

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19403

研究課題名（和文）高圧力が拓く移植可能な組織構築技術の開発

研究課題名（英文）Fabrication of biological graft by hyperbaric pressurization

研究代表者

横山 詩子（Yokoyama, Utako）

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：70404994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：三次元組織構築法の研究が著しい発展を遂げているが、強度を求められる血管組織ではその開発は遅れている。本研究では、生理的範囲を超える極めて高い圧力を負荷すると、ヒト平滑筋細胞同士が接着して細胞外基質を多く産生し、強固な血管様組織ができることを明らかにした。同様の方法で作製したラット平滑筋細胞由来の血管グラフトはラット大動脈に移植することができ、5か月の観察期間内に破裂や血栓は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト血管平滑筋細胞に通常生体内で経験しないレベルの高圧力を印加することで、弾性線維をはじめとした三次元構造をもった細胞外基質を構築することができた。加圧印加培養を行うことで細胞のみから移植に耐えられる血管グラフトが作製できたことで、移植医療の技術となりえる可能性が示唆された。さらに非生理的範囲の周期的な静水圧印加による細胞応答を明らかにしたことで、細胞治療への学術的基盤知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Researches on three-dimensional tissue construction methods have made remarkable progress, but the ideal vascular grafts that are strong enough against blood pressure have not been developed. In this study, we found that human vascular smooth muscle cells adhere to each other and produce extracellular matrices when subjected to extremely high pressures beyond the physiological range, resulting in the fabrication of vascular grafts. A rat smooth muscle cell-derived vascular graft produced by the same method could be transplanted into the rat aorta, and no rupture or thrombus was observed within a 5-month observation period.

研究分野：循環生理学

キーワード：再生医療 循環器 メカニカルストレス 細胞・組織 バイオテクノロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血管や心臓など、生体内で血圧の圧力負荷にさらされている組織は、その圧力に耐えられるように高い弾性や剛性を持ち合わせている。発生の段階で、心臓からの血液の拍出が多くなり、血圧が徐々に上昇するにつれて血管は弾性と剛性を獲得するが、これらの機能獲得には胎生期から幼少期までといった数ヶ月以上～年の単位の時間を要する[1]。弾性や剛性といった力学的特性を担うのは血管の中でも特に中膜の平滑筋細胞とそこから分泌・合成される弾性線維であり、弾性線維構造は中膜の50%もの重量を占める[2]。しかしながら、一旦作られた弾性線維は完成すると分解されない限り数十年は存在できるため、成人期には細胞は新たな弾性線維を作る能力を失う。これらの理由から、弾性線維を有する弾性・強度のある血管グラフトを、短期間で細胞のみから作製することは現在不可能とされている。

このような背景から、生体素材をもちいた人工血管の開発では、強度のある血管を目指して機械的刺激であるずり応力や伸展刺激、圧力印加を利用する手法が試されてきた。従来の研究は、生体内の血圧や血流を模した生理的範囲の刺激を利用したものであり、これらの方法では、数ヶ月以上といった長期間に渡る培養や人工材料の支持体なしには強度を得ることが出来ない[3,4]。つまり、生理的範囲の機械的ストレスでは、生体内と同様に血管構築に長期の時間が必要であり、従来の機械的刺激条件では短期間のうちに再生医療に利用できる細胞のみから構成させる人工血管を作ることはできないと推察される。

一方、生物は気圧の低い環境には耐性が低い、圧力のかかる環境、つまり海中などには超高压まで耐えられる生物が多く存在し、これらの生物は様々な細胞外基質を産生することが知られている。研究代表者は、細胞自体は超高压まで耐えられ、高圧力環境に反応して細胞外基質をはじめとした種々の蛋白を合成する能力を持つ、という点に着目し、高圧力環境を利用して強度のある血管グラフトを構築できないかと着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の常識を超える非生理的範囲の高圧力を用いることで、大気圧環境下では十分に引き出せなかった細胞の能力を最大限に引き出し、最終的には弾性や剛性を有する移植可能な三次元組織を短期間で構築する方法をヒト由来細胞を用いて開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

高圧力を周期的に印加できる装置を連携研究者・金子と開発した。圧力の範囲を大気圧から5気圧(血圧換算で2000 mmHg)までの間で低圧、高圧を設定し、その圧力を0.002 Hzまでの範囲の周期で繰り返し印加し、培地のpHが一定になるように供給するCO<sub>2</sub>分圧を調整して加圧培養を行った。圧力印加条件検討にはヒト臍帯動脈平滑筋細胞を用いた。弾性線維形成の第一段階は、細胞膜表面に可溶性フィブロネクチン同士が結合した不可溶性フィブロネクチン原線維が形成されることであることから、免疫染色にてフィブロネクチン原線維形成を検討した。

