三次元人工微小血管モデルによる血管内皮細胞のフェノタイプ解析

中島忠章*, 松永行子

Phenotypic analysis of endothelial cell function by using three-dimensional microvessel model

Tadaaki NAKAJIMA, Yukiko T. MATSUNAGA

要約：創薬において、*in vitro* では細胞レベルの解析しか行えず、*in vivo* ではその複雑さから組織特異的な現象の詳細な解析が行えない。この乖離をつなげるために、近年、三次元的に組織を模倣したモデルの構築が盛んに行われている。ボトムアップ的に構築された三次元人工微小血管モデルを用いることで、血管新生・透過性といった、血管組織構造レベルでのフェノタイプがライブイメージング可能となる。このフェノタイプ解析は、*in vitro* と *in vivo* のギャップを埋めるような詳細な解析が行えるだけでなく、標的薬剤・遺伝子が持つ血管に対する未知の機能を発見することができ、今まで説明できなかった作用機序や副作用の原理を解明できる。創薬の薬剤探索が終了した際には、まず三次元人工微小血管モデルを用いてフェノタイプ解析を行い、疾患改善の有意性を示す必要性があると考ええる。

Key words: *in vitro* model, blood vessel, angiogenesis, phenotypic analysis

はじめに

現在、創薬のステップにおけるスクリーニングと目的物質の薬効評価のために、二次元(2D) *in vitro* 培養系が用いられている。この系では、初代培養細胞由来もしくは不死化された株細胞を用いて、増殖・分化・シグナル制御等の細胞レベルの作用が解析される。そこで薬効が確認された場合、マウスやサルなどの動物を用いた *in vivo* 試験によって、生体内における薬効の確認と、代謝を含めた薬物の体内動態や副作用の研究が行われ、最終的にヒトの臨床研究へとつながっていく。しかしながら、*in vitro* 系では単一細胞レベルの単純現象のみしか解析できないため、細胞の集合体である組織に対して薬剤がどのような影響を与えるかが予想できない。一方で、*in vivo* 試験ではヒト以外の生物、主にマウス

を用いて行われるため、薬剤の働きがヒトと異なる可能性が高い。また生体内には組織局所的にだけでなく様々な細胞が存在し、それらが体循環ですべてつながっているために非常に複雑な系となっており、標的組織でどのような現象が起きているかを詳細に解明することが困難である。2D *in vitro* 試験と *in vivo* 試験におけるこれらの乖離が原因となり、臨床試験に進んだ場合に薬効が発揮されない場合や、予想外の副作用が出る可能性が存在する。実際に、前臨床試験を終えた薬剤が臨床試験を通過するのは、10%程度であるといわれている¹⁾。

この問題を解決するために、近年 *in vitro* における詳細な解析手段を残しつつ、*in vivo* のように組織構造レベルの現象(フェノタイプ)を捉えることが可能な、三次元(3D) *in vitro* デバイス系の研究が盛んに行われている。3D で生体組織を模倣することで、2D *in vitro* と *in vivo* 研究の橋渡しとなるだけでなく、2D *in vitro* でも *in vivo* でも行えなかった、組織を“みえる化”して研究ができるというメリットが存在する。ヒト株細胞や、iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いて、肝臓や腎臓などの様々な組織を模倣して

*責任者連絡先：
東京大学生産技術研究所機械・生体系部門
〒153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1 An512
Tel: 03-5452-6470, Fax: 03-5452-6471
E-mail: tadaaki@iis.u-tokyo.ac.jp

3D in vitro デバイスが構築されている²⁻⁴⁾。血管の分野においても、血管内皮細胞、周皮細胞、線維芽細胞などを用いて、動脈または毛細血管を模倣したデバイスが様々な種類作製されている⁵⁾。これらのデバイスを用いることで、血管透過性、炎症様作用、血管新生を含めた構造変化といった、血管のフェノタイプ解析を行うことが可能になりつつある。

