

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12608

研究課題名（和文）長期灌流培養系と成熟血管網からなる統合オルガノイドシステム

研究課題名（英文）Integrated organoid system with mature vascular network and long-term perfusion

研究代表者

二井 信行（Futai, Nobuyuki）

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：10508378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞は、血管新生とリモデリングの長期間の過程を経て毛細血管構造を形成する。これらのプロセスを生体外で再現できれば、再生医療、特に移植可能な厚みのある組織を人工的に作り出すことに貢献できる。我々は、点字デバイスにより動的に灌流条件を変化させられるマイクロ灌流デバイスに、フィブリンゲル内3D培養を組み合わせ、成熟した管腔をin vitro再現した。また、これら管腔構造の時間発展のデータから、血管新生と流れの関係を実験的に得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

完全に自発的な血管網をin vitroで再現、組織形成途上の細胞の状態に依らないオルガノイド形成技術を確立できれば、オルガノイドの大型化に貢献できる。また、オンチップセルプロセッシングシステムとしての応用、細胞密度や周囲の環境に適応できる自動培養システムへの応用が期待できる。さらに、集積オルガノイド・プロセッシングシステムへの発展、毛細血管網オルガノイドにコンパクトな循環灌流系と雰囲気制御系をセットにして、（オルガノイド+長期灌流培養+アッセイ）を一体化することで、薬剤の長期的な影響の評価への対応が容易となる。

研究成果の概要（英文）：Vascular endothelial cells form capillary structures through a long-term process of angiogenesis and remodeling. Reproducing such processes in vitro will contribute to regenerative medicine, especially the artificial construction of transplantable thick tissues. We have produced mature lumen structures in vitro by combining a 3D culture of vascular endothelial cells in fibrin gel and a Braille-based microfluidic perfusion device that dynamically changes perfusion directions and flow rates. In addition, time evolution data of these lumen structures provided experimental evidence of the relationship between flow and angiogenesis.

研究分野：生体医工学

キーワード：血管新生 マイクロ流体 リモデリング 長期灌流培養

1. 研究開始当初の背景

ヒト由来の複数の細胞種を、生体機能を模擬できるように組織化して、人工的に培養したもの、すなわちオルガノイドは、いわゆる”mini-human”として、ドラッグディスカバリーと再生医療に貢献することが期待できる。このようなオルガノイドのサイズと、模擬可能な生体機能の幅を左右するのが、その内部に管腔構造があって、灌流可能かどうかである。

細胞塊に管腔構造をもたせる方法には、微細加工により人工的な血管類似の空隙を形成する方法と、内皮細胞に自発的に管腔構造をつくらせる方法がある。後者には、**1)** 組織の成長や形態の変化・環境の変化(酸素濃度など)へ適応した効率的な酸素、老廃物等の物質輸送、そして **2)** 生体組織構造のテンプレートとしてのほたらき、という前者にない重要な利点をもつ。

これまで、オルガノイドへの自発的かつ最適化された血管形成は、*in vivo* では実現している。*In vitro* での現時点の主たる成果としては、太い血管に見立てたマイクロ流路から自発的に管腔を形成した例が比較的多く報告されている。このような管腔形成と血管新生は、概ね **8** 日ほどの短期間の培養で現象を捉えることができ、それが広く報告されている理由と考えられる。それらに対し、リモデリングは、その現象を捉えるために **3** 週間以上の長期にわたる培養が必要とされるが、毛細血管網を長期間維持することは技術的に難しく、報告例は非常に少ない。

8 日を大きく超える管腔の長期培養の報告としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (**HUVEC**) とペリサイトの共培養や、間質流の流量を調節することで **20** 日の長期培養を達成した例が存在する。しかしながら、我々の知る限りでは、ペリサイトの共培養系または間質流の制御といった手段をとっても、**21** 日を超える毛細血管網の維持は達成されていない。

申請者の研究では、点字灌流系と **On-chip Incubation system** (**2.1** 節参照) を統合し、細胞培養に適した環境をコンパクトに実現するオンチップ毛細血管網培養デバイスを開発しており、毛細血管網の長期培養に向けた研究が進められてきた。そして、その先行研究において、たった一例のみ、自発的に形成された毛細血管網の **132** 日にもおよぶ長期培養に成功している。しかしながら、培養の再現性は乏しく、安定した長期培養の実現には未だ至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究で達成されている **20d** を超える期間の自発的・形成毛細血管網の長期培養を安定的に実現し、管腔形成・血管新生・リモデリングといった毛細血管網の形成過程を生体外で再現することを目指す。

