

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650269

研究課題名(和文)再生組織への血管誘導のための最適酸素環境の設計

研究課題名(英文)Optimal oxygen condition of capillary angiogenesis for tissue regeneration

研究代表者

柴田 政廣 (SHIBATA, MASAHIRO)

芝浦工業大学・システム工学部・教授

研究者番号：60158954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マウス背部微小循環観察チャンバー法を用い、低酸素環境下と通常酸素環境下における再生組織部位での新生毛細血管数を比較した結果、低酸素環境下のほうが通常酸素よりも新生血管数は多かった。一方、組織再生面積は通常酸素のほうが大きく、再生初期においては組織周囲からの拡散による酸素供給が有効であることが判明した。これは、血管壁での酸素消費が大きく、組織再生初期における過剰な血管新生は組織への酸素供給に不利となることが考えられる。そのため再生初期には高酸素環境で、その後再生組織の大きさが周囲からの拡散可能距離を超えてからは低酸素環境に置き毛細血管新生を亢進させることが有効であるのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the microcirculatory responses during the wound healing process by in vivo mice models. Mice with dorsal skinfold chambers were used to observe the tissue regeneration and capillary angiogenesis. The progress time for the recovery and the total numbers of new born capillaries were evaluated with different oxygen groups. The progress time for the tissue regeneration was faster under high oxygen conditions rather than low oxygen conditions. The recovery time under high oxygen and low oxygen groups averaged 6 days and 10 days, whereas the total numbers of new born capillaries under low oxygen condition were greater than high oxygen condition. From these results, high oxygen condition would be advantageous for the wound healing in the early stage since oxygen can be supplied from atmosphere. On the other hand, new born capillaries would be required after when the regenerative tissues have grown up to the size larger than oxygen cannot be supplied by diffusion from atmosphere.

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：酸素環境 組織再生 血管新生 毛細血管 創傷治癒 低酸素 生体顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

再建医学領域における有効な治療法として自己組織再生と細胞工学的再生組織の移植が考えられる。これらにとって共通の問題点は再生組織を栄養するための微小循環血行の確立が難しいことである。試験管内においていかに高機能な再生組織であっても、生体内でその機能を長期に亘り維持するには、栄養血管系の構築が不可欠であることは自明である。しかし培養細胞系により目的とする組織を構成する細胞工学プロジェクトの多くは栄養血管についての配慮が欠けている。本研究では、血管新生を組織酸素環境に対する生体固有の適応反応として理解することにより、上記問題点の克服、すなわち自己および細胞工学的再生組織への栄養供給のための *in vivo* 微小血管誘導法の確立を目指す。具体的には、生体制御システムの一環としての血管新生メカニズムを明らかにする、このメカニズムに基づき機能的血管化組織構築のための最適酸素環境を決定する、この血管化組織構築法を、生体システム固有の適応反応を利用した新しい血管新生療法として確立させる。

2. 研究の目的

低酸素に対応する生体制御システムの一環としての血管新生メカニズムを検証する。そのため、生体内血管新生観察モデルとして、ラット・マウス背部皮膚の全層欠損による創傷治癒モデルと背部皮膚透明窓装着血管新生モデルを作製する。開発モデルを用い、生体顕微鏡下に組織酸素分圧を変化させたときの微小循環血行と血管壁での酸素消費の応答を分析し、生体適応としての血管新生に対する至適酸素環境を決定する。その後は、組織再生のための血管新生を最大効率にする酸素環境を整えた状態で、自己骨髄細胞を利用した強力な血管新生療法を確立する。骨髄細胞から分離した内皮前

駆細胞を蛍光標識し、初年度に開発した酸素分圧可変血管新生モデルに投与して蛍光生体顕微鏡下に血管新生部位への動員・分化の関連を追及する。血管新生誘導に最適な酸素分圧を決定し、自己再生組織の血管構築と細胞工学的再生組織への微小循環系および血管柄の確立を目指す。さらに最適状態に設定した生体材料内に主細胞と骨髄細胞、内皮細胞の共培養を行った微小循環形成準備状態の複合体を組み込むことにより、体循環血管からの新生血管を誘導した微小循環血行を有する機能的組織を構築する。

