

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19881

研究課題名（和文）機能性素材を応用した血管オルガノイドの作製

研究課題名（英文）Preparation of vascular organoids by applying functional-elastin materials

研究代表者

山城 義人（Yamashiro, Yoshito）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70751923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体恒常性維持の理解において、生きたままの立体組織を観察することは、不可欠な要素である。組織構築に用いられるスフェロイドやオルガノイドは細胞集合体ではあるものの、その収縮や弾性といった機能は欠落しているのが現状である。そこで、独自に開発した機能性素材（高弾性線維形成株）を用いて、スフェロイドやオルガノイド作製時の基質とし、弾性能を有した血管オルガノイドを作製することを試みた。血管弾性線維をin vitroで評価する系を確立し、弾性線維形成能が極めて高いラット血管平滑筋細胞の樹立に成功した。筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子の変異から分泌される毒性ペプチドの細胞機能への影響などを評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官再生技術として、オルガノイド研究が大きく進展した。上皮細胞を用いた“端”の組織構築（眼、皮膚、胃など）には成功しているものの、細胞外マトリクスを含む深部の組織、いわゆる“間”を作るには至っていない。上皮細胞と深部の細胞を繋ぐ細胞外マトリクスは、組織の伸縮や組織間相互作用などの機能性をもたらす上で必須の要素である。昨今のマイクロデバイスや3Dプリンタといった工学技術の発展に加え、細胞が保有する自然な機能性素材（細胞外環境の構築能）を融合することが、組織構築の成熟化と維持、または再現性の確保において、ブレイクスルーになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Observation of living 3D tissues is an essential element for understanding the maintenance of biological homeostasis. Although spheroids and organoids used for tissue construction are cell aggregates, they currently lack functions such as contraction and elasticity. Therefore, we attempted to create vascular organoids with elasticity by using a functional material, which we originally developed, as a substrate for spheroid and organoid creation. We established a system to evaluate elastic fibers in vitro and succeeded in establishing rat vascular smooth muscle cells with extremely high elastic fiber forming ability. We also evaluated the effects of toxic peptides secreted from mutations in the gene responsible for ALS on cellular functions.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管オルガノイド 細胞外マトリクス メカニカルストレス 筋萎縮性側索硬化症 接着斑

## 1. 研究開始当初の背景

器官再生技術として、この10年ほどの間にオルガノイド研究が大きく進展した。上皮細胞を用いた“端”の組織構築(眼、皮膚、胃など)には成功しているものの、細胞外マトリクスを含む深部の組織、いわゆる”間“を作るには至っていない。上皮細胞と深部の細胞を繋ぐ細胞外マトリクスは、組織の伸縮や組織間相互作用などの機能性をもたらす上で必須の要素であるため、細胞外マトリクスを人為的に再構築し、組織構築に応用することを試みる。

## 2. 研究の目的

生体恒常性維持の理解において、生きたままの立体組織を観察することは、不可欠な要素である。組織構築に用いられるスフェロイドやオルガノイドは細胞集合体ではあるものの、その収縮や弾性といった機能は欠落している。そこで、独自に開発した機能性素材(高弾性線維形成株)を用いて、スフェロイドやオルガノイド作製時の基質とし、弾性能を有した血管オルガノイドを作製する事が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

大血管は3層構造からなり、血管平滑筋細胞と弾性線維によって、血管の伸縮性が調節されている。とりわけ細胞外マトリクスの複合体である弾性線維は、メカニカルストレス応答などの血管恒常性維持に必須であるが、人工的な手法で作製することが難しい。本研究では、申請者のこれまでの経験と予備データに基づき(背景と経緯の頁参照)血管弾性線維形成能が極めて高い平滑筋細胞と線維芽細胞の単離を行い、それらの機能性素材(高弾性線維形成株)を用いて、弾性能を有した血管オルガノイドの作製を目指す。

血管オルガノイドの作成はDr. Penningerらの方法を参照する(Wimmer et al. *Nature*, 2019, Wimmer et al. *Nat. Prot.*, 2020)。従来の方法では、ヒト多能性幹細胞(hPSCs)と共培養するフィーダー細胞としてMEF(マウス胎児線維芽細胞)が利用されるが、MEFは形質が不安定であり、細胞各々のマトリクス分泌能も不均一であるため、手技が安定しない。また、培養7日目に、分化誘導された細胞塊をコラーゲン-マトリゲルに包埋するが、このマトリゲルは非常に高価であるにも関わらず、ロット間の品質が不安定であることや、希釈による強度不安定により、十分な組織構築を達成できない問題点を抱えている。

そこで、hPSCsと共培養するフィーダー細胞は、マウス大動脈から単離した高弾性線維形成能を有する線維芽細胞(eAFs)を使用する。中胚葉や血管形成への分化誘導は従来の方法に従う。培養7日目に、分化誘導された細胞塊を、高弾性線維形成能を有する平滑筋細胞(eSMCs)と共培養し、弾性線維を纏った血管オルガノイドの作製を試みる。包埋の際に、少量のマトリゲルが必要かどうか? eSMCsは脱細胞化し、弾性線維のみに包埋するか? もしくはhydrogelを用いて接着基質の剛性(2-126kPa)を変化させた方が良いのか? など、マトリクスの分泌促進、分化誘導の最適条件を検討する。

#### 4. 研究成果

弾性線維を形成する平滑筋細胞 (eSMC) を樹立し、培養 12 日目に弾性線維の足場となるマイクロフィブリル (Fibrillin-1) と弾性線維を構成する単量体エラスチン (Elastin) を評価した。eSMC 株では、線維上の弾性線維を確認することができた (図 1、右図)。しかし、生成に 12 日間を要したため、eSMC 細胞を再利用することは困難であった。また、作製された弾性線維は疎水性で、抽出が困難であったため、足場として利用することが困難であった。

