

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460264

研究課題名(和文) 移植治療への応用を目指した機能性3次元積層リンパ管組織のエンジニアリング

研究課題名(英文) Engineering of artificial three-dimensional tissue with functional lymphatic network for regenerative medicine

研究代表者

浅野 義哉 (Asano, Yoshiya)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50359494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：三次元人工組織の構築が可能な細胞集積法により構築した人工ヒト脈管組織は移植可能であり、再生医療への応用が期待される。本研究では人工組織移植によるリンパ管再生医療を目指し、ヒト線維芽細胞とリンパ管内皮細胞を材料とした人工リンパ管網組織(AHLT)の構築、マウスへの移植、並びに治療効果の検証を目的とした。AHLTはヌードマウス皮下および筋膜上に生着し、人工リンパ管は毛細リンパ管の機能形態を有していた。これに加えヒトマーカー陽性の小血管様構造の生着も認められ、リンパ管-血管転化を含む脈管リモデリングを見出した。さらにリンパ節郭清モデルへのAHLT移植では、リンパ流路再生誘導を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：An artificial human vascular tissue constructed by a cell accumulation method capable of constructing a three-dimensional artificial tissue can be transplanted and expected to be applied to regenerative medicine. In this study, we aimed at transplantation of artificial human lymphatic network tissue (AHLT), fabricated by using human fibroblasts and lymphatic endothelial cells, into nude mice, and verification of its therapeutic effects. As the results, AHLT engrafted in mouse subcutaneous and fascial tissue, and artificial lymphatic vessels had the structures of lymphatic capillaries. In addition, engraftment of small blood vessel-like structures positive for human markers was also observed, and a vascular remodeling including lymphatic vessel-to-vascular conversion was suggested. Furthermore, AHLT transplantation into the lymph node-dissected model gave a result suggesting induction of lymphatic flow regeneration.

研究分野：組織工学、神経解剖学、細胞組織学

キーワード：三次元人工脈管組織 リンパ管 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト培養細胞を三次元組織化する様々な手法が近年開発され、組織工学によるハイブリッドな人工組織の作製が可能となりつつある。しかし、その移植医療への応用については、生着や機能的再現性など課題は多い。脈管網の付与は人工組織を臨床応用に近づける重要なファクターである。細胞を栄養する血流と、余分な組織液を灌流・排導するリンパ流を付与することにより、移植片の生着効率の改善と機能の維持が期待される。

我々は、新しい三次元培養技術である積層培養法により、ヒト由来線維芽細胞と脈管内皮細胞を用いた人工ヒト血管網組織、および人工ヒトリンパ管網組織の開発を行っている。その微細構造の解析では、それぞれ毛細血管様および毛細リンパ管様の構造が確認され、生体の脈管を高度に再現していることが明らかになった。更に、人工ヒト血管網組織をヌードマウス皮下に移植したところ、生着と脈管の接続を示す結果が得られた。

以上より、積層培養法で構築した脈管組織は高度な機能形態を保持しながら迅速な生着が可能であり、三次元人工ヒトリンパ管網組織の移植についても、リンパ浮腫治療等の再生医療に寄与することが期待される。これまで、組織工学により作製した人工リンパ管網移植の研究は極めて少ない。

2. 研究の目的

そこで本研究では人工三次元組織移植によるリンパ管網再生に重点を置き、人工リンパ管および血管の機能成熟と移植片生着の促進を目標として、積層培養法による機能性の三次元人工リンパ管網組織を確立することを目的とした。このため、血管網構造を加えた機能性三次元脈管組織の構築、ならびに三次元リンパ管網組織移植条件の確立と移植後の機能形態評価に取り組んだ。また、マウスモデルによるリンパ流路再生モデルを作製し、人工脈管網組織移植の効果を *in vivo* イメージングにより検証した。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と培養条件

人工組織の材料として全て市販のヒト初代培養細胞を用いた。ヒト新生児皮膚由来線維芽細胞(NHDF)は 10%FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)により培養し、8 継代以内の細胞を人工組織構築に用いた。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト新生児皮膚由来リンパ管内皮細胞(HDLEC)は内皮細胞専用培地 EGM-2 により培養し、6 継代以内の細胞を人工組織構築に用いた。

