

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21910

研究課題名（和文）微小環境の恒常性維持を可能とする人工リンパ管組織の開発

研究課題名（英文）Development of artificial lymphatic tissue that enables homeostasis of microenvironment

研究代表者

関根 秀一（Sekine, Hidekazu）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60541737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ管内皮細胞のネットワークを含む細胞シートが、in vivoでの移植後のリンパ管新生を促進するかどうかを評価した。ヒトリンパ管内皮細胞とヒト脂肪由来間質細胞を共培養し、リンパ管内皮ネットワークを有する細胞シートを構築した。3層構造の細胞シートをラット皮下組織に移植して2週間後に、ヒトリンパ管内皮細胞由来のリンパ管を観察した。リンパ管の数、直径、深さは、3：2比細胞シートに脂肪由来間質細胞シートを2枚重ねたコンストラクトで最大であった。このコンストラクトをラットの大腿リンパ管切除モデルに移植したところ、移植細胞と宿主リンパ管内皮の両者を含む機能的なリンパ管が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はリンパ管の新生・再疎通による微小環境の恒常性維持メカニズムの解明に寄与することのみならず、リンパ浮腫をはじめとする難治性疾患に対する病因の解明や新治療法の技術開発が可能となり、医療へ大きく貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：This study evaluated whether cell sheets containing a network of lymphatic vessel endothelial cells promote lymphangiogenesis after transplantation in vivo. Human lymphatic endothelial cells and human adipose-derived stromal cells were co-cultured to construct cell sheets with lymphatic endothelial networks. 2 weeks after transplantation of the three-layered cell sheets into rat subcutaneous tissue, lymph vessels derived from human lymphatic endothelial cells were observed. The number, diameter, and depth of lymphatic vessels were greatest in a construct consisting of two adipose-derived stromal cell sheets over a 3:2 ratio cell sheet. When this construct was transplanted into a rat femoral lymphangectomy model, functional lymphatic vessels containing both transplanted cells and host lymphatic endothelium were formed.

研究分野：再生医工学

キーワード：リンパ管再生 リンパ管内皮細胞 共培養 組織工学 再生医療 細胞シート リンパ管切除モデル 脂肪由来間質細胞

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体に類似した3次元組織を構築するには、*in vitro* でいかに生体内により近い細胞の周辺環境をつくるかが求められる。さらには、血管吻合可能な動静脈と毛細血管網を有した構造体とする必要がある。生体内・生体外いずれにおいてもこれらの血管網無くして長期的な構造・機能維持は困難である。これまでに我々は、小動物を用いた既存研究において生体由来の動静脈付き血管床上に血管構成細胞を含むラット心筋シートを段階的に積層化することにより血管網を付与した厚い拍動心筋組織を作製する技術を確立している。毛細血管網を有する生体由来の血管床に足場を含まず細胞だけで構成される細胞シートを直接密着させることが細胞シート内の血管網誘導とそれらの新生毛細血管と血管床内毛細血管との結合に大きく貢献している。より厚く高機能な組織を構築するためには、老廃物の除去や再生毛細血管から漏れ出した組織液を排除し代謝バランスの調整を行う毛細リンパ管の再生が必須となっている。

2. 研究の目的

本研究では、血管網付与技術を基盤に再生組織中の微小環境の恒常性を維持可能とする3次元毛細リンパ管付き組織の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒトリンパ管内皮細胞(HDLEC)とヒト脂肪由来間質細胞(ASC)の共培養を比率別(HDLEC:ASC, 3:2, 1:4)、VEGF-C添加濃度別(0, 25, 50ng/ml)に培養後、リンパ管の分岐数や長さを比較し最適なネットワーク形成条件を検討した。

(2) リンパ管細胞シートを拡散ネットワーク群と局在ネットワーク群でラット皮下に移植し、生着及びリンパ管網の構築を評価する。拡散ネットワーク群としてHDLEC:ASCを1:4で共培養し、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作成し3層重ねて移植とした。局在ネットワーク群はHDLEC:ASCを3:2で共培養し、温度応答性培養皿を用いて作製した細胞シートをASCシート(HDLEC:ASC, 0:5)1層ずつ上下で挟み3層のシート移植とした。

(3) 局在ネットワーク群と同様の細胞シートをラット大腿部で切断したリンパ管上に移植をし、シート内に新生されたリンパ管と宿主のラットリンパ管との接続の有無、物質の輸送が可能か機能の確認を行った。

4. 研究成果

(1) LECはASCと共培養することでネットワーク構造を呈した。緑色蛍光タンパク質発現血管内皮細胞は、ASCsと共培養するとネットワークを形成し(細胞比1:4)血管網のエッジが尖っていた。ASCsと共培養したLEC(1:4比)もネットワークを形成したが、LECネットワークの端の構造は盲端囊のように膨らんだ構造を形成していた。LECとASCを1:4の細胞比で共培養することで、LECネットワークが確認された。GFP-LECとASCの共培養のマージ画像と位相差画像から、ASCはASC内のネットワークを構成せず、LECのネットワークを直接サポートすることもなく、特定の性質を持たないランダムなパターンが観察された。

