

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ソロタイプ  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 生体内のメカニカル刺激を模倣したデバイスの開発と造血機能の再現  
(英語) Development of microdevices which mimic mechanical microenvironments inside the body to recapitulate hematopoietic function *in vitro*
- 研究開発担当者 (日本語) 京都大学白眉センター 特定准教授 鳥澤勇介  
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, The Hakubi Center for Advanced Research, Associate Professor, Yu-suke Torisawa
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、マイクロ流体デバイス技術を駆使することで生体内の環境を模倣し、個々の環境因子に起因する細胞機能を再現可能なデバイスの開発を目的とする。具体的には、発生過程において心臓の拍動の開始に同期して起こる血管内皮細胞の造血機能の再現、およびメカノバイオロジー機構の解明を目指す。更に、生体内における骨髄の形成環境を再現することで、生体外で骨髄環境を再構築可能なデバイスを開発し、これら 2 種類のデバイス (造血チップ・骨髄チップ) を組み合わせることで、ヒト人工性多能性幹細胞 (iPS) から造血幹細胞の作製および造血機能の再現を目指す。

デバイスは全て PDMS (ポリジメチルシロキサン) のみで作製した。造血チップは隔膜型の構造をしており、薄膜の上で細胞を培養する。PDMS の硬さを調節することで、最大 25% 程度の張力を細胞に印加可能なデバイスを開発した。また、共培養が可能なデバイスの開発に取り組み、SU-8 で作製した鋳型に PDMS をスピンコートすることで、多孔性の PDMS 薄膜を作製した。これにより、デバイス上の PDMS 薄膜の両面で細胞が培養可能となり、共培養系の構築が可能となる。作製したデバイスを用いて臍帯静脈内皮細胞の培養を行い、10%~15% 程度の張力を 1 Hz の周期で印加した結果、印加後 2 時間程度で細胞の配向が認められ、24 時間後までにはほとんどの細胞が張力に対し

て直角の方向に配向した。また、張力刺激を印加後、数秒から 1 分間程度で細胞内カルシウム濃度の急激な上昇が認められた。従って、本デバイスによるメカニカル刺激の印加に伴い、細胞内のカルシウムシグナルが活性化されていることがわかる。作製した造血チップを用いて、ヒト iPS 細胞より分化誘導した血管内皮細胞の培養を行った。本年度は主に、分化誘導の条件およびデバイス内での培養条件の検討を行った。PDMS で作製した四角錐状のウェルを用いて胚様体のサイズの制御を行うことで、造血機能を持った血管内皮細胞 (CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>) を良好に誘導可能であった。iPS 細胞から誘導した血管内皮細胞をデバイス内で、張力刺激を印加した環境下で培養を行った結果、臍帯静脈内皮細胞と同様な配向性が認められ、数日程度の培養が可能であった。従って、本デバイスにより iPS 細胞から誘導した細胞を、張力刺激を印加した環境下で培養可能となり、生体内のメカニカルな刺激を再現した環境で、iPS 細胞の培養および分化誘導が可能となった。

骨髓チップにおいては、骨髓環境を模倣する目的で、灌流可能な三次元の血管網を形成できるデバイスの開発を行った。肺繊維芽細胞 (LF) が臍帯静脈内皮細胞の血管新生を誘導し、フィブリンゲル内に血管網が作製出来ることは確認済みであった。そこで、骨髓由来の間葉系細胞 (MSC) を用いて、血管網の作製を試みた。その結果、LF の代わりに MSC を用いても血管網の作製は可能であることがわかったが、形成する管のサイズが小さく、細胞を灌流することは困難であった。そこで、MSC と LF を用いて細胞塊 (スフェロイド) を形成して三次元的に培養を行い、そこに血管網の作製を行った結果、管腔サイズの大きな血管網が作製可能であり、血液細胞を灌流可能であった。更に、複数の小型のスフェロイドを用いて同様な検討を行った結果、血管網の形成が促進され、ゲル中に灌流可能な血管網が張り巡らされたデバイスの開発に成功した。次に、血管細胞の灌流を試みた。小型の蠕動ポンプを用いて血液細胞を数日間、デバイス内を循環させて培養を行った結果、細胞の増殖が認められ、生細胞の割合は 90%以上を維持していた。従って、小型の蠕動ポンプの利用により、デバイス内に血液細胞を循環させて培養可能であった。そこで、デバイス上に作製した血管網の中に造血前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>) を循環させて培養を行った結果、造血前駆細胞は増殖を続け、血管を介してゲルの中へと浸潤してコロニーを形成しており、デバイス内での維持が可能であることが示唆された。従って、本デバイスにより、血液細胞を循環して培養が可能な 3 次元の血管網が作製可能であり、造血前駆細胞の維持が可能であった。

The object of this study is to develop microdevices to recapitulate organ-level cell functions by mimicking cellular microenvironment including mechanical cues using microengineering technology. Specifically, we develop two microdevices; one is to reconstitute hemogenic endothelium to produce hematopoietic stem cells (HSCs) and the other is to reconstitute the microenvironment of bone marrow to recapitulate hematopoietic function *in vitro*.

