

令和元年度 修士論文

ギャップ結合媒介性収縮弛緩可能な
組織工学的人工血管の開発

三重大学大学院 工学研究科 博士前期課程
分子素材工学専攻

金澤 友希

目次

1 序論	1
1-1 心疾患と現存の治療法	
1-2 人工血管と組織工学	
1-3 血管	
1-4 血管平滑筋細胞	
1-5 弾性線維	
1-5-1 エラスチン	
1-5-2 フィブリン	
1-6 ギャップ結合	
1-7 今までの成果	
1-8 本研究の目的	
2 実験方法	13
2-1 培養足場の作製	
2-1-1 水溶性エラスチンの抽出	
2-1-2 水溶性エラスチンの分画	
2-1-3 水溶性コラーゲンの抽出	
2-1-4 水溶性エラスチンの弾性率による分画方法	
2-1-5 水溶性エラスチンの凝集温度による分画方法	
2-1-6 エラスチン、コラーゲンファイバーシートの作製	
2-1-7 多孔質エラスチンゲルの作製	

2-2 エラスチン足場の血管平滑筋細胞に対する影響調査

2-2-1 ブタ大動脈由来平滑筋細胞の単離と培養

2-2-2 血管平滑筋細胞の確認

2-2-3 エラスチン添加培養による血管平滑筋細胞の ECM 産生

2-2-4 多孔質エラスチンゲル接触による血管平滑筋細胞への影響

2-3 ブタ冠動脈と組織工学的人工血管の評価

2-3-1 ブタ冠動脈の単離

2-3-2 組織工学的人工血管の作製

2-3-3 人工血管と冠動脈の組織学的評価

2-3-4 人工血管と冠動脈の弾性率測定

2-3-5 人工血管と冠動脈の血管コンプライアンス測定

2-3-6 収縮弛緩応答試験

2-4 人工血管内のギャップ結合機能調査

2-4-1 血管平滑筋細胞におけるギャップ結合の観察

2-4-2 組織工学的人工血管におけるギャップ結合の機能試験

2-5 統計処理

3 結果27

3-1 ブタ冠動脈の特徴調査

3-1-1 ブタ冠動脈の組織学的評価

3-1-2 ブタ冠動脈の力学的評価

3-2 エラスチン足場の血管平滑筋細胞に与える影響

3-2-1 ブタ大動脈由来血管平滑筋細胞の培養

3-2-2 エラスチン添加による血管平滑筋細胞の ECM 産生

3-2-3 エラスチン AE 混合多孔質ゲルが血管平滑筋細胞に与える影響

3-3	組織工学的人工血管の評価と特徴	
3-3-1	組織工学的人工血管の組織学的評価	
3-3-2	組織工学的人工血管の力学的評価	
3-3-3	組織工学的人工血管の収縮弛緩応答調査	
3-4	ギャップ結合との関係性	
3-4-1	血管平滑筋細胞と冠動脈のギャップ結合観察	
3-4-2	ギャップ結合阻害時の組織工学的人工血管の収縮弛緩応答調査	
4	考察	42
4-1	ブタ冠動脈の構造と力学的特性	
4-2	エラスチン足場による血管平滑筋細胞の弾性線維形成	
4-3	組織工学的人工血管の力学的特性	
4-4	ギャップ結合媒介性収縮弛緩応答	
4-5	エラスチンを用いた組織工学的人工血管の今後について	
5	結論	58
6	謝辞	59
	参考文献	60

1 序論

1-1 心疾患と現存の治療法

心疾患は本邦における死因の第二位であり、年間死者数は 20 万人以上 (Fig.1-1A)、全死亡者数の約 15%¹⁾である。心疾患全体の死亡率は 1950 年から現在まで年々増加傾向にある (Fig.1-1B)。高齢化の影響を除外した年齢調整死亡率は 1970 年代以降年々低下している (Fig.1-1C)。つまり、同じ年齢であれば心疾患で死亡する確率が低下傾向にあるが、心疾患によって死亡する年齢が高齢へとシフトしていることの現れである²⁾。心疾患は心臓に起こる病気の総称で、心疾患の大部分が虚血性心疾患である。虚血性心疾患は、心筋に血液を送る冠動脈の血流が悪くなり、心筋が酸素、栄養不足に陥ることをいう。代表的な病気に狭心症や心筋梗塞があり、どちらも冠動脈の動脈硬化による血管の狭窄や、血栓による閉塞が原因である。主な治療法は、カテーテル治療や外科的バイパス術、薬物治療が主流である。

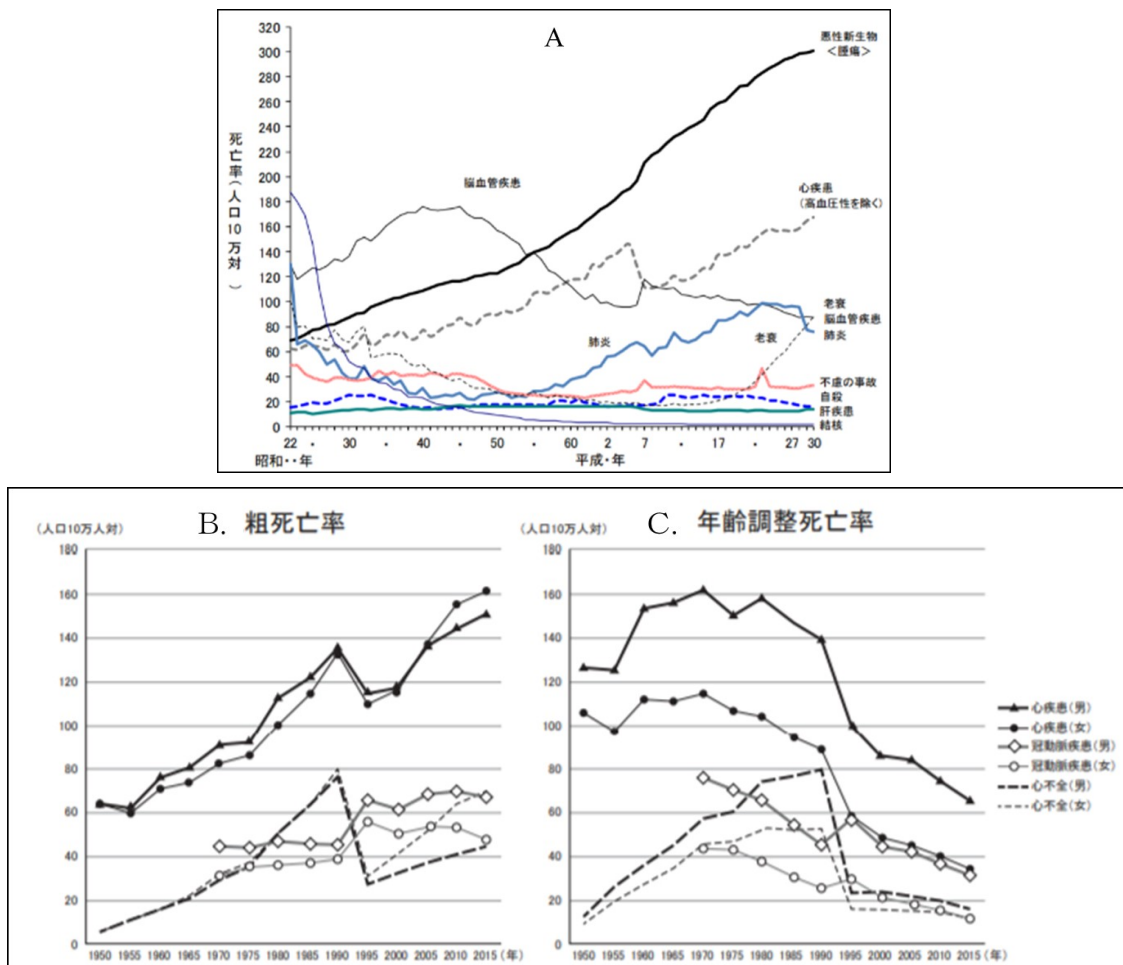


Fig.1-1 わが国における心疾患の死亡率の推移
(A) 日本の死因別死亡率の年次推移¹⁾、(B)粗死亡率²⁾、(C)年齢調整死亡率²⁾
(Aは参考文献1より、B,Cは参考文献2より引用改変)

カテーテル治療は経皮的冠動脈形成術 (Percutaneous coronary intervention: PCI) とも言い、近年の技術発達により冠動脈疾患の主流となった手術法である。特徴は、手首や足の付け根からカテーテルを血管内に挿入、狭窄部を押し広げるもので、低侵襲かつ入院日数が短い。Fig.1-2 左図のように、押し広げた部分が再狭窄しないようステントと組み合わせて治療を行うことが多いためステント治療とも言われる。デメリットは、ステントを使用しても、一度狭窄した部分は元の血管機能を保持していないため、再狭窄する可能性が高いことが挙げられる。ステント未留置の場合は3か月以内で30%~40%、ステント留置の場合は6か月で20%の再狭窄が起きると言われる。

外科的バイパス術は、Fig.1-2 右図のように上腕の橈骨動脈や、下肢の大伏在静脈、内胸動脈、胃大網動脈といった血管(グラフト)を摘出して、狭窄した冠動脈の先と大動脈をグラフトでバイパス的に結ぶ方法である。かつて心疾患治療の主流であったが、開胸手術のため患者への負担が大きく、入院が2週間程度かかるため経済的な理由から PCI が主流となった。しかし、左冠動脈主幹部や、前・後下行枝・回旋枝の全てに狭窄、閉塞がある場合はこちらが選択される。また、PCI が極めて困難と思われる場合にも選択される。5年間の開存率はPCIよりも若干高いことが調査によって判明している³⁾。

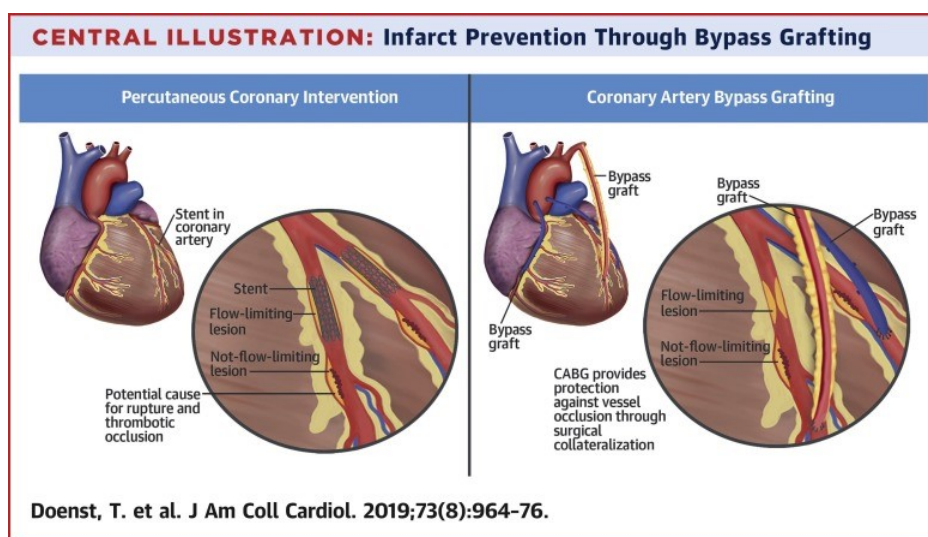


Fig.1-2 カテーテル治療 (Percutaneous coronary intervention:PCI) と外科的バイパス術 (Coronary Artery Bypass Grafting:CABG) の概略図 (参考文献 3 より引用)

どちらの治療法も有効な手段であることを認められているが、再狭窄の可能性を拭き切ることは不可能であり、経済的、患者の身体的負担を加味すると未だ完全な治療法とは言い難い。そこで、様々な解決策が提案されているが、その中の一つとして冠動脈の代替としての人工血管の開発が進められている⁴⁾。

1-2 人工血管と組織工学

生体には自身の損傷部分を復元する能力があるが、その自己再生能力では補いきれないような重篤な疾患、例えば、動脈硬化を代表とする血管疾患の場合、移植などの治療法が必要となる。しかし、移植療法ではドナー不足、免疫的拒絶など様々な理由によって、実際に治療を受けられる患者は現在でも多くない。そのため、古くから代替となる人工血管の開発が進められてきた⁵⁾。

合成材料製人工血管を動物(成犬)実験にて世界で初めて成功させたのは、1952年 Voorhees らで、人体への移植に成功したのは1954年 DeBakey である。DeBakey の開発した Dacron (合成繊維ポリエステル) 製人工血管 (Fig.1-3 左) はそれ以降主流となって開発が進められた。また、それとは別に 1970 年代初頭から ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 製の開発も進められ、現在でもこの二つの人工血管が主に使用されている (Fig.1-3 右)。



Fig.1-3 (A) Dacron 製人工血管⁷⁾、(B) ePTFE 製人工血管⁸⁾

しかし、これらの合成材料製人工血管は大口径(内径 8 mm 以上)、または中口径(内径 6 mm~8 mm)で使用されており、小口径(内径 6mm 未満)のものは未だ存在していない。その理由として、現在使用されている人工血管の機能発揮の原理が関わっている。人工血管は、Fig.1-4 のように、移植後初期に形成される血栓内膜とその上に増殖する血管内皮細胞で偽内膜化することによって長期間安定して機能する。よって、人工血管の径を小さくすると、血管内皮細胞が増殖する前に血栓膜が積層して閉塞するため、冠動脈、末梢血管のような小口径の人工血管は未だ臨床化に至っていない⁹⁾。

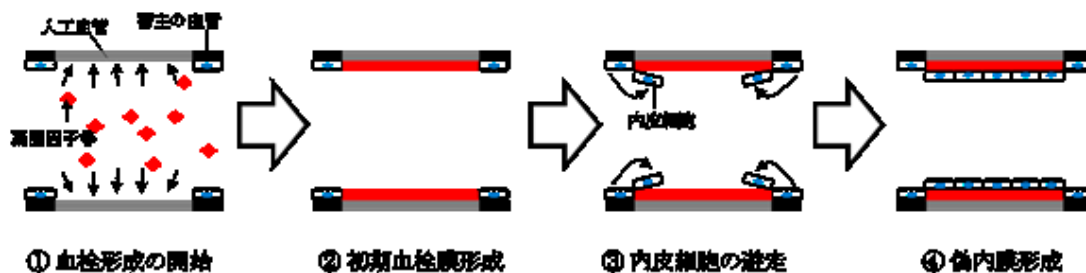


Fig.1-4 既存の人工血管における偽内膜形成過程⁹⁾

そこで、このような問題を解決する方法の一つとして再生医療が注目されている。再生医療とは、患者自身の組織から細胞を取り出し、生体外で増殖・活性化、または遺伝子導入などを行った後に再び生体に戻すものである。この医療法は、生体外で増殖させた細胞だけを直接移植する方法と、細胞が生着し、機能を発現できる足場と一緒に移植する方法の二つがあり、後者を組織工学という。組織工学は、細胞の育つ足場となる基質(マトリックス)の空間的・時間的情報伝達を適切に制御する工学的な手法を用いることで、高性能な人工臓器・組織を作製する技術である⁵⁾。

組織工学によって作製した人工血管は、足場として生体に存在する基質を用いるので抗血栓性に優れており、生体内で分解、吸収されるという利点を持つ。また、細胞によって生理的機能を発現させるため、小口径血管にも代替できると考えられている。高分子人工血管との大きな違いとして、力学的特性がある。高分子血管は強度が非常に高いが柔軟性が低く、硬く伸びにくいことが特徴である。逆に、組織工学的な人工血管は生体適合性の高い足場を使用するため、高分子よりも強度が低くなることが多い。組織工学的な人工血管を開発するには、以上の生理的機能と優れた力学的特性を加味することが非常に重要と言える。

また、想定されるリモデリングについても課題がある。最も古く著名な組織工学的な人工血管は、1998年 Niklason らによって作製されたものである¹⁰⁾。この人工血管は、生分解性ポリマーであるPGA (poly glycolic acid) にブタ大動脈由来平滑筋細胞を播種して拍動培養を行った後、内皮細胞を内腔面に播種したものであった。これをさらに、ミニブタに移植したところ 4 週間開存したと報告した (Fig.1-5)。今から 20 年ほど前に動物への移植が可能となるほどの組織工学的な人工血管が開発されたが、未だ臨床に使用されないのは、おそらく移植後のリモデリングが不完全なためである。現在リモデリングが促進され、力学的強度を保ち続ける組織工学的な人工血管の開発が求められている。

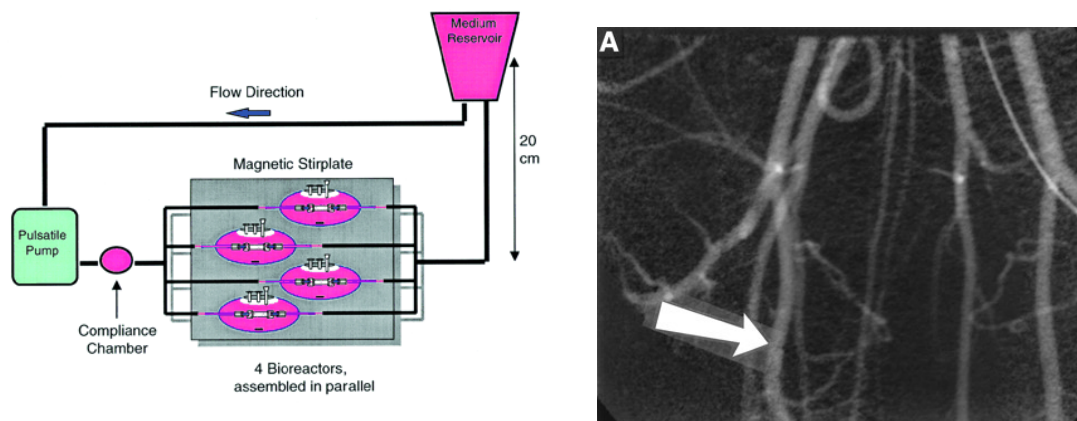


Fig.1-5 Niklason らの研究で使用された(左)拍動培養装置と(右)ミニブタへ移植した際の血管造影¹⁰⁾

1-3 血管

血管はヒトにおいて、全長約 10 万 km におよぶ、身体の様々な細胞に栄養素、酸素を送り込み、細胞から出た老廃物や二酸化炭素などを運ぶ血液が流れるパイプのような組織である。その構造は主に三層からなっており、外膜、中膜、内膜である (Fig.1-6 左)。内膜は、主に単層扁平の薄い内皮細胞から、中膜は血管平滑筋細胞とエラスチンとフィブリリンからなる弾性線維、コラーゲンを主成分とする膠原線維から、外膜は膠原線維と弾性線維 (血管の大きさによっては線維芽細胞も含まれる) からなる。内膜と中膜、中膜と外膜の間はそれぞれ内弾性板、外弾性板が存在する¹¹⁾。

血管は血管壁内の平滑筋を収縮・弛緩させることで内径を変化させ、血圧や血流速度の調整を行って、恒常性 (ホメオスタシス) を保っている。収縮や弛緩の指示は血液から得られる場合と外膜から中膜にかけて存在する神経から得られる場合がある。どちらにおいても最終的に中膜の平滑筋へと指示を出す。

この指示に組織内で時間差があると内径に微妙な差が生まれ、血流が乱れる恐れがある。即ち、血管全体を収縮・弛緩刺激に対応させる必要があるため、血管中膜に存在する平滑筋細胞は全てギャップ結合という細胞間連絡によって接合しており、組織全体を同調、連動させている^{12,13)}。また、平滑筋だけでなく、内膜の内皮細胞と中膜の平滑筋細胞がギャップ結合によって接続していて、血液からの情報を内皮細胞が受け取り、隣接する平滑筋細胞へと伝達して中膜全体へと伝達する (Fig.1-6 右)。神経伝達の場合も同様に刺激を受けた平滑筋細胞がギャップ結合を媒介し全体へと伝達する。

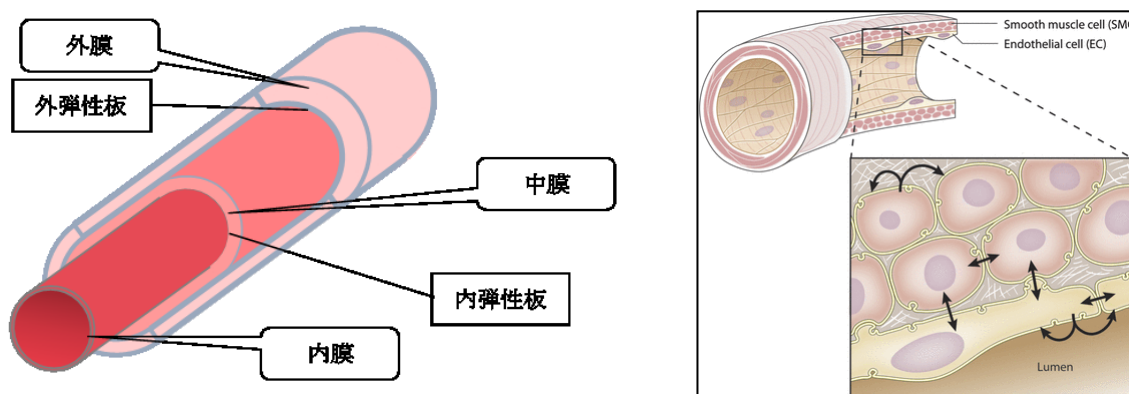


Fig.1-6 血管構造の概略と血管壁のギャップ結合¹³⁾

1-4 血管平滑筋細胞 (Vascular smooth muscle cell)

血管平滑筋細胞は血管中膜に多く存在する細胞で、後述のエラスチンを主成分とする弾性層板に沿って、かつ円周方向(血流と垂直な方向)に沿って配向している。血圧の調整、血管障害時の修復など、循環器系の恒常性維持を担うが、その一方で動脈硬化のような血管疾患の発症に関与し、研究対象として注目を浴びている¹⁴⁾。

血管平滑筋細胞の大きな特徴は形質転換を示すこと(細胞が異なる形状、性質へと分化、または脱分化を行うこと)である。表現型は一般に通常の血管に存在する収縮型と、血管新生時に存在する合成型の二つの表現型があると言われている。収縮型は分化型とも言い、細胞質内にアクチン、ミオシンで形成されたミオフィラメントを多く含み収縮能を持つ。収縮という機能に特化しているため、基本的に細胞増殖や遊走、細胞外基質の産生などは行わない。逆に合成型は脱分化型とも言い、粗面小胞体、ゴルジ体、リボソームなどの細胞小器官に富み、タンパク合成や細胞増殖が盛んである。形質転換のメカニズムというのはまだ解明されていないが、炎症、脂質、酸化ストレス、低酸素刺激などの環境の変化によって、通常の収縮型から合成型へと転換する³⁾。特に、動脈硬化時など、血管が障害を受けて血管内のコラーゲン線維が分解されコラーゲンが平滑筋に作用すると、合成型へと転換しタンパク質の過剰産生が行われる。また、逆に合成型から収縮型へは、拍動やエラスチンといった生体血管内で平滑筋細胞が存在している環境に近い刺激を与えると転換する¹⁵⁾。

