

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06686

研究課題名(和文) 曲率を制御した足場材料によるin vitro 3次元微小血管新生モデルの構築

研究課題名(英文) Development of 3D in vitro angiogenesis model using curvature controlled scaffold

研究代表者

高橋 治子 (Takahashi, Haruko)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：70775767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、曲率を微細に制御した足場材料を用いて、生体外(in vitro)で3次元的な微小血管新生をモデル化することを目的とした。研究実施期間(2年間)において、まず、足場材料の曲率によって血管内皮細胞の血管内皮成長因子(VEGF)に対する血管新生応答を制御できることを証明し、さらに見出した最適な曲率を持った血管足場を微細に設計することで、長く・成熟した血管新生モデルの構築を行った。構築したモデルにおいて血管新生の様子を詳細に画像化し、初めて微小な血管新生の形態変化を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop three-dimensional in vitro angiogenesis model on microdevice chip. The microvessels of several sizes (120, 200, and 300 micrometer in diameter) were successfully prepared and angiogenesis was induced by addition of vascular endothelial growth factor (VEGF). Angiogenesis induction was characterized by the sizes of the prepared microvasculatures. Longer and larger neovascular vessels formed from host microvasculature with smaller diameters, while only small sprouts were detected from large microvasculatures. By observation of the angiogenesis models, we visualized 3D features of the angiogenic sprouting process and provide information on the dynamics of luminal formation.

研究分野：生体材料学

キーワード：血管新生 三次元組織モデル 足場材料 曲率

1. 研究開始当初の背景

血管新生(angiogenesis)は、既存の血管から内皮細胞が増殖・遊走して新たな血管枝を発芽し、血管網を構築する現象である。血管新生はがんを始めとして、心臓血管疾患や炎症性疾患、創傷治癒等多くの疾患に関連するため、疾病および治療法の解明に向け非常に重要な研究対象となっている。1990年代から血管新生研究のために生体(*in vivo*)モデルが用いられてきたが、多くの因子が関わる複雑な血管新生メカニズムや治療薬剤等の標的因子を明らかにするには、関連するパラメータを限定し、定量的に評価可能な生体外(*in vitro*)モデルも非常に有用とされ、これまでに多くのモデルが開発されてきた。これらの *in vitro* モデルでは、Matrigel®やコラーゲン、フィブリン等のゲル上に、血管内皮細胞を単層に播種して成長因子を添加し、ゲル内への毛細血管の発芽を観察するゲル上播種法がよく知られている。このとき、内皮細胞の遊走と、中空の管腔構造を有する新生血管の形成を調べるため、3次元的な細胞外マトリクスを提供する足場材料(ゲル等)での培養が不可欠である。さらに、多方向への血管新生を観察するため、内皮細胞をマイクロビーズ上に播種し、このマイクロビーズをゲル中で培養する手法も提案されている。しかし、これらの既存モデルでは、成長因子等の生理化学的な誘導刺激に応答した血管の発芽と伸長しか検討することができず、血管から新たな血管枝を発芽して血管網を形成する生理的な血管新生現象のモデルは構築できていない。既存の血管から新たな血管が発芽して血管網を形成する、より生体内で起こる現象に近い *in vitro* 血管新生モデルが構築できれば、疾患の解明や治療法の開発に大きく寄与できると期待され、研究が進められている。

研究代表者は、所属する東京大学生産技術研究所松永研究室において、微小なマイクロデバイス中に血管内皮細胞・コラーゲンを適切に配置し、組み上げることで、3次元的な管腔構造を有する微小血管を作製しており、さらに構築した3次元 *in vitro* 微小血管に血管内皮成長因子(VEGF)を加え、VEGF 刺激に応答した血管新生の検討を行ってきた。この検討の中で、予め組み上げる微小血管の直径が小さい場合(120—200 μm)では新生血管の発芽が起こるのに対し、微小血管の直径が大きい場合(300 μm)には発芽が見られないことを予備実験的に見出し、この微小血管を組み上げる足場材料の直径(即ち細胞接着面の曲率)によって、血管新生を空間的に制御し、より生理的な血管新生現象を解析しやすいモデルが構築可能でないかと着想し、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究は、曲率を制御した足場材料を用いた3次元 *in vitro* 微小血管新生モデルの構築を目的とした。具体的には、2年間の研究期

間において①足場材料の曲率(血管の直径)によって、血管内皮細胞の成長因子に対する血管新生応答を制御できることを証明し、さらに②最適な曲率を持った血管足場の形を設計することで、血管新生部位を空間的に制御し、生理的な血管新生現象をモデル化することを試みた。

