

APPLICATION NOTE

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R 細胞観察装置 BioStudio-T 画像解析ソフトウェアモジュール General Analysis

Microphysiological systemsを活用した3D血管新生アッセイ

血管新生は、生殖、発生、創傷修復といった生理的プロセスに関連する一方で、がん、自己免疫疾患、加齢性黄斑変性症、アテローム性動脈硬化症などの疾患とも深く関係しています。特に、がん細胞の転移や腫瘍の成長には血管新生が不可欠であることから、血管新生はがんの重要な特徴の一つとみなされ、創薬の標的として研究が進められてきました。血管新生のプロセスを模倣した*in vitro*アッセイは、抗がん剤などの創薬における薬物スクリーニングに応用可能です。本アプリケーションノートでは、AIM Biotech社のMicrophysiological Systems (MPS) であるidenTxシリーズを活用した、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた3D血管新生アッセイの検証事例をご紹介します。

実験の概要

idenTxシリーズは、培地の灌流による内皮細胞 (EC) へのせん断応力に加え、血管新生誘導因子の濃度勾配や間質流を制御することで、*in vitro*モデルの生理学的模倣精度を向上させることが可能です。間質流は、ゲル内の血管誘導因子濃度勾配と相乗的に作用し、流れの方向性に沿った血管新生を促進します¹。この特性により、従来の2Dおよび3D細胞培養法と比較して、より生理学的機能が高い血管新生モデルの構築が可能です。本検証では、AIM Biotech社のidenTx3/9 (図1a, b) およびidenTx40 (図1c) を使用しました。AIM Biotech社のMPSでは、各培地ポート間の高低差を利用した重力による灌流が、せん断応力やゲル内の間質流を発生させます (図1d, e, f, g)。ハイドロゲルチャンネルには、コラーゲンIを充填し、初代HUVECは片方の培地チャンネルのみに播種しました (図1h, i)。もう一方の培地チャンネルには血管新生誘導因子を含む培地を添加しました。1日2回培地交換し、一方向性の間質流が発生する環境下で4日間培養することで血管新生を誘導しました。

血管新生に伴う過剰なゲル分解に耐性を持つコラーゲンの選別

血管新生の誘導から3日目、ポスト周辺のコラーゲンゲルが分解される現象が観察されました (図2a)。この現象は、コラーゲンの製造メーカーを変更した場合でも確認され、HUVECの過剰活性化に伴うプロテアーゼ分泌が原因であると考えられました^{2, 3}。本3D血管新生アッセイでは、パターン化したコラーゲンゲル内の血管新生の長さが重要な評価指標の一つです。しかし、ゲルの過剰分解は、正確な評価を妨げます。比較検討した結果、E社のコラーゲン製品が分解耐性を持つことを特定しました (図2b)。E社のコラーゲンゲルを用いた、4日間の血管新生誘導では、ゲルの分解が抑えられ、血管新生の伸長が確認されました (図2c)。

