

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04440

研究課題名(和文) 静脈弁形成を制御する力学要因の抽出と再構成アプローチによる静脈弁誘導の試み

研究課題名(英文) In vitro venous valve formation by extracting and reconstructing the mechanical cues involved in the valve development

研究代表者

三浦 重徳 (Miura, Shigenori)

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：70511244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：発達した弁組織を有することで知られる伏在静脈の血管内皮細胞(HSaVECs)を用いて、灌流および伸展刺激を負荷可能な(i)3次元血管網モデルおよび(ii)血管流路モデルをそれぞれ構築した。モデル(i)では、ミリメートルサイズの自発的に形成された血管網の構築を達成し、モデル(ii)では、灌流および伸展刺激を組み合わせることで脈動流を形成し、流路分岐部において不均一な遺伝子発現の分布を再現することに成功した。このように、血管モデルにおける力学刺激と静脈弁関連遺伝子との関わりを評価可能な研究基盤を構築し、HSaVECの力学刺激応答に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「下肢静脈瘤」は、静脈弁が破壊されたことにより発症する典型的な静脈疾患で、国内だけでも女性を中心に1000万人を越える患者がいると言われている。現在、ヒトの生体外静脈弁モデルは知られておらず、マウスなどの四足動物では下肢静脈瘤モデルの作製は困難であると考えられる。本研究により得られた知見とヒト血管モデルに対する力学刺激負荷システムは、生体外で弁組織を誘導するための新たな研究基盤として有用であるとともに、創薬研究の進展に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a stretching and perfusion culture system of vascular constructs lined with the human saphenous vein endothelial cells, aiming at the in vitro induction of venous valve. The following two types of vascular model have been successfully constructed: (i) a three-dimensional (3D) vascular model formed through the cellular processes of self-tissue organization and (ii) ECM microchannel-based artificial vascular model with branching structure. With the model (i), we constructed a millimeter-sized perfusable 3D blood vessel network utilizing the microfluidic channels guided by the microposts. With model (ii), pulsatile flow can be generated by optimizing the stretching and perfusion conditions, which resulted in the upregulation of CD31 in the cells located at the branching points. These models are expected to be useful to understand the mechanical cues underlying the venous valve formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：静脈弁 下肢静脈瘤 メカニカルストレス BioMEMS マイクロ流体デバイス 血管網 再生医療 創薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

静脈弁の組織誘導から崩壊までの組織リモデリングプロセスは、血流によって生じる流体せん断力や筋ポンプ作用によって生じる機械的な力学刺激などで構成される「静脈血管特有の力学場」の中で進行するが、一連のプロセスにおいてそれぞれの力学刺激が果たす役割はほとんど知られていない。近年、リンパ管形成を制御する遺伝子の一部が静脈弁の形成や維持に関与していることが報告され、弁組織の形成に関わる遺伝子が徐々に明らかにされている。静脈弁は、血管内皮細胞が弁内皮細胞へと分化転換することにより形成される。転写因子 Prox1 は、静脈弁形成過程の初期から弁内皮細胞で発現が誘導され、Integrin- $\alpha$ 9 (INTA9)や EphrinB2 (EFNB2)などとともに弁の形成・維持に必要であることが明らかになってきた。しかしながら、弁組織の形成は局所的に起こり、タイミングも一様ではないことから、弁組織の誘導に関わる遺伝子群を局所的に変化させる何らかの要因が存在するはずである。我々は、血管内に生じる不均一なメカニカルストレスが弁組織を誘導するためのトリガーとなっているのではないかと考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、発達した弁組織を有することで知られる伏在静脈の血管内皮細胞を用いて、灌流および伸展刺激を負荷可能な3次元血管内皮管腔ネットワークをマイクロ流体デバイス内に構築する。伏在静脈血管内皮細胞に流体剪断力または伸展(圧迫)刺激を負荷することで力学刺激応答遺伝子群を抽出し、力学刺激によって制御される弁形成関連遺伝子を明らかにする。また、GCaMPなどのカルシウムセンサー蛍光タンパク質を利用することで、血管網内の力学場をリアルタイムに可視化可能な観察システムを構築する。このようにして得られた遺伝子群と力学場の対応情報をもとに、マイクロ流路デバイス内に構築した血管網の力学場を制御し、静脈弁の誘導を試みる。

