

3D血管新生を用いたSunitinib阻害剤評価と Boncyte Analyzerによる定量評価

血管新生は既存血管から新たな血管が出芽・伸長する生理過程であり、その破綻は網膜症、慢性炎症、虚血性疾患など多様な病態の基盤となる。しかし従来の二次元 tube formation assay では管腔構造やECM内への三次元的な出芽、成長因子の濃度勾配が再現されず、動物モデルには種差やスループットの制約がある。

本アプリケーションノートでは、Boncyte Chip –3-Channel–を用い、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の血管新生過程を再現し、受容体チロシンキナーゼ阻害薬 sunitinib の作用を評価した。Sunitinibは出芽長・出芽数・分岐点数・血管網面積を濃度依存的に減少させ、VEGFR/FGFR等のシグナル阻害による血管新生阻害を実証できた。

本 MPS は生体に近い三次元血管構造を用いて血管新生調節化合物の薬効と選択性を定量的に評価でき、創薬初期のスクリーニングや作用機序解析への応用が期待される。

ポイント

- Boncyte Chipで血管新生を再現、Boncyte Analyzerにより定量評価
- Sunitinibの阻害作用を濃度依存的に検出

実験概要

Boncyte Chip –3-Channel–の中央チャンネルにFibrinogenを基礎とするゲル溶液を導入し、インキュベートすることによりゲル化させた。右側流路にGFP発現したHUVEC (GFP-HUVEC, Angio-proteomie社、 5×10^6 cells/mL) を導入し、90°傾かせてインキュベートすることにより、ゲル壁面に接着させた。右側流路には培地EGM-2 (Lonza社)、左側には50 ng/mL VEGF, bFGFを含むEGM-2を導入し、成長因子の濃度勾配を形成した (Day 0と定義)。以降の培養は、傾斜角 6°、動作速度 1.2 °/s、動作時間 10 s、静止時間 20 s に設定した Boncyte Rocker 上で、37 °C、5% CO₂ 条件下にて実施した。

Sunitinib は DMSO に溶解し、10 mM ストック溶液として調製した。これを EGM-2 で希釈し、最終濃度 0、1、3、10、30、100 nM の各溶液を調製した (DMSO 終濃度は全群で統一)。Day 1 に右側流路の培地を各濃度の sunitinib 溶液に置換した。培地交換は 48~72 時間ごとに実施し、左側流路の成長因子含有培地も同時に交換した。培地交換のタイミングで、蛍光顕微鏡 (Evident 社, CKX53) にて、蛍光画像・位相差画像を取得した。

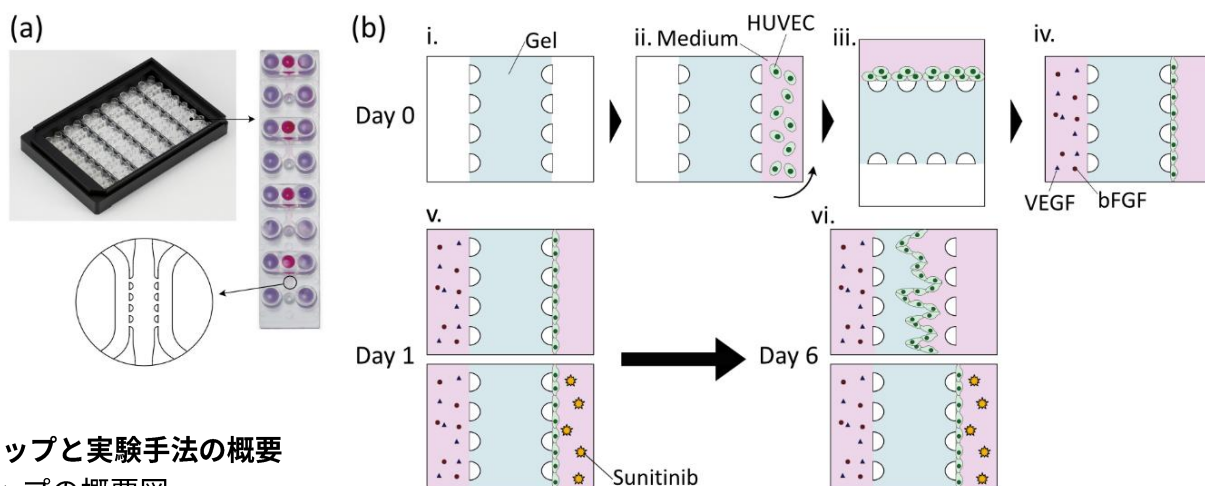


図1 チップと実験手法の概要

a. チップの概要図。

b. 実験手法。ゲル溶液を導入後 (i)、右側チャンネルに培地に懸濁したHUVECsを導入 (ii)。90°傾かせてインキュベートすることにより、ゲル界面にHUVECsを接着 (iii)。左側に成長因子を含む培地を導入 (iv)。Day 1に右側にSunitinibを導入 (v)。培養を続けることで、血管新生を評価 (vi)。

Boncyte Analyzerによる画像処理・解析

Boncyte Analyzerでは、①解析領域のクリッピング、②二値化処理、③細線化処理、④定量化の4つの手順で解析する。①では、位相差画像により中央流路を検出し、クリッピングする。②では、励起ムラ、細胞中心に偏る GFP 発現、太さの異なる血管の共存に対応するため、多段階の処理を用いている。まず rolling-ball 背景差分により照明ムラを補正し、管状構造強調フィルタを適用したうえで、ヒステリシスしきい値により二値化する。GFP発現のムラにより本来血管である領域が血管外の穴として検出された箇所については、穴内部に残存する蛍光強度と境界の鋭さに基づいて判定し、血管領域として補完する。また、培養日数の経過に伴いピラー近傍では HUVEC がシート状に流路壁を覆うが、こうした連続面については蛍光強度から外縁を検出し、内側を一括して塗りつぶす。③の処理後、④の定量評価では、起点ピラー縁を基準に、連結した血管の最先端までの距離を「連結スプラウト到達距離」と定義した。あわせて、総血管長、血管面積率、分岐点密度を算出した (図2)。