この目的を達成するため、これまでのオンチップ毛細血管網培養デバイスをベースに、間質流の流量や流れ方向の切り替え機能を付加したデバイスを用いて、管腔の形成状況に応じた動的な間質流によって血管内皮細胞を刺激することで、長期培養できるか検証するとともに、動的な間質流の制御によって毛細血管網を長期維持する方法を見出すこととした。

3. 研究の方法


3(1) 毛細血管網培養デバイス

本研究で用いた毛細血管網培養用マイクロ流体デバイスの外観と構造を、**図 1** に示す。リソグラフィ技術によって作成した **PDMS** 製のマイクロ流路と、**On-chip Incubation system (OCI)** 用の **PDMS** 製リザーバを、**PMMA** 製リザーバで閉じ込めた構造になっている。流路への培地の送液は、点字セル(**KGS, SC11**)のピンの動作を利用した蠕動マイクロポンプが担い、デバイスを **37** に加温したホットプレートに置くだけで、細胞培養に適した環境をコンパクトに実現する。

3(2) マイクロ流路内 3D 毛細血管網培養

フィブリンゲルに **8.0 × 10⁶ cells/ml** の密度で懸濁したヒト臍帯静脈内皮細胞(**HUVEC**)を培養チャンバー内に播種した後、培地(**Lonza, EGM-2**)を灌流させることで培養を行った。なお、培地は、血管新生を促進させる因子を分泌する正常ヒト肺線維芽細胞(**NHLF**)で馴化したものと、体積比 **1:1** で混合して使用した。

3(3) 点字マイクロ流体駆動による間質流の制御

間質流の制御は、点字セルのピンの動作を利用した。通常の送液は、並列な **2** 本の流路上に存在する縦 **3** 本 **1** セットの点字ピンのペアを、 の **4** ス

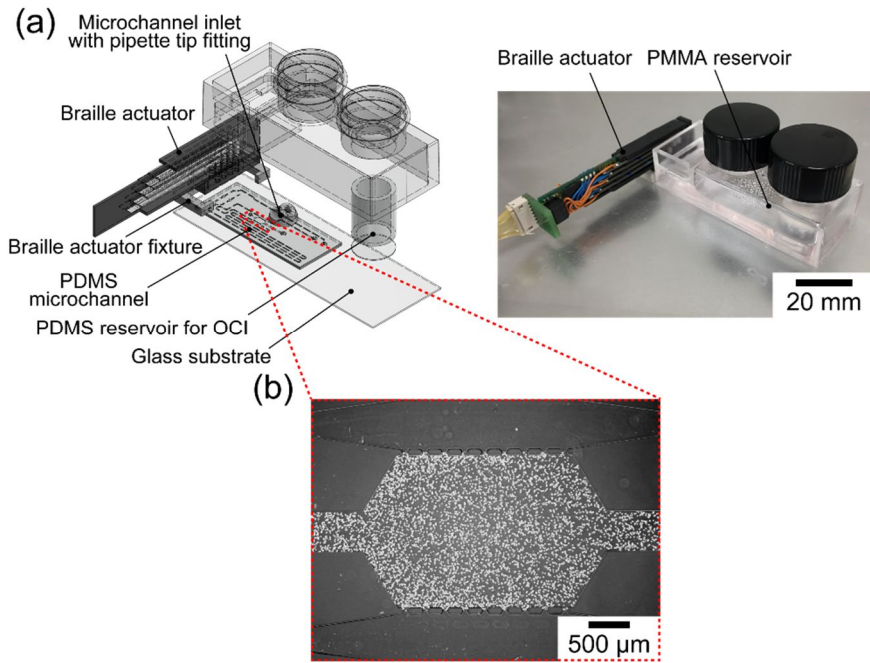


図 1. 点字灌流系と OCI を統合した、オンチップ毛細血管網培養デバイスの外観と構造。(a)分解図と外観。8つのピンをもつ点字セルが、クローズドタイプの PDMS 製マイクロ流路を直接加圧し、内部の液体を押し進めることで送液される。PDMS 製リザーバ内に重炭酸緩衝液を満たすと、培地の pH が一定に保たれる。(b)ゲルで懸濁した HUVEC を播種した直後の培養チャンパー。

