

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24年 5月 21日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659045

研究課題名（和文） 機械的刺激による血管弾性線維形成機序の解明

研究課題名（英文） Mechanical stimulation-induced vascular elastogenesis

研究代表者

南沢 享（MINAMISAWA SUSUMU）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40257332

研究成果の概要（和文）：

血管弾性線維は動脈の構造を保つ上で極めて重要な要素であり、その破綻は老化や血管病と密接に関係している。血管特有のなんらかの機械的刺激が弾性線維形成に影響を及ぼすことが推定される。そこで本研究では機械的刺激の種類や強度などの変化が血管弾性線維形成に及ぼす影響について解明することを目的に研究を行った。ラット胎仔から採取した大動脈血管平滑筋細胞を用いた実験では、細胞の積層化や伸展刺激によって、平滑筋細胞分化がより亢進し、血管弾性線維形成が促進されることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Vascular elastic fibers play a very important role in maintaining the structure of the arteries. The impairment of elastic fiber formation is closely related with aging and vascular diseases. We hypothesized that mechanical stresses onto the arteries would affect elastic fiber formation. Therefore, we tried to perform the quantitative analysis of the relation between elastic fiber formation and the types and strength of mechanical stresses. We found that elastic fiber formation was promoted in multi-layers of smooth muscle cells or by cycle stretch.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：組織工学・形態形成・細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

血管は常に血流や圧力など機械的刺激に曝されながら、その構造を変化させ適応している。これまでも国内外の研究者によって拍動血流が血管平滑筋細胞や内皮細胞の

性状を変化させるという報告は数多くなされている。弾性血管には常に周期的な血流や圧力変化が生じている。しかし機械的刺激の種類や強度などの変化が、血管弾性線維の形成と維持に及ぼす影響については、弾性線維

形成を定量的に評価するための良い実験系がなかったことなどから、今だに明らかになっていない。

Tissue Engineering の革新的技術開発によって、より生体に近い人工血管の作成が試みられている。「より生体に近い」の意味するところは、単に血流を保つための管腔構造ではなく、血管機能を維持するために特殊化された複合機能を有する三次元的構造物と言い換えられる。研究分担者の岩崎らは、動脈血管を構成する3種の細胞（内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞）と人工の高分子シートを材料に、培養液の流量や圧力などの機械的刺激、pH、二酸化炭素濃度などの化学的刺激を自由に制御できる独自の拍動循環培養システムを用いて、動脈と類似した層構造、強度、弾性を兼ね備えたハイブリッド血管の原型を作ることを成功させた (*Circulation* 118:S52-S57, 2008)。この研究によって、拍動循環という機械的刺激の加わることが弾性線維を形成させ、弾力のある血管を再構築するために必要であることが判明した。

2. 研究の目的

本研究では血管特有の機械的刺激（血流や圧など）が血管弾性線維形成に及ぼす影響について、分析的及び演繹的に解明することを目的とした。細胞積層化技術、独自に開発した拍動循環培養システム、培養細胞伸展装置を用いて、血管を構成する細胞・組織とその機械的刺激を定量的に操作し、血管弾性線維形成に重要な因子へ、細胞構成や機械的伸展が及ぼす影響を検討した。これら分析的研究から得られた因子群から、血管弾性線維の形成を決定する数理モデルの構築へ導くことを目標にした。本研究によって、弾性線維形成における機械的刺激の重要性を検証し、弾性線維形成の機序解明への基盤技術と理論の確立することを最終目標とした。血管弾性線維は動脈の構造を保つ上で極めて重要な要素であり、その破綻は老化や血管病と密接に関係している。従って、本研究は血管生物物理学のみならず、医学的・社会的にも極めて意義が高く、より生体に近いハイブリッド人工血管を創出する基盤研究へ導くための挑戦となる。

3. 研究の方法

(1) 機械的刺激の変動によるハイブリッド血管での弾性線維形成の変化

① ラット培養細胞系の確立

既に研究分担者・岩崎らによって確立された拍動循環培養システムを用いて、ハイブリッド血管の作成を試みた。オリジナルの論文では、ウシ平滑筋細胞が使われているが、本研究においては既に公表されている遺伝

