

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

平成 18 年 度

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

門 園 英 樹

平成 18 年度 修士論文

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 Vascular Smooth Muscle Cells
using Elastin Scaffold*



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

門園 英樹

目次

1. 緒言	1
1-1 再生医療と組織工学.....	1
1-2 血管における組織工学.....	2
1-3 血管.....	3
1-3-1 血管の基本構造.....	3
1-3-2 動脈・静脈の構造.....	4
1-3-3 血管の疾患や病変.....	6
1-4 細胞外マトリックス.....	8
1-4-1 エラスチン.....	8
1-4-2 コラーゲン.....	9
1-5 平滑筋細胞.....	10
1-5-1 基本的形態と組織における役割.....	10
1-5-2 細胞－細胞外マトリックス間接着.....	10
1-5-3 インテグリン.....	11
1-5-4 細胞骨格.....	12
1-5-5 形質変換(分化と脱分化).....	13
1-5-6 収縮機構.....	15
1-6 本研究の目的.....	17
2. 方法	18
2-1 動脈構造・組成の検証.....	18
2-1-1 光学顕微鏡によるブタ大動脈血管の観察.....	18
2-2 エラスチンの影響による細胞の表現型解析.....	18
2-2-1 細胞の採取と継代培養.....	18
2-2-2 水溶性エラスチンの抽出.....	18
2-2-3 水溶性エラスチンの分類.....	19
2-2-4 エラスチン水溶液曝露.....	19
2-2-5 エラスチンゲル溶液曝露.....	19
2-2-6 ELISA 法による BrdU 細胞増殖試験.....	19
2-2-7 フローサイトメトリーによる細胞骨格タンパク(SM α -actin) 量測定.....	19
2-2-8 細胞骨格タンパク(SM α -actin) の形態変化における 定性評価(免疫化学染色).....	20

3. 結果	21
3-1 光学顕微鏡によるブタ大動脈血管の観察	21
3-2 ELISA 法による BrdU 細胞増殖試験	23
3-2-1 添加したエラスチンによる影響.....	23
3-2-2 3次元エラスチンゲル培養による影響.....	26
3-3 フローサイトメトリーによる細胞骨格タンパク(SM α-actin)量測定	27
3-3-1 添加した各分画エラスチンによる影響.....	27
3-3-2 3次元エラスチンゲル培養による影響.....	29
3-4 細胞骨格タンパク(SM α-actin)の形態変化における 定性評価(免疫化学染色)	31
3-4-1 添加したエラスチンによる影響.....	31
3-4-2 3次元エラスチンゲル培養による影響.....	33
 4. 考察	 34
4-1 ブタ大動脈血管壁の構造.....	34
4-2 エラスチンが平滑筋細胞の表現型に与える影響.....	34
4-3 分画エラスチンが与える影響の違い.....	37
4-4 エラスチンゲルが与える影響.....	37
 5. 結論	 41
 6. 参考文献	 42
 7. 謝辞	 44
 8. 付録	 45

語句説明

HASMC (Human Aorta Smooth Muscle Cell)	ヒト大動脈平滑筋細胞
PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	血小板由来増殖因子
bFGF (basic fibroblast growth factor)	塩基性線維芽細胞増殖因子
ECM (Extra Cellular Matrix)	細胞外マトリックス
PTFE (polytetrafluoroethylene)	ポリ四フッ化エチレン、テフロン
FAK (focal adhesion kinase)	インテグリン裏打ちタンパク質
Coll (Collagen)	コラーゲン
FN (Fibronectin)	フィブロネクチン
LN (Laminin)	ラミニン
OSP (osteopontin)	オステオポンチン
FB (fibrin)	フィブリン
VN (vitronectin)	ビトロネクチン
SM α -actin (Smooth Muscle α -actin)	細胞収縮骨格タンパク
SM1, SM2 (Smooth muscle myosin heavy chain)	平滑筋ミオシン重鎖
SMemb	胎児型平滑筋ミオシン重鎖
β -actin	非筋型細胞骨格タンパク
CALM	ミオシン軽鎖キナーゼを活性化する物質
MLCK (myosin light chain kinase)	ミオシン軽鎖キナーゼ
FBS (Fetal Bovine Serum)	ウシ胎仔血清
EGF (Epidermal Growth Factor)	上皮増殖因子
cAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate)	セカンドメッセンジャー
RhoA (Rho family)	収縮性のアクチン束形成に関与するシグナル分子
GDP (guanosine diphosphate)	グアノシン二リン酸
BTEB/KLF (basic transcription element binding protein/KLF)	脱分化に導く転写因子
Egr-1 (early growth response gene-1)	脱分化に導く転写因子
Gax	分化に導く転写因子
GATA-6 (GATA-binding protein 6)	分化に導く転写因子
EBP (elastin binding protein)	エラスチン結合受容体
PP (protective protein: cathepsin A)	カテプシン A
SASE (sialidase: neuraminidase)	ノイラミニダーゼ

1. 緒言

1-1 再生医療と組織工学

再生医療とは事故や病気等により損傷、失われた生体組織や器官などに対して細胞を用いて再生し治療を行うものとして大きく注目されている。

再生医療には2種類のアプローチがあり、ひとつは細胞移植である。細胞にはさまざまな種類が存在するが、再生医療では主に未分化細胞である幹細胞が用いられている。この細胞は分化する事によりあらゆる組織を形成する可能性を有する多能性細胞であり、このような細胞を組織の欠損部に移植することで移植した部位特有の再生が試みられている。

