

HUMIMIC Chipを使用した3D生体組織の共焦点イメージング

本アプリケーションノートでは、人体を模倣した構造を持つTissUseのHUMIMIC Chipを用いた腸モデル、骨髄モデルおよび血管組織モデルを紹介する。組織特異的なマーカーを蛍光標識し、共焦点顕微鏡で観察することにより、チップ内で作成された組織が生体組織と同じ構造を形成していることを確認した。これらのモデルを活用することにより、実験動物モデル（ヒトとは生理学的に異なる）と、標準的な*in vitro*アッセイ（ヒト由来細胞であるにも関わらずヒトの生理学的状態を再現できない）との間のギャップを埋めることができる。

実験の概要

Organ-on-a-chipは微細な流路と臓器培養用の区画を備えたデバイスである。チップ上でヒトの細胞を三次元的に培養する事が可能なため、医薬品の新しい評価プラットフォームとして注目されている。TissUseのHUMIMIC Chipは「マルチオーガニックチップ」であり、共通の流路内で培地を循環させながらさまざまな臓器モデルを連結させる事ができる。HUMIMICという名前の通り、このデバイスではヒトの臓器モデルの生理学的環境を模倣しつつ、同時に複数の臓器モデルを培養することが可能である。96ウェルのHUMIMIC Chip2では、区画a'と区画b'（図1）に2種類の異なる臓器モデルを培養することで、他の臓器との共培養が可能となる。区画の間には培地を循環させるためのマイクロ流路が繋がっているため、代謝物やサイトカインといった物質が組織間を常に行き来できる設計になっている。

本実験では腸モデル（図3）と骨髄モデル（図4）の3D培養を区画a'とb'を使用して実施した。また、マイクロ流体チャネルを使用した血管モデルも紹介する（図6）。それぞれの実験は個別に実施された。

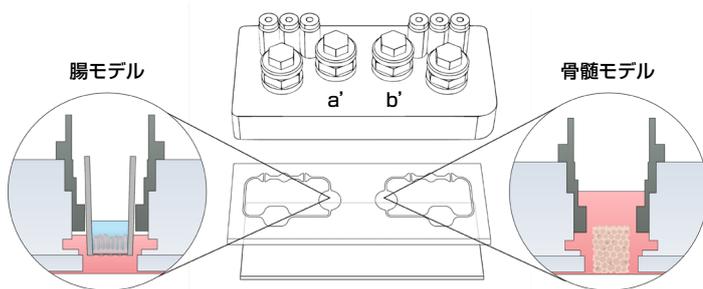


図1. HUMIMIC Chip2 96-wellの分解図
片方の循環スペースにiPSC由来の腸モデルを、もう一方に骨髄モデルを培養。

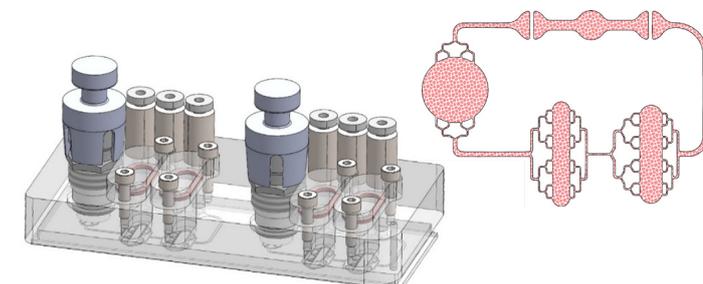


図2. HUMIMIC Chip2^{vasc} の模式図と Chip2^{vasc} マイクロ流路の概略図
iPSC由来の内皮細胞がチャネル全面を覆っている。

腸と骨髄の3D培養モデル

腸モデル

iPSC由来の腸細胞を、HUMIMICメンブレンホルダーにセットしたコラーゲン細胞担体（Viscofan 500049988）上で9日間静置培養した。その後HUMIMIC Chip2 96-wellの区画a'に移し、灌流条件下で3日間培養した。

培養組織はチップから取り出し、組織構造を観察するために蛍光抗体で染色した（図3）。共焦点顕微鏡で撮影した3D画像からは腸組織が閉鎖的なバリアを形成している事が確認でき、また頂端側に存在するタイトジャンクションマーカーであるZO-1を染色することで細胞の極性を確認することができた（図3A、B）。