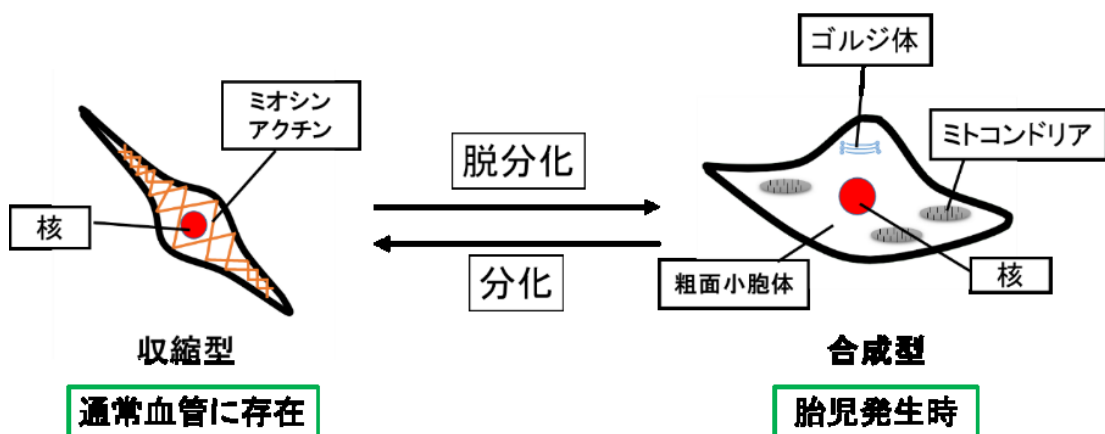


Fig.1-7 血管平滑筋細胞の表現型

1-5 弾性線維

血管に弾性を持たせる細胞外基質の機能複合体は弾性線維と呼ばれる不溶性の線維である。弾性線維の定義としては、弾性線維に特異的な染色法で染色され、その他の膠原線維などからその染色性で区別される線維のことである¹⁶⁾。弾性線維は弾性作用の芯になるタンパク質、エラスチンと線維のネットワークを作る微細線維のマイクロフィブリルからなる。

血管壁においては、平滑筋細胞が水溶性のトロポエラスチンを産生し、エキソサイトーシスによって細胞外に分泌される。その後、リシルオキシダーゼによってエラスチンの配列にあるリシン残基を中心に分子間架橋が進んでエラスチンに特有のデスマシン、イソデスマシンなどが形成されて不溶性のエラスチンとなり、マイクロフィブリルと共に弾性線維を形成していく。エラスチンとマイクロフィブリルの弾性線維形成メカニズムは明らかになっていないが、平滑筋細胞の弾性線維形成は次のようになっていると考えられている (Fig.1-8)。

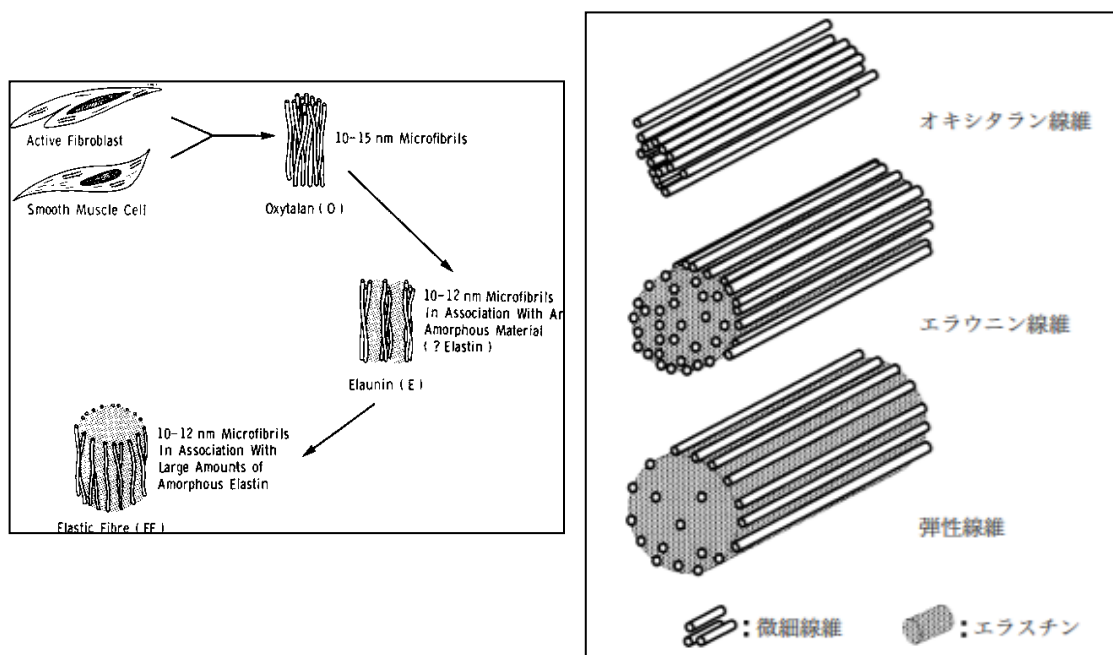


Fig.1-8 (左)活性化線維芽細胞と平滑筋細胞の弾性線維形成過程¹⁷⁾

(右)弾性系線維の種類¹⁸⁾

O: オキシタラン線維、E: エラウニン線維、EF: 弾性線維

オキシタラン線維とは、マイクロフィブリルのみからなる線維であり、弾性線維を形成する場合、糖タンパク質のフィブリンが主成分となる。少量のエラスチンの周囲と内部に多数のマイクロフィブリルが存在するものをエラウニン線維、多量のエラスチンと少数のマイクロフィブリルを持つものを弾性線維という。

1-6 ギャップ結合 (Gap junction)

隣接細胞間の情報伝達を担う、細胞間接合の一つ。隣接細胞の細胞間の間隙 (ギャップ) をトンネルのような構造 (Fig.1-10 A) で結ぶことから 1967 年 Revel と Karnovsky によって定義された²²⁾。間隙の大きさは 2~4nm 程度であり、トンネルの孔の大きさは約 1.5 nm、ATP や cAMP、IP₃、カルシウムイオンなどのセカンドメッセンジャーや、分子量 1200 以下の小分子を透過させる (Fig.1-10 B)。

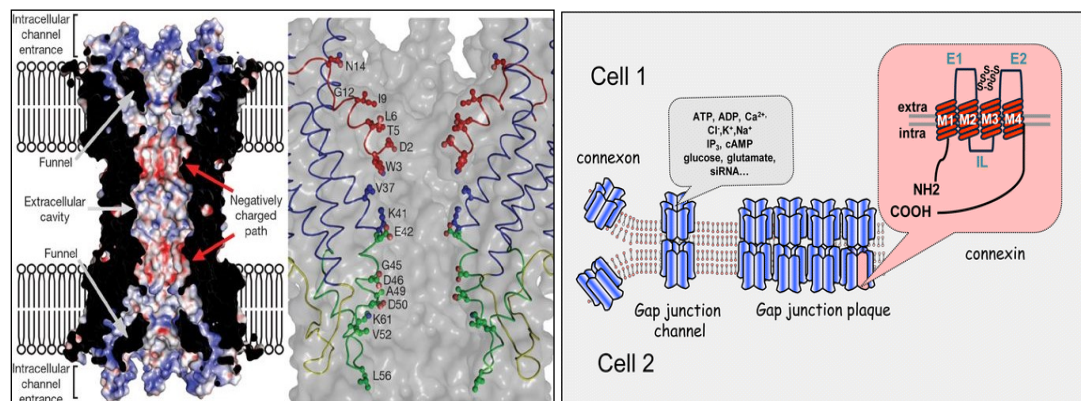


Fig.1-10 (A) ギャップ結合の構造²³⁾と(B) ギャップ結合の透過性²⁴⁾

骨格筋や血液細胞などを除いたすべての組織の細胞に存在して、組織全体の小分子濃度の細胞ごとのばらつきをなくすのに役立っている。特に、神経や心筋といった電気的な刺激の伝搬が重要となる組織では、活動電位を迅速に隣接細胞に伝えて組織全体を連動させるためにギャップ結合が必要とされる¹²⁾。前述のように血管の収縮弛緩応答にも必須である。

ギャップ結合はコネクシン (Connexin) と呼ばれるタンパク質が六量体となり、それが細胞膜の密接する部分で向い合ってきたものである。コネクシンは、4回膜貫通タンパク質であり、六量体をコネクソンとも言い、コネクソンは細胞膜上ではヘミチャネルという主に ATP の流出入を担うチャネルとして働く。コネクソンは、細胞が密接する部分で対になってギャップ結合を形成する。コネクシンが発現されてからギャップ結合に至るまでの過程は Fig.1-11 のようになっている。ギャップ結合は組織全体の情報伝達が均一となるような役割を持つため、異常なく常に働くように半減期 (この場合はコネクシンの発現からコネクソン、ヘミチャネル、ギャップ結合を経てエンドサイトーシスによって取り込まれる、またはプロテオームによって分解され、タンパク質量が半分となる時間) が非常に短いことが特徴の一つである。例えば、心筋細胞におけるコネクシン 43 の半減期は 1-2 時間と言われている²⁵⁾。

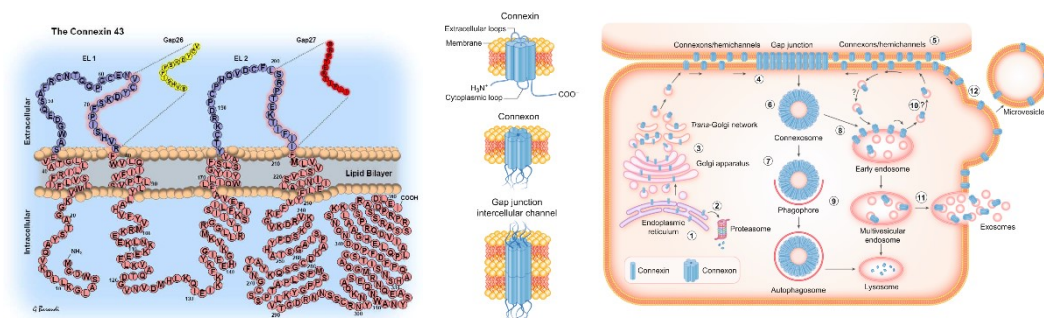


Fig.1-11 コネキシン 43 の構造²⁶⁾とコネキシンからギャップ結合の形成過程²⁷⁾

コネキシンはその分子量によって様々なアイソタイプが存在し、ヒトでは 20 種類以上あるとされる²³⁾。ヒトの体内において最も多く存在するコネキシンはコネキシン 43 (Connexin43: Cx43) である。一つの組織細胞でも様々なタイプが発現し、例えば、正常血管平滑筋細胞では、Cx43 と Cx45、Cx40 が発現することが知られている²⁸⁾。

1-7 今までの成果

本研究室では、組織工学的小口径人工血管を目指し様々な研究成果が得られている。平成 28 年度堀川はエラスチン足場を用いた人工血管を拍動培養させてその有用性を測った¹⁵⁾。静置培養を 30 日間行ったものと、拍動培養を 30 日間行ったものを比較すると、弾性率が 1.5 倍に上昇し、高濃度塩化カリウム溶液にて浸漬させると収縮応答が見られたと報告した (Fig.1-12)。

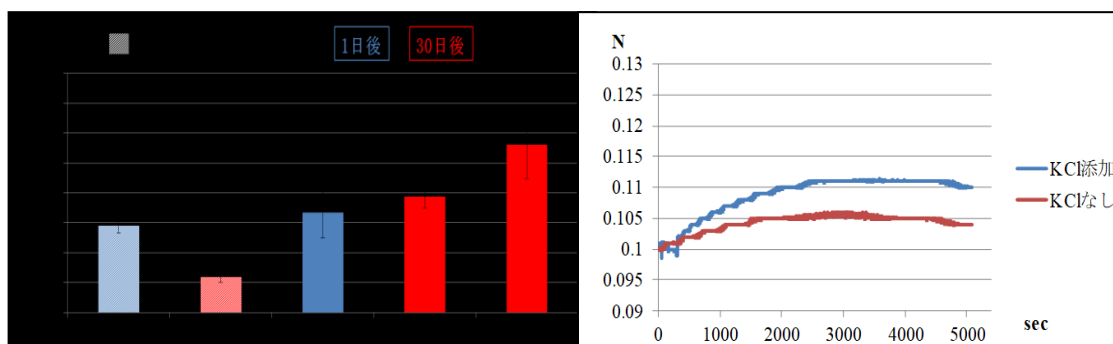


Fig.1-12 30 日間の拍動培養を行った際の弾性率結果¹⁵⁾

また、平成 29 年度石崎は生体血管に存在するギャップ結合に着目した²⁹⁾。エラスチンシート上で 30 日間培養した平滑筋細胞のカリウムによる収縮応答が、シート上に密集した平滑筋細胞間のギャップ結合によることを示唆した (Fig.1-13)。

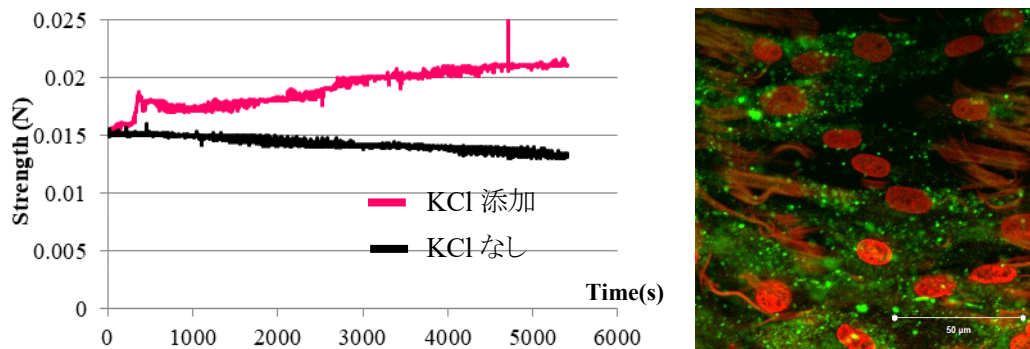


Fig.1-13 (A) エラスチンファイバーシート上平滑筋細胞の収縮応答
(B) シート上平滑筋細胞のコネキシン 43 の観察²⁹⁾

平成 30 年度三田は、エラスチンとフィブリン、コラーゲンを複合化した人工血管を作製した³⁰⁾。作製した人工血管は、弾性率、血管コンプライアンス、縫合保持強度、バースト圧において生体血管に類似、それ以上の値を示し (Fig.1-14)、実用化が期待できる人工血管の作製を報告した。

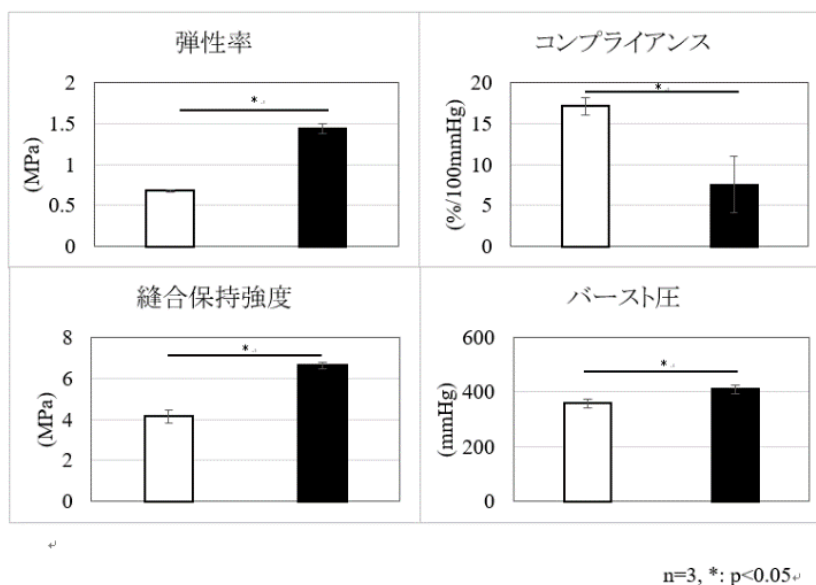


Fig.3-14 AEXゲルを用いることによる変化

Fig.1-14 エラスチンとフィブリン、コラーゲン足場を複合化した人工血管の力学的特性 (参考文献 30 より引用)

1-8 本研究の目的

今までの成果では、収縮応答のみに着目しており、もう一つの重要な血圧調節機構である弛緩応答に着手していない。ギャップ結合との関連性が示唆されたが、人工血管内で実際に機能を果たしているかを調査していない。また、生体血管に類似した人工血管という報告は示されているが、目標となる実際の冠動脈との比較を行った例はない。

そこで、本研究では作製した人工血管を生体冠動脈との比較を行うと共に、次のような条件を満たす人工血管の開発を目指した。

- ① 収縮弛緩応答が可能な人工血管であること
- ② 生体冠動脈に近い力学的特性を持つこと
- ③ ギャップ結合を介した応答が確認できること

2 実験方法

2-1 培養足場の作製

2-1-1 水溶性エラスチンの抽出

四日市畜産公社(株)から頂いたブタ大動脈から中膜層以外の脂肪、血塊、外膜を除去し、細かくミンチした後、エタノールで脱水を行い乾燥し、不溶性エラスチンを得た。得られた不溶性エラスチンを熱シュウ酸処理し、上澄み液を透析チューブに入れ、透析外液の pH が 4.5 以上、浸透圧が 0 mOsm になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を遠心し、上澄み液を凍結乾燥させて水溶性エラスチンを精製した。

2-1-2 水溶性エラスチンの分画

2-1-1 で抽出した水溶性エラスチンを 2-1-4,5 に示す方法でゲルの弾性率、凝集温度を測定して、分類分けを行った。本研究ではエラスチン A~E の 5 種類にクラスを分けた。以下の Table 2-1 にクラス分けしたエラスチンの凡その分子量と物性を記した。

Table 2-1 エラスチンの各クラスと分子量、物性

Elastin のクラス	A	B	C	D	E
弾性率(kPa)	50	25~50	5~25	測定不可 ~5	ゲル化×
凝集温度(°C)	20~22.5	22.5~25	25~30	30~35	35~
数平均分子量 ³⁾	25.2	21.4	18.7	10.3	10.1

2-1-3 コラーゲンの抽出

四日市畜産公社(株)から頂いたブタ大動脈から外膜以外の部分を除去した。5 % クエン酸溶液に 1 mg/mL となるようにペプシンを添加した酵素溶液を作製し、外膜を入れて 2 週間溶解させた。酵素溶液にて溶解した部分をろ過し、ジエチルエーテル処理を行った。エーテル層を遠心分離で除去し、1.7 M NaCl を加え、生じた沈殿を透析チューブに入れ、外液の塩濃度が 0 になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を凍結乾燥させてコラーゲンを得た。このコラーゲンはI型コラーゲンとIII型コラーゲンを含んでおり、本研究では特筆しない限り、この二つのコラーゲンを混合したものをコラーゲンとして使用した。

2-1-4 水溶性エラスチンの弾性率による分画方法

エラスチン濃度 40 %、架橋倍率 2 倍となるように水溶性エラスチン、架橋剤である Dode-DSP、milli-Q 水をアシストチューブ内で混合、完全に溶解させて遠心分離を行った。脱気したエラスチン溶液をキャピラリーチューブに注入し、栓をして密封した後、ねじ口試験管に入れて 15000 rpm, 3 min の遠心分離を行った。遠心後、キャピラリーチューブの入った試験管を脱イオン水で満たし、70°C のウォーターバスで 30 分間加熱した。その後、試験管をアルミホイルで包み、オートクレーブで 121°C、30 分間加熱した。加熱後、キャピラリーチューブからエラスチンゲルを取り出して、脱イオン水に浸した後、インキュベーター内で一晩静置し、翌日各サンプルの弾性率を測定した。

【弾性率(ヤング率)の求め方】

断面積 $A(\text{m}^2)$ の物体を一軸方向に力 $F(\text{N})$ で引き伸ばし、物体の長さが $I_0(\text{m})$ から $I(\text{m})$ へと変形したとき、その時の応力 $\sigma (\text{Pa})$ と歪み γ は次式で求められる。

$$\sigma = F/A$$

$$\gamma = (I - I_0)/I_0$$

フックの法則より、応力の大きさが限界内にあるときは、応力と歪みは比例関係にあるので、弾性率 $E(\text{Pa})$ は次式で求められる。

$$E = \sigma / \gamma$$

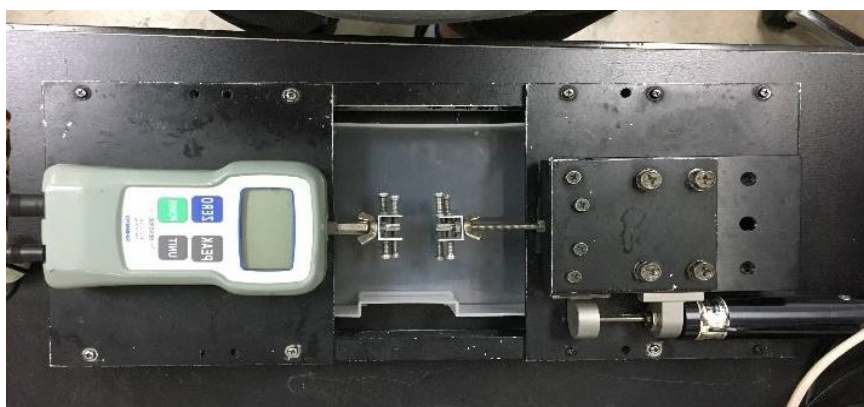


Fig.2-1 弾性率測定装置

2-1-5 水溶性エラスチンの凝集温度による分画方法

サンプルチューブに、水溶性エラスチンが濃度 1 % (v/v) になるように milli-Q を加えて調整した。溶液を試料セルに移し変えて透過光測定装置にセットした。恒温槽で溶液の温度を少しずつ上昇させ、その時の透過光強度を測定することで分画した。

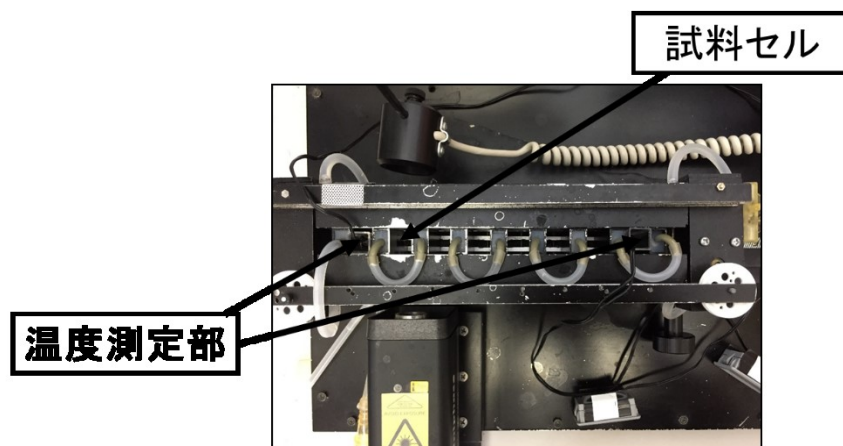


Fig.2-2 凝集温度測定装置

2-1-6 エラスチン、コラーゲンファイバーシートの作製³²⁾

血管中膜に存在するエラスチンは弾性線維として、コラーゲンは膠原線維として線維状に存在することが知られるため、この構造を模倣するためにエレクトロスピニング法を用いてファイバーを作製した。また回転電極を用いてこのファイバーを配向したシート状にしてものを足場として用いた。

分画エラスチン A または、水溶化コラーゲン 200 mg、glycidylglycerol ether (Polysciences Inc.) 20 mg を trifluoroethanol (ECM Lab.) 2 mL に溶解したものをシリンジに入れて、次の条件でファイバー状にした。※条件:印加電圧 15 kV、注入速度 1.8 mL/h、注入時間 6000 sec、空隙距離 15 cm、電極 A1、電極直径 10 cm、面積約 94 cm²、シリンジ針:23G

