

血管誘導機能を有する人工殻を用いた 血管新生プラットフォームの開発

九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能応用工学専攻・准教授 川原 知洋

■ 緒 言

近年、生活習慣病の増大や高齢者の増加に伴い、新薬の開発や疾患の原因分析など、医療分野における技術発展が高く望まれている。近年では、例えば動物細胞を培養した生体モデルを用いて、in vitro(生体外)で効率的に薬剤試験を行なうことが試みられている¹⁾。しかし現状では、血管系との連結や生体の複雑なメカニズムなどを再現できていないため、動物実験などの生体を用いた in vivo 試験が依然として重要である。そのため、ブタやマウスなどを使用した動物実験が行われているが、コストが大きいという問題や倫理的な問題²⁾を孕んでおり、実験動物の使用が厳しくなっている。そのため、近年ではゼブラフィッシュやアフリカツメガエルなどの初期胚を用いる代替法が提案されている^{3,4)}。これら代替動物は、低コストで倫理的な制約が小さいという利点がある。

その中でも我々は、ニワトリの初期胚を代替動物として利用する方法に着目している。以下にニワトリ胚を用いる利点を挙げる。一つ目は、培養開始後 10 日目までは、神経機能が発達しておらず、胚が痛みを感じることなく試験が出来るため、倫理的な制約が比較的小さい点である⁵⁾。二つ目は、卵は安価であり、黄身を栄養源として成長するため培養液等が必要なく、実験室環境でも容易に培養できるため、低コストな点である。三つ目は、ニワトリの初期胚は、短いライフサイクル(21 日程度で孵化)を有するため、試験の結果が短期間で得られる点である。このような特徴を活かして、近年では図 1 のようにニワトリ胚の漿尿膜(CAM: chorioallantoic membrane)上にヒトがん細胞を培養し、抗がん剤や腫瘍転移を評価する実験手法が提案されるなど盛んに研究が行われている⁶⁾。

一方で、ニワトリ胚は卵殻で覆われているため内部を自由に観察・操作できないという問題がある。これに対し、酸素透過性の高いフィルムと透明容器を用いて人工殻を作成し、血管形成前の胚を容器に移して内部を観察しながら培養する方法が用いられているが⁷⁾、これらの研究では人工殻自体の最適な剛性や形状を考慮して設計されておらず、狙った部分を詳細に観察したり操作することが難しかった。

以上のような背景を踏まえ、我々は図 2 のような透明人工殻を機械工学的な観点から設計・製作し、胚を長期培養しながら自在な観察・操作を行うことができる技術を独自に開発してきた⁸⁾。また、付加価値を飛躍的に高めるために、人工殻表面に機能を集積化するコンセプトを提案し、その一例として人工殻にチャネル(流路)を形成することで、図 3 のように胚の漿尿膜上に形成される血管網を自律的かつ部分的に誘導できるという新しい知見を得た。しかしながら、血管が流路内に進入するメカニズムや誘導できる血管径の限界値などは明らかになっていなかった。

そこで、本研究課題では血管が自律的に流路内に誘導される現象の主要因を明らかにすることで部分血管誘導を行うための人工殻設計方法を確立するとともに、微小血管誘導等に应用することで、血管新生プラットフォームへの応用可能性について考察を行なった。

■ 方 法

1. 人工殻の作製

人工殻のフレーム部分は 40 mm 角のポリカーボネートを機械加工することで作製した。また、酸素透過膜については液状のポリジメチルシロキサン(PDMS: polydimethylpolysiloxane)をガラス板上に塗り広げ、ホットプレートで加熱して硬化させサイズが 40×40mm、厚み 0.3mm の膜を作製した。最終的に、フレームに酸素透過膜を貼り付けることで人工殻を構成する。

