

Organ-on-a-Chip

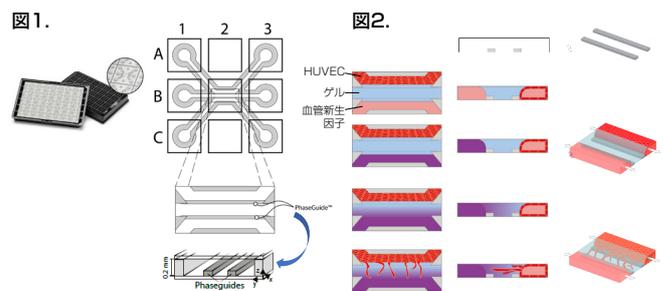
血管新生の3Dモデルを用いた血管形成誘導の経時的イメージング解析

がん、動脈硬化、慢性炎症、虚血などのさまざまな疾患や病態の開始および進行には、血管の恒常性維持機能の低下が関与することが知られている。このような背景から、血管新生などによる新規血管構造の形成あるいは微小血管の損傷に関する詳細なメカニズムを把握する事は非常に重要である。本アプリケーションノートでは、Mimetas社の3D組織培養プラットフォームOrganoPlate®を利用した3D血管新生構造 (*in vitro*灌流血管新生モデル) を共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いて詳細に観察、解析した例を紹介する。

実験の概要

3D組織培養プラットフォームOrganoPlate® (製造元：Mimetas) は、マイクロ流路を用いた灌流により、共培養や管状構造を持つ組織の作製、生体に近い微小環境の再現が可能なシステムである。OrganoPlate® 3-lane 40は、1つのゲル導入用レーンと2つの灌流用レーンを持つ40個の組織培養チップで構成される (図1)。

中央のチャンネルにゲルを注入後、上部のチャンネルにHUVECを播種し、OrganoFlow®を使用してCO₂インキュベーター内で灌流培養し、血管構造を形成した。その後、下部のチャンネルから血管新生促進因子を添加し、経時変化を観察した (図2)。



<https://www.mimetas.com/en/organoplate-3-lane-40/>

実験の結果

血管先端の形態や構成する細胞の局在を観察するため、アクチンおよび血管内皮細胞のマーカーである CD31を染色した。培養液やゲル内のサンプルに適した水浸対物レンズを用いて取得した画像は、非常に明るく明瞭であり、アクチンとCD31の局在におけるわずかな違いを検出できた (図3b)。観察目的に合った対物レンズを選択することで、先端細胞や茎細胞、フラックス細胞など、血管新生に関与するさまざまな細胞の研究に応用可能である。

