

学位論文の要旨

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

March, 2024
(2024 年 3 月)

Tomoyuki Kojima
小嶋 朋之

Department of Obstetrics and Gynecology
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 生殖生育病態医学

(Doctoral Supervisor : Etsuko Miyagi, Professor)
(指導教員 : 宮城 悦子 教授)

学位論文の要旨

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

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.09.041>

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、ウェ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/ α と HIF-1 α 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 ± 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。

引用文献

- Athanasidou, K.A., Eswaramoorthy, R., Hadidi, P., and Hu, J.C. (2013), Self-organization and the self-assembling process in tissue engineering, *Annu Rev Biomed Eng*, 15, 115-36.
- Fang, S., Ellman, D.G., and Andersen, D.C. (2021), Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large Animals and Humans, *Cells*, 10(3), 713.
- Guo, J., Huang, J., Lei, S., Wan, D., Liang, B., Yan, H., Liu, Y., Feng, Y., Yang, S., He, J., Kong, D., Shi, J., and Wang, S. (2023), Construction of Rapid Extracellular Matrix-Deposited Small-Diameter Vascular Grafts Induced by Hypoxia in a Bioreactor, *ACS Biomater Sci Eng*, 9(2), 844-855.
- Iwaki, R., Shoji, T., Matsuzaki, Y., Ulziibayar, A., and Shinoka, T. (2022), Current status of developing tissue engineering vascular technologies, *Expert Opin Biol Ther*, 22(3), 433-440.
- L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T.N., Chronos, N.A., Kyles, A.E., Gregory, C.R., Hoyt, G., Robbins, R.C., and McAllister, T.N. (2006), Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nat Med*, 12(3), 361-5.
- L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., and Auger, F.A. (1998), A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *FASEB J*, 12(1), 47-56.
- Lee, A.Y., Mahler, N., Best, C., Lee, Y.U., and Breuer, C.K. (2014), Regenerative implants for cardiovascular tissue engineering, *Transl Res*, 163(4), 321-41.
- McAllister, T.N., Maruszewski, M., Garrido, S.A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., Zagalski, K., Fiorillo, A., Avila, H., Mangano, X.,

Antonelli, J., Kocher, A., Zembala, M., Cierpka, L., de la Fuente, L.M., and L'heureux, N. (2009), Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study, *Lancet*, 373(9673), 1440–6.

Mohapatra, S.R., Rama, E., Melcher, C., Call, T., Al Enezy-Ulbrich, M.A., Pich, A., Apel, C., Kiessling, F., and Jockenhoevel, S. (2022), From In Vitro to Perioperative Vascular Tissue Engineering: Shortening Production Time by Traceable Textile-Reinforcement, *Tissue Eng Regen Med*, 19(6), 1169–1184.

Rafique, M., Wei, T., Sun, Q., Midgley, A.C., Huang, Z., Wang, T., Shafiq, M., Zhi, D., Si, J., Yan, H., Kong, D., and Wang, K. (2021), The effect of hypoxia-mimicking responses on improving the regeneration of artificial vascular grafts, *Biomaterials*, 271, 120746.

Saito, J., Kaneko, M., Ishikawa, Y., and Yokoyama, U, Challenges and Possibilities of Cell-Based Tissue-Engineered Vascular Grafts, *Cyborg Bionic Syst*, 2021, 1532103.

Saito, J., Yokoyama, U., Nakamura, T., Kanaya, T., Ueno, T., Naito, Y., Takayama, T., Kaneko, M., Miyagawa, S., Sawa, Y., and Ishikawa, Y. (2021), Scaffold-free tissue-engineered arterial grafts derived from human skeletal myoblasts, *Artif Organs*, 45(8):919–932.

Simon, M.C., and Keith, B. (2008), The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(4), 285–96.

Taggart, D.P. (2013), Current status of arterial grafts for coronary artery bypass grafting, *Ann Cardiothorac Surg*, 2(4), 427–30.

Torres, Y., Gluais, M., Da Silva, N., Rey, S., Grémare, A., Magnan, L., Kawecki, F., and L'Heureux, N. (2021), Cell-assembled extracellular matrix

(CAM) sheet production: Translation from using human to large animal cells, *J Tissue Eng*, 12, 2041731420978327.

Virani, S.S., Alonso, A., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., Carson, A.P., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Delling, F.N., Djousse, L., Elkind, M.S.V., Ferguson, J.F., Fornage, M., Khan, S.S., Kissela, B.M., Knutson, K.L., Kwan, T.W., Lackland, D.T., Lewis, T.T., Lichtman, J.H., Longenecker, C.T., Loop, M.S., Lutsey, P.L., Martin, S.S., Matsushita, K., Moran, A.E., Mussolino, M.E., Perak, A.M., Rosamond, W.D., Roth, G.A., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Schroeder, E.B., Shah, S.H., Shay, C.M., Spartano, N.L., Stokes, A., Tirschwell, D.L., VanWagner, L.B., and Tsao, C.W. (2020), American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics–2020 Update: A Report From the American Heart Association, *Circulation*, 141(9), e139–e596.

Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2009), Vascular extracellular matrix and arterial mechanics, *Physiol Rev*, 89(3), 957–89.

Walma, D.A.C., and Yamada, K.M. (2020), The extracellular matrix in development, *Development*, 147(10), dev175596.

Yokoyama, U., Tonooka, Y., Koretake, R., Akimoto, T., Gonda, Y., Saito, J., Umemura, M., Fujita, T., Sakuma, S., Arai, F., Kaneko, M., and Ishikawa, Y. (2017), Arterial graft with elastic layer structure grown from cells, *Sci Rep*, 7(1), 140.

van der Linde, D., Konings, E.E., Slager, M.A., Witsenburg, M., Helbing, W.A., Takkenberg, J.J., and Roos-Hesselink, J.W. (2011), Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis, *J Am Coll Cardiol*, 58(21), 2241–7.

【論文目録】

主論文

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

Kojima, T., Nakamura, T., Saito, J., Hidaka, Y., Akimoto, T., Inoue, H., Chick, CN., Usuki, T., Kaneko, M., Miyagi, E., Ishikawa, Y., Yokoyama, U.
Acta Biomater, 171, 209–222, 2023.

参考論文

1. Transcriptome Analysis Reveals Differential Gene Expression between the Closing Ductus Arteriosus and the Patent Ductus Arteriosus in Humans

Saito, J., **Kojima, T.**, Tanifuji, S., Kato, Y., Oka, S., Ichikawa, Y., Miyagi, E., Tachibana, T., Asou, T., Yokoyama, U.
J Cardiovasc Dev Dis, 16, 8(4), 45, 2021.

2. Perinatal outcomes of recurrent placental abruption

Kojima, T., Takami, M., Shindo, R., Saigusa, Y., Miyagi, E., Aoki, S.
J Matern Fetal Neonatal Med, 34(13), 2192–2196, 2021.