加圧培養と細胞播種を交互に10回繰り返して得られたラット由来細胞シートは、張力測定装置(Tissue Puller 560、DMT社製)にて応力ひずみ曲線を求めて力学的特性を検討した。また、作製した平滑筋細胞シートが血管壁として生体内で機能するかを検証するために、ラットの腹部大動脈にパッチ状グラフトとして移植した。ラット腹部大動脈を全身麻酔下に露出し、大動脈を1×2 mmの楕円状に切除し、同部位に10層の平滑筋細胞シートを10-0 ナイロン糸で12針程で縫合した。移植後は、5ヶ月後まで経時的に観察し、移植部位の組織は平滑筋細胞マーカ

ー ( $\alpha$ SMA) と内皮細胞マーカー (von Willebrand factor) を用いて免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト臍帯血管平滑筋細胞を用いた培養条件として、大気圧コントロール (101 kPa) 静水圧印加 110-130 kPa、または 110-180 kPa、110-300 kPa、110-500 kPa、を繰り返したものを検討した。圧力印加の周期は 0.002 Hz に固定して 24 時間培養を行ったところ、110-180 kPa で最も高度に細胞膜表面にフィブロネクチン原線維形成が認められた。さらに、110-180 kPa の圧力印加を 0.05 Hz、0.01 Hz、0.002 Hz で行ったところ、0.002 Hz の際にフィブロネクチン原線維形成が最も顕著であった。フィブロネクチン原線維の形成は弾性線維形成の足場となると同時に、インテグリンを介した細胞同士の接着を促進し細胞の三次元配置が可能となる。110-180 kPa、0.002 Hz の培養条件において接着斑の形成とリンクして F-actin の線維構造の増強も認められた。フィブロネクチン原線維形成は、Rho kinase の阻害薬 Y27632 または C3 の添加で抑制された。

(2) (1) で得られた周期的静水圧印加条件を用いて、ヒト臍帯動脈平滑筋細胞の播種と圧力印加を 24 時間ごとに交互に行ったところ、4 層の平滑筋細胞シートを作製することができた。これらの細胞シートでは、フィブロネクチン線維の立体構築が確認できた。

(3) 高圧力培養により作製された多層細胞シートが生体内の環境に適合できるかを検討するために、ラット大動脈への移植を考慮してラット血管平滑筋細胞シートを同様の培養条件で作製した。10 層の細胞シートを安定的に作製することができ、Tensile rupture strength は約 0.2 MPa、Elastic modulus は約 0.12 であった。これらはラット大動脈中膜組織と同等であった。

(4) 10 層のラット血管平滑筋細胞シートをラット大動脈にパッチグラフトとして移植したところ、5 か月までの観察期間でグラフトの破裂や血栓による閉塞などは認められなかった。組織学的検討より、1 か月後までに宿主由来の内皮細胞が内腔を完全に被覆していることが示された。また、移植されたグラフトは弾性線維とコラーゲン線維が豊富に認められ、時間経過とともにグラフト由来の組織と宿主大動脈の平滑筋細胞の境界は不明瞭となった。

本研究の結果は、一部を論文として報告した [6]。本研究を通じて、従来実験系の困難さから用いられていなかった生理的範囲を超える高圧力環境を利用した研究の技術基盤を確立することができた。また、細胞のみを用いて弾性線維をはじめとした細胞外基質の三次元構築を短期間で実現することができた。人工素材を使用せずに細胞のみから作られる血管グラフトが作製できる可能性を示したものであり、小児など成長性のあるグラフトが切望されている領域への貢献が期待される。細胞に対する機械的刺激のうち、従来多く研究されてきたシェアストレスや伸展刺激に加え、高度の静水圧に対する細胞の反応を解明することは、これまで引き出せなかった細胞の能力を最大限に活用出来る可能性を秘めており、深海の生物に見られるような種々の蛋白や脂質合成の機序解明にも寄与する可能性が高く、血管研究に留まらない各臓器への貢献が期待される。本研究では、再生医療への応用を見据えて、倫理的、細胞数的に採取可能なヒト臍帯血管平滑筋細胞を利用したが、高圧力環境感受の分子機序の解明から、iPS 細胞、幹細胞を用いた組織構築への礎となることも期待される。

#### < 引用文献 >

Yokoyama, U.; Minamisawa, S.; Shioda, A.; Ishiwata, R.; Jin, M.H.; Masuda, M.; Asou,

T.; Sugimoto, Y.; Aoki, H.; Nakamura, T.; et al. Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* **2014**, *129*, 487-496, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726.

Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* **2009**, *89*, 957-989, doi:10.1152/physrev.00041.2008.

Abedin, M.; Tintut, Y.; Demer, L.L. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res* **2004**, *95*, 671-676, doi:10.1161/01.RES.0000143421.27684.12.

