

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06823

研究課題名(和文) 高密度な細胞外マトリックスを持つ革新的な正常・動脈硬化三次元血管壁モデルの創製

研究課題名(英文) Fabrication of 3D-normal and arteriosclerosis blood vessel wall model containing high density extracellular matrix

研究代表者

中辻 博貴 (Nakatsuji, Hiroataka)

大阪大学・工学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：70806504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈血管壁は、内皮細胞層と平滑筋細胞と細胞外マトリックス(ECM)からなる層の層構造を持っている。その構造を生体外で再現することが出来れば、動脈硬化の治療・予防薬試験や病態の解明に大きく貢献しうる。本研究では、ECM成分からなるマイクロファイバーを作製し、細胞と混合して共培養することで生体組織に類似した高密度なECMを持つ三次元組織の構築に成功した。さらに内皮細胞を組織上に播種することで、内皮細胞層と平滑筋細胞層を持つ層構造をもつ組織の構築に成功した。また、今回の研究の中でマイクロファイバーを紙上に加工して三次元培養に用いることでより生体に近い多層構造を構築できることも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究において、複数層の平滑筋細胞と一層の内皮細胞層からなる三次元組織の構築法等が報告されている。しかし、これらの方法はECM密度が低く、実際の血管壁におけるECM密度(乾燥重量:70%)と大きく異なるという課題があった。ECM成分の構成比は、動脈硬化などの進展に関わることが報告されており、ECM環境を再現することはモデル構築において非常に重要である。本研究で構築された三次元組織は、高いECM密度を持ちまた多層構造も再現している。そのため、細胞-細胞・細胞-ECM間相互作用を含む総合的な評価が可能であり、薬剤試験や病態研究への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Aorta wall has multi-layer structure composed of endothelial cells, smooth muscle cells and extracellular matrix (ECM). Construction of the structure in vitro is still key challenge in tissue engineering. It is being expected to contribute to high throughput drug screening and investigation of the mechanism of vascular disease such as arteriosclerosis. In this study, we prepared ECM microfiber by fragmentation of ECM and co-cultured it with smooth muscle cells to construct 3D culture tissue, which has high ECM density similar to natural aorta wall. In addition, we confirmed that we could construct 3D blood vessel wall model consist of endothelial layer and smooth muscle cell layer by seeding endothelial cells on the 3D culture tissue.

研究分野：組織工学

キーワード：組織工学 細胞外マトリックス マイクロファイバー 血管 三次元培養組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は現代社会における重大な疾患の一つであり、日本における主要な死因である脳血管疾患・心疾患に大いに関わっており、盛んに研究が行われる疾患である。しかし、その発生や進展の詳細な機序については未だ解明仕切れていないことも多い。その理由の一つとして、生体外における有効な実験系が存在しないことがあげられる。動脈硬化の好発部位である大動脈血管壁は、内皮細胞と結合組織からなる内膜、平滑筋細胞層と細胞外マトリックス(ECM)の多層構造からなる中膜、線維芽細胞と ECM からなる外膜の三つの層からなる複雑な構造を有している。動脈硬化の進展において、それぞれの細胞-細胞間・細胞-ECM 間の相互作用が重要な役割を果たし、全体の構造を大きく変化させる。従来の実験系として、二次元培養された細胞や動物モデルが用いられてきた。しかし、二次元培養された細胞では、細胞外環境が生体と大きく異なるため細胞-細胞・細胞-ECM 間相互作用の評価は難しく、また動物モデルでは動物種差による違いが大きいことや実験コストの問題、近年では倫理的な面からも動物の使用が忌避されている。そのため、近年それらの解決策として三次元培養組織モデルが期待されている。

過去の研究例として、細胞表面を ECM 成分でコーティングすることで細胞同士の接着を制御することで複数層の平滑筋細胞層と一層の内皮細胞層からなる多層構造の構築法などが報告されている (*J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 23, 67, 2012)。しかし、実際の大動脈血管壁は、ECM 成分の乾燥重量比は約 70% (J Rodney levic, 2009, "An Introduction to Cardiovascular Physiology", CRC Press) であり、ECM 量が大きく異なるという問題点があった。現在、このような高密度な ECM を持つ三次元組織は報告されておらず、新たな構築法の開発が望まれる。