(2) 細胞集積法によるヒト人工三次元脈管網組織の構築

各ヒト培養細胞をトリプシン/EDTA 処理により培養器から剥離回収後、細胞に対してフィブ

ロネクチンコーティングおよびゼラチンコーティングを繰り返すことで細胞表面に厚さ約 10nm の細胞外基質多層フィルム(ECM nano-film)を形成した(Fig.1)。これにより、培養細胞の三次元積層化を可能とした。培養器には、Corning トランズウェルインサートを用いた。三次元脈管組織の作製では、ECM nano-film を付与した NHDF4 層間に、同様のコーティングを施した内皮細胞を1層共培養した。これを4日間以上培養し、Fig.2 に示す脈管構造のネットワーク形成を確認した。

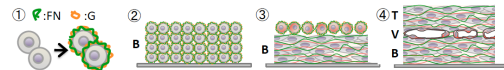


Fig.1 細胞集積法による脈管網組織の構築

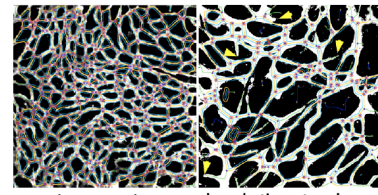


Fig.2 ヒト人工血管網およびリンパ管網

本研究では、上記手法により人工ヒト三次元リンパ管網組織 (artificial human lymphatic network tissue; AHLT) を作製し、移植グラフトとして用いた。

(3) AHLT のヌードマウスへの移植

トランズウェルインサートにて人工組織を作製後、組織部分を採取し、麻酔を施したヌードマウス(BALB/c-nu, 6 週齢、雌)の背部、臀部、腹部の皮下あるいは筋膜上に移植した。切開部を縫合し、4~14 日後に動物を安楽死させ、移植組織を含む宿主組織を採取、固定を行った。また、リンパ流路の *in vivo* イメージングを後述の方法にて行った。

(4) 組織学的解析 (光学顕微鏡)

トランズウェルインサートにて組織作製後、移植前の AHLT、あるいは移植後採取した AHLT を含むマウス組織のパラフィン標本作製した。これらに対して、HE 染色、各種マーカーを用いた免疫組織化学染色等を行った。

(5) 組織学的解析 (透過型電子顕微鏡)

AHLT、あるいは移植後採取した AHLT を含むマウス組織を 2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.1M リン酸バッファーで固定後、1%四酸化オスmiumで後固定した。これらを脱水後、標本を Epon812 樹脂に包埋した。その超薄切片をウルトラマイクロームにより作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛による電子染色を行った後、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

(6) *in vivo* イメージングによるマウスリンパ流路再生モデル

実験に用いるマウスは、予め無蛍光飼料(オリエンタル酵母 iVid #2)を1週間以上投餌しながら飼育した。マウス後肢のリンパ節郭清後、麻酔下でインドシアニグリーン(ICG)によるリンパ流路の in vivo イメージングを ICG 投与(励起波長 810 nm、検出波長 890 nm)により行い、流路再生を評価した。

さらに、上記モデルにおいて、三次元人工ヒトリンパ管網組織の移植を行い、リンパ流路再生に対する効果を評価した。

4. 研究成果

(1) AHLT のヌードマウスへの移植において、宿主組織への生着を確認した。

腹部皮下および背部筋膜上に AHLT を移植後 2 週間の組織において、AHLT の生着を示す組織像を得た。この中で、ヒトビメンチンおよびヒト CD31 に共陽性を示す管腔構造が認められ、人工ヒト脈管構造の生着を確認した (Fig.3)。

(2) AHLT の形成と移植の過程で、ヒト由来小血管様構造の形成を伴う脈管リモデリングを見出した。

ヌードマウス筋膜上および皮下に生着した AHLT においては、人工ヒトリンパ管に加え、その近傍に血流を伴う小血管様構造の分布を見出した。これらはそれぞれ、ヒトリンパ管マーカー(ヒトポドプラニン, ヒト Lyve-1, Prox-1)、ヒト血管マーカー (ヒト CD34, von Willebrand 因子)に陽性を示すことから、HDLEC の血管内皮細胞への転化を伴う血管様構造の形成が示唆された (Fig.4)。