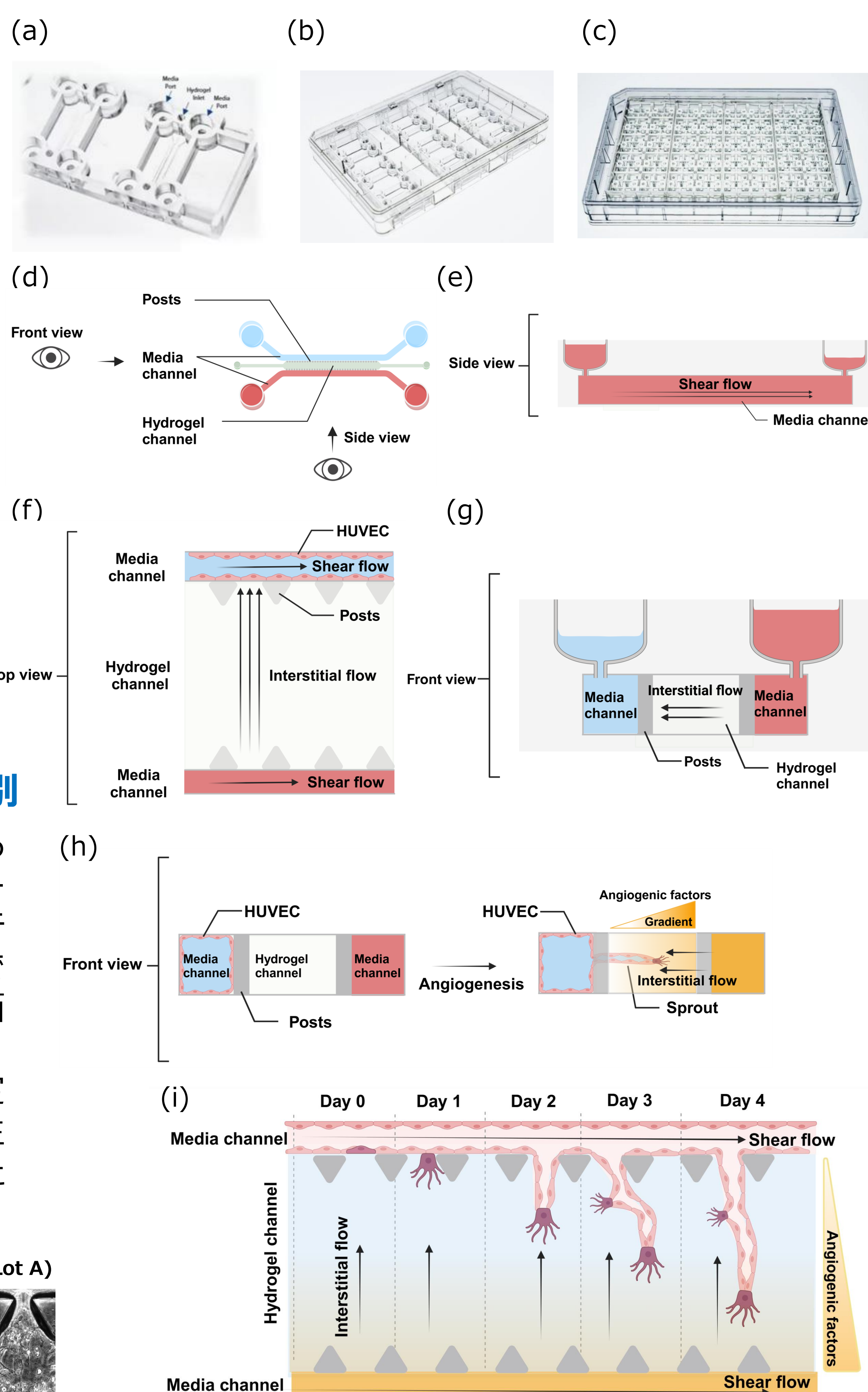
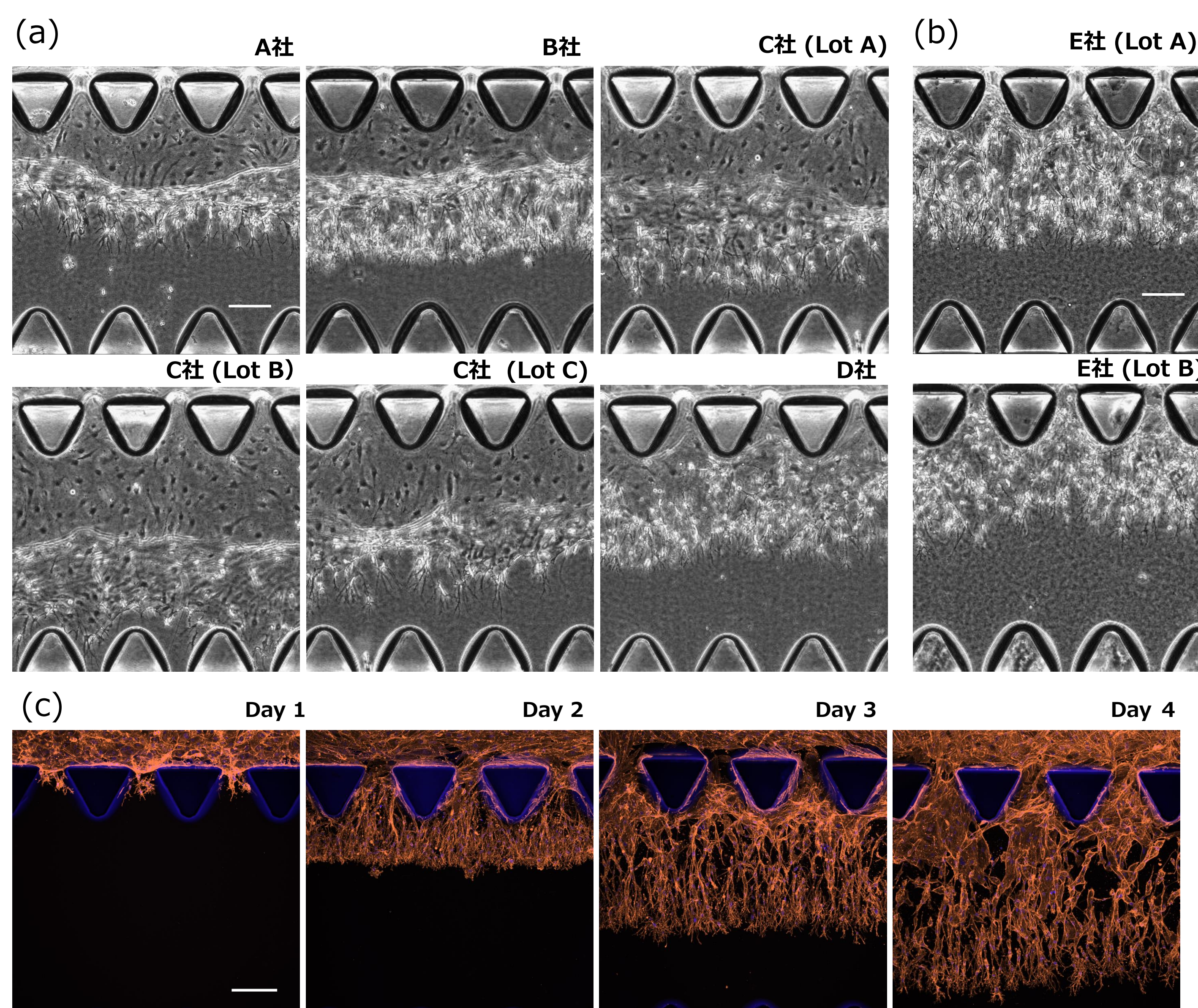


