

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16503

研究課題名（和文）低侵襲化を目指した心筋保護液の開発～虚血合併心筋に対する虚血許容時間の延長～

研究課題名（英文）Development of novel cardioplegia for minimally invasive cardiac surgery

研究代表者

井上 天宏（Inoue, Takahiro）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00349557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：令和4年夏まで行った実験結果で、ビタミンB1添加の心筋保護液が虚血許容時間を延長するとした仮説を実証することは困難と考え、以降は研究内容を変更して別の研究題材に取り組んできた。胎児動脈管から血管平滑筋細胞を採取し、継代により細胞を増殖させたのち、スフェロイド（細胞塊）を作製し、3Dでの血管平滑筋細胞の特性を観察する研究を行ってきた。スフェロイド化した動脈管由来血管平滑筋細胞では、プロスタグランジンの刺激により、表面に近い細胞がヒアルロン酸結合タンパク質を発現しており、また電子顕微鏡で観察したところ、ヒアルロン酸分泌のためこれらの細胞表面が形態を変化させ活性化していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞を用いた研究では、シャーレの上で培養した状態で細胞特性を評価してきたが、それは実際のin vivoとは環境が異なっている。細胞をスフェロイド化することにより、in vivoに類似した細胞環境を設定することができ、その状態で細胞特性を評価することにより、動物実験等の侵襲的な実験の削減につながると考えられる。

本研究結果については、令和4年3月および令和5年3月に開催された日本生理学会総会で発表した。

研究成果の概要（英文）：To our knowledge, this is the first study to create spheroids with single smooth muscle cells in rat ductus arteriosus(DA). DA spheroids can be a better tool to observe the configurational modification after PGE1 stimulation. Creation of 3D-spheroids is a beneficial method to visualize the morphological change following administration of the affected drugs.

研究分野：心筋外科、循環生理

キーワード：心筋保護 虚血心筋 動脈管 血管平滑筋細胞 スフェロイド プロスタグランジン ヒアルロン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初は【低侵襲化を目指した心筋保護液の開発～虚血合併心筋に対する虚血許容時間の延長～】という課題名で、心停止中の心筋虚血の許容時間を延長することができる心筋保護液の新規開発を目的に研究を行っていた。しかしながら 2022 年夏までに行った実験の結果を総合的に評価したところ、ビタミン B1 添加の心筋保護液が虚血許容時間を延長するとして本研究の仮説を実証することは困難であると考え、それ以降は研究内容を変更して別の研究題材に取り組んできた。

### 2. 研究の目的

当教室ではこれまで胎児動脈管が生後に閉鎖するメカニズムに関する研究を行ってきており、動脈管研究に関するさまざまな実験方法や手技をすでに保有していた。そこでラット胎児動脈管から血管平滑筋細胞を採取し、継代により細胞を増殖させたのち、スフェロイド(細胞塊)を作製し、3Dにおける動脈管血管平滑筋細胞の特性を観察する研究に変更した。新たな課題名は【胎児ラット動脈管平滑筋細胞を用いた 3D スフェロイドの PGE<sub>1</sub> 応答性】とした。これまで動脈管の血管平滑筋細胞を題材とした基礎的研究においては、その多くが 2D つまりシャーレ上に培養した細胞を用いたものであったが、実際の組織では縦横斜めに細胞が積載された 3D 構造であるため、隣接する細胞間どうしの相互関係も動脈管の特性に影響することは十分考えられる。よって本来の動脈管の組織構造に類似した 3D 構築の血管平滑筋スフェロイドを作成して、その特性を評価した。

### 3. 研究の方法

動脈管は肺動脈と下行大動脈の間をシャントする胎児循環にはなくてはならない必須の血管であるが、出生し呼吸を開始した時点から閉鎖に導かれる非常に興味深い特徴を持った血管である。動脈管は胎児期にしか存在しないため採取が比較的難しく、採取した動脈管の組織サンプルを用いて酸素応答性や薬剤添加による経時的変化を観察しようとしても、脆弱性により組織が容易に劣化してしまい正確な特性評価が困難である。この問題を解決すべく、スフェロイド化して 3D における細胞の特性を評価することとした。

研究では 3D 構築スフェロイドの特性を比較検討するために、胎児動脈管由来と胎児下行大動脈由来の血管平滑筋細胞を採取し、スフェロイド化した。継代により細胞を十分増殖させたのち、U 字型底のウェルに細胞数 50,000/well を入れ、細胞凝集の様子を 7 日間観察した。7 日後にそれぞれのスフェロイドを取り出し、生化学的分析および特殊免疫染色と電子顕微鏡を用いた組織学的分析を行った。

### 4. 研究成果

スフェロイドにおいてタンパク質の mRNA 発現を qPCR 法で評価したところ、動脈管由来あるいは下行大動脈由来においても、細胞基質あるいは細胞外基質を構成する多くのタンパク質(α-アクチン、エラスチン、フィブロネクチン、カドヘリン、インテグリン、リシルオキシダーゼ、DANCE (フィブリン 5)、PGE<sub>2</sub>-EP4 受容体、AP2 など)の mRNA 発現は、2D (シャーレ培養状態)と実際の組織の中間レベルを示した。つまり生化学的評価では、3D スフェロイド化により 2D 培

養の細胞状態よりも、より実際の組織に類似した特性を示すことが明らかとなった。

またプロスタグランジン E1 (PGE1) 刺激後、それぞれのスフェロイドをパラフィン包埋・薄切してヒアルロン酸結合タンパク質の発現状態を経時的に観察したところ、動脈管由来のスフェロイドでは表面に近い細胞でその発現が有意に上昇しており、実際培養液中にもヒアルロン酸が分泌されていた。さらに PGE1 刺激中のスフェロイドを電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) で経時的に観察したところ、スフェロイド表面の形態を変化 (粗雑・凸凹構造平滑化) させながら活性化しており、ヒアルロン酸の産生に伴うスフェロイドおよび細胞の構造的変化が捉えられた。

これまでの動脈管研究では、シャーレ上で培養した細胞を用いた実験が主であったが、動脈管血管平滑筋細胞のスフェロイド化は、より *in vivo* に類似した環境で細胞動態を観察できるとともに、薬剤や酸素への反応性を生化学的評価のみならず組織学的評価を行うことができるツールになると考えられた。また本研究で採用した細胞のスフェロイド化あるいは細胞シートや生体材料の足場を用いた細胞の 3D 化は、実際の生体臓器を模倣した環境における細胞特性を評価できるため、動物実験等の侵襲的な実験の削減につながるメリットがあることも考えられる。

本研究の結果については、令和 4 年 3 月と令和 5 年 3 月に開催された日本生理学会総会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 天宏
2. 発表標題 胎児ラット動脈管平滑筋細胞を用いた3DスフェロイドのPGE1応答性
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kakeru Okawa
2. 発表標題 Impact of vitamin B1 contained in cardioplegia on cardioprotection during cardiac arrest
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------