

補助事業番号 2022M-202

補助事業名 2022年度 光刺激によるOrgan-on-a-Chipへの血管網構築 補助事業

補助事業者名 立教大学 理学部 化学科 佐々木研究室 佐々木直樹

## 1 研究の概要

### 2 研究の目的と背景

近年、微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイス上に生体組織のモデルを構築する「Organ-on-a-Chip」の研究が盛んに取り組まれている。これらの研究ではまず、数センチ角の基板上に径がマイクロメートルスケールの流路を形成する。次にその流路内へ、生体組織を構成する種々の細胞や生体材料を、生体内における環境や空間配置等を考慮して組み込む。これにより、従来の研究で用いられる培養皿等に比べ、実際の生体組織に近い状況を、生体外で構築できる。

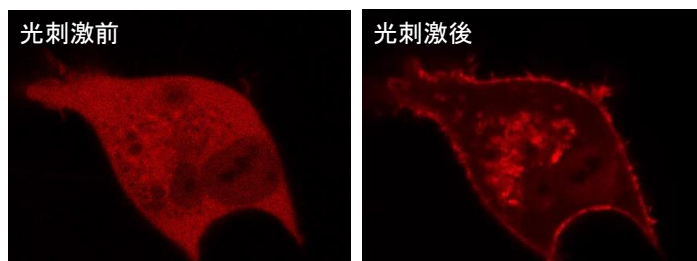
Organ-on-a-Chipの研究において重要と考えられている技術の一つは、実験的に構築した疑似生体組織に、血管網を形成する技術であるが、発展途上である。現状では、血管壁を構成する血管内皮細胞に化学物質をふりかけて血管新生と呼ばれる現象を促し、血管に類似した構造をランダムに形成している。従って、血管密度が十分ではなく、良好な培養環境を構築できない。

本研究では、制御された血管網構造をもつOrgan-on-a-Chipの構築法の開発に取り組んだ。補助事業者らが独自に開発してきた、多孔膜を有するマイクロ流体デバイスをプラットフォームとし、そこに光刺激による血管新生技術を組み合わせることを目的として検討を進めた。

### 3 研究内容

#### (1) 光応答性血管内皮細胞の樹立 ([https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n\\_sasaki/jka.html](https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n_sasaki/jka.html))

光で刺激することで血管内皮細胞の運動性を制御することを目指して研究を進めた。細胞の運動性促進に重要な分子の局在を光で操作するためのプラスミドDNAを作製し、これを運動性の低い培養細胞に遺伝子導入した。この細胞に光を当てたところ、上述の分子が局在化し、細胞の運動性も上昇することを見いだした。

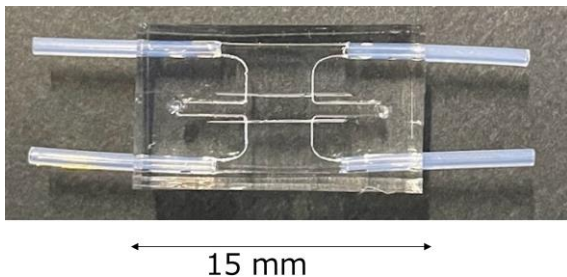


光刺激前後のAktの局在変化

## (2) 血管網構造のためのOrgan-on-a-Chipの作製

([https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n\\_sasaki/jka.html](https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n_sasaki/jka.html))