3D 組織構造体の構築方法として最も簡便な方法としては、細胞の自己組織化によって作られるオルガノイドであろう。血管においては、マトリゲルなどの細胞外マトリックスで構成されたゲル内に内皮細胞を播種することで、自発的に毛細血管網を形成させることができる⁶⁾。直径数百マイクロメートルのビーズに血管内皮細胞を接着させ培養することで管を形成する方法も存在するが⁷⁾、これらの方法では血管の内腔側から溶液処理することができず、生体内の血管における薬物動態を模倣できない。その点の改良法として、デバイスの流路と内腔が通じるように、内皮細胞の自己組織化を用いて毛細血管ネットワークを構成させることで、内腔側からの処理を可能にすることもできる^{8,9)}。他には、あらかじめ polydimethylsiloxane (PDMS) で血管の鋳型を作製しておき、そこに鋳形状のコラーゲンを作製し、内皮細胞で被覆する方法¹⁰⁾、コラーゲンをゲル化させる際にニードルを入れておき、ニードルを除去することで内腔を形成し、内皮細胞で被覆する方法などが存在する¹¹⁾。われわれはこれらのうち、薬剤や遺伝子の効果を安定的に評価するために、ニードルを使った方法を改良することで、内腔側と外側からの溶液処理を明確に分けることができるデバイスを確立した¹²⁾。ニードルを用いた方法は、ニードルの太さを変えるだけで血管径を変更でき、動脈、細動脈、毛細血管様の血管を容易に作製可能である。また、常に同様の形の血管を作製できることから、血管新生などの解析を行う際に、内皮細胞動態をコントロールしやすい。本稿では、本血管デバイスの作製方法と、その応用例についてまとめて報告する。

1. 3D 人工微小血管モデルと、血管フェノタイプ解析法構築

3D 人工微小血管モデル系を構築するために、3D プリンターによって成型されたシリコンモールドに PDMS を流し入れて固めることで、コラーゲンをゲル化させる中央の長方形空間と、内皮細胞の導入と内腔側からの薬剤送達を可能にするための円形リザーバーが、ニードルを通す穴でつながったチップを作製した(図 1A)。中央の長方形空間にコラーゲン type I 溶液を流し入れ、直径 120~300 μm のニードルを横から刺した後、コラーゲンをゲル化させた。ニードルを引き抜くことで、コラーゲンゲル内にニードルの直径に対応した内腔が形成される。リザーバーよりヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)を導入して、コラーゲン内腔を HUVEC で完全に被覆することで、人工微小血管を作製した^{12,13)}。本手法により作製された血管の直径、体積、細胞密度の標準偏差は 10% 以下であり、安定した人工血管作製法であるといえる。

発生期において、血管内皮細胞は中胚葉より誘導され血管が形成され、形成された血管を元に、血管内皮増殖因子(VEGF: vascular endothelial growth factor)などの作用によって分岐が生じ、血管新生が起こる¹⁴⁾。発生完了後に血管は安定した状態となるが、組織の損傷時や炎症時、がんなどの各種疾患によって、血管新生が再び起こる¹⁵⁻¹⁷⁾。3D 人工血管の外側と内側の両方から VEGF A を添加して培養した後、共焦点顕微鏡で 3D 観察すると、この血管の内皮細胞から tip 様の細胞が誘導され、その tip 細胞に続くように stalk 様の細胞が誘導されたことから、in vivo と同様な血管新生が確認された¹³⁾。さらに、共焦点顕微鏡観察では蛍光物質の導入が不可欠であり、血管の 3D 構造をライブイメージングするためには、より非侵襲的な観察方法の確立が求められる。そこで、病院の眼底検査などに用いられる光干渉断層撮影技術(OCT: Optical coherence tomography)¹⁸⁾を用いたところ、培養開始時は平滑な内腔をしていた血管が、VEGF A 添加培養によって血管新生による突起が生まれる様子をライブイメージングできた(図 1B)。

血管内皮細胞はオクルディンやクローディンを介

図1 3D人工微小血管モデル作製の模式図(A). 左図中央のウェル内でコラーゲンゲルを作製する. 両側の丸いリザーバーからHUVECを内腔へ導入する. 内腔側と外側の両方から, ヒト VEGF A 添加時における光干渉断層撮影した画像(B). トロンビンによる血管透過性亢進(C上図). 溶液はすべて右側リザーバーからのみ添加しており, トロンビン添加前にEDTA処理をして結合を弱めている. Colormap imageは蛍光画像を0-255の蛍光強度で疑似カラー化したものである. スケールバー: 500 μm . HUVEC培養用の培地単独(EGM-2), 100U トロンビン含有EGM-2(thrombin), 200 μM EPAC作動薬含有EGM-2(007)を添加した際のVEカドヘリン(緑), アクチンファイバー(赤)の発現(C下左図)と, 血管透過性試験の定量化グラフ(C下右図). 青: 核. スケールバー: 20 μm . エラーバー: S.D.(文献12, 13より改変転載)

