

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22680037

研究課題名（和文） 間質流制御による三次元複合肝組織の血管化

研究課題名（英文） Vascularization of three-dimensional complex liver tissues by regulation of interstitial flow

## 研究代表者

須藤 亮 (SUDO RYO)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：20407141

研究成果の概要（和文）：近年の再生医療において複雑な三次元臓器の再生技術が求められている。特に、毛細血管を含む三次元複合組織の再生が課題であり、本研究は生体工学の立場から三次元肝細胞組織に毛細血管を導入する血管化の技術を検討した。具体的には、微細加工技術によって作製したマイクロ流体デバイスを用いることで細胞周囲の微小環境（流れ、細胞配置など）を時空間的に調節し、肝細胞組織と毛細血管の相互作用を明らかにし、三次元肝組織の血管化に重要な因子を見出した。

研究成果の概要（英文）：There is a demand to reconstruct three-dimensional (3D) complex organs in recent regenerative medicine. In particular, it is important to reconstruct 3D complex tissues including microvascular networks. In this study, we investigated a technology to vascularize 3D hepatocyte tissues. Specifically, cellular microenvironments (e.g., flow, cellular configuration) were spatiotemporally regulated using microfluidic devices made by microfabrication technologies. We clarified interactions between hepatocyte tissues and microvascular networks, and found out important factors for the vascularization of 3D hepatocyte tissues.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：マイクロ流体デバイス 肝臓 血管

## 1. 研究開始当初の背景

現在の再生医療では、角膜・皮膚などの再生に成功しているが、これは単一の細胞が単純な二次元組織を形成しているため再生が比較的容易であるためである。一方、肝臓や心臓などは数種類の細胞が複雑な三次元構造を形成しているため、その再生技術はいま

だに確立されていない。特に、再生した組織に毛細血管を導入すること（血管化）がこれらの三次元臓器を再生するうえで大きな課題になっている。

研究代表者はこれまでに一貫して肝臓再生の組織工学研究に従事してきた。特に、小型肝細胞と呼ばれる肝前駆細胞を用いて生

理的な機能を有する肝組織の再生に成功した (Sudo *et al.*, *Ann Biomed Eng*, 2005; Sudo *et al.*, *FASEB J*, 2005)。また、胆管上皮細胞から生体内に類似した胆管を再生させることに成功した (Hashimoto, Sudo *et al.*, *Am J Pathol*, 2008)。さらに、細胞外環境の弾性率や低酸素状態によって毛細血管の再生を制御できることを報告してきた (Yamamura, Sudo *et al.*, *Tissue Eng*, 2007)。これらの成果により、肝臓を構成する3つの組織(肝組織・胆管・毛細血管)を個別に再生させることが可能になり、次の段階としてこれらを融合させる必要性を認識するに至った。研究代表者は、次世代の組織工学では細胞と細胞を組み合わせて「単純組織」を再生させるだけでなく、次の段階として組織と組織を組み合わせて「複合組織」を再生させることが必須であると考えている。

生体外で機能的な複合組織を再生させるためには、まず生体内の細胞環境について理解する必要がある。そこで、生体内の細胞環境について調べてみると以下のような特徴が挙げられる。

- (1) 液性因子が対流・拡散によって制御されている。
- (2) 環境は時間的に変化する。
- (3) 細胞には三次元的な足場がある。
- (4) 組織の細胞は秩序立った配列になっている。

したがって、三次元複合組織の再生のためには、細胞周囲の微小環境における対流・拡散・細胞配置を時間的・空間的に制御するための工学的な手法の開発が必要不可欠となる。

研究代表者は米国マサチューセッツ工科大学にてマイクロ流体デバイスの開発に携わり、このデバイスによって細胞周囲の対流・拡散・細胞配置を制御できることを見出した。この成果は、MEMS分野で定評のある国際ジャーナル *Lab on a Chip* に掲載された (Chung, Sudo *et al.*, *Lab Chip*, 2009)。さらに、このデバイスで間質流を制御することで毛細血管を再生させることに成功した (Sudo *et al.*, *FASEB J*, 2009)。この成果は、最近新聞でも紹介されて大きな反響を呼んでいる。また、最近の研究で間質流が肝細胞の三次元組織形成にも重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

