1A2-A4 エラスチンマトリックスを足場とする血管平滑筋細胞培養法に関する研究

Novel Cell-Cultured Method of Smooth Muscle Cells using Elastin Scaffold

○門園 英樹、宮本 啓一、堀内 孝

三重大学 大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室

Hideki Kadozono, Keiichi Miyamoto, Takashi Horiuchi

Dept. of Chemistry for Materials, Fac. Of Eng., Mie University

1. はじめに

大動脈には心臓から血流を全身に送るため、高い血圧による負荷と拍動により、血管の膨張と収縮の伸縮運動が繰り返して生じている。弾性繊維であるエラスチンはこうしたストレスに対抗するために必要な伸縮性細胞外基質であり、心臓に近く大応力が加わる血管壁では特にエラスチン含有率は高く（非細胞成分の70%）、血圧が低下する末梢血管ではその含有率は低下する。一般に大動脈はコラーゲンを足場とした内皮細胞層（内膜）、エラスチンを足場とした平滑筋層（中膜）、コラーゲンを足場とした線維芽細胞層（外膜）の3層構造から形成される（Fig. 1）。また足場としてのエラスチンは、血管平滑筋層の収縮に連動することで動脈の弾性・伸縮性および強靱性を担っていると考えられている。我々はこれまでに、生体から抽出・精製した水溶性エラスチンの化学的再架橋法により任意の形状・弾性特性を有するエラスチンマトリックスの成形加工を可能にしてきた。本研究では、人工的に作製したエラスチンマトリックスを血管平滑筋細胞培養の足場として評価することで、血管組織再生のための新規平滑筋層構築法を開発することを目的とした。

Fig.1 Three layers structure of Aorta

2. 実験方法

1) エラスチン・ゼラチンマトリックスシートの作製

水溶性エラスチンと架橋剤を脱イオン水に溶解させ鋳型に入れて、厚さ80μm～300μmのエラスチンマトリックスシートを作製した。ゼラチンシートも同様の方法で作製した。

2) 細胞の接着および形態変化の観察

作製したマトリックス上に細胞（ヒト大動脈由来平滑筋細胞（SMCs）、内皮細胞（ECs）、線維芽細胞（FB））を細胞数が 2.0×10^4 個/mlとなるように播種し、位相差顕微鏡による画像撮影を行い、細胞の形態変化を観察した。接着の様子を比較するために接着率と細胞の形態変化から初期接着と伸展に区別し、接着してから伸展するまでの時間を細胞の基質認識の指標とした。

3. 結果・考察

エラスチンマトリックスに対する各細胞の接着率は平滑筋細胞87%、内皮細胞84%、線維芽細胞26%となり、線維芽細胞は低い接着率となったが平滑筋細胞、内皮細胞は高い接着率を示した（Table.1）。

Table.1 Percentage (%) of adhered cells on elastin and gelatin scaffold.

	FB	SMCs	ECs
Elastin	26.0	87.9	82.0
Gelatin	93.4	—	86.3

また初期接着から伸展への時間を伸展時間／初期接着時間で表すと平滑筋細胞は2.27、内皮細胞3.22、線維芽細胞15.5となり、この比率が短い平滑筋細胞、内皮細胞はエラスチンに対して特異的な接着をし、それに対して線維芽細胞には認識性がないことがわかった（Fig.2）。

ゼラチンマトリックスに対して内皮細胞はエラスチン同様に高い接着率を示し、伸展時間／初期接着時間比は2.45とエラスチンよりも短い値を示し、ゼラチンに対して特異的な接着性を示すと考えられる。また線維芽細胞に関しても接着率が93%と高い接着性を示した（Table.1）。以上より細胞は本来足場とするマトリックスタンパク質、平滑筋細胞はエラスチン、内皮細胞、線維芽細胞はコラーゲンに対し特異的な接着を示すことがわかった。

Fig.2 Recognition ability of various cells on elastin scaffold

4. 結論・展望

平滑筋細胞はエラスチンマトリックスに対しては接着から伸展までに要する時間が短いことからマトリックス認識による親和性が高いと考えられる。この親和性からエラスチンマトリックスは平滑筋細胞の培養基材として適している。また内皮細胞、線維芽細胞はより接着性の高いマトリックス使用が有効的である。今後はこのエラスチンマトリックス中において細胞の形態変化などの影響を調べる事により人工血管作製のための方向性を明らかにしたいと考えている。