

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 6 月 3 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300159

研究課題名（和文）

低酸素に対する生体適応反応を利用した再生組織への *in vivo* 血管誘導法の確立

研究課題名（英文）

Application of hypoxia-induced capillary angiogenesis on regenerative tissue engineering

研究代表者：柴田 政廣 (SHIBATA MASAHIRO)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：60158954

研究成果の概要（和文）：

再建医学領域における有効な治療法として自己組織再生と細胞工学的再生組織の移植が考えられる。これらにとって共通の問題点は再生組織を栄養するための微小循環血行の確立が難しいことである。本研究では、低酸素に対する生体適応反応を利用した再生組織への *in vivo* 血管誘導のための最適酸素環境を検討した。同一個体のラット背部 2 箇所にはほぼ同様の傷を作成し、傷周辺組織を高酸素透過性および低酸素透過性フィルムで覆い異なった酸素環境に保った状態でその後の再生・治癒状態を比較した。通常酸素下で飼育し受傷 1 週間経過後に採取した再生部組織断面標本では、低酸素環境に保った再生組織で新生毛細血管数が多いことが明らかになった。一方、受傷 1 週間経過後の創傷治癒状態を、再生組織面積として比較すると、低酸素環境時に比べ高酸素環境時では新生毛細血管数が少ないにもかかわらず、組織再生能は高いこと明らかになった。以上の結果より、毛細血管からの酸素供給を必要としない組織再生過程初期においては、毛細血管新生に有利な低酸素環境よりも、十分な酸素が組織周囲に存在する高酸素環境のほうが有利である可能性が高いと思われる。しかし、再生組織がある程度の大きさにまで成長すると周辺外気からの酸素供給では不十分となり、新生毛細血管数を確保する必要があるのではないかと結論に至った。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that the hypoxia facilitates capillary angiogenesis, even though the oxygen is necessary to maintain the vital force in regenerative tissues. To clarify such inconsequence we have tried to evaluate the microcirculatory responses during the wound healing process by visualizing the microcirculation *in vivo* mice models using our original video-camera equipped intravital microscope. In order to establish different oxygen environments, the window of dorsal skinfold chamber was covered with oxygen permeable or oxygen impermeable sheet. The progress time for the complete recovery and the total numbers of new born capillaries in the wound bed were evaluated in comparison with two different oxygen groups. The progress time for the tissue regeneration was faster under high oxygen conditions rather than low oxygen conditions. The complete recovery time in the wound bed under high oxygen and low oxygen groups averaged 6 days and 8 days, respectively, whereas the total numbers of new born capillaries in the wound bed under low oxygen condition were greater than those of high oxygen condition. From these results, it is suggested that high oxygen condition would be advantaged for the wound healing in the early stage since oxygen is able to supply to regenerative tissue from atmosphere. On the other hand, new born capillaries would be required after when the regenerative tissues have grown up to the size larger than oxygen cannot be supplied by diffusion from atmosphere.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、生体医工学・生体材料学

キーワード：血管新生、低酸素、組織再生、生体適応反応

1. 研究開始当初の背景

本研究における基本理念は「生体は homeostasis を保ちながら最も効率よく目的を達するように制御・統合されたシステムである」というコンセプトにある。生命活動を維持する上で最も重要な物質である酸素を例にとると、この酸素は、組織の代謝率に応じて消費されながら拡散により毛細血管から組織へ供給される。よって生理的状態にある組織（骨格筋）の毛細血管分布は、酸素拡散に関する物理的特性により支配されるため、体重 30g のマウスも 5000kg のゾウもほぼ同等の幾何学的特徴を有している。同様に、血管新生も無目的に起こる現象ではなく、酸素を要している組織（例えば低酸素状態）に最も効率良く酸素供給しようとする、血管系の最適分岐構造を実現するための適応性変化（血管リモデリング）とみなすことができる。低酸素によって窮迫した細胞から既存血管に送られるシグナルが契機となり新しい分岐を構成する形で血管新生が起こると考えられているが、特にシグナル以降の成長因子、サイトカイン、酵素、レセプター等に関する研究は盛んで分子レベルまで解明が進んでいる。しかし発端である酸素環境が血管新生に及ぼす影響は未だ不明である。低酸素は血管新生を促進するが、行き過ぎればすべての細胞活動は不能になることは明らかである。一方で高圧酸素療法や局所酸素供給療法が難治性潰瘍の創傷治癒を促進することはしばしば臨床で経験されている。これらの知見を基に血管新生のための最適条件を追及し、さらに機能的血管化組織の構築法を確立することは、生命システムにおける組織構築と制御の解明に大きく貢献するのみならず、細胞・組織工学的再生組織の再生医療への橋渡しにもなるものである。

