

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 6 月 15 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21500432

研究課題名（和文）IV 型コラーゲン会合体を用いた抗血栓性ハイブリッド人工血管の開発

研究課題名（英文）Development of artificial blood vessels using type IV collagen aggregates

研究代表者

辛 英哲（SHIN YONGCHOL）

工学院大学・工学部・准教授

研究者番号：20291734

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内環境を模した人工血管の開発のための第一歩として、基底膜の網目骨格を形成する IV 型コラーゲン会合体上で血管内皮細胞を長期培養し、その形態、機能について検討した。その結果、血管内皮細胞は非酵素抽出 IV 型コラーゲン再会合体上では敷石状の形態を維持し、細胞間結合に寄与するタンパク質や 1 次止血の因子の発現などの機能を長期間にわたり維持していた。

本研究より、HAEC は非酵素抽出 IV 型コラーゲン再会合体上で培養することで、生体内環境に近い形態、機能を長期間維持できることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, as the first step of the development of artificial blood vessel that mimics *in vivo* environment, Endothelial cells (ECs) were cultured in long-term on the aggregates of type IV collagen that is similar to meshwork structure found in the basement membrane, and their morphology and function were evaluated. The ECs in long-term culture on type IV collagen aggregates formed a “paving-stone” sheet more stably than those on reconstituted type I collagen fibrils. In addition, the expression of von Willebrand factor that is involved in blood coagulation and several proteins that are involved in cell-cell adhesion was found in the ECs cultured on type IV collagen aggregates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオコンジュゲート材料、コラーゲン、細胞外マトリックス、人工血管

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

人工血管は、生体内の病的な血管を置換す

るために用いられる、一種の人工臓器である。人工血管によって置換されるべき病的血管とは、動脈硬化症等によって発症する動脈瘤、血管狭窄部位を指す。動脈が局部的に囊状に

膨張した動脈瘤は将来破裂すれば、出血によって重篤な状態になるであろうことは容易に想像される。また、血管狭窄は将来易血栓形成部位となり生体にとって危険部位となると考えられる。現在、一般的に用いられているのはテフロン製の人工血管である。テフロン製人工血管は生体内の劣化も少なく、生体内で異物反応、毒性、発癌性が少ない。これまでの国内外の研究からテフロン等を用いた人工血管では血小板による血栓形成がみられた。血栓形成を抑制するため、いくつかのテフロン製樹脂の修飾等を行った。テフロンを荷電側鎖にて修飾させることにより抗血栓形成を有する血管内皮細胞の接着を試みた例も報告されている。また、I型コラーゲンを人工血管内部にコーティングし、内皮細胞を付着させた例もある。しかしながら、血栓形成を抑制するには至っておらず、より生体内の環境に近い人工血管の作製が望まれている。

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

これまでに研究代表者は血管内での血栓形成機構の研究を行ってきた。血管では傷害等によって生じる出血を防ぐため、血小板を中心に血栓が形成される。一方、止血後は過剰に血栓が形成されるのを抑制する。このように血栓形成機構は、細胞（主に血小板）と蛋白質（コラーゲン等の細胞外マトリックス、凝固因子、線溶因子等）間の協調的な相互作用（ネットワーク）を通じて巧妙に制御されている。研究代表者は血管周囲に存在し、血栓形成の開始の開始点となるコラーゲンによる血小板凝集に焦点をあて研究を行ってきた。特に、コラーゲンレセプターの解析、コラーゲン惹起血小板凝集の調節因子に着目し研究を行ってきた。一方、研究分担者はコラーゲンの構造と機能に関する研究を行ってきた。特に生体材料から単離したコラーゲン分子を再会合し、生体内でのコラーゲンの状態を再現することに成功した。一般的に不溶性のコラーゲンの精製は容易ではない。通常組織を機械的に破断した後、タンパク質分解酵素ペプシン等によって処理した後、酸性溶液に溶解し、コラーゲン分子を得る。しかし、IV型コラーゲン等の非コラーゲン領域はペプシンによって分解される。IV型コラーゲンは血管内皮細胞の直下で他のマトリックスタンパク質と共に網目構造をとり、基底膜を形成していることが知られている。IV型コラーゲンの非コラーゲン領域は網目構造の形成に必須であると考えられており、ペプシン処理を伴う精製では、網目構造をした生体内でのIV型コラーゲンを再現することは不可能である。研究分担者はこれまでの研究から、生体組織からIV型コラーゲン分子を