## 3. 研究の方法

### ① マイクロ流体デバイスを用いた血管網の構築

ヒト伏在静脈血管内皮細胞 (HSAVEC) またはヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、以下の2種類の血管網モデルを構築する。

#### (1) 3次元血管網モデル

マイクロポスト構造を有するマイクロ流路デバイス内に、ゲルに懸濁した血管内皮細胞を導入することで、直径50~100  $\mu$ mの3次元血管網を形成する。血管網が有する管腔構造は、共焦点顕微鏡、光干渉断層撮影 (OCT) および蛍光デキストランの注入などにより確認する。

#### (2) 血管流路モデル

上記モデル(1)は、血管内皮細胞の自発的な管腔形成能を利用するため、生体模倣性が高く複雑な血管網を形成するが、力学場の再現が困難であるといった欠点がある。そこで、コラーゲンゲル中に分岐した流路を作製し、これに血管内皮細胞を播種することで力学刺激の制御・解析が容易な血管流路モデルを構築する。

### ② 血管モデルの灌流培養系および伸展培養系の確立

構築した2つの血管モデルを安定して灌流および伸展可能な培養システムを構築する。また、これらの力学刺激が血管網形成に与える影響を観察するためのライブ観察システムの構築についても検討する。

### ③ 力学刺激の可視化方法の検討

弁形成関連遺伝子の発現誘導部位と力学刺激との関連性を解析するため、流路デバイス内で形成された力学場を可視化する方法について検討する。力学刺激に伴って、血管内皮細胞では細胞内カルシウム濃度が上昇することが知られている。GCaMP(カルシウムと結合し蛍光を発する)発現ベクターをヒト伏在静脈血管内皮細胞に導入し、力学刺激に応じて蛍光強度の増加が認められるか条件検討を行う。

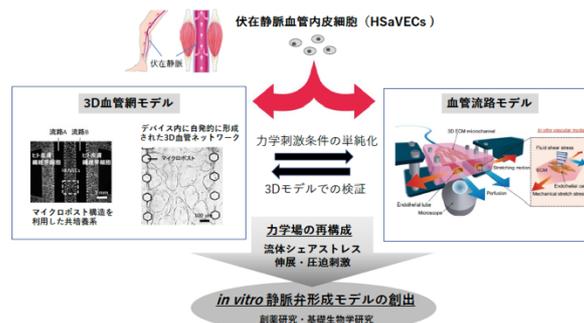


図1. 3D 血管ネットワークモデルと血管流路モデルを用いた静脈弁 *in vitro* 誘導条件の探索

#### ④ ヒト伏在静脈血管内皮細胞の力学刺激応答解析

静脈弁を有する伏在静脈から採取された HsAVEC と静脈弁を持たない臍帯静脈から採取された HUVEC からそれぞれ RNA を単離し、両細胞の遺伝子発現プロファイリングを実施する。また、ヒト伏在静脈血管内皮細胞または血管モデルに対して、流体シヤアストレス、伸展刺激、または両方の力学刺激を負荷し、遺伝子発現変化を解析する。

### 4. 研究成果

#### ① マイクロ流体デバイスを用いた血管網の構築

(1) 3次元血管網モデル (円形血管網モデル)  
マイクロポスト構造を利用し、血管網形成エリアとマイクロ流路間に血管吻合構造を形成可能なデバイスを独自に設計した。血管内皮細胞、線維芽細胞、I型コラーゲンおよびフィブロノーゲンから成る細胞・ゲル混合液をデバイスへ導入し1~2週間培養することで、ミリメートルサイズの血管網の形成に成功した。細胞組成、ゲル組成およびデバイスへの播種方法などについてさらに検討を重ね、50~100  $\mu\text{m}$  の血管径を持つ3次元血管網を2週間程度で再現よく形成する手法を確立した。共焦点顕微鏡、光干渉断層撮影 (OCT) などを用いて、形成された3D血管網が連続した管腔構造を有することを確認した。さらに、デバイス内に形成された3次元血管網とマイクロ流路との吻合部形成率を向上させるために、デバイス設計や流路に導入する培地組成について検討を行った。その結果、培地流路に隣接した繊維芽細胞共培養流路の配置、または培地流路内に血管新生因子4種を含む混合液を導入することで、培地流路と血管網との吻合部形成率が大幅に改善することがわかった。FITC-dextran を培地流路に注入すると、吻合部を介して血管網内に流入し血管網が可視化されたことから、デバイス内に形成された血管網が実際に灌流可能な管腔構造を有することを確認した。