した密着結合とカドヘリン(VE-cadherin)を介した接着結合を形成することで、血管のバリア機能を担っている¹⁹⁾。血管内皮層は必要な際には結合を緩ませることで物質を透過させており、さらに炎症や疾患状態においては、その制御が行えずに血管バリア機能が崩壊すると考えられている。そのため、内皮細胞の構造レベルでの機能の解析として血管バリア機能を評価するために、血管における物質の透過性検出法を確立した。血管作製時に内皮細胞を導入したリザーバーを利用して、そこから内腔側だけに蛍光デキストランを含有した培地を通液させることで、血管透過性を安定的に検出する方法を確立した(図 1C)¹²⁾。透過性評価前にトロンピンを添加すると、カドヘリンの発現が不安定化し、アクチンストレスファイバーが形成されることで、血管透過性が亢進する様子が観察できた。またトロンピン処理前に exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) を選択的に活性化できる薬剤を添加することで、トロンピンによる血管透過性を抑制することが観察でき、3D 人工血管の透過性の制御と、その検出が可能となった。

2. 3D 人工微小血管モデルを用いた薬剤評価

前述のように、成熟後の血管新生は様々な疾患と関連している。特に近年、がん組織周辺において血管新生の促進が起き、その血管のバリア機能が崩壊していることで、抗がん剤のがん細胞への送達に阻害されていることがわかっており、VEGF A の抗体医薬や、その受容体下流のキナーゼ阻害剤であるソラフェニブ、スニチニブといった薬剤で血管新生を抑えることで、抗がん剤の治療効果が高まることが期待されている²⁰⁾。このような薬剤が血管新生を阻害し、血管透過性を抑えることはわかっているが、組織レベルでの、詳細な解析や分子機構の解明は行われていない。その中でも、ソラフェニブとスニチニブの標的となるキナーゼは似ているがわずかに異なっており、薬効や副作用も異なるが²¹⁾、血管のフェノタイプにおいてどのような違いがあるかはわかっていない。そこで 3D 人工微小血管モデルを用いて、ソラフェニブとスニチニブの働きをフェノタイプレベルで解析した。

ソラフェニブとスニチニブは、3D 人工微小血管モデルにおいても、ともに VEGF A 誘導性の血管新生を抑制した(図 2A)²²⁾。しかし、VEGF A とソラフェニブを共添加しても血管透過性を抑制しなかったが、スニチニブの同時添加によっては抑制された(図 2B)。このスニチニブの血管透過性の抑制は、細胞接着の部分的な欠落の抑制によるものであると予想される(図 2C)。このように、3D 人工微小血管モデルを用いることで、創薬早期の段階においてフェノタイプ解析が可能であることがわかった。また、ソラフェニブとスニチニブの血管透過性における効果の違いは、フェノタイプ解析をすることで新たに得られた知見である。両薬剤の薬効と副作用の違いは、この違いに起因している可能性がある。つまり、既存薬剤を組織レベルで再評価することで、今まで未知であった血管に対する作用を発見することも可能であることがわかった。

3. 標的遺伝子の血管内皮細胞におけるフェノタイプレベルの機能解析

遺伝子の働きを解析する上でも、現状は 2D in vitro または in vivo による解析が主流である。2D in vitro では標的となる遺伝子を RNA 干渉法で阻害する方法や、標的遺伝子の下流のシグナルを低分子化合物で阻害する方法など、簡便にその働きを阻害して作用を解析することが可能である一方、細胞増殖・細胞死・分化・遺伝子発現といった細胞レベルの解析しかできない。組織特異的なノックアウトマウスを作製することで in vivo でのフェノタイプ解析は可能であるが、そのマウスの作製には時間がかかり、かつ対象組織が常に観察できる状態にはないために解析に制限があり、細胞も多種存在するために実験系が複雑になる。3D デバイスは遺伝子の機能探索においても、細胞種を絞り、フェノタイプを直接評価可能な点で有用であると考えられる。

われわれは 2003 年に同定された新規血管新生促進分泌タンパク質をコードする epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) に着目した²³⁾。EGFL7 はゼブラフィッシュとアフリカツメガエルの研究から血管網と血管管腔形成に必須であり、マウスを用いた研究から血管新生を制御することがわかってい

図2 3D人工微小血管モデルにおける、VEGF Aとソラフェニブまたはスニチニブの共添加培養(A)。スケールバー：200 μ m。VEGF Aとソラフェニブまたはスニチニブの共添加培養時における、血管透過性評価(B)。画像は0-255の蛍光強度で疑似カラー化したものである。下図はその定量化。エラーバー：S.D. VEGF Aとソラフェニブまたはスニチニブを添加した際のVEカドヘリン(赤)、アクチンファイバー(緑)の発現(C)。青：核。スケールバー：20 μ m。(文献22より改変転載)