ペプシン処理を伴わない方法にて精製する方法を確立している。そして単離したIV型コラーゲン分子を単独で再会合し、生体内での形態と同様な網目状の会合体を得ることに成功している。血管の内側に位置し、抗血栓形成能を担う血管内皮細胞はその直下に存在するIV型コラーゲンを主体とした基底膜に結合することがわかっている。研究分担者は再会合したIV型コラーゲンとI型コラーゲン上で血管内皮細胞を培養すると、IV型コラーゲン上での培養速度はI型コラーゲン上のそれを上回ることで、また細胞の生育密度もIV型コラーゲン上で培養したときの方がより高いこと、生体内の血管内皮細胞が呈するのと同じ敷石状になることを見いだした。また、IV型コラーゲン会合体上で50日間連続培養した血管内皮細胞は形態が変化せず、血管内皮細胞の分化マーカーであるLDLレセプターの機能にも変化がないことから、血管内皮細胞としての構造と機能は失っていない事が予想される。一方、I型コラーゲン繊維上で培養した場合、長期にわたっての培養では一部細胞の剥離また形態の変化が見られた。また、IV型コラーゲンとI型コラーゲンの血小板凝集能を比較したところ、IV型コラーゲンの血小板凝集能がより低い事を明らかにした。これらの研究成果をふまえて、本研究では、テフロン等の人工素材にIV型コラーゲンの会合体を付着させ、血管内皮細胞を生体内環境に近い状態で生育させることで、抗血栓性の人工血管を作成する事ができると考えるに至った。

2. 研究の目的

我々は生体内環境を模した人工血管の作製を目標としている。本研究ではその端緒として、IV型コラーゲン会合体上での培養による血管内皮細胞の機能に影響するのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 各種コラーゲン溶液の調製

ウシレンズキャプセルをプロテアーゼ阻害剤を加えたPBS中で超音波破碎し、遠心法によって回収した沈澱に0.5M酢酸を加え溶解することで、非酵素的な手法によりIV型コラーゲンを抽出した。その溶液中のIV型コラーゲンを塩析によって回収し、非酵素抽出IV型コラーゲン試料とした。

非酵素抽出IV型コラーゲン(IV-A)と非酵素抽出ブタ腱由来I型コラーゲン(I-A)に終濃度0.1mg/mLになるようにペプシンを加え25℃、1時間インキュベートしたものをそれぞれペプシン処理IV型コラーゲン試料(IV-Apep)、ペプシン処理I型コラーゲン

(I-Apep)とした。

(2)各基質上での HAEC の長期培養

IV-A、IV-Apep、ペプシン抽出ヒト胎盤由来 IV 型コラーゲン (IV-pep)、I-A、及び I-Apep を 30 μ g/ml に調製し、培養皿に添加後、中性、37 $^{\circ}$ C の条件で再会合させた。そこに HAEC を播種し 1~2 ヶ月間培養を行った。

(3)免疫蛍光染色

各培養基質上で長期培養した HAEC を各種抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。抗体は抗血小板接着分子-1 (PECAM-1)、抗ヒト von Willebrand factor (VWF) 抗体、及びコネキシン 43 (Cx43) 抗体を用いた。

(4)Realtime RT-PCR による各タンパク質 mRNA 量測定

各培養基質上で長期培養した HAEC から mRNA を抽出、逆転写し Realtime PCR によって PECAM-1、VWF、及び Cx43 mRNA 量を測定した。内部標準として GAPDH を用いた。

4. 研究成果

(1)免疫蛍光染色法を用いた細胞の形態の観察

1 ヶ月間各基質上で培養した HAEC を抗 PECAM-1 抗体を用いて染色した蛍光像を図 1 に示した。非酵素抽出 IV 型コラーゲン (IV-A) 上で培養した HAEC は細胞間の隙間が無く、細胞の大きさも均一であった。(図 1a)。一方、その他のコラーゲン試料を培養基質とした場合(図 1b-f)、HAEC の細胞間に隙間が多く、重層化していた。HAEC ではコートしたコラーゲンの種類にかかわらず、PECAM-1 の発現が見られた。

PECAM-1 は生体内では EC 同士の接合部に多く発現する。非酵素抽出 IV 型コラーゲン再会合体 (IV-A) 上の HAEC でのみ PECAM-1 が細胞間接合部に局在しており、生体内の状態を再現していると考えられる。

またその他のコラーゲン試料を培養基質とした場合、PECAM-1 の局在は、細胞同士の接合部だけでなく全体的に発現しており、重層化し細胞同士が集まった部分には強く、細胞が疎密な部分では弱く発現していた。

