

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19937

研究課題名（和文）血管新生と神経新生の融合による三次元脳組織工学の開拓

研究課題名（英文）Development of three-dimensional brain tissue engineering by the combination of angiogenesis and neurogenesis models

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では組織工学の観点から、マイクロ流体デバイスを用いた三次元培養によって脳の三次元ユニット構造であるNeurovascular Unit（NVU）を再現することを目的とした。まず血管新生モデルの開発に注力し、次に神経新生モデルと組み合わせる方針で研究を進めた。まず初めに血管および神経それぞれの培養モデルの共通の培養プラットフォームとなるマイクロ流体デバイスを作製し、脳組織工学に適した血管新生モデルを検討した。次に、脳の発生段階を模擬することによって脳血管新生モデルを構築した。これらの結果に基づいて、最終的に血管新生と神経新生の融合に取り組み、三次元NVU培養モデルの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外で脳組織を構築しようとする学術基盤において欠如している三次元脳組織工学を開拓することによって、【神経科学（単一細胞レベル） 三次元脳組織工学（多細胞レベル） 脳オルガノイド培養（組織レベル）】のシームレスな脳組織工学の学問体系を創出し、再生医療・創薬研究への応用に発展させる点に学術的意義がある。また、脳組織工学は、脳機能を解明するための実験モデルとしての役割だけでなく、病気メカニズムや創薬研究、診断デバイス開発においても重要な位置づけとなる点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to construct a culture model of neurovascular unit, which is a three-dimensional (3D) unit structure in the brain, by 3D culture in a microfluidic device from the standpoint of tissue engineering. This study was conducted by focusing on the development of an angiogenesis model, which was followed by the combination of the angiogenesis model and a neurogenesis model. First, we constructed a microfluidic device, which is a common culture platform for both angiogenesis and neurogenesis models. We then investigated an angiogenesis model which is useful in brain tissue engineering. Furthermore, we constructed a brain angiogenesis model by recapitulating brain developmental stages. Finally, we successfully constructed a 3D NVU culture model by combining angiogenesis and neurogenesis models.

研究分野：組織工学

キーワード：三次元培養 脳 血管新生 神経新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は構造・機能ともに極めて複雑であるため、その三次元構造を再生することが難しい。従来研究では、個々の細胞に着目し、神経突起の伸長メカニズムを調べるといった基礎的な研究が行われてきたが、ニューロンだけでなくグリア細胞や血管などの脳を構成する周辺の細胞や環境も含めた Neurovascular Unit (NVU) というコンセプトが提案されているように、脳の構造や機能を理解するためには個々の細胞に着目するだけでは不十分であり、ニューロン・アストロサイト・血管などによって構成される多細胞のユニット構造として理解しなければならない。最近では脳オルガノイド培養の開発が進み、三次元構造の重要性が認識されてきたが、微小培養環境制御とライブセルイメージングに課題がある。

研究代表者は、これまでにマイクロ流体デバイスを用いた微小培養環境の制御によって、内腔の連続した毛細血管網の構築に成功してきた。三次元臓器には血管による酸素と栄養の供給が必要であるため、毛細血管網の構築はあらゆる臓器の組織工学・再生医療において重要であるが、本研究では、組織工学において未開拓の脳に着目し、これまでに培ってきた血管構築手法と神経幹細胞の培養を融合することによって三次元脳組織工学の創成に挑戦する着想に至った。

脳は極めて複雑な構造であるため、まずは神経系と血管系の細胞に分けて個別に培養条件を検討してきた。血管系の構築については、当初は国内外で広く用いられているヒト臍帯静脈内皮細胞を用いていたが、脳血管は全身の血管の中でも極めて特異的な特徴を有する。そのため、ヒト脳血管内皮細胞を用いて、新たな血管培養モデルを構築した。一方で、神経系細胞については将来的なヒト iPS 細胞の使用も見据え、ヒト ES 細胞由来神経幹細胞を実験に用いることにした。この細胞から、ニューロンやアストロサイトが分化してくるが、これらの分化誘導を調節するために、培養に用いるゲルの種類や濃度の検討を行ってきた。その結果、神経新生と血管新生を実現するための基本となる培養環境を見出した。以上の経緯により、神経新生と血管新生を実現する基本培養モデルが確立されたため、これらのモデルに改良を加えることで脳組織工学の研究が展開できる萌芽的な段階にある。