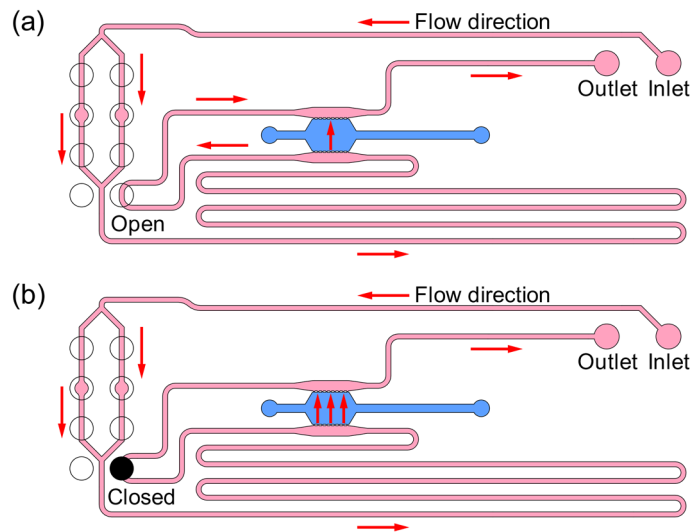


図 2. 点字セルのピンの動作を利用した、間質流の流量制御。培養チャンバ(図中青色部)を浸透する流れの強さを、迂回流路上の点字ピンの加圧の有無によって調整する。加圧することで迂回流路を閉塞し、培養チャンパーを直接通るルートに流れを集中させる。(a)加圧無しの弱い流れ。(b)加圧有りの強い流れ。

テップ(各ステップ 2 s)で、2 ステップの位相差をつけながら動作させることで行った。なお、はピンが流路を加圧している状態、○はピンが流路を加圧しない状態を示す。流れ方向の反転は、上記の 4 ステップの動作を反転させることで可能である。また、間質流の流量は、図 2 に示すように、培養チャンパーを迂回する流路への、点字ピンの加圧の有無によって調整した。

3(4) 管腔のイメージングと画像解析

培養期間中、倒立顕微鏡(Leica DMi8)に取り付けた CMOS カメラ(The Imaging Source, DMK33UX174)を用いて細胞の観察を行った。明視野像は 1 日ごとに取得し、管腔形成の進捗と生育の偏りに応じて、間質流の流量と方向の制御を実施した。内腔の可視化には、PBS(-)で希釈した 2.5(v/v)%の FITC-dextran(Sigma-Aldrich, 46945)を用い、蛍光像を適時取得した。

取得した蛍光像には、ImageJ と AngioTool による画像解析を適用し、管腔の分岐数と、

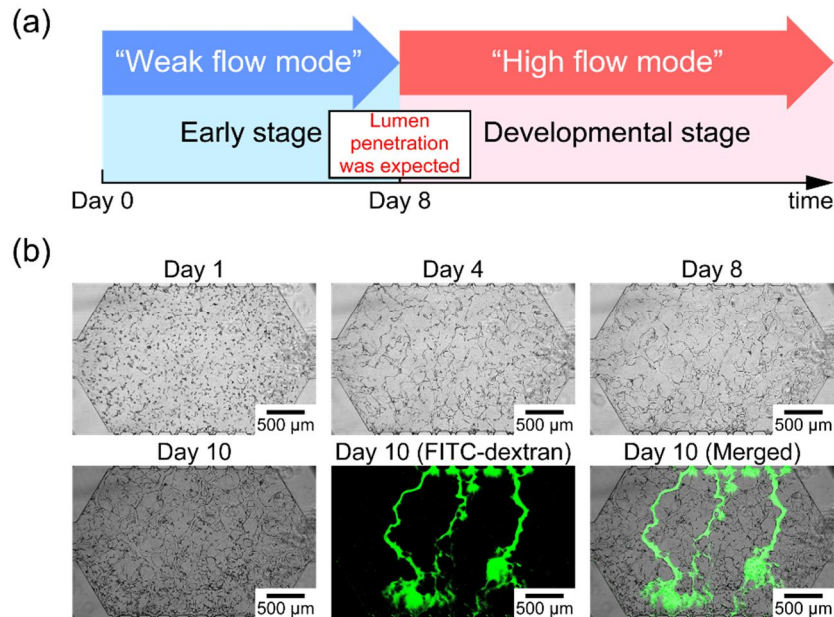


図 3. 間質流の流量制御による灌流可能な管腔の形成. (a)管腔の形態に基づいた流量制御スキームの例. (b)(a)を適用した培養個体における, 培養開始から流量切り替え前後までの管腔の発達.

