

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 2 月 27 日現在

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21500433
 研究課題名（和文） 積層化再生組織内における血管前駆構造体の形成機構と機能に関する研究
 研究課題名（英文） Studies on the formation mechanism and function of prevascular network structures within multi-layered cell-sheet constructs
 研究代表者
 笹川 忠（SASAGAWA TADASHI）
 東京女子医科大学・医学部・助教
 研究者番号：30424675

研究成果の概要（和文）：細胞シート三次元積層化共培養システムを用いて、積層化再生組織内における血管前駆構造体の形成機構ならびに移植後に誘導される毛細血管新生の機序について検討を行った。血管内皮細胞に発現する分泌型糖タンパク質と細胞内タンパク質をコードする二種類のヒト遺伝子を新たに見出した。特に、後者の遺伝子に対するsiRNAを血管内皮細胞に導入した場合、マトリゲル上で誘導されるネットワーク形成に抑制が認められたことから、この遺伝子が血管前駆構造体形成に関わる分子の一つである可能性が示唆された。一方で、血管前駆構造体を有する積層化再生組織において胎盤増殖因子PlGFならびに細胞外マトリックス分解酵素MMP-9の産生亢進が認められたことから、両分子の皮下移植時に誘導される毛細血管網形成への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using a cell-sheet staking 3-D co-culture system, the mechanisms of prevascular network formation within layered cell-sheet and neovasvularization by engrafted prevascular cell-sheets were investigated. Two human genes encoding secreted glycoprotein and intracellular protein, expressed in endothelial cells (ECs), were newly identified. Especially, EC network formation on Matrigel was inhibited by treating the cells with siRNA for the latter gene, indicating that this gene might be one of the regulators for prevascular network formation. On the other hand, the productions of both placenta growth factor (PlGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) significantly increased in the prevascular cell-sheets. Therefore, these soluble proteins might play an important role in the functional anastomosis after subcutaneous transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：組織工学、再生医療、細胞シート、血管新生、三次元積層化共培養、血管内皮細胞ネットワーク形成

1. 研究開始当初の背景

これまでに、血管内皮細胞をシート状態にある培養細胞(細胞シート)でサンドイッチ状に挟み込んで三次元的な組織化を行うことにより、再生組織内において血管内皮細胞が網目状のネットワーク構造(血管前駆構造体)を形成すること、さらに皮下組織へ移植した場合にその網目構造を反映するような毛細血管網形成が移植後早期に誘導されることを見出している。

2. 研究の目的

本研究は、細胞シート三次元積層化共培養法によって再構築された積層化組織を新しい血管新生モデルとして用い、血管前駆構造体の形成機構ならびに移植後に誘導される血管新生の機序を解明することで、血管形成に関わる新たな血管生物学的知見の獲得を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 血管前駆構造体形成に伴って発現が変動する遺伝子の探索

温度応答性培養皿と細胞シート積層化支援デバイスを用いて、蛍光ラベルしたヒト大動脈由来血管内皮細胞(HAEC)をヒト皮膚由来線維芽細胞(FB)シートで挟み込んで血管前駆構造体を有する積層化組織を作製した(図 1-A)。コントロールには、蛍光ラベルした FB を挟み込んだ積層化組織を実験に供した。経時的に Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。データ解析により絞り込まれた候補遺伝子は、RT-PCR により、その発現の確認を行った。

(2) 候補遺伝子産物の特性解析

マイクロアレイ解析によって絞り込まれた二種類の候補遺伝子に関して、発現ベクターを作製し、CHO 細胞に遺伝子導入することで、安定発現細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、免疫染色およびウエスタンブロットによるタンパク質レベルでの解析を行った。さらに、各種ヒト由来細胞を用いた発現に関する検討も行った。

(3) 候補遺伝子産物の機能解析

血管内皮細胞に候補遺伝子に対する siRNA を導入することで、その遺伝子発現を抑制した場合のマトリゲル上で形成される血管内皮細胞のネットワーク状態を指標として機能評価を行った。

(4) 積層化組織が産生する血管新生関連因子の探索

移植時の行程を反映させるために、各積層化組織を組織培養用ディッシュに再接着させ、血清および Growth factor を含まない培地で、三日間培養を行った。調製した培養上清は、抗体アレイ解析に供した。特に、血管前駆構造体を有する積層化組織で産生亢進が示唆された因子に関しては、ELISA またはウエスタンブロットにて、定量的または定性的に評価を行った。

4. 研究成果

(1) 積層化組織内における血管前駆構造体の形成に伴って発現増加を示す遺伝子

HAEC を FB シートで挟み込む三次元的な共培養を行うことで、積層化組織内に血管前駆構造体の形成が誘導される(図 1-B)。経時的に抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、血管前駆構造体を有する積層化組織に特異的な発現を示し、かつその形成に伴って増加傾向を示す、機能不明な二種類の遺伝子(便宜上、#1 および#2 と表記)を見出すことができた(図 1-C)。