以上の経緯を経て、研究代表者らはマイクロ流体デバイスを用いて肝組織と毛細血管を組み合わせる研究に着手し、毛細血管を肝組織近傍に配置させる予備的な実験結果を得ている。そこで、間質流を制御することで細胞外環境の対流・拡散状態を調節し、肝組織・毛細血管の形態形成に影響を与え、複合組織を再生させる着想に至った。特に、マイ

クロ流体デバイスを用いて間質流および細胞配置を時間的・空間的に制御し、多細胞のダイナミクス(遊走・走化作用・形態形成・細胞接着)を実験的に明らかにすることで、三次元複合肝組織の血管化を実現することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、現在ティッシュエンジニアリングの分野で重要な課題となっている「毛細血管を含む三次元複合組織の再生」を実現するために生体外で再生した複数の組織を融合させる新しい研究手法を提案する。具体的には、研究代表者らが開発したマイクロ流体デバイスを利用して細胞環境の間質流および細胞配置を時間的・空間的に制御することによって多細胞のダイナミクス(細胞接着・遊走・走化性・形態形成)を最適化し、三次元複合肝組織に毛細血管を導入(血管化)することを目的とした。さらに、従来の生物・医学分野による要素還元論的な手法とは異なり、工学を基盤とした複合臓器再生のための新しい構成論的手法として展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて間質流を時間的・空間的に制御することによる複合組織再生への影響を検討することを目的としている。特に、細胞微小環境における拡散・対流を制御し、肝臓を構成する3種類の異なる細胞群を時間的・空間的に制御して導入することで、三次元複合肝組織の血管化を試みる。顕微鏡イメージング技術により各細胞群のダイナミクス(遊走・走化作用・形態形成・細胞接着)をリアルタイムで記録し、定量的に解析する。さらに、多細胞組織におけるタンパク質の発現・局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的に解析し、細胞間相互作用を定量的に評価する。特に、3種類の細胞群を導入する順序・タイミング、および培養環境における対流・拡散を時間的・空間的に最適化することによってそれぞれの細胞群が組織化し、三次元複合組織の血管化を実現する条件を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 2010年度の研究成果

マイクロ流体デバイスを用いて間質流を制御し、3種類の異なる細胞群を時間的・空間的に制御してマイクロ流路に導入することで、細胞群が組織化する最適な条件を検討した。

具体的には、以下のステップで研究を進め、研究成果を得た。

- ① マイクロ流体デバイスをソフトリソグラフィ法によって製作した。

- ② ラットの肝臓から3種類の細胞群（肝細胞・毛細血管内皮細胞・および血管周囲細胞である星細胞）を分離し、各細胞群の組織形成が最適化される組み合わせを実験的に検討した。
- ③ 分離した各細胞群をマイクロ流体デバイスに導入する順序・タイミングを変更することで、各細胞群において組織化が誘導される最適な条件を検討した。
- ④ タイムラプス顕微鏡システムで細胞動態を長時間観察し、多細胞のダイナミクス（遊走・走化作用・形態形成・細胞接着）を記録・解析を行ない、肝細胞組織と血管様ネットワークの相互作用を定量的に解析した。
- ⑤ マイクロ流体デバイスにおいて形成された三次元組織を各種マーカーで蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元構造を解析した。