もうひとつのアプローチが組織工学的手法による試みである。これは細胞移植だけでは治療ができない大きく欠損した場合で、三次元構造を持つ生体組織を再生することを目的としている。組織工学は大きく3つの要素に分けられる(図 1-1)。臓器組織機能を再生するための“細胞”、その細胞を三次元的に培養するのに最適な基材としての“足場”、そして細胞の分化・増殖を制御する“サイトカイン”に分けられる。

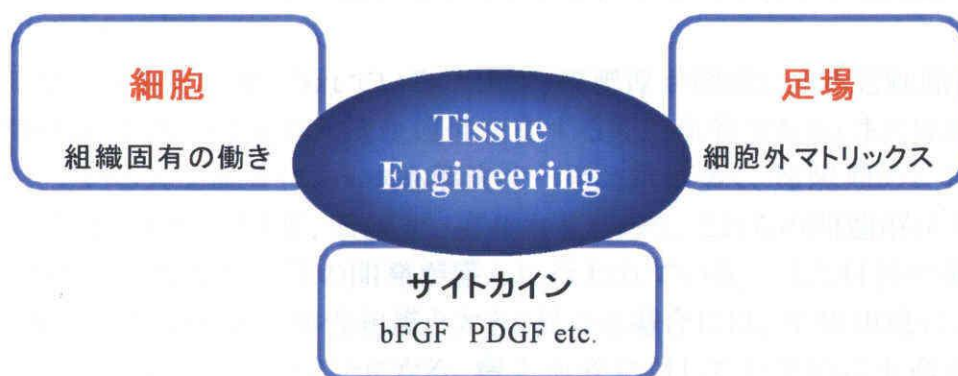


図 1-1 組織工学の3要素

この3つの要素が密接に関連し合うことではじめて成立するとされる。その為には、細胞本来の機能制御、細胞および細胞外環境との理解が必要不可欠である。しかし、現在の所これらの具体的な相互関係の解明は不十分であり未知な部分も多い。細胞の周りには、細胞外マトリックス(ECM: extracellular matrix)と呼ばれる物質が数多く存在し、代表的なものにタンパク質や糖類であるコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンがある。細胞外マトリッ

クスは細胞の間を満たし、細胞がばらばらになることを防ぎ、細胞の形態や機能を決定する役割を担っている。つまり、この細胞外マトリックスと細胞との特異性や機能制御に関する理解が組織工学の重要課題である。

1-2 血管における組織工学

臨床において使用される人工血管に必要な条件としては以下の事があげられる。生体適合性がよく、毒性、発がん性がなく、抗原性は最小限に抑えられていること、生体内において物理化学的に変性せず、耐久性に優れていること、操作性がよいこと、過剰な血栓形成がないこと、人工血管からの血液の漏出がないこと、感染に抵抗性であることなどである。

現在臨床利用されている人工血管には、ポリエステル(ダクロン)を使用した布製人工血管とポリ四フッ化エチレン(PTFE,テフロン)製人工血管が存在する。現在の人工血管の主流となっているのが、シールドグラフトと呼ばれ、上述の人工血管にゼラチンやコラーゲンでコーティング処理をした人工血管である。人工血管の材料に求められる性質として、生体反応の少ないことがあげられる。しかし、現在用いられている人工血管は剛直であり、管径の圧力依存性は生体血管と比べると極めて小さく、コンプライアンスが一致していないという問題がある。また、径 3mm以下の細い血管では、血栓が形成されやすく満足できるものは少ない。³⁾

現在、最も開発を困難とされているのが、内膜肥厚が問題になる冠動脈位および静脈位に用いる優れた抗血栓性を有する人工血管である。また臨床で使用されている人工血管においても解決すべき問題は多く、遠隔期のパンヌス形成、狭窄、血栓性閉塞、石灰化、劣化などがある。これらの問題解決に向けて、組織工学的人工血管の開発が盛んに行われている。また材料の弾性率が接触する生体組織の弾性組織と大きく異なる場合には、生体組織に非生理学的なストレスを与えることになる。宿主血管に対して力学的に不適合であるために、その接続部位や内壁に血栓が形成し血管の閉塞を誘発してしまうのである。そこでこのように流動によるストレスを生体血管と同様に感受して、生体血管のそれとコンプライアンスを同調させることができる、新しい弾性素材を用いた組織工学的人工血管の開発が切望されている。⁴⁾

1-3 血管

血管は血液を体内各部に流通させる管である。心臓から送り出された血液は大動脈を経由し全身に行き渡り、各動脈を通った血液は各種の器官・組織の毛細血管へと流れ込んでいく。毛細血管では栄養、代謝老廃物、呼吸ガスの交換などが血液と組織の間で行われる。毛細血管はやがて合わさりあいやがて太い静脈となり血液を心臓へと戻す。そして再び血液を全身へ送り出し循環させている。

血管は主に動脈、静脈、毛細血管からなり、それぞれ構造が異なる。血管壁は内膜、中膜、外膜の三層構造から構成されている(図 1-2)。

1-3-1 血管の基本構造

内膜

最内層にある内膜は内皮細胞の単層扁平上皮とその下の内皮下結合組織からなり、内皮細胞層は血管の内腔を被っていて、細胞の長軸と血流方向が平行になるような配向をしている。内皮細胞は血管内腔を滑らかにするだけではなく、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ型コラーゲン、ラミニン、エンドセリン、一酸化窒素、フォン・ウィルブランド因子を分泌する。内皮細胞の直下には基底膜、疎性結合組織と少数の縦走平滑筋細胞からなる内皮下層が存在する。

