

論文の内容の要旨

論文題目 二方向の化学濃度勾配下における

血管内皮細胞の遊走性評価のための微小流体デバイス

氏 名 西村 啓吾

1. 序論

本研究の目的は、二方向に形成された生化学物質の濃度勾配下における血管内皮細胞の遊走性を観察および評価可能なデバイスを構築することである。

血管新生は、既存の血管から新しい血管が形成される生理学的なプロセスであり、血管内皮細胞の遊走を起点として開始される。生体内では、その遊走の方向性の制御が、正常な胚発生や発育に重要な役割を果たす。生体内で血管内皮細胞の遊走の方向性を決定する重要な要因の一つが、種々の生化学物質による複雑な濃度勾配の分布である。そのような生化学物質の例として、これまでに、血管内皮増殖因子(VEGF)、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)、ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (PMA)、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) などによる血管内皮細胞の遊走の促進と調節への効果が、*in vitro* の実験系で示されてきた。また、通常の生体内には極微量しか存在しないが、過剰な塩化コバルト (CoCl_2) が擬似的な低酸素状態を誘導し、間接的に VEGF の産生を刺激することが報告されてきた。近年、微小流体デバイスを用いることで生化学物質の濃度勾配を形成し、ゲル上に播種された血管内皮細胞の層や、ゲル中に包埋されたスフェロイドからの血管内皮細胞の遊走を、濃度勾配の起点、ここでは標的物質の流れる流路の方向へと制御する研究が報告されてきた。しかし、これらのデバイスでは、標的物質の流れる流路からゲルおよび血管内皮細胞の層に向かう一方方向にしか濃度勾配を形成できないか、あるいは複数の流路から異なる標的物質を流したとしても、それらの物質がスフェロイド周囲のゲル中に混在するようになるため、複数

の方向性を持った濃度勾配の形成が不可能であった。

そこで本研究では、二方向に形成された生化学物質の濃度勾配下における血管内皮細胞の遊走性を観察および評価可能なデバイスの構築を目的とする（図 1）。具体的には、まず両脇にゲルが存在する捕捉部を持つ微小流路デバイスを設計および製作し、血管内皮細胞からなるスフェロイドを捕捉できることを示す。次に、ゲルの外側にある流路に二つの異なる種類および濃度の生化学物質を流すことで、スフェロイドを挟んで二つの方向に異なる濃度勾配を形成できることを示す。最後に、提案するデバイスを用いて、二方向から成長因子や血管新生を促進する化学物質を導入した場合の、血管内皮細胞の遊走性を定量評価できることを示す。

2. デバイスの作製と機能評価

序論で述べた各種の機能を実現するために、両脇にゲルが存在する捕捉部を持ち、捕捉部のある中央流路、およびその両外側にゲルを挟んで隣接する二本の流路を持つ微小流路デバイスを設計した。設計した三次元データに基づき三次元造形装置により形成されたモールドを用いて、ソフトリソグラフィ法によりシリコン系樹脂とガラスからなる微小流路デバイスを作製した。これを、三次元造形装置により造形した培地チャンバと接着させることで、培養デバイスを作製した（図 2）。本デバイスの機能を確認するため、まず外側の二本の流路に蛍光着色したゲル溶液を流した後に、空気を導入して流路中のゲル溶液を部分的に除去した。それにより、中央流路と両外側に隣接する二本の流路とを隔てる位置で、かつ捕捉部の両脇に位置する局所的な領域にゲルを形成した（図 3）。次に、蛍光タンパク質発現型血管内皮細胞と肺線維芽細胞からなるスフェロイドを、捕捉部のある流路（幅および高さ $500\text{ }\mu\text{m}$ ）に導入し、二つのゲルの間に捕捉した（図 4）。この時、スフェロイドが二つのゲルとの接着に成功する割合（捕捉成功率）は、スフェロイドの直径が $700\text{ }\mu\text{m}$ 以下の場合には、直径に依らず約 70–80% という安定した値を示すことが明らかになった（図 5）。続いて、外側の流路に蛍光物質を導入したところ、蛍光物質がゲル中を通過して徐々に中央流路に達し、さらに中央流路の送液口を通過して微小流路デバイスの外部に続く流れが生じることで、ゲル中に濃度勾配が形成された。これらの結果から、作製した培養デバイスが、局所的なゲル形成機能、スフェロイド捕捉機能、および濃度勾配形成機能を有することが示された。