また、流路(チャネル)構造を持つ膜は図 4 に示すように 3 層構造となっている。1 層目(Inner layer)は、流路に血管網を誘導するための入り口となる穴(Φ1~2mm)を開ける。2 層目(Middle layer)には、チャネルと空気層を形成する。3 層目(Outer layer)は、形成した流路及び空気層に蓋をするための膜である。膜厚は、1 層目は 0.3mm、2 層目は 0.5mm、3 層目は 0.3mm とした。各層の膜を作製した後、液状の PDMS を接着剤として塗布して貼り合わせ、75 °C に設定したホットプレート上で 20 分間加熱して硬化させる。

2. 計測システムの構築

これまで、観察を行う際には、人工殻に移植したニワトリ胚をインキュベータから取り出して撮影を行うことが一般的であった。しかし、撮影のたびにインキュベータから取り出す行為は胚に対して大きなストレスを与えることになる。また、インキュベータの中に観察装置を一緒に入れ、撮影を行うこともできるが、結露などの問題があるため対策が必要であった。そこで、透明窓を有するインキュベータを使用し、外側から観察を行うことのできる観察システムを構築した。カメラを取り付けたマイクロスコープをステージに固定し、ステージの位置制御とマイクロスコープの倍率を変化させ、1台のカメラで撮影を行なうことで全体の画像を取得する。なお、1週間程度の観察を持続的に行なえるようにするため、ステージ位置決め制御、観察倍率調整、照明点灯制御、温度制御は1台のPCにより完全自動で行うことができるようなソフトウェアについても開発した。

また、ニワトリ胚の漿尿膜呼吸と膜の酸素透過率との相互作用によって生じる空気層内の圧力変化について詳細に計測するために、人工殻内(インキュベータ内)及び流路構造を有する膜にそれぞれ圧力センサを取り付けて調査を行なった。圧力のデータは1秒ごとにPCに取り付けたAD変換器(16bit)によって計測し、上記のタイムラプス撮影を行いながら同時にセンサデータの取得ができるようにした。

3. ニワトリ胚の移植と培養

有性卵をインキュベータ(温度 39℃, 湿度 80%)で3日間培養した後、オートクレーブで滅菌処理を行った人工殻に移し替え、再度インキュベータに戻して培養を行った(ニワトリ胚が大きく成長したあとに移植を実施すると、移植の際に出血が生じて生存率が著しく低下してしまうため)。なお、ニワトリ胚を用いた実験に関しては「九州工業大学動物実験等に関する規定」に則って、事前に実験計画書を学内の動物実験委員会に提出して承認を受けた上で実施した。また、実験時間を短くするなどニワトリ胚への苦痛や使用量をできるだけ低減できるように配慮した。

■ 結 果

1. 生存率と血管の形態

構築したタイムラプス観察装置を用いて、培養したニワトリ胚の経時観察を行った。図5(a)(b)より、培養開始後およそ5～7日目から血管網が流路内に誘導されているのが確認できる。培養13日程度を過ぎると、胚の成長による漿尿膜の縮小に伴い血管も縮小していくことが確認できる。また、この場合のニワトリ胚の生存率を図5(c)に示す。結果より、人工殻側面に流路を付加した場合においても、これまでの人工殻と同程度の高い生存率でニワトリ胚を培養できていることがわかった。これにより、血管を部分誘導することによる培養への大きな影響が無いことを確認できた。また、生存しているニワトリ胚では流路を側面に取り付けると90%以上の高い確率で流路内へ血管網が進入することを確認した。

次に、人工殻側面の流路部分に誘導されている組織を固定化して切片を作製し、その形態を調査した。HE染色を行い観察した結果を図6に示す。結果より、漿尿膜と血管が流路内に誘導されていることが確認された。この結果より、特定の条件で流路を形成した人工殻でニワトリ胚を培養すると、ニワトリ胚の血管を誘導できることが示された。

