

## 組織工学的人工血管中膜モデルの開発と評価

## Development and characterization of the tissue engineered vascular media model

○堀川公佑（三重大） 晝河政希（三重大） 堀江俊貴（三重大）

傍嶋達也（三重大） 宮本啓一（三重大） 堀内孝（三重大）

Kosuke HORIKAWA, Mie University, Masaki HIRUKAWA, Mie University, Toshiki HORIE, Mie University, Tatsuya SOBAZIMA, Mie University, Keiichi MIYAMOTO, Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie University Taro

**Abstract:** Arterial bypass graft implantation remains the primary therapy for patients with advanced cardiovascular disease. However, there is no available synthetic small-diameter vascular graft. Tissue engineering offers an attractive approach to creating functional blood vessels by combining vascular cells with natural scaffold. We focused on the elastin which is predominant protein of blood vessel and smooth muscle cells (SMCs). In this study, We developed tissue engineered vascular media model by combining SMCs with elastin vascular scaffold. We investigated construction and mechanical strength of the model.

**Key Words:** Elastin, smooth muscle cells, Tissue engineered vascular media, mechanical strength

## 1. 緒言

現在、動脈硬化を主な原因とする血管疾患の有効な治療法として、高分子材料を用いた人工血管や血管内腔拡張ステントを用いる対処法が主流となっている。しかし、未だ小口径のものにおいては、生体拒否反応による血管の再狭窄などの課題がある。そのため、我々は、生体適合性の高い組織工学的人工血管の開発を目的として研究を行っている。今回、生体血管組織由来のエラスチンを用いて作製した伸縮性3次元足場材料と、血管の収縮を制御する血管平滑筋細胞（SMC）を組み合わせた血管中膜モデルの作製を行った。モデル作製にあたり重要となる3次元足場材料の構造および力学的強度の評価と、SMCの表現型のコントロールを検討したので報告する。

## 2. 方法

## 2-1 SMCの表現型の制御

ブタ大動脈から単離したSMCを通常培地（10%FBS含有DMEM培地）と脱分化促進培地の2種類の培地を用いて培養を2週間行った。細胞の表現型の評価は $\alpha$ -Smooth Muscle Actin( $\alpha$ -SMA)の免疫蛍光染色により行い、基質産生能の評価はエラスチンアッセイにより行った。

## 2-2 3次元足場材料の作製

ブタ大動脈から得られた水溶性エラスチンを用いてエラスチンファイバーシート<sup>(1)</sup>をエレクトロスピンニング法を用いて作製した。(Fig.1)また、架橋剤Dode-DSPを用いてエラスチンゲルを作製した。(Fig.2)

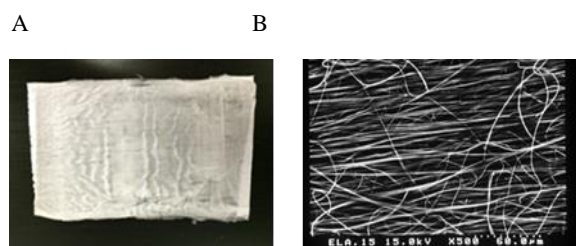


Fig.1 A) Elastin Fiber Sheet.

B) scanning electron microscope (SEM) Image.

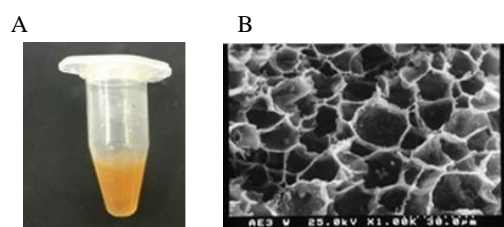


Fig.2 A) Elastin Gel. B) SEM Image.

これらを、ファイバー-ゲル-ファイバーと層状に組み合わせることにより、生体血管と同様の層状構造（ユニット構造）を有する3次元血管足場を作製した。

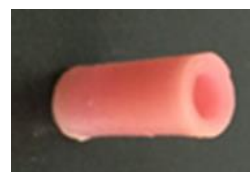


Fig.3 Tissue engineered vascular media model

## 2-3 3次元足場材料の構造評価

作製した3次元足場と生体血管の断面構造を観察するため、凍結切片を作製し、HE染色によって比較、検討した。

## 2-4 3次元足場材料の力学的特性の評価

作製した3次元足場と生体血管との力学的強度の比較を弾性率測定により行った。生体血管は中膜部分として比較するため外膜および内膜を除去処理したものをを用いて測定した。

## 3. 結果

## 3-1 SMCの表現型の制御

免疫蛍光染色により、SMCの $\alpha$ -SMAの発現を通常培地による培養(Fig.4A)、および脱分化促進培地による培養(Fig.4B)で比較した。

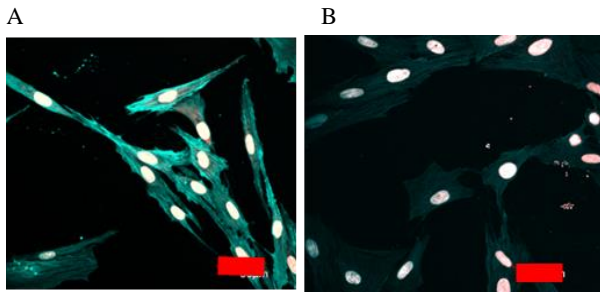


Fig.4  $\alpha$ -SMA expression (7 day) .scale bar:50 $\mu$ m  
A) standard medium  
B) dedifferentiation promoting medium