図1. 3D血管新生アッセイの概略図

使用したAIM Biotech社のMPSデバイス、idenTx3 (a)、idenTx9 (b)、および idenTx40 (c) (参照URL: <https://aimbiotech.com/>)。 (d) idenTx3/9のマイクロ流体ユニット/チップの概略図。3つのマイクロ流体チャンネルは三角柱状のポストによって区切られており、中央のゲルチャンネルにハイドロゲルをパターン化します。このゲルチャンネルは、ポストに隣接する培地チャンネルと接触しています。 (e) idenTx3/9流路の側面図。 (f) idenTx3/9流路の上面図。 (g) idenTx3/9流路の前面図。 (h, i) 血管新生スプラウト形成を促進する誘導因子の濃度勾配と間質流。各パネルの矢印は、培地チャンネル内のせん断流およびゲルチャンネル内の間質流の方向を示しています。絵は BioRender (<https://www.biorender.com/>)により作成しました。

図2. 3D血管新生の誘導に伴う過剰なゲル分解と分解耐性を持つコラーゲンの選別

(a) 各社コラーゲンゲルにおける血管新生の位相差画像。 (b) E社コラーゲンゲルにおける血管新生の位相差画像。MPSにはidenTx3/9を使用し、各コラーゲンゲルはすべて2.5 mg/mlの濃度に調整してゲル化させました。細胞はHUVEC (PromoCell社、Lot A) を使用し、血管新生誘導因子として50 ng/ml FGF-2、100 nM PMA、500 nM S1P、および50 ng/ml VEGFを添加しました。各位相差画像は、血管新生誘導3日後に細胞観察装置BioStudio-T (Nikon) を用いて撮影しました。 (c) 3D血管新生の共焦点画像。共焦点画像は、各々の培養日数において固定化した標本をファロイジン (オレンジ: F-アクチン) およびヘキスト (青: 細胞核) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡システムAX (Nikon) を用いて10倍対物レンズでZスタック撮影を行い、Maximum Intensity Projection (MIP) 画像を示しました。スケールバー=200 μm。