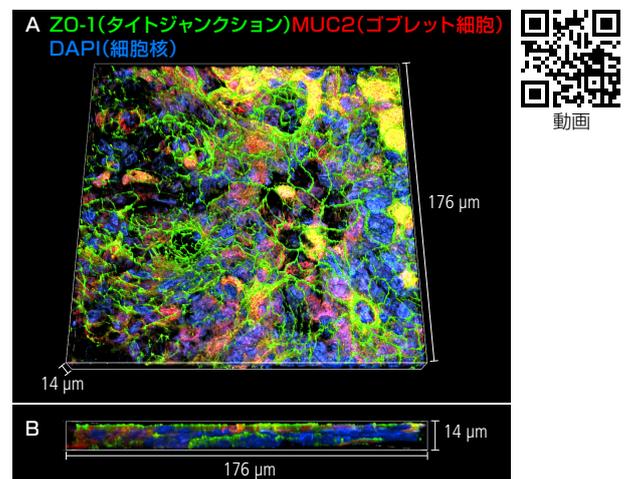


図3. HUMIMIC Chip2を用いて培養したiPSC細胞由来の腸組織
(A) 腸組織表面の上面図
(B) Aの断面図。ZO-1は頂端側に分極化している。
対物レンズ：CFI アポクロマート LWD Lambda S 20XC WI

骨髄モデル

三次元培養用セラミックス足場材料（Zellwerk、Sponceram）をHUMIMIC Chip2 96-wellの区画b'に配置し、ヒト初代造血幹細胞、前駆細胞（HSCs）および間葉系間質細胞（MSCs）を灌流条件下において足場上で35日間共培養した。

三次元培養用セラミックスは多孔質構造を示し、F-アクチンを発現する細長いMSCsと円形状のHSCsが全体に生育している事が分かる（図4A、B）。

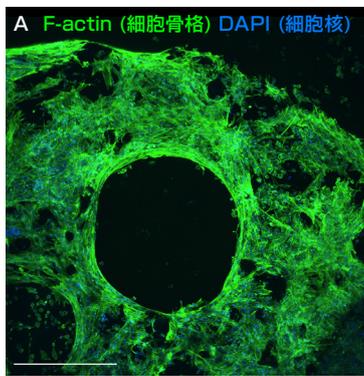
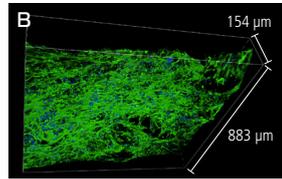


図4. HUMIMIC Chip2を用いて培養した骨髄細胞
(A) MIP 画像
スケールバー：500µm
対物レンズ：CFI プランアポクロマート Lambda 10X
(B) 足場表面の上面図
対物レンズ：CFI アポクロマート LWD Lambda S 20XC WI
MSCsとHSCsは、三次元培養用セラミックス上に均一に生育している。



動画

血管構造の構築

図5は、HUMIMIC Chip2^{vasc}を用いた血管構造の構築、免疫染色、画像取得の実験手順を示している。共焦点顕微鏡を使用した場合、細胞の撮影はチップの下側に位置する対物レンズを介して実施される。チップのガラス底の厚さは1mmのため、作動距離の長い対物レンズを用いることで焦点位置に到達する事が可能である。チップ内のマイクロ流体チャンネルに形成された血管構造の観察には、開口数が高く (NA = 0.7)、作動距離が長い (2.3 mm) CFI S プランフルオール LWD 20XCレンズを使用した。図6は、チップのチャンネル内に形成された血管構造を示している。内皮細胞はチャンネルを形成し、これが分岐して血管床に続いている。血管床では血管が発芽して臓器モデルへの血管のつながりが構築される。