3. 研究の方法

(1) 血管新生メカニズムの解明

低酸素に対応する生体制御システムの一環としての血管新生メカニズムを検証する。ラット・マウス背部皮膚の全層欠損による創傷治癒モデルと背部皮膚透明窓装着血管新生モデルを用い、生体顕微鏡下に組織酸素分圧を変化させたときの微小循環血行と血管壁での酸素消費の応答を分析し、生体適応としての血管新生に対する至適酸素環境を決定する。

(2) 生体内血管新生モデルの確立

これまで対象としてきた骨格筋微小循環モデルに加え、マウス背部皮膚を対象とした皮膚軟部組織の微小循環を可視化する実験モデルを開発する。このモデルを基に創傷治癒過程の血管新生を慢性的、定量的に解析できる血管新生モデルを確立する。

(3) 酸素分圧と血行動態・血管新生の関連
酸素分圧変化によって血行動態と血管新生が如何に影響を受けるかを観察・解析する。血管新生モデルに独自に開発した組織内酸素分圧分布計測システムを適用する。組織酸素分圧の調整は、当初は酸素濃度を調整したガスをチャンバー内に誘導することにより行うが、その後は微小循環可視化モデルの透明窓に異なる酸素透過性を有する素

材を用いることで観察領域の酸素分圧を1-2mmHgから数10mmHgまで変化させられるようにする。この素材としては酸素透過性コンタクトレンズ素材を使用する予定である。種々の酸素分圧における血行動態と血管新生を定量し、それらの関連を見出す。血行動態は現有の動的微小循環血流測定システム(Capiflow[®])により微小循環ビデオ信号波形をコンピュータ上で解析する。

(4) 骨髄細胞挙動の解明

血管新生に関与する内皮前駆細胞など骨髄中の幹細胞は低酸素刺激により末梢血中に動員され、血管新生部位に取込まれ分化するといわれているが、*in vivo*での動態は十分に解明されていない。申請者は新鮮骨髄から内皮前駆細胞を豊富に含むEPC-enriched fractionを分離・標識する手法をほぼ習得している。前記の酸素分圧可変血管新生モデルに蛍光標識した抽出骨髄細胞を投与して蛍光生体顕微鏡下にその動態を追求する。その画像を基に酸素分圧と骨髄細胞の創傷部位への動員・分化の関連を調べる。

(5) 血管壁における酸素消費の推定

種々の組織酸素レベルにおける血管内外での酸素分圧を計測し、その実測値を基に、独自の微小循環酸素拡散モデルを用い、血管壁での酸素消費を定量化し、新生血管密度と組織への酸素供給効率の関連を検討する。

(6) 最適酸素状態の検証

低酸素が血流増加、骨髄細胞の動員を惹起して血管新生を誘発するという経過を予想しているが、いかなる程度の低酸素が血管新生にとって有利かは不明である。酸素がなければすべての生命活動は不能のため低酸素も過度になると細胞の活動は抑制され創傷治癒・血管新生が阻害されることは理論的、実験的、臨床的にも明らかである。再生組織内の血管密度とそれらが消

費する酸素量と再生組織酸素分圧の関連を詳細に解析し、周囲からの拡散による酸素供給が可能な組織容積を求め、低酸素環境に変更し血管新生を誘導させる最適ポイントを決める。これらの結果から組織再生のための最適酸素状態を決定する。

(7) 血管新生療法の開発

組織再生のための血管新生を最大効率にする酸素環境を整えた状態で自己骨髄細胞を利用した強力な血管新生療法の開発を行う。生体適合材料に骨髄細胞を組込むと同時に酸素分圧を調節する技術を開発する

