

補助事業番号 2022M-271

補助事業名 2022年度 複合的な力学刺激によるin vitro血管組織成熟の可視化 補助事業

補助事業者名 慶應義塾大学 理工学部 尾上弘晃

1 研究の概要

本事業の目的は、力学刺激による応答をリアルタイムに可視化が可能なin vitro血管組織モデルを構築し、成熟化した血管組織の形成の実現とその成熟化メカニズムを理解することである。これにより、血管に起因する難病を患う患者への移植医療による治療や、薬の開発コストの削減に貢献する。

2 研究の目的と背景

生体内において、血管組織は血流による流れのせん断力や筋肉による伸展刺激など、様々な力学的刺激を複合的に受けている。このような刺激は、血管組織の発生・成長・修復などの形態維持に欠かせないだけでなく、腫瘍は血栓などの病態とも関連があるとされ、血管組織の動態メカニズムの理解のために極めて重要であると認識されている。この力学刺激に細胞が応答するメカノトランスダクションと呼ばれる現象は、近年では再生医療や薬物試験を目的としたin vitroでの血管組織構築でも重要視されており、その理解が医学の発展に大きく貢献されると期待されている。しかしながら、生体内において血管は血流から受けるせん断刺激や筋肉から受ける伸展刺激などの力学刺激を複合的に受容しており、その複雑な血管周辺環境のin vitroでの再現が困難であることから、このメカニズムの多くはまだ未解明である。それ故、in vitroでの成熟化した血管組織の構築はいまだ達成されていないのが現状である。

そこで本研究では、力学刺激によるin vitro血管組織の応答をリアルタイムに可視化が可能なorgan-on-a-chipモデルを構築し、成熟化した血管組織の形成とその成熟化メカニズムの理解を目的とする。具体的には、細胞外マトリクス(ExtraCellular Matrix, ECM)で構成された伸展および灌流可能なマイクロ流体システムを提案する。本研究では、ECMマイクロ流路の作製のために3Dプリンタで印刷された水溶性犠牲層を用いることで、ECM内に分岐を有する複雑な流路を簡便に作製可能であり、生体内の複雑な血流が生み出すせん断応力の再現が可能である。さらにマイクロ流体システムを伸展装置につなぐことで、流路内に3次元培養した細胞に対して、流体せん断刺激と伸展刺激の同時に負荷することが可能であり、筋肉による外的な力学伸展や収縮を再現する。これらのシステムを顕微鏡上に設置することで、複合的な力学刺激に対する細胞応答を単一細胞レベルで顕微鏡観察可能とし、組織の形態変化および成熟化の現象をタンパク質発現などの分子的なレベルでリアルタイムに追跡可能である。

3 研究内容

① ECMマイクロ流路の作製条件の検討

細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) の一つであるゼラチン (熱変性コラーゲン) を架橋したTGゼラチンとシリコーン (polydimethylsiloxane: PDMS) を用いて、3Dプリンティングによりつくられたポリビニルアルコール (PVA) を水溶性モールドとして利用し、ECMによるin vitro分岐血管モデルを作製した (SRS-molding法として新規作製手法を開発) (図1)。

これらマイクロ流路に対し長時間の灌流を行うため、チェックバルブを用いてシリンジポンプのスイッチングによる灌流システムを構築した (図2)。さらに拍動流の理論的な解析をするため、数値計算のモデルの構築も行った。

