

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600057

研究課題名(和文)血管新生研究のためのin vitro血管ネットワークモデルの開発

研究課題名(英文)Development of in vitro vascular network model for angiogenesis research

## 研究代表者

松永 行子(津田行子)(Matsunaga, Yukiko)

東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：00533663

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究の目的は、血管新生研究のための三次元微小血管システムを構築することである。具体的には、マイクロ加工技術を用いて、中空のコラーゲンゲル構造を作製し、三次元微小血管モデルの構築を行った。作製した微小血管は、VEGF濃度に応答して血管新生挙動を示し、また、がん細胞との共培養により、血管新生とがん細胞の血管内への侵入が観察された。以上より、本in vitro微小血管システムは血管新生研究への有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Tissues in disease such as inflammation, angiogenesis and cancer metastasis, are highly complex, thus sophisticated model is required to understand these mechanism actions at cellular and tissue levels. In this study, we prepared collagen microchannels by using collagen gels and PDMS hosting chamber including a needle (120 micrometer in diameter) as a channel mold. By using the device, continuous lumen structure of human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) surrounded by collagen gels can be formed. This vasculature model allows continuous monitoring of the vascular sprouting responding to the angiogenic factors. Compared to the traditional 2D culture system, our model is very useful for the investigation of the vascular disease at both cellular and tissue levels.

研究分野：組織工学

キーワード：血管新生 マイクロ流路デバイス in vitroモデル コラーゲン 血管内皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ガン、糖尿病などあらゆる疾患、生活習慣病には血管新生（血管形成、退縮、透過等の血管内皮細胞の運動性）が関わっている。図1に示すように正常組織と癌組織の血管ネットワークパターンは異なり、薬剤に対する血管パターンの構造変化をモデル化できれば、創薬分野および微小血管が伴う疾患メカニズムの解明に役立てることができる。

これまで、血管新生研究は主に、動物の体内および動物から単離した網膜などの血管付き組織を対象としており、サンプルの数、実験系の複雑さが問題となっている。できるだけ単純化し、周辺組織と血管との相互作用を観察可能なモデルの構築が必要であり、本研究では、内部に中空構造を有する血管ネットワーク構造（正常組織、疾患組織）を構築し、薬剤に対する微小血管の状態を経時的に観察可能な *in vitro* 三次元微小血管システムを構築することに着想した。

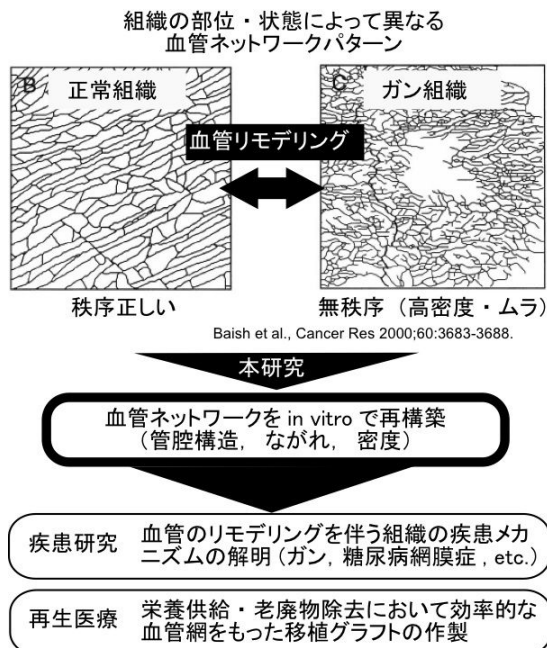


図1 本研究が目指す微小血管モデル再構築の重要性と本研究がもたらす効果

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、血管新生研究のための三次元微小血管システムを構築することである。すでに開発した三次元コラーゲンゲルマイクロ流路デバイスを用い、微小血管モデルの作製、安定化構造の構築、を行う。最終的には、ガン細胞との共培養および血管新生因子による環境応答試験を行うことで、作製した微小血管システムの血管新生研究利用への有効性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

正常ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells, Lonza)

