

2022 年度 JKA 補助事業

研究成果報告書

2024 年 1 月 22 日

立教大学 理学部 化学科 佐々木研究室

1. 補助事業概要

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

2. 研究体制

・代表研究者

佐々木直樹 立教大学理学部化学科 准教授（現：教授）

・共同研究者

樋口麻衣子 立教大学理学部生命理学科 准教授

3. 評価委員

佐藤香枝 日本女子大学 理学部化学生命科学科 教授

4. 評価資料

4-1 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。

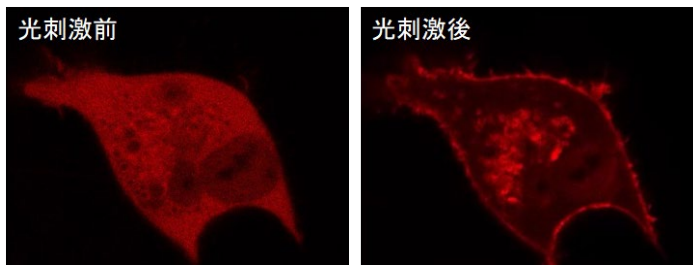
Organ-on-a-Chip の研究において重要と考えられている技術の一つは、実験的に構築した疑似生体組織に、血管網を形成する技術であるが、発展途上である。現状では、血管壁を構成する血管内皮細胞に化学物質をふりかけて血管新生と呼ばれる現象を促し、血管に類似した構造をランダムに形成している。従って、血管密度が十分ではなく、良好な培養環境を構築できない。

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。

4-2 研究内容

（1）光応答性血管内皮細胞の樹立

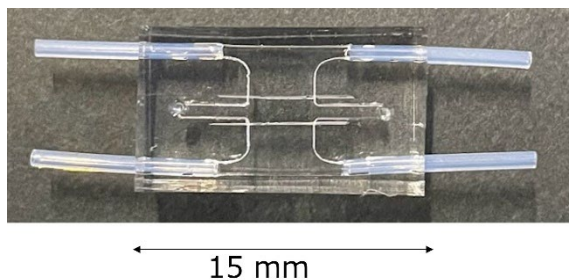
光で刺激することで血管内皮細胞の運動性を制御することを目指して研究を進めた。細胞の運動性促進に重要な分子の局在を光で操作するためのプラスミド DNA を作製し、これを運動性の低い培養細胞に遺伝子導入した。この細胞に光を当てたところ、上述の分子が局在化し、細胞の運動性も上昇することを見いだした。



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

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。

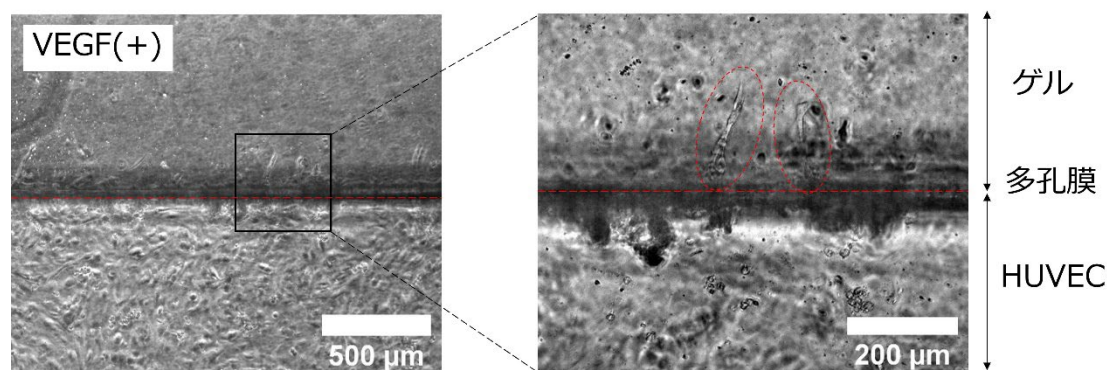


マイクロ流体デバイスの光学像

（３）光刺激による血管新生の実証

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 存在下の出芽の様子

4-3 本研究の展望

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 本研究にかかわる知財・発表論文等

【学会発表】

Organ-on-a-Chip with vertically arranged porous membranes

Naoki Sasaki (招待講演)

Pittcon 2023、Pennsylvania Convention Center、2023/03/18-22

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

6 評価委員コメント

細胞の運動性を上昇させるための基本操作が実証できており、さらに血管網構造を形成するためのマイクロ流体デバイスも本研究で改良が図られている。加えて、化学刺激による血管新生実験で出芽が見られており、価値ある実験が実証できている。学会発表もなされており、今後の研究の進捗に大いに期待したい。