2. 研究の目的

再生医療・組織工学において三次元臓器の再生手法には多くの課題が残されている。特に脳は、神経科学などの基礎研究は進んでいるが、組織工学については未開拓である。脳組織はニューロン・グリア細胞などの神経系の細胞と血管内皮細胞・ペリサイトなどの血管系の細胞が有機的に組み合わせることで三次元組織を形成し、高次機能を発現している。この三次元構造を生体外で再現することは脳組織工学における喫緊の課題である。

脳の組織工学は、脳機能を解明するための実験モデルとしての役割だけでなく、病気のメカニズムや創薬研究においても重要な位置づけとなる。近年パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患において損傷したニューロンを薬剤によって修復を図る治療が行われているが、脳血管特有の血液脳関門という機能によって血流から脳実質への物質輸送が厳しく制限されている。そのため薬剤の供給が困難であり、その制御には周辺の細胞も関与している。そこで、ニューロンに周辺細胞や脳微小環境環境も含めた NVU を考慮することによって、それらの相互作用の中で脳機能を制御し、適切に薬剤を届ける治療戦略の重要性が認識されている。

脳の組織工学に関連する従来研究として、マイクロ流路を用いて神経突起の伸長メカニズムを調べる培養モデルや、カルチャーインサートを用いた共培養モデルが報告されているが、これらの研究はいずれも二次元の静置培養であり、培養が容易な一方で生体内の生理的な環境を再現していない。一方、最近の研究で脳オルガノイド培養法が開発され、三次元の神経組織が培養できるようになってきた。この方法は三次元環境を有する点で優れているが、培養液に浮遊する細胞塊であり、微小培養環境を制御することができない。さらに、血管が欠如している点に大きな課題がある。以上のように、従来研究は組織レベルと単一細胞レベルに着目した研究であり、三次元・多細胞レベルの研究が欠如している。このギャップを解消することで、【神経科学(単一細胞レベル) 三次元脳組織工学(多細胞レベル) 脳オルガノイド培養(組織レベル)】のシームレスな脳組織工学の学問体系を創出し、基礎研究から再生医療・創薬研究などの応用へ展開することが期待される。そこで、本研究ではマイクロ流体デバイスを用いて、脳の三次元 NVU を再現する培養モデルを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず血管新生モデルの開発に注力し、次に神経新生モデルと組み合わせること、最終的に血管系および神経系の細胞から構築されるユニット構造(NVU)を構築した。

(1) マイクロ流体デバイスの設計と作製

フォトリソグラフィ法によってマイクロ流路パターンを鋳型を作製した。流路のデザインは、研究代表者がノウハウを蓄積してきた三次元マイクロ流体デバイスを基本とし、神経幹細胞と血管の共培養に特化したデザインに改良した。

(2) 血管新生モデルの検討

マイクロ流体デバイスを用いて、血管内皮細胞を培養し、血管新生因子を添加した培養液を用いることで血管形成を誘導した。この時、血管内皮細胞の由来の重要性を調べるために、広く用いられているヒト臍帯静脈内皮細胞に加えて、ヒト脳微小血管内皮細胞を用いた培養モデルを

構築し、両者を比較した。さらに、血管形成を調節する力学的因子として間質流の影響も調べた。さらに、生体内のように血管壁細胞（ペリサイト）に被覆され、安定化された血管を形成するためにヒト間葉系幹細胞との共培養も検討した。