血管新生に関する研究として、我々はこれまでに、血流に起因した血行力学的応力（shear stress）が内皮細胞の機能を修飾し、血管新生を制御するという生理的メカニズムの evidence を得ている（Ichioka et al.

Microvasc Res 1998, Asano et al. Med Biol Eng Comput 2005)。その機序の根本には低酸素に対する生体の制御反応があると考えている（Shibata et al. Eur J Appl Physiol 2005)。すなわち低酸素に呼応して血流（応力）が増加し、内皮細胞の機能変化を介し血管新生が誘発される。同時に種々のサイトカインと内皮前駆細胞など幹細胞を擁する骨髄細胞が動員され、相互に作用しながら血管新生がコントロールされるというプロセスを想定している（Ichioka et al. Ann Plast Surg 2004)。一方、低酸素に対する生体反応として血管新生が惹起されるが、血管密度と組織への酸素供給効率の関連において血管壁自身の酸素消費を考慮した研究は見当たらない。これまでの我々の研究において血管壁、特に機能的状態にある細動脈平滑筋の酸素消費は、これまで報告されていた摘出血管による血管壁の酸素消費と比べはるかに多いことを報告している（Shibata et al. Am J Physiol 2005, Shibata et al. J Appl Physiol 2006)。この血管壁での高酸素消費は組織への酸素供給過程においても無視できず、これまで組織で消費されていると考えられていた酸素のかなりの量が実際には血管壁で消費され、無制限な脈管形成は非効率的な酸素供給を惹起する危険性を有する。これらの研究成果に基づき、本研究では、組織への酸素供給を最終目的とする血液循環システム自身の適応反応である血管新生に着目し、この生体固有の適応反応を再生組織の構築法として活用する着想に至った。

2. 研究の目的

再建医学領域における有効な治療法として自己組織再生と細胞工学的再生組織の移植が考えられる。これらにとって共通の問題点は再生組織を栄養するための微小循環血行の確立が難しいことである。実験室においていかに高性能な再生組織であっても、生体内でその機能を長期に亘り維持するには、栄養血管系が不可欠であることは自明である。しかし細胞培養により目的とする組織を構成

する細胞工学プロジェクトの多くは、栄養血管についての配慮が欠けている。本研究では上記問題点の克服、すなわち自己および細胞工学的再生組織への微小循環血行の確立を目指す。具体的には、①生体制御システムの一環としての血管新生メカニズムを明らかにする。②このメカニズムに基づき機能的血管化組織構築のための最適条件を決定する。③この血管化組織構築法を、生体固有の適応反応を利用した新しい血管新生療法として確立させる。