これについて AHLT 形成過程、および移植後の生着過程を解析した。この結果、ヒト血管内皮細胞の特徴(ヒト CD34 陽性、Prox-1 陰性)を示す部位が散在性に出現し、これらを起点として、小血管様管腔構造の成熟と、宿主血管との吻合による血液の流入が起ると推測された (Fig.5)。さらにこれらの脈管がヒト CD90 および α SMA 陽性の壁細胞様細胞により被覆された (Fig.5)。

AHLT の形成と移植では上記のような脈管リモデリングが生じることが分かった (Fig.6)。

(3) マウス組織に生着した AHLT において、毛細リンパ管および小血管様構造の超微細形態を確認した。

AHLT をマウス筋膜上に移植、生着後の組織超微細形態を透過型電子顕微鏡により解析した。ヒト人工リンパ管では、管腔の形態、内皮細胞間接着構造の他、係留フィラメントの形成など、毛細リンパ管の機能形態を確認した。一方ヒト小血管様構造については、タイトな内皮細胞間接着構造や基底膜の発達など、小血管を特徴付ける形態を確認した (Fig.7)。

これらから、AHLT の生着における各人工ヒト脈管の機能形態の成熟が示唆された。

(4) ICG 蛍光によるヌードマウス後肢-臀部リンパ流を可視化し、AHLT 移植によるリンパ流路形成促進を示唆する結果を得た。

リンパ流路可視化/再生モデルにおいて、膝窩リンパ節および腸骨下リンパ節の郭清時に AHLT の臀部皮下移植を行ったところ、臀部に広範な表層リンパ流路の形成を認めた (Fig.8)。これより、AHLT によるリンパ流路再生の可能性が示唆された。

このほか本研究では、in vitro における人工リンパ管網組織の改良として、HUVEC と HDLEC の共培養による血管/リンパ管網含有組織の構築も行った。また、移植組織への平滑筋細胞あるいは周皮細胞の添加について条件検討も行っており、AHLT の脈管機能改善につなげる予定である。

しかし上述の通り、AHLT 移植後の生体内環境における機能形態成熟が顕著であったことから、本研究期間はその解析に重点を置いた。この中で、HDLEC と NHDF の組み合わせでリンパ管と血管を含む人工グラフトが形成されることを見出した。今後は上記脈管リモデリングの分子機構、各脈管の生体内における生理機能、リンパ浮腫モデルに対する治療効果をさらに解析し、再生医療への応用を目指す。

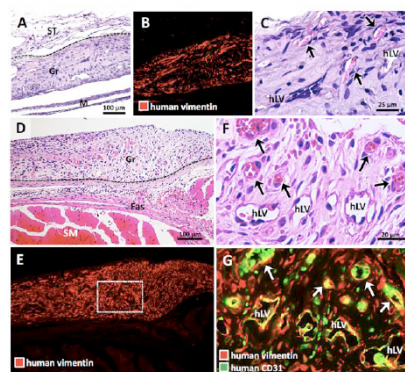


Fig.3 マウス皮下及び筋膜上への人工ヒトリンパ管網組織の(AHLT)の移植

A-C: 皮下への移植。D-G: 筋膜上への移植。いずれも移植後 2 週間の像を示す。A, D の GR は移植組織を示す。B, E はそれぞれ同一部位のヒトマーカー(human vimentin)の染色像。C, F は A, D の拡大像を示し、ヒト人工リンパ管(hLV)と血管様構造(矢印)が認められる。G は 2 種類のヒトマーカー(human vimentin と human CD31)の二重染色像。脈管構造は両マーカー陽性であり、ヒト細胞由来であることを示す。

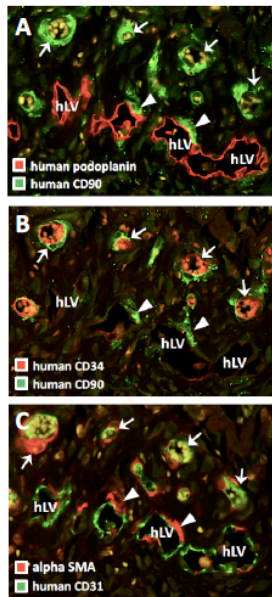


Fig.4 生着した AHLT に含まれる脈管の免疫染色

マウス筋膜上移植後 2 週間の AHLT 部拡大像を示す。ヒト人工リンパ管(hLV)はリンパ管マーカーのヒトポドプラニン陽性を示す(A, 赤)一方、近傍の血管様構造は血管マーカーのヒト CD34 陽性を示した(B, 赤)。その周囲はヒト CD90 陽性の壁細胞様細胞で覆われていた(A, B, 緑)。これらの脈管と壁細胞様細胞はそれぞれヒト CD31、 α SMA にも陽性を示した。壁細胞様細胞は平滑筋様の性質を持つ筋線維芽細胞と考えられる。