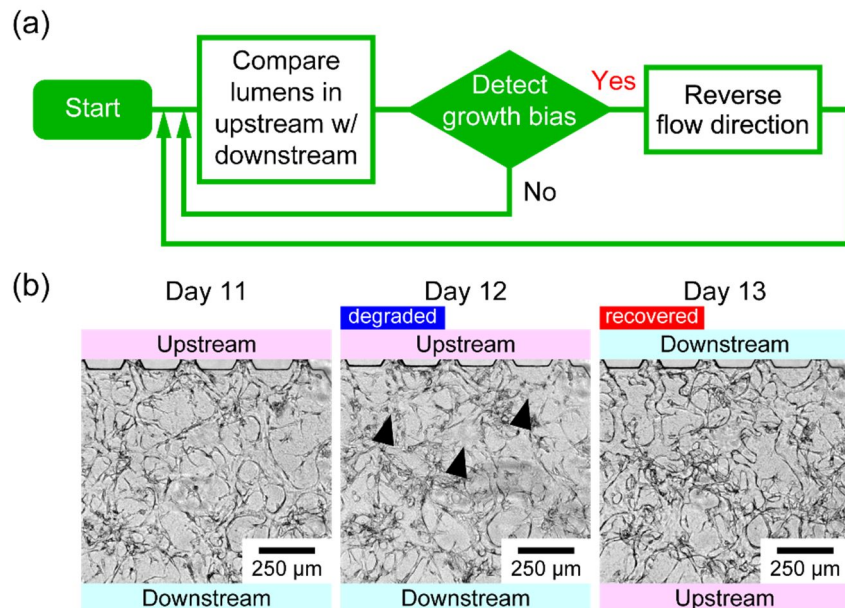


図 4. ビジュアルフィードバックを伴う流れ方向制御による, 管腔構造の維持. (a)流れ方向切り替え制御のフローチャート. (b)流れ方向切り替えの効果の例. 矢頭で指し示す先に注目すると, 一度崩壊した管腔の構造が修復されていることが理解できる.

培養チャンパー内を占める管腔の面積占有率を求め, 毛細血管網の形態の変化を調べた.

4. 研究成果

4(1) 流量制御による灌流可能な管腔の形成

点字制御によってマイクロ流路上の培地の経路を切り替え, それにより間質流の流量を切り替えることにより, 灌流可能な管腔を形成できた. 具体的には, 図 3(a)に示すように, 管腔の開通が見込まれる時点を形態で推測し, 図 2(a)に示す経路がもたらす「弱い流れ」(培養チャンパーを迂回する流路を点字ピンで加圧しない, 主に間質流)と, 図 2(b)に示す「強い流れ」(迂回する流路を点字ピンで加圧. 間質流に加え管腔を貫通する流れ)を切り替えた. 実際には, 弱い流れで培養を開始してから数日程度で管腔形成を観測でき, 管腔形成が進んで培養チャンパー内を開通することが見込まれた時点, もしくは, 管腔形成が進行しなくなった時点で, 強い流れに切り替えた. 図 3(b)に示す培養例においては, **day8**で開

