

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 小嶋朋之

横浜市立大学大学院医学研究科 生殖生育病態医学

## 審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	臓器再生医学	主任教授	小川 毅彦
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	小児科学	主任教授	伊藤 秀一
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	外科治療学	主任教授	齋藤 綾

Hydrostatic pressure under hypoxia facilitates fabrication of tissue-engineered vascular grafts derived from human vascular smooth muscle cells in vitro

低酸素下における静水圧は *in vitro* における  
ヒト血管平滑筋細胞由来の組織工学的人工血管の作製を促進する

1. 序論

心血管疾患は成人の世界的な死因のトップである。心血管疾患の60%以上は冠動脈や末梢動脈、大血管などの血管病変に起因している (Virani et al., 2020)。先天性心血管系疾患は、生存する新生児の約1%に発症し、新生児死亡の主な原因となっている (Linde et al., 2011)。複雑な奇形を伴う先天性心疾患系疾患の治療には複数回に及ぶ手術が必要である。成人では病変血管を自家移植や人工血管で置換し、小児では人工血管を使用して異常血流を修正する。しかし、これらの治療には自家移植に用いることができる健康な血管の数が限られていることや、血栓形成のリスクがあること、小児患者では移植血管に成長性が望めないことなどの制約がある (Taggart et al., 2013; Lee et al., 2014)。そのため、生体適合性のある組織工学的人工血管が成人・小児患者ともに望まれている。

多層血管壁の自己組織化は細胞が細胞-細胞、細胞-マトリックス接合や自然な細胞外マトリックスネットワークを形成することを容易にするなどの利点をもたらすと考えられている。そのため、足場材料のない人工血管の作製には簡便な方法が望まれている。

胎児期に血管は他の臓器と同様に低酸素環境で発達し (Simon et al., 2008)、特に機械的な力に暴露され始めると、血管平滑筋層が肥厚し、血圧に耐えられる細胞外マトリックスが形成される (Wagenseil et al., 2009)。灌流を伴うバイオリアクター (L'Heureux et al., 1998; L'Heureux et al., 2006; McAllister et al., 2009) や静水加圧 (Saito et al., 2021; Yokoyama et al., 2017) など機械的負荷を利用した組織工学によって、移植可能な足場材料を必要としない組織工学的人工血管の作製が可能となった。しかし、組織工学的人工血管の作製には細胞外マトリックスの成熟と十分な機械的強度を得るのために長時間の培養が必要である (Mohapatra, et al., 2022)。近年低酸素条件が組織工学的人工血管の作製に導入され、ヒト真皮線維芽細胞を足場材料に播種し培養すると、移植のための強度を得るまでの作製時間が短縮された。

本研究では低酸素環境と組み合わせた超生理範囲の静水圧が、生理的細胞間

接着，細胞-細胞外マトリックス接着，天然細胞外マトリックスネットワークを含む血管構造の自己組織化を促進するかを検討した。

## 2. 方法

臍帯動脈から分離培養した臍帯動脈平滑筋細胞や，ScienCell 社から入手した臍帯動脈平滑筋細胞を用いて多層細胞シートの作製と，RNA シークエンスや定量 PCR，ウエスタンブロッティング，免疫細胞化学染色を行った。

細胞は (1) 大気圧/通常酸素分圧 (AP/NOR)，(2) 大気圧/低酸素分圧 (AP/HYP)，(3) 静水圧/通常酸素分圧 (HP/NOR)，(4) 静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP)，の 4 種類の刺激を行った。

フィブロネクチンで被覆したアテロコラーゲン膜上に 1 層目のヒト臍帯動脈平滑筋細胞を播種し静置した。24 時間後に静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) を 24 時間印加した。その後，1 層目の細胞の上に 2 層目の細胞を播種する。この操作を 10 回繰り返すことで 10 層の多層細胞シートを作製した。

ヒト臍帯動脈平滑筋細胞で作製した細胞シートの移植実験には雄ヌードラット (F344/NJcl- rnu/rnu, 体重:200-250 g) を使用した。2.0×1.5 mm 大に加工した細胞シートを腎動脈下の腹部大動脈に縫合した。移植手術の 3 週間後，3 ヶ月後，5 ヶ月後に開腹手術を行い，移植部位の組織学的評価を行った。

## 3. 結果

ヒト臍帯動脈平滑筋細胞を用いた RNA シークエンスの結果より，静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) によって 20 遺伝子の発現が 2 倍以上増加することがわかった。これらの遺伝子のうち細胞接着を強化することで知られている NDRG1 が静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) で増加した。静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) で培養したヒト臍帯動脈平滑筋細胞の接合部では N-cadherin が集簇し，NDRG1 を標的とした siRNA によって N-cadherin の集簇は抑制された。

フィブロネクチン結合に必要な integrin  $\alpha 5$  および integrin  $\beta 1$  の発現は静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) によって増加した。またヒト臍帯動脈平滑筋細胞を静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) 下で培養することでフィブロネクチンの線維形成が促進された。

RNA シークエンスのデータを用いた Gene Set Enrichment Analysis では静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) と細胞外マトリックスと関連のある GOCC\_COLLAGEN\_TRIMER, およびコラーゲン架橋に必須である LOX の間に正の相関があることがわかった。

静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) で培養したヒト臍帯動脈平滑筋細胞は大気圧/通常酸素分圧 (AP/NOR) や大気圧/低酸素分圧 (AP/HYP)，静水圧/通常酸素分圧 (HP/NOR) で培養したときと比較して NDRG1 と LOX の発現量が増加した。NDRG1 と LOX の増加はそれぞれ CEBP/ $\alpha$  と HIF-1 $\alpha$  によって媒介されていた。