3. 研究の方法

研究初期は、低酸素に対応する生体制御システムの一環としての血管新生メカニズムを検証する。そのため、生体内血管新生観察モデルとして、ラット・マウス背部皮膚の全層欠損による創傷治癒モデルと背部皮膚透明窓装着血管新生モデルを作製する。開発モデルを用い、生体顕微鏡下に組織酸素分圧を変化させたときの微小循環血行と血管壁での酸素消費の応答を分析し、生体適応としての血管新生に対する至適酸素環境を決定する。次年度は、血管新生を最大効率にする酸素環境を整えた状態で、自己骨髄細胞を利用した強力な血管新生療法を確立する。骨髄細胞から分離した内皮前駆細胞を蛍光標識し、初年度に開発した酸素分圧可変血管新生モデルに投与して蛍光生体顕微鏡下に血管新生部位への動員・分化の関連を追及する。血管新生誘導に最適な酸素分圧を決定し、自己再生組織の血管構築と細胞工学的再生組織への微小循環系および血管柄の確立を目指す。最終年度には、最適状態に設定した material 内に主細胞と骨髄細胞、内皮細胞の共培養を行った微小循環形成準備状態の複合体を組み込むことにより、体循環血管からの新生血管を誘導した微小循環血行を有する機能的組織を構築する。以下、具体的な研究方法を記す。

従来から微小循環観察対象としてきた骨格筋微小循環モデルに加え、ラットおよびマウス背部皮膚を対象とした皮膚軟部組織での血管新生モデルを開発する。血管新生可視化モデルも含め、以下の創傷治癒モデルと Skinfold chamber 血管新生モデルを作製し、創傷治癒過程および組織再生過程の血管新生を慢性的、定量的に解析する。

(1) 創傷治癒モデルにおける血管新生の検討

創傷治癒過程は血管新生を観察するため有効な生体反応である。最も簡便で一般的に用いられているマウス背部皮膚の全層欠損モデルにおいて創傷局所の酸素環境を変化される方策を考案する。創傷を酸素透過性の異なる膜（透明フィルム）で被覆することにより酸素環境を変化させる。創傷局所の環境酸素分圧は高感度酸素センサーに optical

fiber を装着し非接触で光学的に測定する。この方法では、酸素感受性リン光色素を添加した直径数 mm の oxygen sensor spot に optical fiber を通して励起光を照射し、酸素濃度依存的に発光・消退するリン光をセンシングし、oxygen sensor spot 存在部位の酸素濃度を定量化する。透明のフィルムドレーシングに spot を貼り付けそれを創傷側にして被覆することで透明フィルム下の創傷部位の酸素分圧を無侵襲非接触で計測できる。この透明フィルムに酸素不透過性膜（ポリ塩化ビニリデン 酸素透過性：40-90 ml/m² 24hr/atm）あるいは酸素透過性膜（ポリメチルペンテン 酸素透過性：60000-65000 ml/m² 24hr/atm）を用いることにより、数 mmHg~40 mmHg の低酸素環境あるいは 90 mmHg~150 mmHg の高酸素環境の創傷局所酸素分圧を得ることができる。これにより創傷の酸素環境と血管新生の関連を組織学的に定量する。

(2) Skinfold chamber 血管新生モデルにおける検討

我々らが開発した mouse skinfold chamber による血管新生モデルに時間分解型レーザー生体顕微鏡法を適用して生体内酸素計測を行う。本法では、血管内投与した酸素感受性リン光プローブ (Pd ポルフィリン) のリン光寿命を顕微測光することにより、微小循環観察 window を通し非接触で微小血管内および周囲組織の酸素分圧を 10 μm オーダーの空間分解能で測定できる。本法により血管新生過程における組織の酸素分布と微小血管構築をマッピングする。微小循環観察 window には通常カバーガラスを用いるが、これを前述のような酸素透過率の異なる透明素材に置き換えることにより、血管新生が進行する酸素環境を様々に変化させ、酸素環境と血管新生の関係を詳細に解析する。この透明素材には、(株)シードコンタクトレンズの協力により種々の酸素透過率を持つコンタクトレンズ素材を利用する。またより高濃度の酸素環境の効果をみるため低流量バルブを用いて任意の酸素濃度の air を chamber に流入させる方法も検討している。