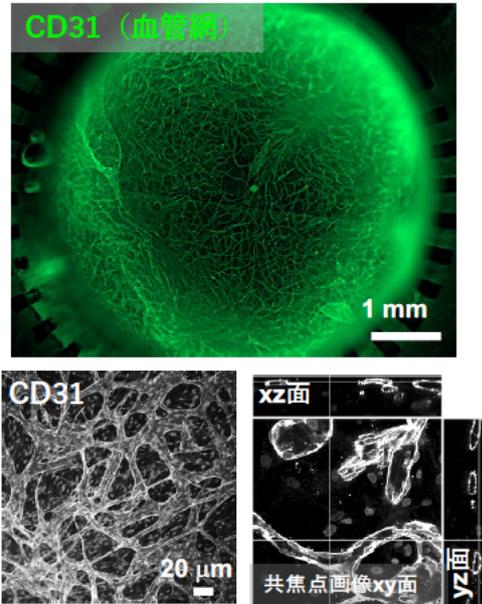


図2. マイクロポスト構造を利用して作製した3D血管網モデル. 共焦点顕微鏡により、管腔構造が確認できる。

#### (2) 血管流路モデル

3Dプリンタで形成された管腔形成用PVAモールド(水溶性犠牲層)をコラーゲンゲル内に設置し、灌流可能なコラーゲンマイクロ流路を作製した。その後、GFP-HUVEC懸濁液を流路内に導入し、流路内腔を覆うことで血管流路モデルを構築した。PVAモールドは図3にあるように、分岐構造を有しており、流路径が段階的に小さくなるよう設計することで、多様な流体シヤアストレスを血管内皮細胞に負荷できるモデルとした。

#### ② 血管モデルの灌流培養および伸展培養システムの構築

2つの血管モデルに対して流体シヤアストレス、伸展刺激を負荷するために、灌流および伸展培養システムの構築を試みた。図2に示す3D血管網モデルは、蛍光デキストラン溶液を注入すると、血管網エリアの辺縁部までしか浸透せず、中央部では管腔構造は未発達で灌流性が高くないことが判明した。光干渉断層撮影(OCT)で3D血管網が形成されたゲル組織の形状を観察すると、凹形状となっており中央部では組織密度が高く、管腔が形成されにくい状態であった。したがって、3次元血管網の灌流を目的とする場合、血管形成領域のサイズを2~3 mm以内にとどめる必要があることがわかった。本研究では、既に図1に示した従来の3D血管網作製デバイスを用いて灌流実験に成功している。このデバイスでは、左右の流路は効率よく管腔構造により連結され、デバイス

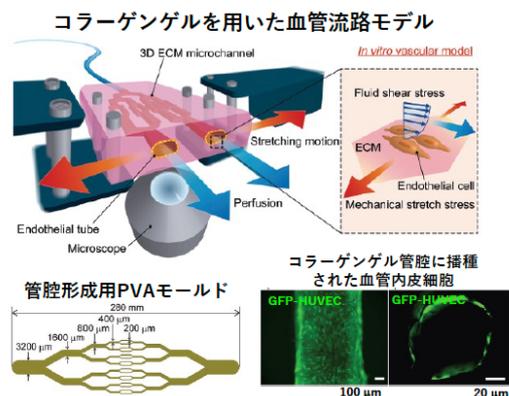


図3. 血管流路モデル. 分岐構造を持つコラーゲンマイクロ流路を作製し、流路内に血管内皮細胞を導入することで、血管を模倣したマイクロ流体モデルを構築した。

を傾斜させることにより血管網の灌流培養が可能であった。また、図4に示すように、市販のストレッチチャンバーと3D血管網形成デバイスをボンディングすることで、血管網の伸展培養系を構築した。さらに、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で使用可能な細胞培養ライブ観察システム（図4左図）に装着可能な独自の伸展制御システム（金属加工したチャンバー固定部材をステッピングモーター、伸展コントローラーで伸展制御）を作製した。本システムを用いることにより、伸展刺激を負荷しながら血管網形成の長期観察およびGCaMPの蛍光シグナルの検出（以下「③力学刺激の可視化」参照）が可能となった。

