカニカルな刺激を再現することに成功した。この培養液の流れによる模擬血流刺激により筋線維や血管内皮細胞からなる共培養組織の形態が変化することを明らかにした。さらに、肝癌細胞と血管内皮細胞からなる共培養組織におけるアルブミン産生量ならびに模擬血流へのアルブミン移行量といった機能が変化することを見出し、提案のマイクロ流路システムが血管構造モデルとして有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤開発や疾患メカニズムの解明に主に用いられる動物実験では、ヒトと動物との種差から適用可能な疾患や組織に限りがあった。一方、ヒト細胞を用いた実験では、異種の細胞間の相互作用の再現が困難であり、細胞間相互作用に基づく物質移行性を評価できなかった。本研究で実現したマイクロ流路システムは、異種の共培養組織を有する血管構造モデルの創出を可能にするだけでなく、模擬血流にともなう細胞の形態や機能の再現も可能であることも示している。よって、本技術は体外での薬剤効能評価や病態解析においてパラダイムシフトを生み出す意義深い成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have developed a microfluidic channel that can be combined with commercially available culture inserts with collagen vitrigel membranes, and have succeeded in reproducing the mechanical stimulation associated with blood flow in vivo by applying a flow of culture medium to cells cultured on vitrigel membranes. The morphology of co-cultured tissues consisting of myofibers and vascular endothelial cells was confirmed to be changed by the flow of culture medium. Furthermore, we found that the flow stimulation changed functions of co-cultured tissues consisting of hepatocytes and vascular endothelial cells, such as albumin production and albumin transfer to the flow, indicating that the proposed microfluidic system is useful as a model of vascular structure.

研究分野：マイクロ工学、組織工学

キーワード：MicroTAS Organ-on-a-chip マイクロ流路 灌流システム メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

生体での糖取り込みは骨格筋が主として担っており、インスリンの供給にて糖取り込み量が増えることが知られている。一方、国内で約 300 万人いる II 型糖尿病患者では、インスリンが骨格筋に供給されても糖取り込み量が増えず、高血糖状態になってしまうことが問題となっている。近年血管内皮細胞のインスリン透過性の悪化による血流から骨格筋へのインスリン供給量減少が II 型糖尿病の主たる原因の一つであることが提案され、体外で本現象を再現する臓器モデルの確立が望まれている。

これまでに、細胞を培養した多孔質膜をマイクロ流路に組み込むことによる血流からの物質移行性評価が提案されてきたが、多孔質膜上では細胞は血流の存在を認識できず細胞の極性が揃わないため、血流からの物質移行性を正確に再現することは困難だった。コラーゲン膜上での培養により細胞の極性が整うとの知見が知られており、コラーゲン膜をマイクロ流路中に組み込み細胞培養を行えば、血流からの物質移行性を評価可能な血管構造モデルができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、市販のコラーゲンビトリゲル膜付きカルチャーインサートとマイクロ流路を組み合わせることで、骨格筋血管構造モデルを構築することを目的とした(図 1)。本モデルにて模擬血流による流れ刺激の負荷により生体における血流にともなうメカニカルな刺激を再現することで、筋線維や血管内皮細胞の形態が変化することを明らかにし、血管構造モデルとして有用であることを示す。

提案のシステムは、ガラスとシリコンゴム(PDMS)から成るマイクロ流路を基本構成としており、ポンプを用いることで PDMS 製のマイクロ流路へ送液可能になっている。加えて、マイクロ流路の中央に穴が開いており、市販のカルチャーインサートが設置できるようになっている。このとき、カルチャーインサートの底面が流路の上面と同一平面に配置されるため、インサート底面に接着した細胞に流れ刺激が負荷可能となっている。このように、市販のカルチャーインサートをマイクロ流路に取り付けるだけで本システムが利用可能となるため、特殊な技術がなくとも誰でも使用できる。

3. 研究の方法

まず、提案のマイクロ流路システムにて細胞に流れ刺激を負荷可能か確認する。当該マイクロ流路システムの作製手順として、まずマイクロ流路のモールド内で PDMS を固めることで、流路パターンを形成した。モールドから流路パターンを取り外した後、流路パターンとガラスプレートの表面にプラズマ処理を行い、お互いの表面同士を接着させることで流路パターンとガラスプレートを接合させた。このように作製されたマイクロ流路に対して滅菌処理を行うため、30 分以上 UV 照射を行った。作成したマイクロ流路に細胞培養したカルチャーインサートを嵌め込むことで、マイクロ流路システムを準備した(図 2 上)。その後、ETFE チューブを介してマイクロ流路システムとペリスタティックポンプを接続することで、培養液をマイクロ流路内に灌流可能にした(図 2 下)。マイクロ流路内の細胞への培養液の灌流による流れ刺激を負荷した状態で培養し、当該細胞が生体内に近い遺伝子・たんぱく質発現特性や形態を発するのための最適な刺激条件を明らかにする。