最近、申請者らの研究室では ECM 成分の一つであるコラーゲンファイバーをマイクロ断片化して分散し、線維芽細胞と混合して共培養することで高いコラーゲン密度を持つ三次元組織の構築が可能であることを確認した。そこで、本研究では ECM 成分からなるマイクロファイバーと細胞を共に培養することで高密度な ECM を持つ血管壁モデルの構築が可能であると考えた。また動脈硬化危険因子の処理や動脈硬化疾患部位特異的な成分を混合することで動脈硬化モデルの構築についても可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高密度な ECM を持つ三次元血管壁モデルおよび動脈硬化モデルの構築である。その達成のため、まず ECM 成分であるコラーゲンおよびエラスチンを細断化することでマイクロファイバーを製作し、平滑筋細胞と共培養することで三次元組織を構築する。さらに、その三次元組織上に内皮細胞を播種することで内皮細胞層を構築し、血管壁模倣組織を構築する。さらに構築された三次元組織に動脈硬化危険因子や免疫細胞を播種することで動脈硬化症状の模倣が可能であるかについてなどを検討する。

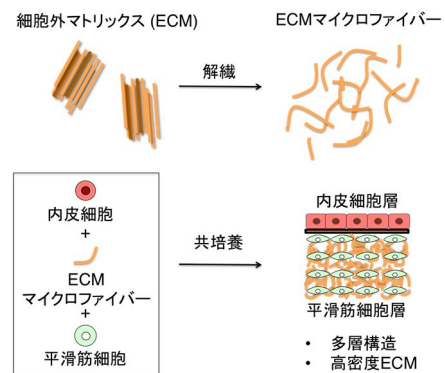


図1、ECM マイクロファイバーを用いた血管壁モデル構築

3. 研究の方法

(1) ECM マイクロファイバー分散液の作製

コラーゲンIを1重量パーセントで10xリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に加え、ホモジナイザーで5分間処理することで分散させた。この溶液を遠心沈降(10000 rpm, 5 min)し、上澄みを除いてPBS中に再分散させコラーゲンマイクロファイバー(CMF)分散液を得た。同様に、ウシ由来エラスチンを1重量パーセントでMilli-Q中に加え、ホモジナイザーで10分間処理を行うことでエラスチンマイクロファイバー(EMF)分散液を得た。それぞれのマイクロファイバーの状態については、位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡により確認した。

(2) ECM マイクロファイバーを用いた血管壁モデルの構築

ECMと平滑筋細胞を任意の量で混合し、24 wellプレート用カルチャーインサートに加えた。インサート外部にも培地を加え、プレート遠心(1100 rpm, 15 min)を行なってECMと細胞を沈降させた。カルチャーインサート内外に平滑筋用培地(SGM2)を追加して、CO₂インキュベーター内で一晚培養を行った。その後、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を組織上に播種し、CO₂インキュベーター内で培養を行なった。三次元組織の構造観察は、組織切片画像から確認した。構築した三次元組織をPBSで3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドpH緩衝溶液で一晩固定を行なった。組織のパラフィン置換し、ミクロトームにより組織切片を作製した。組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色およびCD31免疫染色を行い光学顕微鏡により観察を行なった。

(3) 免疫細胞の浸潤評価

ヒト単球様細胞(THP-1)を24 wellインサート内に播種し、200 nMのホルボール-12-ミリスチン酸-13酢酸塩を含む培地(RPMI-1640, FBS 10%, PSG 1%)で3日間培養することでマクロファージ様に分化させた。未分化のTHP-1および分化したTHP-1を5x10⁴個血管壁モデル上に播種し、3日間培養を行なった。免疫細胞の浸潤をanti-CD68免疫染色を行なった組織切片画像

および組織上面の顕微鏡観察から評価を行った。

(4) ECM ペーパーの作製

それぞれの ECM マイクロファイバー分散液をシリコンゴムで作製した型枠内に流し込み 30°C で水分を乾燥させることで任意の形状の ECM ペーパーを作製した。この時、コラーゲンとエラスチンの混合比を変えることで、その物性の変化についての検討を行なった。