中膜

中間にある中膜は血管壁で最も厚い層である。中膜を構成する同心円状の細胞層は、拍動方向に対して平行に配向している平滑筋細胞からなっている(図 1-3)。平滑筋細胞は血圧を維持し血流の分布をコントロールするのに重要な働きをしている。平滑筋の層の間にはエラスチン繊維、Ⅲ型コラーゲン、プロテオグリカンが存在している。内膜と中膜の間には内弾性板、中膜と外膜の間にはエラスチンからなる外弾性板と呼ばれるものが存在する。中膜層は動脈において非常に発達している。

外膜

最外層の外膜は、主に縦走する線維性弾性組織からなっており、血管全体を取り囲み保護している。外膜は主に線維芽細胞、コラーゲン線維、縦走する弾性線維で構成されている。

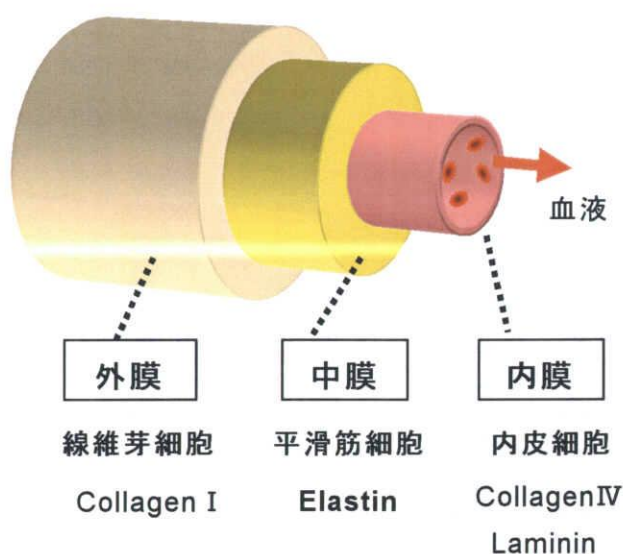


図 1-2 大動脈 3 層構造 ^{5) 6) 19)}

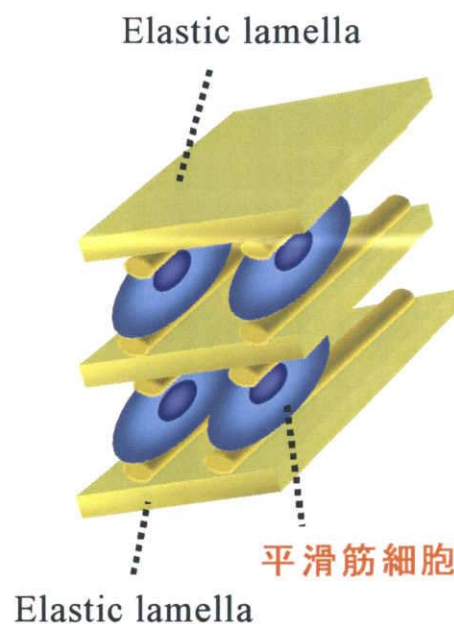


図 1-3 血管中膜構造 ²⁰⁾

1-3-2 動脈・静脈の構造

動脈

動脈の内膜は単層扁平の内皮細胞と、それを裏打ちする薄い結合組織からできている。大きな動脈では、内膜の外層で弾性線維の束が集まって2～3層の膜状構造をとっている。この弾性線維は中、大動脈では内弾性板というはっきりした1枚の膜として認めることができる。細い動脈では内膜の結合組織はほとんど認められていない。中膜は平滑筋と結合組織(特に弾性線維)でできている。平滑筋の大部分は血管を取り巻くように輪走している。一般に、大動脈、腕頭動脈、総頸動脈、鎖骨下動脈、総腸骨動脈、肺動脈のような太い動脈では中膜の弾性繊維が非常によく発達しておりこれを弾性型の動脈とよぶ(図 1-4)。これに対し、少し細い動脈では、平滑筋が発達しており筋型の動脈とよんでいる。太い動脈の弾性に富んだ構造は、心臓から血

液が拍出される際の収縮期圧を緩和させるとともに、拡張期にも一定の血圧を維持することに役立っている。一方、筋型の動脈は神経やほかの化学的な刺激により血管の内径を自在に伸縮させて、流れる血液の量を調節することができる。外膜はまばらな結合組織(主に縦走するコラーゲン線維)でできている。筋型動脈では中膜との境に、弾性線維が膜状に発達して外弾性板を作る事もある。比較的太い動脈では血管壁を養うための血管が外膜にみられる。