(8) 骨髄細胞 carrier material の検索

採取した骨髄細胞を保持し、生体外で活動度を維持するための環境設定や適切な素材を検討する。血管新生のためには血管が伸展するための細胞足場が必要なため、その役割も兼ねて現時点ではコラーゲンマトリックスの利用を考えているが、それ以外のbiodegenerativeな素材についても最適なものを探求していく。

(9) 酸素分圧コントロール法の開発

骨髄細胞を組み込んだ生体素材の酸素分圧を制御する方法を考案する。前年度研究計画5で見出した最適酸素分圧をセットポイントとして酸素環境測定システムを作成し、最適酸素環境を維持する方法を探る。酸素分圧測定法としてはPd-ポルフィリンなどの酸素感受性プローブの蛍光寿命測定またはClark型電極のような酸化還元の化学反応を利用したシステムを用いる予定である。酸素状態調節には外部からの酸素供給量を調整する方法に併せ、酸素透過性の異なる生体適合素材を使用する。

(10) 血管新生療法の確立

ここまでの成果を総括して酸素分圧をコントロールでき、前駆細胞やサイトカインを豊富に含む自己骨髄細胞入りの生体適合材料を欠損部に移植することで生理的に最適な条件での血管新生誘導を行い、自己再生

組織への血管誘導を確実にする手法を確立する。

(11) 機能的組織の構築法の創製

本研究の最終段階では組織工学的再生組織への微小循環系および血管柄の確立を目指す。血管新生最適状態に設定した細胞足場を兼ねた生体材料内に主細胞と骨髄細胞、内皮細胞の共培養を行い、ハイブリッド幹細胞として組込む技術を開発する。この微小循環形成準備状態の複合体に対して種々の条件・環境を整備することにより体循環血管からの新生血管を侵入・結合させ血管柄付きで微小循環血行を有した機能的組織の構築法の創製を目指す。

(12) 総合評価

以上の研究成果に基づき、最適酸素供給効率に基づく機能的血管化組織の構築法に関する統合的な知識を提供する。

4. 研究成果

(1) 局所酸素環境と毛細血管新生の関連

まず、異なる酸素環境下での微小循環動態を比較するために、酸素不透過性透明窓（カバーガラス）を装着したモデルと酸素を透過する透明窓を装着したモデル透明窓を装着したモデルを用意した。各モデルにおいて、透明窓装着後 0, 3, 5, 7 日目の窓内酸素分圧を計測するとともに、微小循環動態を顕微鏡システムで観察・記録した。酸素分圧の計測は、酸素感受性蛍光プローブの消光時間から求める非接触・光学的手法（Fibox3: PreSens）により行った。観察視野内に存在する微小血管面積の定量化は、観察窓装着直後（観察 0 日目）と 7 日目の微小循環画像内の血管占有面積を Image J（NIH）により二値化処理し、0 日目に対する増加率として表した。

酸素不透過性窓と酸素透過性窓を装着し 7 日経過後の血管占有面積の増加率は、それぞれ $77 \pm 24\%$ と $11 \pm 3\%$ で両者には有意な違いが見られた（図 1）。一方、同時に計測