静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) 下培養によっておよそ 5 週間で  $2132 \pm 228$  mmHg の破断応力を有する血管平滑筋細胞グラフトを作製することができた。これらのグラフトをラットの腹部大動脈に移植したところ、17 例中 16 例が生存した (3 週間 ;  $n = 6/7$  例, 3 ヶ月 ;  $n = 6/6$ , 5 ヶ月 ;  $n = 4/4$ )。移植後のグラフトは 3 週間後には内皮化し、5 ヶ月後でも開存しており、ヒト由来の細胞はラット由来の平滑筋細胞に置換されていた。

#### 4. 結論

本研究により、静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) 培養によって、細胞-細胞間、細胞-細胞外マトリックス間の接着を高めることによって、強度が高く且つ足場材料を必要としない移植用のヒト血管平滑筋細胞グラフトを短時間で作製できることと、静水圧/低酸素分圧 (HP/HYP) 培養によって強固な細胞外マトリックスネットワークの構築ができることが示唆された。

#### 質疑応答詳細

実際に大きいシートを用いた動物移植実験では瘤化してしまい上手くいかなかったが、その考察が少なかった印象である。何か考えていることがあるか。

⇒ヒト腹部大動脈瘤の組織像では、弾性線維の破壊を確認することができる。また、一度破壊された弾性線維の修復や再生は不可能とされている。本研究においては臍帯動脈平滑筋細胞の細胞シート内に弾性線維を認めておらず、弾性線維の欠如が瘤化の原因と考える。LOX をノックアウトしたマウスを高血圧にすることで腹部大動脈瘤モデルマウスを作成することからも、LOX を反対に過剰発現することで弾性線維形成を促進できるのではと期待している。

今後の検討事項として、細胞シート内のトロポエラスチンからの弾性線維形成の促進を含めた弾性線維の在り方に着目したい。

その弾性線維について、血管における平滑筋細胞以外の細胞について考えたか。

⇒血管は外膜に含まれる線維芽細胞や、中膜の平滑筋細胞、そして内皮には内膜細胞が存在する。外界からの圧力を受けた ECM からのシグナルや、血流の shear stress などを受けた内皮細胞から分泌された因子が平滑筋に作用し、弾性線維の形成に関与していることは十分に考えられる。

今回は低酸素と周期加圧を組み合わせた 4 群で hUASMCs を刺激培養し、RNA-sequencing を行った。そこから NDRG1 を抽出して着目したが、その他の遺伝子にも着目・検討をおこなったか。

⇒スライドに示した Table はコントロールに比べ低酸素下周期加圧 (HP/HYP) で上昇していたもの (FPKM 値が 10 以上もの) を上位から列挙している。少な

くとも NDRG1 より上位のものは全て解糖系・嫌気性代謝にかかわるものであり、細胞接着に関わるような遺伝子は見当たらなかった。

LOX についてのインパクトが薄い印象だった。本当に LOX の発現が細胞シートの作製必要な因子なのか。また、NDRG1 と LOX が最重要因子であると言い切れるのか。それ以外に重要なファクターはないのか。

⇒LOX をノックアウトしたマウスでは大動脈中の弾性線維が断裂しており腹部大動脈瘤を形成することからも LOX は大動脈中の弾性線維形成を担う重要な因子と考えられる。

低酸素下周期加圧から細胞シートを作製するには様々な因子が様々なカスケードを経て作用していると思うし、今回はその中のカスケードの1つとして NDRG1 と LOX が見つかったと考えている。全ての事象を単一制御遺伝子（マスター遺伝子）で説明するのは難しいと思う。

上記のような考察では NDRG1 と LOX は間違ったマーカーである可能性があり、論文としても危ういと思う。本当に今回の論文において NDRG1 と LOX が key となる因子であると言えるのか。

⇒本研究では CEBP $\alpha$  のインヒビターとして、また HIF-1 $\alpha$  のインヒビターとしてエキノマイシンを使用し低酸素下周期加圧 (HP/HYP) で上昇した NDRG1 と LOX の発現を抑制することができた。そのエキノマイシンを用いて hUASMCs の低酸素下周期加圧 (HP/HYP) 培養を行うと細胞の積層が阻害され細胞シートが作製できなくなることを示した。この実験から NDRG1 と LOX が抑制されると細胞シートが作製できなくなると結論づけることができるため、NDRG1 と LOX が重要因子であると結論づけられると考えている。

移植後 5 ヶ月でヒト由来細胞が消失したとしているが、この結果は実験前から想定していたことだったか。

⇒実験中は、移植した細胞シートに外から栄養血管が走行し、ヒト由来細胞は生存し続けると予想していた。しかし実際にはヒト由来細胞は消失し代わりに宿主から遊走してきたラット平滑筋細胞に置換された。これは、異種間の移植によることか原因なのかは不明である。

今回の実験に使用した低酸素を含めた周期加圧の条件は実際にはどの状況を模したもののなのか。

⇒本研究は Sci Rep. 2017. で発表した加圧システムをもとに行っている。周期加圧は 110-180 kPa (65-600 mmHg) 、0.002 Hz (500 秒周期) でありどちらも非生理学的なものである。低酸素に関しても同様に既存の報告を参考に細胞接着の増加を期待して取り入れたが、子宮内環境を模して PO<sub>2</sub>=35 mmHg を目標とはしてい

なかった。

現在、生体内の環境（圧力、心拍数、酸素分圧）を極限まで再現する周期加圧装置の開発を試みているが、高振幅を再現すると、インキュベータ内の二酸化炭素や窒素を一定に保つことや、モーターによる発熱で 37℃に保てないなど課題がある。

以上の発表内容と質疑応答から小嶋朋之医師は医学博士の学位授与に値すると判断された。