る²⁴⁻²⁶。しかし、ヒトにおける機能の詳細はわかっていなかったため、3D人工微小血管モデルを用いてEGFL7の機能解析を行った²⁷。HUVECにEGFL7に対するsmall interfering RNAを導入することでノックダウンを行い、その細胞を用いて人工微小血管モデルを作製した(siEGFL7- μ V; 図3A)。siEGFL7- μ VのVEGF A誘導性の血管新生率を定量化したところ、今までの報告と同様に血管新生は抑制されていた(図3B)。しかし、通常血管新生の頂端部のみに存在するtip細胞が、血管新生部の根元にも多く存在しており(図3C, 矢尻)、ただ単純に血管新生を抑制しているわけではなく、tip細胞とstalk細胞との関係性を乱すことで、血管新生を抑制していることがわかった。さらに、siEGFL7- μ V

においては血管透過性も亢進しており(図3D)、ヒト単球系細胞を内腔側より導入するとその接着が促進されていたことから、炎症が誘導されていることが明らかとなった(図3E)。このように、EGFL7は血管において、VEGF A誘導性の血管新生を、tip細胞とstalk細胞への分化制御を通して維持しており、血管のバリア機能の保護機能と炎症抑制機能を有することが判明した(図3F)。その後、2D in vitro系を用いて分子機構を解明した結果、これらのEGFL7の役割はVEGF A誘導性のカドヘリンのリン酸化の促進を介していることが推察された。

キナーゼ阻害剤や遺伝子の機能解析において、3D人工微小血管モデルを用いて組織レベルでの解析を行うことで、2D in vitro解析では観察不可能な

図3 EGFL7をノックダウンしたHUVECを用いて作製した3D人工微小血管モデル(siEGFL7- μ V)のVEGF A応答性(A). コントロールとしてヒト遺伝子に共通配列を持たないsmall interference RNAを使用(siCtrl- μ V). スケールバー: 500 μ m. siEGFL7- μ Vにおける血管新生を画像解析により定量評価(B). エラーバー: S.D. VEGF A添加時のsiEGFL7- μ Vのアクチンファイバー(赤)の共焦点顕微鏡画像(C). 青: 核. 矢尻: tip細胞. 矢印: stalk細胞. スケールバー: 20 μ m. VEGF A添加時のsiEGFL7- μ Vの血管透過性定量評価(D). エラーバー: S.D. siEGFL7- μ Vにおける単球系細胞THP-1(緑)の接着画像と, その定量評価(E). 赤: HUVEC(EC). スケールバー: 200 μ m. エラーバー: S.D. 血管におけるフェノタイプレベルでのEGFL7の役割と(F左図), 細胞内での作用機序の模式図(F右図). (文献27より改変転載)

図4 創薬における3D *in vitro* デバイスを用いたフェノタイプ解析の重要性

In vitro から *in vivo* になるにつれて取得できる情報量は増えるが、ヒト組織のフェノタイプ解析は3D *in vitro* デバイスでのみ解明できる。標的遺伝子やシグナルが決定した際には、まず3D *in vitro* デバイスを用いてフェノタイプ解析を行った後、2D *in vitro* で詳細を解析するといった戦略が有用であると考えられる。

未知の現象を捉えることが可能となる(図4)。このような現象を生体内の血管で直接的にかつ詳細に観察することは困難であり、2D *in vitro* と *in vivo* 解析のみを用いた、現状の遺伝子機能解析法や創薬手法は、フェノタイプレベルでの発見や相違を見逃してしまうため、後々に齟齬が生じてくるのだと予想する。実際に、EGFL7に対する抗体医薬が、抗血管新生薬として臨床研究に持ち込まれた際には、予想したような効果が得られなかった^{28,29)}。その理由は、EGFL7が血管新生を促進するという単純な機能を持っているのではなく、tip細胞化の制御・透過性抑制・炎症抑制作用といった血管内皮の恒常性維持、つまり安定化作用も持ち合わせていることが3D人工微小血管モデルの結果より示され、抗EGFL7抗体がこれらの作用も抑制してしまうことで、臨床研究において顕著な効果が現れなかったことが予想される。逆に、あらかじめ3D人工微小血管モデルを用いた解析を行っていれば、臨床研究に行く前にこの結果はある程度予想できたとも考えら

