

形態形成理解のためのマイクロデバイス内における毛細血管網の再構築

横川 隆 司*

Regenerating Capillary Network in a Microfluidic Device for Understanding Morphogenesis

Ryuji Yokokawa*

Conventional method to understand morphogenesis has relied on *in vitro* short-term culture duration, which was prepared by retrieving *in vivo* samples to a Petri dish. To elongate the culture time *in vitro*, delivering nutrients and oxygen to the target tissue is critical. Here, we propose a microfluidic device to create a capillary network to support such a delivery, which elongate the tissue culture duration for understanding morphogenesis *in vitro*. Key achievements of this project are design and fabrication of the microfluidic device, optimization of Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) culture condition, and the network (angiogenesis) assay. We will introduce tissues to the device and evaluate how their culture duration is elongated by our method. Analysis of morphogenesis will follow these fundamental studies.

1. 研究の背景・目的

微小流体デバイスを用いた単一細胞レベルでの細胞培養、解析技術が確立してきたことに伴い、近年ではボトムアップ的にデバイス内でスフェロイドを作製したり、数 mm スケールの細胞塊を作成したりできるようになった。しかし、機能的な組織まで組み上げた例はなく、ボトムアップのみにより細胞から組織を組み上げることは現状では難しい。一方で、発生生物学の分野では *in vivo* の組織を直接取り出して培養する器官培養という技術により、その形態形成を理解する取り組みがある。例えばマウスの胚全体を培養することで生体に近い構造ができる。この器官のスケールは数 100 μm –数 mm スケールであり、マイクロデバイスが得意とするスケールの 10–100 倍である。しかしながら、組織の構成細胞数が増えれば増えるほど、内部への酸素供給が不足し観察される形態形成現象が *in vivo* を反映したものにならないという問題がある。したがって、器官培養において毛細血管網を利用した十分な酸素供給が可能なシステムを構築することは、機能する組織を理解するうえで非常に重要な技術である。

血管網は生体内において線維芽細胞からの分泌物に血管内皮細胞が誘導され、細胞外基質中に自発的に形成される。これまでに血管内皮細胞により血管網を再構成できるという報告(1)があるが、組織と血管網を接続することにより、組織の長期培養を実現した例はない。そこで、我々は、最終的に細胞凝集体スフェロイドを組織のモデルとし、血管網と接続することで長期培養が可能であることを示すことを目標とした。そのため、本研究では、デバイス内での血管網形成に適したゲルの選定、微小流体デバイスの設計と製作、その内部における HUVEC の培養と血管新生アッセイをおこなった。最終的には、図 1 に示すようなマウス初期胚を中央部に配置し、両側から血管新生により養分等を供給することで長期培養を可能にするデバイスを目指している。

2. 実験方法

これまで、HUVEC の培養には様々な細胞外基質が用いられているため、本研究の血管新生アッセイに適した基質を選定するための実験をおこなった。コラーゲンゲル、フィブリンゲル、マトリゲルを用いて、デバイス内で想定される HUVEC がゲルに包埋されその上に培地が存在する状態(図 2 の方法 1) とゲル上に HUVEC を含む培地が存在する状態(図 2 の方法 2) について比較実験をおこなった。

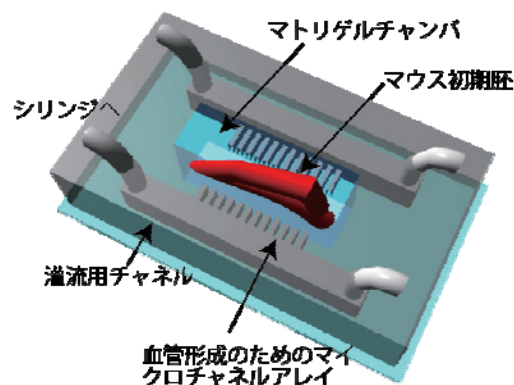


図 1. マウス初期胚の形態形成理解のための「マルチスケール長期培養デバイス」の概念図

2014年3月17日 受理

* 豊田理研スカラー (京都大学工学研究科マイクロエンジニアリング専攻)

次に、HUVECの血管新生アッセイをおこなうためのデバイス開発を進めた。フィブリンゲル内に向かって血管新生が起こることが知られているので(2)、フィブリンゲル用のチャンネル(図3のチャンネル番号3)を中央に配置した流体デバイスを作製した。5本のチャンネルが100 μm 間隔の柱で仕切られており、PDMSとガラスボトムディッシュをプラズマ接着することで作製した。図中のチャンネル2, 3, 5にそれぞれHUVEC, フィブリンゲル, Lung Fibroblast (LF)を導入し培養を行った。チャンネル5にはフィブリンゲルに包埋したLFを配置することで、LFからの成長因子がチャンネル3および4を介して拡散し、HUVECの血管新生を促進することを期待した。