IV-A 上で見られた単層で隙間ない敷石状の EC の配列は生体内の EC の状態を再現していると考えられる。この EC の形態、配列は接着しているコラーゲンの会合体の形状に起因していると考えられる。酢酸抽出した IV 型コラーゲン (IV-A) は網目状の平面的な会合体を再構成することが報告されており、生体内の基底膜の構造を一部再現していると考えられ、それを足場としている EC が隙間なく均一に配列することに関与しているこ

とを示唆している。

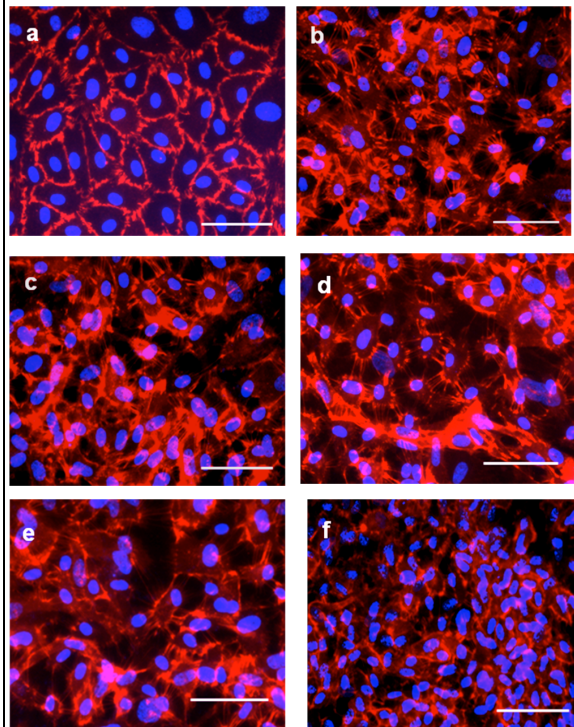


図 1 各種培養基質上の HAEC での PECAM-1 の局在

a:IV-A、b:IV-Apep、c:IV-pep、d:I-A、e:I-Apep、f:コートなし
赤:PECAM-1 青:核 scale:200 μ m

(2)免疫蛍光染色法を用いた細胞の機能の検討

1 ヶ月間各基質上で培養した HACE を抗 VWF 抗体を用いて免疫染色し得た蛍光像を図 2 に示した。VWF は血管での一次止血の因子であり血管内皮細胞の分子マーカーである。IV-A 上で培養したほぼすべての HAEC が VWF 発現能を有していた (図 2a)。一方、その他の培養基質上では、VWF を発現する細胞と発現していない細胞が混在していた (図 2b-f)。また、(IV-A)上の HAEC では核の VWF が局在しており、分泌前の VWF がゴルジ体へ移動していると考えられる。

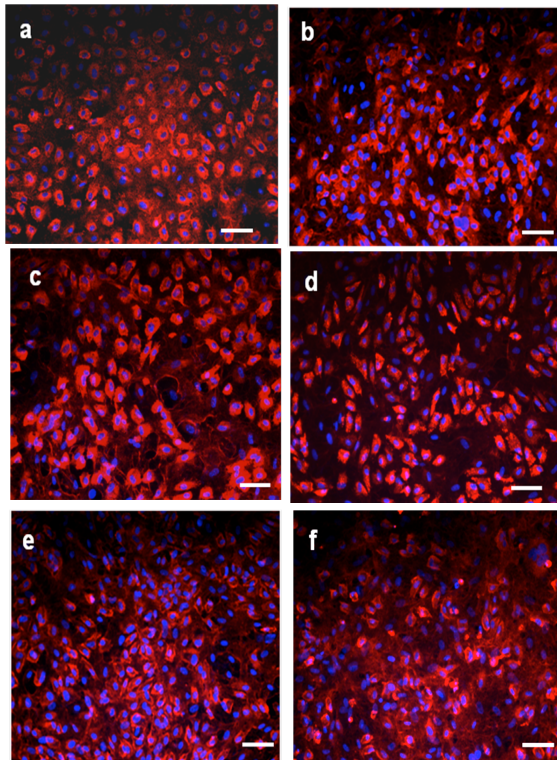


図2 各種培養基質上の HAEC での VWF の局在
a:IV-A、b:IV-Apep、c:IV-pep、d:I-A、
e:I-Apep、f:コートなし
赤:VWF、青:核 scale:200μm