を EGM-2 (Lonza) で培養した。本研究では継代数 2-5 継代目の細胞を用いた。

#### (2) 微小血管モデルの作製

中央のコラーゲンゲル流路部とその両端にリザーバーを有する PDMS マイクロ流路デバイスを作製した。PDMS 表面とコラーゲンゲルの密着性を高めるためにフィブロネクチン (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いて PDMS デバイス表面の前処理を行った。直径 120  $\mu\text{m}$  のマイクロニードルをデバイスに挿入し、中性化コラーゲン溶液 (最終濃度 2.4  $\text{mg/ml}$ , Type I-P コラーゲン, 新田ゼラチン) を添加し、30 分間 37°C でゲル化した後に、マイクロニードルを静かに引き抜くことでコラーゲンゲル流路を形成した。HUVEC の細胞懸濁液 (2.5  $\times 10^6$  cells/ml) をリザーバーに滴下し、細胞をコラーゲンゲル流路壁面に接着させ、24 時間毎に培地交換を行った (図 2)。

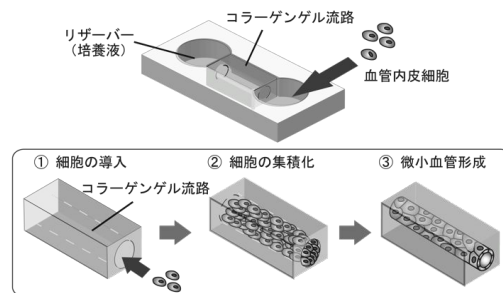


図2 三次元コラーゲンゲルマイクロ流路による微小血管モデルの作製方法

#### (3) 蛍光免疫染色

得られた微小血管を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、細胞膜透過処理後、細胞核、アクチンフィラメント、VE-カドヘリンについて既存の方法により免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss) を用いて観察した。

#### (4) 環境応答性試験

微小血管モデルに高濃度の Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を添加し、微小血管から新生する血管内皮細胞の挙動について観察した。また、ガン細胞 (マウスメラノーマ細胞 B16F10 など) との共培養系を作製し、共培養下での微小血管の挙動について観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 安定化 *in vitro* 微小血管モデルの構築

安定化した微小血管モデルの形成には、一定の直径を有し、均一な細胞-細胞間結合を有することが必要である。

コラーゲンゲル流路内へ細胞播種 24 時間後の微小血管の免疫染色画像 (アクチンフィラメント) を図 3 に示す。流路壁面全体が HUVEC に覆われ、管腔構造が形成されてい

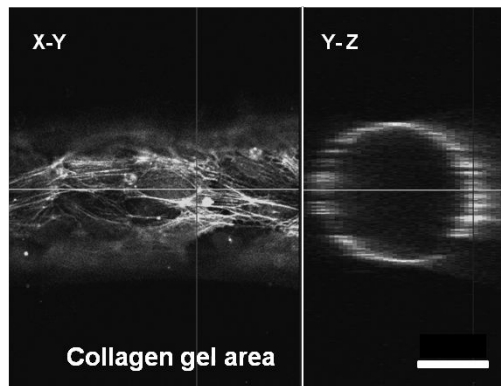


図3 作製した微小血管モデル(アクチンフィラメント)。 Scale bar: 50  $\mu\text{m}$

ること確認した。内径 120  $\mu\text{m}$  のコラーゲンゲル流路に細胞を播種した場合、24 時間後に内径が 100  $\mu\text{m}$  に収縮し、48 時間後もその値を維持することが確認された。細胞を播種していないコラーゲンゲル流路は、24、48 時間後も初期の直径が変化しないことから、細胞を播種した培養系では、細胞がコラーゲンゲルを牽引する力により微小血管全体の収縮が起こったと考えられる。

一方で、血管内皮細胞間の接着タンパク質である VE-カドヘリンの発現は、培養 24 時間後では、細胞間に VE-カドヘリンの発現が認められ、一部では発現がみられず不均一であった。培養 48 時間以降では微小血管全体に均一な発現が認められた。

