21103 再生血管の分化と力学特性に及ぼす力学刺激の効果

Effect of Mechanical stimulation on Tissue Engineered Vascular Graft

○学 松浦 伸明(東大)

正 古川 克子(東大)

Nobuaki MATSUURA

Katsuko FURUKAWA

学 野崎 良(東大)

正 牛田 多加志(東大)

Ryo NOZAKI

Takashi USHIDA

University of Tokyo, Tokyo, Japan

Cells and tissue are always exposed to mechanical stimulation *in vivo*. This study investigated the effect of mechanical stimulation on tissue engineered vascular graft by culturing smooth muscle cells in PLLA scaffolds under rotational and pulsatile flow condition. Rupture strengths were significantly improved by pulsatile flow conditions. Histological staining indicated that mechanical stimulation facilitates cell proliferation and extracellular matrix generation. Immunohistochemistry for smooth muscle α -actin represented that tissue engineered vascular grafts cultured under pulsatile condition contain more redifferentiated smooth muscle cells than other culture conditions. These results demonstrate that pulsatile flow leads to reconstruction of extracellular matrix deposition and improvement of biomechanical functions toward the development of tissue engineered vascular graft.

Key Words: tissue engineered vascular graft, smooth muscle cells, pulsatile flow, phenotype

1. 背景

血管系疾患の治療法として近年、生分解性材料と細胞を組み合わせた組織再構築型の再生血管が着目されている。しかし現在臨床応用されている再生血管では血管組織の再構築が不十分であるため力学的強度が弱く、小口径の動脈には適用できない問題がある。そこで現在、様々な力学刺激を負荷しながら培養を行うことで早期に血管組織を再構築させる研究が活発に行われている^{[1][2]}。

また血管機能には平滑筋細胞の分化が大きな影響を与えている。平滑筋細胞には収縮型と合成型の2つの表現型が存在する。収縮型の平滑筋細胞は収縮機能を持ち血圧調整を行うのに対し、合成型では収縮機能を持たず増殖を行う。動脈硬化症や高血圧などの血管中には合成型の平滑筋細胞が存在し、これらは増殖亢進やタンパク質合成の増大などを示して病変を進展させる。そのため増殖を行うために合成型を示している平滑筋細胞を収縮型に再分化させることは、再生血管の機能回復において重要な要因であると考えられる。

2. 目的

力学刺激の変化による細胞増殖や細胞外マトリクス産生の変化を調べることで、力学的強度の高い再生血管の開発を目指す。さらに平滑筋細胞の表現型の変化を調べることで、力学刺激が細胞の分化に及ぼす影響について調べることを目的とした。

3. 実験方法

3.1. 再生血管の作製

本研究では培養担体として外形7mm、内径5mm、気孔率90%の生分解性材料PLLA(poly-L-lactic acid)を用いた。この培養担体を平滑筋細胞と酸性コラーゲン溶液の懸濁液(5×10^6 cells/ml)に孔の中まで充填するように陰圧の条件下で

細胞播種し、コラーゲンをゲル化させることにより再生血管を作製した。

3.2. 培養

力学的刺激が血管組織の再構築に及ぼす影響を調べるために以下の実験条件で1週間培養を行った。

①静置培養(static culture)

流れのないフラスコ内で培養を行う。

②巡回培養(rotational culture)

回転半径1.25cm、回転数74rpmのシェイカー上で培養を行う。

③拍動流負荷培養(pulsatile flow culture)

Fig.1に示す実験装置を用い、流量制御を行うことにより再生血管に拍動流を負荷しながら培養を行う。本研究では平均壁面せん断応力0.2[Pa]の拍動流を0.2Hzで負荷した。

また全ての実験条件において平滑筋細胞の再分化を促すために、DMEM-LGに添加因子を加えた培地^[3]を使用した。

Fig.1 Pulsatile Flow Culture System

4. 実験結果

4.1. 力学試験

培養環境による再生血管の破断強度の変化を調べた。Fig. 2より静置培養に比べ旋回培養では破断強度が低くなるのに対し、拍動流負荷培養では高くなることが分かった。また旋回培養と拍動流負荷培養では統計学的有意差が確認された ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Rupture Strength

4.2. 形態学的評価

細胞増殖を調べるために、ヘキスト染色を用いて細胞核の蛍光染色を行った。Fig. 3より、旋回培養も拍動流負荷培養も静置培養に比べ細胞数が増殖していることが分かった。また細胞外マトリクス産生を調べるためにエラスチカ・ワンギーソン染色を用いて組織染色を行った (Fig. 4)。この結果からも、力学刺激を負荷しながら培養を行うことにより細胞外マトリクスの産生量が増加していることが確認された。特に拍動流負荷培養においては、細胞増殖数と細胞外マトリクス産生量が共に大幅に増加しており、組織染色画像からは再生血管の強度を向上させる弾性繊維の発現も確認された。

(a)static (b)rotational (c)pulsatile

Fig. 3 Hoechst Stain (bar=400 μ m)

(a)static (b)rotational (c)pulsatile

Fig. 4 Elastica Van Gieson Stain (bar=400 μ m)

4.3. 免疫染色

組織培養した平滑筋細胞の表現型を調べるために、収縮型に特有な SM- α アクチンの免疫染色を行った。Fig. 5より、静置培養と旋回培養ではほとんど変化が観られないのに対し、拍動流負荷培養を行った再生血管では SM- α アクチンの発現が認められた。このことより、静置培養と旋回培養に比べ拍動流負荷培養を行った再生血管内には多くの収縮型を示した平滑筋細胞が存在していたことが考えられる。

(a)static (b)rotational (c)pulsatile

Fig. 5 Immunohistochemistry for Smooth Muscle α -Actin

(bar=400 μ m)

5. 考察

静置培養と旋回培養を比較すると、旋回培養の方が細胞増殖数と細胞外マトリクス産生量が多くなったにも関わらず、力学的強度は静置培養よりも低くなった。これは旋回培養では静置培養に比べて PLLA の加水分解が促進されるために破断強度が低下し、その差を拍動流負荷培養ほど組織再構築の度合いが顕著でなかったため細胞数と細胞外マトリクスで補うことができなかったからだと考えられる。

旋回培養と拍動流負荷培養を比較すると、拍動流負荷培養の方がはるかに力学的強度が高く、組織の再構築が促進されていることが確認された。よって生体内環境に近い力学刺激を負荷しながら培養を行った方がより再生血管の組織再構築を促す働きがあると考えられる。また拍動流負荷培養を行った再生血管からは多くの SM- α アクチンの発現が認められた。よって拍動流負荷培養を行ったことにより、再生血管内の収縮型を示した平滑筋細胞数が増加したと考えられる。これらより他の培養条件に比べて、拍動流負荷培養をすることは再生血管の力学的機能を向上させる働きがあると考えられる。

6. 結論

- ・力学刺激を負荷しながら培養を行うことにより、再生血管の細胞増殖と細胞外マトリクス産生が促進された。
- ・拍動流負荷培養により、細胞増殖と細胞外マトリクス産生がより顕著に促進された。
- ・拍動流負荷培養により、再生血管内の収縮型を示した平滑筋細胞数が増加した。

7. 参考文献

- [1] S. I. Jeong et al., Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds, *Biomaterials* 2005;26:1405-1411.
- [2] C. Williams et al., Purfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries, *Tissue Eng.* 2004; 10:930-941.
- [3] L. E. Niklason et al., Functional arteries grown *in vitro*, *Science* 1999;284:489-493.