Niklason, L.E. Building stronger microvessels. *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 405-406, doi:10.1038/nbt.1854.

Ishiwata, R.; Yokoyama, U.; Matsusaki, M.; Asano, Y.; Kadowaki, K.; Ichikawa, Y.; Umemura, M.; Fujita, T.; Minamisawa, S.; Shimoda, H.; et al. Three-dimensional multilayers of smooth muscle cells as a new experimental model for vascular elastic fiber formation studies. *Atherosclerosis* **2014**, *233*, 590-600, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.045.

Yokoyama, U.; Tonooka, Y.; Koretake, R.; Akimoto, T.; Gonda, Y.; Saito, J.; Umemura, M.; Fujita, T.; Sakuma, S.; Arai, F.; et al. Arterial graft with elastic layer structure grown from cells. *Sci Rep* **2017**, *7*, 140, doi:10.1038/s41598-017-00237-1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計30件（うち査読付論文 29件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 21件）

1. 著者名 Yokoyama Utako, Tonooka Yuta, Koretake Ryoma, Akimoto Taisuke, Gonda Yuki, Saito Junichi, Umemura Masanari, Fujita Takayuki, Sakuma Shinya, Arai Fumihito, Kaneko Makoto, Ishikawa Yoshihiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Arterial graft with elastic layer structure grown from cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-00237-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計65件（うち招待講演 34件 / うち国際学会 17件）

1. 発表者名 Yokoyama U, Tomoyuki K, Junichi S, Takanori Y, Takashi N, Yoshinobu S, Kentaro K, Etsuko M, Yoshihiro I
2. 発表標題 Development of human arterial graft with mechanically functional extracellular matrices.
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤純一、横山詩子
2. 発表標題 へその緒から作る人工血管 心臓病の子供たちに成長する人工血管を届けたい
3. 学会等名 市民講座「細胞エクササイズで頑丈な人工血管を作ろう！」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山詩子
2. 発表標題 細胞をトレーニングしたら頑丈な血管ができた！細胞から血管を作る加圧トレーニングのレシピを発見
3. 学会等名 市民講座「細胞エクササイズで頑丈な人工血管を作ろう！」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokoyama U
2. 発表標題 How "Human arterial graft" should be fabricated?
3. 学会等名 CBS 2018- IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山詩子
2. 発表標題 三次元血管モデルの有用性
3. 学会等名 オープンイノベーションカンファレンスIII (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川義弘、横山詩子、齋藤純一、金子真
2. 発表標題 周期加圧培養法による人工血管の作成
3. 学会等名 第39回日本循環制御医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤純一、横山詩子、高山俊男、洞出光洋、伊藤弘明、須郷慶信、倉澤健太郎、宮城悦子、金子真、石川義弘
2. 発表標題 周期的加圧培養による移植可能な血管グラフトの作製
3. 学会等名 第17回日本心臓血管発生研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito J, Yokoyama U, Takayama T, Horade M, Ito H, Sugo Y, Kurasawa K, Ogawa M, Miyagi E, Kaneko M, and Ishikawa Y
2. 発表標題 Mechanoreponse to periodic hydrostatic pressure enables fabrication of human arterial graft
3. 学会等名 American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yokoyama, U., Saito, J., Ito, H., Tadokoro, T., Taniguchi, H., Kaneko, M. Ishikawa, Y.
2. 発表標題 Fabrication of scaffold-free human vascular graft by periodic hydrostatic pressurization
3. 学会等名 The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito, J., Yokoyama, U., Ito, H., Tadokoro, T., Sugo, Y., Kurasawa, K., Ogawa, M., Miyagi, E., Taniguchi, H., Kaneko, M. Ishikawa, Y.
2. 発表標題 Fabrication of Implantable Human Arterial Graft by Periodic Hydrostatic Pressure
3. 学会等名 The 8th TAKAO International symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計11件

1. 著者名 Saito J, Yokoyama U, Takayama T, Ito H, Tadokoro T, Sugo Y, Kurasawa K, Ogawa M, Miyagi E, Taniguchi H, Kaneko M, Ishikawa Y.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 398(289-291)
3. 書名 Fabrication of implantable human arterial graft by periodic hydrostatic pressure.	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Method for producing three-dimensional cell aggregates.	発明者 Utako Yokoyama	権利者 公立大学法人横浜市立大学，大阪大学，名古屋
産業財産権の種類、番号 特許、US 10,669,525 B2	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

東京医科大学 細胞生理学分野 <a href="https://tokyo-med-physiology.jimdofree.com/">https://tokyo-med-physiology.jimdofree.com/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 純一  (Saito Junichi)  (30779301)	横浜市立大学・医学部・助教    (22701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	金子 真  (Kaneko Makoto)  (70224607)	大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------