(2) ASCsと共培養したLECの網目模様と及ぼす細胞比率とVEGF-C濃度の影響。VEGF-Cの濃度はLECによる網目模様にはほとんど影響を与えなかったが、LECとASCの比率を1:4から3:2に変更すると、LECの網目模様が密集した島状の形成が促進された。定量的な評価では、VEGF-C濃度は、1mm²あたりの枝数および1mm²あたりの枝長に大きな影響を及ぼさないことがわかった。しかし、LEC/ASC比を1:4から3:2に変更すると、1mm²あたりの枝数が増え(P<0.05)、1mm²あたりの枝長が長くなった(P<0.05 二元配置分散分析)。一対比較では、3:2比/25ng/mL VEGF-C群の枝密度は、1:4比/0ng/mL VEGF-C群や1:4比/25ng/mL VEGF-C群のそれよりも有意に高い(P<0.05)ことが示された。

(3) ラット皮下組織への移植から2週間後の3層構造のLEC/ASC細胞シート(1:4比)には、リンパ管様の構造が確認された。生体内に移植したLEC/ASCシートでリンパ管が発達するかど

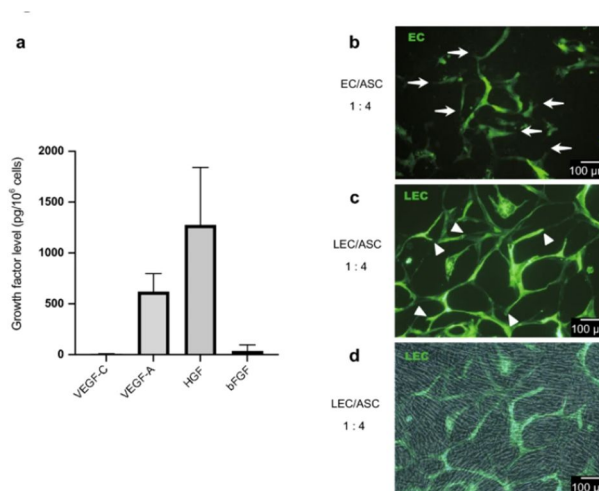


図1. ASCsによる成長因子の分泌と、ECまたはLECとの共培養によるネットワークの形成

うかを調べるため、LEC/ASCシート（1：4比）を3枚重ね、ラット臀筋に移植しました。移植2週間後の細胞シート/皮下部のポドプラニン免疫染色により、LECからなる血管様構造の存在が確認され、拡大画像では細胞シート内に物質が移動していることが確認された。このことから、細胞シート移植によるリンパ管状構造への発達が確認された。

（4）ラット皮下組織への細胞移植方法の違いによるリンパ管様構造の比較。LECとASCを1:4の割合で混合した懸濁液を注入（細胞懸濁液群） LEC/ASC（1:4）を3枚重ねて移植（拡散 LEC ネットワーク群）、ASC2枚と LEC/ASC（3：2）1枚を重ねて移植（局在 LEC ネットワーク群）という3種類の細胞移植の方法について比較検討した。ヒトポドプラニンの免疫染色により、移植した LEC 由来のリンパ管様構造を同定し、移植した LEC 由来のリンパ管の特徴を数値化した。細胞懸濁液投与群では、細胞シート投与群に比べ、皮下層に宿主血管（抗ヒトポドプラニン抗体陰性の宿主の動脈、静脈、リンパ管）が多く含まれており、注入による炎症反応によるものと考えられた。移植1週間後、ヒトポドプラニン陽性リンパ管は、細胞懸濁液群では認められず、拡散ネットワーク群では時々見られ、局所性 LEC ネットワーク群ではより頻りに観察された。リンパ管様構造の数、平均直径、平均深さ、最大深さは、いずれも細胞懸濁液群よりも拡散ネットワーク群で有意に高かった（ $P < 0.01$ ）。さらに、リンパ管様構造の数、平均直径、平均深さ、最大深さは、細胞懸濁液群（ $P < 0.01$ ）または拡散 LEC ネットワーク群（ $P < 0.01$ ）よりも局在 LEC ネットワーク群において有意に高かった。したがって、LEC 由来のリンパ管の数、直径および深さは、他のグループよりも限局性 LEC ネットワークグループの方が大きいことが確認された。

（5）移植によるリンパ管再建の支援を確認。1.5×1.5mm の大腿筋とそのリンパ管を切除して大腿リンパ管切除モデルを作製し、mScarlet-1 標識 LEC の局所的ネットワークを含む細胞シートを欠損部に移植した。細胞シート移植 1 週間後に移植部位を観察したところ、移植した筋層表面に新生血管が確認された。また、この部位には LEC のネットワークが観察された。蛍光ヒアルロン酸を間質に注入してリンパ管の機能を評価したところ、蛍光ヒアルロン酸注入後3分から宿主リンパ管に蛍光シグナルが現れ、12分後には消失したことから、宿主リンパ管は間質からヒアルロン酸を取り込んで循環することができた。さらに、ヒアルロン酸注入後3分から7分の間に高倍率で観察したところ、宿主リンパ管と移植リンパ管内皮の間の接続が示された。以上のことから、移植 LEC はリンパ管の再建に寄与する可能性があることが示唆された。

