

補助事業番号 2024M-469

補助事業名 2024年度 ポンプレスマイクロ灌流細胞培養デバイスの開発 補助事業

補助事業者名 慶應義塾大学 理工学部 システムデザイン工学科 山下 忠紘

1 研究の概要

本研究は、管腔状の培養空間、拍動流、高スループット性を兼ね備える、マイクロ流体デバイスとウェルプレートを組み合わせた、新しい血管組織培養技術を開発しました。本技術は、立体的な血管組織の構築を課題とする再生医療・組織工学分野において役立つ、新しい細胞培養ツールとなることが期待されます。

2 研究の目的と背景

人体の隅々にまで張り巡らされている血管ネットワークは、血流を介して栄養・酸素の分配や老廃物の除去を司る組織です。現在、再生医療、特に細胞から臓器を構築することを目指す組織工学の分野において、1mmを切る直径の血管組織をヒトの体の外で構築することが急務とされています。しかし、このような血管組織は、手作業による成形が困難であり、これまで様々なマイクロ加工技術が用いられてきたものの、体外で精緻に作り上げることができませんでした。管腔構造を持ち、さらに心臓が引き起こす拍動流れを模した周期流れを加えることができる体外培養血管モデルが開発されることで、臓器の構築や、血管の病気を治すための薬剤の検査に使うことができると期待されています。このような培養血管モデルを開発するためには、細胞を立体的に培養可能で、周期的な流れを引き起こすことができる特殊な細胞培養ツールが必要になります。本研究は、将来的に血管組織の体外での培養を実現するため、周期流れを引き起こすことが可能な、立体細胞培養技術の開発に取り組みました。

3 研究内容

(1)細胞培養マイクロデバイスの設計・加工

<https://www.yamashita.sd.keio.ac.jp/news/20250527>

本研究は、管腔状の培養空間、拍動流、高スループット性を兼ね備える、マイクロ流体デバイスとウェルプレートを組み合わせた血管組織培養技術を提案しました。ウェルプレート底面に設けられたマイクロ流体デバイス内に、前後に貫通した直径500 μm の内腔を持つコラーゲンゲルを充填

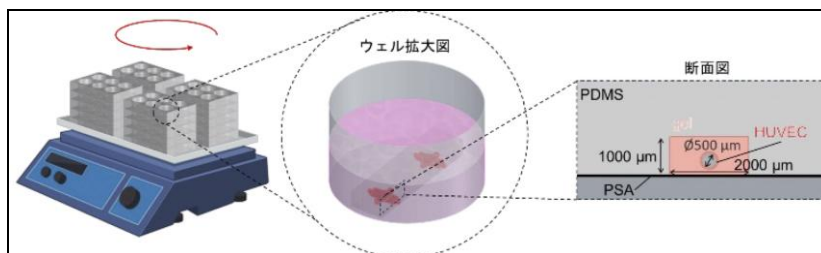


図1 マイクロ灌流細胞培養デバイスのコンセプト

します。次に、内腔にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を播種します。そして、ウェルプレート
を震盪機で震盪することにより、ウェル内に周期的な流れを引き起こし、細胞培養空間に拍動的
な流れを負荷します(図1)。

本研究はまず初めに、マイクロ流体デバイスとウェルプレートが統合された新しい細胞培養容器
を設計・加工しました(図2)。マイクロ流体デバイスを加工するための鋳型となる金型を製作し、ソ
フトリソグラフィと呼ばれる手法を用いて、内部に組み込むマイクロ流体デバイスを製作しました。
このマイクロ流体デバイスを、アクリル樹脂を切削加工して製作したフレームに、感圧性接着シー
トを用いて貼り付けることで、マイクロ灌流細胞培養デバイスを製作しました(図3)。

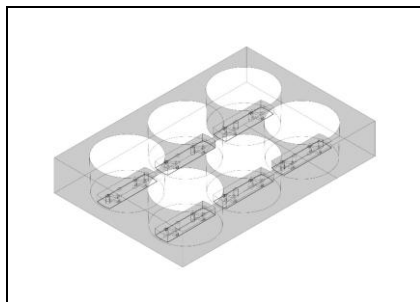


図2 マイクロ灌流細胞培養デバイスの設計図

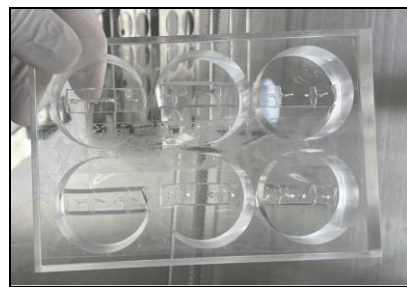


図3 マイクロ灌流細胞培養デバイス

(2) 拍動流下での細胞培養と表現型評価

<https://www.yamashita.sd.keio.ac.jp/news/20250527>

実際に製作したマイクロ灌流細胞培養デバイスの内部に、直径500 μ mの内腔を持つコラーゲ
ンゲルを充填し、血管内皮細胞を導入しました。そして、デバイスを震盪機の上に固定し、
2Hzの周期で震盪しながら72時間血管内皮細胞を培養しました(図4)。72時間後に培養した細
胞を固定・染色し、その立体構造を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察しました。血管内
皮細胞が、コラーゲンゲルの内腔を覆い、管腔状の血管内皮様組織を形成していることが確
認できました。また、血管内皮細胞が持つ細胞核は、内腔に沿ってその長軸を揃えるように
配置され、生体内の血管内皮組織と同様の配向性を示しました(図6)。このように、培養し