(3) 血管新生モデルと神経新生モデルの融合

まず、神経幹細胞から異なる分化段階の細胞を誘導した。すなわち、三次元 NVU を構築するためには、血管と組み合わせる神経幹細胞の分化状態が重要となる。脳の発生段階において神経幹細胞は「神経幹細胞 神経前駆細胞 ニューロン アストロサイト」の順番で分化する。そこで、生体外においてこれらの分化誘導を行った。次に、マイクロ流体デバイスを用いて、これらの分化誘導した神経系細胞と血管系細胞の共培養を行った。

4. 研究成果

本研究では、血管新生と神経新生の三次元培養モデルを融合することが最終的な目標になるが、その基盤となる血管および神経それぞれの培養モデルの開発も重要となる。そこで、まず初めに共通の培養プラットフォームとなるマイクロ流体デバイスを作製し、脳組織工学に適した血管新生モデルを検討した。次に、脳の発生段階を模擬することによって脳血管新生モデルを構築した。これらの結果に基づいて、最終的に血管新生と神経新生の融合に取り組み、血液脳関門三次元培養モデルの構築に成功した。具体的な研究成果を以下に示す。

(1) マイクロ流体デバイスの設計と作製

フォトリソグラフィ法によってマイクロ流路パターン of 鋳型を作製し、ソフトリソグラフィ法によってマイクロ流体デバイスを作製した。このデバイスには細胞と培養液を流し込むマイクロ流路と隣接する三次元ゲルによって構成される。マイクロ流路から血管内皮細胞や神経幹細胞を導入し、マイクロ流体デバイスにおいてこれらの細胞を培養できることを確認した。

(2) 血管新生モデルに用いる血管内皮細胞の臓器特異性

血管内皮細胞の臓器特異性を調べるために、ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト脳微小血管内皮細胞を用いて微小血管を形成し、血管透過性を比較した。その結果、ヒト脳微小血管内皮細胞が形成する血管の透過性の方が有意に低いことを立証した。これらの成果は、脳組織工学において脳血管由来の血管内皮細胞を用いることの重要性を示している。

(3) 血管新生の調節因子

マイクロ流体デバイスを用いた血管新生モデルにおいて血管新生を調節する因子について検討した。まず、マイクロ流体デバイスを用いることの利点として培養環境における流れを制御できることが挙げられる。特に、間質流という比較的遅い流速の流れが血管形成に与える影響を調べた。すると、間質流が血管形成を促進し、特に間質流の上流方法に向かって血管を伸長することが明らかになった。この血管形成促進効果は間質流の強さに依存することがわかった。

(4) 微小血管を安定化する血管壁細胞（ペリサイト）

生体内の毛細血管は血管壁細胞（ペリサイト）に被覆されることによって安定化されている。そこで、本研究では血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養を行い、間葉系幹細胞がペリサイトに分化し、培養における微小血管が長期間維持されることを明らかにした。さらに、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の混合比率および細胞配置を制御することによって微小血管同士を吻合させる培養条件を明らかにした。

(5) 神経幹細胞から異なる分化段階の細胞を誘導

三次元神経・血管ユニットを構築するためには、血管と組み合わせる神経幹細胞の分化状態が重要となる。脳の発生段階において神経幹細胞は、神経前駆細胞・ニューロン・アストロサイトに分化する。そこで、神経幹細胞の分化誘導実験を行い、これらの細胞のマーカーを発現する細胞が得られることを確認した。

(6) 血液脳関門三次元培養モデルの構築

マイクロ流体デバイスを用いて脳血管内皮細胞、間葉系幹細胞、および神経幹細胞から分化誘導した細胞（ニューロン・アストロサイト）の共培養を行った。脳血管内皮細胞が間葉系幹細胞から分化したペリサイトに被覆された毛細血管様ネットワークを構築することを確認した。さらに、この毛細血管様ネットワークの近傍にアストロサイトが配置される三次元組織（血液脳関門モデル）を構築することに成功した。