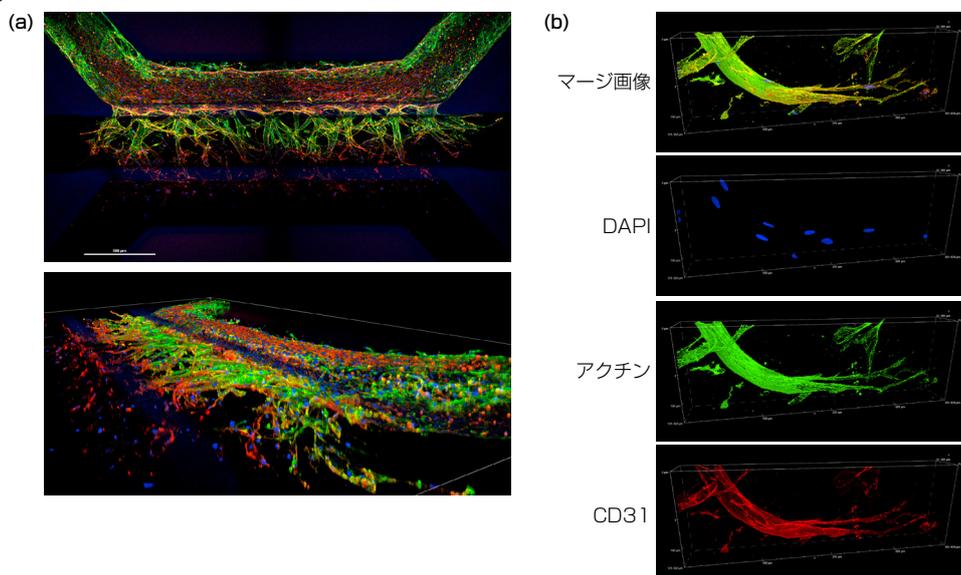
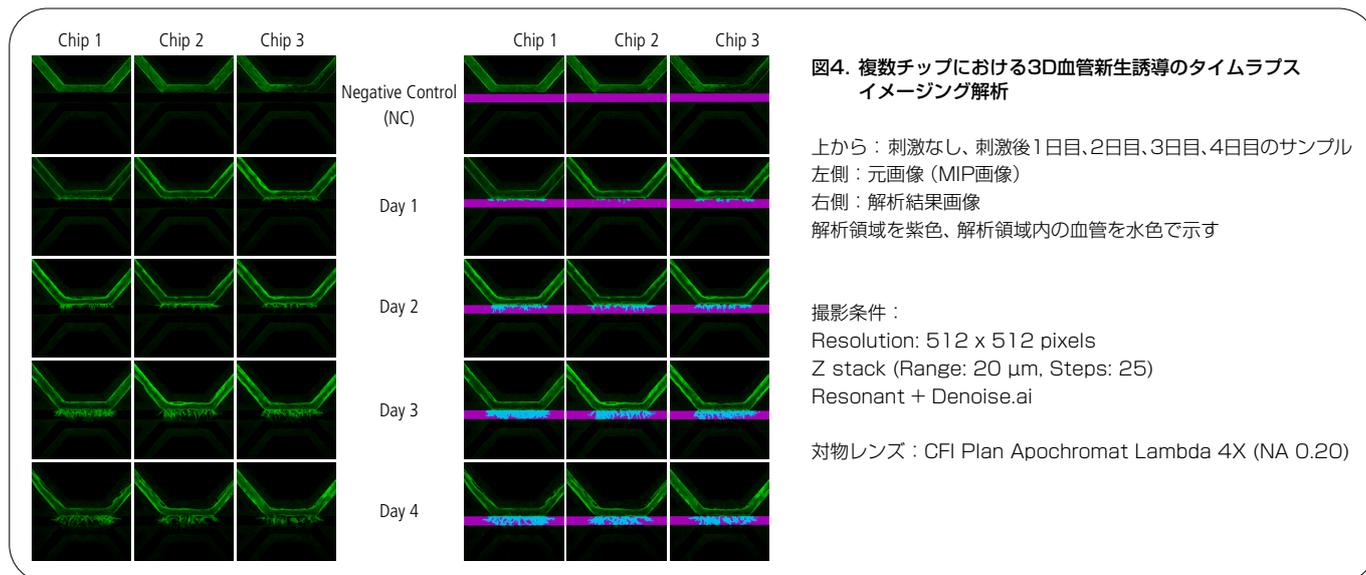