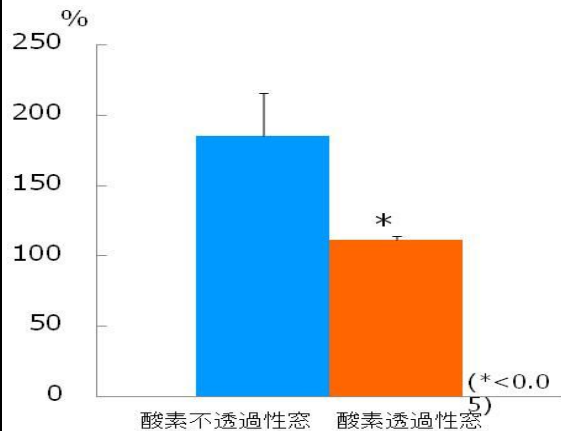


図 1 酸素不透過性窓と酸素透過性窓を装着し 7 日経過後の血管占有面積の増加率

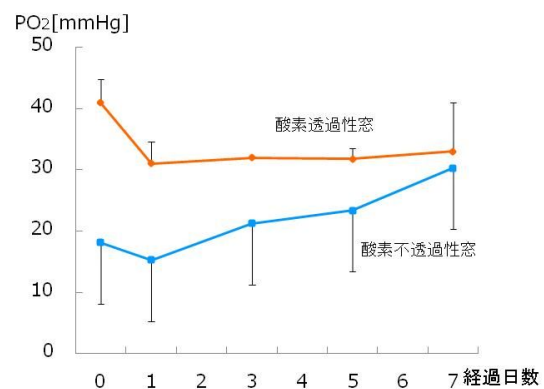


図 2 酸素不透過性窓と酸素透過性窓装着時の窓内組織酸素分圧の経時変化

した観察窓内組織酸素分圧は酸素透過性窓内では、装着直後から 7 日目まではほぼ 30 ~ 40mmHg の範囲に留まっているが、酸素不透過性窓内は、装着直後は 20mmHg 以下と低酸素状態にあるが、その後は血管面積の増加と共に 30mmHg まで増加していることが分かる（図 2）。

(2) 毛細血管新生と組織再生能

毛細血管新生と組織再生能の関係を明らかにするため、異なる酸素環境下での創傷治癒過程の微小循環動態観察を行った。創傷の作成は透明窓内組織中央部に生検用パンチ（Kai Industries Co., Ltd.）で直径 1mm の組織欠損を作成した。その後、酸素

不透過性窓または透過性窓を装着することで酸素環境を調整しながら欠損修復部位に浸潤する新生血管の違いを中心に7日間観察した。図3に透明窓装着後0,5,7日目の創傷治癒観察例を示す。図中上下段は、それぞれ酸素不透過性窓と透過性窓を装着したモデルの観察結果である。酸素不透過性窓内で治癒したモデルは、酸素環境制御直後から欠損に向かって血管が新生し始め、欠損を修復する再生組織に血管を誘導させながら治癒した。それに対し、酸素透過性窓内の欠損は、血管のない組織のみで欠損を塞ぎ、その後に組織内への血管誘導が起こった。生体内の組織酸素分圧は通常、安静状態では40mmHg前後である。そのためそれ以下の酸素状態に陥った場合、代謝機能維持のため組織自身の適応反応が働き、血管新生が亢進すると考えられるが、この適応反応が *in vivo* 微小循環の経時観察により直接確認できた。さらに創傷治癒時では組織での酸素消費は通常より多くなるため、この血管新生亢進による適応反応はより顕著に表れるのではないかと考えられる。図3上段の低酸素環境下での創傷治癒過程観察結果で見られた欠損部位への新生血管の浸潤は、本仮説の妥当性を示すもので、早急に酸素を必要とする創傷組織がまずライフラインの血管を構築し、そこから組織再生に必要な酸素を確保しているのではないかと考えられる。一方、高酸素環境では拡散により外気から直接酸素を取り入れられるため、再生初期段階においては必ずしも血管を必要としない。しかし拡散による酸素供給には距離的制限があるため、再生組織が成長していく過程においては限界がある。以上、本研究結果をまとめると、再生医療への応用まで考慮した長期的な血管誘導法としては、早い段階で再生組織に血管網を構築することのできる低酸素環境が有利であるのではないかと結論に至った。

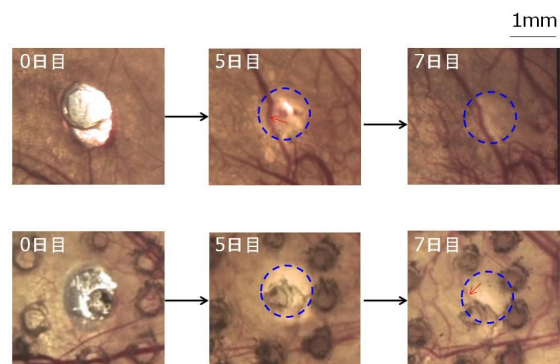


図3 透明窓装着後0,5,7日目の創傷治癒観察例。図中上下段は、それぞれ酸素不透過性窓と透過性窓を装着したモデルを示す。

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:全て査読有)