次に、血管流路モデルの灌流および伸展培養について検討を行なった。シリンジポンプに接続されたコラーゲンマイクロ流路を顕微鏡下に設置された伸展チャンバ内に作製し、蛍光ナノビーズを注入することにより流路内の流れを可視化した。チャンバ伸展方法と送液を制御することにより、マイクロ流路内に脈動流を形成可能なモデルを構築することができた。また、灌流/伸展培養条件下では、流路内の血管内皮細胞は流れ方向（伸展方向に対して垂直）に沿って配向し、生体内の血管と類似した血管構造および流れ特性を模倣することに成功した。

### ③ 力学刺激の可視化方法の検討

力学刺激に反応して細胞内に流入してくるカルシウムイオンをイメージングすることで、細胞が感受している力学刺激の可視化について検討を行なった。GCaMP6sまたはGCaMP6fを2A peptideを介してnls-dTomatoとタンデムに連結し、共発現する発現ベクターを構築した。構築したベクターをリポフェクションによりHSAVECに導入したところ、核内にdTomatoの蛍光シグナルを認めた。しかしながら、伸展率5, 10, 15, 20%いずれの条件においてもGCaMPに由来する緑色蛍光シグナルはdTomato陽性細胞において微弱ながら検出されるのみであり、3次元血管網内の力学刺激を可視化するための十分な感度を達成できなかった。引き続き、tdTomatoを用いた感度改善および伸展頻度などについて条件検討を行っている。

### ④ ヒト伏在静脈血管内皮細胞の力学刺激応答解析

静脈弁が発達する伏在静脈から採取されたHSAVECより抽出したRNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、HUVECの遺伝子発現プロファイルと比較することで、HSAVECで高発現するメカノセンサータンパク質、静脈弁マーカー数種を同定した。また、伸展刺激に対する力学刺激応答遺伝子を抽出するため、HSAVECに伸展刺激を0, 5, 72時間負荷し、RNA-seq解析を行なった。静脈弁マーカーであるPROX1, EFNB2, INTA9などは、伸展刺激により有意に発現誘導されることを確認した。以上の結果から、HSAVECは、HUVECと比較して特定のメカノセンサータンパク質を高発現し、伸展刺激により静脈弁形成に関わる遺伝子の発現が誘導される特性を有している可能性が示唆された。

一方、血管流路モデルを灌流/伸展培養すると、分岐部においてCD31の発現が亢進しており、分岐部と直線部で不均一な遺伝子発現パターンを再現することに成功した。しかしながら、本モデルでは伸展/灌流培養により静脈弁と思われる形態誘導は認められず、負荷する力学刺激条件の強さ、頻度について引き続き検討が必要であると考えられた。

以上、本研究を通じて、静脈弁関連遺伝子と力学刺激との関連性を評価可能な3次元血管モデルを構築するとともに、発達した静脈弁を有する伏在静脈から採取されたHSAVECの力学刺激応答性について新たな知見を得ることができた。

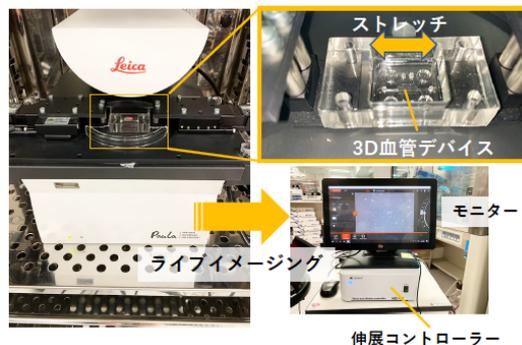
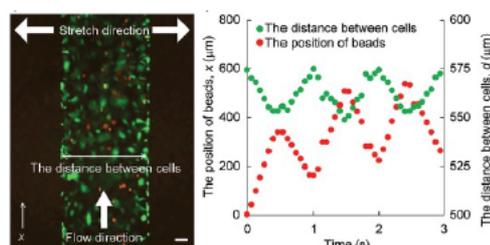