れる。もちろん、ハイスループットという点においては、現状では2D *in vitro* 解析には劣るが、創薬のステップにおいて、薬剤探索が終了した際には、まず3D人工微小血管モデルを用いてフェノタイプ解析を行い、疾患改善における有意性が示せた場合のみ、2D *in vitro* と *in vivo* の解析と合わせてより詳細な研究を行って臨床研究につなげるという手法が、より堅実なのではないかと提案したい(図4)。

おわりに

著者らのグループが開発した3D人工微小血管モデルに必要な物は、PDMSチップ・コラーゲン・ニードルだけであり、他の特別な機械や複雑なパーツを必要としない。また、安定的に血管構造を作製可能であり、簡便な解析方法も各種樹立されている。そのためデバイス工学が未経験な生物学者でも、チップ作製、3D人工微小血管モデル作製と解析が容易である。当デバイスを用いて、様々な血管研究者に

“みえる化した”フェノタイプ解析を行っていただきたいと考えている。

今回紹介した解析法だけでなく、血管においては構造に関する現象が多く存在する。例えば血栓形成においては、PDMSで一部狭窄した血管の形を再現し、内皮細胞で裏打ちしたもの、線維芽細胞を含んだゼラチンで成型した内腔に内皮細胞で被覆したもの、コラーゲンゲルに内皮細胞と周皮細胞を裏打ちしたもの、といった3D血管デバイスに血液または血小板を内腔側から導入することで、血小板や赤血球の凝集や、その凝集体への線維芽細胞の浸潤といった、生体の血栓形成様の構造を再現することが可能となっている^{10, 30, 31)}。われわれの開発した3D人工微小血管モデルは、上記の方法と同様に、周皮細胞などとの共培養も可能であるため³²⁾、本稿で紹介する以外に、内皮細胞以外の様々な細胞との相互作用によって行われるフェノタイプ解析分野において、応用が期待できる。

著者全員の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- Mullard A: Parsing clinical success rates. *Nat Rev Drug Discov* **15**: 447, 2016.
- Kimura H, Sakai Y, Fujii T: Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet* **33**: 43–48, 2018.
- Beckwitt CH, Clark AM, Wheeler S, Taylor DL, Stolz DB, Griffith L, Wells A: Liver 'organ on a chip'. *Exp Cell Res* **363**: 15–25, 2018.
- Wilmer MJ, Ng CP, Lanz HL, Vulto P, Suter-Dick L, Maser-euw R: Kidney-on-a-chip technology for drug-induced nephrotoxicity screening. *Trends Biotechnol* **34**: 156–170, 2016.
- Sato K, Sato K: Recent progress in the development of microfluidic vascular models. *Anal Sci* **34**: 755–764, 2018.
- Scherberich A, Beretz A: Culture of vascular cells in tridimensional (3-D) collagen: a methodological review. *Therapie* **55**: 35–41, 2000.
- Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, Taylor KL, Aitkenhead M, Pérez-del-Pulgar S, Carpenter PM, Hughes CC: Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvasc Res* **66**: 102–112, 2003.
- Song JW, Munn LL: Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 15342–15347, 2011.
- Galie PA, Nguyen DH, Choi CK, Cohen DM, Janmey PA, Chen CS: Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 7968–7973, 2014.
- Zheng Y, Chen J, Craven M, Choi NW, Totorica S, Diaz-Santana A, Kermani P, Hempstead B, Fischbach-Teschl C, López JA, Stroock AD: In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 9342–9347, 2012.
- Nguyen DH, Stapleton SC, Yang MT, Cha SS, Choi CK, Galie PA, Chen CS: Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 6712–6717, 2013.
- Pauty J, Usuba R, Takahashi H, Suehiro J, Fujisawa K, Yano K, Nishizawa T, Matsunaga YT: A vascular permeability assay using an in vitro human microvessel model mimicking the inflammatory condition. *Nanotheranostics* **1**: 103–113, 2017.
- Takahashi H, Kato K, Ueyama K, Kobayashi M, Baik G, Yukawa Y, Suehiro JI, Matsunaga YT: Visualizing dynamics of angiogenic sprouting from a three-dimensional microvasculature model using stage-top optical coherence tomography. *Sci Rep* **7**: 42426, 2017.
- Patan S: Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* **50**: 1–15, 2000.
- DiPietro LA: Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol* **100**: 979–984, 2016.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* **454**: 436–444, 2008.
- Carmeliet P, Jain RK: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**: 298–307, 2011.
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA: Optical coherence tomography. *Science* **254**: 1178–1181, 1991.
- Cao J, Ehling M, März S, Seebach J, Tarbashevich K, Sixta T, Pitulescu ME, Werner AC, Flach B, Montanez E, Raz E, Adams RH, Schnittler H: Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell migration during sprouting angiogenesis. *Nat Commun* **8**: 2210, 2017.
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT, Faraoni R, Floyd M, Hunt JP, Lockhart DJ, Milanov ZV, Morrison MJ, Pallares G, Patel HK, Pritchard S, Wodicka LM, Zarrinkar PP: A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **26**: 127–132, 2008.
- Randrup Hansen C, Grimm D, Bauer J, Wehland M, Magnusson NE: Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the Treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci* **18**: pii: E461, doi: 10.3390/ijms18020461, 2017.
- Pauty J, Usuba R, Cheng IG, Hespel L, Takahashi H, Kato K, Kobayashi M, Nakajima H, Lee E, Yger F, Soncin F, Matsunaga YT: A vascular endothelial growth factor-dependent sprouting angiogenesis assay based on an in vitro human blood vessel model for the study of anti-angiogenic drugs. *EBioMedicine* **27**: 225–236, 2018.
- Soncin F, Mattot V, Lionneton F, Spruyt N, Lepretre F, Begue A, Stehelin D: VE-statin, an endothelial repressor of smooth