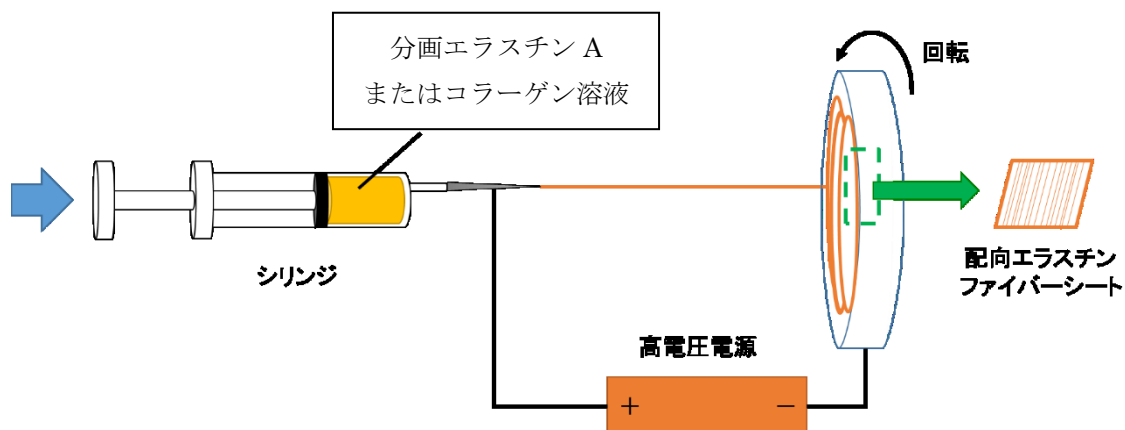


Fig.2-3 エレクトロスピニング法によるエラスチン・コラーゲンファイバーシートの作製

2-1-7 多孔質エラスチンゲルの作製

人工血管を構成する足場の一つとして、多孔性のエラスチンゲルを選択した。後述のゲル接触培養等で用いる多孔性エラスチンゲルは次のように作製した。

1.5 mL アシストチューブに、分画エラスチン A とエラスチン E を 50 % ずつ混合した水溶性エラスチン、Dode-DSP、反応加速剤である 80 mM Na_2CO_3 (Wako)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) を全て混合して遠心分離を行い、37 °C で 2 時間インキュベートさせてゲル化を行った。作成したエラスチンゲルの多孔性は、共焦点レーザー顕微鏡によって確認を行った。以降の実験で用いたエラスチンゲルは全て確認作業によって多孔性が確認されたものを使用した。

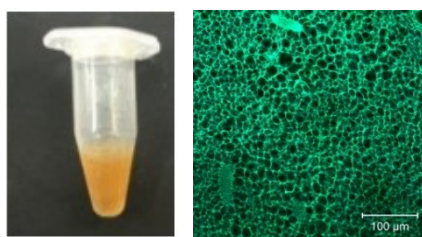


Fig.2-4 多孔質エラスチンゲルと共焦点レーザー顕微鏡による多孔性確認

2-2 エラスチン足場の血管平滑筋細胞に対する影響調査

2-2-1 ブタ大動脈由来平滑筋細胞の単離と初代培養

四日市畜産公社(株)から頂いたブタ大動脈から細胞単離を移植片培養法にて行った。まず、頂いた大動脈から脂肪や、血塊、外膜を取り除いて、2 mm ~ 3 mm 程度の大きさの組織片に切り分けた。切り分けた組織片を細胞培養シャーレに静置して、37°C/5%インキュベーター(池本理化工業)内で 2 時間静置した。



Fig.2-5 外膜、脂肪などを除去したブタ大動脈

組織片がシャーレ表面に付着したのを確認後、組織片が剥がれないように慎重に 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) 含有 DMEM を添加し、培養を開始した。数日後、組織片から細胞が十分に遊出したことが確認出来たら (passage 0 と定義)、組織片を除去した後、トリプシン処理にて細胞を剥離させ、得られた細胞の継代培養を行なった。3 日に 1 度培地交換を行ない、コンフルエント (80 % ~ 100 %) まで細胞が増殖した時点で継代を行った。以降の実験には passage 3 ~ 6 の細胞を用いた。

2-2-2 血管平滑筋細胞の確認

前項で得られた細胞の特定を行うために、平滑筋細胞に特異的な smooth muscle α -actin (α -SMA)を免疫蛍光染色によって確認した。

2-2-1 で得られた細胞を 12 well プレート(住友ベークライト)に、滅菌済みの丸型カバーガラス(松浪硝子工業)上に播種し培養した。その後、培地を抜き取り 2%パラホルムアルデヒド(東京化成工業)/ 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) / PBS を 15 分浸して固定し、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。カバーガラスを取り出し、細胞のない面の水分をふき取り側面にワセリン(健栄製薬株式会社)を薄く塗った。1% goat serum (Life Technologies) / PBS (以下ブロッキング液と記載)を加え 15 分間、室温でブロッキングした。その後、一次抗体をブロッキング液で希釈し、冷暗所で一晩静置した。静置後 PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。二次抗体を PBS で希釈し、2 時間、室温で抗体処理を行った。処理後、PBS で 5 分間の洗浄を行い、2 回目と 3 回目は 20 ng/mL DAPI(同仁化学研究所)/ PBS で洗浄と核染色を行った。その後、スライドガラス(アズワン)に、蛍光試薬封入剤である SlowFade®Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher)で封入しトップコートによってカバーガラス淵をコート後、共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, LSM710)を用いて蛍光観察を行った。用いた抗体と各希釈倍率は次の Table 2-2 に示した。

Table 2-2 大動脈由来細胞の確認に用いた抗体

抗体名	希釈倍率
Anti-alpha smooth muscle Actin mouse monoclonal antibody(Novusbio)	1:200
Goat anti-mouse IgG(H+L),FITC conjugate(Merck Millipore)	1:200

2-2-3 エラスチン添加培養による血管平滑筋細胞の ECM 産生

材料として用いる水溶化エラスチンによる血管平滑筋細胞の ECM 産生への影響をタンパク質発現によって調査した。調査方法は、水溶化エラスチン添加条件で血管平滑筋細胞を培養し、ECM のタンパク質発現を免疫蛍光染色によって観察した。観察した ECM には弾性線維形成初期に産生される Fibrillin を選択した。

分画エラスチン A と E を DMEM 10 mL に対して 11.1 mg 溶解し、10 % FBS/DMEM の完全培地にした際エラスチン濃度が 1.0 mg/mL となるよう調整した。継代培養によって懸濁液とした血管平滑筋細胞を 12 well プレートに予め設置した滅菌済みの丸型カバーガラス上に播種し、エラスチン添加培地にて 2 週間培養を行った。2 週間培養後、培地を慎重に取り除き PBS にて洗浄後、2 %パラホルムアルデヒド/ PBS 溶液にて 15 分間固定を行った。PBS にて 5 分間洗浄を 3 回行い、カバーガラスを取り出し、細胞のない面の水分をふき取りガラスの淵にワセリンを薄く塗った。ブロッキング液を 200 μ L 加え 15 分間、室温でブロッキングした。ブロッキング液を除去後、一次抗体/ブロッキング液を 100 μ L ずつ全体に滴下し、暗冷所(4°C 冷蔵庫)にて一晩静置した。PBS にて 5 分間洗浄を 3 回行った。その後、カバーガラスを取り出して異なる 12 well プレートに移し替えて、二次抗体/ PBS を 200 μ L ずつ全面に滴下し、室温にて 2 時間静置した。抗体処理後、PBS で 5 分間の洗浄を行い、2 回目と 3 回目は 20 ng/mL DAPI/ PBS で洗浄と核染色を行った。その後、スライドガラスに、SlowFade®Diamond Antifade Mountant で封入した後、蛍光観察を行った。用いた抗体と各希釈倍率は以下のとおりである。

Table 2-3 エラスチン添加培養に用いた抗体

抗体名	希釈倍率
Anti-Fibrillin 1 mouse monoclonal antibody (Novusbio)	1:200
Goat anti-mouse IgG(H+L),FITC conjugate (Merck Millipore)	1:200

2-2-4 多孔質エラスチンゲル接触による血管平滑筋細胞への影響

2-1-6 項で記載した多孔質エラスチンゲルを接触させた場合に血管平滑筋細胞にどのような影響があるかを、Fibrillin の発現によって観察した。

継代培養によって血管平滑筋細胞を懸濁液としたものを、12 well プレートに予め設置した Φ18mm カバーガラス上に 5×10^4 cells/cm² となるように播種した。播種後、37°C/CO₂ 下で 1 日インキュベートし細胞をガラス面に接着させた。続いて、2-1-6 項と同様にエラスチンゲルを作製し、12 well プレートに予め設置した Φ18 mm カバーガラス上に 20 μL ずつ塗布した。そこに細胞を播種して1日静置したカバーガラスを細胞面とゲルが接触するように、ゲルの上に置いてゲル化するまで約 40 分静置した (Fig.2-6)。

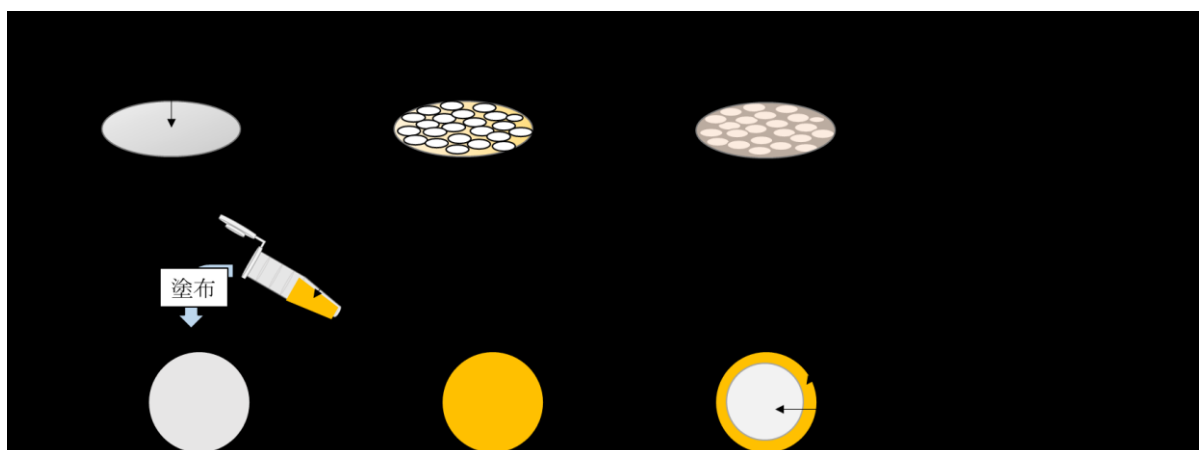


Fig.2-6 血管平滑筋細胞の多孔質エラスチンゲル接触の実験手順

ゲル化後、DMEM を導入して 37°C/CO₂ 下で 1 日インキュベートした。翌日、DMEM を除いて 10% FBS / DMEM を導入して 2 週間培養を行った。2 週間後、カバーガラスを取り外して PBS にて洗浄を行い、2 %パラホルムアルデヒド / 0.2 %Triton X-100/PBS で固定後 2-2-3 と同様の手順で染色作業を行った。用いた抗体は 2-2-3 と同様である。

2-3 ブタ冠動脈と組織工学的人工血管の評価

2-3-1 ブタ冠動脈の単離

四日市畜産公社(株)から頂いたブタの心肺(心臓、気管支、両肺、大動脈弓)から心臓だけを切断し、心臓から冠動脈を切除した(Fig.2-7)。取り出した冠動脈は冷却した PBS に浸し、後述の収縮弛緩試験にて用いる場合は 48 時間以内に使用した。組織学的評価を行ったものは 10 % ホルマリン/PBS にて浸漬させて、2 日間固定を行った。力学的評価を行ったものは、PBS にて十分洗浄して PBS にて保存した。単離した冠動脈の種類と用いた実験の対応を Table 2-3 に示す。

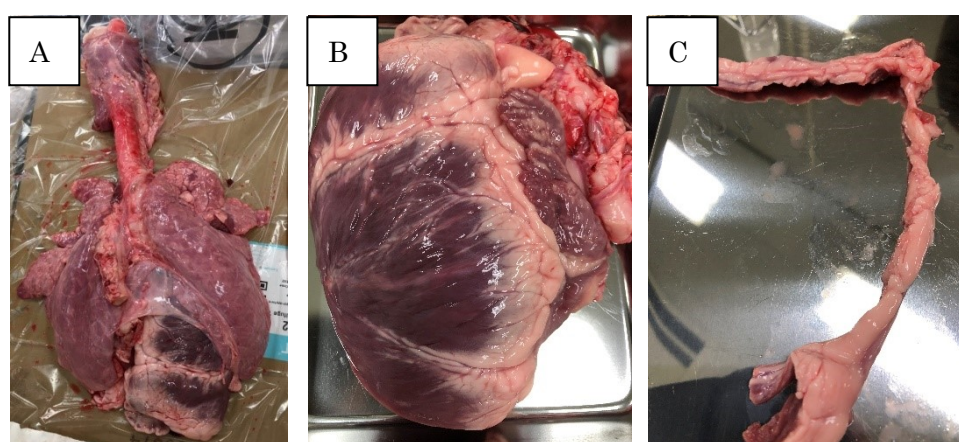


Fig.2-7 ブタ冠動脈の摘出。

- (A)ブタ心肺:気管支、肺、心臓、大動脈弓が一体となっている
(B) 摘出したブタ心臓、(C)ブタ左冠動脈

Table 2-3 摘出した冠動脈の種類と使用した実験

冠動脈の種類	実験
左冠動脈主幹部 (Left main trunk: LMT)	H&E 染色、収縮弛緩応答試験
左前下行枝 (Left anterior descending branch: LAD)	組織染色、力学的試験
回旋枝 (Circumflex artery: Cx)	組織染色、力学的試験
右冠動脈 (Right coronary artery: RCA)	収縮弛緩応答試験

2-3-2 組織工学的人工血管の作製

継代培養によって懸濁液とした血管平滑筋細胞を 80×10^4 cells/sheet となるようにエラスチンファイバーシート $2.5 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$ に播種した。エラスチンシートのみを用いる場合はこれを計 8 枚、コラーゲンシートを含める場合は計 7 枚用意して $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 下で 2 時間インキュベートした。静置後、一枚のシートを外径 4 mm のシリコンチューブに 3 回巻き付けた。その後、2-1-6 と同様の手順で作製した多孔質エラスチンゲルをシートに $20 \mu\text{L}$ ずつ塗布してシートを巻き付けておいたチューブに重ねて巻き付けた。これを 7 度繰り返して人工血管を作製し、一週間培養後、評価を行った。コラーゲンシートを用いる場合は、最外側に配置した (Fig.2-8)。

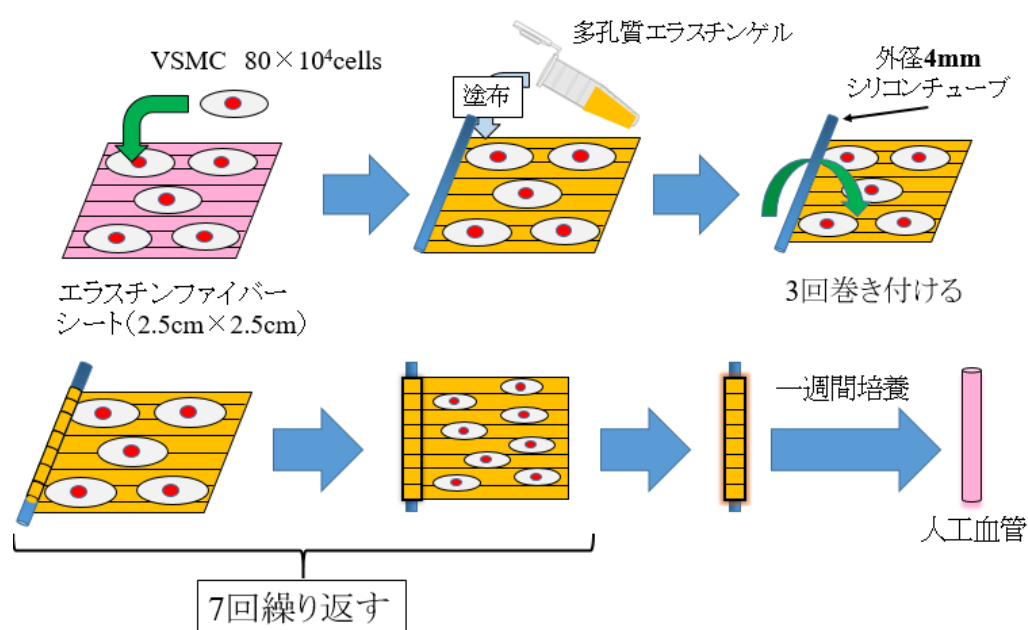


Fig.2-8 組織工学的人工血管の作製方法

2-3-3 人工血管と冠動脈の組織学的評価

作製した人工血管と冠動脈の構造的な評価を行うために、H&E 染色、EVG 染色、免疫蛍光染色を行った。固定を行ったブタ冠動脈と人工血管をパラフィン包埋、または OCT コンパウンド(サクラファインテックジャパン)を用いた凍結包埋を行って、滑走式マイクロームによって切片化した。切片化したサンプルを脱パラフィンさせて、各種染色を行った。簡単に説明すると、H&E 染色はヘマトキシリン 10 分、エオジン Y 5 分の染色時間で行い、EVG 染色はレゾルシンフクシン 5 分、鉄ヘマトキシリン 10 分、ワンギーソン液による染色は 5 分間行った。免疫蛍光染色は、脱パラフィンの後、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液に浸けてマイクロウェーブ法によって賦活化処理を行った。賦活化後ブロッキングを 15 分間行った。一次抗体/ブロッキング液を添加して、冷暗所にて一晚静置した。PBS による洗浄後、二次抗体/PBS を 200 μ L ずつ全面に滴下し、室温にて 2 時間静置した。抗体処理後、PBS で 5 分間の洗浄を行い、2 回目と 3 回目は 20 ng/mL DAPI/ PBS で洗浄と核染色を行った。その後、スライドガラスに、SlowFade®Diamond Antifade Mountant で封入した後、蛍光観察を行った。用いた試薬は Table 2-4 に示した。

Table 2-4 人工血管と冠動脈の評価に用いた試薬

試薬・抗体名	備考・希釈倍率
Anti-Fibrillin 1 mouse monoclonal antibody (Novusbio)	1:200
Goat anti-mouse IgG(H+L),FITC conjugate (Merck Millipore)	1:200
ヘマトキシリン	武藤化学
エオジン Y	武藤化学
塩化第二鉄	Wako
ヘマトキシリンー水和物	武藤化学
レゾルシンフクシン液	武藤化学
ワンギーソン液	武藤化学

2-3-4 人工血管と冠動脈の弾性率測定

作製した人工血管と冠動脈の力学的評価を弾性率測定にて行った。PBS 中に保存した冠動脈を、適当な幅に切断してねじ口試験管に移し milli-Q 水を導入した。試験管をアルミホイルで包んでオートクレーブ(121℃、2気圧、20分)を行い、コラーゲン成分を可溶化させた後、milli-Q 水でよく洗浄した。洗浄したサンプルを切ってシート状にし、線維方向と血流方向の幅と、厚さを測定した。これをシート用弾性率測定装置に取り付けて、37℃ 恒温槽中で 500 μm/s の速さで引張り、応力の変化を記録した。計測値から応力と歪みを計算して、応力-歪み曲線から弾性率を測定した。また、自然長に対する破断時の伸び(ΔL)から伸長率を算出した(以下の式参照)。

$$\frac{F(\text{N})/A(\text{m}^2)}{\Delta L(\text{m})/L_0(\text{m})} = \text{弾性率(Pa)} \quad \frac{\Delta L(\text{m})}{L_0(\text{m})} \times 100 = \text{伸長率(\%)}$$

2-3-2 で作製した人工血管の弾性率測定は、リング状の人工血管を切り開いてシート状にして冠動脈と同様に測定を行った。

2-3-5 人工血管と冠動脈の血管コンプライアンス測定

ブタ冠動脈と人工血管の生理的血压時における伸展しやすさを評価するために血管コンプライアンス測定を Fig.2-9 に示す装置で測定を行った。シリンジポンプを通し、圧力検知器(Keyence 社)で任意の圧力に調製した PBS をサンプルに向けて流し込んだ。圧力は、生理条件下における平均的な拡張期、収縮期血压の 80 mmHg, 120 mmHg に設定し、各圧力をかけた時のサンプルをカメラで撮影して ImageJ を用いて外径(d₈₀,d₁₂₀)を測定した。外径の値を用いて以下の式から血管コンプライアンスを算出した(ΔP = 120 mmHg - 80 mmHg = 40 mmHg)。

$$\frac{\frac{d_{120}(\text{m}) - d_{80}(\text{m})}{d_{80}(\text{m})}}{\Delta P(\text{mmHg})} \times 10^4 = \text{コンプライアンス(\%/100mmHg)}$$

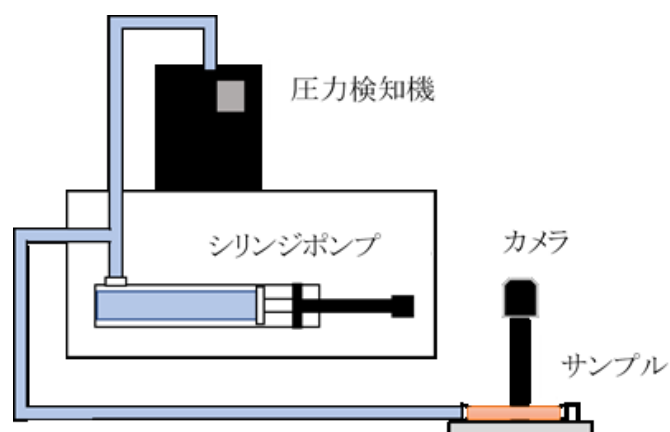
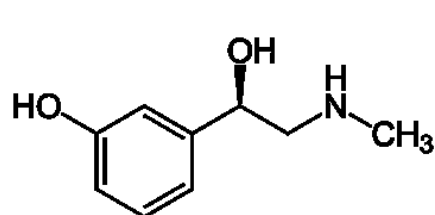


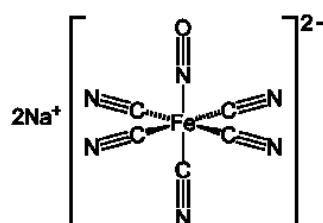
Fig.2-9 血管コンプライアンス試験器

2-3-6 収縮弛緩応答試験

ブタ冠動脈と人工血管の血管としての機能を調査するために、収縮弛緩を Fig.2-10 に示す装置と手順で測定を行った。緩衝液の組成は Table 2-8 に示すように参考文献 33、34 を参照して作製した。脱分極、過分極の影響を調査するために、高濃度塩化カリウム溶液 (118 mM) と低濃度塩化カリウム溶液 (5.9 mM) を収縮・弛緩剤として用いた。また、臨床で用いられ、内皮細胞非依存性収縮・弛緩を示すフェニレフリンとニトロプルシドナトリウムを収縮・弛緩剤に選択した。



<フェニレフリン>



<ニトロプルシドナトリウム>

		LP	HP
	分子量	mM (mmol/L)	mM (mmol/L)
NaCl	58.44	123	11
KCl	74.55	4.7	116.8
CaCl ₂	110.98	1.25	1.25
MgCl ₂	203.3	1.2	1.2
KH ₂ PO ₄	136.09	1.2	1.2
NaHCO ₃	84.01	15.5	15.5
D-glucose	180.16	11.5	11.5

Table 2-5 収縮弛緩試験で使用した緩衝液の組成^{33,34)}

(LP: Low potassium ion buffer、HP: High potassium ion buffer)

