

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560208

研究課題名(和文)ペリサイト被覆による安定化毛細血管構築の組織工学

研究課題名(英文)Tissue engineering on microvessel construction stabilized by pericyte covering

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マイクロ流体デバイスを用いて血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養を行い、ペリサイトに被覆され安定化された毛細血管の構築を実現することを目的とした。特に、毛細血管の形成過程におけるペリサイトの役割を明らかにすることや、最終的に構築したペリサイトに被覆された毛細血管の三次元的な構造を検討することに取り組んだ。その結果、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の相互作用を定量的に評価することで血管形成を促進する条件を見出し、ペリサイトの被覆によって安定化され、内腔の連続した毛細血管網を構築する組織工学的手法を確立した。この成果は血管網を含む三次元組織の再生を目指す組織工学において重要な足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, endothelial cells and mesenchymal stem cells were cocultured in a microfluidic device to construct stable microvasculature covered by pericytes. In particular, we investigated the role of pericytes in the process of vascular formation, and the three-dimensional structure of constructed microvascular networks covered by pericytes. We found culture conditions to promote capillary formation by quantitatively analyzing the interaction between endothelial cells and mesenchymal stem cells, and established a tissue engineering method for construction of stable microvascular networks covered by pericytes. These findings have an important implication for the development of tissue engineering to construct three-dimensional tissues including microvascular networks.

研究分野：生体組織工学

キーワード：血管新生 組織工学 三次元培養 ペリサイト マイクロ流体デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

現在、組織工学では毛細血管を含む三次元臓器の再生が国内外で大きな課題になっているため、毛細血管の再生・制御技術の確立は組織工学の発展のために極めて重要である。このような観点から研究代表者らは生体外における血管形成に取り組み、これまでの研究で、細胞外の力学的環境や低酸素状態、血管内皮前駆細胞などが毛細血管の形成に重要な役割を持つことを明らかにしてきた (Yamamura et al., Tissue Eng, 2007; Ueda et al., J Biomech Sci Eng, 2008; Koga et al., Tissue Eng Part A, 2009)。また、最近の研究では、血管形成過程の三次元イメージングに優れたマイクロ流体デバイスの開発に成功した (Chung et al., Lab Chip, 2009; Adv Mater, 2009)。さらに、このデバイスを用いて肝細胞と血管内皮細胞の共培養を行うと毛細血管の形成が促進されることを見出した (Sudo et al., FASEB J, 2009)。これらのマイクロ流体デバイスを用いた三次元培養法は Nature Protocols 誌の表紙にも掲載され (Shin et al., 2012) 工学的手法を用いた新しい三次元培養法として期待されている。さらに、研究代表者らは、このマイクロ流体デバイスを用いた血管形成の検討実験を重ね、連続した内腔を有する毛細血管網を再構築することが可能になった。

以上のように研究代表者らは長年に渡り毛細血管を形成させる技術を培ってきたが、次の段階として再生血管を長期間維持・安定化させる研究に展開する必要性を認識するに至った。生体内では毛細血管を外側から包み込み、血管の構造と機能を安定化する周皮細胞(ペリサイト)が存在する。したがって、長期間安定かつ機能的な毛細血管を構築するためには、マイクロ流体デバイスを用いた血管形成の三次元培養モデルにペリサイトを導入する必要がある。現在のところペリサイトを分離・培養する方法が確立されていないが、間葉系幹細胞がペリサイトに分化することが報告されている。そこで、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養を行うことで、血管内皮細胞が毛細血管を形成する一方で、間葉系幹細胞がペリサイトに分化し、最終的にペリサイトに被覆された毛細血管を構築しようとする着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、マイクロ流体デバイスを用いて血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養を行い、微小培養環境を制御することで、ペリサイトに被覆され安定化した毛細血管の構築を世界に先駆けて実現することを目的とした。また、構築された安定化毛細血管の形成過程におけるペリサイトの役割を明らかにすることに取り組んだ。さらに、最終的に構築したペリサイトに被覆された毛細血管について、その三次元的な構造を詳細に検討した。特に、間葉系幹細胞を時間的および空間