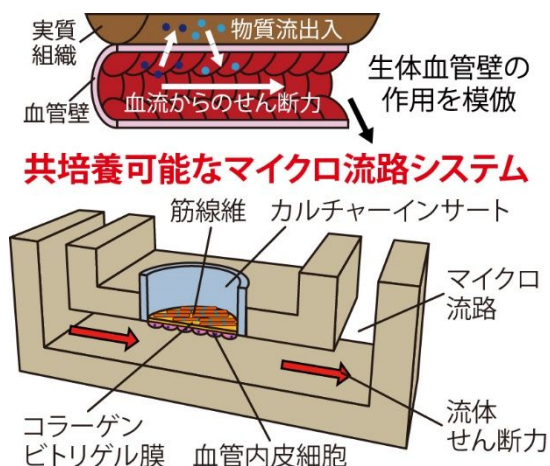
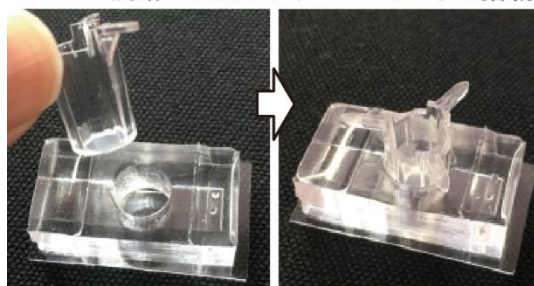


図 1. 共培養組織に流れ刺激負荷可能なマイクロ流路システムの概念図

マイクロ流路へのカルチャーインサートの搭載



ポンプとの接続による培養液の灌流

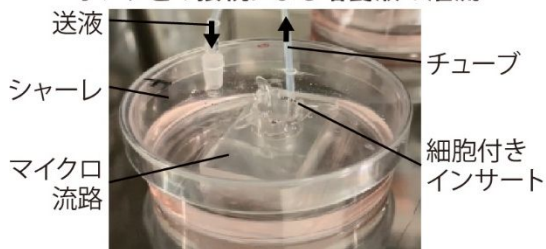


図 2. マイクロ流路へのカルチャーインサートを搭載する様子ならびにポンプとマイクロ流路の接続による灌流培養の様子

4. 研究成果

カルチャーインサート中のコラーゲンビトリゲル膜上に血管内皮細胞を播種したところ、内皮細胞が膜に接着し、細胞増殖の結果としてビトリゲル膜全体を細胞が覆う様子が観察された(図3)。加えて、ビトリゲル膜上に筋芽細胞を播種して培養したところ、筋芽細胞が融合して筋管が形成された。これらの結果より、コラーゲンビトリゲル膜は骨格筋血管モデル用の培養基板に適していることが確認された。

底面に血管内皮細胞を培養したビトリゲル膜カルチャーインサートを提案のマイクロ流路に嵌めこんだ状態で、培養液の灌流を行った。20 mL/min で送液しても流路とインサートの接触面からの漏れはなく、細胞に対してマイクロ流路を用いて十分な流量を送液可能であることが分かった。この状態で3日間灌流培養を行った結果、流れを負荷する前は血管内皮細胞のアクチンの方向はランダムであったが、流れを負荷することで、一方向に整列することが確認された(図4)。アクチンの向きは細胞の向きを示しており、流れ負荷によって細胞の向きが変化したことを本結果は示している。以上より、提案のマイクロ流路システムはコラーゲンビトリゲル膜上に接着した血管内皮細胞に流れ刺激を負荷しながら培養可能であることが確認された。さらに、マイクロ流路にバブルトラップ用のタンクを設け、かつカルチャーインサート内にハイドロゲルを入れた状態にて筋芽細胞培養すると、流れ方向に血管内皮細胞が向くだけでなく、筋芽細胞が融合して形成された筋管が流れ方向と垂直の向きに整列することが分かった。本結果より、流れ刺激を負荷することで共培養組織の細胞形態を制御可能であることが示唆された。

さらに、提案のマイクロ流路では、カルチャーインサートを取り外し可能なため、カルチャーインサートに対する標準的な解析が実施可能である。そこで、取り外したインサートに対して経上皮電気抵抗(TEER)を計測した(図5)。流れ刺激を負荷しても TEER 値には変化はなく、流れ刺激によってバリア機能が低下しないことが確認された。

最後に、本マイクロ流路システムが血管壁の物質移行性評価のモデルとなり得るのかを評価するために、底面に血管内皮細胞、中に肝癌細胞を培養したカルチャーインサートをマイクロ流路に設置し、培養液を3日間灌流した。その結果、灌流することで肝癌細胞からのアルブミンの産生量が増量するだけでなく、血管内皮細胞を介してアルブミンが培養液内に取り込まれる量も増大することが分かった。本結果より、提案のマイクロ流路システムは流れ刺激によって流れに負荷されていない細胞の物質産生といった機能変化をもたらすのに加え、血管内皮細胞を介した産生物の移行性解析を実施可能であることが示唆された。