(5) ECM ペーパーを用いた細胞培養と三次元組織の構築

作成された ECM ペーパーを培地 (DMEM, FBS 10%, PSG 1%) 中に浸し、ヒト通常線維芽細胞(NHDF)を播種した。1, 3, 5, 7 日目にペーパーを回収し、含まれる DNA 量から細胞数の変化を評価した。またペーパー上の NHDF のモルフォロジーは、cell tracker red® で染色し蛍光顕微鏡で評価した。NHDF を播種した ECM ペーパーを積層し、プレート遠心 (1000 rpm, 5 min) に よって ECM ペーパーを接着することで多層構造を持つ三次元組織を構築した。

4. 研究成果

(1) ECM マイクロファイバーを用いた血管壁モデルの構築

作製された CMF の形状は画像解析の結果、CMF の長さは $77.5 \pm 7.3 \mu\text{m}$ 太さは $11.5 \pm 2.7 \mu\text{m}$ であった。この CMF と平滑筋細胞を混合し、インサート内で共培養することで 3 mm 程度の厚みを持つ三次元組織が構築できた (図 2b)。その切片画像を観察すると高密度なコラーゲンと平滑筋細胞が均一に存在することが確認できた。また平滑筋細胞が組織内部でよく進展しており、壊死などの様子は確認されなかった (図 2c,d)。これらの結果から CMF を用いることで mm スケールの高い ECM 密度を持った組織を構築できることが確認された。

しかし、一方で CMF のみから作成した三次元組織は収縮による形状の変化が大きく、薬剤評価などへの応用のためには形状を保持した組織が望ましい。そこでコラーゲンに代わりより、大動脈血管壁の ECM の主要成分であり、また不要性が高く安定性の高いエラスチンを用いて同様の実験を検討した。

エラスチン粉末をコラーゲンと同様にホモジナイズすることにより、エラスチンマイクロファイバー (EMF) を作製した。得られた EMF は、画像解析の結果、線維太さ $1.27 \pm 0.40 \mu\text{m}$ 線維長さ $9.17 \pm 4.77 \mu\text{m}$ であった。この EMF と平滑筋細胞を CMF と同様の手法で共培養することで三次元組織を構築した。構築された三次元組織は、インサート底面にしっかりと接着しており、組織の収縮は大きく抑えられていることが確認出来た (図 3a)。そこで、この三次元組織上に HUVEC を播種し内皮細胞層を構築した。その結果、HUVEC は三次元組織の上面にきれいな層構造を形成することが分かり、また組織内への浸潤もほとんどないことを確認した (図 3b)。この HUVEC 層を上面からの観察したところ、組織上面に内皮細胞が一様に広がっており、間隙等も存在しないことが確認できた (図 3c, d)。また内皮細胞間が強固に接着していることを、電気抵抗値の測定により評価した。内皮細胞の播種によって電気抵抗値が有意に上昇しており、この差は HUVEC を二次元培養した際の結果と同等であった。これらの結果から、三次元組織上に構築した内皮細胞層は、二次元培養で作製した内皮細胞層と同等の物質透過に対する抵抗性を有していることが確認出来た (図 3e)。

この三次元血管壁モデルの有効性を評価するため、ヒト免疫様細胞である THP-1 を用いて実験を行った。マクローファージ様に分化させた THP-1 ではほとんど組織内に浸潤せず、内皮細胞層上で凝集していたのに対し、単球様の THP-1 が細胞層に潜り込むようにして浸潤していることが観察された。単球は内皮細胞と相互作用によって接着し、内皮細胞間をすり抜けて遊走することが知られており、今回の結果から本モデルは免疫細胞の浸潤の再現が可能であることが