3. 研究の方法

ポリジメチルシロキサン(PDMS)で作製したマイクロデバイスにコラーゲンで足場となるゲル流路を作成し、そこへヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を導入し、ゲル表面に接着・伸展させて管腔構造を持つ微小血管を作製した。ゲル流路を作製した際に、コラーゲンゲル中に挿入するマイクロニードルの直径を120, 200, 300 μm と変化させ、直径の異なる流路を作製した。この流路へ HUVECs を導入し、微小血管を形成させた。血管内皮成長因子(VEGF)を0または50 ng/mLとなるように添加し、7日間培養して時間経過による変化を明視野顕微鏡および、光コヒーレンストモグラフィ(OCT)で観察した。培養後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定、細胞骨格のアクチンや細胞極性マーカーであるラミニンやポドカリキシンを染色し、共焦点レーザー顕微鏡で新生血管の構造を観察した。新生血管の数・長さ・血管の直径を測定し、血管の直径(=曲率)と血管新生および血管径の変化の関係を比較した。

次に、血管新生を誘導する足場として最適な曲率面を作製できることが確認できた細い直径(200 μm 以下)のゲル流路において、周皮細胞であるペリサイトとの共培養系を検討した。HUVECs と一緒にペリサイトを導入し、VEGF を添加して血管新生を誘導し、ペリサイト存在下における血管新生の様子を観察した。

4. 研究成果

PDMS マイクロデバイス中に作製した3次元 *in vitro* 微小血管モデルに対し、VEGF 添加後7日間の変化の様子を光学顕微鏡で観察すると、培養時間に伴って顕著な血管の分岐・新生が見られた(Fig. 1)。しかし、作製した微小血管が管腔構造を有しているかど

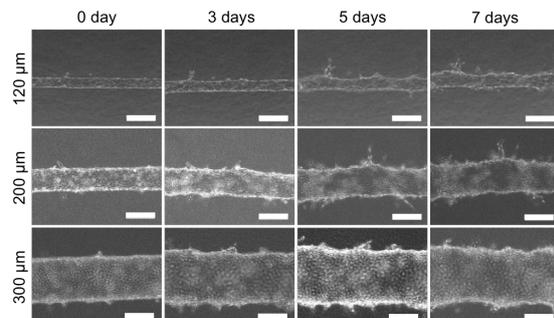


Figure 1. Bright field microscopic images of angiogenesis process induced by VEGF (50 ng/mL). Bars = 200 μm .

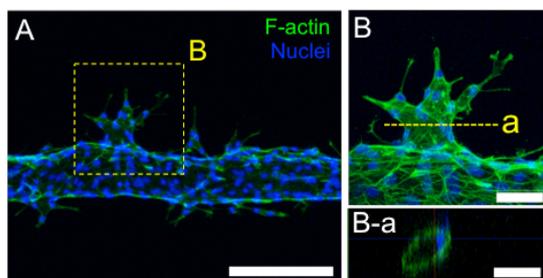


Figure 2. (A) Confocal laser scanning microscopic image of neovasculature stained for F-actin and nuclei in the 3D *in vitro* angiogenesis model. Bar = 200 μm . Image (B) corresponds to areas bounded by the yellow box in (A). Image (B-a) is in-plane section of neovasculature shown in (B). Bar = 50 μm . All images are obtained 7 days after VEGF stimulation.

うか、また新しく新生した血管も管腔を形成しているかどうか詳細は明らかにできなかった。そこで、組織の3次元構造を観察するためによく用いられる共焦点レーザー顕微鏡による三次元的な可視化を試みた。7日間 VEGF 存在下で培養した微小血管をパラホルムアルデヒドで固定化後、免疫組織染色法によって染色すると、細胞内の細胞骨格(アクチン)などが観察できた(Fig. 2)。新生血管の断面をみると、中が空洞な管腔構造を持つことが確認された。さらに、染色する分子を基底膜側に特異的に発現するラミニンと、頂端膜で多く発現するポドカリキシンを染色すると、構築した微小血管は細胞極性を有する生理的な血管であることが確認できた。