2. 誘導できる血管網の限界値

人工殻に付加するパターンの流路幅を変化させ、どの程度の細さの流路へニワトリ胚の血管を誘導できるか調査した。なお、流路幅が数2mm程度(深さ方向500 μ m)の場合は、手作業でパターンを作製することが出来ていたが、幅が100 μ m以下の流路を作製することは難しい。そのため、シリコンウェハにフォトリソグレイ(SU-8)を用いてマイクロパターン(型)を作製し、それをPDMSに転写して流路を作製した。様々な流路幅を持つ人工殻でニワトリ胚を培養した結果、図7のように最小で約30 μ m幅の流路に対して血管1本レベルで誘導が可能であることがわかった。また、流路幅が250 μ mより小さい場合においては、誘導された血管網が流路と平行に形成されることが確認できた。30 μ m以下のさらに細い流路への誘導も可能であると思われるが、幅が細くかつアスペクト比の大きいパターンを作製すると、型が壊れてしまったり、PDMSに転写した後に流路が閉塞するなどの問題点が生じたため、今後は流路作成方法に関してさらなる検討が必要である。

3. 誘導メカニズムの解明

人工殻に付加する流路形状が血管誘導に関係しているのではないかと考え、空気層の体積変化と血管誘導の関係性を調査した。結果を図 8 に示す。結果より、空気層の体積を大きくするにつれて誘導される血管領域が大きくなっているのが確認できた。このことから、人工殻を設計する際の空気層の大きさが血管誘導に大きく関係していることがわかった。そのため、現在の人工殻においてニワトリ胚の血管を部分的に誘導するためには、空気層の体積を少なくとも $200\sim 400\text{mm}^3$ 以上確保する必要があることが分かった。

さらに、ニワトリ胚の漿尿膜呼吸と膜の酸素透過率との相互作用によって生じる空気層内の圧力変化について圧力センサを用いて調査した。結果を図 9 に示す。結果より培養開始後は大気圧に対して陽圧であるが、培養経過に伴い空気層内が人工殻内に対して陰圧 (-0.1kPa 以下) になっていることが分かる。これより、ニワトリ胚が呼吸を行うことで空気層内の酸素が使用されて圧力差が生じ、血管がチャネル内に入り込んでいる (吸引されている) 可能性が高いことが示された。これらの結果より空気層内の圧力変化が重要なパラメータであることが確認されたため、次にシリンジポンプ (設定値: $1.0\mu\text{l}/\text{min}$) を用いて人工的に空気層内の圧力を変化させた比較実験を行った。結果を図 10 に示す。結果より、減圧した場合は、空気層内の圧力は陰圧になり、血管誘導が起きる事がわかった。一方で、加圧した場合は、空気層内の圧力は陰圧になることはなく、血管誘導も起きない事がわかった。この際、人工的にシリンジポンプで減圧すると、他の条件に比べて血管の誘導される領域が多くなるが、出血が生じたり、自身を吸引して誘導できる血管網のバラツキが大きくなってしまいうことが分かった。したがって、人工的に圧力変化を起こすよりも、ニワトリ胚自身の酸素消費と PDMS 膜の酸素透過との相互作用によって自然に陰圧を生じさせるほうが望ましい結果が得られることが明らかになった⁹⁾。

■ 考 察

これまでの実験結果より、血管の部分誘導は図 11 に示すようなプロセスで起こっていると考えられる。まず、人工殻の高い酸素透過性により、漿尿膜上の血管が側面に伸展してくる。その後、ニワトリ胚の酸素消費量の増加により、空気層内外に圧力差が生じ、血管網が流路内へ自律的に誘導される (ニワトリ胚の自己ポンピングメカニズム)¹⁰⁾。この方法は、環境を適切に設計すれば、外部ポンプや血管誘導因子を一切用いずに血管を部分誘導できることを意味しており、本研究課題で開発した方法は簡易かつ高精度に血管を誘導できるという利点を有する。

以上の知見を流路設計に応用した例を図 12(a) に示す。血管が誘導される条件を満たすように適切に設計を行うことで、複数チャネルへの同時誘導も可能であり、誘導した血管に対する薬剤刺激をより効率的に行なえるようになった。また、図 12(b) に示すように血管が人工殻から三次元的に飛び出したような形状でも誘導が可能であり、内径 $300\mu\text{m}$ のチューブ内にも誘導できることを確認した。これにより、誘導した血管に対して局所力学刺激を加えながら血管新生を観察するような全く新しい実験が可能となった^{11,12)}。