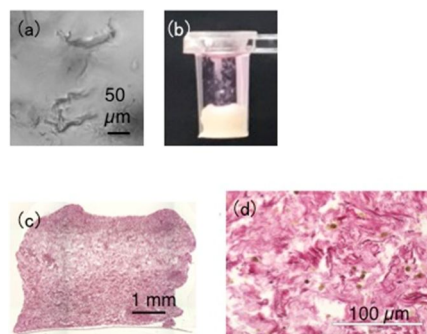


図 2 (a) CMF の位相差顕微鏡像 (b) CMF と平滑筋細胞の共培養組織の写真 (c) エラスチカワンギーソン染色切片画像 (d) 切片画像拡大図

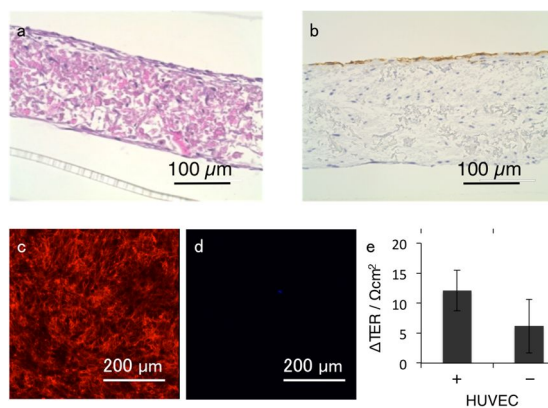


図 3、(a) ソニケーション処理から作製した EMF と平滑筋細胞の共培養組織切片のヘマトキシリンエオシン染色画像 (b) HUVEC を播種した三次元組織切片の anti-CD31 免疫染色画像 (褐色: HUVEC, 青: その他細胞) (c) HUVEC を播種した三次元組織上面の anti-CD31 免疫染色蛍光画像及び (d) HUVEC を播種していない条件の画像 (e) HUVEC 層の有無による電気抵抗値の変化

この差は HUVEC を二次元培養した際の結果と同等であった。これらの結果から、三次元組織上に構築した内皮細胞層は、二次元培養で作製した内皮細胞層と同等の物質透過に対する抵抗性を有していることが確認出来た (図 3e)。

示唆された。

これらの結果から、本研究で構築した EMF を用いた血管壁モデルの有効性が示された。現在、この血管壁モデルに動脈硬化危険因子を処理した際の応答を検討しており、将来的に患者の潜在的な動脈硬化リスクの診断や治療薬試験などへの応用を期待している。

(2)ECM ペーパーを用いた血管壁モデルの構築

ECM マイクロファイバーを利用した血管壁モデルは、免疫細胞の浸潤などの再現において有効であることが確認された。だが一方で、生体の血管壁の中膜は平滑筋層と ECM 層が交互に折り重なった多層構造を持っており、前述の手法では再現することが難しかった。そこで、ECM マイクロファイバーをペーパー状に加工してから細胞を播種し、これを積層することで多層構造を持つ三次元組織が構築可能ではないかと考え、検討を行なった(図 4)。

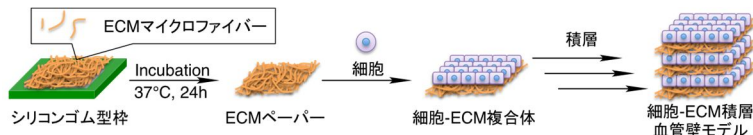


図 4. ECM ペーパーを用いた細胞-ECM 積層血管壁モデルの構築

各 ECM 溶液およびその混合溶液をシリコンゴムで作製した枠内で乾燥させることで ECM をペーパー状に加工した。コラーゲン溶液 (SC) で作製した場合はほぼ透明なペーパーが得られたが混合溶液 (Mix) 及び EMF から作製したペーパーは不透明であった(図 5a,b,c)。その微細構造について光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で観察したところ SC はほぼ一様な様子を示したのに対し、Mix 及び EMF では繊維構造が残っていることが観察された。この繊維構造が光を散乱するため透過性が低下していると考えられる。

作成されたペーパーは、屈曲させたりパンチで穴あけ加工を行うことが可能であった。その表面は、接触角測定により全て疎水性の性質を示すことがわかった。それぞれのペーパーの安定性を示すためリン酸緩衝生理食塩水中での重量変化を評価したところ、一週間後もそれぞれのペーパーは形を保っていることがわかった。これらの結果から、それぞれの ECM ペーパーは細胞培養に有効な物性を持つことが確認された。

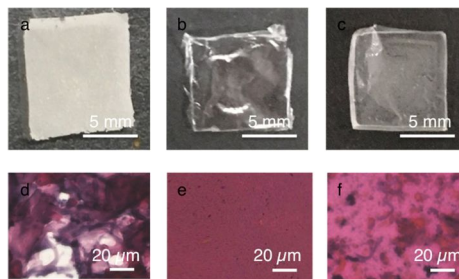


図 5. 各 ECM ペーパーの外観写真 (a) EMF (b) SC (c) Mix およびエラスチン/ワンギーソン染色したペーパーの光学顕微鏡観察画像 (d) EMF (e) SC (f) Mix (紫: エラスチン、赤: コラーゲン)