HUMIMIC Chip2^{vasc}でのiPSC由来内皮細胞の培養

↓ 3 日間

チップ内で免疫染色

↓
画像撮影

図5. 実験手順

血管構造を構築するための培養、免疫染色 (DAPI, CD31, CD144, vWFおよびZO-1)、画像取得の実験手順

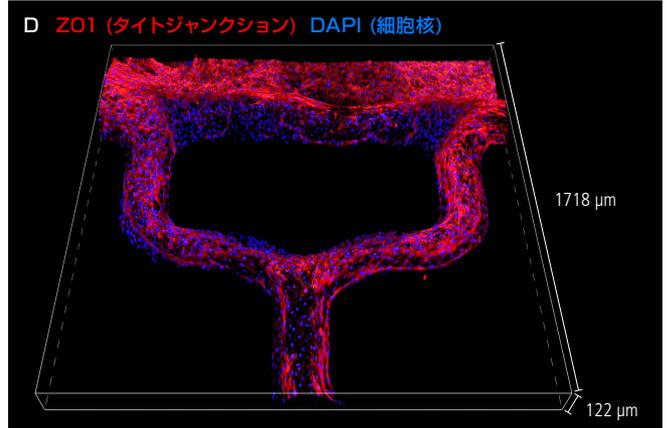
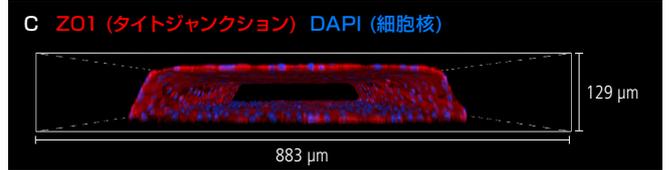
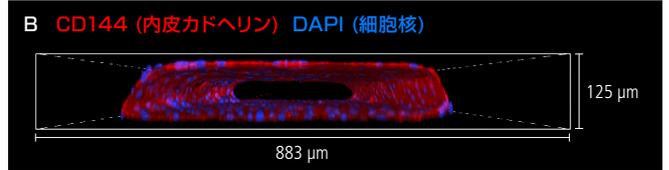
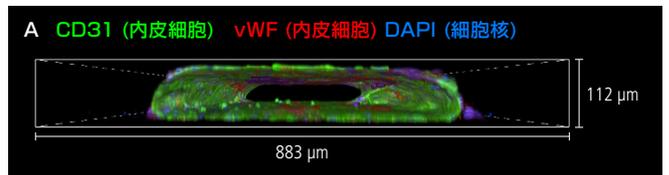


図6. Chip2^{vasc}のチャンネル内で培養された血管構造

(A, B) 内皮細胞はチャンネルの全側面を覆ってチューブを形成。
(C) タイトジャンクションを可視化。
(D) 血管が分岐し血管床に続く様子。
対物レンズ：CFI S プランフルオール LWD 20XC



動画

まとめ

本アプリケーションノートでは、HUMIMIC Chipを使用してヒトの生体組織と同様の構造を持つ培養組織を形成できることを示した。各臓器モデルに応じた適切な画像取得方法を選択することにより、組織特有の三次元的形態およびマーカーの局在を確認することができた。

著者情報

Anja Patricia Ramme¹, Isabell Durieux¹, Ilka Maschmeyer¹, Johanna Dietzfelbinger¹, Hiroaki Kii², Haruka Matsumori², Mamiko Masutani², Yasujiro Kiyota²

¹ TissUse GmbH, Berlin, Germany, www.tissuse.com; ² NIKON CORPORATION, Tokyo, Japan

製品情報



HUMIMIC Starter

ポンプ圧は連続的に調整でき、自動的に設定されます。USBポートが装備されているため、圧カプロファイルの管理やデータの転送が容易に行えます。HUMIMIC StarterはHUMIMIC Chip2、Chip3、Chip3plus、Chip4と互換性があります。



HUMIMIC Chip2

2種の異なる臓器モデルを同時に培養できます。細胞や組織を用いて腸、肺、皮膚などの生体バリアを模倣したり、スフェロイド培養またはマトリックス存在下での培養を行うことで、肝臓のような三次元培養環境を模倣したりすることも可能です。



HUMIMIC Chip2^{vasc}

内皮細胞が流路全体に広がり、流路チャンネルの壁面全体をカバーするように設計されています。チャンネルは血管床に接続されており、血管床で発芽して臓器モデルへの血管のつながりを構築することが可能です。



共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

AX/AX Rは、従来機比4倍の8K×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のレゾナントスキャナーは、2K×2Kの高解像度を実現。毎秒720フレーム (2048×16画素画素) 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。