HSCs have been found to arise at arterial sites of the embryonic vasculature after the initiation of heartbeat. We thus developed a microfluidic device (Hemogenic endothelium-on-a-chip) where cells can be cultured while applying cyclic strain and fluidic shear stress in order to mimic the arterial microenvironment. All devices are made from polydimethylsiloxane (PDMS). By controlling stiffness of PDMS devices, the maximum of 25% strain can be applied to cells. Furthermore, we made porous PDMS membranes using SU-8 molds so that two types of cells can be cultured on the both sides of a porous PDMS membrane. Thus, this device enables co-culture of two types of cells onto a thin membrane while applying mechanical stimuli. When umbilical

vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in the device with cyclic strain (10% ~ 15%, 1 Hz), the cells underwent reorientation and alignment in response to cyclic strain. We evaluated intracellular calcium concentration and observed sparks of intracellular calcium signaling in cyclic strain-stimulated cells. Therefore, this device provides *in vivo*-like mechanical microenvironment which manipulates cellular alignment and intracellular signaling. We then cultured iPS-derived cells in the devices. After optimizing the culture condition, we were able to generate hemogenic endothelial cells (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>) from human iPS cells. When iPS-derived hemogenic endothelial cells were cultured in the devices with the cyclic strain, they underwent reorientation and alignment similar to HUVECs. Therefore, we have developed a device to culture iPS-derived cells with cyclic strain to mimic *in vivo*-like mechanical environment.

We developed another microfluidic device (Bone marrow-on-a-chip) to form 3D perfusable vascular networks in order to mimic the microenvironment of bone marrow. We have already confirmed that HUVECs can form perfusable vascular networks in a fibrin gel when they are co-cultured with lung fibroblasts (LFs). Thus, we tested if bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs), instead of LFs, can induce the formation of vascular networks in order to recreate the microenvironment of bone marrow. We confirmed that MSCs were able to induce the formation of vascular networks of HUVECs but the size of vascular lumen was too small to perfuse cells. Thus, we used 3D cellular spheroids consisting of MSCs and LFs to produce larger vascular networks and obtained the result that these spheroids were able to form vascular networks with large vascular lumens where blood cells were able to be perfused. Next, we tried to recirculate blood cells in a microfluidic device using a small peristaltic pump and observed that blood cells can be recirculated while maintaining their viability and proliferation potency. Therefore, we recirculated bone marrow-derived hematopoietic progenitor cells (CD34<sup>+</sup>) in the vascular networks formed in the microfluidic device to reconstitute bone marrow. We confirmed that these hematopoietic progenitor cells maintained their viability and kept proliferating in the device. Therefore, we have developed a microfluidic device to form 3D perfusable vascular networks in which hematopoietic cells can be maintained.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5 件、国際誌 1 件)

1. 鳥澤勇介. マイクロデバイスによる生体臓器の機能再現. **感染 炎症 免疫**. 2016, 46, 62-65.
2. 鳥澤勇介. Organ-on-a-Chip. **再生医療**. 2016, 15, 20-24.
3. 鳥澤勇介. 骨髄模倣マイクロデバイス : Bone Marrow-on-a-Chip. **バイオマテリアル**. 2017, 35, 50-53.
4. 鳥澤勇介, 梨本 裕司, 横川 隆司. Organ-on-a-chip: 動物実験に替わる薬物の新たな評価手法と効果予測. **ぶんせき**. 印刷中.

5. 鳥澤勇介. 生体臓器の機能再現に向けた Organ-on-a-chip 技術の開発. バイオサイエンスとインダストリー. 印刷中.
6. Nashimoto Y, Hayashi T, Kunita I, Nakamasu A, Torisawa Y, Nakayama M, Takigawa-Imamura H, Kotera H, Nishiyama K, Miura T, Yokokawa R. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. **Integr. Biol.**, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Cell-generated niches for organ-on-a-chip microdevices, 口頭, 鳥澤勇介, 29<sup>th</sup> International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2016/11/11, 国内.
2. 骨髄機能をもつ organ-on-a-chip の創製とその応用, 口頭, 鳥澤勇介, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2016/11/21, 国内.
3. Development of Biomimetic Microdevices to Reconstitute Bone Marrow Function, 口頭, 鳥澤勇介, 16<sup>th</sup> International Conference on Biomedical Engineering, 2016/12/8, 海外.
4. Organ-on-a-chip 技術と骨髄機能の再現に向けた取り組み, 鳥澤勇介, 日本化学会第 97 春季年会, 2017/3/18, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Organ-on-a-chip 技術と骨髄機能の再現に向けた取り組み, 鳥澤勇介, 大阪大学ナノ理工学人材育成産学コンソーシアム平成 28 年度 第 2 回ナノ理工学情報交流会「メカノバイオロジーとナノテクノロジーの融合」, 2016/9/8, 国内.
2. Organ-on-a-Chip 技術と骨髄機能の再現に向けた取り組み, 鳥澤勇介, 第 21 回再生医療の実用化に関するニーズ発表会, 2017/2/24, 国内.

(4) 特許出願

なし