的に制御して血管形成モデルに加えることによって、安定化毛細血管を構築できる最適な培養条件を検討した。その際、血管形成のプロセスを詳細に解析することによって、血管内皮細胞とペリサイトの相互作用を定量的に解析した。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の5つのステップに従って段階的に研究を進め、最終的にペリサイトに被覆された機能的な毛細血管網の構築に取り組んだ。その際、マイクロ流体デバイスを用いることによって細胞配置や導入時期を精密に制御し、血管形成のプロセスを可視化・モニタリングした。さらに、共焦点顕微鏡画像を解析することによって、血管形成を定量的に評価した。

ステップ マイクロ流体デバイスの作製と血管形成モデルの構築

ステップ 血管形成モデルへの間葉系幹細胞の導入: 細胞配置の検討

ステップ 血管形成モデルへの間葉系幹細胞の導入: 導入時期の検討

ステップ ペリサイト被覆毛細血管の構造解析

ステップ ペリサイト被覆毛細血管の構築プロセスにおける間質流の影響

## 4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスの作製と血管形成モデルの構築

安定化毛細血管の形成に必要なマイクロ流体デバイスを設計し、ソフトリソグラフィ法によって作製した。マイクロ流体デバイスは、微細加工を施したシリコンウエハを鋳型としてマイクロ流路パターンを転写したシリコンゴム (PDMS) にカバーガラスをプラズマ接着することによって作製した(図 1)。マイクロ流体デバイスには平行な2つのマイクロ流路があり、その間にコラーゲンを配置したデザインとした。血管内皮細胞は流路表面に露出したコラーゲンに接着し、培養液に血管新生因子を添加することで、血管内皮細胞がコラーゲンに侵入し、コラーゲン内部で毛細血管網を形成した。このとき、ゲルの組成についてコラーゲン単独だけでなく、フィブリンおよびコラーゲンとフィブリンの混合についても検討し、血管形成において最適な混合比率を見出した。

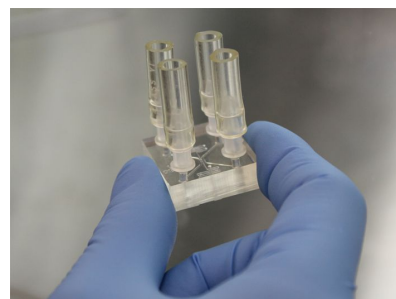


図 1 作製したマイクロ流体デバイス

## (2) 血管形成モデルへの間葉系幹細胞の導入：細胞配置の検討

生体外血管形成モデルを作成する際、間葉系幹細胞を追加するマイクロ流路を変更することで、血管形成の観点から毛細血管網を形成している血管内皮細胞と間葉系幹細胞の相対的な位置関係について検討した。すなわち、血管内皮細胞と反対側のマイクロ流路に間葉系幹細胞を追加する場合と、同じ側の流路に追加する実験を行った。その結果、後者の条件において、より伸長する安定化毛細血管網が構築されることを見出した。すなわち、間葉系幹細胞が毛細血管の外側からアプローチするのではなく、血管の内側からアプローチする方が、毛細血管を構築する上で優れていた。さらに、検討を重ねた結果、ゲルの組成やゲル領域の大きさを変更することで、血管内皮細胞と反対側のマイクロ流路に間葉系幹細胞を追加する場合においてもペリサイトに被覆された毛細血管網を構築することに成功した。

## (3) 血管形成モデルへの間葉系幹細胞の導入：導入時期の検討

間葉系幹細胞と血管内皮細胞を播種するタイミングについて検討し、培養の開始段階から同時に播種した方が血管形成を安定して誘導しうることを明らかにした。すなわち、培養初日に間葉系幹細胞を追加した条件では、培養7日目において血管内皮細胞が毛細血管網を形成し、間葉系幹細胞はペリサイトに分化し、毛細血管に沿って存在していた（図2A）。一方で、血管内皮細胞がある程度血管を形成した培養3日目の段階で間葉系幹細胞を追加した条件では、間葉系幹細胞を追加する前に形成されていた毛細血管網が崩壊する現象が観察された（図2B）。