(3) 血管壁における酸素消費の推定

組織の低酸素に対する生体制御反応として血管新生が惹起され、その血管新生が亢進すれば当然、組織への酸素供給量が増加すると考えられているが、前述のように血管壁、特に機能的状態にある細動脈平滑筋の酸素消費の多さを考慮すると、組織に供給されていると思われていた酸素のかなりの量が実際には血管壁で消費されている。申請者らが開発した生体顕微鏡下での酸素分圧計測法により、種々の組織酸素レベルにおける血管内外での酸素分圧を計測し、その実測値を基に、微小循環酸素拡散モデルを用い、血管壁での酸素消費を定量化し、新生血管密度と組織へ

の酸素供給効率の関連を検討する。

開発した血管新生モデルを用い、血管新生に強く関与していると考えられている内皮前駆細胞の動態と酸素環境の関係を調べる。このデータを基に、血管新生を最大効率にする酸素環境を整えた状態で自己骨髄細胞を利用した強力な血管新生療法を開発する。

(4) 最適酸素状態の検証

低酸素が血流増加、骨髄細胞の動員を惹起して血管新生を誘発するという経過を予想しているが、如何なる程度の低酸素が血管新生にとって positive かは不明である。酸素がなければすべての生命活動は不能のため低酸素も過度になると細胞の活動は抑制され創傷治癒・血管新生が阻害されることは理論的、実験的、臨床的にも明らかである。どこかに最も活発な血管新生を誘導できる酸素レベルがある。初年度の研究成果を基にこの最適酸素状態を決定する。

(5) 疾患モデル動物による評価

形成・再建外科領域での臨床においては、虚血組織の血管新生をいかに促進して創傷を治癒させるかが課題となっている。しかし欠損部から自己組織を再生させる場合、患者は概ね糖尿病等の基礎疾患、高齢、衰弱、虚血などの悪条件下にあり母床からの新生血管誘導が困難である。本法を臨床応用するための基礎データを収集するため、創傷治癒遅延モデルとして高血圧自然発症ラットや遺伝的糖尿病マウス、高脂血症ラット等を用い、虚血性組織への血管誘導過程での正常群モデルとの違いを検討する。

(6) 臨床応用への適用性評価

これまでに得られた自己再生組織の vascularization 法を基に、糖尿病患者の虚血肢に前駆細胞やサイトカインを豊富に含む自己骨髄細胞入りの material を移植し、生理的に最適な条件での血管新生誘導を試みる。これら一連の臨床応用は、埼玉医科大学病院において先進医療として認可を受け行う予定である。

(7) 総合評価

以上の研究成果に基づき、最適酸素供給効率に基づく機能的血管化組織の構築法に関する統合的な知識を提供するとともに、この血管化組織構築法を、生体固有の適応反応を利用した新しい血管新生療法として確立させる。

4. 研究成果

(1) 組織酸素環境と毛細血管血流

組織への栄養供給は、細動脈と細静脈間にある毛細血管で行われるが、この毛細血管血流は周囲組織の酸素状態に関係し、毛細血管上流に位置する細動脈の収縮・拡張により制御されていると考えられている。ここでは、動物実験により生体顕微鏡下に微小循環を直接観察することにより、急性時での組織酸素

環境と毛細血管血流の関連を in vivo において調べた。家兔の大腿に位置する骨格筋 tenuissimus muscle を対象に、生体顕微鏡下で筋組織の酸素分圧を変化させたときの毛細血管赤血球速度と開存毛細血管数（実際に血流の存在する血管数）を計測した。筋組織酸素分圧の調節は酸素・窒素・炭酸ガスで泡気し任意の酸素分圧に保ったタイロッド溶液 (pH:7.3, 37°C) で筋表面を灌流することにより行った。毛細血管血流はTVカメラ接続の生体顕微鏡を介し動画として録画し、再生画像から赤血球速度と開存毛細血管数を求めた。図1に実験結果を示す。毛細血管赤血球速度と開存毛細血管数は筋組織酸素分圧に大きく依存することが分かる。毛細血管赤血球速度、開存毛細血管数ともに筋組織が低酸素状態では高値を示し、酸素分圧の上昇に従い低くなり、最終的には血流が停止することにより筋組織毛細血管血流は増加することが確認できた。