3. デバイスを用いた培養機能の評価

本デバイスを用いてスフェロイドを培養したところ、ゲルの方向に血管内皮細胞が遊走した。共焦点顕微鏡を用いた観察により、遊走した血管内皮細胞によって分岐形状を有する管腔構造が形成されたことが分かった。さらに、形成された管腔の内部にマイクロビーズ（直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ ）を送液可能であることを確認した。これらの結果から、本デバイスを用いることで、スフェロイドを培養可能であり、また血管新生を伴う血管内皮細胞の遊走を観察可能であることが示された。

4. 二方向への生化学物質の濃度勾配下における培養

本デバイスの外側の二本の流路に、各種の成長因子 (VEGF, S1P, PMA, MCP-1) や血管新生を促進する化学物質 (CoCl_2) を導入し、その条件下でスフェロイドの培養を行った。観察の結果として得られた画像を解析することにより、血管内皮細胞の両側のゲルへの浸潤面積を数値データとして取得した (図 6)。解析結果に基づく定量的な評価から、各生化学物質が、走化性能やケモキネシス能といった、血管内皮細胞の遊走への異なる効果を示すことが分かった。さらに、デバイスに濃度の異なる VEGF を導入し、スフェロイドの培養を行った。結果として、血管内皮細胞の遊走への効果は、濃度によって異なり、1 ng/mL 以上の濃度条件において、統計的に有意な効果を示すことが明らかになった (図 7)。最後に、二方向に異なる濃度の VEGF を導入し、スフェロイドの培養を行った。結果として、50 ng/mL と 100 ng/mL の濃度の VEGF がそれぞれ導入された二つの流路に対して、血管内皮細胞の遊走が起きた (図 8)。この結果から、VEGF による走化性能が二方向に対して働いたことが明らかになり、それ故に、本デバイスが二方向への生化学物質の濃度勾配とそれによる血管内皮細胞の遊走への効果を実現したことが示された。

5. 結論

本研究では、血管内皮細胞からなるスフェロイドを、二方向に形成された生化学物質の濃度勾配下で、培養および観察可能なデバイスを構築した。さらに、作製したデバイスを用いて、種々の生化学物質の影響下でスフェロイドを培養し、血管内皮細胞の遊走を定量解析することで、生化学物質による遊走性への効果を定量的に評価可能であることを示した。

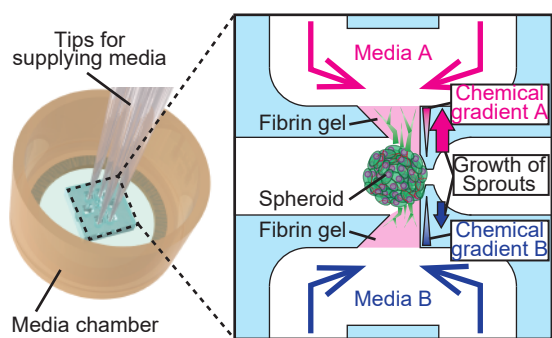


図 1. 本研究のコンセプト.

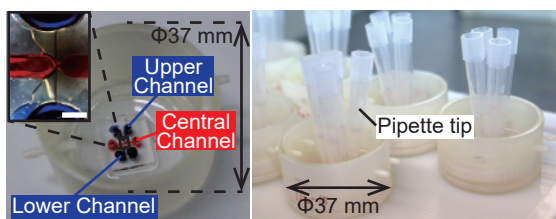


図 2. 培養デバイス. Scale bar: 500 μm .

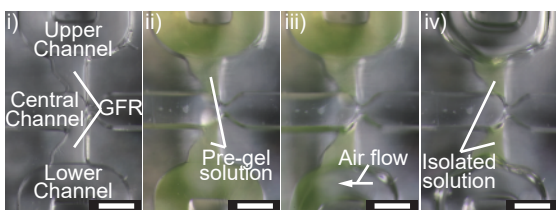


図 3. 局所的なゲル形成. Scale bars: 500 μm .

