

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659100

研究課題名(和文)三次元多層細胞構築による動脈硬化における炎症の慢性化機構の解明

研究課題名(英文)Three-dimensional multilayers of smooth muscle cells as a new experimental model for vascular biology

研究代表者

横山 詩子(YOKOYAMA, Utako)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：70404994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規実験系「三次元多層細胞」を構築して動脈硬化の病態を解明し、効果的な治療の基礎を確立することを目的とした。ラットの新生仔の大動脈から単離した血管平滑筋細胞を用い、フィブロネクチンとゼラチンの細胞表面の薄膜形成により7層の三次元血管モデルを構築した。7層の積層構造と弾性線維の形成が確認され平滑筋の分化度が高いことが明らかになった。さらに、三次元平滑筋細胞積層体にマクロファージが浸潤し弾性線維を分解している様子をとらえることができた。本研究による三次元血管モデルは血管疾患解明の新たなツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Elastic fiber formation is disrupted with age and by health conditions including aneurysms and atherosclerosis. Despite considerable progress in the understanding of elastogenesis using the planar culture system and genetically modified animals, it remains difficult to restore elastic fibers in diseased vessels. To further study the molecular mechanisms, we created in vitro three-dimensional vascular constructs. Three-dimensional cellular multilayers (3DCMs), which consisted of seven layers of neonatal rat aortic SMCs cultured in 1% fetal bovine serum in DMEM medium, exhibited layered elastic fibers and differentiated smooth muscle cell phenotype within seven days of being in a static culture condition. Furthermore, infiltration of THP-1-derived macrophages decreased the surrounding elastic fiber formation in 3DCMs. 3DCMs may offer a new experimental vascular model to explore pharmacological therapeutic strategies for abnormal vascular remodeling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理一般

キーワード：循環器・高血圧 生理学 ナノバイオ 細胞・組織 三次元培養 弾性線維 動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は血管の慢性炎症が主たる原因であると考えられているが (Ross R. N. Engl. J. Med. 1999)、その機序は解明されていない。特に血管壁の大半を占める平滑筋細胞が慢性炎症に果たす役割、という視点での研究はない。その理由は、平滑筋細胞が免疫細胞と内皮細胞に及ぼす作用を検討でき、ヒトの病態を反映する実験系が存在しないためと考えられる。申請者は、新規実験系である、ヒトの免疫 内皮 平滑筋細胞からなる三次元多層細胞を *ex vivo* で構築し、生理的血管壁構造を再現することで、ヒトの動脈硬化における炎症の慢性化機構を解明できる可能性があるとして着想した。

## 2. 研究の目的

新規実験系「免疫 内皮 平滑筋細胞からなる三次元多層細胞」を構築して動脈硬化の病態を解明し、効果的な治療の基礎を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 三次元積層体の構築

ウィスターラットの新生仔の大動脈から単離した血管平滑筋細胞を用いた。平滑筋細胞の表面にフィブロネクチンとゼラチンを交互に9回コーティングし、細胞表面にナノレベルの薄膜形成を4日間かけて行い、合計7層の平滑筋細胞積層体を構築した。その後10%もしくは1%のFBSを含有したDMEM, DMEM/F-12を用いて2日間培養し、培地条件が弾性線維の形成や平滑筋細胞の特性に与える影響を検討した。

### (2) 弾性線維形成の解析

弾性線維の染色・定量: エラスチカ・ワングーソン染色を行い、ソフトウェアを用い

て、輝度抽出により定量した。また、タンニン酸含有の固定液で処理した積層細胞体を電子顕微鏡で観察し、弾性線維形成の存在を確認した。

### (3) 平滑筋細胞の分化の評価

平滑筋細胞積層体と、既存の三次元細胞培養としてスフェロイドを平滑筋細胞で作成し、平滑筋の分化の比較・検討を行った。平滑筋分化マーカーとして、SM1, SM2, alpha SMA, SM22, calponin, high caldesmon, myocardin を定量 PCR または免疫染色、ウェスタンブロットで行った。未分化マーカーとしてはSMembを定量PCRとウェスタンブロットで評価した。

### (4) マクロファージとの共培養

三次元平滑筋細胞積層体に単球系細胞株 (THP-1) を PMA を用いてマクロファージに分化させて共培養し、マクロファージの平滑筋細胞体への影響を検討した。マクロファージの平滑筋細胞積層体への浸潤は、パラフィン切片による蛍光免疫染色で評価し、弾性線維の断裂の評価はエラスチカ染色で行った。

## 4. 研究成果

### (1) 血管中膜を模した平滑筋細胞積層体の構築法の確立

血管の生理学的特性において弾性線維の構築は必須である。動脈硬化は大動脈などの大血管から冠状動脈などの中血管に好発し、脂質の沈着に端を発した持続する炎症によって、内膜肥厚形成の促進と、弾性線維形成の低下が起こる。動脈硬化など血管リモデリングを解析するために、三次元細胞積層体の中での弾性線維の構築を可能にするような培養法の検討を行った。