図4. 3D血管網モデル伸展培養システムの構築。CO<sub>2</sub> インキュベーター内で血管網形成の長期ライブ観察が可能。

### 灌流/伸展培養により形成された脈動流



### 灌流/伸展培養により流れ方向に細胞が配向

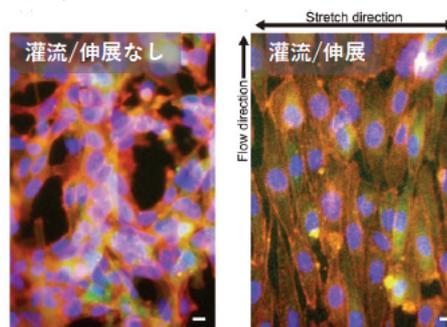


図5. 灌流/伸展培養による脈動流の形成と細胞配向性の向上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto, Y., Nagata, S., Matsumoto, M., Sugawara, K., Miura, S., and Takeuchi	4. 巻 348
2. 論文標題 Microfluidic system for applying shear flow to endothelial cells on culture insert with collagen vitrigel membrane.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators: B. Chemical	6. 最初と最後の頁 130675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2021.130675	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 -

1. 著者名 Shimizu, A., Goh,WH., Itai, S., Hashimoto, M., Miura, S. and Onoe, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 ECM-based microchannel for culturing in vitro vascular tissues with simultaneous perfusion and stretch.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab on a chip	6. 最初と最後の頁 1917-1927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0lc00254b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Muramatsu, J., Shimizu, A., Hashimoto, M., Miura, S., and Onoe, H.
2. 発表標題 Protein expression micro-scale mapping analysis of endothelial tissue in in vitro branched vascular model under mechanical stimuli.
3. 学会等名 MEMS2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Muramatsu, J., Hashimoto, M., Miura, S., and Onoe, H.
2. 発表標題 Pulsatile flow analysis at branched point in ECM-based endothelial vascular model under mechanical stretch.
3. 学会等名 MicroTAS 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 K. Kasahara, Y. Kurashina, S. Miura, S. Miyata, H. Onoe
2 . 発表標題 Real-time single-cell-resolution observation of three-dimensional skeletal muscle tissues under mechanical stimuli
3 . 学会等名 MBI 3M satellite poster session in Japan ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 J. Muramatsu, W. H. Goh, M. Hashimoto, S. Miura, A. Shimizu, K. Hashimoto, and H. Onoe
2 . 発表標題 Shape retaining and sacrificial molding fabrication method for ECM-based in vitro vascular model
3 . 学会等名 MEMS2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 K. Kasahara, Y. Kurashina, S. Miura, S. Miyata, and H. Onoe
2 . 発表標題 Real time three-dimensional single cell-resolution monitoring system for observation of dynamic cell behavior under mechanical stimuli.
3 . 学会等名 MEMS2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 J. Muramatsu, W. H. Goh, M. Hashimoto, S. Miura, A. Shimizu, K. Hashimoto, and H. Onoe
2 . 発表標題 Shape retaining and sacrificial molding fabrication method for ECM-based in vitro vascular model.
3 . 学会等名 MEMS2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 清水あずさ、Goh Wei Huang、橋本道尚、三浦重徳、尾上弘晃
2. 発表標題 in vitro 3次元組織培養のための伸展可能なECMマイクロ流体システム
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Shimizu, J. Hashimoto, M. Hashimoto, S. Miura, H. Onoe
2. 発表標題 ECM-based Stretchable Microfluidic System for in vitro 3D Tissue Culture.
3. 学会等名 Transducers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu, A., Goh, Wei H., Itai, S., Hashimoto, M., Miura, S., Onoe, H.
2. 発表標題 Stretching Motion-driven ECM-based Pulsatile Flow Generator for Mimicking Venous Blood Flow in vivo.
3. 学会等名 MicroTAS 2019 Proceedings (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋下健哉、清水あずさ、三浦重徳、尾上弘晃
2. 発表標題 In vitro血管モデルにおける力学刺激と細胞応答の可視化
3. 学会等名 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三浦重徳, 竹内昌治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 じほうビジネスサービス	5. 総ページ数 7
3. 書名 Drug Delivery System 第34巻4号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	尾上 弘晃  (Onoe Hiroaki)  (30548681)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授    (32612)	

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
---------	---------