

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651156

研究課題名(和文)眼底組織模倣型オーガンチップデバイスの開発

研究課題名(英文)Development of an organ on a chip that mimics the ocular fundus

研究代表者

梶 弘和(Kaji, Hirokazu)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70431525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織・臓器の構造や機能を模倣した新しい3次元培養モデル(Organ-on-a-Chip)が最近注目されてきており、肺、肝、腸などの消化呼吸器系組織を模倣する試みが盛んに検討されている。しかしながら、眼などの特殊感覚器系に関するオンチップの培養モデルはほとんど例がない。そこで本研究では、マイクロ流路デバイス内に眼底組織を模倣した3次元培養系の構築に取り組んだ。流路デバイス内で網膜色素上皮細胞などの神経支持細胞を培養して、形態観察や分泌物解析を行ったところ、生体組織に近い機能を発現していることが確認された。今後、開発した培養系の病態モデル化やそれを用いた薬効評価への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Developing new three-dimensional (3D) in vitro cell culture models closely mimicking human tissues and organs (referred to as "organ on a chip") has recently attracted great attention for disease modeling and drug discovery. In particular, there have been many attempts to mimic the digestive and respiratory systems such as the lung, liver and intestine. To date, however, there are few reported on-chip culture models of sensory organs such as the eye. Thus, this research aims to develop a cell-based retinal model within a microfluidic device and to examine cellular responses to controlled environments. The characterization of neural supporting cells including retinal pigment epithelial cells cultured in the device was performed and found to exhibit properties found in native tissues. Application of stimuli that induce pathological changes in cultured cells would extend the system to a disease model for new therapy and drug discovery.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

キーワード：システムオンチップ 生体材料 マイクロ・ナノデバイス 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

生体機能に近いヒト組織・臓器モデルの開発は、疾患研究や創薬プロセスにおいて非常に重要である。バイオマテリアルやマイクロ流体技術、細胞組織工学の進展により、生体組織・臓器の構造や機能を模倣した新しい3次元培養モデル (Organ-on-a-Chip) の開発が盛んに行われている。従来より、このようなバイオデバイスは検討されてきているが、ハーバード大学の Ingber グループが、ヒト肺機能を再構築したデバイスを用いて病原菌に対する炎症反応やサイトカインへの応答など、実際に肺で起こる種々のプロセスを再現した研究結果を昨年 Science 誌 (vol.328, pp.1662-1668) に報告して以来、この分野への注目度が一層高まっている。しかしながら、現在検討されている培養モデルのほとんどが、肺、肝、腸などの消化呼吸器系を対象としており、眼などの特殊感覚器系に関する報告例はほとんど無い。

日本での失明原因の上位は新生血管が出現する糖尿網膜症や加齢黄斑変性、治療法の存在しない網膜色素変性などがある。加齢、酸素濃度、エネルギー代謝、圧、血流、遺伝子など様々な因子が発症に関わるが、これらの疾患の多くは短期間に一因子の関与だけで発症することは無いために治療法の開発が困難となっている。新しい治療法や薬剤の開発には、眼疾患の病態メカニズムを正確に理解することが必須であり、複雑で慢性的な病態を簡単に模擬できる培養モデルが極めて有用である。

2. 研究の目的

生体組織・臓器の構造や機能を模倣した新しい3次元培養モデル (Organ-on-a-Chip) が最近注目されてきており、肺、肝、腸などの消化呼吸器系組織を模倣する試みが盛んに検討されている。しかしながら、眼などの感覚器系に関するオンチップの培養モデルはほとんど例がない。そこで本研究では、マイクロ流路デバイス内に眼底組織を模倣した3次元培養系を構築し、細胞周囲環境の精密制御を行い、細胞への影響を調べる。失明疾患上位はすべて網膜疾患であり、慢性的な複雑な刺激が細胞障害に関わることから、今回の研究を足掛かりに失明上位疾患をチップ上にモデル化し、新しい治療法や薬剤スクリーニング法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

フォトリソグラフィを用いて、シリコン基板上に SU-8 のピラー (高さ 25 μm 、直径 10 μm) を 80 μm 間隔で作製した。この基板をフッ化シランで処理した後、ポリジメチルシロキサン (PDMS) のプレポリマーを流し込み、熱硬化させることで、10 μm の細孔のアレイを有するポラス化 PDMS 膜を得た。このポラス膜を、流路構造を造りこんだ PDMS モールドで挟み込み、2層流路構造を有する

デバイス (各流路のサイズは、幅 1 mm、高さ 100 μm) を作製した。ポラス膜の上下がそれぞれ細胞の培養面となっている。作製した流路デバイス内でヒト網膜色素上皮 (ARPE) 細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を灌流培養し、機能的・形態的な解析を行った。