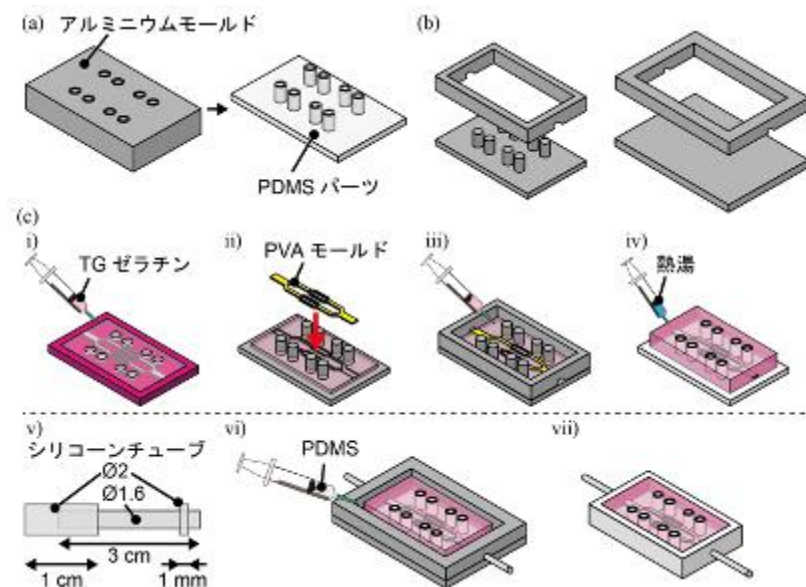


図1 SRS-molding法によるin vitro血管モデルの作製プロセス

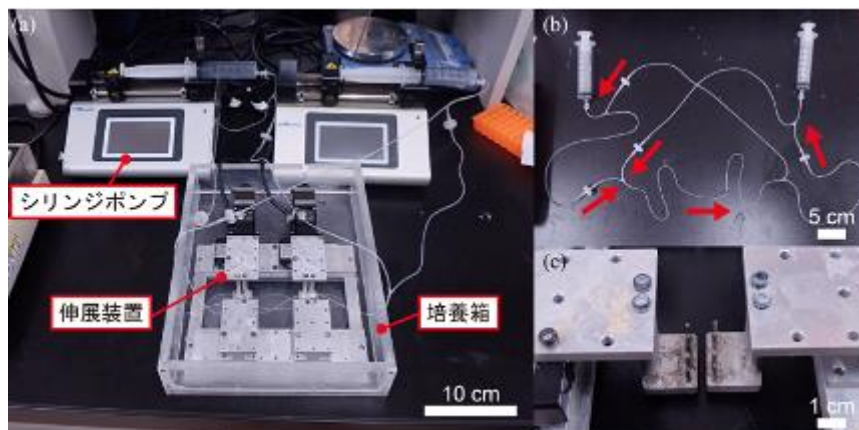


図2 構築した伸展・灌流培養システムの写真

② 力学刺激に対する血管内皮組織の特性評価

流れによるせん断力と、機械的変形による引張刺激，それぞれによる血管内皮組織の応答を評価するために，PDMSで作製したストレッチチャンバと，チャンネルスライドを用いて血管内皮細胞を伸展刺激下と流体せん断刺激下で培養した。