構築した血管から新しい血管が新生する際の3次元構造の変化を詳細にライブ観察するため、光の干渉性を利用して試料内部の構造を高分解能・高速で撮影する光干渉断層撮影法(光コヒーレンストモグラフィ、OCT)を用いて観察した。このシステムを用いて、微小血管モデルの断層面を観察し、得られた断面像から3次元的な血管構造を再構築した(Fig. 3)。断面像からは、作製した微小血管の直径や、微小血管から伸びた新しい新生血管が観察された。3次元像からは、作製時には表面が平滑だった血管が、VEGF 存在下で7日間培養すると、細胞の増殖や血管新生により凹凸した構造に変化している様子が明らかとなった。また、微小血管モデルを1日ごとに観察することで、時間に伴って徐々に血管が伸びていく過程を詳細に観察することが可能であった(Fig. 4)。新生血管部位の断層像に着目すると、微小血管から新しい血管が伸び、中空な構造をつかって成熟していく過程を観察できた。これまで、管腔構造の形成メカニズムとして、発芽した新生血管の内皮細胞に極性ができ、細胞—細胞間に空洞が形成されて成熟するモデル(cord hollowing model と呼ばれる)が提唱されていたが、直接

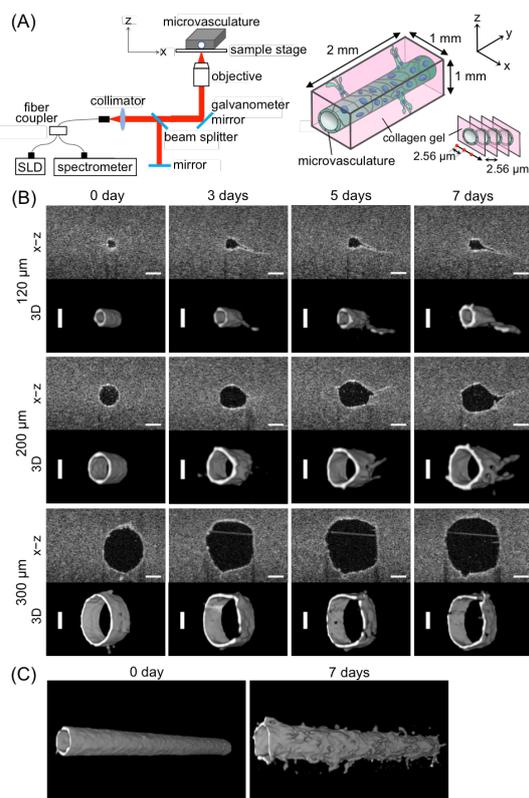


Figure 3. (A) Stage-top optical coherence tomography (OCT) setup and scanning condition for the microvasculatures. Super luminescent diode (SLD) output is coupled into a single mode fibre and split at the fibre coupler into microvasculature and reference arms. Reflections from the two arms are combined at the coupler and detected by the spectrometer. Longitudinal imaging was performed in the area of microvasculature. (B) OCT images of the angiogenic process induced by VEGF (50 ng/mL). Top row: cross-sectional images surrounded by collagen gel. Bottom row: reconstructed 3D images performed using ImageJ. Bars = 100 μm . (C) 3D images of the entire microvasculature (2 mm in length) at

的なライブイメージングはなされていなかった。今回の測定で、提唱モデルの過程を初めて可視化することに成功した。さらに、断層像から新生血管と、内部の管腔構造の長さの経時変化も定量的に測定可能であった。

以上から、細い(200 μm 以下)微小血管を構築することで、血管内皮成長因子(VEGF)に応答した血管新生を効率的に誘導できることを証明できたため、次に周皮細胞であるペリサイトとの共培養により、より長く、成熟した血管新生プロセスのモデル化を試みた。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)と一緒に周皮細胞であるペリサイトをゲル流路内に導入すると、自発的に血管内皮細胞層の外側(細

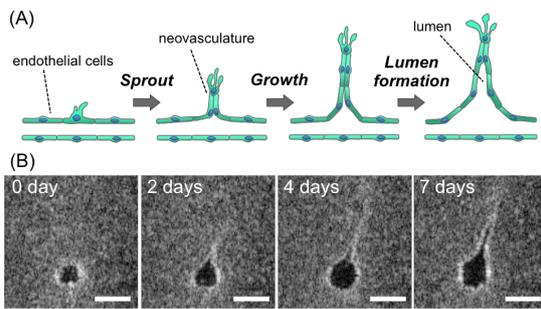


Figure 4. (A) Vascular sprouting cord hollowing model. (B) Neovascular formation detected by OCT. Bar = 100 μm .