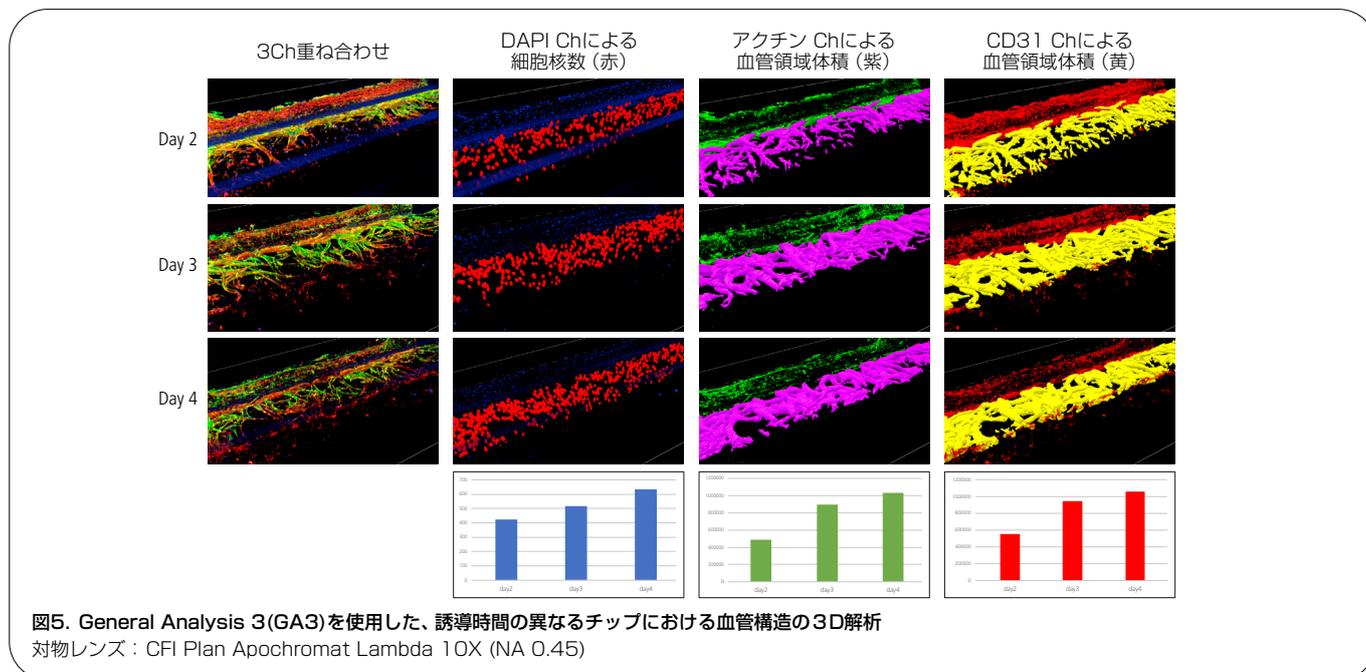
図3. OrganoPlate® 3-lane 40 上に構築された血管の3次元構造

(a) CFI Plan Apochromat Lambda 10X (NA 0.45) 対物レンズで取得したチップの血管全体の画像
(b) CFI Apochromat Lambda S 40XC WI (NA 1.25) 対物レンズで取得した1つの血管の画像

血管新生の有無をチップごとに検出するためにはスルーブットが重要である。4倍対物レンズを使用することで、チップ全体をワンショットで観察できる(図4)。また顕微鏡AIモジュールDenoise.aiを使用することにより、レゾナントスキャナーの高速性はそのまま低ノイズのXY-Z画像を取得できるため、画像解析による定量評価にも展開が可能である。



定量解析は2次元だけでなく3次元画像でも可能である。図5ではゲル領域に3次元的に分布した血管新生を細胞核数、アクチン領域の体積、CD31領域の体積を用いて解析した。



まとめ

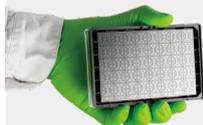
共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rは、業界随一の広視野(対角25 mm)を持ち、一度に広い範囲を撮影できる。また、Denoise.aiを用いて高速スキャンすることにより、複数のチップの撮影時間を短縮できる(図4)。さらに、適切な対物レンズの使用により、一本一本の血管の形態や、それらを構成する細胞の3次元的配置を詳細に観察できることが確認できた(図3b)。また、画像解析ツールGA3により血管新生の定量評価が可能であり(図5)、このシステムがスルーブット性の求められる3D血管新生モデルを用いた毒性評価や薬効評価へ応用できることが示唆される。

使用デバイスの紹介

OrganoPlate® 3-lane 40

(Product no. 4004-400-B 製造元：MIMETAS)

OrganoPlate®3-lane 40は40個の独立したチップ内にゲル導入用と2つの灌流用の合計3つのレーンで構成され、灌流可能な管状構造組織の作製が可能です。上皮及び内皮細管のApicalとBasal側からアクセスできるため、膜透過性試験やトランスポータアッセイに適しています。



製品に関するお問い合わせ：
 ミメタスジャパン株式会社



製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

従来機比4倍の8K x 8K画素の高解像度画像を実現。対角25mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に取得でき、光毒性を低減します。AX Rは2K x 2Kの高解像度を実現。毎秒720フレーム(2048 x 16画素)の高速取得により、生きたサンプルの変化や反応を逃さず捉えます。