3D血管新生に及ぼす抗がん剤スニチニブの効果

HUVECの血管新生に対する誘導因子の影響を検証するため、4日目に誘導因子を添加した条件と添加しなかった条件を比較しました（図3a）。誘導因子を添加した条件では、血管新生が促進され、XZ断面画像から管腔構造を有する血管が形成されていることが確認されました（図3b）。

次に、MPSで形成された血管新生に対する薬効評価の妥当性を検証するため、既知の血管新生阻害剤である血管内皮成長因子受容体2（VEGFR2）阻害薬のスニチニブを用いて評価を行いました（図3c）。NIS-Elements（Nikon）のGA3機能を用いて蛍光共焦点画像を解析した結果、スニチニブは10 μMの濃度で血管新生を有意に抑制することが確認されました（図3d、e、f、g）。

また、この3D血管新生アッセイの信頼性を評価するため、溶媒コントロール（DMSO処理）とスニチニブ（10 μM処理）の条件を比較し、血管新生のMax Vertical Length（最大垂直長）を基にZ'ファクターを算出しました。Z'ファクターは0.49を示し、本MPSが抗がん剤の血管新生阻害効果を評価する系として利用可能であることが示唆されました（図3d）。

3D血管新生アッセイの頑健性

さらに、異なるドナー由来のHUVECを用いて、本評価系の頑健性を検証しました。PromoCell社の1ロット(Lot B)およびLONZA社の2ロット(Lot C、D)を使用し、スニチニブの血管新生抑制効果を評価したところ、Max Vertical Lengthに基づくZ'ファクターは0.39～0.76の良好な値を示しました（図4a、b、c）。複数ロット間で安定した結果が得られたことから、本3D血管新生アッセイは、スニチニブの薬効を定量的かつ頑健に評価できる手法であることが示されました。

まとめ

本アプリケーションノートでは、AIM Biotech社のMPSを用いた3D血管新生アッセイを検証しました。本アッセイは、血管新生プロセスを生理学的に高い再現性で模倣できることが示され、抗がん剤スニチニブによる血管新生阻害効果の評価においてもその有用性が確認されました。また、HUVECの異なるロット間でも一貫した結果が得られ、評価系としての頑健性の高さが示されました。本アッセイは、抗がん剤にとどまらず、血管新生に関連する幅広い疾患治療薬の開発や評価への応用が期待されます。

著者 株式会社ニコン 木根原匡希、前田美和、早川知子

参考論文

1. Synergy between interstitial flow and VEGF directs capillary morphogenesis *in vitro* through a gradient amplification mechanism, Cara-Lynn E Helm et. al., PNAS USA., 2005, 1;102(44):15779-84.
2. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation, M Luisa Iruela-Arispe et. al., Dev Cell., 2009, 16(2):222-31.
3. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis *in vitro*., Duc-Huy T. Nguyen et. al., PNAS USA., 2013, 23;110(17):6712-7.