子情報を活用すること、細胞自体への遺伝子操作を加えること、今後生体内にハイブリッド血管を移植して評価する可能性があること、などを考慮し、ラット動脈を細胞の供給源と変換した。胎生21日のWistarラットを帝王切開で取りだし、速やかに下行大動脈を剥離して、初代培養を行った。継代による細胞固有の特性変化を考慮して、6継代目までの大動脈血管平滑筋細胞を実験に使用した。

② 機械的刺激（伸展）による弾性線維形成の変化

培養細胞伸展刺激システムにラット大動脈平滑筋細胞を培養し、伸展刺激の種類や強度を変化させ、培養平滑筋での弾性線維形成の程度を測定した。弾性線維形成の程度は組織学的検討や弾性線維形成過程で重要と考えられている既知の遺伝子や蛋白の発現などを調べることによって判定した。

③ ハイブリッド血管の構成成分の変化による弾性線維形成への影響

血管再構築の過程で、平滑筋層や外膜層の厚さや性状を変化させることや、弾性線維形成を促進する遺伝子（Loxなど）を培養平滑筋細胞に導入したものを使って、ハイブリッド血管を作成した。

(2) 弾性線維形成に関与する遺伝子・蛋白プロファイル変化の網羅的解析

弾性線維形成に影響を及ぼす因子が判明した場合、その刺激の与えた時に生じる遺伝子・蛋白の変化をDNAマイクロアレイやnano-LC-MS/MSなどの質量分析を使って解析した。本研究期間内ではプロスタグランジンE刺激が弾性線維形成不全を生じることが判明したので、プロスタグランジンE刺激を血管平滑筋に与えた段階での網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 機械的刺激の変動によるハイブリッド血管での弾性線維形成の変化

① ポリグリコール酸シートへのラット培養細胞の播種

胎生21日のWistarラットの大動脈平滑筋細胞をポリグリコール酸シートへ播種

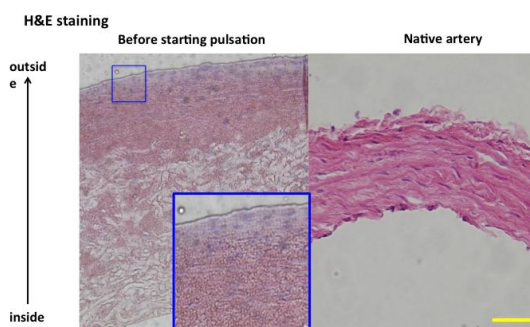


図1. ポリグリコール酸シート上に播種したラット血管平滑筋細胞（左）と新生仔ラット大動脈組織断面像（右）：左の細胞は管腔内側に殆ど細胞が認められなかった。外側の細胞が存在する部分には、エラスチン染色で染まる部分が認められた。

し、約4週間培養を行ったところ、図1のようにシート外側部分への平滑筋細胞の生着が認められた。その部位はエラスチン染色で染まる部分が存在し、弾性線維形成が行われていることが示唆された。しかし、内側には殆ど細胞を認めず、内側面への酸素・栄養供給不足によって細胞が死滅する可能性が示唆され、解決すべき問題として残った。

② 機械的刺激(伸展)による弾性線維形成の変化

培養細胞伸展刺激システムにラット大動脈平滑筋細胞を培養し、10%の伸展刺激を1Hzで与え、14日間を行ったところ、伸展刺激のないものに比べ、10%の伸展刺激を与えたものは弾性線維形成が有意に亢進していた。さらにエラスチン mRNA 発現が10%の伸展刺激を与えた群では伸展開始から5日目より増加し、徐々に発現が増加していた(図2)