■ 要 約

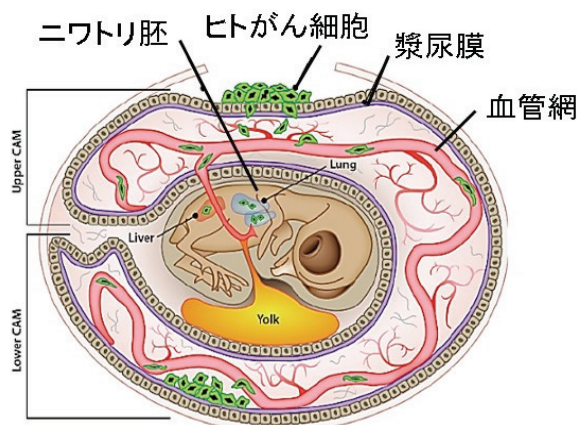
本研究課題では、実際の循環器と血液を用い一つも簡易に利用できる血管新生プラットフォームを開発することを目指し、流路を付加した人工殻内でニワトリ胚を培養し、形成される血管網を任意の位置・サイズに部分誘導する方法とその応用例について示した。成果をまとめると以下になる。

- ・人工殻側面に流路を形成することでニワトリ胚の血管網を高い成功率かつ高精度に誘導する方法を新たに確立した。
- ・誘導のメカニズムについて詳細に調査することで、外部動力等を一切必要とせずニワトリ胚の自己ポンピングによって血管網が誘導されることをはじめて明らかにした。
- ・実際に血管新生プラットフォームとしての応用可能性を有していることを確認した。

今後は、確立した手法を用いて細胞培養などの実験を行なうとともに、人工殻にさらに他の機能を付加する方法についても検討していく予定である。

■ 文 献

1. Takayama K et al. (2013) 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 34, 1781-1789.
2. Carlsson B(1986)Issues in animal experimentation-view of the animal rightist. *Acta Physiol Scand* 128, 50-68.
3. McGrath P, Li CQ(2008)Zebrafish : a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(9-10), 394-401.
4. Seabra R, Bhogal N(2010)In vivo research using early life stage models. *In Vivo* 24, 457-462.
5. Isachenko V et al.(2012)Comparison of in vitro-and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. *PLoS ONE* 7(3), e32549, 9 pages.
6. Liu M et al.(2013)The histone methyltransferase EZH2 mediates tumor progression on the chick chorioallantoic membrane assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma. *Transl Oncol* 6, 273-281.
7. Kamihira M et al.(1998)Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Dev Growth Differ* 40, 449-455.
8. Huang W, Arai F, Kawahara T(2015)Egg-in-Cube : design and fabrication of a novel artificial eggshell with functionalized surface. *PLoS ONE* 10(3), e0118624, 20 pages.
9. Huang W, Arai F, Furukawa KS, Ushida T, Kawahara T(2017)An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane. *PLoS ONE* 12(4), e0175595, 20 pages.
10. 板山, 川原(2017)マイクロ流路を有する人工殻で培養したニワトリ胚の血管誘導メカニズムの解明と応用, 第36回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2P03.
【化学とマイクロ・ナノシステム学会 第36回研究会 優秀発表賞受賞, 2017.10.5】
11. Itayama M, Kawahara T(2017)3D blood vessel shaping of chick embryo for mechanobiology research, *21st Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ -TAS)*, 1487-1488.
12. 板山, 福田, 川原(2017)微細パターンを付与した人工殻を用いたニワトリ胚漿尿膜の部分誘導とその応用, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 1P-0864.