ブタ冠動脈は摘出後 48 時間以内に 5 mm 幅に切断し、ステージヒーターによって 37°C に加温した低濃度カリウムイオン緩衝液 (Low potassium ion buffer :LP) に浸漬させた。その時の血管の断面をカメラによって 20 分間撮影した。その後、高濃度カリウムイオン緩衝液 High potassium ion buffer :HP) に溶液を入れ替えて浸漬し 20 分撮影した。同様にニトロプルシドナトリウム/HP (SNP)、HP、LP と順に 20 分ずつ撮影を行った。これとは別に、LP に浸漬したサンプルを 20 分間撮影に続いて、フェニレフリン塩酸塩 /LP (PE) に置換し同様に撮影を行った。その後、再び LP にて断面変化を 20 分間撮影した。撮影した動画を 1 分ずつの画像にして、それぞれの時点の内腔面断面積を ImageJ によって測定した。撮影直後 0 分の内腔面断面積を 100 % としたときの断面積変化をそれぞれ算出し、収縮弛緩の様子を数値化した。

•KClとSNPの影響調査

- ① 5.9K-PSS
- ② 118K-PSS
- ③ 1 μ M SNP/118K-PSS
- ④ 118K-PSS
- ⑤ 5.9K-PSS

•PEの影響調査

- ① 5.9K-PSS
- ②' 10 μ M PE/5.9K-PSS
- ③' 5.9K-PSS

↳ 撮影後、内径の変化率を算出

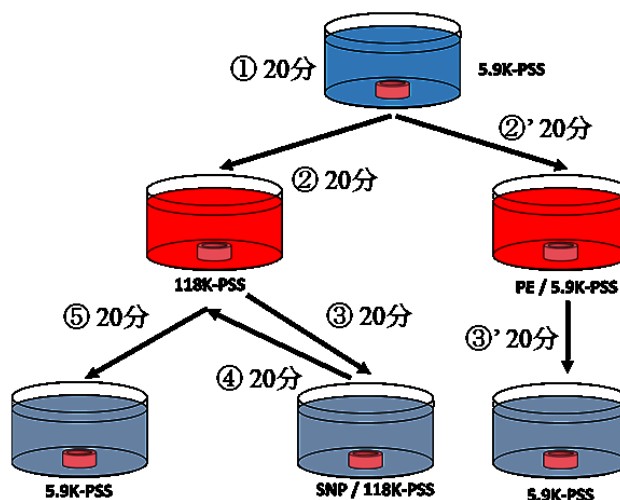


Fig.2-10 収縮弛緩応答試験の手順概略図

2-4 人工血管内のギャップ結合機能調査

2-4-1 血管平滑筋細胞におけるギャップ結合の観察

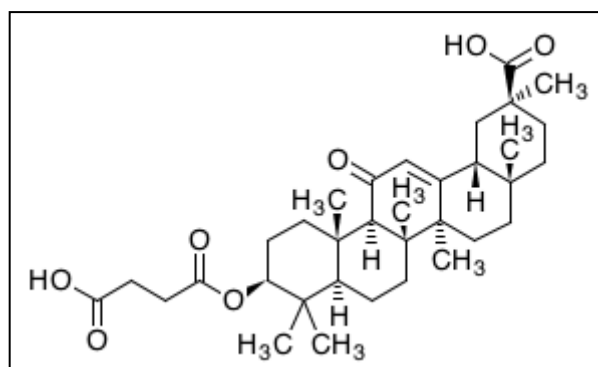
血管平滑筋細胞においてギャップ結合がどのように存在しているかを免疫蛍光染色によって観察した。

継代培養によって懸濁液とした血管平滑筋細胞を 12 well プレートに予め設置した滅菌済みの丸型カバーガラス上に播種し、コンフルエントとなるまで培養を行った。培養後、培地を慎重に取り除き PBS にて洗浄後、2 %パラホルムアルデヒド /PBS 溶液にて 15 分間固定を行った。PBS による洗浄を 5 分 3 回行った後、0.2 % TritonX-100/PBS を添加して 15 分間膜透過処理を行った。PBS にて 5 分間洗浄を 3 回行い、カバーガラスを取り出し、細胞のない面の水分をふき取りガラスの淵にワセリンを薄く塗った。その後、ブロッキング液を用いて 15 分間、室温でブロッキングした。ブロッキング液を除去後、一次抗体 /PBS を 100 μ L ずつ全体に滴下し、暗冷所(4 $^{\circ}$ C 冷蔵庫)にて一晩静置した。PBS にて 5 分間洗浄を 3 回行った。その後、カバーガラスを取り出して異なる 12 well プレートに移し替えて、二次抗体 /PBS を 200 μ L ずつ全面に滴下し、室温にて 2 時間静置した。抗体処理後、PBS で 5 分間の洗浄を行い、2 回目と 3 回目は 20 ng/mL DAPI/ PBS で洗浄と核染色を行った。その後、0.5% CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye (Biotium) /PBS にて 10 分間処理して細胞膜染色を行った。PBS 洗浄を 3 回行って、PBS によって封入を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

2-4-2 組織工学的人工血管におけるギャップ結合の機能試験

人工血管におけるギャップ結合の機能を調査するため、参考文献 35 を参考に
してギャップ結合の阻害剤を用いて収縮弛緩試験を行った。

2-3-2 のように作製し一週間培養した人工血管を幅 5 mm 程度に切断し、100
 μM カルベノキソロン(Cayman Chemicals)/PBS 溶液に 20 分間室温で静置した。
その後、2-3-6 で記載した手順と同様に収縮弛緩応答試験を行った。



<カルベノキソロン>

2-5 統計処理

統計的な有意性は解析ソフト StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。解析には
Tukey-Kramer 法を用いた。p 値<0.05 を有意とした。有意な差が認められた結果
のグラフには、*:p<0.05 と表記した。

3 結果

3-1 ブタ冠動脈の特徴調査

3-1-1 ブタ冠動脈の組織学的評価

本研究で目標とする血管の構造を決定するため、ブタ冠動脈を病理染色によって観察した。

まず H&E 染色によって冠動脈切片を観察し層の数、細胞密度を測定した (Fig.3-1-1, Table 3-1)。層の数、密度の測定には冠動脈を 3 つ染色して無作為に 10 箇所測定した。層の数は平滑筋層、または弾性層板に挟まれた層を一つの層として数えた。

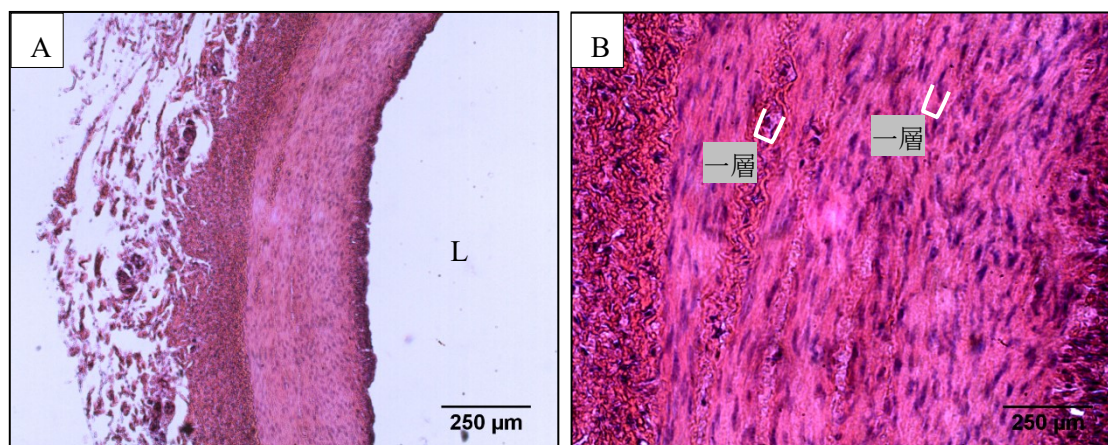


Fig.3-1-1 ブタ冠動脈の H&E 染色 (青紫:細胞核、ピンク:その他組織、L:内腔面)
(A) 全体、(B) 拡大図

サンプル	層の数(外膜は除く)	細胞密度($\times 10^4$ cells/mm ²)
ブタ冠動脈	33.7 ± 4.2	5.6 ± 0.8

Table 3-1 H&E 染色によるブタ冠動脈の特徴 (n=10)

H&E 染色の結果、ブタ冠動脈の層数は約 30 層であり、細胞密度は約 5×10^4 cells/mm² であることが分かった。この結果より、今後作製する人工血管の層の数を 25~30 層、細胞密度は 5×10^4 cells/mm² となるように実験を行うことにした。

続いて、弾性線維と膠原線維を染め分けできる EVG 染色によってブタ冠動脈内の大まかなタンパク質の構成を調査した (Fig.3-1-2)。

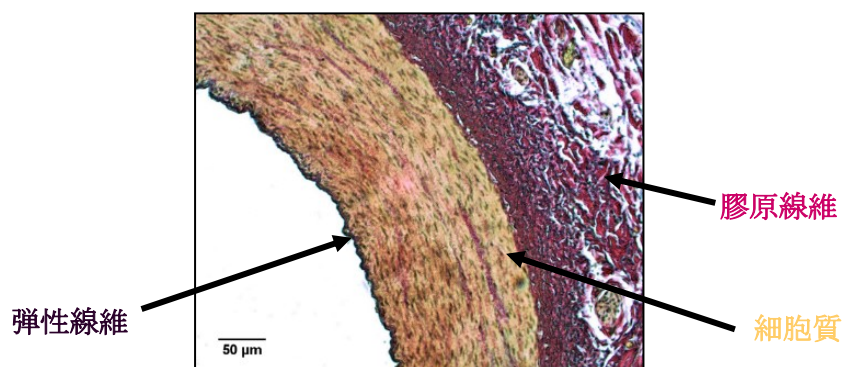


Fig.3-1-2 ブタ冠動脈の EVG 染色結果

(黒～黒紫:弾性線維、赤紫～赤:膠原線維、薄黒:細胞核、黄:細胞質)

EVG 染色の結果、生体の冠動脈には弾性線維と膠原線維が存在していることが確認された。特に、内膜、中膜には弾性線維が、外膜には膠原線維が多く分布していた。また、中膜層に存在する細胞が円周方向に配向し、密になっていることも確認できた。このことから、目標とする人工血管は弾性線維を構成するタンパク質のエラスチンを内側に、膠原線維の主成分であるコラーゲンを外側にしたようなものが望ましいと判断した。また、細胞は円周方向に配向してできるだけ密になるような構造を目標とした。

最後に、ブタ冠動脈に存在する細胞を特定するために、平滑筋細胞特異的マーカーである α -SMA の免疫蛍光染色を行い評価した。

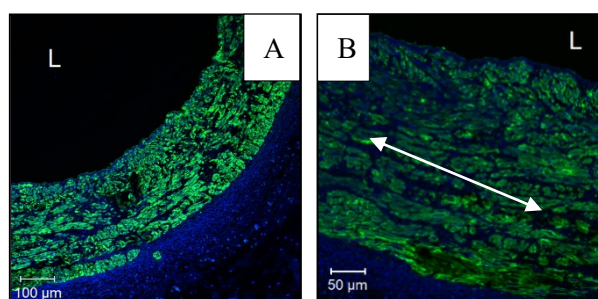


Fig.3-1-3 ブタ冠動脈の免疫蛍光染色の結果

(A)全体像、(B)拡大図 (青:細胞核、緑: α -SMA、両矢印:円周方向)

α -SMA の免疫蛍光染色の結果、中膜部分に存在する細胞は平滑筋細胞であることがわかった。また、内膜、外膜部分に存在する細胞は平滑筋細胞ではなく他種の細胞であることが示唆された。加えて、最内腔側にある内弾性板の直近まで平滑筋細胞が迫っており、中膜に存在する平滑筋細胞のほとんどが、血流方向に対して円周に配向していることが確認できた。

3-1-2 冠動脈の力学的評価

目標の冠動脈の力学的特性を知るために弾性率と血管コンプライアンスを測定した。

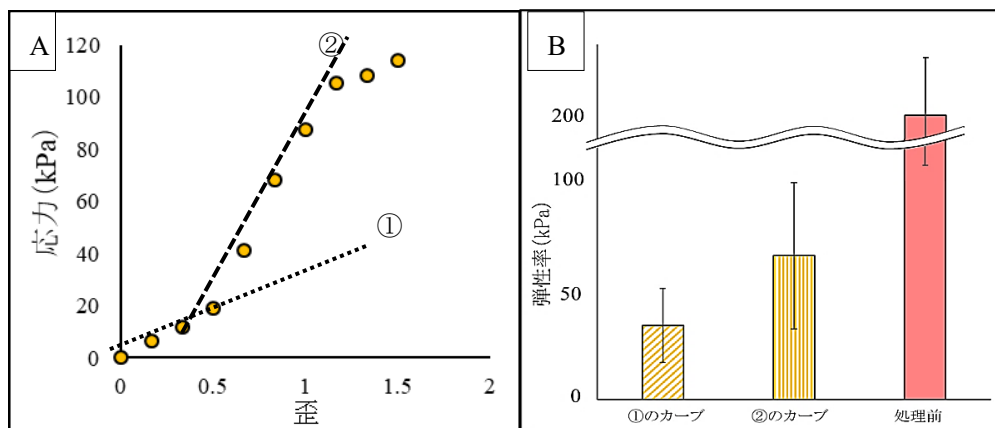


Fig.3-1-4 ブタ冠動脈の弾性率結果

(A) オートクレーブ処理後の冠動脈の応力歪曲線、(B) 弾性率結果 (n=4)

オートクレーブ処理前のブタ冠動脈は破断せず測定限界に達したため参考値であるが、 192.6 ± 81.4 kPaであった。オートクレーブによって組織内のコラーゲンを溶出させた群では、Fig.3-1-4 (A) に示す「Jカーブ」が確認された。正確な弾性率を算出するため、Jカーブの一つ目のカーブ(①)と、二つ目のカーブ(②)の値をそれぞれ算出した(Fig.3-1-4 (B))。①は 33.7 ± 16.9 kPa、②が 65.5 ± 33.3 kPaであった。このことから、エラスチンのみで作製した人工血管の弾性率は約 60 kPa が最低限必要であることが分かった。

血管コンプライアンスは、 13.1 ± 6.9 %/100mmHgであった(Fig.3-1-5)。参考文献 35 によると、既存の高分子血管の代表である ePTFE 製血管は 1.6 ± 0.2 %/100mmHg であることから、高分子製人工血管よりも血管コンプライアンスが遥かに優れていることが分かった。目標とする人工血管の血管コンプライアンスはこれと同程度になるようにする必要があることが分かった。

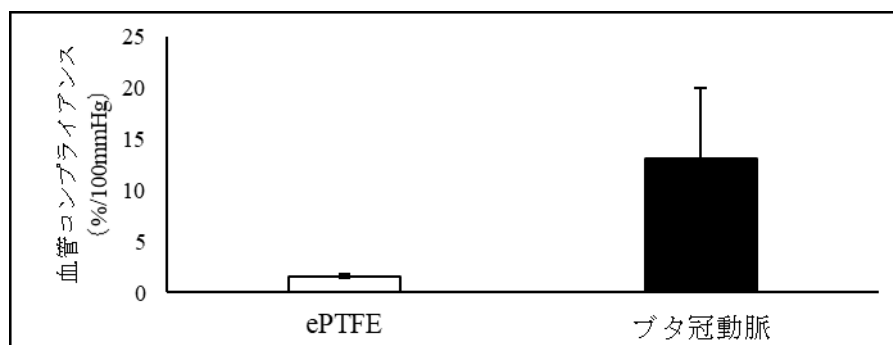


Fig.3-1-5 ブタ冠動脈の血管コンプライアンスの結果
ブタ冠動脈:n=6、ePTFE:参考文献 36 より引用改変

以上のことをまとめると、目標の人工血管の作製条件は次のようになる。

- ① 層の数:25~30 層
- ② 細胞密度: 5×10^4 cells/mm²
- ③ 足場に用いる細胞、タンパク質:血管平滑筋細胞、エラスチン、コラーゲン
- ④ 目標最低弾性率:60 kPa
- ⑤ 血管コンプライアンス:10~15 %/100mmHg

3-2 エラスチン足場の血管平滑筋細胞に与える影響

3-2-1 ブタ大動脈由来血管平滑筋細胞の培養

ブタ大動脈から単離した細胞の細胞種を特定するために、平滑筋細胞の特異的マーカーである α -SMA の染色を行った (Fig3-2-1)。

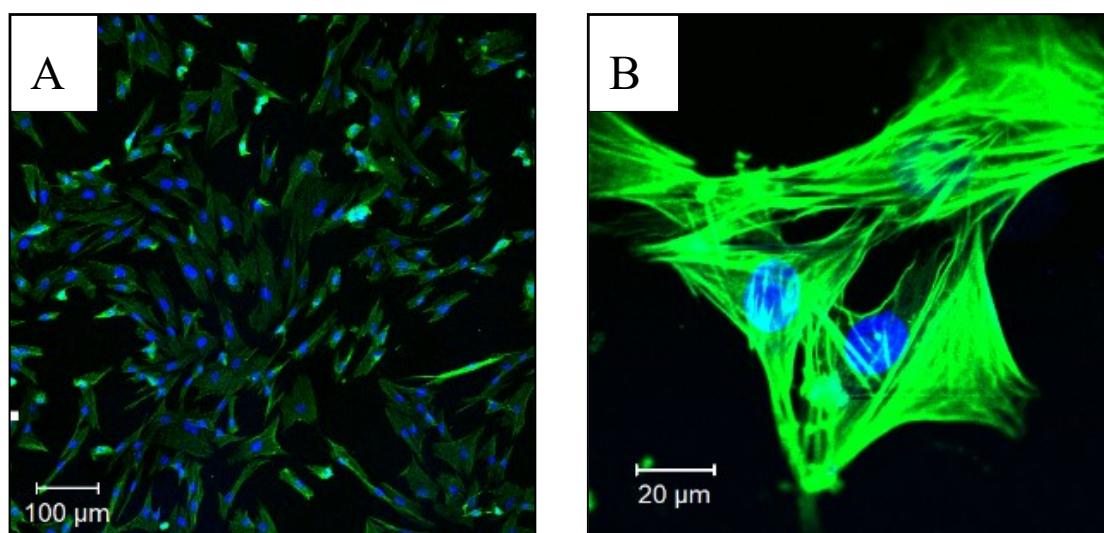


Fig.3-2-1 (A)ブタ大動脈から単離した細胞の α -SMA の免疫蛍光染色の結果
(B)拡大図 (青:細胞核、緑: α -SMA)

染色結果より、平滑筋細胞に特有の α -SMA のアクチンフィラメントがはっきりと確認できたことから、大動脈中膜から単離した細胞はブタ冠動脈にも存在した血管平滑筋細胞と断定して以降の実験に使用することにした。

3-2-2 エラスチン添加による血管平滑筋細胞の ECM 産生

エラスチン足場を用いた人工血管を作製するにあたり、エラスチンによる血管平滑筋細胞への影響を、分画エラスチン添加培養時の ECM 産生の違いによって評価した。ECM の代表として、弾性線維形成の初期に発現が認められる Fibrillin の免疫蛍光染色の結果を次に示す (Fig.3-2-2)。添加に用いた分画エラスチンのクラスは、先行研究³⁷⁾に基づいてタイプ A と E (以下エラスチン A、エラスチン E) を用いた。

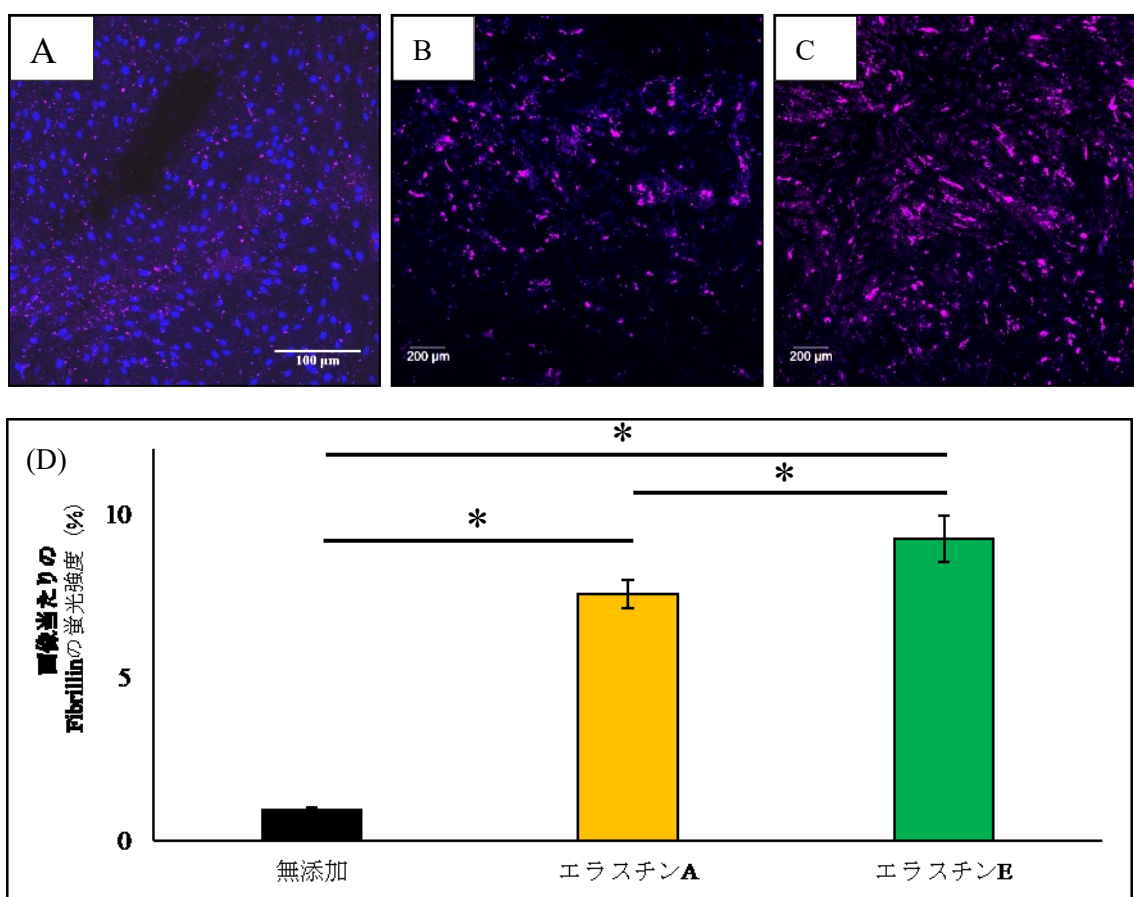


Fig.3-2-2 (A)無添加、(B)エラスチン A 添加、(C)エラスチン E 添加培養 VSMC の Fibrillin 蛍光観察結果 (青:細胞核、マゼンタ:Fibrillin)、(D)画像当たりの Fibrillin の蛍光強度 (n=3、*:p<0.05)

クラスに関係なく分画エラスチンによって、Fibrillin の発現が誘発され、弾性線維形成の初期段階をエラスチンによって誘導できることが示唆された。また、エラスチン A よりエラスチン E の方が発現を有意に増加させることが確認された。

3-2-3 エラスチン AE 混合多孔質ゲルが血管平滑筋細胞に与える影響

先行研究から細胞の生育環境に必要な多孔質構造を取ることが分かっている、エラスチン A と E の混合ゲルと VSMC を接触させて培養した場合の Fibrillin の蛍光観察をすることで、どのような影響があるかを評価した (Fig.3-2-4)。なお、接触させた群は、培養後ゲルから細胞を剥がしたものを観察した結果である。