### (2) 2011年度の研究成果

マイクロ流体デバイスを用いて間質流を制御し、細胞の配置や形態形成を時間的・空間的に制御することで、細胞群が組織化し、血管化するために最適な条件を検討した。

具体的には、以下の研究成果を得た。

- ① マイクロ流路のデザインを改良したマイクロ流体デバイスを用いて実験を行い、実験データ取得のハイスループット化を図った。
- ② マイクロ流体デバイスで培養する3種類の細胞群（肝細胞・毛細血管内皮細胞・星細胞）に関して、組織化を誘導するために最適な組み合わせを検討した。特に、星細胞が毛細血管形成プロセスにおいて血管内皮細胞の形態形成を安定化することを見出した。また、肝細胞組織の血管化を行う際に、血管内皮細胞との共培養プロセスを時間的に制御することが重要であることを見出した。
- ③ 培養液にTGF $\beta$ を添加し、細胞間接着へ及ぼす影響と血管化プロセスに与える影響を定量的に解析した。
- ④ タイムラプス顕微鏡システムで細胞動態を長時間観察し、血管ネットワークの細胞動態を定量的に解析した。
- ⑤ マイクロ流体デバイスにおいて形成された三次元組織を各種マーカーで蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて毛細血管ネットワークと肝細胞組織の界面を中心に三次元構造を可視化した。

### (3) 2012年度の研究成果

マイクロ流体デバイスを用いて間質流を制御し、細胞の配置や形態形成を時間的・空間的に制御することで、細胞群が組織化し、血管化するために最適な条件を検討した。

具体的には、以下の研究成果を得た。

- ① これまでに改良した新しいデザインのマイクロ流体デバイスを用いて肝細胞と血管内皮細胞の共培養を行い、共培養のプロセスを明らかにした。
- ② 昨年度までに得られた実験成果から、血管内皮細胞との共培養プロセスを時間的に制御することが肝細胞組織の血管化を行う際に重要であることを見出し、新しく作成したマイクロ流体デバイスで血管内皮細胞および肝細胞の播種時期をコントロールすることで三次元肝組織の血管化が実現する知見を得た。
- ③ マイクロ流体デバイスでの微小培養環境を検討するため、生体内における血管化プロセスの検討を行い、血管密度が重要なパラメーターであることを見出した。
- ④ 肝組織の血管化を行う際に、毛細血管網を安定化させることが重要であるとの考えに至り、間葉系幹細胞と血管内皮細胞の共培養を行うことでマイクロ流体デバイスにおいて毛細血管網を長期間維持する微小培養環境を見出した。

### (3) 3年間の研究成果のまとめ

マイクロ流体デバイスを用いて細胞の配置や組み合わせる順序をシステマティックに検討し、本研究の目的である三次元複合肝組織の血管化を実現するための道筋を立てることができた。一部血管化を実現する予備的な成果も得られ、今後実験条件をより詳細に検討することで毛細血管網を含む三次元肝組織を再構築することが期待できる。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計13件）

- ① Kyoko Yamamoto, Kohei Tanimura, Yo Mabuchi, Yumi Matsuzaki, Seok Chung, Roger D. Kamm, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Ryo Sudo. The stabilization effect of mesenchymal stem cells on the formation of microvascular networks in a microfluidic device. *Journal of Biomechanical Science and Engineering* (in press) 査読有
- ② Yoshinori Abe, Ryo Sudo, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita. Steady and pulsatile shear stress induce different three-dimensional endothelial networks through pseudopodium formation. *Journal of Biorheology* (in press) 査読有
- ③ Junichi Kasuya, Ryo Sudo, Genta Masuda, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita. Reconstruction of hepatic stellate cell-incorporated liver capillary structures in

small hepatocyte tri-culture using microporous membranes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (in press) 査読有

- ④ Johann Kalchman, Shingo Fujioka, Seok Chung, Yamato Kikkawa, Toshihiro Mitaka, Roger D. Kamm, Kazuo Tanishita, Ryo Sudo. A three-dimensional microfluidic tumor cell migration assay to screen the effect of anti-migratory drugs and interstitial flow. *Microfluidics and Nanofluidics* (in press) 査読有
- ⑤ Yoojin Shin, Sewoon Han, Jessie S. Jeon, Kyoko Yamamoto, Ioannis K. Zervantonakis, Ryo Sudo, Roger D. Kamm, Seok Chung. Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nature Protocols* 7, 1247–1259, 2012 査読有
- ⑥ Junichi Kasuya, Ryo Sudo, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita. Spatio-temporal control of hepatic stellate cell-endothelial cell interactions for reconstruction of liver sinusoids in vitro. *Tissue Engineering Part A* 18, 1045–1056, 2012 査読有