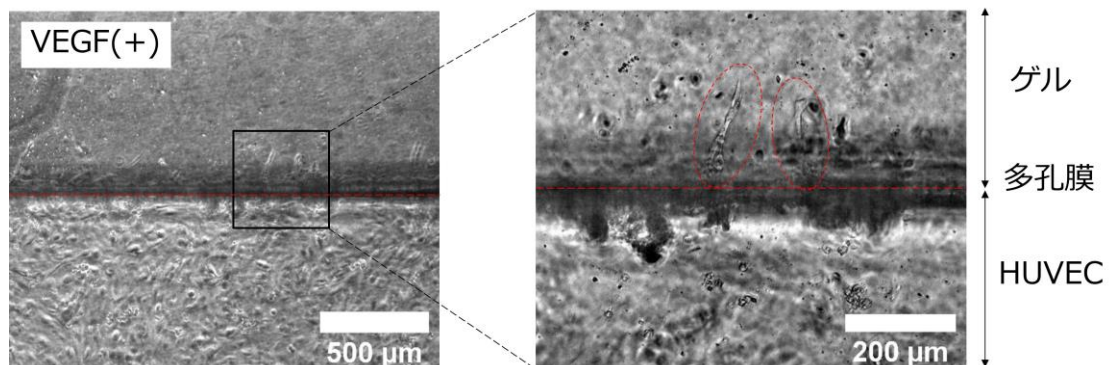
血管新生の出発点となる血管内皮細胞層を有し、細胞の光刺激とその後の顕微観察を異なる方向から実現可能なOrgan-on-a-Chipを作製した。アクリル板をレーザー加工して鋳型を作製し、これをポリジメチルシロキサン(PDMS)でかたどって、マイクロ流路パターンを有する基板を得た。流路パターンをもたない別の基板と接合したのち、市販のセルカルチャーインサートから切り出した多孔膜を基板に対して垂直に組み込んだ。最後に基板の側面にカバーガラスを接合することで、血管内皮細胞層の足場となる多孔膜を有し、かつ直交する二方向からの顕微観察が可能なマイクロ流体デバイスを作製した。デバイスの流路内に血管内皮細胞HUVECの懸濁液を導入・培養してOrgan-on-a-Chipとした。2日間培養したのちに生死アッセイを行い、培養後の細胞染色と蛍光観察が可能であることを確認できた。当初の実験手順やデバイスデザインでは、膜上への細胞播種に必要な細胞懸濁液の量が多い、低倍率の対物レンズしか観察に使用できないなどの問題があったが、実験手順およびデバイスデザインを改良することで解決できた。



マイクロ流体デバイスの光学像

## (3) 光刺激による血管新生の実証 ([https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n\\_sasaki/jka.html](https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n_sasaki/jka.html))

上記(2)で作製したマイクロ流体デバイスに上記(1)で樹立した細胞を組み込んだOrgan-on-a-Chipにおいて、まずは血管新生を誘起できることを示すために、化学刺激による血管新生実験に取り組んだ。2枚の多孔膜を境界として3本の流路が並んだデバイスを用い、中央の流路には血管周囲の構造を模したフィブリンゲルを組み込み、これをはさんで一方の流路の膜上にHUVECを培養したのち、もう一方の流路に血管内皮増殖因子VEGFの溶液を導入して、VEGFの濃度勾配を形成した。3日間培養ののちにChipを観察し、位相差像から出芽数を求めた。その後、光刺激による血管新生実験に取り組んだ。化学刺激による血管新生実験では、100 ng/mLのVEGF溶液を用いたところ、出芽が確認された。VEGFを含まない溶液を用いた対照実験を行い、出芽数を比較したところ、有意な差が見られたことから、VEGFにより血管新生が誘起されていること、および申請者が独自に開発してきている多孔膜を有するChip上での血管新生実験が可能であることを実証できた。



VEGF存在下での出芽の様子

#### 4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究は創薬分野への応用が期待される。Organ-on-a-Chipは動物実験の代替法として着目されており、新薬開発の低コスト化や倫理的問題の回避が期待できる。十分な血管網を有するOrgan-on-a-Chipを開発することで、実際の生体組織に近い環境を生体外で作り出し、薬物候補物質の性能を的確に評価できると考えられる。

#### 5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

補助事業者はこれまでに様々なOrgan-on-a-Chipの開発に取り組んできたが、本研究で開発した手法は、それらの研究に共通して活用でき、Organ-on-a-Chipの高度化を実現するものである。今後の研究において積極的に本手法を活用し、研究の深化と実応用への展開を目指して検討を進めていきたい。

#### 6 本研究にかかわる知財・発表論文等

##### 【学会発表】

- 1) Organ-on-a-Chip with vertically arranged porous membranes  
Naoki Sasaki (招待講演)  
Pittcon 2023, Pennsylvania Convention Center, 2023/03/18-22
- 2) 多孔膜垂直配置マイクロ流体デバイスによる血管新生モデルの構築  
加藤はる香、佐々木直樹  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第47回研究会、東北大学川内キャンパス、2023/05/13-14

## 7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし

## 8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 立教大学理学部(リッキョウダイガクリガクブ)

住 所: 〒171-8501

東京都豊島区西池袋3-34-1

担 当 者: 教授 佐々木直樹(ササキナオキ)

担 当 部 署: 化学科 佐々木研究室(カガクカ ササキケンキュウシツ)

E - m a i l: n\_sasaki@rikkyo.ac.jp

U R L: [https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n\\_sasaki/index.html](https://www2.rikkyo.ac.jp/web/n_sasaki/index.html)