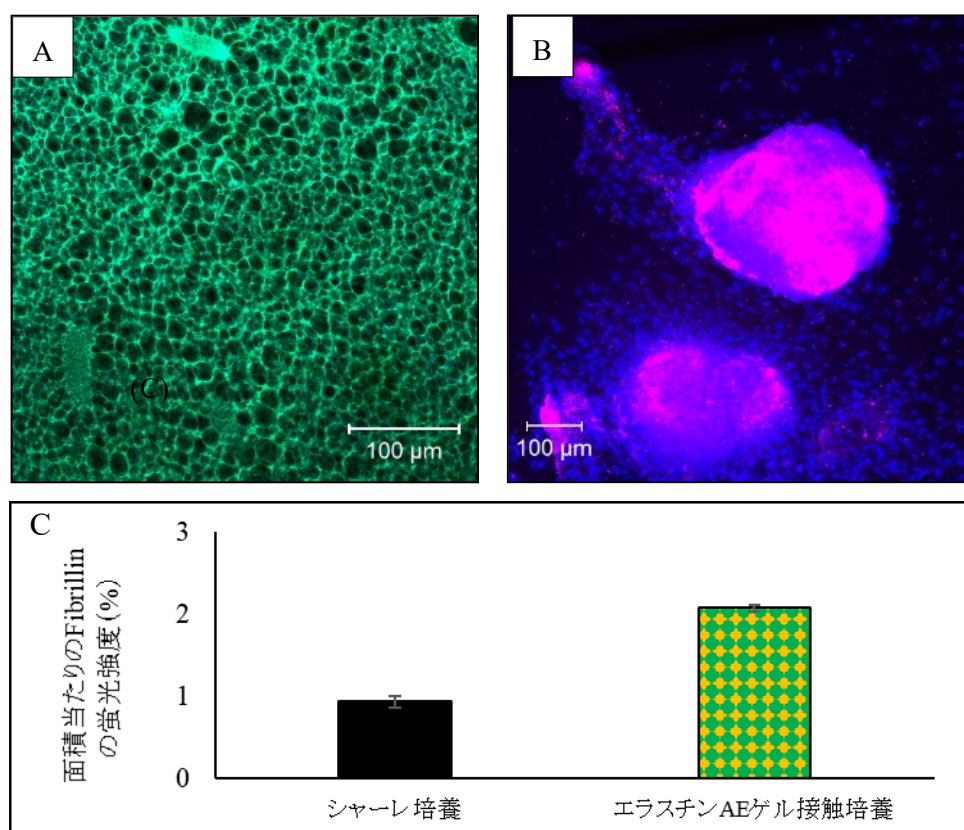


Fig.3-2-3 (A) エラスチン AE 混合ゲルの多孔質の様子、(B) エラスチン AE 混合ゲルを接触させて培養した VSMC の Fibrillin の免疫蛍光染色の結果 (青: 細胞核、マゼンタ: Fibrillin)、(C) シャーレ培養との蛍光強度比較

エラスチン AE 混合ゲルに接触させて 2 週間培養を行った群の蛍光強度は、画像面積当たり 2.1 ± 0.04 % であり、シャーレ培養 (0.93 ± 0.08 %) に比べて増加していた。このことから、エラスチン AE 混合ゲルによって VSMC の Fibrillin 産生を促進することが示唆された。

3-3 組織工学的人工血管の評価と特徴

3-3-1 組織工学的人工血管の組織学的評価

3-2 にて有用性が示されたエラスチンファイバーシートとエラスチン AE 混合ゲル、血管平滑筋細胞を組み合わせて人工血管を作製した。作製した人工血管を H&E 染色と免疫蛍光染色によって構造解析を行った。染色によって観察し得られた画像から、層の数、細胞密度を測定した (Fig.3-3-1, Table 3-2)。層の数については、エラスチンシートと平滑筋細胞層を一つの層として測定した。

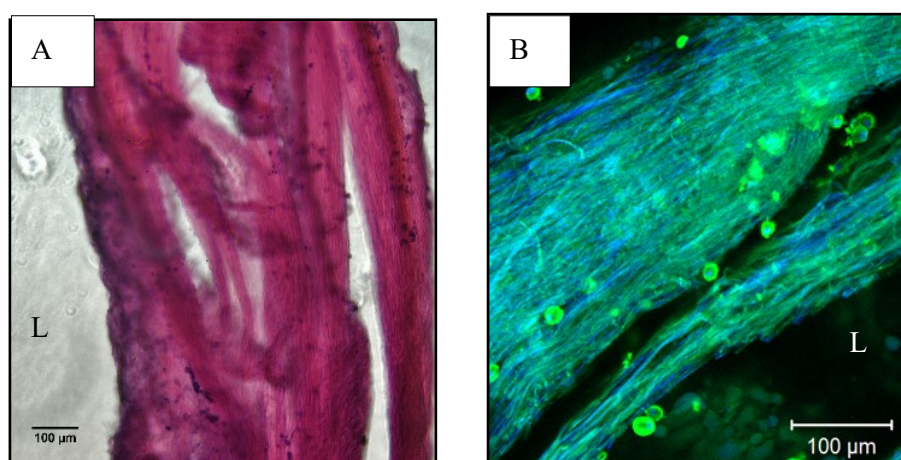


Fig. 3-3-1 組織工学的人工血管の染色結果

- (A) H&E 染色 (青紫:細胞核、ピンク:その他組織、L:内腔面)
 (B) α -SMA の免疫蛍光染色 (青:細胞核、緑: α -SMA、L:内腔面)

Table 3-2 染色で得られた組織工学的人工血管の特徴 (n=10)

サンプル	層の数	細胞密度($\times 10^4$ cells/mm ²)
人工血管	20.6 \pm 3.2	1.3 \pm 0.3

作製した人工血管の層の数は 20.6 ± 3.2 層であり、作製法のシート 8 枚 \times 3 回巻き = 24 層を概ね満たしていた。細胞数は $1.3 \pm 0.3 \times 10^4$ cells/mm² で目標としていた 5×10^4 cells/mm² に及ばなかった。1 層の厚みは 17.9 ± 5.6 μ m と、ブタ冠動脈よりも一層が薄くなっていることが分かった。内径はおおよそ 4 mm であった。

3-3-2 組織工学的人工血管の力学的評価

組織工学的人工血管の力学的特性を弾性率と血管コンプライアンスによって評価し、冠動脈との比較を行った (Fig.3-3-2)。対照としたブタ冠動脈の値は、二つ目のカーブの値を記した。

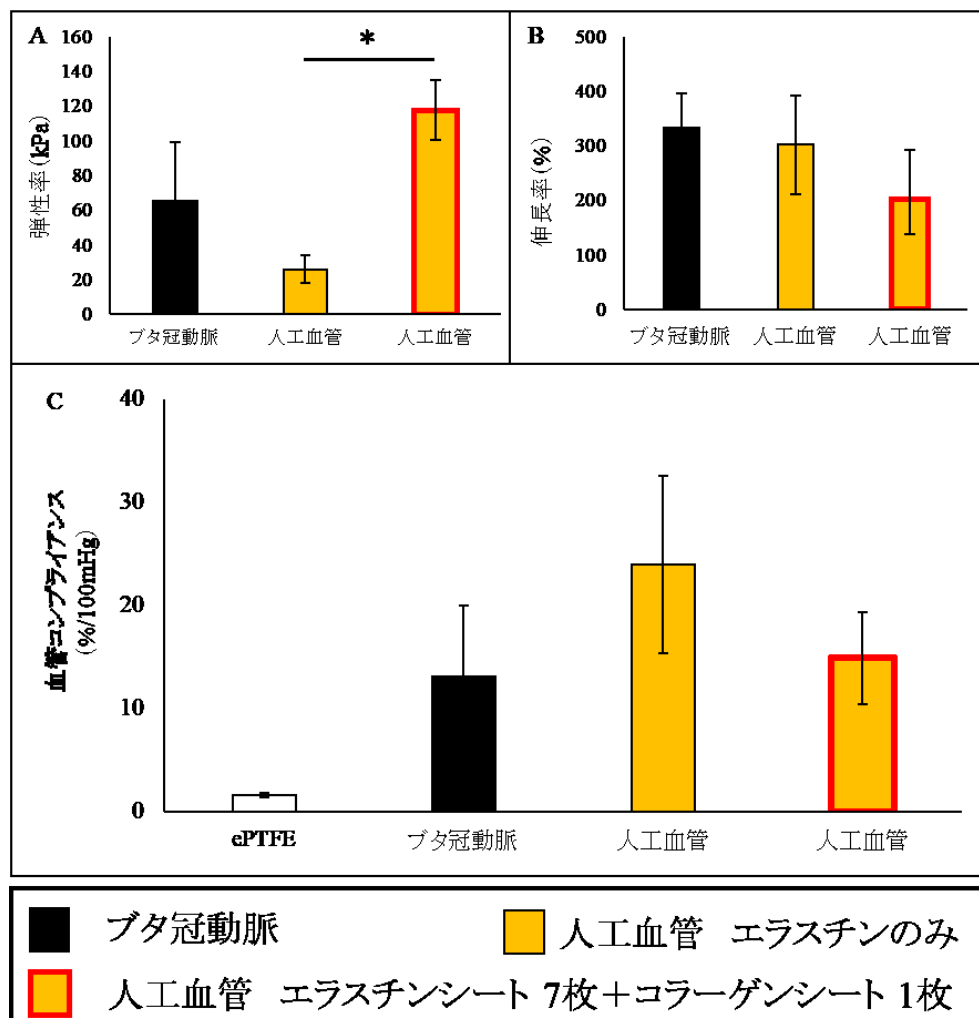


Fig.3-3-2 (A,B)組織工学的人工血管の弾性率と伸長率結果
(C)血管コンプライアンスの値(冠動脈:n=4-5、人工血管:n=3、*:p<0.05)

エラスチンのみで作製した人工血管の弾性率は 25.8 ± 8 kPa (Fig.3-3-2 A 中央)、伸長率は 301.6 ± 91 % (Fig.3-3-2 B 中央)、血管コンプライアンスは 23.9 ± 8.6 %/100mmHg (Fig.3-3-2 C 中央)であった。

また、コラーゲンシートを最外側に巻いた人工血管は、弾性率が 117.5 ± 17 kPa (Fig.3-3-2 A 右)、伸長率は 201.6 ± 63 % (Fig.3-3-2 B 中央)、血管コンプライアンスは 14.9 ± 4.5 %/100mmHg (Fig.3-3-2 C 中央)で冠動脈との有意な差はなかった。以上から、エラスチンのみで作製した人工血管は目標弾性率、血管コンプライアンス共に満たさない結果になり、コラーゲンを一枚導入すると目標を満たす人工血管となることが分かった。

3-3-3 組織工学的人工血管の収縮弛緩応答調査

組織工学的人工血管の機能が冠動脈様であるかを評価するために、収縮・弛緩剤を導入した際の内径変化を動画撮影し、開始後 0 分を 100 %として 5 分経過後 (Fig.3-3-3)、20 分経過後 (Fig.3-3-4) の変化率を冠動脈と比較した。使用した収縮剤は高濃度カリウムイオン (High Potassium ion buffer: HP) とフェニレフリン (PE)、弛緩剤には低濃度カリウムイオン (Low Potassium ion buffer: LP) とニトロプルシドナトリウム (SNP) である。

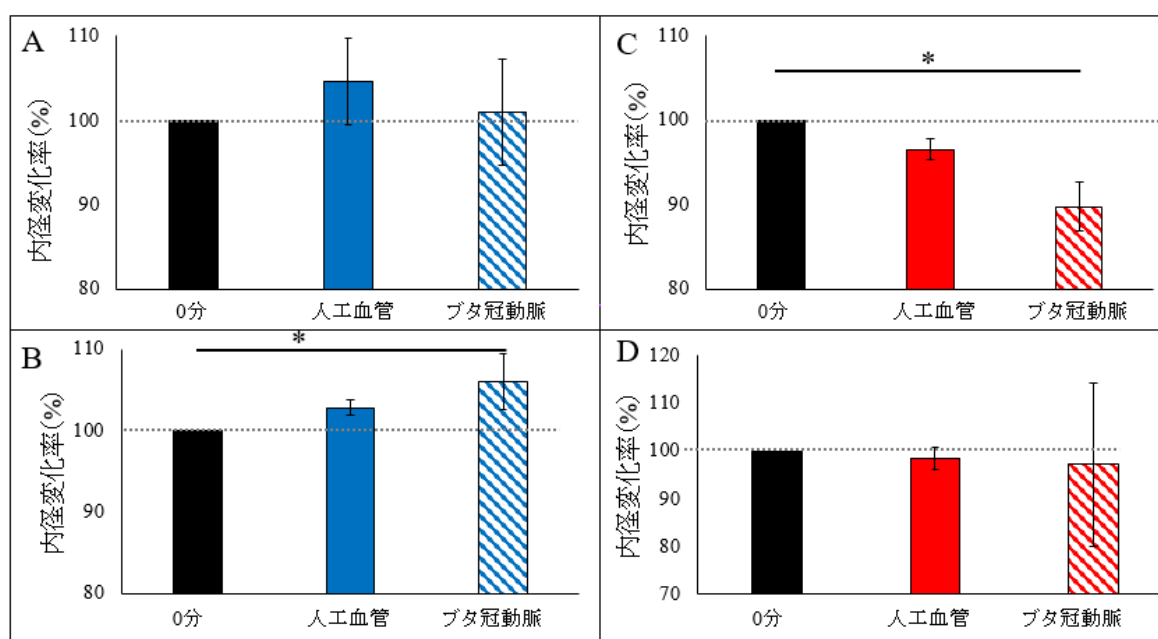


Fig.3-3-3 各収縮・弛緩剤添加後 5 分の変化率

(A) LP、(B) SNP、(C) HP、(D) PE 添加

(人工血管、ブタ冠動脈:n=3、*:p<0.05)

人工血管における弛緩剤添加 5 分の変化は、LP:104.6 ± 5.2 %の弛緩傾向 (Fig.3-3-3 A 中央)、SNP:102.8 ± 0.9 %の有意な弛緩 (Fig.3-3-3 B 中央) が観察された。また、収縮剤を添加した群においては、HP:96.5 ± 1.2 % (Fig.3-3-3 C 中央)、PE:98.4 ± 2.5 % (Fig.3-3-3 D 中央) の収縮傾向が見られたが、有意な差はなかった。

冠動脈においては、LP:101.0 ± 6.3 % (Fig.3-3-3 A 右)、SNP:106.0 ± 3.4 % (Fig.3-3-3 B 右) の有意な弛緩、HP:89.7 ± 2.9 %の有意な収縮 (Fig.3-3-3 C 右)、PE:97.2 ± 17.1 % (Fig.3-3-3 D 右) の収縮傾向にあった。LP においてはほとんど変化がなかった。

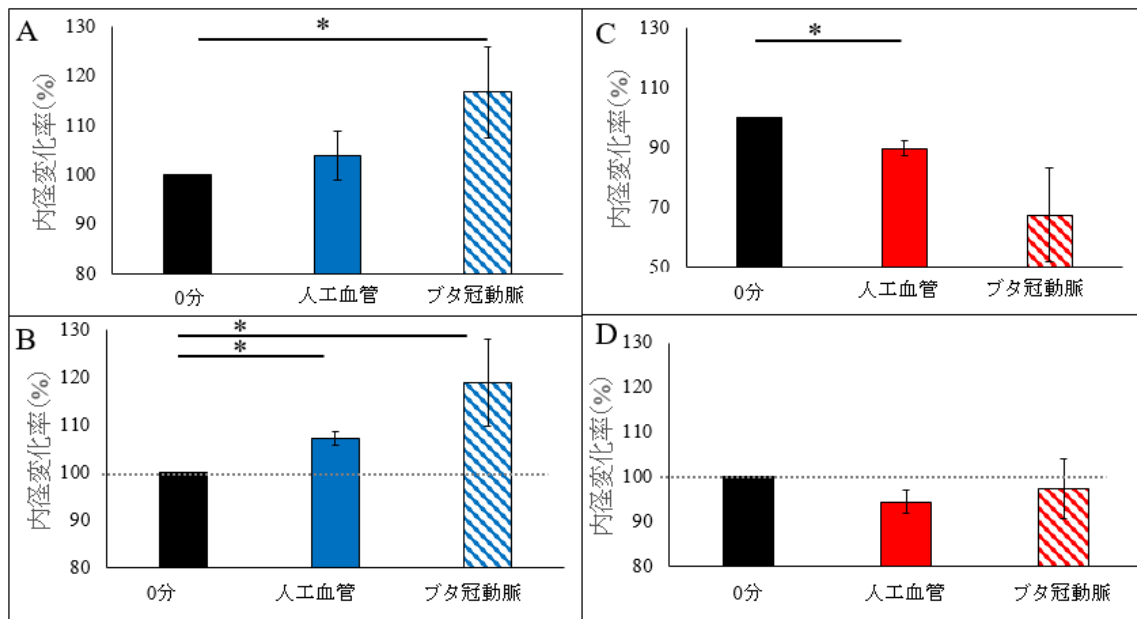


Fig.3-3-4 各収縮・弛緩剤添加後 20 分の変化率
 (A) LP、(B) SNP、(C) HP、(D) PE 添加
 (人工血管、ブタ冠動脈:n=3、*:p<0.05)

20 分の変化は、人工血管においては LP:107.2 ± 11.1 % の弛緩傾向 (Fig.3-3-4 A 右中央)、SNP:118.8 ± 11.1 % の有意な弛緩 (Fig.3-3-4 B 中央)、HP:89.7 ± 2.6 % の有意な収縮 (Fig.3-3-4 C 中央)、PE:94.5 ± 2.5 % の収縮傾向 (Fig.3-3-4 D 中央) が観察された。

冠動脈においては、LP:104.0 ± 5.0 % の弛緩傾向 (Fig.3-3-4 A 右)、SNP:107.1 ± 1.4 % の有意な弛緩 (Fig.3-3-4 B 右)、HP:80.6 ± 10.7 % の有意な収縮 (Fig.3-3-4 C 右)、PE:97.4 ± 16.0 % の収縮傾向 (Fig.3-3-4 D 中央) が観察された。

以上の結果から、作製した人工血管は各収縮・弛緩剤に応じた応答を示すことが分かったが、臨床で用いられる収縮剤の PE の応答はどの群においても確認されなかった。冠動脈と比較すると、平均値に差は見られたがどの群においても有意な差は見られなかったことから、生体様の収縮弛緩応答があったと言える。これを裏付けるために、生体血管に多く存在することが知られるギャップ結合について注視して次の実験を行った。

3-4 ギャップ結合との関係性

3-4-1 血管平滑筋細胞と冠動脈のギャップ結合観察

血管組織において収縮弛緩応答を行う際、重要な役割を果たすギャップ結合の様子を確認するためにブタ冠動脈のコネキシン 43 (Connexin43: Cx43) の免疫蛍光染色によってその観察を行った (Fig3-4-1)。

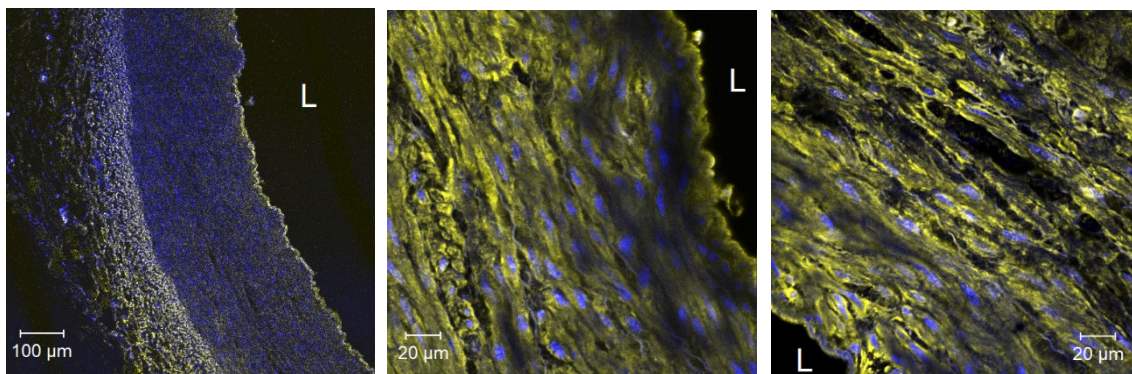


Fig.3-4-1 ブタ冠動脈の Cx43 免疫蛍光染色結果
(青:細胞核、黄:Cx43、L:内腔面)

ブタ冠動脈には Cx43 が存在し、ギャップ結合の存在が示唆された。

続いて、大動脈から単離した VSMC におけるギャップ結合をコネキシン 43 の免疫蛍光染色によって観察を試みた (Fig.3-4-2)。

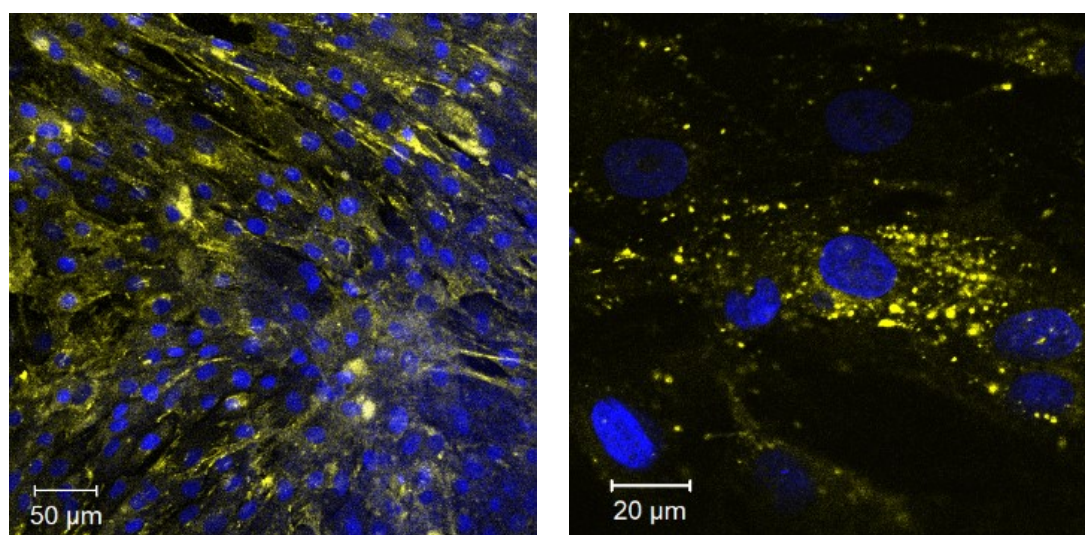


Fig.3-4-2 VSMC の Cx43 の免疫蛍光染色結果
(青:細胞核、黄:Cx43)

Cx43 の蛍光が観察されたが、細胞質内の Cx43、細胞膜上のヘミチャネル、細胞間のギャップ結合の違いがはっきりと分からなかったため、細胞膜の共染色を行った (Fig.3-4-3)。