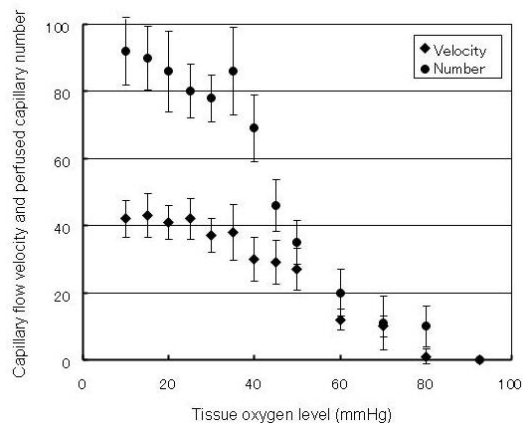


Fig.1 Changes in capillary flow velocity and perfused capillary number in response to tissue oxygen level

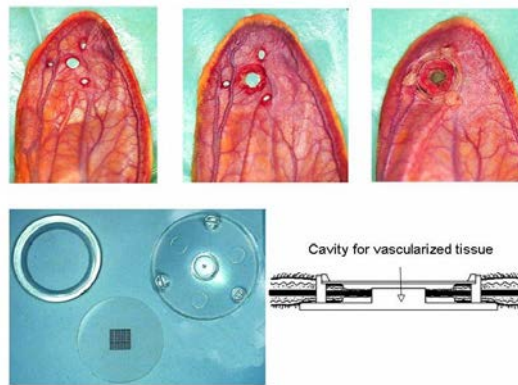


Fig. 2 The chamber implanted in the distal portion of rabbit ear.

(2) 毛細血管血流と血管新生

つぎに、毛細血管血流と血管新生の関係を調べた。実験には、家兔耳介チャンパー観察法 (rabbit ear chamber) を用いた²⁾。図2に家兔耳介チャンパー観察法の概要を示す。耳介部に直径7mmの創傷を作成し、その部位に厚み50 μ mの透明窓を装着する。この厚み50 μ mの透明窓内には骨格筋等の実質組織は再生せず、膜状組織内の新生毛細血管のみが生体顕微鏡下で観察できる。毛細血管新生量の定量化は窓内面積に占める新生血管面積率で表わした。また実験は、通常血流群と、交感神経遮断剤 (α 1-blocker: Prazosin) 経口投与による高血流負荷群により行い、各群とも受傷後3週間、無麻酔下において毛細血管新生過程を観察した。図3には、通常血流群と Prazosin 経口投与による高血流群の受傷後9日目からの透明窓内新生血管量の変化を、また図4には、通常血流(A)と高血流負荷(B)における受傷後21日経過時の透明窓内新生血管顕微鏡像の1例を示す。透明窓内血管新生が観察可能となる受傷後9日目から窓内全てに血管網が完成する21日経過時まで全ての期間において高血流群での血管新生亢進の高さが観察できる。また21日目の顕微鏡像においても、高血流群での血管密度の多さが分かる。

以上の組織酸素環境と毛細血管血流、および毛細血管血流と血管新生の各実験結果より、組織周辺を低酸素環境に保つことにより局所血流量を増加させることができ、さらに高血流量を保つことにより血管新生を亢進させることが可能であることが明らかになった。これらの知見を基に、低酸素環境が組織再生に有効であるかを調べた。