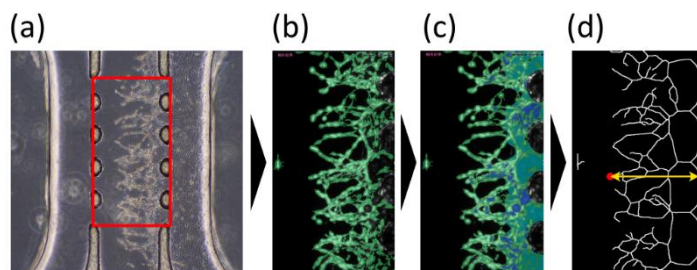


図2 Boncyte Analyzerによる解析手順

- 位相差画像から自動的にクリッピング。
- 二値化処理 (緑色)。
- 誤検出の血管外領域 (青) とシート状の領域 (シアン) を補正。
- 細線化処理。黄線の距離を連結スプラウト距離と定義。

Sunitinibの阻害試験

蛍光画像の観察から、Sunitinib 30 nM 以上の条件では血管新生が抑制されることが確認された (図3a)。定量評価においても、Day 6 および Day 8 の時点で、30 nM 以上の群では対照群と比較して各指標が有意に低い値を示した (図3b)。連結スプラウト到達距離に基づき IC50 を算出したところ、Day 6 において 25 nM であった。先行研究では、sunitinib の VEGF 誘導性 HUVEC 増殖に対する IC50 は 4~12 nM^{1,2}、VEGFR2 キナーゼ活性に対する IC50 は 43 nM³ と報告されており、本系で得られた値はこれらと同等の範囲にあった。以上より、本 MPS は血管新生阻害作用を定量的に評価する系として利用可能であることが示唆された。

References:

- Nacev BA, Liu JO. PLoS One. 2011;6(9):e24793.
- Zhang K, et al. Thorac Cancer. 2020;11(6):1636–1647.
- Bakri SJ, et al. PLoS One. 2024;19:e0304782.

製品情報

Boncyte Chip – 3-Channel –

- 3つの流路が平行に並んだ流路構造
- 底面PDMSにより細胞への十分な酸素供給が可能



Boncyte Rocker

- 手のひらサイズの小型ロッキングシェーカー

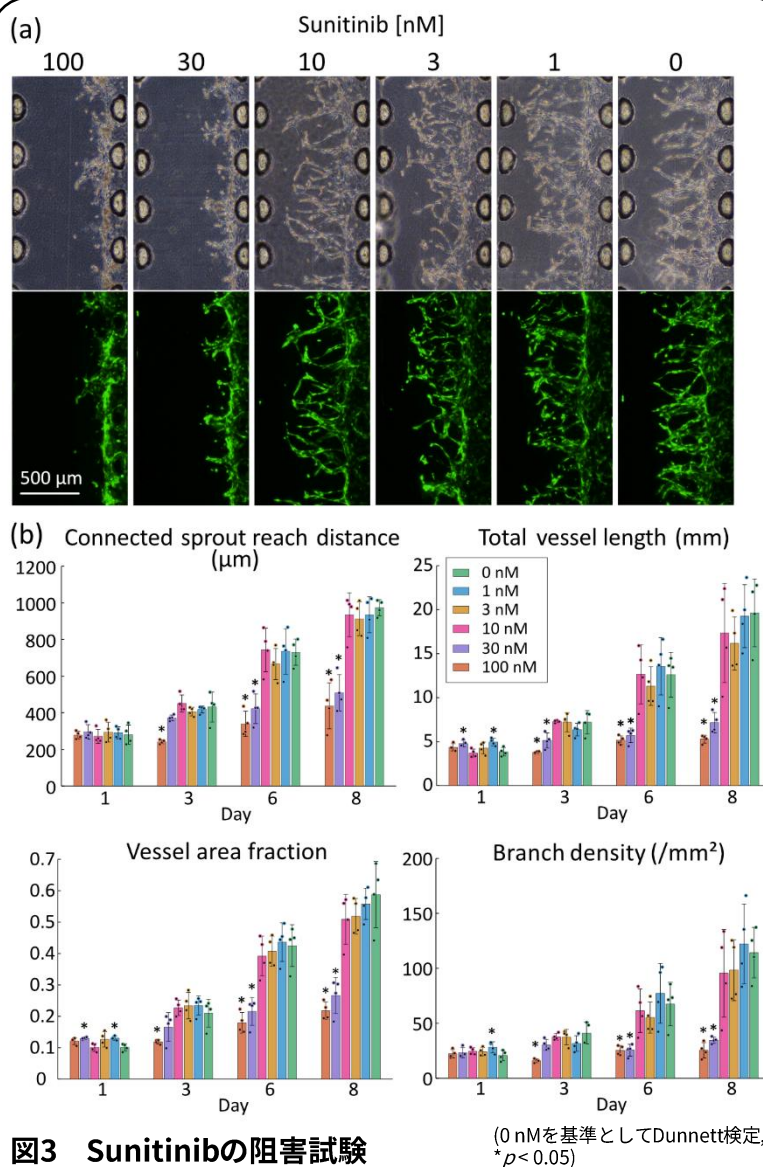


図3 Sunitinibの阻害試験

- Day 6の蛍光、位相差画像
- 血管新生の定量化 (左上から連結スプラウト到達距離、総血管長、血管面積率、分岐点密度)