

課題番号 50

流体デバイス organ-on-a-chip を利用した血管内皮最終分化モデルの開発

〔1〕組織

代表者：梨本 裕司

(東京科学大学 生体材料工学研究所)

対応者：鈴木 隆哉

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 88,870 円, 旅費 41,130 円

〔2〕研究経過

【目的】

多能性幹細胞(iPS/ES 細胞)や組織幹細胞によって *in vitro* 再生された組織・臓器が実際に生体内で機能するためには、コンストラクトを維持するための成熟した血管網が必須である。とくに臓器機能を担う実質細胞（例：肺上皮細胞・肝細胞・腎尿細管細胞など）とのインターフェイスとなる毛細血管内皮細胞は、臓器の栄養維持・酸素供給・代謝産物のクリアランスに適した細胞形態へ分化している。例えば肺毛細管細胞は効率的なガス交換のために極めて薄い細胞質(1 μ m)を持っていながら、肺胞空間を維持するために極めてタイトな細胞間接着能を持っている。一方で肝類洞血管内皮細胞は肝臓で代謝される高分子を大量に吸収・排泄するために内皮細胞自体に物理的な「窓」が開いている。

このような最終分化を *in vitro* で再現することは初代血管内皮培養細胞をもってしても成し遂げられていない。培養細胞はおおむね増殖能が高く、細胞分裂のために多くの細胞内器官が動員され豊富な細胞質を持っている。しかし最終分化した血管内皮細胞は増殖を止め、細胞間接着をタイトに形成し、血液細胞・高分子・ガスの輸送・交換のために菲薄化する必要がある。

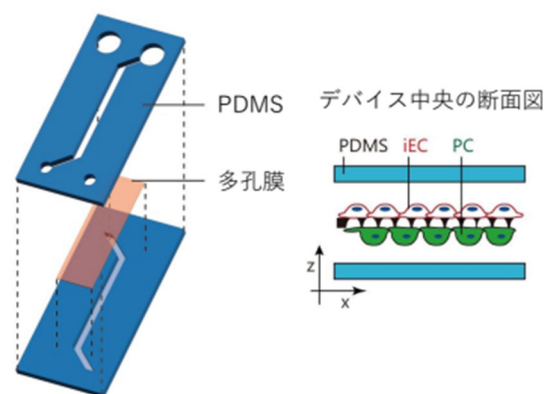
加齢研受け入れ研究者の鈴木隆哉助教は肺の組織工学・再生医療に関する研究を行っており、とくに臓器の脱細胞化マトリックスに肺実質細胞を定着させ肺を再生するプロジェクトに携わっている。この研究で大きな壁となっているのが、脱細胞化肺の完全な再血管化である。鈴木助教はすでにヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いてマウス脱細胞化肺の再血管化を達成

し、そのマウス同所性移植に成功している。しかし肉眼的な血流は十分と思われたものの、電子顕微鏡レベルでは血管内皮細胞の成熟は全く得られておらず、*ex vivo* 培養環境のさらなる洗練が必要となっている。

私はこれまで流体デバイス Organ-on-a-chip(OOC)を用いて、血管内皮と様々な組織細胞との共培養技術の開発に携わってきた。OOC は生体組織の 3D 環境を PDMS 器材の比較的単純化されたプレート上のデバイスへ抽象化し、実際の生体内で細胞にもたらされる物理的なシグナル（圧・応力等）を再現するものである。また多孔膜を介した共培養も可能であり、大型臓器のマイクロ環境をより観察しやすい形で再現することができる。

(下図)

デバイス①



本研究では私が開発している流体デバイスと、鈴木助教が開発している組織エンジニアリングプラットフォームを統合し、培養細胞注入後の血管内皮成熟に必要な環境・分子シグナルを明らかにすることを目的としている。成熟細胞は概ね分裂を停止して G0 細胞周期となっている。まず正常な細胞周期停止が得られる環境を静的培養環境・流体デバイス環境で明らかにし、これを脱細胞化肺プラットフォームで検証する。

本研究ではまず 2D 環境で血管内皮細胞を培養し、下記の増殖停止・細胞分化シグナルを与える。これにより起こる細胞形態の変化をレーザー顕微鏡および電子顕微鏡で計測する。これらのシグナルはいくつか

の時間・強度を比較検討する。形態とともに1細胞あたりの核酸量・タンパク量を定量し、細胞ボリュームの変化を推定した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

① 血清除去モデル

血清除去は血管内皮細胞を含む様々な培養細胞の細胞周期を停止させる作用があることが知られている

(Nosedá M., et al., 2004)。HUVEC等を血管内皮用培地 (EGM2 および iPS 血管内皮誘導培地) により培養し、Supplement の血清を除去した培地で 12・24 時間培養し細胞周期を停止させる実験を行った。細胞の停止は 36 時間程度で得られ始めたが、細胞剥離がみられ、十分なサンプルを得られなかった。

② 分裂阻害モデル

ドキシソルビシン(2・8 μ M)やマイトマイシン(10 μ g/mL)は細胞周期を停止する化合物として広く用いられている。血管内皮細胞をこれらの薬剤に暴露し細胞周期を停止させた。分裂停止が得られたが、細胞形態が線維芽細胞用となり、細胞老化の影響が疑われた。

今後はこれらのモデルの条件を整え、とくに飢餓状態ではなく低血糖培地などを作成して細胞死が誘導されないような条件を検討する。

デバイスの開発については私が行い、細胞培養モデルについては加齢医学研究所で鈴木が行っている。オンライン会議により2ヶ月に1度程度定期的な進捗状況の確認や結果の共有、計画の策定を行っている。

(3-2) 波及効果と発展性など

臓器エンジニアリングは再生医療の究極の目標であり、非常に注目度が高い。加齢研担当者の鈴木は動物肺にヒト細胞を移植して血管再生をおこない、また動物に再移植する実験に成功し大きな注目をあつめた。今後移植可能な再生臓器開発へむけて大きな進展を図るべく、本研究の成果を利用できると考える。

[4] 成果資料

なし