製作したデバイスを用いて、血管新生の起こりやすい条件を検討した。検討したパラメータとしては、HUVECとLFの播種密度、フィブリンゲルの濃度、デバイス内への細胞播種方法などである。形成された血管網は蛍光レクチンで染色すると共に、漏れがないかを確認するため蛍光ビーズを流し観察をおこなった。

3. 結果・考察

それぞれのゲルで培養した結果、図2の方法1ではフィブリンゲルのみ播種直後から細胞が増殖している様子が観察され、他の2つでは増殖が見られなかった。一方、方法2のようにゲルでコーティングしたディッシュ上で培養した場合は、コラーゲンゲルにおいて最も細胞の増殖が確認された。このことから、デバイス内においてはフィブリンゲルとコラーゲンゲルを用いた実験を並行して進めたが、以下ではフィブリンゲルを用いた場合の結果についてのみ報告する。

デバイス内のチャンネル3に対してフィブリンゲル濃度1-5%の範囲を用いてゲルを導入した。PDMSの疎水性を向上させることで、低濃度のフィブリンゲルであってもチャンネル3のみにゲルをとどめる技術を確認した。その後、LF(播種密度0-1 $\times 10^7$ cells/ml)を含むフィブリンゲルをチャンネル5に導入しその他のチャンネルはEGM-2培地で満たした。24時間培養後にLFの成長を確認した上で、HUVECをチャンネル2に導入し培養したところ、図4のようにLFの濃度に応じて血管新生が見られた。図4は播種4日目後の様子であり、血管網はLFが多いほどゲル内への伸びが早く、LFが存在しなければ伸びてこなかった。また、ビーズが血管網内部に留まったことから、漏れがないことも確認した。

4. まとめと今後の展望

本研究により、LFが多いほど血管形成が促進されること、また形成されたネットワークに漏れがないことが分かった。今後は、LFの分泌物の拡散とHUVECの血管形成の関係を明らかにして血管形成の最適化を行い、スフェロイドを組織モデルとしてデバイスに導入し血管網との接続を試みる。

REFERENCES

- (1) A. C. Newman, M. N. Nakatsu, W. Chou, P. D. Gershon, C. C. Hughes, "The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation", *Mol. Biol. Cell*, 22, 3791-3800, 2011.
- (2) J. H. Yeon, H. R. Ryu, M. Chung, Q. P. Hua, N. L. Jeon, "In vitro Formation and characterization of a perfusable three-dimensional tubular capillary network in microfluidic devices", *Lab Chip*, 12, 16, 2815-2822, 2012.
- (3) T. Hayashi, H. Shintaku, H. Kotera, T. Miura, R. Yokokawa, "組織培養のためのマイクロ流体デバイス内におけるHUVECを用いた管路形成", 第27回化学とマイクロナノシステム学会, 2013.

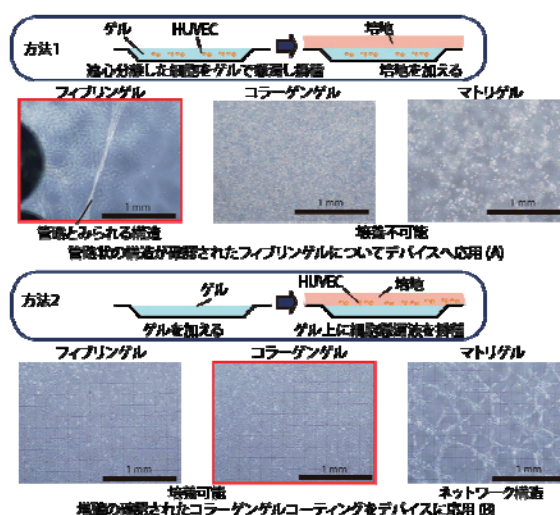


図 2. 血管新生アッセイに用いるゲルの検討

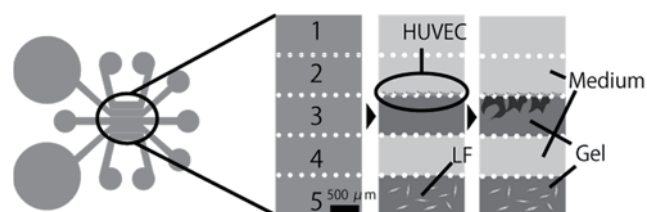


図 3. 本研究で設計した血管新生アッセイ用微小流体デバイス

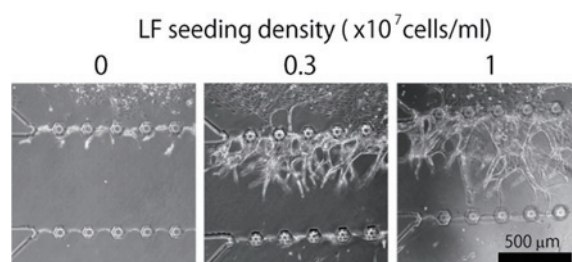


図 4. LFの播種密度による血管新生の違い