(7) ゲルサンドイッチ法を用いた新規培養モデルの構築

ゲルサンドイッチ法を用いて脳血管内皮細胞によるネットワーク構造を形成させ、そこに神経幹細胞から分化誘導した細胞（ニューロン・アストロサイト）を加えることによってアストロサイトやニューロンが血管ネットワークに沿って移動する新規培養モデルを構築した。

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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uwamori Hiroyuki, Ono Yuuichi, Yamashita Tadahiro, Arai Ken, Sudo Ryo	4. 巻 122
2. 論文標題 Comparison of organ-specific endothelial cells in terms of microvascular formation and endothelial barrier functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microvascular Research	6. 最初と最後の頁 60~70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mvr.2018.11.007	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Kyoko, Tanimura Kohei, Watanabe Masafumi, Sano Hiromu, Uwamori Hiroyuki, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Chung Seok, Kamm Roger D., Tanishita Kazuo, Sudo Ryo	4. 巻 25
2. 論文標題 Construction of Continuous Capillary Networks Stabilized by Pericyte-like Perivascular Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 499~510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2018.0186	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 該当する
1. 著者名 Abe Yoshinori, Watanabe Masafumi, Chung Seok, Kamm Roger D., Tanishita Kazuo, Sudo Ryo	4. 巻 3
2. 論文標題 Balance of interstitial flow magnitude and vascular endothelial growth factor concentration modulates three-dimensional microvascular network formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 36102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5094735	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 該当する
1. 著者名 Watanabe Masafumi, Sudo Ryo	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of an in vitro vascular anastomosis model in a microfluidic device	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 18-00521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.18-00521	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 須藤 亮	4. 巻 60
2. 論文標題 間質流によって生み出される細胞集団のかたち	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 025 ~ 030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.025	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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kazuya Kibo, Takuya Higuchi, Mizuki Ichikawa, Hiroyuki Uwamori, Ryo Sudo
2. 発表標題 Investigation of a 3D Brain Angiogenesis Model Mimicking CNS Developmental Stages
3. 学会等名 5th TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuya Kibo, Takuya Higuchi, Mizuki Ichikawa, Hiroyuki Uwamori, Ryo Sudo
2. 発表標題 Creating a 3D brain angiogenesis model with MSCs and neural cells mimicking CNS developmental stages
3. 学会等名 EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川瑞紀、須藤亮
2. 発表標題 灌流可能な脳微小血管網を用いた三次元血液脳関門モデルの構築
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Sudo
2. 発表標題 In vitro tissue engineering using 3D microfluidic devices
3. 学会等名 International Symposium on SSS Laser Processing (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Kibo, Takuya Higuchi, Mizuki Ichikawa, Hiroyuki Uwamori, Tadahiro Yamashita, Ryo Sudo
2. 発表標題 3D brain angiogenesis platform on a microfluidic device
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masafumi Watanabe, Ryo Sudo
2. 発表標題 Engineering of in vitro vascular anastomosis under vascular endothelial growth factor (VEGF) gradients in a microfluidic device
3. 学会等名 TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society)-EU 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Sudo
2. 発表標題 In vitro 3D tissue engineering using a microfluidic device
3. 学会等名 Nano LSI Open Seminar (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Sudo
2. 発表標題 Microfluidic systems for 3D tissue engineering of cancer and vascular tissues
3. 学会等名 Microfluidics & Organ-on-a-Chip Asia 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野航平、菅野隼、山下忠紘、須藤亮
2. 発表標題 メソスケールデバイスを用いた灌流による毛細血管網の形態変化の調査
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木保和也、柴隆太、山下忠紘、須藤亮
2. 発表標題 ヒト神経幹細胞由来アストロサイトと血管新生モデルの融合による血液脳関門モデルの開発
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 酒井康行、金森敏幸 監修 (須藤 亮 分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 193-200
3. 書名 臓器チップの技術と開発動向 (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)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学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

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