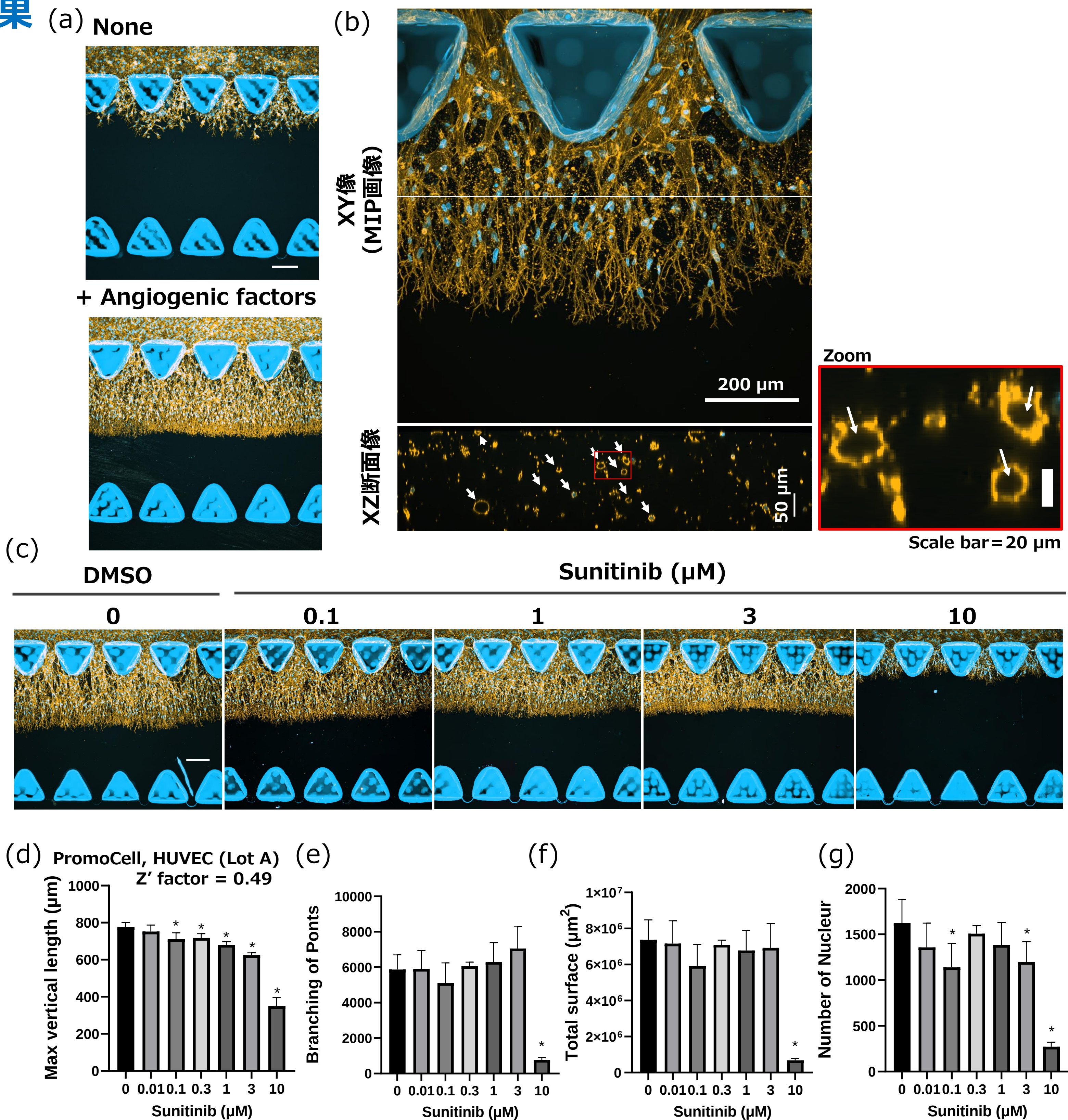


図3. HUVECの3D血管新生に及ぼす抗がん剤スニチニブの効果
(a) 血管新生の共焦点画像。(b) 血管新生の共焦点画像のXZ断面画像。白ラインにおけるXZ断面画像を示しています。矢印は血管の管腔構造を示しています。右下のパネルは赤枠の拡大図を示しています。(c) スニチニブを処理した血管新生の共焦点画像。(d-g) 血管新生の定量画像解析：最大垂直長 (d)、分岐数 (e)、総面積 (f)、核の数 (g)。エラーバーはn=5の標準偏差 (SD) を示します。*はDMSO処理と比較した場合のDunnett法による検定でp < 0.05を示します。血管新生は、HUVEC（PromoCell社、Lot A）を使用し、idenTx40およびE社のコラーゲンを用いて、50 ng/ml FGF-2、0.5 nM PMA、500 nM S1P、50 ng/ml VEGF、および各濃度のスニチニブを添加し、4日間培養することで誘導しました。共焦点画像は、標本を固定化後、ファロイジン（オレンジ：F-アクチン）およびヘキスト（青：細胞核）で染色し、共焦点レーザー顕微鏡システムAX（Nikon）を用いて10倍対物レンズでZスタック撮影を行い、MIP画像として示しています。ポストはヘキストの励起波長により自家蛍光（青）を示します。スケールバー＝200 μm