大動脈の中膜の ECM の主な成分はエラスチンであることから、まず EMF ペーパーを用いて細胞の培養及び積層組織の構築実験を行なった。まず細胞が入手しやすい NHDF 及び HUVEC 細胞を用いて検証を行なった。細胞の進展具合から、EMF ペーパー上に各細胞は十分に接着することがわかった。また一定以上の細胞を播種することで、EMF ペーパー上に細胞の層を形成させることが可能であることも確認できた(図 6a~d)。この細胞を接着させた EMF ペーパーを積層し、遠心沈降することで積層した組織を構築した。細胞の層(紫)と赤色 (EMF) の層が密着して交互に現れており、多層構造を構築することに成功している(図 6e)。

これらの結果から、ECM ペーパーを用いることで多層構造を持つ三次元組織が容易に構築可能であることが示された。現在は、平滑筋細胞を用いることで大動脈の中膜模倣モデルの構築を検討している。ECM 層は、細胞の遊走に強く影響することが報告されており、動脈硬化における平滑筋の異常増殖などを評価する系としての有効性などが期待される。

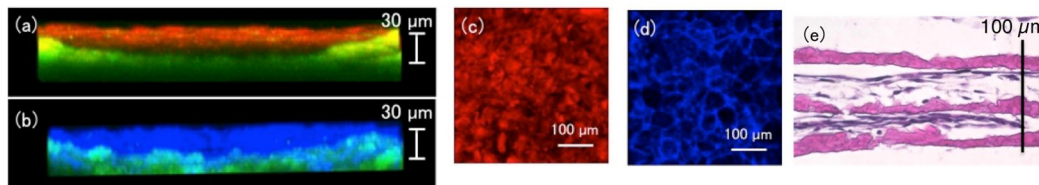


図 6. (a) EMF ペーパー上に播種したヒト正常繊維芽細胞 (NHDF) の切片画像 (赤: 細胞、緑: ECM) (b) EMF ペーパー上に播種したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の切片画像 (青: 細胞、緑: ECM) (c) EMF ペーパーに接着した NHDF (d) EMF ペーパー上に接着した HUVEC (e) EMF ペーパーの積層により作製した多層構造を持つ三次元組織

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Nakatsuji, H.; Matsusaki, M.; ACS Biomater. Sci. Eng. *in press* (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 中辻 博貴、松崎 典弥、免疫細胞の浸潤機構を再現可能な生体外血管壁モデルの構築、第 68 回高分子学会年次大会、ポスター発表、2019 年 5 月 29-31 日、大阪国際会議場
2. 中辻 博貴、松崎 典弥、Extracellular matrix fiber paper for construction of multi-layered 3D-tissue、第 67 回高分子討論会、口頭発表、北海道大学札幌キャンパス
3. 中辻 博貴、松崎 典弥、細胞外マトリックス(ECM)層と細胞層からなる階層構造を有する三次元組織体構築を容易にする ECM ペーパーの調製、日本バイオマテリアル学会関西ブロック第 13 回、口頭発表、2018 年 8 月 31 日、京都工芸繊維大学 60 周年記念館
4. 中辻 博貴、松崎 典弥、細胞外マトリックスペーパーの調整と高度な階層構造を有する三次元組織体の構築、第 64 回高分子研究発表会(神戸)、口頭発表、2018 年 7 月 13 日、兵庫県民会館
5. 中辻 博貴、松崎 典弥、細胞外マトリックスペーパーによる新しい組織構築技術の創製、第 67 回高分子学会年次大会、2018 年 5 月 23-25 日、口頭発表、名古屋国際会議場
6. Hiroataka Nakatsuji, Michiya Matsusaki, Extracellular matrix paper (ECM-papers) for construction of multi-layered blood vessel wall tissues, Society for biomaterials 2018, 2018, April 11-14th, ポスター・口頭発表, Hilton Atlanta
7. 中辻 博貴、松崎 典弥 細胞アッセイ技術シンポジウム、ポスター発表、2018 年 1 月 19 日、アステラス製薬株式会社つくば研究センター
8. Hiroataka Nakatsuji, Michiya Matsusaki, Fabrication of 3D-blood Vessel Wall Models Using Collagen Microfiber, 174th Committee JSPS, Symbiosis of nanodevices, ポスター発表, 2017, December 21th, 京都テルサ

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。