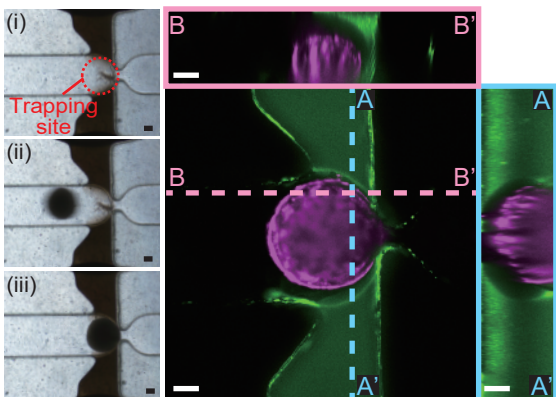


図 4. スフェロイドの捕捉. Scale bars: 100 μm .

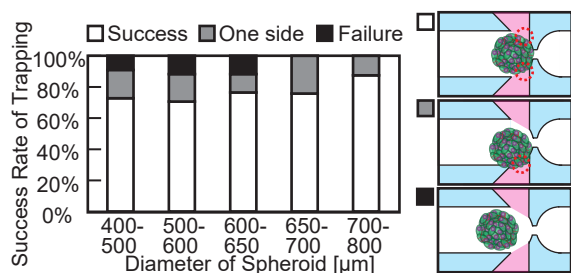


図 5. スフェロイドの捕捉成功率.

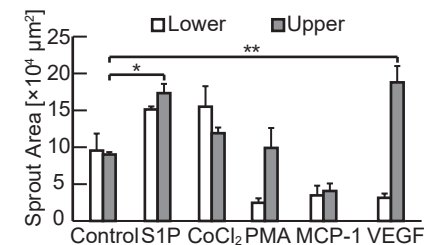
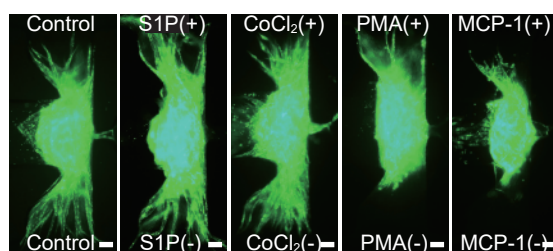


図 6. 各種の生化学物質を用いた培養結果. Scale bars: 100 μm .

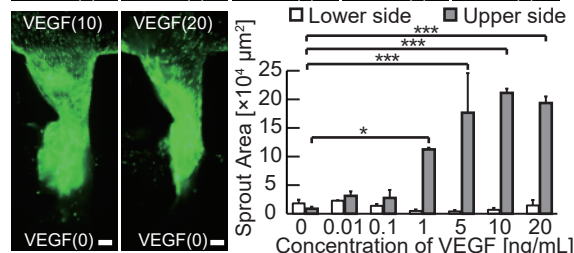
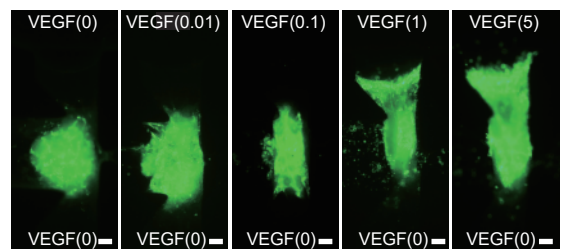


図 7. 異なる濃度の VEGF を用いた培養結果. Scale bars: 100 μm .

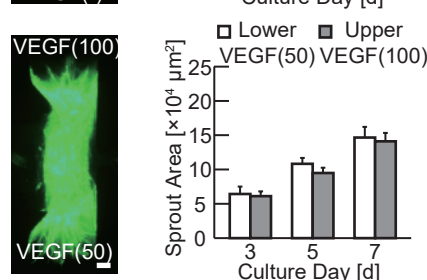
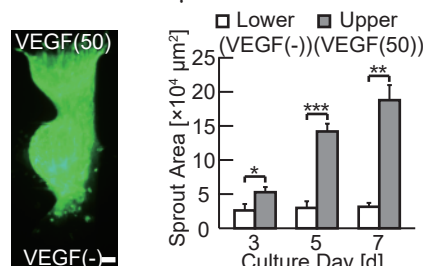


図 8. 二方向から異なる濃度の VEGF を与えた際の培養結果. Scale bars: 100 μm .