以上より、本マイクロ流路は流れ刺激負荷することで、血管壁のモデルの構築への応用が期待される。さらに、将来的には血管壁を介した物質の流入のモデルとして、病態解析や創薬試験に応用することが期待できる。

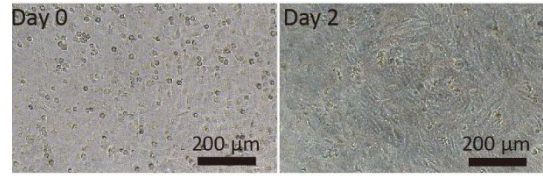


図3. コラーゲンビトリゲル膜上で血管内皮細胞を培養した様子

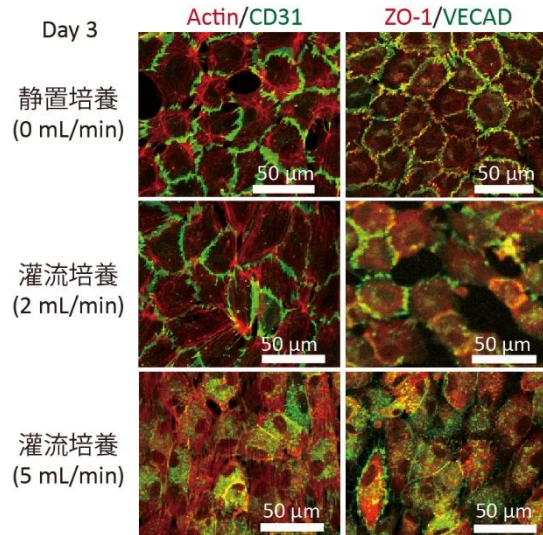


図4. コラーゲンビトリゲル膜上で培養した血管内皮細胞に流れ刺激を負荷した様子



図5. カルチャーインサートの取り外しとTEER測定の様子

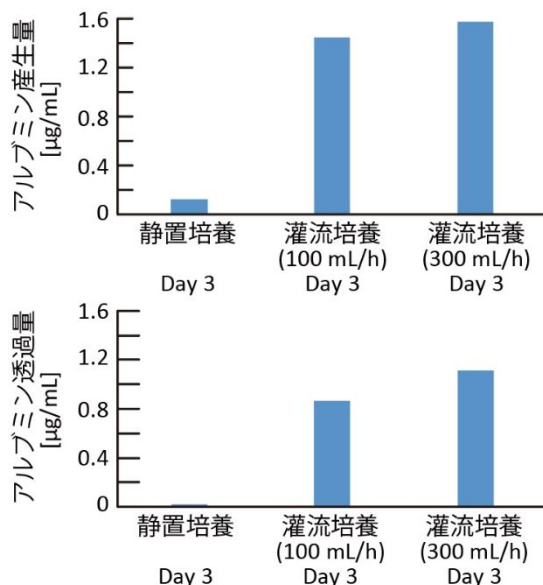


図6. 肝癌細胞 - 血管内皮細胞の共培養モデルにおけるアルブミン産生量およびアルブミン透過量と流れ刺激の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nobuhito Mori、Yuya Morimoto、Shoji Takeuchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Perfusable and stretchable 3D culture system for skin-equivalent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 011001 ~ 011001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1758-5090/aaed12	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryosuke Suzuki, Yuya Morimoto, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Stretchable and perfusable microfluidic device for cell barrier model
3. 学会等名 the 33rd MEMS conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takumi Yamada, Minghao Nie, Ai Shima, Yuya Morimoto, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Locally-patterned parylene membrane enables electrical resistance measurement for a cellular barrier consisting of < 100 cells
3. 学会等名 the 33rd MEMS conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森本雄矢、長田翔伍、島亜衣、三浦重徳、竹内昌治
2. 発表標題 マイクロ流路を用いた模擬血管壁への流体せん断応力負荷
3. 学会等名 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Matsumoto, Yuya Morimoto, Toshiro Sato, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 A microfluidic organoid trapping device to form tube-like intestinal organoids
3. 学会等名 The 24th MicroTAS (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuya Morimoto, Nobuhito Mori, Shoji Takeuchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 28 (総ページ数: 382)
3. 書名 In vitro tissue construction for organ-on-a-chip application (書名: Applications of Microfluidic Systems in Biology and Medicine)	

〔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
研究分担者	根岸 みどり (加藤みどり) (Negishi Midori) (30300750)	武蔵野大学・薬学部・助教 (32680)	
研究分担者	長田 翔伍 (Shogo Nagata) (40751441)	東京大学・生産技術研究所・特任研究員 (12601)	
研究分担者	高橋 英俊 (Hidetoshi Takahashi) (90625485)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・助教 (12601)	

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