マウス大動脈から単離した血管平滑筋細胞での実施や、iPS 細胞からの分化に関しては進行中のため公表を控える。

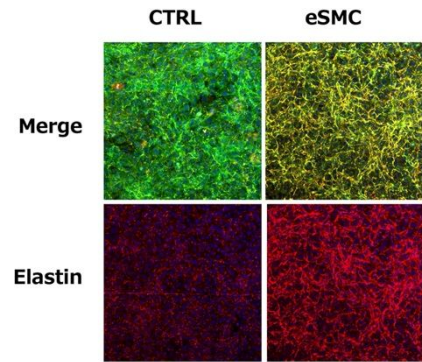
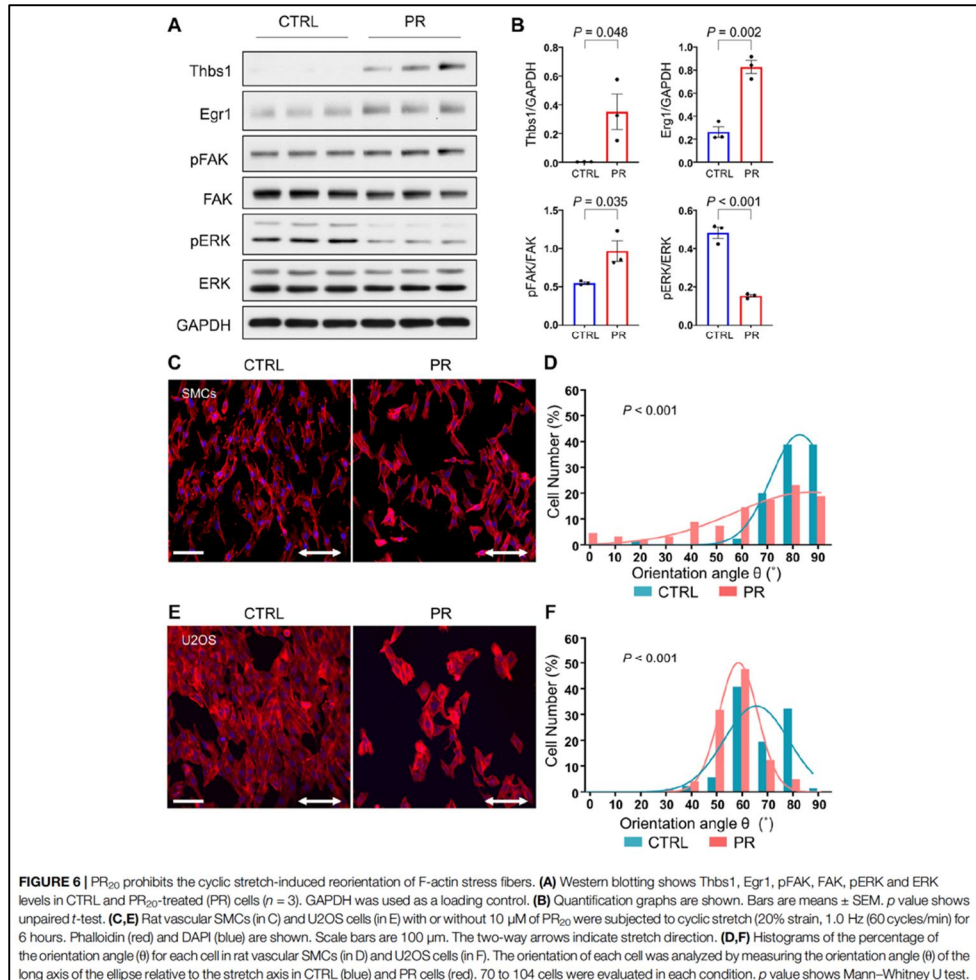


図1. 高弾性線維形成能細胞株の樹立  
血管平滑筋細胞培養12日目。Fibrillin-1 (緑) とElastin (赤) の染色。

共同研究の一環として、分担者の森と共に、筋萎縮性側索硬化症 (ASL) の原因遺伝子の変異から産生される毒性ペプチド (Proline-Arginine (PR) poly dipeptides) が細胞骨格やメカニカルストレスに与える影響を解析した。PR poly dipeptides 処理は、中間径フィラメントの形成不全やアクチン細胞骨格、接着斑形成の異常を引き起こした。さらに、PR poly dipeptides 処理によって、伸展刺激に対するメカニカルストレス応答異常 (配向不全) を引き起こし、細胞外マトリクス Thrombospondin-1 の過剰分泌や、接着斑の過剰な活性化を引き起こし、細胞を硬化させることを報告した (Shiota et al. Front. Cell Dev. Biol., 2022、下図: 論文 figure 6 より抜粋)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Isozumi Noriyoshi, Kiriya Takao, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 C9orf72-Derived Proline:Arginine Poly-Dipeptides Modulate Cytoskeleton and Mechanical Stress Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.750829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 研究者総覧 <a href="https://trios.tsukuba.ac.jp/ja/researchers/0000003664">https://trios.tsukuba.ac.jp/ja/researchers/0000003664</a> 個人の研究紹介サイト <a href="https://www.chura-rhythm.com/publications/">https://www.chura-rhythm.com/publications/</a>
--

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
研究分担者	森 英一朗 (Mori Eiichiro) (70803659)	奈良県立医科大学・医学部・准教授  (24601)	
研究分担者	吉野 大輔 (Yoshino Daisuke) (80624816)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授  (12605)	

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
---------	---------