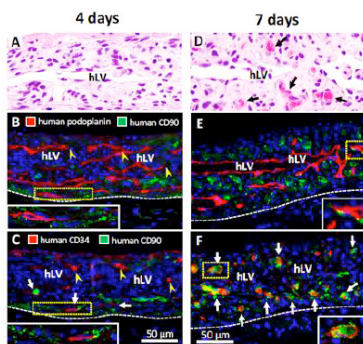


Fig.5 AHLT 生着初期における脈管の分布

AHLT 筋膜上移植 4 日目では、ヒト人工リンパ管(hLV)の周囲に血管様構造は認められなかった(A)。ヒトポドプラニンは hLV に陽性を示した(B, 赤)一方、ヒト CD34 は hLV 上にスポット状に陽性を示した(C, 赤)。移植 7 日目では、hLV 近傍にマウス血流を伴う小血管様構造が現れ(D)、ヒトポドプラニン陽性を示す hLV(E, 赤)、およびヒト CD34 陽性を示す小血管様構造(F, 赤)をそれぞれ確認した。これらは、移植 4 日目に比べ増加したヒト CD90 陽性細胞に被覆され、小血管様構造で特に顕著だった(E, F, 緑)。

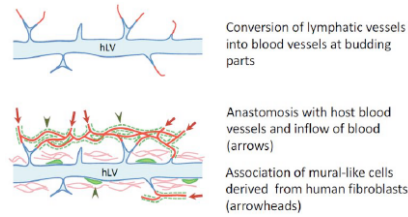


Fig.6 AHLT の生着と脈管リモデリングの概要

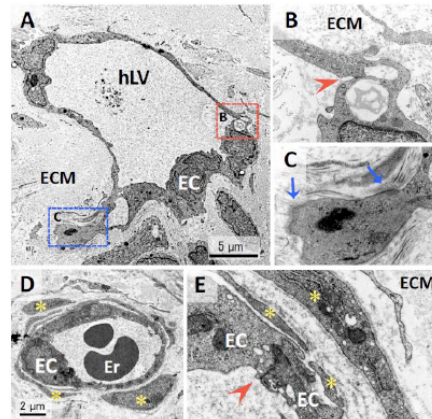


Fig.7 筋膜上に生着した AHLT の超微細形態 (TEM 像)

生着した人工リンパ管は不定形の断面像を示し(A)、内皮間接着構造(B, 矢頭)、係留フィラメント(C)など、毛細リンパ管の機能形態を示していた。一方小血管様構造は類円形の断面(D)、タイトな内皮間接着構造(E, 矢頭)、基底膜の発達、壁細胞様細胞の近接(D, E, アスタリスク)など、血管の特徴を示していた。脈管周囲にはコラーゲン線維に富む細胞外マトリクス(ECM)がみられた。EC: 内皮細胞

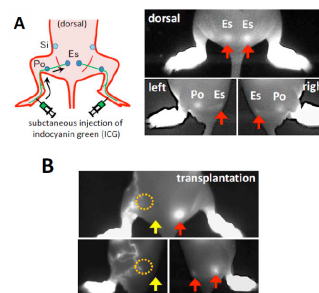


Fig.8 後肢-臀部リンパ流路の生体イメージングと AHLT の移植

A: インドシアニンググリーン(ICG)の footpad への皮下投与後、遠赤外線検出により膝窩リンパ節(Po)を経て臀部外側仙骨リンパ節(Es, 赤矢印)に至るリンパ流路を可視化した。B: リンパ流路モデルにおいて AHLT を移植した結果、広範なリンパ流路の形成が認められた。

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 5 件)

1. 浅野義哉, 松崎典弥, 岡野大輔, 西口昭広, 明石満, 下田浩. 細胞集積法によるヒト人工三次元脈管組織のエンジニアリングと移植. リンパ学, 査読なし, 39 (1), (2016), 18-20