1 ヶ月間各基質上で培養した HACE を抗 Cx43 抗体を用いて免疫染色した蛍光像を図3に示した。Cx43 は IV-A 上では核付近に強い発現が見られ、ゴルジ体に局在していると考えている (図 3a)。その他の培養基質では細胞によって核付近に局在しているもの、細胞全体に広く分布しているものが認められた (図 3b-f)。Cx43 がゴルジ体に局在している細胞や小胞体に存在する細胞が混在していると考えられる。

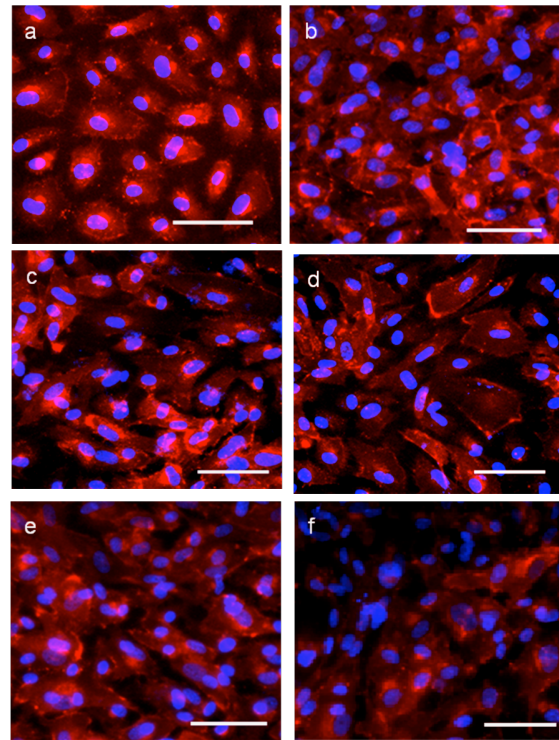


図3 各種培養基質上の HAEC での Cx43 の局在

a:IV-A、b:IV-Apep、c:IV-pep、d:I-A、
e:I-Apep、f:コートなし
赤:Cx43 青:核 scale:200μm

(3) Real-time RT-PCR による各タンパク質 mRNA 量測定

2 ヶ月間各基質上で培養した HAEC の PECAM-1、VWF、Cx43 mRNA 量を測定した結果を図4に示した。コートしていない培養皿で培養した HAEC の各 mRNA 量を 100%とした場合の相対量で示した。

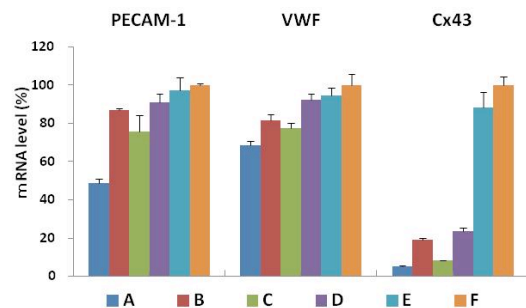


図4. 各培養基質上で培養した HAEC の 各タンパク質の mRNA 量

A:IV-A、B:IV-Apep、C:IV-pep、
D:I-A、E:I-Apep、F:コートなし

まず PECAM-1 mRNA 量は IV-A 上で培養した場合、その他基質と比べ少なかった、IV-A 上では免疫蛍光染色像から HAEC 同士の接合部に PECAM-1 の局在が確認された。細胞接合部に必要十分な量の PECAM-1 があり、過剰な発現を抑制していると考えている。

VWF mRNA 量は IV 型コラーゲンが培養基質の場合、I 型コラーゲンやコートなしと比較し少なかった。HAEC は IV 型コラーゲンと接着することで VWF の発現を制御しているのではないかと考えられたが、その機構については不明である。

また Cx43 mRNA 発現量は、IV 型コラーゲンと I-A を培養基質としたとき著減した。免疫蛍光染色像から Cx43 量には大きな違いが確認できず、遺伝子レベルでの発現量と Cx43 タンパク質量に明確な相関は見られなかったことから、より詳細な検討が必要と考えられる。

(4) 結論

ヒト大動脈内皮細胞は、非酵素法により抽出した IV 型コラーゲン会合体上で培養した時のみ、長期間その形態を維持することが可能であった。また、分子マーカーである VWF の発現も、ほぼ全ての細胞で長期間維持されることから、分化能維持にも、非酵素抽出した IV 型コラーゲンの会合体が寄与していると考えられる。