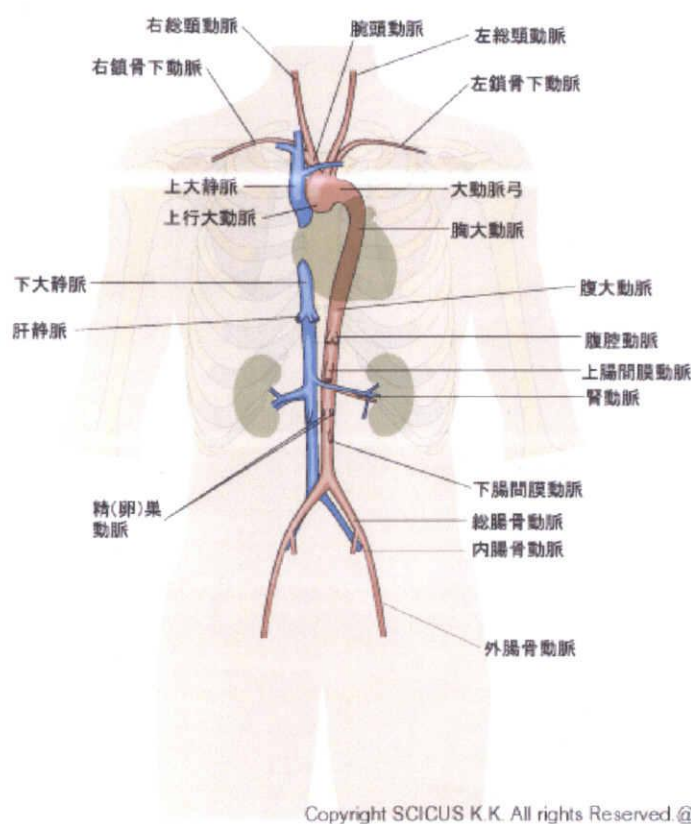


図 1-4 体内のさまざまな血管 ³⁹⁾

特に大動脈は心臓から送り出される血液の圧力に対する耐性が必要となる。組織の持つ耐性の大部分は弾性繊維による。弾性繊維は、疎性結合組織では細長くて分岐しているが、脊柱の黄色靭帯や大血管にある弾性板では、太い束を作っている。弾性線維は、結合組織にある線維芽細胞、血管平滑筋細胞、弾性軟骨の軟骨細胞で作られる。弾性線維は主にエラスチンでできており、その周囲は微細線維(microfibril)で取り囲まれている。その微細線維の直径は 10nm で、糖蛋白のフィブリリンでできている。弾性線維の形成過程を見ると、微細線維がまず形成されてエラスチン分子が沈着するための足場を形成し、その間隙にエラスチンが沈着していき、微細線維は成

長中の線維の末端へと移動していく。弾性線維は静止長の 1.5 倍まで引き伸ばすことができ、再びもとの長さに戻ることができる。大動脈中にはエラスチンは約 70%含まれるとされていて、弾性を持つ事により血压に耐えることができる(図 1-5)。大動脈においてエラスチンタンパクは必要不可欠である。⁵⁾

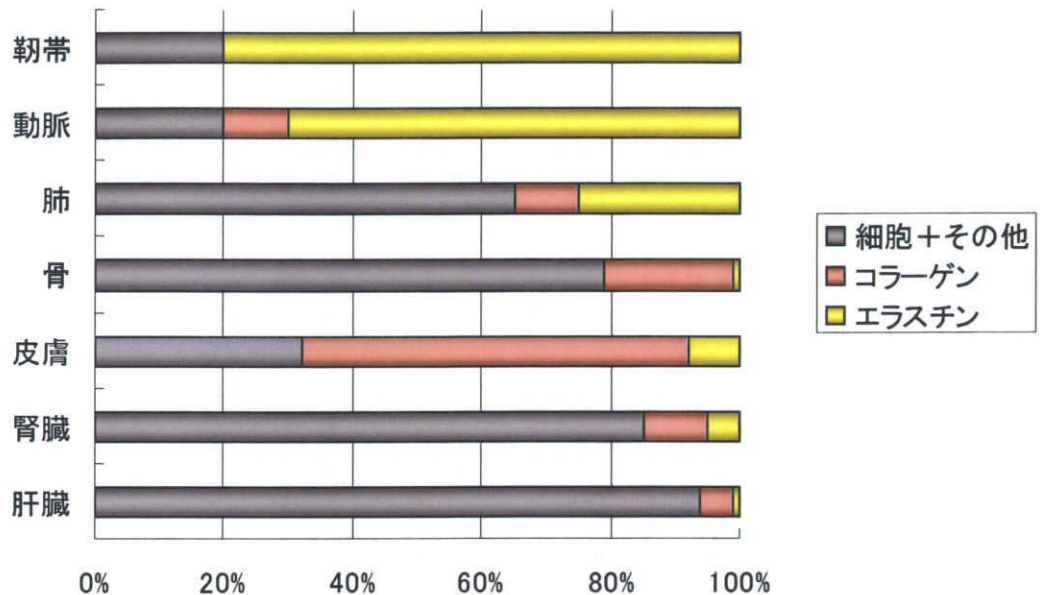


図 1-5 組織中の細胞外マトリックス分布図

静脈

静脈の壁も3層構造からなるが、動脈に比べて壁の厚さが薄く、弾性線維と平滑筋が少ないのが特徴である。静脈の内膜は単層で扁平の内皮細胞と、その下の薄い結合組織でできているが、太い静脈では縦走する平滑筋線維も含まれる。管径が 15~20 μ m 以上の静脈では、内膜がひだ状に伸びだして静脈の弁をつくっている。中膜は、輪走する平滑筋との中の結合組織からなるが、筋線維は動脈に比べてまばらである。外膜は比較的厚く豊富な結合組織の中に縦走する平滑筋を認めることもある。⁵⁾⁶⁾

1-3-3 血管の疾患や病変

血管組織は胎児期において、安定に組織化していき血管のネットワークを形成し発達していく。しかし、遺伝子疾患や血管壁のマトリックス欠如などの血管の疾患や病変により、血管の形態形成に異常をきたす。これにより組織の虚血や組織の崩壊などを引き起こす(図1-6)。

その中でもエラスチンの欠如により、内皮下において細胞の異常な増殖が起

き、血管の閉塞を引き起こす(図1-6b)。また部分的なエラスチンの崩壊により細胞の異常増殖が起き閉塞することも知られている(図1-6C)。また他の細胞外マトリックス(コラーゲンやフィブリン)の欠如により、血管組織の崩壊が起こることも現在までの研究で分かっている(図1-6a)。以上から細胞外マトリックスが細胞の機能を制御し安定した組織を維持することが示されている。