Ref) Liu et al., *Trans Oncol*, 2013
(p. 275, Fig. 1を一部改変)

図1：ニワトリ胚を用いた従来研究の一例



図 2：従来開発した人工殻の外観

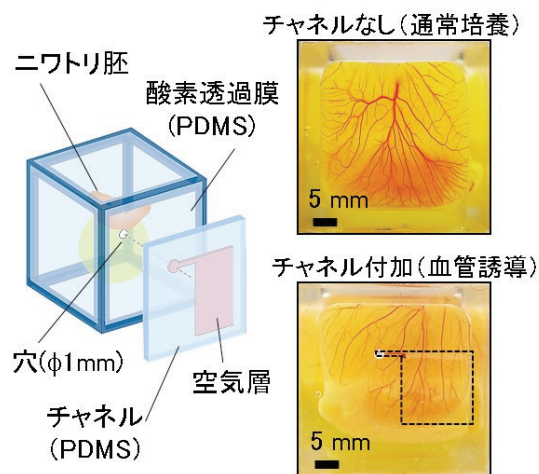


図 3：人工殻への血管誘導機能の付加

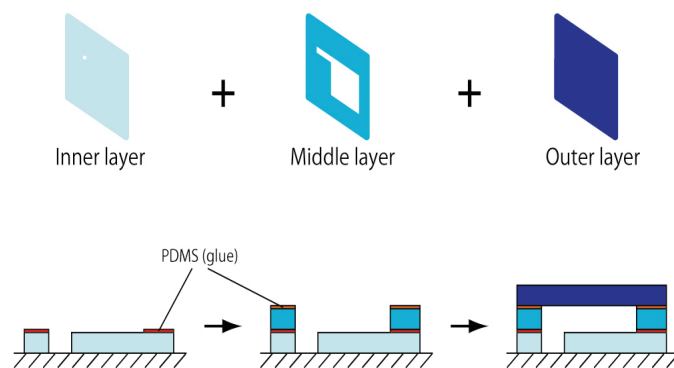
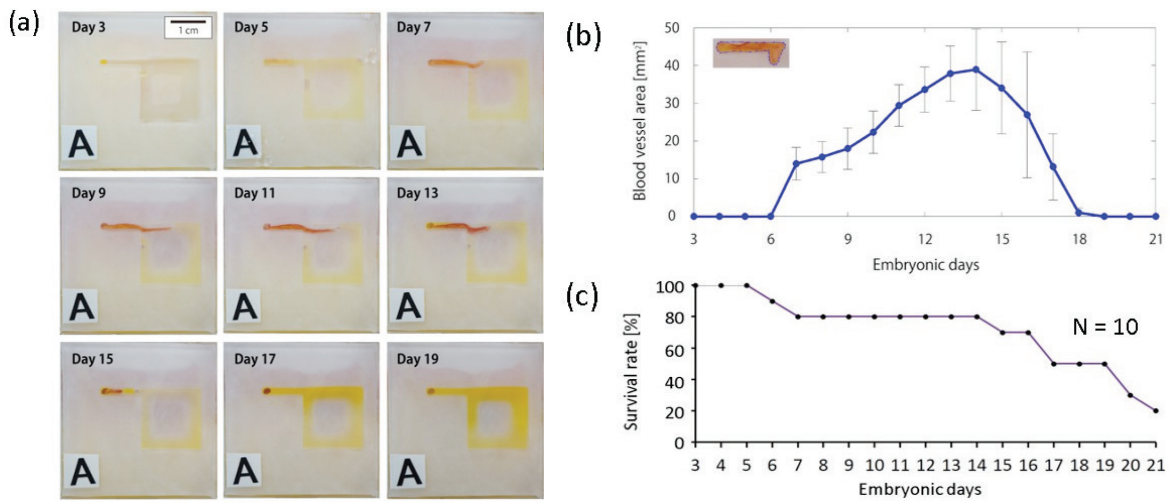