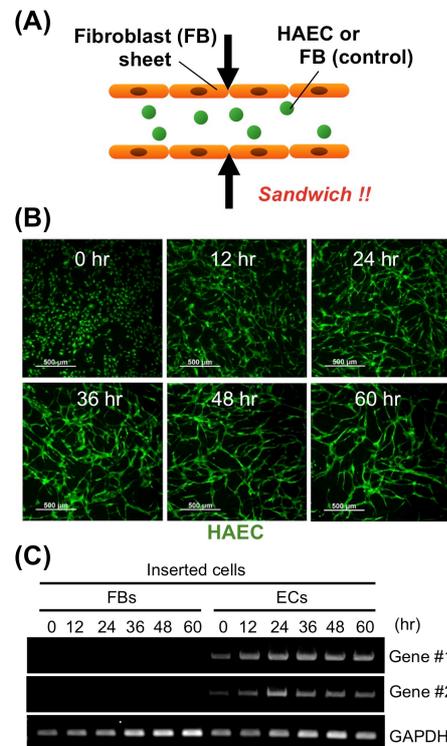


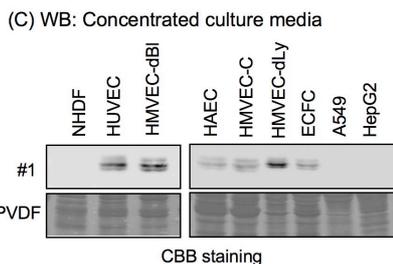
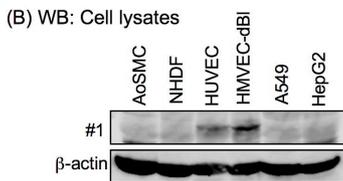
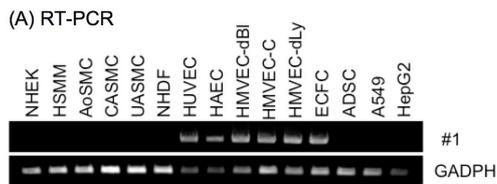
図 1. 血管前駆構造体形成に伴って発現に変化を示す遺伝子探索の検討

(2) 遺伝子#1に関する解析

タンパク質レベルでの解析を行うため、C末端側に FLAG タグを有する発現ベクターを作製し、CHO 細胞に遺伝子導入を行った。この安定発現細胞株を用いて、抗 FLAG 抗体による免疫染色およびウエスタンブロット、さらにリコンビナントタンパク質を用いた解析の結果により、#1 タンパク質は小胞体-ゴルジ体を経由して分泌される糖タンパク質である可能性が示唆された。

次に、#1 タンパク質が実際に発現・分泌されているのかを調べるため、種々のヒト由来細胞を用いて検討を行った。まず、遺伝子発現に関しては、内皮細胞特異的に発現する傾向が認められた(図 2-A)。さらに、抗#1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、各種内皮細胞の細胞溶解液ならびに濃縮培養上清において、推定される分子量の位置にバンドを検出することができた(図 2-B, 2-C)。

また、機能評価に関しては、ヒト血管内皮細胞に遺伝子#1 に対する siRNA を導入した場合、マトリゲル上で形成される血管内皮細胞のネットワーク構造には、顕著な変化は認められなかった。



NHEK: ヒト表皮角化細胞
 HSMM: ヒト骨格筋芽細胞
 AoSMC: ヒト大動脈平滑筋細胞
 CASMC: ヒト冠状動脈平滑筋細胞
 UASMC: ヒト臍帯動脈平滑筋細胞
 NHDF: ヒト皮膚線維芽細胞
 HUVEC: ヒト臍帯静脈内皮細胞
 HAEC: ヒト大動脈内皮細胞
 HMVEC-dBI: ヒト皮膚微小血管内皮細胞
 HMVEC-C: ヒト心臓微小血管内皮細胞
 HMEVC-dLy: ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞
 ECFC: ヒト血管内皮前駆細胞
 ADSC: ヒト脂肪由来幹細胞
 A549: ヒト肺癌基底上皮癌細胞株
 HepG2: ヒト肝癌細胞株

図 2. 各種ヒト由来細胞における#1 の発現に関する検討

(3) 遺伝子#2に関する解析

N 末端側に GFP を融合させて発現させるためのベクターを作製し、CHO 細胞に遺伝子導入を行った。この遺伝子産物と GFP との融合タンパク質は、細胞骨格に似たような細胞内局在を示した(図 3-A)。また、遺伝子#2 においても、今回使用したすべてのヒト内皮細胞において遺伝子発現が認められた。

機能に関しては、遺伝子#1 での解析と同様に、マトリゲル上で誘導される血管内皮細胞のネットワーク形成に対する影響で評価を行った。その結果、遺伝子#2 に対する siRNA 導入によって、ネットワーク構造の形成阻害が認められた(図 3-B)。