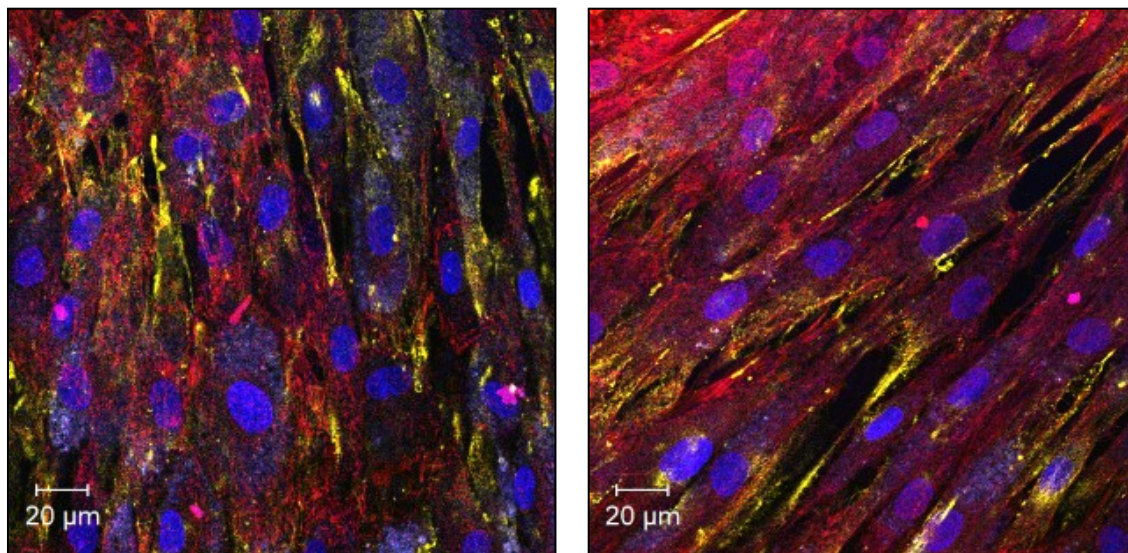
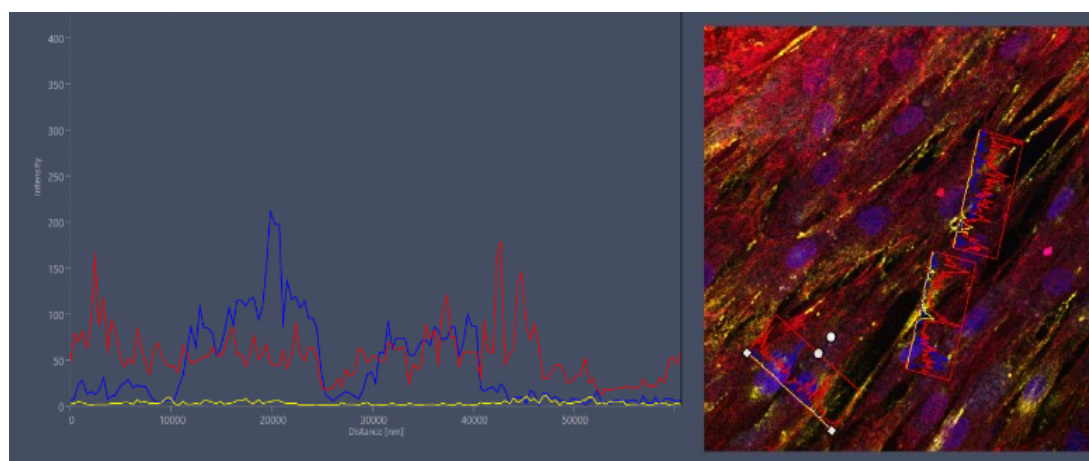


Fig.3-4-3 VSMC の Cx43 と細胞膜の蛍光染色結果
(青:細胞核、黄:Cx43、赤:細胞膜)

この画像から、細胞核、Cx43、細胞膜の蛍光強度の分布を分析して、特徴的であった 3 つの蛍光パターンを次に示す (Fig.3-4-4)。



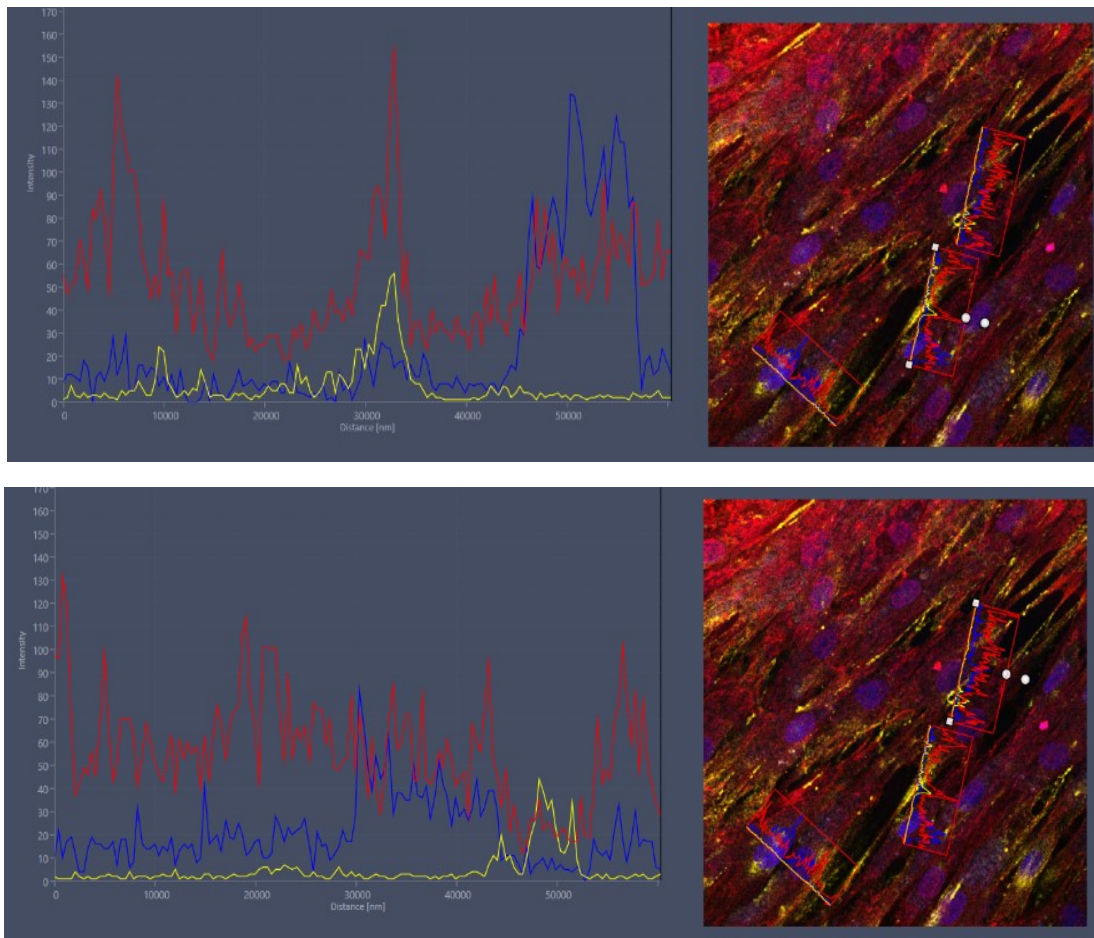


Fig.3-4-4 細胞核、Cx43、細胞膜の特徴的な蛍光分布

全画像を通して、青の高い蛍光強度が見られる部分は細胞核が、赤であれば細胞膜の淵、黄ならば Cx43 の存在を示している。

一枚目は、Cx43 の存在はあるものの偏りがある訳ではない。二枚目は、細胞膜と同じ場所に Cx43 の高い蛍光が見られる。三枚目は、赤の高い蛍光に挟まれるように Cx43 の高い蛍光が見られる。一枚目は、細胞質全体に存在する Cx43 またはコネクソン、二枚目は細胞膜上のヘミチャネル、三枚目はギャップ結合と思われる。このことから、血管平滑筋細胞間のギャップ結合の存在が示唆された。

3-4-2 ギャップ結合阻害時の組織学的人工血管の収縮弛緩応答調査

作製した人工血管の収縮弛緩応答のギャップ結合を媒介して起きているかを、カルベノキソロンによってギャップ結合の働きを阻害した際の収縮弛緩応答によって評価した。評価は5分(Fig.3-4-5)と20分(Fig.3-4-6)の時点で行った。

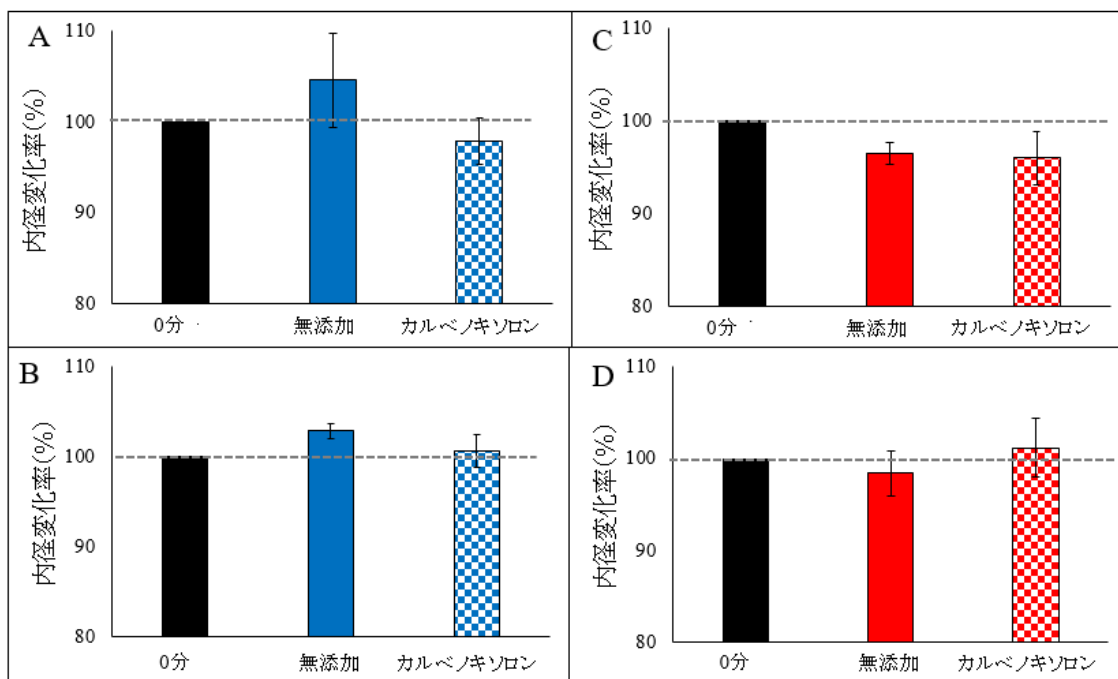


Fig.3-4-5 無添加とカルベノキソロン添加を行った人工血管の各収縮・弛緩剤作用後5分の内径変化率

(A) LP、(B) SNP、(C) HP、(D) PE 添加

(無添加人工血管、カルベノキソロン添加人工血管:n=3、*:p<0.05)

各収縮、弛緩剤導入後5分の時点で、カルベノキソロンを添加した群の変化は、LP:97.9±2.5%(Fig.3-4-5 A 右)、SNP:100.6±1.8%(Fig.3-4-5 B 右)、HP:96.0±2.8%(Fig.3-4-5 C 右)、PE:101.2±3.2%(Fig.3-4-5 D 右)であり、各収縮・弛緩剤に応じた変化はほとんど見られなかった。無添加群と比較するとHPにのみ有意な差があり、高濃度カリウムイオンによる収縮応答が抑制された。その他の薬剤に関しては有意な差は見られなかった。

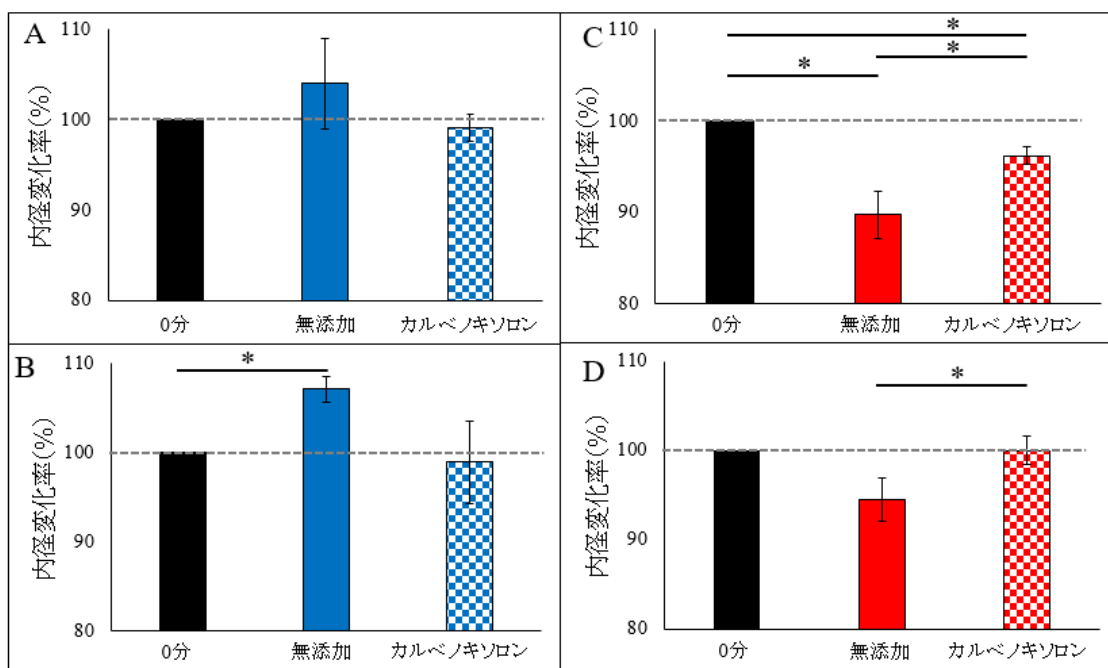


Fig.3-4-6 無添加とカルベノキシロン添加を行った人工血管の
各収縮・弛緩剤作用後 20 分の内径変化率
(A) LP、(B) SNP、(C) HP、(D) PE 添加
(無添加人工血管、カルベノキシロン添加人工血管:n=3、*:p<0.05)

20 分時点でカルベノキシロン添加群は、LP:99.1 ± 1.5 % (Fig.3-4-6 A 右)、
SNP:98.9 ± 4.6 % (Fig.3-4-6 B 右)、HP:96.2 ± 1.0 % (Fig.3-4-6 C 右)、
PE:100.0 ± 1.6% (Fig.3-4-6 D 右)でほとんど変化がなかった。無添加群と比較し
てHPとPEで有意な差は見られ抑制された。SNPとLPにおいては有意な差はな
かったが抑制傾向にあった。

カルベノキシロンを添加し、ギャップ結合の働きを阻害した人工血管において収
縮弛緩の抑制が観測されたことから、作製した人工血管はギャップ結合を介した
収縮や弛緩応答を行っていることが示唆された。

4 考察

4-1 ブタ冠動脈の構造と力学的特性

先行研究³¹⁾で塩処理後オートクレーブ (Fig.4-1 中のコラーゲン処理) を行ったブタ大動脈の引張試験を行った結果、オートクレーブ前では J カーブが見られ、オートクレーブ後では直線的な応力歪曲線が得られている (Fig.4-1)。しかしながら、Fig3-1-4 のように本研究では、オートクレーブ後でも J カーブが見られた。これについて考察する。

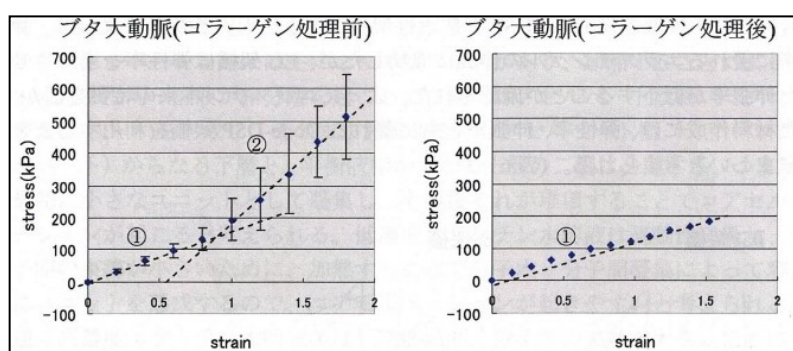


Fig.4-1 塩処理後オートクレーブを行ったブタ大動脈の引張試験結果³¹⁾

動脈は、構造の違いによって、弾性動脈と筋性動脈に細分できることが知られている¹¹⁾。前者は激しい血圧の変動を緩和する必要がある大動脈、腕頭動脈、総頸動脈、肺動脈などがこれに該当する。中膜部分が平滑筋細胞と弾性層板が豊富に存在し、受動的に血圧の変動に耐えていることが知られる。後者は、中膜部分のほとんどが平滑筋細胞からなり、積極的に収縮し血管内径を変える。また、大動脈の H&E 染色では Fig.4-2 のようにはっきりとした弾性層板が確認できるが、冠動脈ではそれが不明瞭である。これは、弾性層板の構造的違いが関係している。

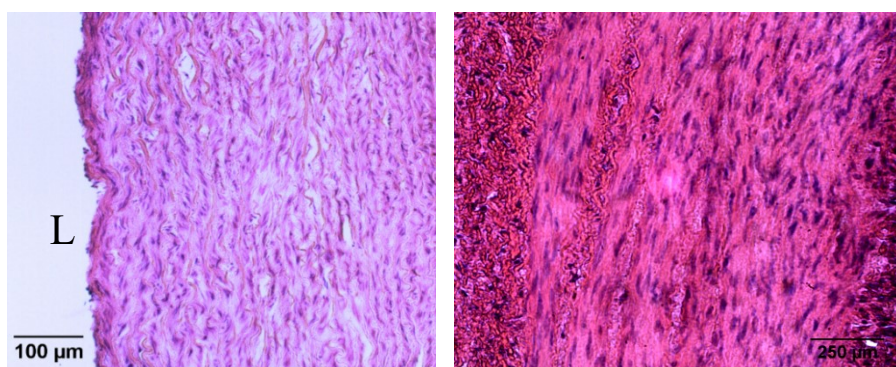


Fig.4-2 ブタ大動脈とブタ冠動脈の H&E 染色比較
(左) 大動脈、(右) 冠動脈

Glagov らは、SEM によって様々な血管中膜を観察した結果、大動脈と冠動脈に次のような違いがあると述べている³⁸⁾。大動脈を始めとするほとんどの動脈では、弾性層板は周期的な細孔を有するエラスチンの厚い連続シートであり、平滑筋細胞がその層板間に密に存在し、エラスチンの線維と接続している。しかし、冠動脈の弾性層板は、狭くより間隔の広いエラスチンの線維で構成されており、つまり、大動脈と比較して薄く多孔性の構造を示す³⁸⁾。この記述を基に予想される構造の模式図を Fig.4-3 に記した。



Fig.4-3 大動脈と冠動脈の構造模式図(組織を外膜側から見た時の図)

大動脈のエラスチンは、弾性層板の名に相応しい板状になっており、平滑筋細胞を一層ずつに分け隔てている。冠動脈にあるエラスチンの線維は、配向性の高いネット構造を示していると考えられる。本研究で行った円周方向の弾性率測定では、次の Fig.4-4 のように構造が歪みながら破断まで至ったと考えられる。

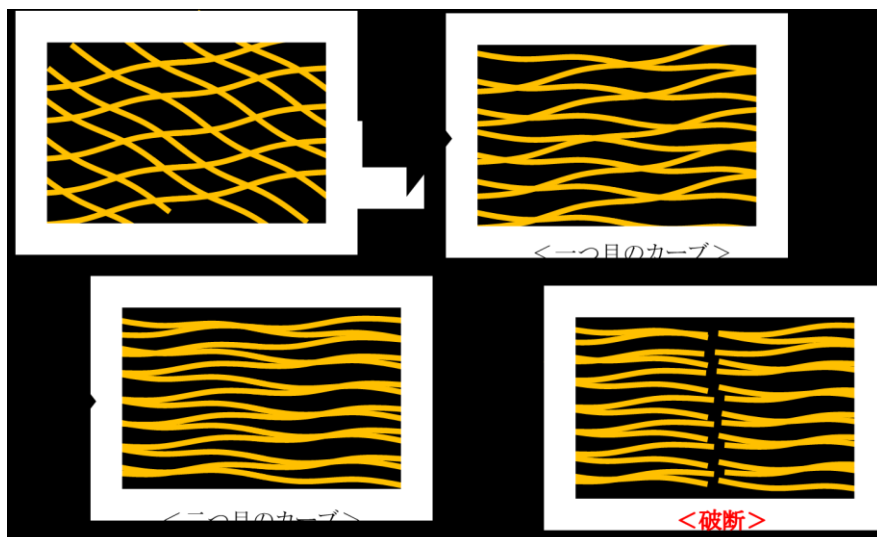


Fig.4-4 オートクレーブ処理後冠動脈の破断過程

よって、今回のような一つ目のカーブは、ネット構造が徐々に変形し完全な線維状になるため歪みに対して応力の値が低く、二つ目のカーブになると線維状態になるため、応力の値が高くなり破断までを表していると思われる。

4-2 エラスチン足場による血管平滑筋細胞の弾性線維形成

3-2 で得られたエラスチン添加培養時の VSMC のフィブリリン発現上昇について考察する。本研究では、不溶性エラスチンを熱シュウ酸処理によって水溶化したエラスチンを用いた。この水溶化エラスチンを弾性線維が断片化されたペプチドと考え、生体内で類似したものが発生する例があり、その一つがアテローム性動脈瘤である。

アテローム性動脈瘤は Russel Ross によって 1999 年に提唱された機序が有力とされている³⁹⁾。その大まかな機序を以下に示す。

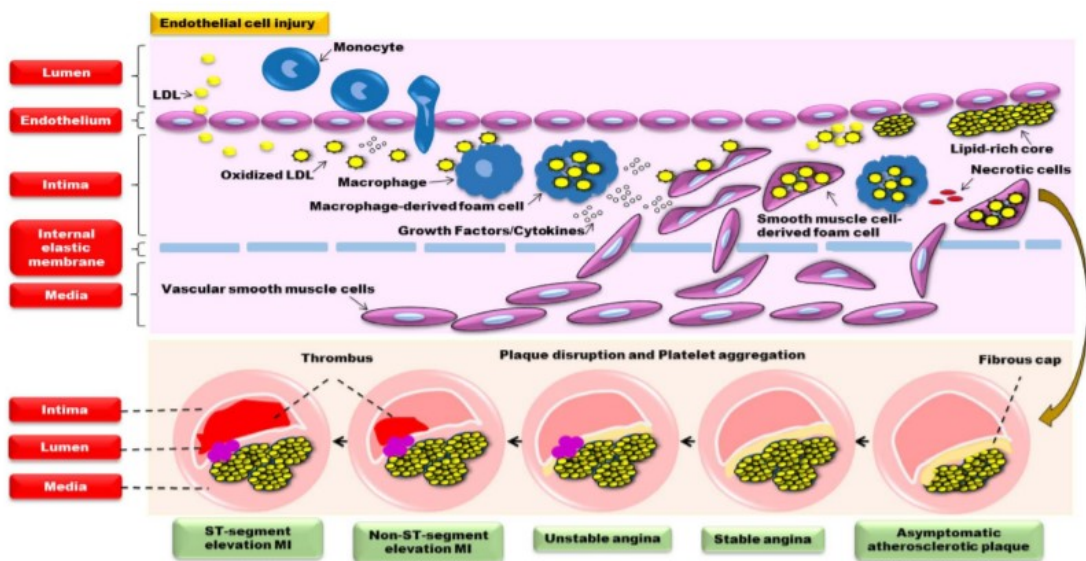


Fig.4-5 アテローム性動脈瘤のメカニズム⁴⁰⁾

<機序>

- ① 内膜が加齢、喫煙、肥満等の影響により損傷を受ける。
- ② 血中の単球が内膜表面に接着し、内皮の下層へと侵入
- ③ 単球は酸化 LDL (Low density lipoprotein) を取り込み泡沫細胞 (脂肪蓄積マクロファージ) となる。
- ④ 泡沫細胞が様々な成長因子やサイトカインを産生する。
- ⑤ 産生された成長因子、サイトカインによって中膜の平滑筋細胞が合成型へと変化し内膜へと遊走、増殖を始める。
同時に泡沫細胞の産生する MMP (Matrix metalloproteinase) によって、細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) が分解される。
- ⑥ 内膜内で平滑筋細胞が傷害修復のために過剰な基質産生と増殖を行い、内膜が肥厚化する。