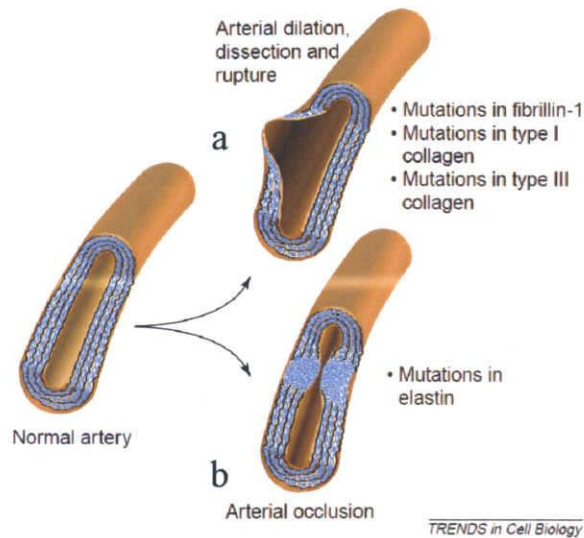


図1-6 遺伝子疾患における血管病²¹⁾

(a)コラーゲン、フィブリン欠損による血管の破壊・破裂
(b)エラスチン欠損による閉塞

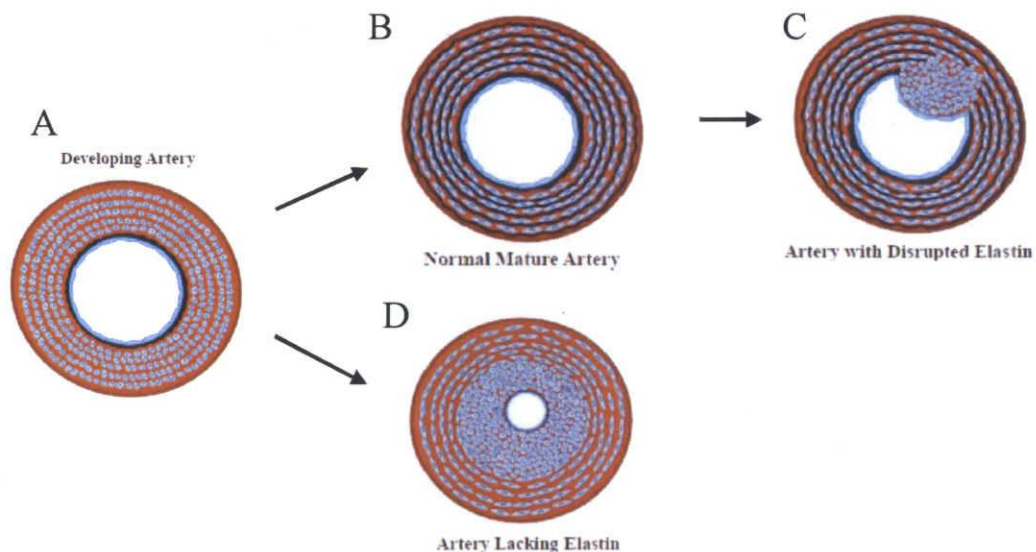


図1-7 エラスチン欠如による血管病²²⁾

A:胎児期の血管 B:正常成熟血管 C:部分的エラスチンの崩壊
D:エラスチン遺伝子欠損による血管

1-4 細胞外マトリックス(ECM:extra cellular matrix)

動物の体は60兆個とも言われる細胞から構成されているが、身体を構成しているのは細胞だけではない。細胞が心臓など身体の各器官を正しく形成するためには、細胞の外側で細胞どうしの接着や引張りおよび圧縮などの外圧に対抗するために強度を持った構造の存在が必要となる。ECMはこのような働きをする物質の総称で、体内において細胞外の空間を充填する物質であり、また、ECMは機能的組織の物理的構築、(例:軟骨や骨)、細胞接着による細胞の足場提供、細胞増殖因子などの保持や提供、(例:ヘパラン硫酸に結合する細胞増殖因子FGF)、細胞増殖、細胞分化、細胞移動など多種多様な役割、細胞の制御を行っている。ECMの主要成分は、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチンやラミニン等といった糖タンパク質であるが、この種類や組成は組織ごとに極めて多様性に富むことが知られている。細胞は常にその時々に応じて最適化された、ECMをまとっている。さらに近年では、ECMとの相互作用を介した、細胞の増殖・分化制御シグナルなどの機能が明らかになりつつあり、細胞機能制御因子としてのECMの役割が注目されている。

1-4-1 エラスチン(Elastin)

エラスチンは分子量が約67 KDaの細胞外マトリックスの一つであり、組織から酸、アルカリ、アルコール等で処理後に残る、不溶性タンパク質と定義される。組織の伸縮性、弾性を生み出す繊維状タンパク質で、大動脈、靱帯、肺、皮膚、結合組織に発現している。特に、動脈の中膜に多く含まれ、平滑筋細胞との相互関係が注目されている。エラスチンは、一次構造に疎水性側鎖を含むアミノ酸が約92%を占めており、エラスチン凝集体の収縮・弛緩により、立体構造が容易に復元する。エラスチンの特異的なアミノ酸配列をとってVGVAPG (ValバリンーGlyグリシンーValバリンーAlaアラニンーProプロリンーGlyグリシン)構造を有していることが知られている。また、生体内において以下のような架橋構造を形成することで、その弾性・不溶性・熱安定性を有している。