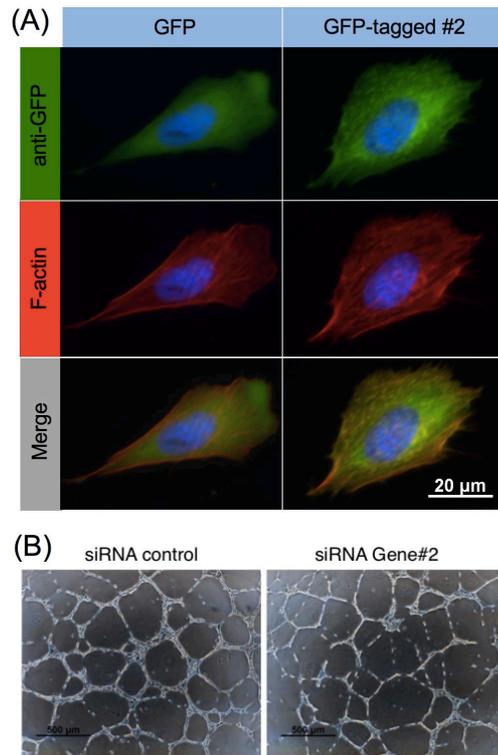


図 3. #2 タンパク質の細胞内局在および機能に関する検討

(4) 積層化組織から産生される血管新生関連因子

血管前駆構造を有する積層化再生組織を免疫不全動物の皮下組織上へ移植した場合、移植三日後には新生血管が認められる。この血管新生の誘導には、移植組織から産生された血管新生関連因子による作用機序が考えられた。そこで、三日間培養した各積層化組織の培養上清中に、どのようなタンパク質が含まれているのかを抗体アレイを用いて解析を行った。その結果、VEGF、HGF、angiogenin を含む数種類の血管新生促進に機能する因子の存在が示された。その中でも特に、胎盤

増殖因子 placenta growth factor (PlGF)と細胞外マトリックス分解酵素の一つであるmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)が、血管前駆構造体を有する積層化組織の培養上清中に多く産生されていることがELISAまたはウエスタンブロットの結果により示された(図4-A, 4-B)。

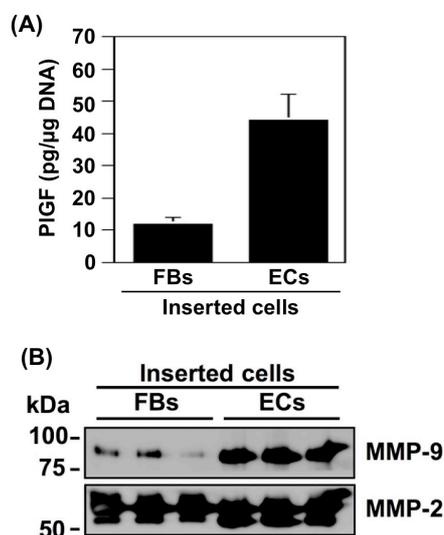


図4. 血管前駆構造体を有する積層化組織で産生が亢進する血管新生関連因子

(5) まとめ

血管内皮細胞との細胞シート三次元積層化共培養により、新たに内皮細胞に発現する二種類の遺伝子を見出すことができた。これらの遺伝子産物は、一つは内皮細胞が産生する分泌型糖タンパク質であった。もう一つは、血管前駆構造体形成に関与する細胞内タンパク質である可能性が示唆された。

一方、移植後早期に認められる毛細血管網の誘導には、移植組織から産生された PlGF および MMP-9 が機能している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

なし

[学会発表] (計4件)

- ① 笹川忠, 清水達也, 大和雅之, 岡野光夫, 細胞シート積層化共培養法を用いた血管内皮細胞ネットワーク形成に関わる分子の探索, 第10回日本再生医療学会総会, 2011, 3, 1, 東京

- ② 笹川忠, 清水達也, 大和雅之, 岡野光夫, 細胞シート工学に基づく in vitro 血管新生モデルを用いた血管内皮細胞ネットワーク形成機構の解析, 第31回日本炎症再生医学会, 2010, 8, 5, 東京

- ③ 笹川忠, 清水達也, 関谷佐智子, 大和雅之, 岡野光夫, 血管前駆構造を有する積層化組織の毛細血管網誘導能に関する研究, 第31回日本炎症再生医学会, 2010, 8, 5, 東京

- ④ 笹川忠, 清水達也, 関谷佐智子, 大和雅之, 岡野光夫, 細胞シート三次元積層化共培養法を用いた血管前駆構造を有する積層化組織の作製および評価に関する研究, 第17回日本血管生物医学会, 2009, 10, 9, 東京

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページアドレス

<http://www.twmu.ac.jp/ABMES/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹川 忠 (SASAGAWA TADASHI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30424675