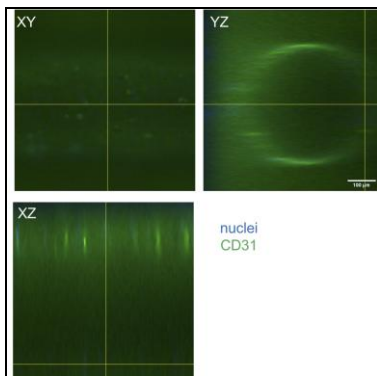


図4 静置培養された血管内皮細胞

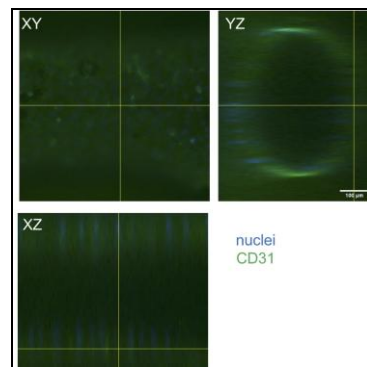


図5 震盪培養された血管内皮細胞

た組織は、血管内皮様の形態的特徴を備えており、血管モデルとして役立つことが期待されます。

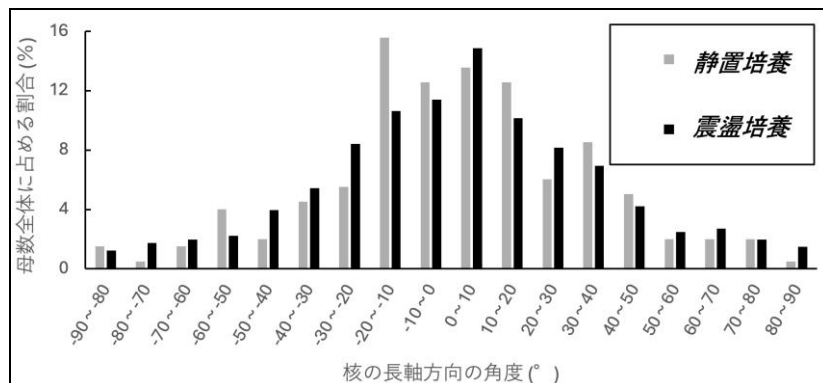


図 6 血管内皮細胞が持つ細胞核の配向角

(3) 今後の課題

<https://www.yamashita.sd.keio.ac.jp/news/20250527>

今後、本マイクロ灌流細胞培養デバイスを様々な細胞の培養に応用するにあたり、震盪中にマイクロ流路内に生じる流れの詳細を、実験および数値解析によって明らかにする必要があります。また、培養した血管組織に炎症を誘発する生化学因子を投与し、血管の透過性変化をはじめとするリアルな血管組織としての炎症応答が見られるかどうかを確認することで、培養組織の血管モデルとしての実用性を検証していきます。これらの検証作業を通じて、本技術の再生医療・組織工学への応用可能性を確かめていきます。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究が開発したマイクロ灌流細胞培養デバイスは、拍動流を生成する細胞培養容器として従来にない高スループット性を持ちます。このため、特に血管組織を構成する細胞群や、血流に関わる血球等の細胞群を培養・解析するための新しいプラットフォームになり、再生医療・組織工学分野の実験装置として今後広く用いられるようになることが期待されます。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者である山下は、これまでの研究を通じて、細胞培養皿の上で血管平滑筋細胞と血管内皮細胞を積層共培養する際、拍動流れが重要であることを報告してきました(A. Fernandes *et al.*, *Adv. Sci.*, 9, 2202317, 2022)。今回の研究で開発した、マイクロ流体デバイスとウェルプレートを統合したマイクロ灌流細胞培養デバイスは、上記の実験系で細胞の立体培養を実現し、より高度な細胞培養技術と位置付けられます。今後この細胞培養技術は研究室の持つ技術的な基盤となり、立体的な血管組織の構築や、その内部での流れの制御に課題を持つ組織工学に解決策をも

たらず新しい細胞培養技術を生み出すことが期待されます。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

- ・2025 BMES annual meeting
- ・日本機械学会 第38回バイオエンジニアリング講演会
にて研究成果を発表する予定です。

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

JKA_2024年度成果報告資料

https://9f8bab2c-0a75-4dbe-acbc-421da68d7e80.usrfiles.com/ugd/bff838_9305da5673c54538ab3953a8838af0dc.pdf

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

細胞核の配向性の解析に使用したMATLABスクリプト

https://9f8bab2c-0a75-4dbe-acbc-421da68d7e80.usrfiles.com/archives/bff838_0690d202df5c4a08b48aba45cf8c7c1b.zip

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(ケイオウギジユクダイガク 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： 准教授 山下忠紘(ヤマシタタダヒロ)

担 当 部 署： システムデザイン工学科 山下研究室

(システムデザインコウガクカ ヤマシタケンキュウシツ)

E - m a i l: yamashita@sd.keio.ac.jp

U R L: <https://www.yamashita.sd.keio.ac.jp/>