胞外マトリックスであるコラーゲン側)にペリサイトが接着した二層構造を形成し、周皮細胞が血管内皮の周囲に裏打ちするような、生体内で観察される構造を形成することを明らかとした。ペリサイト共存下では、血管内皮細胞単独に比べ、VEGFに応答して新生した血管の長さが長く、また新生した微小血管の周囲にもペリサイトがサポートするように接着している様子が観察された。さらに、血管から外へ物質が漏れ出す血管透過性も低く抑えられることが明らかとなった。以上から、血管内皮細胞と周皮細胞共培養系によって長く・成熟した血管新生モデルが構築可能であることを示すことができた。

本研究により、微小な血管を人工的にマイクロデバイス上に作製し、がん細胞などが産生するVEGFを加えることで、血管から新しい血管が枝分かれし伸びる「血管新生」現象をモデル化できた。光コヒーレンストモグラフィ(OCT)などの観察システムを用いることで、新しい血管が伸び、中空な構造をつくって成熟していく過程を初めてライブで直接観察し、定量的に評価することに成功した。本モデルは既存の血管から内皮細胞が増殖・遊走して新たな血管枝を発芽し、血管網を構築する生理的な血管新生現象をモデル化しており、今後の血管新生をターゲットとする創薬研究やスクリーニングなどへの応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Eujin Lee, Haruko Takahashi, Joris Pauty, Masayoshi Kobayashi, Keisuke Kato, Maki Kabara, Jun-ichi Kawabe, Yukiko T. Matsunaga, A 3D *in vitro* pericyte-supported microvessel model: visualisation and quantitative characterisation of multistep angiogenesis, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 (2018), 1085–1094. DOI: 10.1039/C7TB03239K.
2. Joris Pauty, Ryo Usuba, Irene Gayi Cheng, Louise Hespel, Haruko Takahashi, Keisuke Kato, Masayoshi

Kobayashi, Hiroyuki Nakajima, Eujin Lee, Florian Yger, Fabrice Soncin, Yukiko T. Matsunaga, A vascular endothelial growth factor-dependent sprouting angiogenesis assay based on an *in vitro* human blood vessel model for the study of anti-angiogenic drugs, *EBioMedicine*, 27 (2018), 225–236. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.12.014.

3. 高橋治子, 加藤佳祐, 小林正嘉, 上山憲司, 松永行子, OCT技術を利用した3次元 *in vitro* 血管新生モデルのライブイメージング, 生産研究, 69 巻 3 号(2017), 123–126. DOI: 10.11188/seisankenkyu.69.123.
4. Joris Pauty, Ryo Usuba, Haruko Takahashi, Junichi Suehiro, Kanoko Fujisawa, Kiichiro Yano, Tomohiro Nishizawa, Yukiko T. Matsunaga, A vascular permeability assay using an *in vitro* human microvessel model mimicking the inflammatory condition, *Nanotheranostics*, 1 (2017), 103–113. DOI:10.7150/ntno.18303.
5. Haruko Takahashi, Keisuke Kato, Kenji Ueyama, Masayoshi Kobayashi, Gunwoong Baik, Yasuhiro Yukawa, Jun-ichi Suehiro, Yukiko T. Matsunaga, Visualizing dynamics of angiogenic sprouting from a three-dimensional microvasculature model using stage-top optical coherence tomography, *Scientific Reports*, 7 (2017), 42426. DOI: 10.1038/srep42426.

〔依頼講演〕(計1件)

1. 高橋治子, 松永行子, 薬剤評価のための *in vitro* 微小血管モデルの構築, 第56回日本生体医工学会大会, 仙台, 2017年5月

〔学会発表〕(計5件)

1. 高橋治子, 松永行子, 3次元 *in vitro* 血管チップの作成とOCTによる血管新生過程の可視化, 第25回日本血管生物医学学会学術集会, 大阪, 2017年12月
2. 高橋治子, 松永行子, 3次元 *in vitro* 微小血管モデルデバイスの作製と応用, 第12回ナノ・バイオメディカル学会大会, 筑波, 2017年11月
3. 高橋治子, 松永行子, OCT技術を用いた *in vitro* 血管新生モデルの3次元ライブ観察, 「細胞を創る」研究会 10.0, 京都, 2017年10月
4. 高橋治子, 松永行子, OCTを用いた3次元 *in vitro* 血管新生モデルの観察, 第26回MRS-J, 横浜, 2016年12月
5. Haruko Takahashi, Yukiko T. Matsunaga, Non-invasive visualization

of angiogenesis dynamics in 3D *in vitro*
microvasculature model by OCT, ICBS
2016, Tokyo, Japan, November, 2016

〔受賞〕（計 1 件）

1. 学会賞, 第 12 回ナノ・バイオメディカル
学会大会, 筑波, 2017 年 11 月

〔その他〕

所属研究室ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 治子 (TAKAHASHI Haruko)
東京大学・生産技術研究所・特任助教
研究者番号：70775767