エラスチン蛋白がリシルオキシダーゼ

により架橋結合することで機能的な弾性線維が形成される。DMEM/F-12 には、リシルオキシダーゼの活性に必要な銅が含有されているため、DMEM/F-12 での培養が弾性線維形成に有利ではないかと考えた。しかしながら、DMEM/F-12 により培養された三次元血管モデルでは細胞の生着が悪く7層の構造が形成されなかった。一方、DMEM により培養されたものでは7層の積層構造と弾性線維の形成が確認された。次に血清の条件を変えてさらに検討したところ、1%のFBSの条+件では10%と比較し、弾性線維の形成が有意に増加した。DMEM+1%FBSの条件では、エラスチカ染色により層状の弾性線維が形成されていることがわかり、さらに電子顕微鏡でも平滑筋細胞の層の間に弾性線維が形成されていることが確認され、生化学的にもトリチウムラベルしたバリンの取り込みが、ほかの培養法や平面培養の平滑筋細胞より多かったことから、この平滑筋細胞積層体では弾性線維形成が行われていることが証明された。また、弾性線維を形成する構成分子のうち特に、tropoelastin と fibrillin-2 の mRNA 発現が単層の平面培養より有意に高かった。これまで、3次元細胞体の中で1週間で弾性を形成させるといった報告はなく、本研究での短期間での弾性線維構築の確立は新規であると考えられたため、特許申請(後述)を行った。

## (2) 平滑筋細胞分化の検討

従来の培養法である単層培養では、平滑筋細胞を生体内のように高度に分化させた状態で保つことは困難であった。このため、単層培養法を用いた *in vitro* の実験から得られた知見は、しばしば生体内の現象を反映していないといった問題点がある。そこで本研究では、三次元平滑筋細胞積層体の平滑筋細胞の分化度を、従来の単相培養法と比較検討した。

単層の細胞と比較し、三次元血管モデル

においては収縮型の平滑筋マーカーである SM1 と calponin の mRNA 発現が有意に多く、合成型のマーカーである SMemb の発現が少なかった。また、既存の三次元培養として、平滑筋細胞をスフェロイド状に培養したものと平滑筋細胞の分化度を比べた。他の細胞腫では多く報告のあるスフェロイド培養だが、平滑筋細胞をスフェロイド状に培養した報告は少なく、平滑筋細胞の分化度を評価したものはなかった。スフェロイド培養の方が単層培養より分化度が高いことが予測されたが、予想に反して、スフェロイド培養は単層培養より全てのマーカーにおいて平滑筋細胞の分化度が低かった。つまり、三次元平滑筋積層細胞体は、単層培養とスフェロイド培養に比べて平滑筋の分化度が高いことがわかった。

## (3) マクロファージ浸潤の影響の検討

三次元平滑筋細胞積層体にマクロファージに分化させた THP-1 細胞を添加し、共培養を行った。72時間後、マクロファージが層状に配置された平滑筋細胞部分に浸潤し、その周囲の弾性線維が分解されていることを fibrillin-1 に対する抗体を用いた免疫染色とエラスチカ染色でとらえることができた。また、三次元細胞積層体自体がマクロファージの浸潤に伴って断裂し、肉眼的にも著明な変化を認めた。さらに、マクロファージは炎症部位でシクロオキシゲナーゼを高発現し、プロスタグランジンEを産生することが知られている。シクロオキシゲナーゼは動脈硬化部位でも産生が多いことが知られているため、プロスタグランジンEを平滑筋細胞積層体に添加して培養したところ、マクロファージの浸潤で見られたものと同様に、弾性線維の断裂を細胞体のリモデリングが認められた。

#### (4) 結語

本研究により、弾性線維を含有する分化度の高い平滑筋細胞で構成される三次元細胞積層体を作製することができた。マクロファージの浸潤も再現できることが確認できたため、この三次元血管モデルは血管疾患解明の新たなツールとなることが期待される。本研究は *Atherosclerosis* (233) p590-600、2014 に掲載された。

#### 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12件)

1. Ishiwata R, Yokoyama U, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Akashi M, and Ishikawa Y. Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular Elastic Fiber Formation Studies. *Atherosclerosis*. 査読有. 233. 2014. 590-600. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.045

2. Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Ishikawa Y. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation*. 査読有. 129. 2014. 487-96. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726

3. Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y. The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev*. 査読有. 65. 2013. 1010-52. DOI:10.1124/pr.112.007195

4. 横山詩子, 金 美花, 石川義弘. 動脈瘤と PGE<sub>2</sub>. 遺伝子医学 MOOK. 査読無. 24. 2013. 296-300. <http://www.medicaldo.co.jp/gene/mook.no24.html>