また、間葉系幹細胞と血管内皮細胞の接触状態が、血管形成プロセスにおいて重要な役割を持つことを見出した。

## (4) ペリサイト被覆毛細血管の構造解析

これまでの実験によって決定された条件においてペリサイトに被覆された毛細血管が構築されることを立証した。特に、共焦点レーザー顕微鏡による血管構造の三次元的な解析を行い、内腔の連続した毛細血管が構築されていること、および間葉系幹細胞から分化したペリサイトが毛細血管を外側から被覆し血管を安定化することで少なくとも3週間は培養可能であることを確認した（図3）。さらに、両細胞の相互作用によって形成される血管径が異なることを見出した。

## (5) ペリサイト被覆毛細血管の構築プロセスにおける間質流の影響

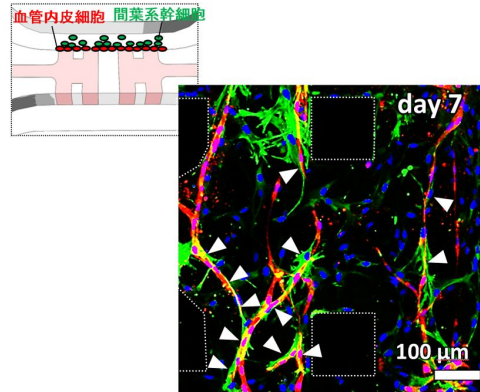
間質流を負荷すると血管の安定化が促進されるため、血管形成の初期段階では間質流を負荷しない条件の方が、血管形成が促進されることを見出した。

## (6) まとめ

研究期間全体の成果をまとめると、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の相互作用を定量的

に評価することで血管形成を促進する条件を見出し、ペリサイトの被覆によって安定化された毛細血管網を効率よく構築する組織工学的手法を確立した。この成果は血管網を含む組織再生を目指す組織工学において重要な足がかりとなる。

### A 培養初日に間葉系幹細胞を追加



### B 血管形成後に間葉系幹細胞を追加

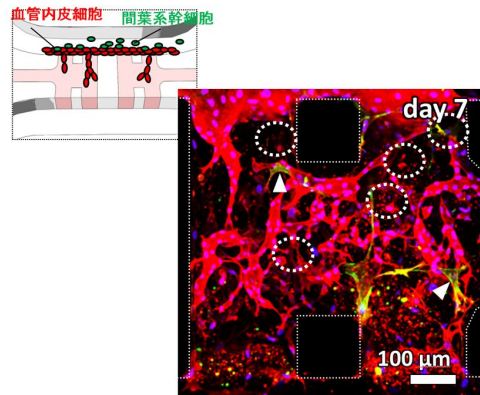


図2 血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養における細胞配置の検討。培養7日目に細胞を固定し、免疫蛍光染色を行い血管構造を可視化した。A: 培養初日に間葉系幹細胞を血管内皮細胞と同じ流路に追加した。B: 血管形成後（培養3日目）に間葉系幹細胞を追加した。矢頭は、ペリサイトに分化した間葉系幹細胞、点線は崩壊した血管を表す。

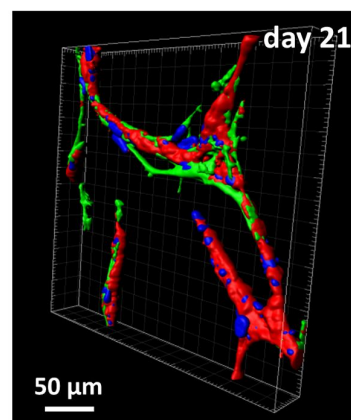


図3 本研究において構築された培養21日目の安定化毛細血管。赤：血管内皮細胞、緑：ペリサイト、青：細胞核。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Ryo Sudo, Multiscale tissue engineering for liver reconstruction, Organogenesis, 査読有, vol. 10, 2014, pp. 216-224