以上の結果より、コラーゲンゲル流路内に導入直後の細胞は、流路壁面に接着し内腔面全体を覆う。その後、培養時間とともに、細胞間接着分子が発現し細胞-細胞間の結合が起こり、最終的に培養 48 時間で、均一な細胞間結合と安定した直径を有する微小血管を形成することが確認された。

#### (2) 微小血管モデルの環境応答性試験

作製した微小血管モデルは、図 4 に示すように中腔の微小血管からコラーゲンゲル領域へ血管内皮細胞が新生挙動を示すことが明らかである。つまり本微小血管モデルは、コラーゲンゲルに囲まれているため、本来生体内で起こる、血管新生を模倣した実験系となりうることを示された。

高濃度の VEGF を添加したときと VEGF を添加しないものに比べて、添加 24 時間後における新生した血管内皮細胞(スプラウティング)の数は約 3 倍以上、スプラウティングの長さは約 2 倍の結果を示した。

また、マウスメラノーマ細胞 B16F10 との共培養系では、コラーゲンゲル内への血管新生挙動を示すと同時に、B16F10 の遊走と微小血管内への侵入が観察されたことから、本モデルは、がん転移モデルとしても利用可能であることが示唆された。

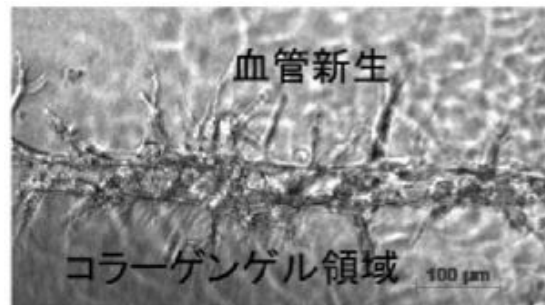


図4 血管新生挙動を示す三次元 *in vitro* 微小血管モデル。 Scale bar: 50  $\mu\text{m}$

以上の血管より、本微小血管モデルは環境に応答した血管新生挙動を示すことが明らかとなった。周辺細胞や、薬剤に対する微小血管の変化を経時的に観察し、アルゴリズムを作成できれば、薬効評価や、効率的な疾患の診断・予測が可能となり、最先端医療への貢献が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

藤澤佳乃子、松田勇、末弘淳二、湯川泰弘、梅津光生、松永行子、“血管透過性評価のための新規 3D *in vitro* 微小血管モデル”、生産研究、査読無、67、2015、41-43。

湯川泰弘、藤澤佳乃子、金範竣、松永行子、“シエアストレス負荷条件下における *in vitro* 三次元微小血管内の血管内皮細胞の挙動観察”、生産研究、査読無、67、2015、31-33。

松永行子、“*In vitro* 微小血管モデル：生体組織構造のデザイン”、高分子、査読無、63、2014、390-391。

〔学会発表〕(計 23 件)

松永行子、“三次元組織構築モデルによる正常-疾患相互作用のみえる化”、東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会・プラズマフォーラム、仙台、東北大学青葉山キャンパス、2015.2.19 (招待講演)

松永行子、“MEMS 組織工学による三次元組織構築の新たな展開”、第 24 回インテリジェント材料/システムシンポジウム、東京、東京女子医科大学先端生命医学研究所、2015.1.19 (招待講演)

松永行子、“ボトムアップ組織工学”、第 8 回高度物理刺激と生体応答に関する研究分科会特別講演会、福岡、九州大学伊都キャンパ

入, 2015.1.20 (招待講演)

松永行子, “三次元組織を利用した正常-疾患相互作用解析”, 『次世代バイオ・医療技術研究会』平成26年度第1回研究会, 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.12.8 (口頭)

松永行子, “Body on a chip -臓器チップがもたらす健康社会”, 女子中高校生理系進路選択支援事業【最先端の工学研究に触れてみよう!】, 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.11.14 (招待講演)

Yasuhiro Yukawa, Yukiko T. Matsunaga, “In vitro tissue model on chip”, JST Taiwan-Japan Workshop, Taiwan, 2014.11.12 (口頭)