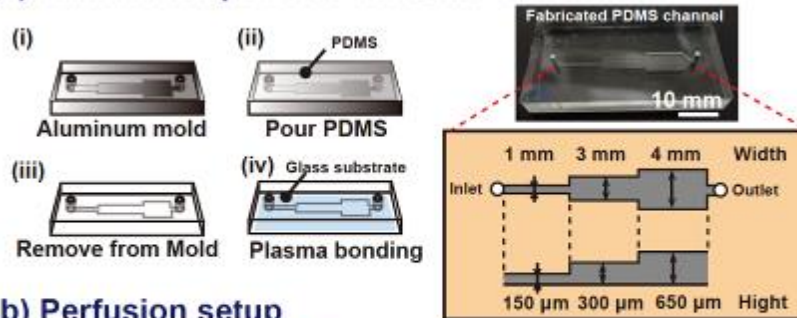
③ 複合的な力学刺激への血管内皮組織の応答確認

作製したECMによるin vitro血管モデルを用いて，複合力学刺激下で血管内皮細胞を培養し，qPCRによって力学刺激による遺伝子発現を評価した。

④ 組織応答のリアルタイム観察による力学刺激と血管成熟化の機序解明

血管の分岐点や静脈弁の損傷部位で発生する渦流や逆流は，アテローム血栓症や静脈瘤などの血管疾患などの原因となっており，単純なせん断応力ではなく，

(a) Fabrication process of PDMS channel



(b) Perfusion setup

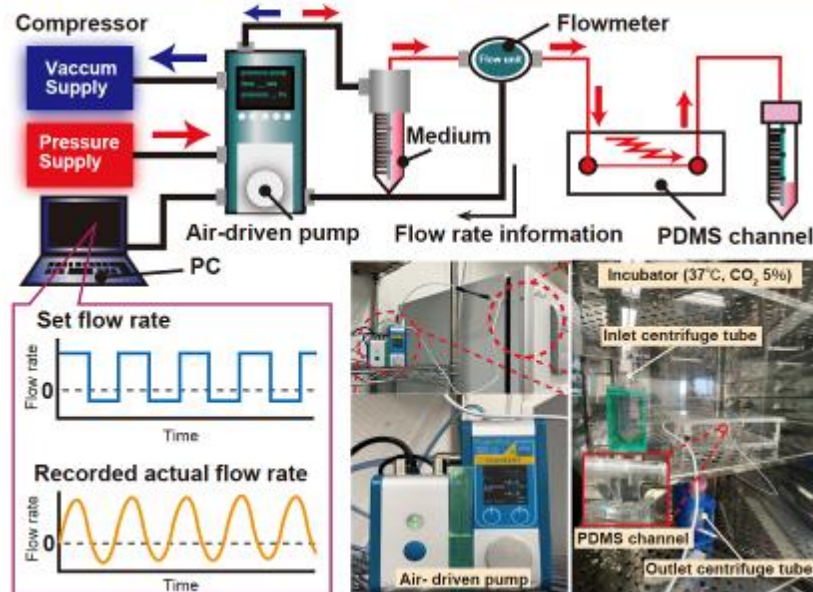


図3 BFOSSを印加する実験システム

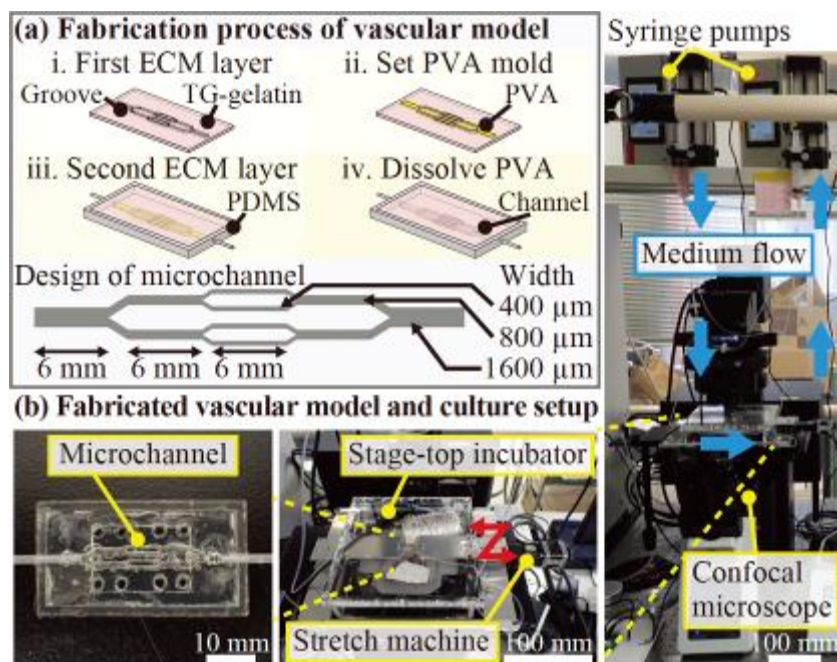


図4 力学刺激培養可能なリアルタイムイメージング

拍動流や、逆流振動流など乱流が重要と言われている。したがって、乱流の中でも前後振動流BF0SSに注目し、圧力制御ポンプを使用して血管内皮細胞にBF0SSを適用する培養システムを構築し、血管挙動のメカニズムを解明することを目的とした（図3）。拍動流を印加するためのPDMS流路は、アルミニウム型に硬化させたPDMS樹脂をプラズマ処理によりガラス基板に接着して作製した。灌流培養のセットアップのために、流量計を圧力制御ポンプ装置に接続し、リアルタイムフィードバック制御を行う培養システムを組み立てた。圧力駆動の流量はPCのソフトウェアで設定し、設定された剪断応力と流れを適用するために流量とサイクルを設定した。