DOI: 10.4161/org.27968

須藤 亮, MEMS 技術を応用した再生工学、日本機械学会誌、査読無、117 巻、2014、pp. 24-27

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, 査読有, vol. 8, 2013, pp. 114-128

DOI: 10.1299/jbse.8.114

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, 2013, 査読有, vol. 27, pp. 38-48

DOI: 10.1007/s12573-012-0056-5

須藤 亮, 流れ刺激による血管ネットワーク形成のイメージング解析、日本血栓止血学会誌、査読無、24 巻、2013、pp. 576-581

Yoshinori Abe, Yoshiyuki Ozaki, Junichi Kasuya, Kimiko Yamamoto, Joji Ando, Ryo Sudo, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor, PLoS One, vol. 8, e82085, 2013

DOI: 10.1371/journal.pone.0082085

その他 4 件

〔学会発表〕(計 20 件)

上森寛元、谷村耕平、須藤亮、血管形成開始における血管内皮細胞と間葉系幹細胞の相互作用の影響、第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 19~21 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

谷村耕平、上森寛元、須藤亮、間葉系幹細胞と血管内皮細胞の相互作用による血管形成の開始、日本機械学会 第 27 回バイオエンジニアリング講演会、2015 年 1 月 9~10 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Hiroyuki Uwamori, Kohei Tanimura, Ryo Sudo, HUVEC-MSC interactions in the initiation of capillary network formation, IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC) Micro and nanotechnology in medicine conference (MNMIC) 2014, 2014 年 12 月 8~12 日, Kahuku (USA)

Ryo Sudo, Multiscale liver and vascular

tissue engineering, 17th Biomechanics Seminar, 2014 年 11 月 14 日, 京都大学再生医科学研究所(京都府京都市)

Ryo Sudo, Yoshinori Abe, Saki Menjo, Kazuo Tanishita, Capillary formation under interstitial flow in a microfluidic device for liver tissue engineering, 2014 BMES (Biomedical Engineering Society) annual meeting, 2014 年 10 月 22~25 日, San Antonio (USA)

上森寛元、谷村耕平、須藤亮、マイクロ流体デバイスを用いた細胞及び増殖因子位置制御による毛細血管網再構築の検討、日本機械学会年次大会、2014 年 9 月 7~10 日、東京電機大学(東京都足立区)

Ryo Sudo, Hiroyuki Uwamori, Kohei Tanimura, Yoshinori Abe, Kazuo Tanishita, Reconstruction of microvascular networks in a microfluidic device, 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 2014 年 9 月 1~4 日, Shima Kanko Hotel The Classic (三重県志摩市)

Hiroyuki Uwamori, Ryo Sudo, Effect of unidirectional VEGF supply on the formation of capillary networks with pericytes in a microfluidic device, 7th World Congress of Biomechanics, 2014 年 7 月 6~11 日, Boston (USA)

Ryo Sudo, Yoshinori Abe, Kohei Tanimura, Hiroyuki Uwamori, Kazuo Tanishita, The effect of interstitial flow on the formation of microvascular networks in a microfluidic device, The 18th International Vascular Biology Meeting 2014, 2014 年 4 月 14~17 日, Miyakomesse (京都府京都市)

須藤 亮, MEMS 技術を利用した血管複合組織の再生、第 2 回イノバイオ研究会セミナー「生体組織再生研究の最前線」、2013 年 10 月 21 日、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)

Kohei Tanimura, Kyoko Yamamoto, Ryo Sudo, Effect of interstitial flow on reconstruction of capillary networks in HUVEC-MSC coculture, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2013 年 7 月 3~7 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

その他 8 件

〔その他〕

慶應義塾大学理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

(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