Yasuhiro Yukawa, Beomjoon Kim, Yukiko Matsunaga, “Fabrication of Perfused Culture System for Functional Microvasculature Models”, 2014 BMES Annual Meeting, 2014, pp. 171, San Antonio, Texas, 2014.10.24 (ポスター)

松永行子, “Microvascular Chip for the Dynamic Analysis of Tissue Complex Behavior”, 機能性錯体化学研究会, 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.8.5 (招待講演)

湯川 泰弘, 末弘 淳一, 金 範俊, 松永 行子, “血管新生研究のための in vitro 微小血管モデル” CIBiS Symposium, 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.7.23 (ポスター)

Yukiko T. Matsunaga, “Cells interaction and therapeutic target”, Workshop on BioMEMS and cancer -research and innovations-, Lille, France, 2014.6.15. (招待講演)

松永行子, “生体組織構築による生命動態の見える化”, 日本学術振興会産学協力研究委員会第174委員会「分子ナノテクノロジー」第47回研究会, 東京, 品川, 2014.6.4 (招待講演)

松永行子, “組織工学の新たな展開: in vitro 病態モデルの構築”, 奨励会特別研究会, I 東京, 東京大学生産技術研究所, 2014.5.15 (招待講演)

Yukiko T. Matsunaga, “Microvascular chip for the Dynamic analysis of tissue complex behavior”, JST Taiwan-Japan Workshop on Bioelectronics" and "Biophotonics, 2014, Tokyo, 2014.4.4 (ポスター)

Y.T. Matsunaga, “Vascularized tissue formation using microfluidic system”, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, 2013.7.5. (招待講演)

松田勇, 末弘淳一, 梅津光生, 松永行子, “細胞集積マイクロゲル流路デバイスによる in vitro 血管新生モデルの構築”, 第35回日本バイオマテリアル学会大会, 船堀, 東京, 2013.12.05. (口頭)

松永行子, “ボトムアップで組織の階層構造をつくる-Fabrication of hierarchical tissue models using the bottom-up tissue engineering”, 第36回日本分子生物学会年会, (神戸ポートアイランド) 2013.12.3 (招待講演)

松永行子, “マイクロ流体技術による in vitro 階層化組織モデルの構築”, 第35回医用高分子研究会講座(東京), 2013.11.27 (招待講演)

Y.T. Matsunaga, “In vitro 3D microvasculature model chip for biological study”, 4th Synthetic Immunology Workshop (Kyoto Univ.) 2013.11.16 (招待講演)

松永行子, “生体組織再構築のためのボトムアップ組織形成術”, 次世代ナノシステムの創製3研究領域合同公開シンポジウム, 品川, 東京, 2013.10.07. (ポスター)

松永行子, “細胞社会の再構築による生命現象の解明”, 第2回バイオアセンブラ若手シンポジウム, 東大生研, 2013.06.12. (招待講演)

②松永行子, “再生医療へ向けた組織形成のためのマイクロ流体技術”, 日本表面科学会, 摩擦の科学研究会, (成蹊大学) 2013.05.25 (招待講演)

②Y.T. Matsunaga, N. Brandenberg, I. Matsuda, M. Umezumi, Y. Okubo: “Rapid formation of engineered microvasculatures using microfluidic techniques”, Society for Biomaterials Annual Meeting, 2013. (ポスター)

③ Y.T. Matsunaga, “Bottom-up tissue engineering using microfluidics”, ACS Poly/PMSE Division Student Chapter, Macromolecular Sci. & Eng. Center, University of Michigan, USA, 2013.04.15 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

松永行子, “バイオマテリアルマイクロピーズによる三次元階層組織の高速形成”, ゲルテクノロジーハンドブック, 監修中野義夫, pp.104-109, NTS Inc., 2014年10月発刊(分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：微小血管-組織間相互作用観察のための三次元ゲルチップ

発明者：松永行子

権利者：東京大学

種類：特許 番号：特許願 2013-261089

出願年月日：平成 25 年 12 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

東京大学生産技術研究所松永研究室 HP

<http://www.matlab.iis.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永行子(津田 行子)(MATSUNAGA YUKIKO) 東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：00533663

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

未弘 淳一(SUEHIRO JUNICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：80572601