(3) 組織酸素環境と組織再生能

酸素環境の違いによる組織再生能を *in vivo* で比較するためには、個体差を排除する必要がある。そのため本実験では、同一個体のラット背部にほぼ同様の傷を作成し、その後の再生・治癒状態を比較した。図5に実験モデルの概要を示す。組織の酸素環境は、剥離した皮膚面に、高酸素透過性および低酸素透過性の透明フィルムを装着しすることにより、再生組織周囲を異なった酸素環境に保った。傷内の酸素分圧は、非接触タイプの光学的酸素分圧測定装置により経透明フィルムの測定した。高酸素透過性フィルム内の酸素分圧は100-160 mmHgに、一方低酸素透過性フィルム内の酸素分圧は10-40 mmHgに保たれることが確認できた。これらの酸素環境において1週間での組織再生(治癒)過程を観察した。受傷1週間経過時に採取した再生部組織断面標本の顕微鏡像を図6(A)に示す。組織標本中、新生毛細血管は黒い点として示されているが、低酸素環境に保ったほうが明らかに新生毛細血管数が多いことが分かる。つぎ

に、受傷後1週間経過時の組織再生(治癒)状態を、受傷面積に対する再生組織面積率として表したものを図6(B)に示す。本結果より、低酸素環境時に比べ高酸素環境時では新生毛細血管数が少ないにもかかわらず、組織再生能は高いことが分かる。

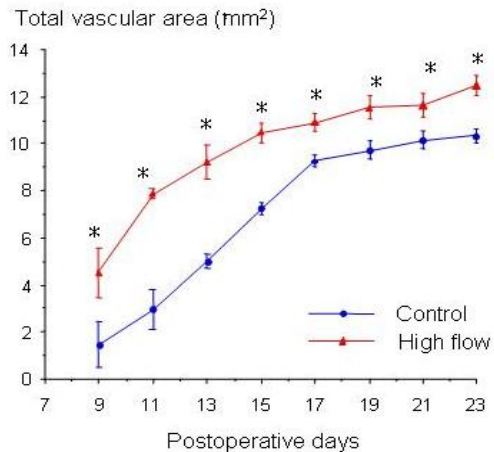


Fig.3 Total vascular area in the prazosin-treated group was significantly greater than those in the control group.

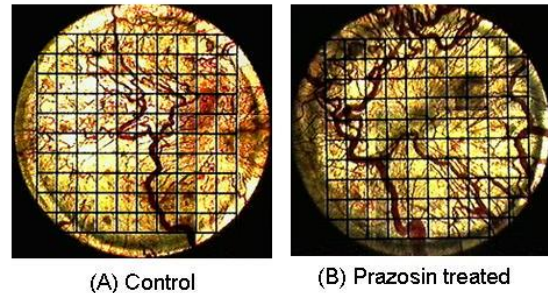


Fig.4 General appearance of the microvasculature in the chamber.

(4) まとめ

今回の結果を総合的に判断すると、毛細血管からの酸素供給を必要としない組織再生過程初期においては、毛細血管新生に有利な低酸素環境よりも、十分な酸素が組織周囲に存在し、周囲からの拡散で酸素供給が可能な高酸素環境に保つほうが組織再生に有利である可能性が高い。しかし、再生組織がある程度の大きさに成長すると外気からの拡散のみでは酸素供給が不十分となり、酸素供給源としての毛細血管が必要となると思われる。このような状況下においては、再生組織周辺を低酸素環境に保ち、毛細血管新生を亢進させる必要が高いのではないかと考えられる。

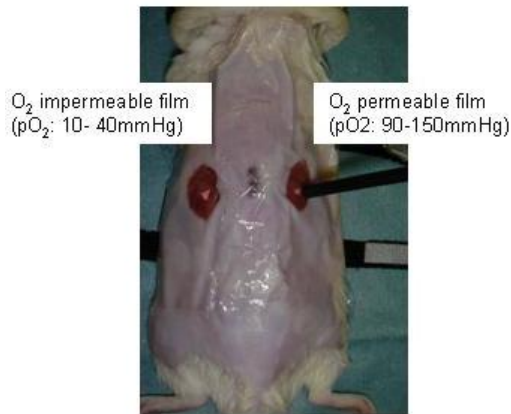


Fig. 5 Animal model to observe the wound healing.