Fig.4 より、 $\alpha$ -SMA の発現は、脱分化促進培地において通常培地で培養したものより弱いことが示された。画像の輝度解析より、通常培地で培養したものは、脱分化促進培地で培養したものの 3.1 倍を示した。

また、SMC を培養したそれぞれの培地を回収し、エラスチンアッセイを行い、そのエラスチン産生量を測定した。その結果、脱分化促進培地で培養すると SMC のエラスチン産生量が増加することがわかった。(Fig.5)

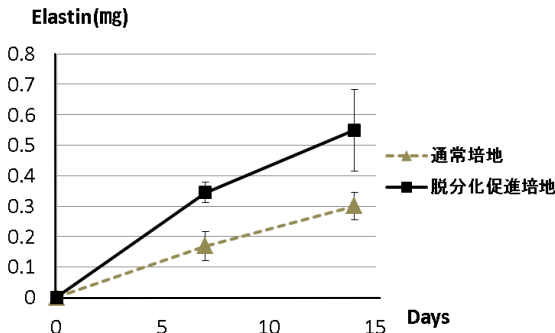


Fig.5 Elastin Assay. Matrix production of SMC

### 3-2 3次元足場材料の構造評価

作製した血管足場の断面の構造を HE 染色により観察した。(Fig.6A) その結果、ファイバー-ゲル-ファイバーの層状構造が確認できた。また、生体血管についても同様に HE 染色を行い、層状構造を確認した。(Fig.6B)

このことから、作製した 3次元足場材料は、生体血管と類似したユニット構造を有していることがわかった。

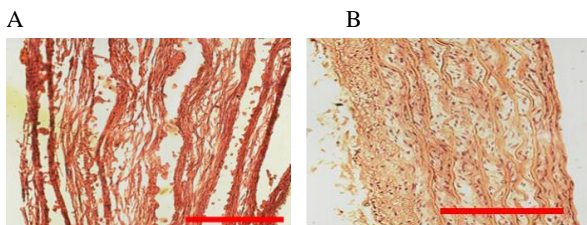


Fig.6 Hematoxylin-Eosin (HE) stain. scale bar:250 $\mu$ m  
A) Tissue engineered vascular media model  
B) Porcine Aorta

### 3-3 3次元足場材料の力学的特性の評価

作製した 3次元足場材料の弾性率を測定した結果を Fig.7 に示す。同様に生体血管（コラーゲン除去処理後）とエラスチンゲルについての測定結果を示す。

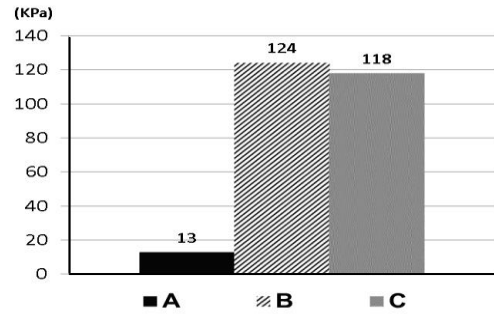


Fig.7 Elastic modulus

A) Elastin gel B) Vascular Media Model C) Porcine Aorta

エラスチンゲル(A)だけでは生体血管に及ばなかったが、ファイバーを複合した 3次元足場(B)においては、生体血管中膜(C)と同じ弾性率を示す結果となった。

## 4. 考察

### 4-1 脱分化促進培地による SMC の形質転換

SMC は通常時、生体内で収縮型の表現型をとっている<sup>(2)</sup>。しかし、血管新生時または、損傷時においては脱分化し、合成型となり基質産生を促す。本研究で作製する 3次元足場は、ブタ由来のエラスチンを材料として用いており、最終的に自己組織へとリモデリングする必要がある。そのため、SMC の基質産生能力の向上が必要不可欠となる。今回、脱分化促進培地により、SMC の産生するエラスチン量を増加させることが示唆された。この合成型 SMC を 3次元足場材料と組み合わせることにより、SMC の産生した基質により、リモデリングされ、自己組織となる組織工学的人工血管中膜モデルが作製できると考えられる。

### 4-2 3次元足場材料の評価

今回作製した血管 3次元足場は生体血管中膜のユニット構造を模倣しており、このユニット内に SMC を組みこむことで、生体血管中膜構造を再現することが可能であると示唆された。また本実験で得られた合成型 SMC は、生体血管中膜に存在する弾性板を作り出す働きがある。そこで、血管 3次元足場に組み込むことで、その高い基質産生能により、自己組織へのリモデリングや力学的特性の強化が期待される。今回は、合成型 SMC を組み込む前の段階として、生体内拍動時の力・変形に耐えうる血管 3次元足場材料が開発できたと考えられる。

## 5. 結論

本研究によって、脱分化促進培地により SMC を脱分化させ、基質産生能を向上させることに成功した。また、生体血管の中膜層構造を模倣した 3次元足場材料を開発することができた。

## 6. 参考文献

- (1) Keiichi Miyamoto, et al, Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 45, No. 1, pp. 33-41, 2009.
- (2) S.S.M.Rensen, P.A.F.M.Doevendans, and G.J.J.M.van Eys, Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity, *Netherlands Heart Journal*, Vol. 15, No. 3, pp. 100-108, 2007.