5. Yokoyama U, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation. *PLoS ONE*. 査読有. 7. 2012. e36724. DOI:10.1371/journal.pone.0036724

6. Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Jin MH, Cai W, Jin HL, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Okumura S. Pharmacological Stimulation of Type 5 Adenylyl Cyclase Stabilizes Heart Rate under both Microgravity and Hypergravity induced by Parabolic Flight. *J Pharmacol Sci*. 査読有. 119. 2012. 381-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850613>

7. Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Oshikawa J, Okumura S, Sato M, Yokota S, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y. Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening. *Circ J*. 査読有. 76. 2012. 2456-64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22785618>

8. Yokota T, Aida T, Ichikawa Y, Fujita T, Yokoyama U, Minamisawa S. Low-dose Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor Stimulation Promotes Closure of the Rat Ductus Arteriosus with Minimal Adverse Effects. *Pediatr Res*. 査読有. 72. 2012. 129-36. DOI:10.1371/journal.pone.0094895

9. Fukumura H, Sato M, Kezuka K, Sato I, Feng X, Okumura S, Fujita T, Yokoyama U, Eguchi H, Ishikawa Y, Saito T. Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species Production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. *J Physiol Sci*. 査読有. 62. 2012. 251-7. DOI:10.1007/s12576-012-0204-0

10. Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, Snead A, Lu D, Aroonsakool N. Cyclic AMP and Epac in the Regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol*. 査読有. 166. 2012. 447-56. DOI:10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x

11. Matsusaki M, Kadowaki K, Adachi E, Sakura T, Yokoyama U, Ishikawa Y, Akashi M. Morphological and Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation. *J Biomater Sci Polym Ed*. 査読有. 23. 2012. 63-79. DOI:10.1163/092050610X541953

12. 横山詩子, 石渡遼, 大島登志男, 南沢享, 石川義弘. 三次元血管モデルを用いた動脈

硬化性疾患の機序解明 Elucidation of Molecular Mechanisms of Atherosclerosis by Three-Dimensional (3D)-Layered Blood Vessel Constructs. 科学と工業. 査読無. 86. 2012. 329 - 35. [http://www.osakaira.com/kagaku\\_86.html](http://www.osakaira.com/kagaku_86.html)

〔学会発表〕(計8件)

1. Yokoyama U. Molecular mechanisms of the regulation of vascular elastic fiber formation and development of a new 3D vascular model. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2013,12,3-6. Kobe. (招待講演)

2. 横山詩子. 血管弾性線維形成の機序解明に向けた三次元血管壁組織の開発. 第2回三次元生体組織構築公開シンポジウムー世界基準へのチャレンジ. 2013,11,28. 東京. (招待講演)

3. 横山詩子. プロスタグランジンEによる血管弾性線維の制御メカニズムと新たな三次元血管モデルの可能性. 国立循環器病研究所セミナー、第18回NCVC研究者交流会. 2013,9,27. 大阪. (招待講演)

4. Yokoyama U. Molecular Mechanisms of Dynamic Cardiovascular Adaptation from Fetal to Neonatal Life. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2013,3,27-29. Tokyo. (招待講演)

5. Ishiwata R, Yokoyama U, Arakawa N, Nomura A, Oshima T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Proteomic analysis identified prostaglandin E2-induced proteins in tissues from patients with aortic aneurysm. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2013,3,27-29. Tokyo.

6. 横山詩子. 動脈硬化性疾患の機序解明にむけた三次元血管モデルの開発. 三次元生体組織構築公開シンポジウムー世界基準へのチャレンジ. 2012,11,28. 東京. (招待講演)

7. 横山詩子. プロスタグランジンEシグナルと弾性線維形成 動脈管閉鎖や大動脈瘤形成への関与. 医学研究の基礎を語り合う集いTokyo Heart Development Club. 2012,6,25. 東京. (招待講演)

8. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. Rat Smooth Muscle Cells within Three Dimensional Cellular Multilayers Exhibit Contractile Phenotypes and Layered Elastic Fiber. The

8<sup>th</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research. 2012,5,17-19. Seoul, Korea.

〔図書〕(計2件)

1. Yokoyama U, Ishikawa Y. Springer. Nanomedicine and Nanotoxicology. 2014. 8ページ.

2. Minamisawa S, Yokoyama U. Congenital Heart Disease - Selected Aspects. InTech. 2012. 348ページ.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 三次元組織体及びその製造方法  
発明者: 明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2013-212966

出願年月日: 2013,10,10

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ: 横浜市立大学医学部循環制御医学 [www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1](http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 詩子 (YOKOYAMA Utako)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号: 70404994

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

石川 義弘 (ISHIKAWA Yoshihiro)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 40305470

市川 泰広 (ICHIKAWA Yasuhiro)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 10555121