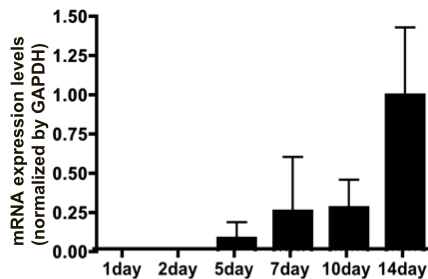


図2. 伸展刺激によるエラスチンmRNA発現の増加

今後はさらに伸展頻度や強度を変えて、弾性線維形成の程度を比較検討する予定である。

③ 血管平滑筋積層化による弾性線維形成への影響

平滑筋培養細胞の積層化技術を用いて、ラット胎仔から採取した大動脈血管平滑筋細胞を順次積層化し、7層まで細胞生存性を保ったまま、重層化することに成功した。この大動脈血管平滑筋細胞層の再構築系を用いて、血管弾性線維形成に影響を与える要素の検討を行った。その結果、1) 血管平滑筋培養細胞は単層に比べて重層化の方が血管弾性線維の形成が促進されること、2) 細胞培養液のウシ胎仔血清濃度を10%から1%へ低下させる、もしくは血清を除去する

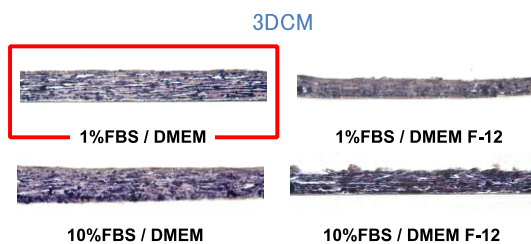


図3. 積層化した平滑筋細胞における各培養条件による弾性線維形成の違い。ウシ胎仔血清濃度1%において弾性線維形成が促進された。

と血管弾性線維の形成が促進されること(図3)、3) プロスタグランジン E 刺激を行うと血管弾性線維の形成が有意に抑制されること、を見出した。本結果に基づき、より定量的な解析のための準備を整えることが出来た。

(2) 弾性線維形成に関与する遺伝子・蛋白プロファイル変化の網羅的解析

本研究と関連して行われているラット動脈管の研究結果から、プロスタグランジン E 刺激が弾性線維形成不全を生じることが判明したので、プロスタグランジン E 刺激を血管平滑筋に与え、その培養上清を nano-LC-MS/MS 質量分析を使って解析した。その結果、プロスタグランジン E 刺激によって、Nov という分泌タンパクがより多く分泌されることが判明した。今後、さらに Nov が弾性線維形成に及ぼす影響について検討を進める予定である。

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2件)

① Nakano H, Williams E, Hoshijima M, Sasaki M, Minamisawa S, Chien KR, Nakano A. Cardiac origin of smooth muscle cells in the inflow tract. *J Mol Cell Cardiol.* 50(2):337-45, 2011.

② Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga AI, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(5):F991-F1003, 2010.

[学会発表] (計3件)

①石渡遼、横山詩子、門脇功治、松崎典弥、明石満、石川義弘、南沢享. 3D cellular multi-layer of rat smooth muscle cells has a potential as a novel ex vivo arterial model. The 89TH Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2012年03月29日、松本市総合体育館(長野県)

②岩井謙治、永澤和道、加藤尚志、南沢享. Nov is a novel protein secreted by prostaglandin E2 stimulation from the rat ductus arteriosus. The 7th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum. 2011年7月8日、福岡国際会議場(福岡県)

③石渡遼、横山詩子、門脇功治、松崎典弥、明石満、石川義弘、南沢享. Three dimensional cellular multi-layer

technology utilized evaluation of elastic fiber formation and phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 7th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum. 2011年7月8日、福岡国際会議場（福岡県）

〔図書〕（計1件）

Minamisawa S, Yokoyama U. Congenital Heart disease: Recent advances concerning the molecular mechanism of patent ductus arteriosus. InTech - Open Access Publisher, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.mac.com/sminamisawa/set/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南沢 享 (MINAMISAWA SUSUMU)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40257332

(2) 研究分担者

常田 聡 (TSUNEDA SATOSHI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30281645

加藤 尚志 (KATO TAKASHI)

早稲田大学・教育学術院・教授

研究者番号：80350388

岩崎 清隆 (IWASAKI KIYOTAKA)

早稲田大学・高等研究所・准教授

研究者番号：20339691

加川 友己 (KAGAWA YUKI)

早稲田大学・ナノ理工学研究機構 次席研究員

研究者番号：90409649