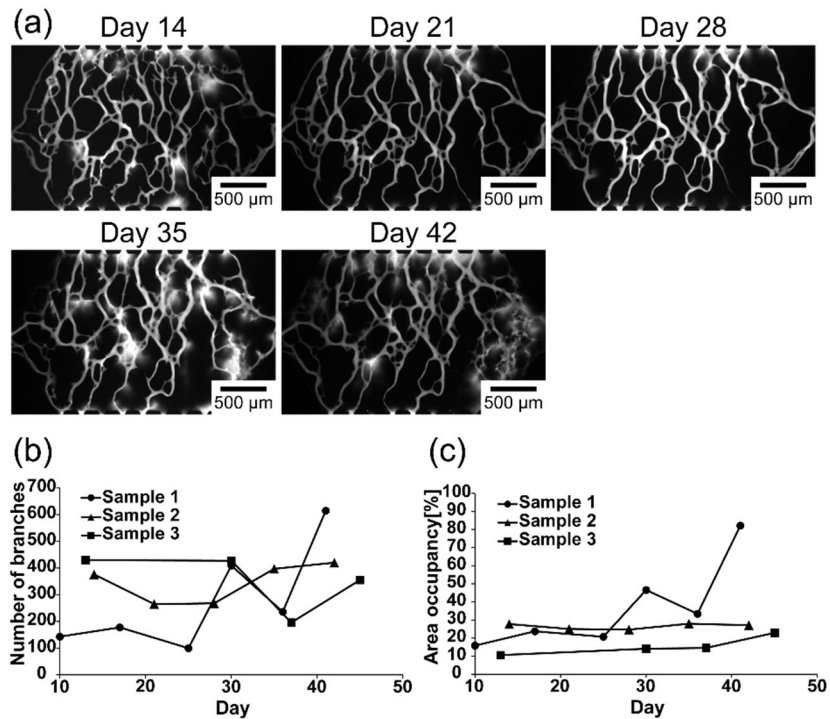


図5. 40日間を超えた長期培養の結果. (a)長期培養の1例. 下記グラフデータの凡例の Sample 2にあたる. (b)管腔の分岐数の変化. (c)培養チャンバー内を占める管腔の面積占有率の変化.

通が見込まれたため、強い流れに切り替えたところ、**day10** に実際に管腔が開通した. なお、拡散係数の小さい蛍光色素である **FITC-dextran** によって管腔を可視化することで開通を確認した.

4(2) 流れ方向制御による管腔構造の長期維持

さらに、管腔開通後の管腔を貫通する流れについても、その形態に基づいた流れ方向の切り替えが管腔構造の維持に有効であることを見出した. 流れ方向の切り替えは、図 4(a)に示す、培養チャンバーの上流側と下流側の生育状況を比較するビジュアルフィードバックのもと実行した. その効果の例を図 4(b)に示す. **day12** 時点において、灌流の上流側において、管腔壁が崩壊して単体の細胞へと衰退する現象を確認した直後に、灌流の方向(上流と下流)を反転させた. その後 **day13** までにかけて管腔壁が修復され、管腔の構造が維持された. 管腔が衰退する現象は決まって上流側で発生していた. その原因として、点字ピンの離散的な動作から生みだされた強い脈流による細胞への強いせん断力が考えられる. しかし、灌流を弱めると細胞が死滅する、または管腔が過剰に膨張する. 安定した管腔灌流を維持しつつ管腔の崩壊を防ぐ方法はまだ見出していないが、引き続き探索中である.

しかし、管腔の崩壊は一時的なものであり、結果、貫通流れ方向の切り替えにより、**40** 日間を超える長期培養を達成することができた. 図 5 にその培養の 1 例と、蛍光像の画像解析によって求めた分岐数と管腔の占有面積率の推移を示す. 図 5(b)に示す管腔の分岐数、(c)に示す管腔の面積占有率ともに、これらの値も多少の増減を繰り返しながら、すなわち、血管新生とリモデリングを繰り返しながら、管腔が成長したことを示している.

本研究では、点字灌流系と **OCI** を統合したオンチップ毛細血管網培養デバイスにおいて、管腔の形態に応じた動的な間質流によって血管内皮細胞を刺激した. その結果、管腔の形態に基づく間質流の流量の調整と流れ方向の切り替えによって、灌流可能な毛細血管網の形成と、**40** 日間を超える長期培養を実現することができた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nakamura, Masataka Ninomiya, Yusuke Nishikata, Kotaro Futai, Nobuyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 On-chip long-term perfusable microvascular network culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 -
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 Nishikata Kotaro, Nakamura Masataka, Arai Yuto, Futai Nobuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 An Integrated Pulsation-Free, Backflow-Free Micropump Using the Analog Waveform-Driven Braille Actuator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 294 ~ 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi13020294	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masataka Nakamura, Kotaro Nishikata, Yusuke Ninomiya, Nobuyuki Futai
2. 発表標題 On-chip long-term perfusable microvascular network culture
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西方 洸太郎, 鈴木 渉, 二井 信行
2. 発表標題 オンチップ3次元組織灌流培養が可能な3Dクリノスタットの開発
3. 学会等名 日本マイクログラフィティ応用学会 第33回学術講演会 (JASMAC-33)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西方洸太郎, 中村将隆, 二井信行
2. 発表標題 点字マイクロ流体灌流における疑似チェックバルブスキームによる生体内流れの再現
3. 学会等名 化学とマイクロナノ学会研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村将隆, 西方洸太郎, 二井信行
2. 発表標題 流路形状と送液方法の最適化による3次元細胞培養用マイクロ流路への再現性のあるゲル区画形成
3. 学会等名 生体医工学会関東支部若手発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二井 信行, 西方 洸太郎, 中村 将隆, 三田 優和, 小出 眞路, 三浦 岳
2. 発表標題 長期マイクロ灌流培養下における自発的血管ネットワーク形成
3. 学会等名 日本再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2021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

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