この中で⑤の MMP による ECM 分解について詳しく解説する。

泡沫細胞の産生する MMP は MMP-2、MMP-9 と様々あるが、血管を構成する ECM、特に膠原線維と弾性線維を分解する。断片化した各線維はペプチドとして中膜内の平滑筋細胞、内膜の内皮細胞にも作用する。

断片化した膠原線維であるコラーゲンペプチドは平滑筋細胞に作用すると合成型への形質転換を促し、平滑筋細胞はコラーゲンを始めとする様々な ECM の過剰産生を行うようになる。特に、I型コラーゲンを産生するためプラーク部分のコラーゲンの割合は正常血管と比較して高くなるため、後に硬化していく⁴¹⁾。

弾性線維の主成分であるエラスチンはカルシウムと脂質の沈着によってタンパク質分解が誘発され、かつ MMP によるエラスチンの分解が起こる。この時、エラスチンは断片化されてエラスチンペプチドという形で残存する。エラスチンペプチドは、平滑筋細胞や内皮細胞上のエラスチン受容体複合体 (Elastin receptor complex: ERC) に作用して増殖や ECM 産生を促すとされる⁴²⁾。

ERC は EBP (Elastin binding protein)、PPCA (Protective protein / cathepsin A)、Neu-1 (Neuraminidase-1) で構成される、ヘテロ三量体である。EBP はエラスチン結合部位をもち、PPCA はセリンプロテアーゼ活性を、Neu-1 はシアル酸を糖タンパク質や糖脂質から切断すると言われている。Pascal らによると、エラスチンペプチドが EBP に結合すると、Neu-1 の活性が促進され、最終的に ERK1/2 や Akt 経路の活性化へと繋がる (Fig.4-6)。

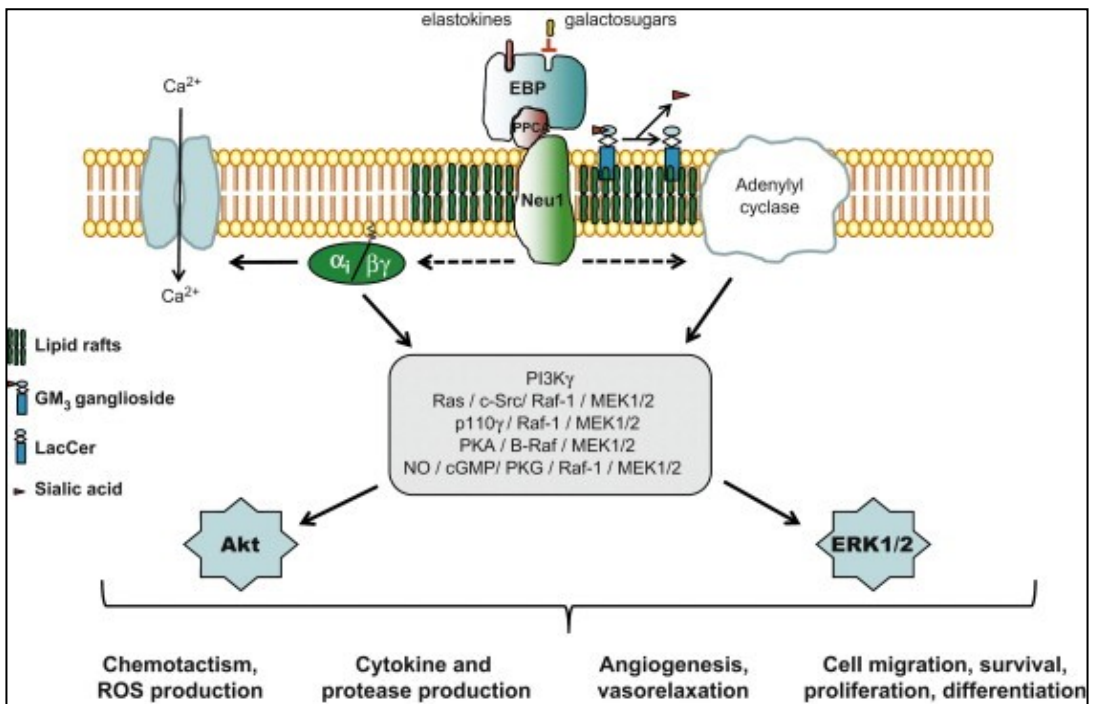


Fig.4-6 ERC を介したエラスチンペプチド(図中の elastokines)による細胞への影響⁴²⁾

PI3K や、Aktの活性化によってFibrillinの転写・翻訳が促進されるという報告がある⁴³⁾ため、エラスチンペプチドからAkt、PI3Kを介したFibrillinの発現が起きると推察できる。

また、アテローム性動脈瘤においては、平滑筋細胞がECMの過剰産生によって内膜肥厚、硬化を促進する。このECMは、種々のコラーゲンのほか、エラスチンやフィブリリンなども含まれる。よって今回の実験で断片化した分画エラスチンがERC等を経てフィブリリンの合成へと至ったのではないかと考えている。

また、ゲルを接触させて培養させた際にも、フィブリリンの発現上昇が見られたことについて考察する。Fig.3-2-4で示したゲルを接触させて2週間後ゲルを細胞から剥がして観察を行った。本研究室で用いられる、多孔質エラスチンゲルは次のような機序を経て多孔質ゲルとなると考えられている(Fig.4-7)。

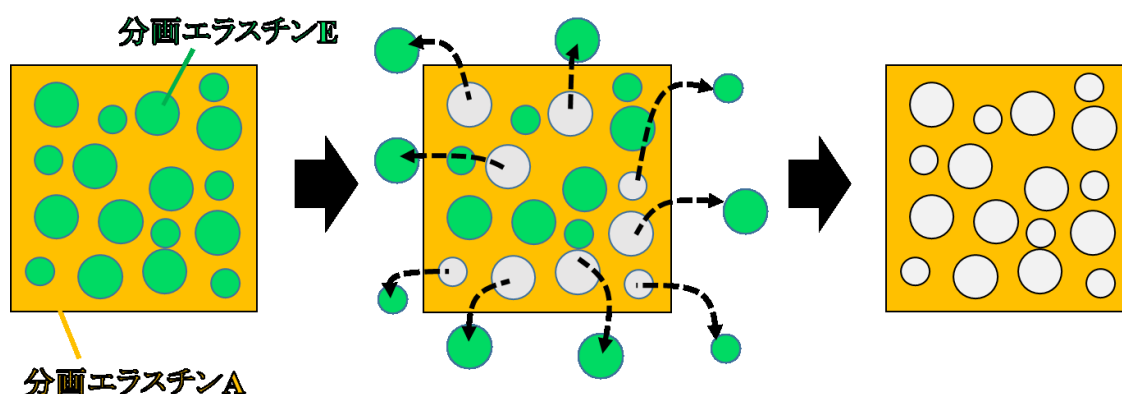


Fig.4-7 分画エラスチン AE 混合ゲルの多孔質化メカニズム

エラスチン A と E を混合させてゲル化を行うと、エラスチン E 部分がゲル化することなく、エラスチン A のみがゲルとなる。このゲルに培地を導入すると水溶性のためゲル化していない E 部分のみが培地成分へと流出して、この流出したエラスチンが、先ほど説明したエラスチンペプチドによる作用機序によってFibrillin発現を促したと思われる。添加等によるエラスチンの補填を行っていないにも関わらず、2週間時点でFibrillin産生があったことについては次のような現象が起きていたと推測される。

培地交換を3日に一度行っているので徐々に流出したエラスチンは減少していく。しかし、ゲル化したエラスチンゲルが加水分解または、平滑筋細胞の産生するMMPによって分解されて、再びエラスチンペプチドが供給される。これによって、2週間時点でもエラスチンが平滑筋細胞の周囲に存在しており、産生が確認できたと考えている。

また、この実験結果は、ゲルと平滑筋細胞の間への弾性線維形成の初期過程が観察できたとも言える。すなわち、エラスチン足場を用いた人工血管において培養を継続すればゲルとの接触によって弾性線維のリモデリングが開始されることを示唆している。以上を踏まえて作製した人工血管内では Fig.4-8 に表すような分解・リモデリング進行が起きていると推測される。

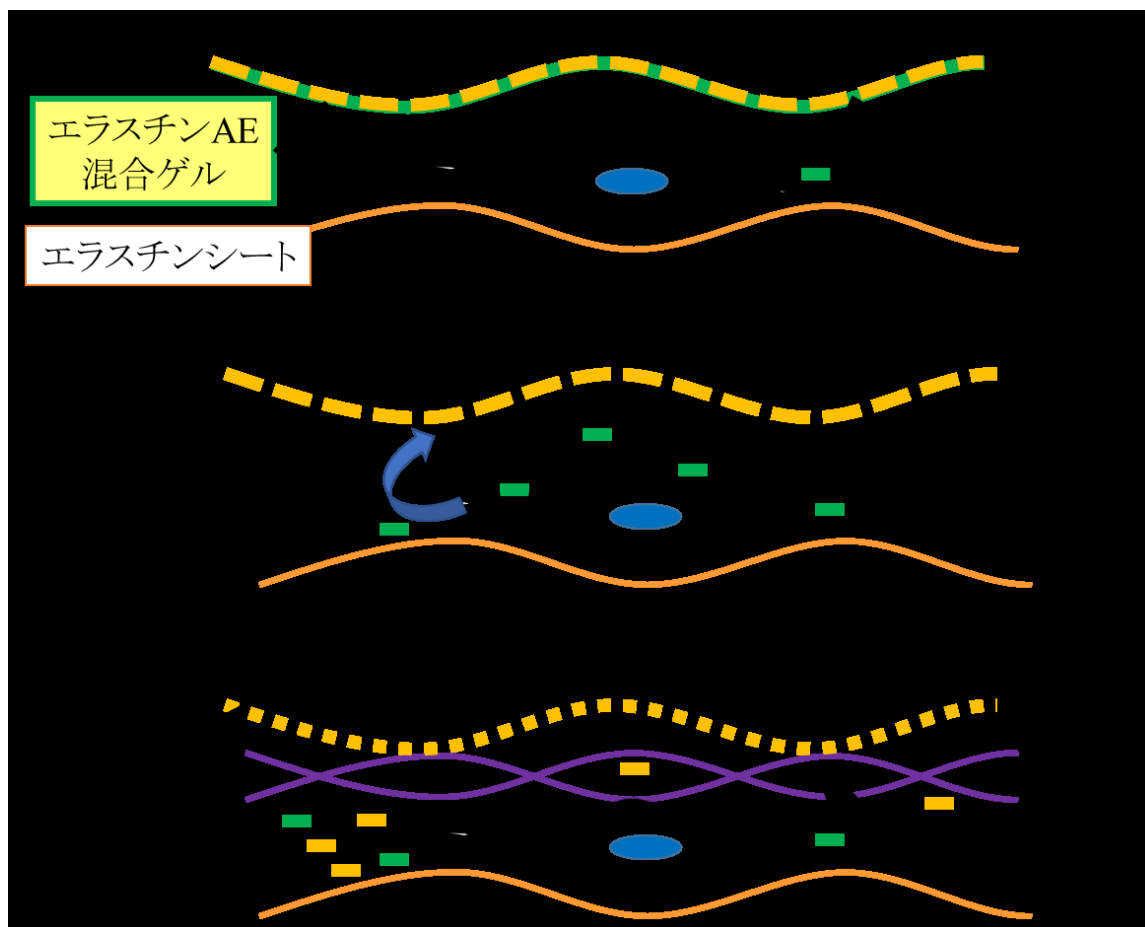


Fig.4-8 エラスチン足場を用いた人工血管のリモデリング

培養液に浸すことで分画エラスチン AEゲルのうち、エラスチンE部分のみが漏出しエラスチンペプチドとして平滑筋細胞へと作用する。これによって Fibrillin、Elastin の合成が開始され、同時に MMP の産生も活発となる。産生された MMP は多孔質エラスチンゲルを分解し、A部分がエラスチンペプチドとして平滑筋細胞に供給され Fibrillin、Elastin の合成が促進される。この繰り返しのによって、リモデリングが進行することが期待される。

4-3 組織工学的人工血管の力学的特性

先行研究³⁰⁾では、無細胞人工血管を作製した翌日に弾性率、コンプライアンスを測定して次のような結果を得た(Fig.4-9)。

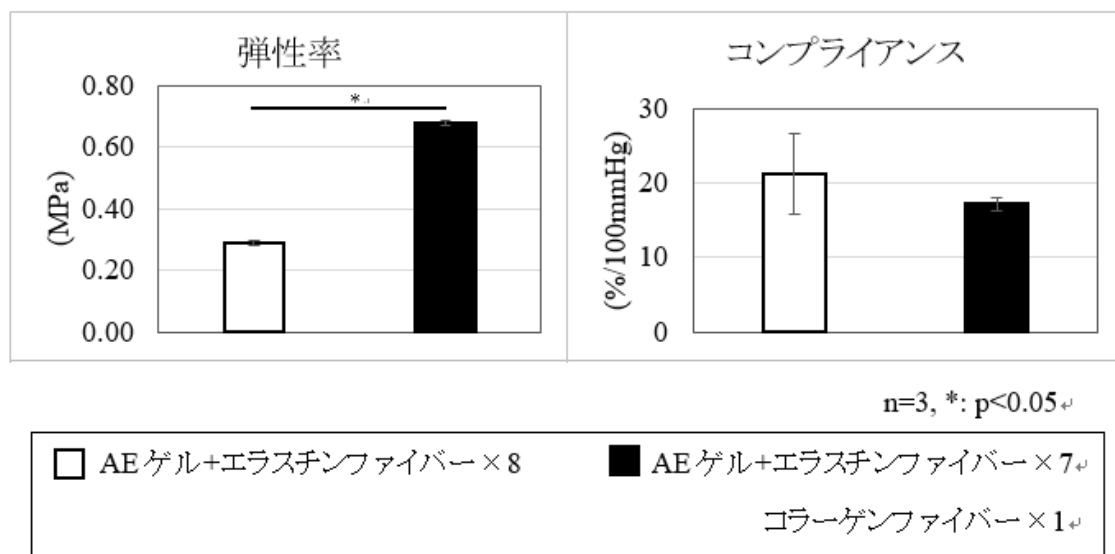


Fig.4-9 多孔質エラスチン AE ゲルと、エラスチンシートのみで作製した人工血管とコラーゲンファイバーシートを導入した人工血管の弾性率とコンプライアンス比較 (平成 30 年三田修論³⁰⁾より一部抜粋)

多孔質ゲルとエラスチンシートのみで作製した人工血管の弾性率は約 300 kPa で、コンプライアンスは 20 %であった。本研究と弾性率の測定方法が異なるため明確な比較はできないが、1 週間培養後で 25 kPa 程度と大幅に減少している (Fig.3-3-2 A)。しかし、コンプライアンスは 25 %と大幅な変化はなかった (Fig.3-3-2 C)。このことについて考察する。

作製した人工血管の力学的強度を担保しているのは、エラスチンファイバーシートである。エラスチンシートは加水分解や細胞の産生する MMP 等によって分解されて強度低下につながったと思われる。しかし、分解されたシートはすぐに培養液中へと流出することなくその場に留まっているのではないかと考えられる。作製した人工血管はエラスチンシートがエラスチンゲルによって互いに接着しているような構造を取る (Fig.4-10 左)。よって、分解されたシートはゲルによって一時的に接着していて (Fig.4-10 右)、ゲルまたはシートの完全分解までは時間を要するため、弾性率が低下したにも関わらず、コンプライアンスは維持されたのではないかとと思われる。

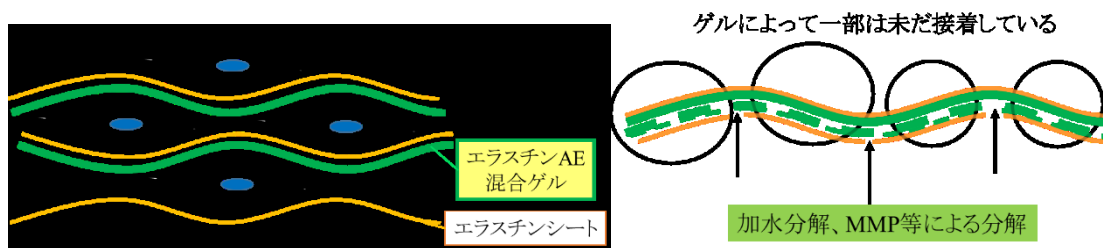


Fig.4-10 人工血管の断面模式図と、培養一週間後の足場の様子
(一週間後の様子は細胞を省略した)

コラーゲンファイバーシートを導入したことにより、弾性率はオートクレーブ処理後のブタ冠動脈の倍以上、コンプライアンスの値は先行研究とほぼ同じ値となった。4-2 でも述べたが、コラーゲンには平滑筋細胞を合成型へと誘導する報告があり、本研究では過剰な ECM 分解、ECM 産生を阻止するため、コラーゲンシートには細胞を導入していない。よって、コラーゲンシートは加水分解によって徐々に分解されるが、細胞の出す MMP の影響を直接受けることがないため分解が遅延されたと考えられる。

弾性率はエラスチンシートのみで作製するとエラスチンシートの分解による構造破壊が原因で弾性率低下が顕著に表れたが、コラーゲンシートによって半分程度に抑えられたと言える。コンプライアンスについては、エラスチンシートの構造破壊が起きていたが、コラーゲンシートによってこれが抑えられ、一週間後も維持できたと考えられる。

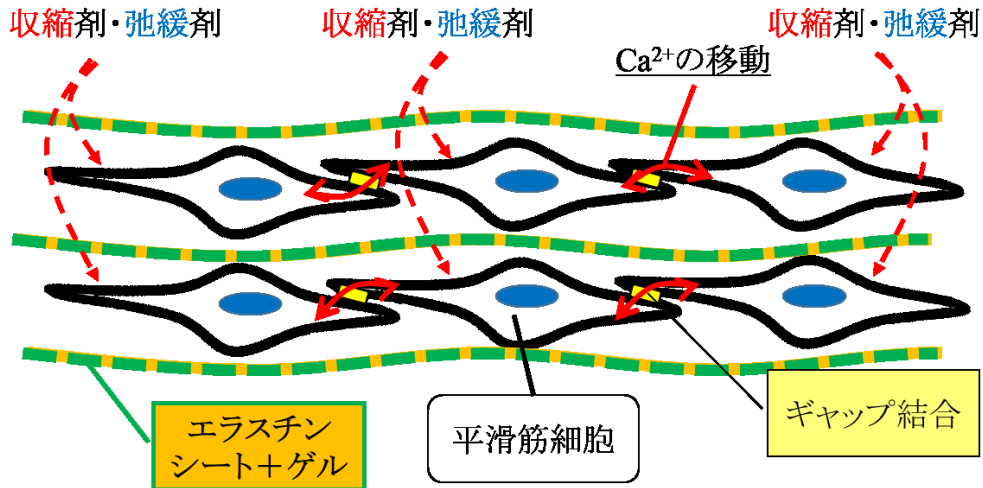
弾性率の値は、オートクレーブ処理後の冠動脈より倍近い値となったが、処理前の値と比べると半分にも満たない。原因は先に述べたエラスチンシートの分解と思われるが、これを制御する必要がある。加水分解は避けることができないが、MMP 等によるシートの分解は可能であると思われる。MMP による分解を阻害するものをシートやエラスチンゲルに導入、または培地中に添加することで MMP による分解を抑制できると考えている。

また、冠動脈は平滑筋細胞と弾性層板の間にもコラーゲンが存在し、ネットワークを形成している³⁸⁾。これが、強度を保っているが、今回作製した人工血管ではそれが達成されていない。これを模倣できれば強度上昇へと繋がる可能性がある。

4-4 ギャップ結合媒介性収縮弛緩応答

今回作製した人工血管の収縮弛緩応答は Fig.4-11 のように起きると考えられる。

Fig.4-11 人工血管の収縮弛緩応答の機序予測



冠動脈と人工血管の大きな違いは、シート間の細胞間連絡が困難な点である。Fig.3-1-3 から冠動脈中膜のほとんどが厚い平滑筋層で構成されることから、冠動脈は内皮や外膜から受けた刺激を、ギャップ結合を介して素早く全体へと伝えていていると考えられる。このことは、冠動脈において 5 分でも収縮、弛緩に有意な応答が見られたことから説明できる。逆に人工血管は各層が隔てられているため、今回の実験であれば一層の平滑筋細胞層においてはギャップ結合によって応答が伝達されるが、次の層に伝えるには収縮・弛緩物質が浸透するまでの時間を要していると考えられる。よって、冠動脈よりも遅い時点で収縮・弛緩反応が見られたと思われる。

また、各収縮・弛緩剤による応答の違いを Fig.4-12,13 に示した。Fig.4-12 は平滑筋細胞における収縮弛緩の大まかなメカニズムである

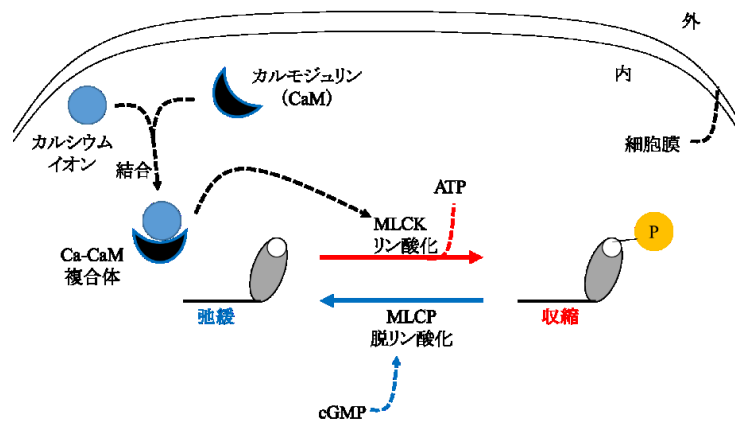


Fig.4-12 平滑筋細胞における収縮弛緩メカニズムの簡略図⁴⁴⁾

平滑筋細胞の収縮メカニズムは細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) とカルモジュリン (Calmodulin : CaM) の結合によって開始され、カルシウム-カルモジュリン複合体 (Ca-CaM) がミオシン軽鎖キナーゼ (Myosin light-chain kinase : MLCK) に作用し、キナーゼが活性化、ミオシン軽鎖をリン酸化する。リン酸化したミオシンはアクチンと結合して収縮が起こる。弛緩は cGMP などの作用によって、MLCK のリン酸化によって MLCK が不活性化、または、ミオシン軽鎖ホスファターゼ (Myosin light-chain phosphatase : MLCP) の活性化によってミオシンの脱リン酸化が起きて弛緩が起こる (Fig.4-12)。

低濃度カリウムから高濃度カリウムに溶液を変えると、細胞膜上にあるカリウムイオンチャンネル (内向き整流性 K^+ チャンネルなど) によって、細胞内へとカリウムイオンが流入する。流入によって膜電位が変化し、カルシウムイオンチャンネルが開いてカルシウムイオンが細胞内へ流入し、脱分極が起きる。カルシウムイオンの細胞内濃度上昇に伴い、カルモジュリンとカルシウムが結合して収縮を促す (Fig.4-13 A)。