4. 研究成果

流路デバイス内で ARPE 細胞を培養すると、ポラス膜上に ARPE 細胞のモノレイヤー組織が形成され、上皮に特徴的なヘキサゴナルな細胞形態が観察された。ポラス膜表面にナノスケールの凹凸を加えるとタイトジャンクションの形成が促進されることがわかった。また、生体 RPE 層と同様に、基底側への VEGF の極性分泌も観察され、低グルコース負荷を加えると、頂端側に比べ基底側への VEGF 分泌量が増加した。次に、HUVEC を流路内で培養すると、ポラス膜の細孔に細胞が侵入し反対側の面に遊走する様子が観察された。細胞培養面の反対側に VEGF を混合させた培養液を灌流すると、遊走する細胞が 3 倍程度増加し、HUVEC が VEGF に応答していることがわかった。続いて、ポラス膜の上下に ARPE 細胞と HUVEC をそれぞれ培養することで共培養系を構築することができた。今後、この共培養系を用いた両細胞間の相互作用評価や、RPE 層の機能低下を誘発する刺激を負荷することで病態モデルへの展開が期待できる。

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5件)

Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe, "A Polymeric Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats" Adv. Healthcare Mater. (2014)(in press). 査読有 doi:10.1002/adhm.201400114

Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Hojae Bae, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji, "Micropatterned polymeric nanosheets for local delivery of an engineered epithelial monolayer" Adv. Mater. 26, 1699-1705 (2014). 査読有 doi:10.1002/adma.201301300

Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe,

“A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye” *Acta Biomater.* 10, 680-687 (2014). 査読有 doi:10.1016/j.actbio.2013.11.004

Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe, “Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally-induced choroidal neovascularization” *PLoS ONE* 8, e58580 (2013). 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0058580

Amir M. Ghaemmaghami, Matthew J. Hancock, Helen Harrington, Hirokazu Kaji, Ali Khademhosseini, “Biomimetic tissues on a chip for drug discovery” *Drug Discov. Today* 17, 173-181 (2012). 査読有 doi:10.1016/j.drudis.2011.10.029

〔学会発表〕(計 25 件)

(1) 梶 弘和 (基調講演), “眼科領域におけるマイクロ・ナノ技術応用” 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 仙台, 2014 年 1 月 11, 12 日

(2) 梶 弘和, “マイクロ流体デバイスを用いる眼底組織培養モデルの開発” 日本動物実験代替法学会第 26 回大会, 京都テルサ, 2013 年 12 月 19~21 日

(3) Yoshinori Mori, Toshinori Fujie, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji, “Polymeric ultra-thin films for local delivery of cell monolayer” 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, USA, Dec. 16-20, 2013.

(4) Syuntaro Ito, Shunichi Tsunajima, Toshinori Fujie, Nobuhiro Nagai, Kuniaki Nagamine, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, “Development of a cell-based model of the ocular fundus within a microfluidic device” 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, USA, Dec. 16-20, 2013.

(5) 綱嶋俊一, 伊藤俊太郎, 藤枝俊宣, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “バルジ試験器機構を利用した上皮細胞への力学的負荷システムの開発” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 姫路, 2013 年 12 月 5, 6 日

(6) 森 好弘, 藤枝俊宣, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “ナノシートによる細胞輸送システムの開発” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 姫路, 2013 年 12 月 5, 6 日

(7) 伊藤俊太郎, 綱嶋俊一, 藤枝俊宣, 永井展裕, 長峯邦明, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “眼底組織モデル構築に向けたマイク

ロ流路デバイスの開発” 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 船堀, 2013 年 11 月 25, 26 日

(8) Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, Ali Khademhosseini, “Local delivery of engineered cell monolayer directed by micropatterned polymeric nanosheets” 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 船堀, 2013 年 11 月 25, 26 日

(9) 森 好弘, 藤枝俊宣, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “ナノシートを用いる細胞送達システムの開発” 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 船堀, 2013 年 11 月 25, 26 日 (ハイライト講演に選定)

(10) 伊藤俊太郎, 綱嶋俊一, 藤枝俊宣, 永井展裕, 長峯邦明, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “バルジ試験機構を用いた網膜色素上皮細胞評価システムの構築” バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学, 2013 年 10 月 8 日

(11) 森 好弘, 藤枝俊宣, 永井展裕, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “自己支持性ナノシートによる細胞輸送システムの開発” バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学, 2013 年 10 月 8 日

(12) Hirokazu Kaji, Toshinori Fujie, Yoshihiro Mori, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Ali Khademhosseini, Toshiaki Abe, “Retinal pigment epithelial cells supported by polymeric ultra-thin films for the subretinal delivery” International Soft Matter Conference 2013, Rome, Italy, Sept. 15-19, 2013.

(13) Toshinori Fujie, Hao Liu, Ken Nakajima, Hirokazu Kaji, Ali Khademhosseini, “Flexible nanomembranes for directing cellular organization” International Soft Matter Conference 2013, Rome, Italy, Sept. 15-19, 2013.