- muscle cell migration. *EMBO J* **22**: 5700–5711, 2003.
- 24) De Mazière A, Parker L, Van Dijk S, Ye W, Klumperman J: Eglf7 knockdown causes defects in the extension and junctional arrangements of endothelial cells during zebrafish vasculogenesis. *Dev Dyn* **237**: 580–591, 2008.
 - 25) Charpentier MS, Tandon P, Trincot CE, Koutleva EK, Conlon FL: A distinct mechanism of vascular lumen formation in *Xenopus* requires EGFL7. *PLoS ONE* **10**: e0116086, 2015.
 - 26) Nichol D, Shawber C, Fitch MJ, Bambino K, Sharma A, Kitajewski J, Stuhlmann H: Impaired angiogenesis and altered Notch signaling in mice overexpressing endothelial Eglf7. *Blood* **116**: 6133–6143, 2010.
 - 27) Usuba R, Pauty J, Soncin F, Matsunaga YT: EGFL7 regulates sprouting angiogenesis and endothelial integrity in a human blood vessel model. *Biomaterials* **197**: 305–316, 2019.
 - 28) García-Carbonero R, van Cutsem E, Rivera F, Jassem J, Gore I, Tebbutt N, Braiteh F, Argiles G, Wainberg ZA, Funke R, Anderson M, McCall B, Stroh M, Wakshull E, Hegde P, Ye W, Chen D, Chang I, Rhee I, Hurwitz H: Randomized phase II trial of parsatuzumab (anti-EGFL7) or placebo in combination with FOLFOX and bevacizumab for first-line metastatic colorectal cancer. *Oncologist* **22**: 375–e30, 2017.
 - 29) von Pawel J, Spigel DR, Ervin T, Losonczy G, Barlesi F, Juhász E, Anderson M, McCall B, Wakshull E, Hegde P, Ye W, Chen D, Chang I, Rhee I, Reck M: Randomized phase II trial of parsatuzumab (anti-EGFL7) or placebo in combination with carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab for first-line nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist* **23**: 654–e58, 2018.
 - 30) Costa PF, Albers HJ, Linssen JEA, Middelkamp HHT, van der Hout L, Passier R, van den Berg A, Malda J, van der Meer AD: Mimicking arterial thrombosis in a 3D-printed microfluidic in vitro vascular model based on computed tomography angiography data. *Lab Chip* **17**: 2785–2792, 2017.
 - 31) Zhang YS, Davoudi F, Walch P, Manbachi A, Luo X, Dell'Erba V, Miri AK, Albadawi H, Arneri A, Li X, Wang X, Dokmeci MR, Khademhosseini A, Oklu R: Bioprinted thrombosis-on-a-chip. *Lab Chip* **16**: 4097–4105, 2016.
 - 32) Lee E, Takahashi H, Pauty J, Kobayashi M, Kato K, Kabara M, Kawabe J, Matsunaga YT: A 3D in vitro pericyte-supported microvessel model: visualisation and quantitative characterisation of multistep angiogenesis. *J. Mater. Chem. B* **6**: 1085–1094, 2018.