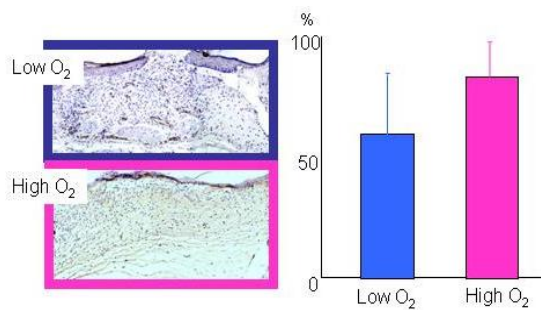


Fig.6 Micrographs of regenerative tissue sample under low and high oxygen levels (A). Relative ratio of regenerative tissue area and total wound area for one week after operation (B).

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 6 件)

- ①Uangpairoj P, Shibata M. Evaluation of vascular wall elasticity of human digital arteries using alternating current signal. *Vascular Health and Risk Management*. 2013 (in press).査読有
- ②Osakabe N, Shibata M. Ingestion of cocoa ameliorates endothelial dysfunction in mesentery arterioles induced by high fat diet in rats: An in vivo intravital microscopy study. *Life Sci*. 91, 1196-200. 2012.査読有
- ③Uangpairoj P, Shibata M. Experimental and numerical studies of digital arterial elasticity by volume oscillometric analysis. *Proc of Innovative Simulation for Health Care*. 13, 180-185 2012.査読有
- ④Uangpairoj P, Shibata M. Simulation of Vascular Volume Pulsation of Radial Index

Artery. Proc of Eur Modeling & Simulation Symp. 728-733, 2011.査読有

- ⑤Ogawa M, Motoi K, Yamakoshi T, Nogawa M, Yamakoshi Y, Shibata M, Yamakoshi Y. A new proposal of tailored bioinstrumentation using rapid prototyping and three-dimensional CAD-first trial to develop individually designed cuff-units for continuous blood pressure measurement. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2011, 3994-3997. 2011.査読有
- ⑥Shibata M, Yamakoshi T, Yamakoshi K, Komeda T. Observation of capillary flow in human skin during tissue compression using CCD video-microscopy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010, 5161-5164. 2010.査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ①川村彩智、関谷直美、市岡滋、柴田政廣. 低酸素に対する生体適応反応を利用した再生組織への in vivo 血管誘導. ライフサポート学会、2011年11月、東京
- ②林浩大、川村彩智、Uangpairoj P, 柴田政廣. レーザー血流計を利用した in vivo 生体顕微鏡での微小血管血流計測法の開発、第51回日本生体医工学会大会、2012年05月、福岡
- ③Uangpairoj P, Shibata M. Evaluation of vascular wall elasticity in human digital arteries by volume oscillometric technique. 第51回日本生体医工学会大会、2012年05月、福岡
- ④横川和弘、柴田政廣. マクロおよびマイクロ血液循環解析手法によるポアズイユの法則の実験的検証、第36回日本バイオレオロジー学会、2013年06月、福岡
- ⑤林浩大、柴田政廣. 非接触レーザー血流計による生体顕微鏡下での実質臓器微小血管血流計測、第36回日本バイオレオロジー学会、2013年06月、福岡
- ⑥柴田政廣, 濱島早紀, 川村彩智. 骨格筋微小循環における酸素ダイナミクス. 第36回日本バイオレオロジー学会、2013年06月、福岡
- ⑦Kawamura S, Shibata M. Intravital observation of capillary angiogenesis during wound healing under different ambient oxygen conditions. 17th Conf of Clinical Hemo-rheology and Microcirculation. Jul 2013, Pécs, Hungary

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 政廣 (SHIBATA MASAHIRO)
芝浦工業大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 60158954

(2) 研究分担者

越阪部 奈緒美 (Osakabe Naomi)
芝浦工業大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 30554852