(14) Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nagai Nobuhiro, Yamamoto Kotaro, Saya Hideyuki, Kaji Hirokazu, Nishizawa Matsuhiko, Nakazawa Toru, Abe Toshiaki, “Protective effects of Clotrimazole against oxidative stress-induced cell death in RGC-5 cells and preparation of controlled release device” 第 29 回 DDS 学会学術集会, 京都, 2013 年 7 月 4, 5 日

(15) 伊藤俊太郎, 永井典裕, 長峯邦明, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “マイクロ流路デバイスを用いる眼底組織モデルの開発” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 27 回研究会, 仙台, 2013 年 5 月 23, 24 日

(16) 伊藤俊太郎, 永井典裕, 長峯邦明, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “マイクロ流路デバイスを用いた眼底組織モデルの開発” 電気化学会第 80 回大会, 仙台, 2013 年 3 月 29~31 日

(17) 伊藤俊太郎, 永井典裕, 長峯邦明, 西

澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “マイクロ流路デバイスを用いた眼底組織模倣チップの開発” 日本機械学会東北支部第48期総会・講演会, 仙台, 2013年3月15日(独創研究学生賞受賞)

(18) Hirokazu Kaji, Shuntaro Ito, Nobuhiro Nagai, Kuniaki Nagamine, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, “Development of a cell-based model of the retina within a microfluidic device” Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Tokyo, Dec. 10, 2012.

(19) 梶 弘和, “マイクロ流体デバイスを用いる眼底組織培養モデルの開発” 日本動物実験代替法学会第25回大会, 慶応義塾大学薬学部芝共立キャンパス, 2012年12月7~9日

(20) Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, “An implantable drug delivery device for treating retinal disorders” IEEE-EMBS Micro- and Nanoengineering in Medicine Conference, Maui, USA, Dec. 3-7, 2012.

(21) Toshinori Fujie, Hirokazu Kaji, Ali Khademhosseini, “Ultra-thin polymeric interface to engineer muscle tissues” IEEE-EMBS Micro- and Nanoengineering in Medicine Conference, Maui, USA, Dec. 3-7, 2012 (Poster award).

(22) 梶 弘和 (招待講演), “バイオファブリケーション技術の開発とオーガニックデバイスへの展開” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012, 仙台, 2012年11月26, 27日

(23) 伊藤俊太郎, 永井典裕, 長峯邦明, 西澤松彦, 阿部俊明, 梶 弘和, “マイクロ流路デバイスを用いる眼底組織培養モデルの開発” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012, 仙台, 2012年11月26, 27日

(24) Hirokazu Kaji (invited), “Biofabrication techniques for biologically relevant tissue models and drug delivery devices” 23rd 2012 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Nov. 4-7, 2012

(25) Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, “A controlled-release capsule device for transscleral drug delivery to the retina” μ TAS 2012, Okinawa, Japan, Oct. 28-Nov. 1, 2012.

〔図書〕(計4件)

Toshinori Fujie, Serge Ostrovidov, Samad Ahadian, S. Prakash Parthiban, Ali Khademhosseini, Hirokazu Kaji, “Bioinspired Muscle Tissue Devices” In Handbook of Biomimetics and Bioinspiration: 3 Volume Set, E. Jabbari,

A. Khademhosseini, L. P. Lee, D.-H. Kim, A. Ghaemmaghami Eds. (World Scientific Publishing, 2014) (in press).

Seila Selimovic, Hirokazu Kaji, Hojae Bae, Ali Khademhosseini, “Microfluidic systems for controlling stem cell microenvironments” In Microfluidic Cell Culture Systems, 2nd Edition, J. T. Borenstein, C. J. Bettinger, S. L. Tao, Eds. (Elsevier Publishing, 2014) (in press).

Tim Albrecht, Maarten P. de Boer, Frank W. DelRio, Mehmet R. Dokmeci, Cristoph Eberl, Junji Fukuda, Hirokazu Kaji, Chris Keimel, Ali Khademhosseini, MRS Symposium Proceedings Volume 1415, MEMS, BioMEMS and Bioelectronics - Materials and Devices, (Cambridge University Press, 2012), 221 pages.

Lamya Ghenim, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Xavier Gidrol, “Impedance sensing of biological processes in mammalian cells” In Integrated Biomaterials for Biomedical Technology, M. Ramalingam, A. Tiwari, S. Ramakrishna, H. Kobayashi, Eds. (Scrivener Publishing, 2012), pp. 293-308.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞担持パターン化ナノ薄膜
発明者: 梶 弘和, 藤枝俊宣, 森 好弘, 西澤松彦, 阿部俊明, 永井展裕
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-137253
出願年月日: 2013年6月28日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 弘和 (KAJI, HIROKAZU)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 70431525

(2) 研究分担者

阿部 俊明 (ABE, TOSHIAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90191858

永井 展裕 (NAGAI, NOBUHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30400039