<Elastinの構造>

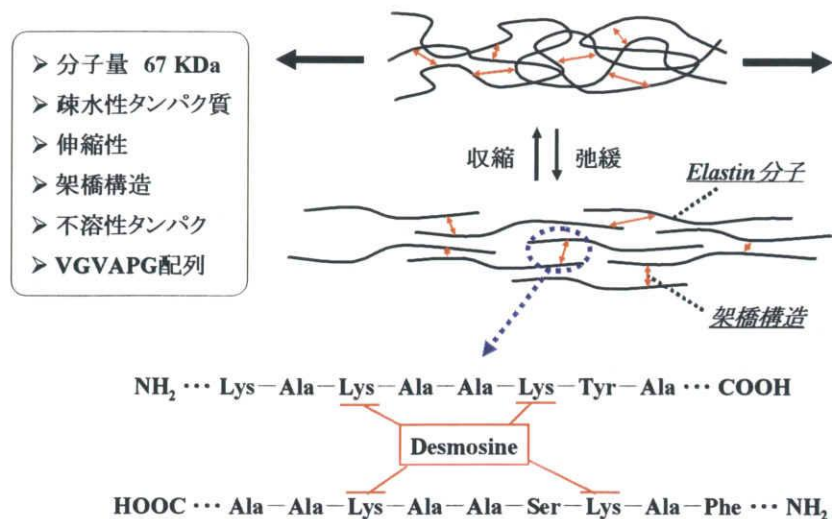


図1-8 エラスチンの構造⁷⁾

1-4-2 コラーゲン(Collagen)

コラーゲンは、骨・腱・真皮・軟骨などの結合組織に多く存在し、体内での力学的な強度を担っている。コラーゲンのペプチド鎖を構成するアミノ酸は、“ $\text{Gly}-\text{Pro}-\text{Hyp}$ ”と、グリシンが3 残基ごとに繰り返す一次構造を有する。また、分子量10 万程度の、1 本のペプチド鎖はトロポコラーゲンと呼ばれる。多くの型のコラーゲンは、トロポコラーゲンが3 本集まり、らせん構造を形成する。I 型コラーゲンの長さはおよそ300 nm、太さは1.5 nm ほどである。ヒトのコラーゲン蛋白質は30 種類以上あることが報告されており、例えば、真皮、靱帯、腱、骨などではI 型コラーゲンが、関節軟骨ではII 型コラーゲンが、上皮組織の裏打ち構造である基底膜ではIV 型コラーゲンが主に含まれている。コラーゲンの機能は、生体の形態維持や保護各臓器間の結合などの物理的機能と考えられてきたが、最近では生物学的役割として、血小板凝集の誘発、血小板からの顆粒の放出、各種細胞の基質、細胞の分化、骨や歯の石灰化、創傷の治癒促進、光や物質の透過性を維持などが知られている。

1-5 平滑筋細胞

1-5-1 基本的形態と組織における役割

平滑筋は不随性の筋収縮に関与しており、胃、腸、子宮、血管などに存在する。迅速に収縮することはできず緩やかな収縮で最大張力に達するには5秒かかる。また骨格筋や心筋よりも長時間にわたって収縮を行い、長時間にわたって張力を保持できるので、そのような状況が必要な臓器や組織に存在している。

平滑筋細胞は細長い紡錘形の細胞で長さは約 0.2mm、直径は 5~6 μm である。細胞の中央には2つかそれ以上の核小体を持つ楕円形の核があり、細胞の両端は細くなっている。平滑筋が収縮すると、核はらせん状に縮まる。平滑筋細胞の核周囲の細胞質、特に核の両端には多数のミトコンドリア、ゴルジ装置、粗面小胞体、滑面小胞体のほか、グリコーゲンなどの封入体がある。このような細胞小器官に加え、平滑筋の細胞質には、細いフィラメント(7 nm)や太いフィラメント(15nm)が様々な方向に走っている。細いフィラメントはアクチンからなり、太いフィラメントはミオシンからなり、これが細胞の収縮に関与している。⁷⁾

1-5-2 細胞－細胞外マトリックス間接着

多細胞生物においては、個々の細胞は独立して存在しているのではなく、細胞同士が付着、あるいは細胞が細胞外マトリックスに接着し存在する。接着には細胞同士の細胞間接着 (Cell-Cell adhesion) と、細胞－細胞外マトリックス接着 (Cell-ECM adhesion) がある。細胞接着の基本原理は、細胞同士あるいは細胞とマトリックスが直接接触して付着しているということであるが、細胞は接着のために細胞骨格を動員した細胞接着のための構造体を持つこともある。

細胞接着は、細胞接着分子の分子間相互作用によって担われ、接着構造体も接着分子を中心に形成される。細胞接着の様相は、細胞や組織の種類によって多様である。一般に細胞同士は、アドヘレンス・ジャンクション、タイトジャンクション、デスモソームといった接着構造を形成する。一方、細胞と細胞外マトリックスはヘミデスモソームやインテグリンといった接着構造を介して接着する。この時、細胞の下部には、接着斑 (focal adhesion) と呼ばれる(図1-9)。構造ができる。接着斑が形成されると、FAK (p125 focal adhesion kinase) が自己リン酸化し、シグナル伝達が始まる。また、カドヘリンやインテグリンのよ