1. Shibata M, Hamashima S, Ichioka S, Kamiya A. Oxygen dynamics in microcirculation of skeletal muscle. *IFMBE Proceedings* 41, 1033-1036, 2014
2. Watanabe N, Inagawa K, Shibata M, Osakabe N. Flavan-3-ols fraction from cocoa powder promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in mice. *Lipids in Health and Disease* 2014, doi:10.1186/1476-511X-13-641.
3. Inagawa K, Aruga N, Matsumura Y, Shibata M, Osakabe N. Alteration of the Systemic and Microcirculation by a Single Oral Dose of Flavan-3-Ols. *PLoS ONE* 9(4): 2014
4. Uangpairoj P, Shibata M. Evaluation of vascular wall elasticity of human digital arteries using alternating current signal photoplethysmography. *Vascular Health and Risk Management*.9: 283-295, 2013
5. Osakabe N, Shibata M. Ingestion of

cocoa ameliorates endothelial dysfunction in mesentery arterioles induced by high fat diet in rats: An in vivo intravital microscopy study. Life Sciences 91: 1196–1200, 2012

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Shibata M, Hamashima S. Cardiovascular adaptation in response to chronic hypoxia in awake rats. International Society of Oxygen Transport to Tissue. 2014年6月28日～7月3日. London, UK
2. 横川和弘, 濱島早紀, 柴田政廣. Poiseuilleの法則を用いたin vivo末梢血管抵抗の実験的評価. 第53回 生体医工学会大会. 2014年6月24～26日. 仙台
3. 濱島早紀, 柴田政廣. 低酸素環境に対する心臓血管系の適応. 第37回日本バイオレオロジー学会. 2014年6月5～6日, さいたま
4. Yokokawa K, Shibata M. Theoretical and experimental analyses of total peripheral vascular resistance by direct measurement of microvascular response. Internatinal Conference on Biomedical and Health Infomatics. 2014年6月1～4日, Valencia, Spain
5. 横川和弘, 濱島早紀, 柴田政廣. Comparison of peripheral vascular resistance based on macro- and micro-circulatory responses by Poilleuille's law. 第39回微小循環学会. 2014年2月5～6日. 東京
6. Shibata M, Hamashima S, Ichioka S, Kamiya A. Oxygen dynamics in microcirculation of skeletal muscle. XIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing. 2013年9月25～28日, Sevilla, Spain

7. Kawamura S, Shibata M. Intravital observation of capillary angiogenesis during wound healing under different ambient oxygen conditions. 17th Conference of European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation. 2013年7月6～9日. Peacs, Hungary
8. 柴田政廣, 濱島 早紀, 川村 彩智. 骨格筋微小循環における酸素ダイナミクス. 第36回日本バイオレオロジー学会. 2013年6月6～8日. 福岡
9. 林浩大, 柴田政廣. 非接触レーザー血流計による生体顕微鏡下での実質臓器微小血管血流計測. 第36回日本バイオレオロジー学会. 2013年6月6～8日. 福岡
10. 横川和弘, 柴田政廣. マクロおよびマイクロ血液循環解析手法によるポアズイユの法則の実験的検証. 第36回日本バイオレオロジー学会. 2013年6月6～8日. 福岡
11. Uangpairoj P, Shibata M. Evaluation of vascular wall elasticity in human digital arteries by volume oscillometric technique. 2012年5月10～12日. 福岡
12. 林浩大, 川村彩智, Uangpairoj P, 柴田政廣. レーザー血流計を利用したin vivo生体顕微鏡での微小血管血流計測法の開発. 第51回日本生体医工学会大会. 2012年05月10～12日. 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴田 政廣 (SHIBATA MASAHIRO)
芝浦工業大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 60158954