[学会発表] (計 42 件)

- ① 山本 興子、安定化毛細血管の再生における血管内皮細胞と間葉系幹細胞の相互作用、第 12 回 日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 23 日、神奈川
- ② 山本 興子、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の相互作用による毛細血管安定化の検討、日本機械学会 第 25 回 バイオエンジニアリング講演会、2013 年 1 月 10 日、茨城
- ③ 若杉 美樹、マウス背側皮膚窓による培養小型肝細胞組織移植に伴う血管新生の観察、日本機械学会 第 25 回 バイオエンジニアリング講演会、2013 年 1 月 10 日、茨城
- ④ 須藤 亮、生体工学的的手法による微小血管構築制御、日本機械学会 第 25 回 バイオエンジニアリング講演会、2013 年 1 月 9 日、茨城
- ⑤ Ryo Sudo, Three-dimensional liver cancer cell migration assay under interstitial flow in a microfluidic system, 1<sup>st</sup> Annual IEEE EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2012 年 12 月 4 日, Ka'anapali, USA
- ⑥ 阿部順紀、血管内皮細胞の 3 次元ネットワーク形成に及ぼす間質流の影響、日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会、2012 年 11 月 17 日、東京
- ⑦ 若杉 美樹、マウス背側皮膚窓への培養肝

細胞組織移植による血管新生観察と組織酸素分圧測定、第 16 回 酸素ダイナミクス研究会、2012 年 9 月 29 日、東京

- ⑧ Junichi Kasuya, Construction of functional ex-vivo liver tissues with pericytes-incorporated microvessels using microporous membranes, 3<sup>rd</sup> TERMIS World Congress, 2012 年 9 月 7 日, Vienna, Austria
- ⑨ Ryo Sudo, Quantitative analysis of interactions between capillary networks and hepatocyte tissues in a microfluidic platform. 2012 年 9 月 7 日, 3<sup>rd</sup> TERMIS World Congress, Vienna, Austria
- ⑩ 須藤 亮、小型肝細胞－星細胞－血管内皮細胞共培養モデルにおける肝類洞様構造の再構築と肝細胞機能発現第 19 回 肝細胞研究会、2012 年 6 月 30 日、北海道
- ⑪ 須藤 亮、肝細胞との共培養が血管内皮細胞の三次元ネットワーク形成に与える影響、2012 年 6 月 12 日、神奈川
- ⑫ 須藤 亮、生体外における肝臓再生への工学的アプローチ、分野横断型医工学研究プラットフォーム BASIC 特別講演会、2012 年 2 月 29 日、宮城
- ⑬ 須藤 亮、マイクロ流体デバイスを用いた三次元組織再生への工学的アプローチ、バイオフィジオロジー研究会、2012 年 2 月 25 日、京都
- ⑭ Ryo Sudo, Microfluidic culture models for investigating normal and cancer cell behaviors, バイオメカニクス懇話会、2012 年 1 月 16 日、北海道
- ⑮ Tomohiro Tsuji, Quantitative analysis of the interactions between 3D hepatocyte tissue and capillary networks in a microfluidic platform, MicroTAS 2011, 2011 年 10 月 3 日, Seattle, USA
- ⑯ Ryo Sudo, A bioengineering approach to liver tissue engineering, Biofrontier Symposium 2010, 2010 年 11 月 11 日, 石川
- ⑰ Ryo Sudo, Hepatocyte-endothelial cell interactions monitored in a microfluidic device, World Congress of Biomechanics 2010, 2010 年 8 月 1 日, Suntec Convention Centre, Singapore

[その他]

ホームページ

<http://www.sudo.sd.keio.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須藤 亮 (SUDO RYO)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：20407141

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :