

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670394

研究課題名(和文)自己組織化を利用したオンチップ血管モデルの開発 血管生理・病態の再現と理解

研究課題名(英文)Development of on-chip vascular model utilizing the self-organizing ability: reconstitution-based understanding of vascular physiology and pathology

研究代表者

西山 功一(Nishiyama, Koichi)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80398221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、微小流体デバイス上で長期灌流可能な血管網を血管新生を通じて構築する基盤技術を開発した。ヒト培養細胞と単離したマウス細胞のどちらを用いても、壁細胞が内皮細胞の構造体を取り囲み内腔に管腔を持つ、生体内を模す血管網を再構築することに成功した。また、毛細血管流相当の流速で培地を1週間に渡り灌流することが可能になった。さらに、血管新生時の細胞動態を定量評価するための技術基盤も整ってきた。最後に、同解析系を用いることで、内腔圧は内皮細胞による血管伸長現象を抑制的に制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a fundamental technology, which enables to reconstitute the long-term-perfusible vascular network on a microfluidic device via angiogenesis. Using either human or murine primary cells, we succeeded to reconstruct the vascular structure that approximates in vivo, in which endothelial sprouts were properly covered with perivascular pericytes and have a lumen structure. Furthermore, the reconstructed vasculature was perfusable with the culture media at a perfusion speed, corresponding to capillary blood flow, over a week. In addition, we established an imaging and quantitative analysis system for understanding of cellular angiogenic mechanisms. Using the on-chip angiogenic model, we identified intraluminal pressure to be one of the potential negative regulators of endothelial cell-driven angiogenesis.

研究分野：血管生物医学

キーワード：血管新生 微小流体デバイス 自己組織化 再構成 血流

1. 研究開始当初の背景

血管は生体内のほとんどの組織に配置され、酸素や栄養を供給することで生体の恒常性維持に大きく貢献する。血管の構造的(動脈硬化など)、機能的(攣縮など)異常は、生体の恒常性の破綻、すなわち病気の発症・進展に直結する。よって、血管が関連する病態の克服には、血管自身の生理・病態をこれまで以上の広い視野でより深く理解していく必要がある。

そのアプローチとして、蓄積された知識に基づき目的の現象を1から再現し理解する方法がある。これまで、工学系グループを中心に半導体技術を生物学に応用する分野が開拓され(BioMEMS)、オンチップで送液可能な血管系を作り出す研究が展開されてきた。最近、内皮細胞の自己組織化を利用し送液可能な血管網を微小流体デバイス上で作る技術が報告されてきており(Lab Chip 2013;13:1489)、血管の生理や病態を ex vivo で構成的に理解するための技術的基盤が徐々に整ってきた。

これまで、我々は、自己組織化的に血管をつくる血管新生のしくみの解明に携わってきた(Circulation 2005;112:2840, J Biol Chem 2007;282:17200)。最近、内皮細胞の自己組織化動態を可視化・定量化する解析系を開発し、そのしくみも少しずつ明らかとなってきた(Development 2011;138(21):4763)。さらに、血管内皮細胞、壁/平滑筋細胞、線維芽細胞をそれぞれ単離し、それらを再構成して血管構造を作らせる再現実験技術も確立しつつあった。

2. 研究の目的

本研究では、血管の自己組織化に関する我々のこれまでの知識と技術に基づき、長期維持可能で、生体内の様々な血管を模す、今まで実現されていないオンチップ血管モデルを開発することを目指した。特に、本研究期間内で、1) 内皮細胞と壁/平滑筋細胞が管腔をもつ血管構造をつくる血管新生現象の微小流体デバイス上での再現と、その過程を担う細胞動態の理解、2) 微小流体デバイス上に再構築する血管構造内腔に長期送液できる技術の開発と送液による新生血管への影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

① 微小流体デバイス上での灌流可能な血管網の構築

血管内皮細胞の自己組織化性を利用し、ヒト

フィーダー細胞(ヒト肺由来線維芽細胞)との共培養と血管内皮増殖因子(VEGF)刺激により、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)およびヒト胎盤血管由来壁細胞が、微小流体デバイス上の細胞外基質内(フィブリン・コラーゲンゲル)に侵入し、血管新生の過程を得て管腔構造をもつ血管構造を3次元的に形成することを誘導した。微小流体デバイスの設計は、連携研究者の横川らが行った(京大工学部)。

マウスの胸部大動脈から内皮細胞、壁/平滑筋細胞、および線維芽細胞を、酵素法と磁気細胞分離(MACS)技術を用いて、単離・増幅した。上述のヒト培養細胞による場合と同様な方法で、線維芽細胞成分をフィーダー細胞として用い、単離した血管細胞が微小流体デバイス上で血管新生現象を再現することを誘導した。

② 微小流体デバイス上での血管新生動態の可視化と細胞メカニズムの解析

あらかじめ血管細胞を、異なる CellTracker 色素により染色し、それらを混ぜて、上述の微小流体デバイス上の血管新生誘導実験に使用した(モザイク解析)。微小流体デバイス上に誘導された血管新生において、その細胞動態と血管形態の変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて4次元的にタイムラプス観察した。必要に応じて、細胞核をヘキストダイや SYTO ダイなどで染色した。

③ 微小流体デバイス上の血管網構造への長期送液

血管新生による成長過程の血管(血管内腔は盲端)、および、構築された血管、両方において、細胞培地を灌流させた。流量可変型の微量用シリンジポンプを用いて、生体内の毛細血管内に近い流速(0.5-1mm/s)にて、内腔を灌流させた。

④ 血管新生動態における壁細胞および内腔圧負荷の影響の検討

微小流体デバイス上で、内皮細胞のみ、内皮細胞と壁細胞、という2つの構成細胞条件にて、形成される新生血管の違いを細胞・形態レベルで定量的に比較し、血管新生における壁細胞の役割を検討した。さらに、血管内腔圧による血管新生動態の影響を、内皮細胞のみでの新生血管にて検討した。内腔圧は、さまざまな血管新生時期に、静水圧をかけることで再現させた。

4. 研究成果

① 様々な生物種の細胞を用い微小流体デ

バイス上で生体内を近似する血管網を構築する技術の開発 (図 1)

既報の (Lab Chip 2013;13:1489) デバイス設計を基に、5 つの流路からなるデバイスを設計した。流路 1 にはフィブリン・コラーゲンゲルに含めたフィーダー細胞を、流路 3 にはフィブリン・コラーゲンゲルを、流路 4 には内皮細胞および壁細胞を導入した。流路 2、4 および 5 には培地を充填した。20ng/ml の VEGF を含む培地で、約 5~7 日間培養することで、播種した血管細胞は、フィブリン・コラーゲンゲル内に侵入し、最終的には対側の流路 2 に血管が開通した。

再構築した新生血管を、各種染色後に、共焦点レーザー顕微鏡で組織学的に検討した結果、管腔構造を持つ内皮細胞の血管様構造の周りに壁細胞が取り囲む、生体内の血管を近似した構造ができていることがわかった。さらに、対側流路への血管腔貫通前後で、蛍光標識されたビーズを、流路 4 を通して静水圧を利用し導入した結果、灌流できる血管網が構築されていることが分かった。

以上のように、微小流体デバイス上で、灌流可能な管腔構造をもち生体内の血管を構造的に近似する血管網を、血管新生過程を通して構築する技術を確立した。現時点で、マウスから単離した血管細胞を用いた場合、管腔構造を持った血管構造が、対側まで貫通するまでには至っておらず、今後の技術的な改善

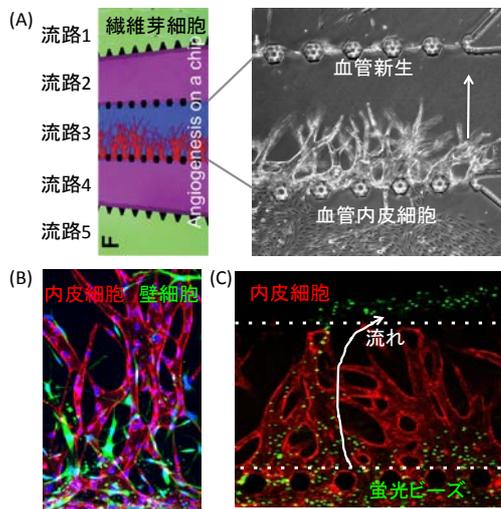


図1: 微小流体デバイス上の灌流可能な血管網の再構築 (A) デバイスデザインと血管新生の再現. (B) 壁細胞が内皮細胞に寄り添う血管構造. (C) 血管内腔に灌流可能.

課題である。

② 微小流体デバイス上での血管新生動態の可視化

Celltracker による内皮細胞と壁細胞の染色条件を検討したところ、3 mM 濃度での試薬使用が細胞毒性なく、また、細胞が十分に可視

化できる条件であることがわかった。Celltracker にて異なる色に染め分けた内皮細胞を同等に混和し(モザイク解析)、微小流体デバイスで、上述と同様に血管新生現象を再現させた。培養 4 日目に、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、一つ一つの細胞形状まで 3 次的に十分に可視化できた。

しかし、その動態を 10 分置きにタイムラプス観察したところ、観察開始から約 2 時間程度で、光毒性と思われる細胞死が見られ始めた。顕微鏡観察による細胞毒性を回避するため、様々な条件での観察を検討したが、現行の顕微鏡システムでは、観察が可能な条件を見出すことができなかった。現在、所属施設に新たに導入されたライトシート共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行う準備を進めている。その為に、連携研究者の横川らと共同して、同顕微鏡システムに適したデバイス開発を進めている。

③ 微小流体デバイス上に再構築した血管網構造に送液する技術の確立

血管新生により成長過程の血管(血管内腔は盲端)に灌流した場合、流路 4 内の細胞が送液により流路から剥離し、その後の血管新生がうまく進まないという問題が生じた。デバイス流路内の、細胞外基質のコーティング等、送液により細胞が流路壁面から剥離しないための改善策が今後必要であり、現在、その検討を行っている。

流路 3 内の細胞外基質内で血管網を構築し、血管内腔が対側の流路 2 に開通した後においては、微小流量シリンジポンプで毛細血流に相当する流速にて、約 1 週間培地を灌流することが可能になった。毛細血管流相当の流速を再現するため、管腔の断面積から必要となる単位時間当たりの流量を算出した。さらに、コロイドを流路に流し、その流れを PIV (粒子画像流速測定法) にて定量的に実測することで、必要な単位時間当たりの予測流量が妥

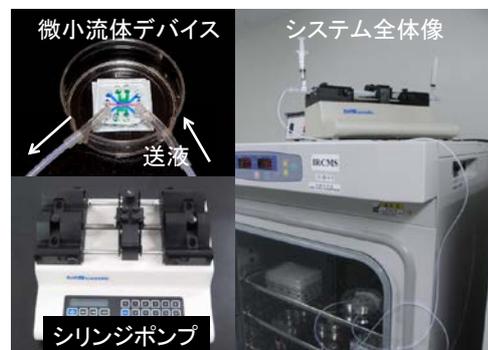


図2: 微小流体デバイス上の血管網への送液システム

当であることを確かめた。以上より、再構築した血管網に細胞培地を灌流する基本的技術は確立できた (図 2)。現

在、内皮細胞のみで構築した血管網に灌流させているが、壁細胞を加えたより生体内に近い血管網ではどうか、血管新生動態や血管形態への送液の影響はどのようなものか、また、より長期的な培養にて血管の分化（動脈化）を再現できるかなど、生物学的諸問題に応用していくことを今後予定している。

④ 内腔圧による内皮細胞動態制御の可能性を発見

血管内皮細胞のみで血管新生を行わせた場合に比較して、壁細胞が共存すると、デバイス上での血管伸長の促進と血管の狭小化を認めた。これまで他の血管新生解析系で得てきた結果を再現するものであり、微小流体デバイスを用いた血管新生評価系が有用であることを示唆する。さらに、上述のモザイク解析を行い、細胞レベルでの解析を行った結果、壁細胞が存在する場合、個々の内皮細胞は枝の伸長方向に伸展した形態を示しており、新生血管の形態変化を一部説明していると考えられた。

非常に低い内腔圧（2mmHg）を、内皮細胞のみで行わせた血管新生の早期にかけると、血管伸長が止まり、最終的には血管形態も異常に変化することを見出した。内腔圧により、血管伸長が止まった後、再度、内腔圧負荷を解除することで、血管の伸長は再開された。このことから、少なくとも、内腔圧負荷により血管伸長が止まることは、内皮細胞死などの不可逆的变化が非生理的に誘導された結果ではないことを示唆する。今後、血管新生動態における内腔圧の生理的意義と作用メカニズムに関して検討を深めていく予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Sugihara K*, Nishiyama K*, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H, *These authors contributed equally to this work、Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling、Cell Rep、査読有、13(9)、2015、pp1814-1827、DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.051.
- ② Sueta D, Yamamoto E, Tanaka T, Hirata Y, Sakamoto K, Tsujita K, Kojima S, Nishiyama K, Kaikita K, Hokimoto S,

Jinnouchi H, Ogawa H, The accuracy of central blood pressure waveform by novel mathematical transformation of non-invasive measurement、Int J Cardiol、査読有、189、2015、pp244-246、DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.03.182.