図 4：人工殻に付加する流路構造と作製方法



((a)では誘導された血管を観察しやすくするため、膜に白色インクを混ぜて作製している)
図5：血管網の誘導の様子と生存率に与える影響

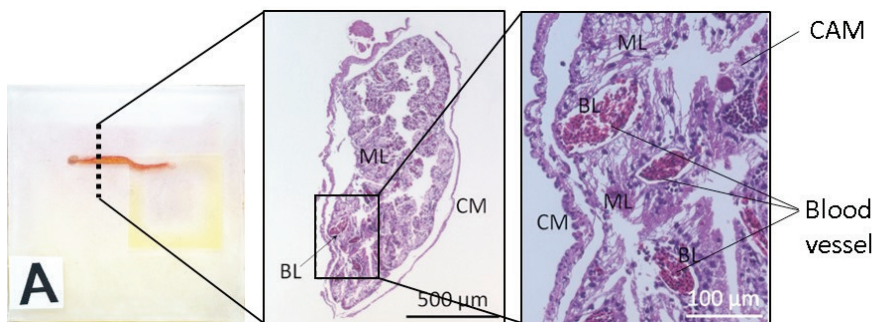


図6：誘導した血管の切片標本

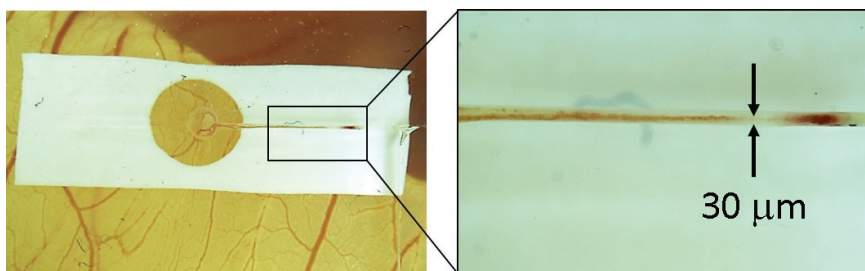


図7：微小流路への誘導の例(血液の循環も観察された)