また、灌流および伸張下のトランスグルタミナーゼ架橋ゼラチン流路による分岐血管モデルにおいて、内皮細胞の挙動をライブイメージングするシステムを構築した。分岐血管モデルは共焦点顕微鏡上に構築されており、機械的伸展刺激および流れによるせん断応力刺激を内皮細胞（EC）をに与えつつ、蛍光タイムラプス観察を可能とする。分岐血管モデルはポリビニルアルコール（PVA）を溶解して成型することにより作製した（図4）。

成果を公表している研究室ホームページ (<http://www.onoe.mech.keio.ac.jp/index-j.html>)

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

どのような力学刺激を与えることがin vitroにおける血管組織の成熟化に必要であるかの知見を世に与えることで、(i) 成熟化した血管(動脈や静脈弁など)を人工的に構築し患部に移植することで、血管に起因する難病を移植医療により治療することが可能となる。また、(ii) 成熟化した血管に対して薬物試験を実施することにより、難病に対しての薬の開発期間とコストの大幅な削減をもたらす、最新の治療薬が早く安く患者の元に届くようになることに貢献する。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者の専門である微細加工技術およびマイクロ流体技術を、in vitroの血管組織モデルの解析技術へと展開した研究プロジェクトである。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

1. 村松淳平, **尾上弘晃**, ”工学的アプローチによる生体組織構築”, 機械の研究, 養賢堂, Vol. 73, No. 5, pp. 334-342, May 5, 2021.
2. Hayate Yamamoto, Jumpei Muramatsu, Shigenori Miura, **Hiroaki Onoe**, “Microfluidic perfusion culture device that applies multiple degrees of shear stress and various flow types,” The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (microTAS 2023), Katowice, Poland, Oct. 15-19, 2023.
3. Hayate Yamamoto, Jumpei Muramatsu, Shun Itai, Shigenori Miura, **Hiroaki Onoe**, “In vitro vascular model capable of backflow to elucidate the relationship between oscillating shear stress and non-diurnal dysfunctioncity analysis with microfiber-shaped cardiac tissue,” Cardiovascular Bioengineering (CVBE) Symposium 2023, Kyoto, Japan, May. 29-31, 2023.
4. Jumpei Muramatsu, Azusa Shimizu, Michinao Hashimoto, Shigenori Miura, **Hiroaki Onoe**, “In vitro branched vascular model capable of reproducing biomimetic pulsatile flow,” Cardiovascular Bioengineering (CVBE) Symposium 2023, Kyoto, Japan, May. 29-31, 2023.
5. Hayate Yamamoto, Jumpei Muramatsu, Shun Itai, Shigenori Miura, **Hiroaki Onoe**, “In vitro vascular model with mechanically induced backflow for elucidation of venous disease,” The 18th Annual International Conference on Micro/Nano Engineered and Molecular Systems (NEMS 2023), Jeju, Korea, May. 14-17, 2023.
6. 村松淳平, 清水あずさ, 橋本道尚, 三浦重徳, 尾上弘晃, ”分岐血管モデルを用いた複合力学刺激に対する血管内皮細胞のタンパク質発現分布解析,” 第 62 回日本生体医工学会大会 2023, 名古屋, May 18-20, 2023.
7. 山本颯, 村松淳平, 三浦重徳, 尾上弘晃, “血管内皮機能解析のための複数のせん断応力を連続的に印可可能なコラーゲン製血管モデル” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 48 回研究会, 熊本, Nov. 6-8, 2023.
8. 山本颯, 川原光稀, 三浦重徳, 尾上弘晃, “力学刺激応答解析のための in vitro コラーゲン血管モデル,” 日本機械学会 第 13 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 徳島, Nov. 14-16, 2022.

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

<http://www.onoe.mech.keio.ac.jp/JKA2024.pdf>

(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： 慶應義塾大学理工学部学部

(ケイオウギジユクダイガウ リコウガクブ)

住 所: 〒223-8522

神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1

担 当 者: 教授 尾上 弘晃(オノエ ヒロアキ)

E - m a i l: onoe@mech.keio.ac.jp

U R L: <http://www.onoe.mech.keio.ac.jp/index-j.html>