- ③ Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kuriara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. Nat Commun、査読有、5、2014、pp4552、DOI: 10.1038/ncomms5552.
- ④ 西山 功一、血管づくりに秘められた細胞集団の挙動、細胞工学、査読無、33(6)、2014、pp639-644.

〔学会発表〕（計 15 件）

- ① 西山 功一、自律的に樹状構造をつくる血管細胞動態と制御機構、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016、3、28、ビッグパレットふくしま（福島・郡山市）
- ② 國田 樹、Quantification of effects of mechanical stimuli and mural cells on angiogenic morphogenesis、National Institute of Genetics International Symposium 2016、2016、1、10、東京大学生産技術研究所（東京・目黒区）
- ③ 西山 功一、血管新生における血管壁細胞の役割、CVMW2015 心血管代謝週間、2015、12、12、神戸国際会議場（兵庫・神戸市）
- ④ 西山 功一、血管内皮細胞の血管新生運動を制御する細胞自律的・非自律的メカニズム、CVMW2015 心血管代謝週間、2015、12、10、神戸国際会議場（兵庫・神戸市）
- ⑤ 國田 樹、血管新生に対する力学刺激の効果を検証するための灌流アッセイ系の構築、CVMW2015 心血管代謝週間、2015、12、10、神戸国際会議場（兵庫・神戸市）
- ⑥ 西山 功一、血管新生プレーヤーとしてのペリサイト、第38回年会 BMB2015、2015、12、2、神戸商工会議所（兵庫・神戸市）
- ⑦ 西山 功一、Coordinated angiogenic behavior of tip endothelial cell

revealed by a combined approach with experimental and mathematical modeling、第13回日韓血管生物合同シンポジウム、サムジュアートホール (釜山 (韓国))

- ⑧ 西山 功一、Coordinated angiogenic behavior of tip cell revealed by experiment-driven mathematical modeling、Gordon conference ‘angiogenesis’、サルベ・レジナ大学 (ロードアイランド (米国))
- ⑨ 西山 功一、Genetic and epigenetic regulation in angiogenic cell dynamics、第79回日本循環器学会学術集会、2015、4、26、リーガロイヤルホテル (大阪) (大阪・大阪市)
- ⑩ 西山 功一、Molecular and cellular mechanisms in angiogenic morphogenesis、第79回日本循環器学会学術集会、2015、4、24、リーガロイヤルホテル (大阪) (大阪・大阪市)
- ⑪ 林 智也、Vascular network formation for a long-term spheroid culture by co-culturing endothelial cells and fibroblasts、The 28th IEEE international conference on micro electro mechanical systems (MEMS 2015)、Estoril Centro De Congressos (エストリル (ポルトガル))
- ⑫ 西山 功一、血管新生の包括的理解のための新しい解析システムの構築、第5回 Molecular Cardiovascular Conference II、2014、8、6、神戸シェラトンホテル (兵庫・神戸市)
- ⑬ 西山 功一、Cell dynamics during angiogenic morphogenesis、The joint annual meeting of the Japanese society for mathematical biology and the society for mathematical biology、2014、8、1、グランキューブ大阪 (大阪・大阪市)
- ⑭ 西山 功一、Stochastic and deterministic aspects of angiogenic endothelial cell movements revealed by mathematical modeling、Research Planet 2014、東京国際フォーラム (東京・千代田区)
- ⑮ 西山 功一、Stochastic and deterministic aspects driving angiogenesis as a morphogenetic multicellular movement、The 18th international vascular biology

meeting、2014、4、17、京都市勧業館「みやこめっせ」(京都・京都市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://kumamoto-ircms-nishiyama.jp/about-research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 功一 (NISHIYAMA, Koichi)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80398221

(2) 連携研究者

三浦 岳 (MIURA, Takashi)
九州大学・大学院医学系研究院・教授
研究者番号：10324617

横川 隆司 (YOKOKAWA, Ryuji)
京都大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：10411216

(2) 研究協力者

松原 彬 (MATSUBARA, Akira)
國田 樹 (KUNITA, Itsuki)