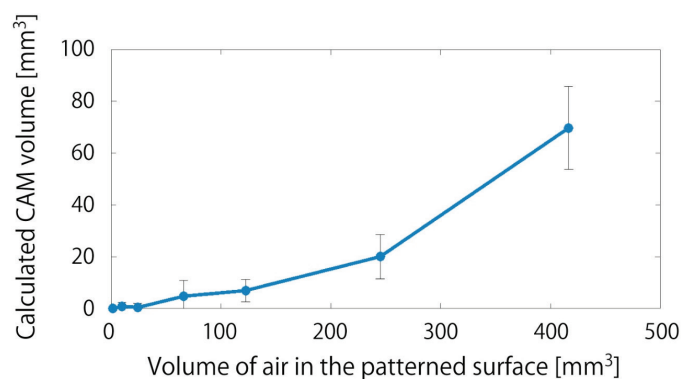


図 8：空気層の体積と誘導される血管網の関係

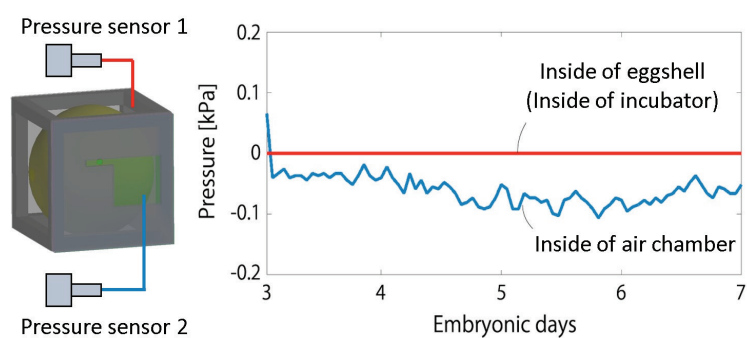


図 9：空気層内の圧力変化

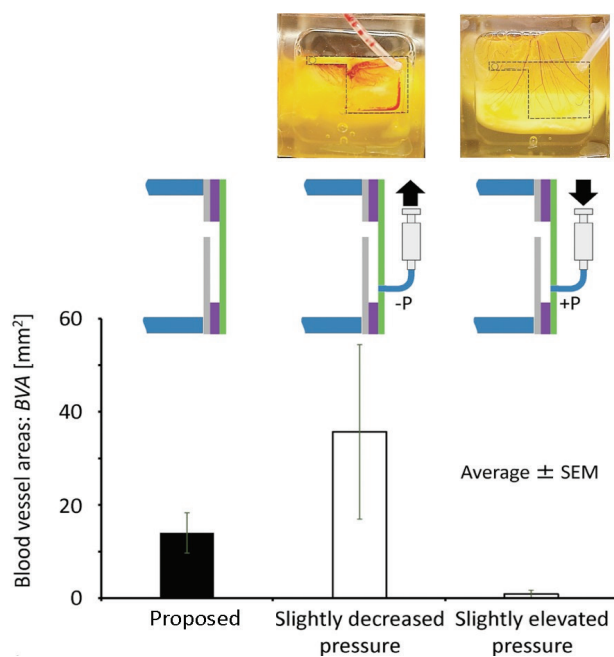


図 10：比較実験の結果

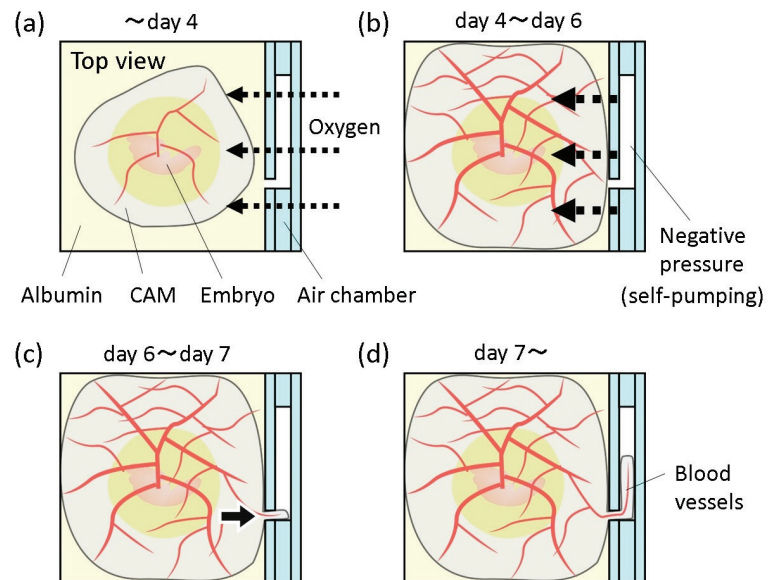


図 11：血管誘導プロセス
(ニワトリ胚の自己ポンピングメカニズムを用いた誘導)

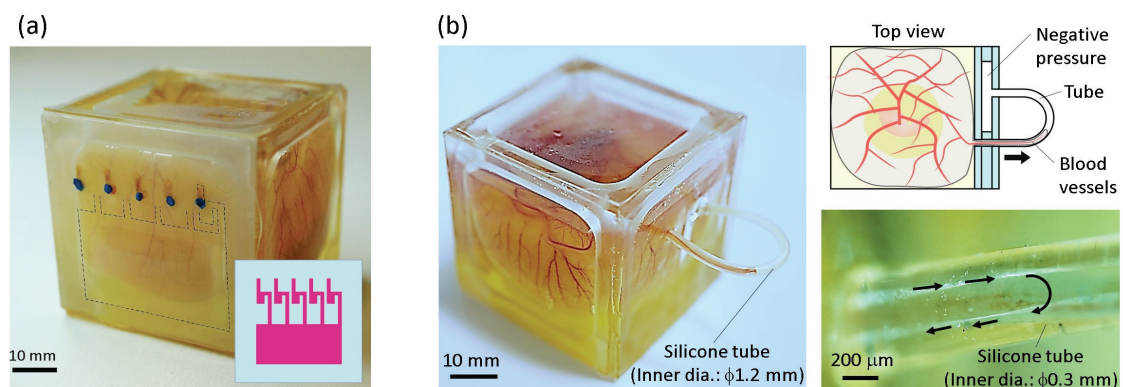


図 12：応用例