うな典型的な細胞接着分子は、その細胞内ドメインで細胞骨格と結合しており、アクチンフィラメントなどを動員した接着構造体の構築を行う。

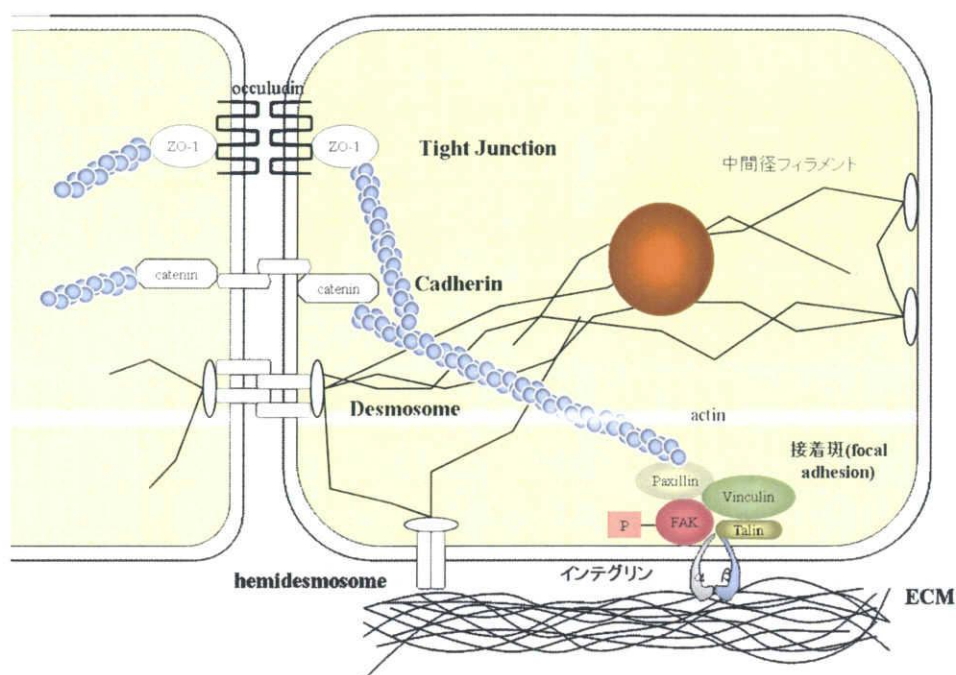


図1-9 細胞間、細胞－基質間結合⁸⁾

1-5-3 インテグリン(Integrin)

インテグリンという名前は、細胞外で細胞外マトリックスに結合するなど細胞内外を統合(integrate)することから命名された。インテグリンは、細胞外マトリックスへの接着において中心的役割を果たす細胞表面の接着レセプタータンパクで、分子量は約140 kDa 前後である。細胞外マトリックスへの物理的な接着を単に媒介するだけでなく、細胞外マトリックス自体が有する様々な情報を解読する役割も果たす。構造的には、 α 鎖と β 鎖の2本のサブユニットのヘテロダイマーで、 α 鎖には19種類、 β 鎖には8種類の異なるタイプが見つかっており、それらの組み合わせにより少なくとも24種類の異なるインテグリンヘテロダイマーがこれまでに同定されている。インテグリンはほぼすべての細胞に発現しているがその種類は、細胞のタイプにより異なる。インテグリンは、細胞外ドメインでラミニンやフィブロネクチンのような細胞外マトリックスのリガンドと結合する一方で、細胞内領域で様々なシグナル伝達因子やアクチン結合タンパクと直接あるいは間接的に結合し、細胞形態の維持、細胞増殖、といった情報を細胞内に伝達する。インテグリンを介して細胞が細胞外マトリックスの接着蛋白質に結合すると、FAK (focal adhesion kinase) というチロシンキナーゼの自己リ

ン酸化がおこり、それに続き、ドッキングタンパクやアダプタータンパクのチロシンリン酸化が2次的に誘導される。インテグリンからのシグナル伝達経路は、それ自身が単独で働くものではなく、複雑に働いており、このようなインテグリンを介するこのようなシグナル伝達経路は、未解決の部分多い。

そのなかで平滑筋細胞に存在するインテグリンとリガンドとなるマトリックスの関係が明らかになってきている(表1-1)。このようなインテグリンとリガンドの結合により細胞内のシグナリングに関与している。しかし、エラスチンとインテグリンとの相互作用に関する報告はされておらず、エラスチンと平滑筋細胞の詳細なレセプターは解明されていない。

表 1-1 平滑筋細胞のインテグリンと認識リガンド²³⁾

	インテグリン	平滑筋細胞認識リガンド
$\beta 1$	$\alpha 1 \beta 1 = \text{CD49a/CD29}$	Coll I II III IV VIII, LN 1
	$\alpha 2 \beta 1 = \text{CD49b/CD29}$	Coll I VIII
	$\alpha 3 \beta 1 = \text{CD49c/CD29}$	FN, Coll I
	$\alpha 4 \beta 1 = \text{CD49d/CD29}$	-
	$\alpha 5 \beta 1 = \text{CD49e/CD29}$	FN, FB
	$\alpha 6 \beta 1 = \text{CD49f/CD29}$	LN 1
	$\alpha 7 \beta 1$	LN 1
	$\alpha 8 \beta 1$	-
	$\alpha 9 \beta 1$	-
	$\alpha v \beta 1$	VN, FN, OSP
$\beta 3$	$\alpha v \beta 3 = \text{CD51/CD61}$	VN, FN, LN1, Coll I IV, OSP, FB
$\beta 5$	$\alpha v \beta 5 = \text{CD51/-}$	VN, OSP

1-5-4 細胞骨格

動物の体をつくる細胞にはそれぞれ固有の形がある。たとえば、平滑筋細胞は紡錘状、内皮細胞は敷石状、ヒトの赤血球は円盤状、筋肉線維は紡錘形、白血球はアメーバ形などである。細胞の形が細胞膜の輪郭によって決まっているかのような誤解があるが、これは硬い細胞壁をもつ植物や細菌の細胞の