2. 浅野義哉, 松崎典弥, 明石満, 下田浩. 血管・リンパ管ネットワークを有する三次元人工腹膜組織. 化学工業, 査読なし, 66 (11), (2015), 824-830

3. Asano Y, Shimoda H, Okano D, Matsusaki M, Akashi M. Transplantation of three-dimensional artificial human vascular tissues fabricated using an extracellular matrix nanofilm-based cell-accumulation technique. J Tissue Eng Regen Med, 査読あり, (10.1002), (2015), 2108

4. Asano K, Asano Y, Ono HK, Nakane A. Suppression of starvation-induced autophagy by recombinant toxic shock syndrome toxin-1 in epithelial cells. PLoS One, 査読あり, 9(11), (2014), e113018

5. Zhou Q, Ye X, Sun R, Matsumoto Y, Moriyama M, Asano Y, Ajioka Y, Saijo Y. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into alveolar epithelial cells in vitro for use in vivo. Stem cells translational medicine, 査読あり, 3 (6), (2014), 675-685

<参考>

Asano Y, Shimoda H, Matsusaki M, Akashi M. Transplantation of artificial human lymphatic vascular tissues fabricated using a cell-accumulation technique and their engraftment in mouse tissue with vascular remodeling (投稿中)

[学会発表](計 8 件)

1. 浅野義哉, 下田浩, 岡野大輔, 松崎典弥, 明石満. 三次元人工ヒトリンパ管網組織の移植と脈管リモデリング [第122回日本解剖学会総会・全国学術集会], 2017年3月28日 - 3月30日, 長崎大学坂本キャンパス / 長崎県・長崎市

2. 小田切理, 浅野義哉, 豊見山良介, 松崎典弥, 明石満, 下田浩. 三次元ヒト人工腹膜組織を用いた消化器癌細胞腹膜転移モデ

ルにおける浸潤動態の形態学的評価 [第122回日本解剖学会総会・全国学術集会], 2017年3月28日 - 3月30日, 長崎大学坂本キャンパス / 長崎県・長崎市

3. 浅野義哉, 松崎典弥, 明石満, 下田浩. 三次元人工ヒトリンパ管網組織の移植と生着後の組織形成 [第16回日本再生医療学会], 2017年3月07日 - 3月09日, 仙台国際センター / 宮城県・仙台市

4. 浅野義哉, 小田切理, 永谷春香, 松崎典弥, 明石満, 下田浩. 三次元人工腹膜組織を用いた癌腹膜転移モデル [第121回日本解剖学会全国学術集会], 2016年3月27日 - 3月30日, ビッグパレットふくしま / 福島県・郡山市

5. 浅野義哉, 松崎典弥, 岡野大輔, 西口昭広, 明石満, 下田浩. 細胞集積法によるヒト人工三次元脈管組織のエンジニアリングと移植 [第39回日本リンパ学会総会], 2015年3月27日 - 3月29日, ソラシティーカンファレンスセンター / 東京都

6. 浅野義哉, 松崎典弥, 西口昭広, 岡野大輔, 明石満, 下田浩. リンパ管の機能・形態研究の新たな展望 [第120回日本解剖学会全国学術集会], 2015年3月21日 - 3月23日, 神戸国際会議場 / 兵庫県・神戸市

7. 下田浩, 浅野義哉. 血管・リンパ管ネットワークを有する三次元腹膜組織 [JST 新技術説明会], 2015年2月13日, JST 東京本部別館ホール / 東京都

8. 浅野義哉, 松崎典弥, 岡野大輔, 西口昭広, 明石満, 下田浩. 細胞集積法による三次元人工腹膜モデルの開発 [第152回弘前医学会例会], 2015年1月23日, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター / 青森県・弘前市

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~anatomy2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野義哉 (ASANO, Yoshiya)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号:50359494

(2)研究分担者

下田浩 (SHIMODA, Hiroshi)

弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号:20274748

(3)連携研究者

岡野大輔 (OKANO, Daisuke)
弘前大学・医学研究科・助手
研究者番号:00719023

(4)連携研究者

明石 満 (AKASHI, Mituru)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号:20145460

(3)連携研究者

松崎典弥 (MATSUSAKI, Michiya)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号:00419467