これらの結果から、非酵素的手法により抽出した IV 型コラーゲンから形成された会合体は優れた血管内皮細胞の培養基質であることが示された。現在一般的に用いられているテフロン性の人工血管では血小板による血栓が見られるが、抗血栓性を有する血管内皮細胞を接着させる事により、より生体内環境に近い新規人工血管の開発に寄与すると考えられる。

(5) 今後の展望

今後、IV 型コラーゲン会合体上での内皮細胞の機能を検討する一環として、血小板粘着能に与える影響などを観察する予定である。さらに、血管内皮細胞の培養を長期間安定に維持するため、微生物の混入を極力抑えるよう努力すると同時に、IV 型コラーゲン会合体と同様な網目サイズを形成できる滅菌可能な人工線維を入手出来るようつとめたい。

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 3 件)

- ① Yongchol Shin, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata *et al.* 'Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin(ogen)', Journal of Biochemistry, 2012, in press, 査読有. DOI: 10.1093/jb/mvs066
- ② Katsue Suzuki-inoue, Yongchol Shin *et al.* (13 人中 11 番目) 'Essential in Vivo Roles of the C-type Lectin Receptor CLEC-2', Journal of Biological chemistry, 2010, Vol. 285, pp.24494-24507, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M110.130575
- ③ Junichi Saito, Yasutada Imamura *et al.* (13 人中 2 番目) 'ELISA Measurements for Urinary 3-Hydroxyproline-containing Peptides and its Preliminary Application to Healthy Persons and Cancer patients', Anticancer Research, 2010, Vol. 230, pp.1007-1014, 査読有, <http://ar.iiarjournals.org/content/30/3/1007.abstract>

[学会発表] (計 10 件)

- ① 松下裕、IV 型コラーゲンを取り入れた生体内環境を模した人工血管の可能性 -IV 型コラーゲン会合体上で長期培養した血管内皮細胞の形態、機能の検討-、日本化学会第 9 2 春季年会、2012 年 3 月 26 日、神奈川県横浜市
- ② 遠山武志、ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) と IV 型コラーゲンの接着を阻害するタイワンコブラ由来タンパク質の単離、日本化学会第 9 2 春季年会、2012 年 3 月 26 日、神奈川県横浜市
- ③ 辛英哲、IV 型コラーゲンを取り入れた生体内環境を模した人工血管の可能性、第 2 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム、2012 年 3 月 10 日、東京都新宿区
- ④ 松下裕、IV 型コラーゲンを取り入れた生体内環境を模した人工血管の可能性-再構成した IV 型コラーゲン会合体上で長期培養した血管内皮細胞の形態・機能の検討-、日本化学会第 9 1 春季年会、2011 年 3 月 29 日、神奈川県横浜市
- ⑤ 遠山武志、腫瘍細胞とコラーゲンの接着を阻害するタイワンコブラ由来タンパク質の構造と機能の解明、日本化学会第 9 1 春季年会、2011 年 3 月 29 日、神奈川県横浜市
- ⑥ 松下裕、IV 型コラーゲン会合体を用いたハイブリット人工血管構築、第 2 回大学コ

- ンソーシアム八王子学生発表会、2010年12月4日、東京都八王子市
- ⑦ 遠山武志、細胞とコラーゲンの接着を阻害する蛇毒由来タンパク質の探索、第2回大学コンソーシアム八王子学生発表会、2010年12月4日、東京都八王子市
- ⑧ 小玉賢繁、ナマココラーゲン線維による細胞凝集体の形成、第42回日本結合組織学会学術大会第57回マトリックス研究会大会合同学術集会、2010年12月4日、秋田県
- ⑨ Kenji Uchida, Culture conditions affecting cellular clump formation accompanying intercellular accumulation of type V collagen fibrils, 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月5日、神奈川県
- ⑩ Yasutada Imamura, Development of ELISA Measurement for Urinary 3-Hydroxyproline containing Peptides and its Preliminary Application to Community Healthy Persons and Cancer Patients, 8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月5日、神奈川県

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇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]

ホームページ等
第2回医薬工3大学包括連携推進シンポジウムでの発表について：
<http://www.kogakuin.ac.jp/koryu/iyakuko/news/pdf/05070108.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛 英哲 (Shin Yongchol)
工学院大学・工学部・准教授
研究者番号：20291734

(2) 研究分担者

今村 保忠 (Imamura Yasutada)
工学院大学・工学部・教授
研究者番号：40201339

(3) 連携研究者

()

研究者番号：