高濃度から低濃度カリウムに変えると、濃度勾配によってカリウムイオンが流出し、膜電位の過分極が起きる。その後、カルシウムイオンが流出、カルシウムイオン濃度の低下によって、弛緩を促す (Fig.4-13 B)。

ニトロプルシドナトリウム (SNP) による弛緩について。ニトロプルシドナトリウムから一酸化窒素 (NO) が遊離する。NO は細胞内に存在するグアニル酸シクラーゼに作用して、GTP を cGMP に変換する。cGMP は PKG を活性化して筋小胞体 (カルシウムイオンストア : Ca^{2+} ストア) のチャンネルを刺激してカルシウムイオンの取り込みを促進して、弛緩を引き起こす (Fig.4-13 C)。

フェニレフリン (PE) による収縮について。PE を細胞膜表面に存在するアドレナリン $\alpha 1$ 受容体が認識して、直近の G タンパク質を介してプロテインキナーゼ C (Protein kinase C : PKC) や Ca-CaM 依存性キナーゼ II などの酵素が活性化する。これらによって、細胞膜表面、または筋小胞体のカルシウムイオンチャンネルを刺激して、カルシウムイオンを流入、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させ収縮へと至る (Fig.4-13 D)。

今回用いた収縮・弛緩剤の中で唯一細胞膜上の受容体を介して作用する PE に関しては、Fig.4-13 D のような機序で収縮することを想定して実験を行ったが有意な差は見られなかった (Fig.3-3-3、Fig.3-3-4)。これについて考察を行う。今回用いた細胞は、大動脈由来の平滑筋細胞である。大動脈は 4-1 で記述したように弾性動脈に分類される。よって日常的に収縮や弛緩を行う冠動脈と比較して、その応答に対して鋭敏ではないことが考えられる。今回使用した収縮・弛緩剤の中で、受容体を介しての反応は PE だけである。PE を認識する受容体はアドレナリン受容体 α_1 である⁴⁸⁾が、アドレナリン受容体はいくつか種類が存在する。

大動脈にはアドレナリン受容体 α_1D が、冠動脈には α_1A と α_1D 、 α_2A,B が存在するという報告がある⁴⁶⁾。

Adrenergic receptors			
α_{1A}	Blood vessels, heart, lung, liver, smooth muscle, vas deferens, prostate	α_{2B}	Blood vessels, coronary and CNS vessels, kidney, liver, pancreas, platelets, sympathetic neurons
α_{1B}	Heart, kidney, lung, spleen	α_{2C}	Presynaptic sympathetic nerve terminals
α_{1D}	Aorta, coronary artery, platelets, prostate	β_1	Heart, kidney, adipocytes; skeletal muscle
α_{2A}	Autonomic ganglia, coronary and CNS vessels, pancreas, platelets, sympathetic neurons	β_2	Blood vessels, bronchi, eye, gastrointestinal tract, heart, kidney, lung; skeletal muscle

Fig.4-14 アドレナリン受容体の一覧と、存在する組織
(参考文献 48 より一部抜粋)

受容体の数からも分かるように冠動脈の方が神経刺激に対して鋭敏であることが分かる。また、ウサギ大動脈にはムスカリン受容体 M2、M3 が存在し特に M3 受容体は収縮に働く⁴⁹⁾。生体内でどちらが優先であるかは報告されていないが、今回の PE による収縮が観察できなかったのは、大動脈ではムスカリン受容体が優先的に働いているからだと推測できる。よって、冠動脈の働きを完全に再現するには、大動脈由来の平滑筋細胞ではなく、冠動脈由来のものを使用する必要があると思われる。また、今回は PE による応答、即ちアドレナリン受容体 α_1 のみの応答を観察したので、他の受容体に作用する薬物を用いた実験も必要と言える。例えば、 α_2 受容体であれば、クロニジンを、 β_2 受容体であればサルメテロールやアルブテロールなどが該当する⁵⁰⁾。

エラスチン足場を用いた人工血管内平滑筋細胞間のギャップ結合による収縮弛緩作用について考察する。本実験では、ギャップ結合を阻害したことによって収縮弛緩応答性が低下し、ギャップ結合が機能していることを示唆した。

血管に限らず子宮、気管支、膀胱等の平滑筋は、骨格筋、心筋と異なり筋節（サルコメア）が存在しない。骨格筋、心筋はサルコメアで密着接合（Tight junction）を形成し、細胞間が 5 nm 程度まで接近している。その周辺にギャップ結合を形成して、収縮刺激伝達物質の Ca^{2+} の細胞間輸送を達成し、神経によって受けた膜電位変化を組織全体に高速伝達を可能にしている⁵⁰⁾。

平滑筋にはこれらが存在せず細胞間を密着させる手段がないため、どのように密着しギャップ結合を形成しているかは未だ解明されておらず、デスモソームによるものとする報告もあるが、上皮細胞のデスモソームの細胞間距離は 20 nm ~ 30 nm であるため⁵¹⁾、これだけの影響とは考えにくい。ただし、平滑筋は骨格筋、心筋と異なり、平滑筋の周囲に ECM が豊富に存在しているため、この ECM が平滑筋の密着を援助していると推察できる。

CAY M. らは、IV型コラーゲンとフィブリンで形成されたマイクロフィブリルが血管平滑筋細胞の接着と集合に関与していると報告している⁵²⁾。つまり、Fig.4-14 のようにマイクロフィブリルに平滑筋細胞が集合・密着し、その近接した部分でギャップ結合を形成していると推察する。

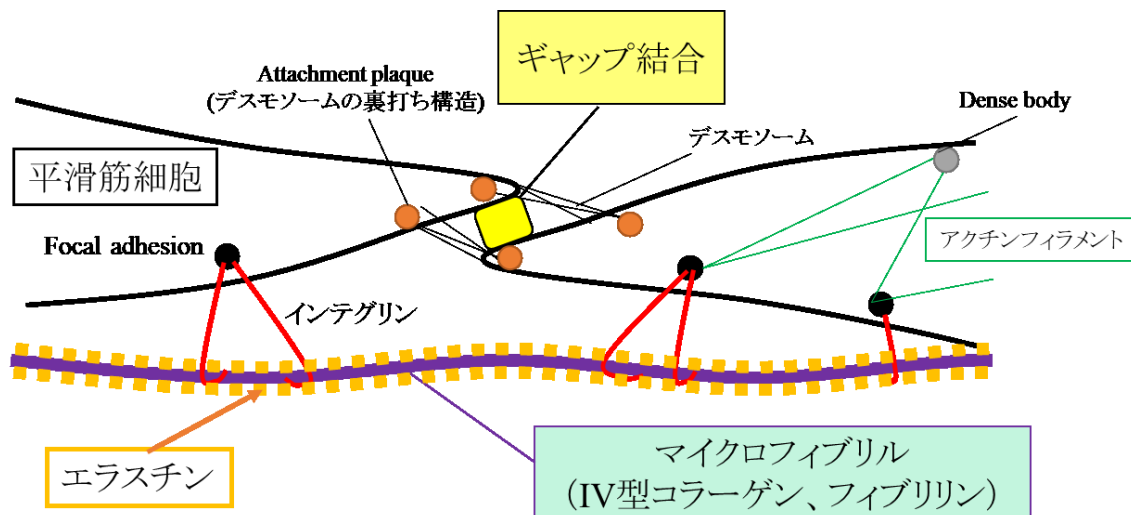


Fig.4-15 マイクロフィブリルに集合・密着しギャップ結合を形成する平滑筋細胞の模式図

エラスチン足場で作製した人工血管内の平滑筋細胞がギャップ結合を形成し、その機能を発揮したのは、4-2 で述べたフィブリリン産生によるものであると考えられる。人工血管のギャップ結合形成に至るまでを Fig.4-16 に示した。

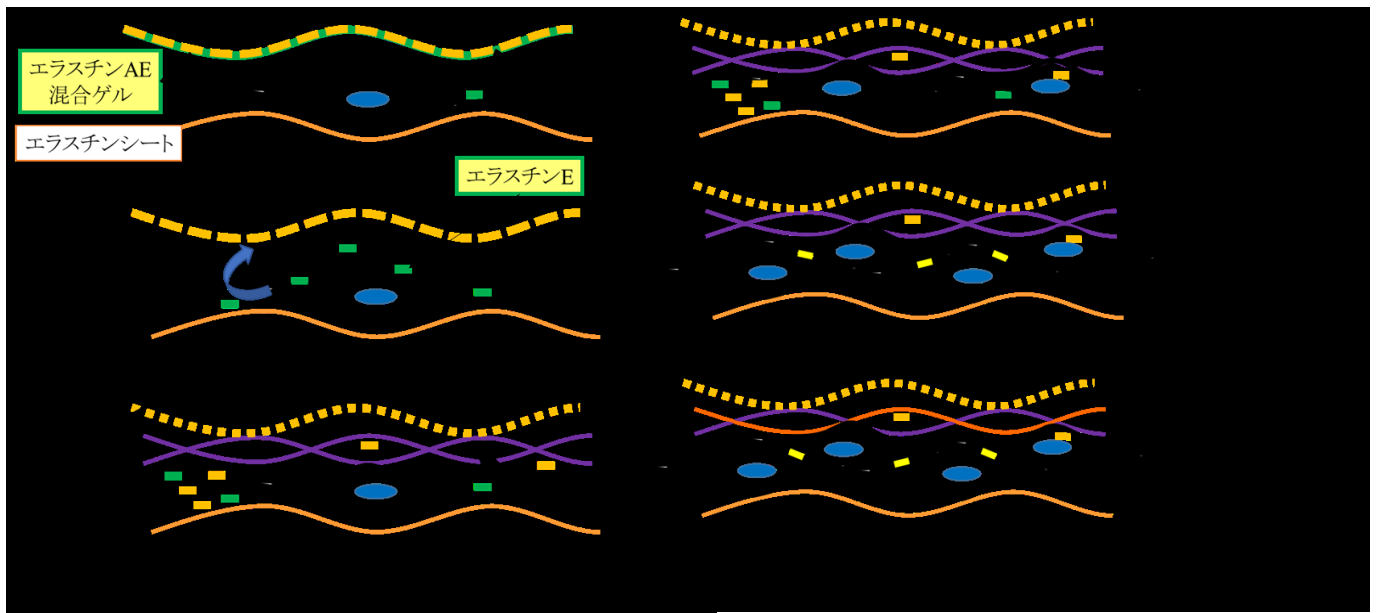


Fig.4-16 人工血管内の平滑筋細胞のギャップ結合形成過程

培養直後では、エラスチン AE 混合ゲルからエラスチン E のみが漏出し、シート上の平滑筋細胞から、フィブリリンが産生されマイクロフィブリル形成過程が開始される。ゲル層とシート層の間にフィブリリン線維(またはマイクロフィブリル)が形成され、そこに平滑筋細胞が遊走し、集合していく。この後、密着した平滑筋細胞間にギャップ結合が形成され、細胞間の直接連絡が達成されると推測される。その後はマイクロフィブリルに平滑筋細胞が産生したエラスチンが沈着し、弾性線維が形成されると思われる。

4-5 エラスチンを用いた組織工学的人工血管について

本研究の結果から、エラスチンシートと多孔質エラスチンゲルを用いた人工血管は力学的強度、機能を十分に持ち得ることが分かった。しかしながら、未解決な要素が未だ存在するため、今後はその解決を行わなければならない。大きな未解決部分は① 縫合保持強度、② 内皮細胞導入の2点であると考える。

①について。平成30年三田³⁰⁾は、水溶化フィブリンと水溶化エラスチンを組み合わせたゲルを用いて作製した人工血管が、縫合に十分な強度を示したと報告した。本研究では、フィブリンを用いておらず縫合するには強度が低いことが予想される。今後は、フィブリンを用いた人工血管の作製を視野に入れる必要がある。

②について。血管の収縮や弛緩は、序論でも述べたが神経から平滑筋、または血液から内皮、内皮から平滑筋に伝えられて起こる。また、内皮は血栓形成が起きないように、血管内腔面の保護を行っている。つまり、血管において内皮細胞は必要不可欠であるため、人工血管へ内皮細胞を導入しなければならない。内腔面側の保護は可能であると考えられるが、内腔面のシートの厚さが原因で、内皮から平滑筋のギャップ結合による伝達が十分に起きない可能性がある。そこで次のようなモデルを提案する。

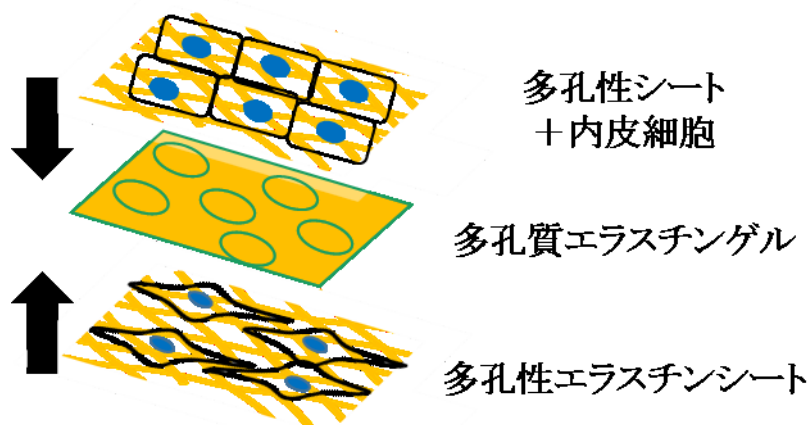


Fig.4-17 人工血管の新規案

冠動脈は弾性層板がネット様であるため、用いるシートも多孔性であることが望ましいと思われる。しかし、単なる多孔構造は強度低下に繋がり、その強度を補強するためI型コラーゲンを導入すると平滑筋細胞の合成型への転換が起きる可能性がある。IV型コラーゲンは基底膜を構成するコラーゲンであり、IV型コラーゲンが豊富に含まれる水晶体基底膜の弾性率が 820 kPa と報告があることから⁵³⁾、IV型コラーゲンはある程度の強度を持つと思われる。さらに、IV型コラーゲンは平滑筋細胞の収縮型への転換を促し⁵⁴⁾、生体血管において内皮細胞は基底膜と接触しているため、新しい組織工学的人工血管の構成材料に相応しいと考える。水溶性IV型コラーゲンをエレクトロスピンニング法によってシート化し、これをエラスチンシートと交互に組み合わせそれをエラスチン AE 混合ゲルで接着させて、内腔面に内皮細胞を接着させることができれば、内皮を媒介した収縮弛緩応答が可能な人工血管となることが予想される。

5 結論

エラスチンをシート状、ゲル状に加工した足場と血管平滑筋細胞を組み合わせた組織工学的人工血管は、各収縮・弛緩剤に応じた挙動を示した。また、この収縮、弛緩力はギャップ結合を媒介して行われていることが分かり、生体冠動脈に近い人工血管を開発できたと言える。この人工血管は、今までになかった冠動脈の代替血管としての使用が大いに期待できる。

6 謝辞

生体材料化学研究室に配属されてから今まで、難解で不思議で、しかし非常に興味深いこの生化学、生体材料化学という学問に引き込んで頂きました、堀内孝名誉教授、宮本啓一教授に深く感謝致します。これほどに熱中し、努力し、楽しかった学問はなく、この研究室で研究できたことを誇りに思います。

また、2年前より本研究・修士論文の作成だけでなく、様々な面でご指導、助言頂いた晝河政希助教、副査を担当頂きました湊元幹太准教授に深く御礼申し上げます。実験設備の使用に関してお世話になりました三重大学先端科学研究支援センターの小林裕子先生、近田登美子様、登川美奈様にも感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、助力して頂いた諸先輩方、後輩たちに感謝します。特に同じグループとしてサポートやアドバイスを頂いた、後藤耕太君、瀧口慎也君、倉田園加さんには大変お世話になりました。3人がいて本当に良かったです。また、研究生活を3年間共にした同期には迷惑をたくさんかけましたが、最後までやりきることができたのは同期の皆さんの助力あってこそだと思います。ありがとうございました。

最後に、6年という長い大学生活含め、24年間サポートしてくれた家族に感謝します。この大学生活、研究生活から学んだことを十分に生かして、来年度から社会人として社会に貢献できるよう邁進します。

令和2年 金澤友希

参考文献

- 1) 厚生労働省. 平成 30 年(2018)人口動態統計月報年計(概数)の概況.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai18/index.html>.
- 2) 久松隆史、三浦克之:わが国における心疾患の死亡率・罹患率の動向/日本循環器病予防学会誌,2018(53);1-8
- 3) Torsten Doenst *et al.*; PCI and CABG for Treating Stable Coronary Artery Disease. *Journal of the American college of cardiology* 2019; 73(8): 964-976
- 4) 石井庸介;冠動脈バイパス術に対する小口径人工血管の開発/日本医科大学医学雑誌 2007; 3(3):151
- 5) 赤池敏宏;生体機能材料学—人工臓器・組織工学・再生医療の基礎—/コロナ社(2005),p132-135
- 6) 神谷瞭ら;医用生体工学/培風館 2000:p175-176
- 7) LeMaitre Vascular, Inc. HP より引用:
<https://www.lemaitre.com/products/albograft-polyester-vascular-grafts>
- 8) TERUMO CORPORATION SEALPTFE HP より:
<https://www.terumo.co.jp/medical/equipment/me326.html>
- 9) 伊藤悦子,岡野光夫;人工血管血液接触面の構造とその特性/表面技術 1998;
49(7): 45-51
- 10) L. E. Niklason, *et al.*; Functional Arteries Grown in Vitro. *Science* 1999;
284(5413): 489-493
- 11) 児玉龍彦ら;血管生物学/講談社 1997
- 12) Warner, A.; Gap junctions in development-a perspective. *Seminars in Cell Biology*
1992; 3: 29-47
- 13) Marie B., *et al.*: Regulation of Cellular Communication by Signaling Microdomains in the
Blood Vessel Wall. *Pharmacological Reviews* 2014;66(2):513-569
- 14) 日本血管生物医学会:血管生物医学事典/朝倉書店(2011)
- 15) 堀川 公佑:組織工学的人工血管中膜モデルの開発/平成 28 年度修士論文
(2016)
- 16) 大山俊郎ら;弾性線維/共立出版株式会社 1992:p21-22、p154-155
- 17) M S Noor Sunba, *et al.*; Tumours of the anterior uvea. III. Oxytalan fibres in the
differential diagnosis of leiomyoma and malignant melanoma of the iris. *The
British journal of ophthalmology* 1980; 64(11): 867-874
- 18) Toshihiko Yajima, *et al.*; Elastic System Fibers in the Peridontal Tissues. *日本歯
周病学会会誌* 2004; 46(3): 175-184
- 19) UniProt Consortium sus scrofa Elastin
- 20) LAWRENCE B.,*et al.*; Structure of the Elastic Fiber: An Overview. *THE JOURNAL
OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* 1982, 79: 128-132,

- 21) Cay M. Kielty, *et al.*; Elastic fibres. *Journal of Cell Science* 2002 115: 2817-2828
- 22) J. P. Revel and M.J.Karnovsky: Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *Journal of Cell Biology* 1967; 33(3): C7-12
- 23) Maeda S., *et al.*: Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* 2009; 458(7238): 597-602
- 24) Daniel Chevallie, *et al.*: Connexin 43 a check-point component of cell proliferation implicated in a wide range of human testis diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013; 70(7): 1207-1220
- 25) Laird D., *et al.*; Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochemical journal* 1991; 273(1): 67-72
- 26) Ghayda Hawat and Ghayath Baroudi; Connexin 43 Hemichannels and Pharmacotherapy of Myocardial Ischemia Injury. *Novel Strategies in Ischemic Heart Disease* 2012; 10:189-218
- 27) Aasen T., *et al.*; Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene* 2019; 38(23): 4429-4451
- 28) Daniel A. Goodenough and David L. Paul; Gap Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009; 1(1): 1-19
- 29) 石崎 梓: 組織工学的人工血管モデルにおける収縮弛緩応答に関する研究 /平成 29 年度修士論文(2018)
- 30) 三田 百恵: 血管由来細胞外マトリックスを用いて組織工学的人工血管の作製および評価/平成 30 年度修士論文(2019)
- 31) 岡井正典: エラスチンゲルの力学特性の制御/平成 19 年度修士論文(2008)
- 32) Keiichi Miyamoto, *et al.*; Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. *International Journal of Biological Macromolecules* 2009; 45(1): 33-41
- 33) 九州大学大学院 医学研究院 付属心臓血管研究施設 分子細胞情報学部門より 血管平滑筋の収縮
- 34) Ulf Malmqvist and Anders Arner: Kinetics of contraction in depolarized smooth muscle from guinea-pig taenia coli after photodestruction of nifedipine. *Journal of physiology* 1999; 519(1): 213-221.
- 35) Adam C.*et al.*, Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation / Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall, *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 2011;31(2):399-407
- 36) Valentina Catto, *et al.*, *Vascular Tissue Engineering: Recent Advances Small Diameter Blood Vessel Regeneration*. hindawi publishing corporation 2014: 1-24
- 37) 堀江俊貴: Elastin を用いた血管平滑筋細胞の形質転換制御法の開発/平成 24 年度修士論文(2013)
- 38) John M. Clark and Seymour Glagov; Transmural Organization of the Arterial Media The Lamellar Unit Revisited. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 1985; 5(1): 19-34

- 39) Russell Ross; Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE* 1999; 340: 115-126
- 40) Guihua Tian, *et al.*; Therapeutic Effects of Wenxin Keli in Cardiovascular Diseases: An Experimental and Mechanism Overview. *Frontiers in Pharmacology* 2018; 9: 1-14
- 41) A. Wayne Orr, *et al.*; Molecular Mechanisms of Collagen Isotype-Specific Modulation of Smooth Muscle Cell Phenotype. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009; 29(2): 225-231
- 42) Pascal Maurice, *et al.*; Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: The elastokine concept. *Trends in cardiovascular medicine* 2013; 23: 211-221
- 43) Liliana Schaefer and Rento V. Iozzo; Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *Journal of biological chemistry* 2008; 283(31): 21305-21309
- 44) Richard E. Klabunde; Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *Cardiovascular Physiology Concepts* 2019
- 45) D. VOET ら; ヴォート基礎生化学 2014:p194-203s
- 46) Eugenia Vázquez-Rey and Juan Carlos Kaski; Cardiovascular Syndrome X and Endothelial Dysfunction. *Revista Española de Cardiología* 2003; 56(2): 181-192
- 47) Rajkumar Pyla, *et al.*; Metformin exaggerates phenylephrine-induced AMPK phosphorylation independent of CaMKK β and attenuates contractile response in endothelium-denuded rat aorta. *Biochemical Pharmacology* 2014; 92(2): 266-279
- 48) Erica A Wehrwein, *et al.*; Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Comprehensive Physiology* 2016; 6(3): 1239-1278
- 49) Jaiswal N. ,*et al.*; Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1991; 258(3): 842-850
- 50) Kanno S. and Saffitz JE.; The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology* 2001;10(4): 169-177
- 51) Emmanuella Delva, *et al.*; The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009; 1(2): 1-17
- 52) C.M. Kielty, *et al.*; Attachment of human vascular smooth muscles cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin. *Journal of Cell Science* 1992; 103: 445-451
- 53) Fisher RF and Wakely J.; The elastic constants and ultrastructural organization of a basement membrane (lens capsule). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 1976; 193(1113): 335-358
- 54) Johan Thyberg and Anna Hultgårdh-Nilsson; Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell and Tissue Research* 1994; 276(2): 263-271