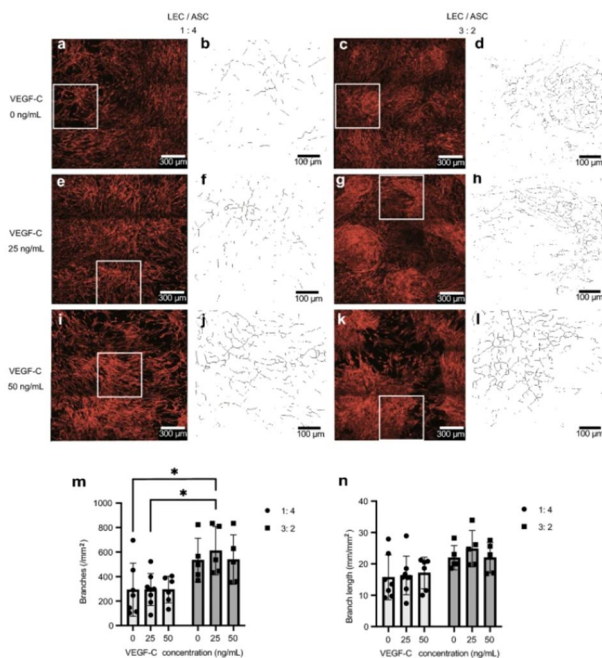


図 2. ASC と共培養した LEC による網目模様に対する細胞比および血管内皮増殖因子-C 濃度の影響

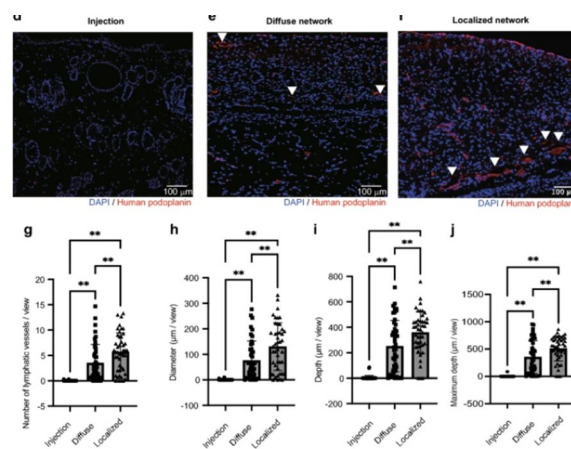


図 3. 細胞移植方法の違いによるリンパ管様構造の比較

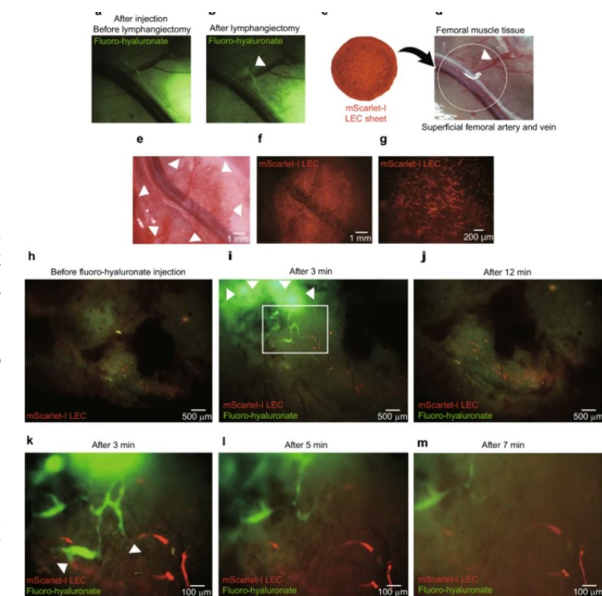


図 4. 局在ネットワーク LEC 細胞シートは機能的なリンパ管の再建に寄与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ayumi Inoue Nagahara, Jun Homma, Bikei Ryu, Hidekazu Sekine, Yuhei Higashi, Tatsuya Shimizu, Takakazu Kawamata	4. 巻 12
2. 論文標題 Networked lymphatic endothelial cells in a transplanted cell sheet contribute to form functional lymphatic vessels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26041-0	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 歩, 関根 秀一, 劉 美憬, 本間 順, 清水 達也, 川俣 貴一
2. 発表標題 リンパ管内皮ネットワークシート移植によるリンパ管網構築法に関する基礎検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	本間 順 (Homma Jun) (50507366)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	

	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
研究協力者	井上（長原） 歩 (Inoue Nagahara Ayumi)	東京女子医科大学・脳神経外科 (32653)	

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