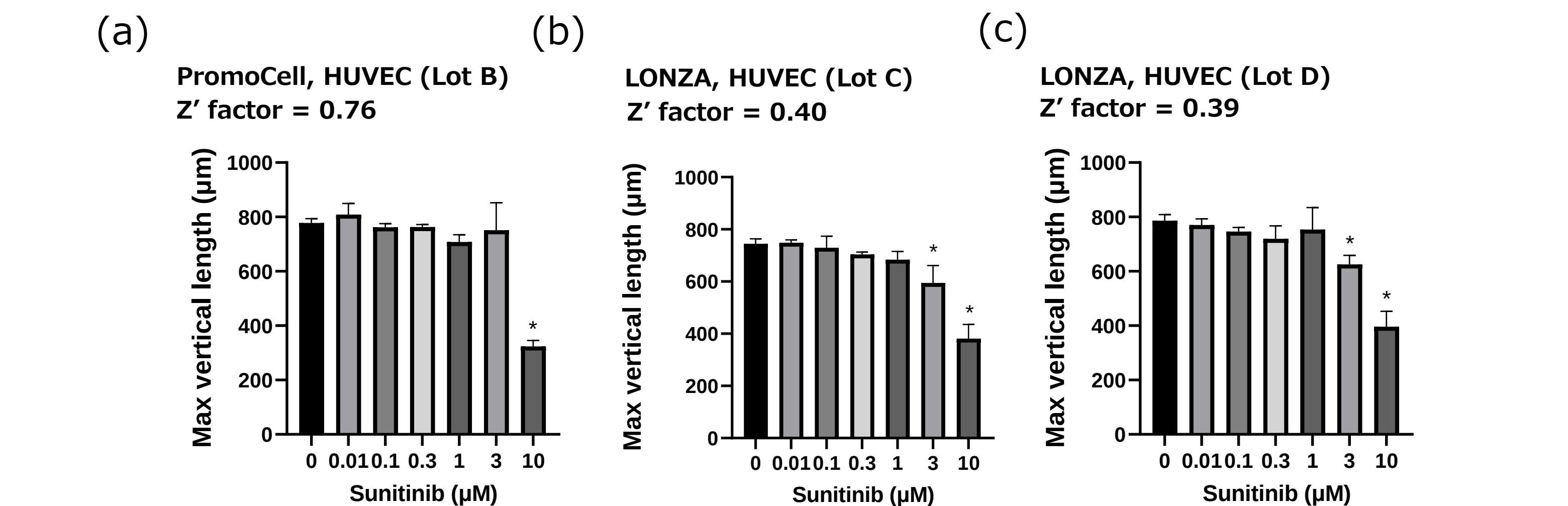


図4. HUVECの3D血管新生アッセイに及ぼす細胞のロット間差
(a, b, c) 各HUVECの3D血管新生の定量画像解析。血管新生は、PromoCell社 (a) およびLonza社 (b, c) のHUVEC、idenTx40、およびE社のコラーゲンを使用し、50 ng/ml FGF-2、0.5 nM PMA、500 nM S1P、50 ng/ml VEGFおよび各濃度のスニチニブを添加し、4日間誘導しました。各グラフは、ファロイジン染色画像から解析した血管新生の長さを示しています。ロット間差における各Z'ファクターは、DMSOおよびスニチニブ（10 μM）処理後の血管新生の長さから計算し、各パネルに示しています。エラーバーはn=5の標準偏差 (SD) を示します。*はDMSO処理と比較した場合のDunnett法による検定でp < 0.05を示します。

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

- ・生細胞への光毒性が低く、光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージング
- ・高速：最速毎秒720フレーム（レゾナント 2048 ×16画素）
- ・高解像度：最高8 K（ガルパノ）/ 2 K（レゾナント）
- ・高スループット：視野数25 mmの超広視野

細胞観察装置 BioStudio-T

- ・CO2インキュベーター内に設置可能
- ・対物レンズの移動によりウェルプレート全体を撮影可能
- ・振動のない安定したタイムラプス撮影が可能
- ・AIM biotech社idenTxシリーズのガス透過性ラミネートに対応