話で、動物細胞にはあてはまらない。細胞膜は脂質二重層からできており流動的に形を変える。動物細胞はその内部に硬いタンパク質性の構造物、すなわち、細胞骨格をもっており、これが細胞の形づくりや形の維持に働いている。細胞骨格は微細線維、微小管、中間径フィラメントのそれぞれ異なる3種類の分子により構成される。これらの分子構造物が細胞内を縦横に走り、細胞を形づくり、形態を維持している。細胞が形を変える際には、これら構造の新生、解体、配置変換が起こる。また、細胞内の多くの高分子や細胞小器官は細胞骨格に結合し、細胞内で一定の位置に保たれている。これら異なる細胞骨格が互いに機能を分担しながら1つの細胞内に共存している多様性が細胞骨格の特徴である。⁷⁾

1-5-5 形質変換(分化と脱分化)

血管平滑筋細胞は、前駆細胞から分化型細胞、分化型細胞から脱分化細胞への形質転換を遂げる。前者の機序は現在詳しいことは分かっていないため、ここでは後者の形質転換について説明する。

平滑筋細胞には二つの表現型が存在することが知られている。正常の血管平滑筋細胞は動脈の中膜層に存在し、収縮・弛緩を行っている。この成熟した平滑筋細胞は収縮型と呼ばれている。収縮型平滑筋細胞は紡錘形の単核細胞で、増殖・遊走能や細胞外マトリックス産生能を持たない。そのためミトコンドリア、ゴルジ装置、粗面小胞体、リボソームなどの細胞内小器官に乏しく、多数の収縮に関する筋原線維を持つ。これに対し動脈硬化巣内膜、冠動脈再狭窄部の新生内膜などにみられる平滑筋細胞は合成型と呼ばれる。この型は増殖・遊走し細胞外マトリックスを産生する。細胞内小器官に富んでいるが筋原線維は乏しい。

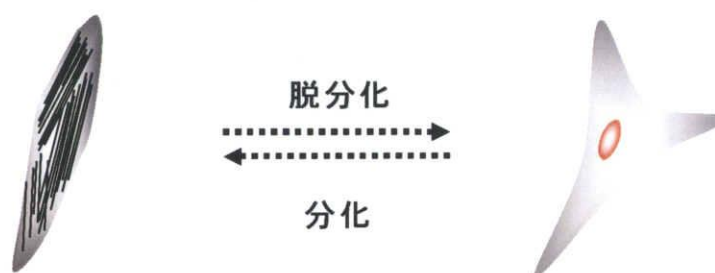


図 1-10 平滑筋細胞の形質変換(概念図)

平滑筋細胞が合成型から収縮型への移行することを分化、また収縮型から合成型へは脱分化・形質変換と呼ばれる(図 1-10)。この形質転換に伴い平滑筋細胞の分子マーカー発現が変化する。平滑筋の分子マーカーとして SM- α アクチン、ミオシン重鎖、カルポニン、カルデスモン、SM22 α 、 β -トロポミオシン、 α 1 インテグリンなどが挙げられ、これらの分子マーカーは平滑筋細胞の収縮に関与する器官であり、収縮型細胞では発現が増加する。また合成型では減少することが知られている(表 1-2)。

表 1-2 平滑筋細胞の表現型における特徴と発現タンパク⁹⁾

収縮型	表現型	合成型
正常	状態	血管傷害、新生
血管収縮 血流調整	機能	増殖・マトリックス産生 血管修復
筋原線維	発達器官	細胞内小器官
	タンパク発現	
↑ (増加)	SM α -actin	↓ (減少)
↑	SM1、SM2	↓
↑	カルポニン	↓
↑	カルデスモン	↓
↑	SM22	↓
↑	α 1 インテグリン	↓
↓	SMemb	↑
↓	β -actin	↑

1-5-6 収縮機構

収縮の様式は“フィラメント滑り説”に従うが、ある瞬間に収縮するのは細胞全体ではなく細胞の一部のこともある。収縮力は、細胞内で中間径フィラメントによって伝えられる。この中間径フィラメントはビメンチン、デスミンからなる。アクチンと中間径フィラメントは α -アクチニンと暗調小体(dense body)と結合している。暗調小体は、細胞質のなかや細胞膜の細胞質側にみられる。収縮力は筋原線維と暗調小体を介して中間径フィラメントに伝わる。筋原線維は細胞をねじるようにして短縮する。

ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントとの存在比は、横紋筋の1:2に対し、1:10~20である。横紋筋と同じく収縮は Ca^{2+} により制御されるが、アクチン側調節ではなく、ミオシンL鎖の Ca^{2+} 依存的リン酸化によるとされる。

これら収縮器官による平滑筋細胞の収縮機構は以下の通りである。

- (1) 神経インパルスやホルモンシグナルによって、カルシウムイオンが細胞内へ流入する。
- (2) 細胞内に増加した Ca^{2+} がカルモデュリンと結合(Ca-CALM)する。
- (3) この複合体がミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)と結合し(Ca-CALM-MLCK)、非活性であったミオシン軽鎖キナーゼは活性型となる。
- (4) これがATPを利用し、ミオシン軽鎖をリン酸化する。
- (5) リン酸化されたミオシン軽鎖(pLC)によってミオシンは、アクチンと反応できるようになり、収縮を行う。
- (6) 収縮後、細胞内にあるフォスファターゼによってミオシンLCから脱リン酸化が行われる。
- (7) ミオシンはアクチンと反応ができなくなり弛緩が生じる。

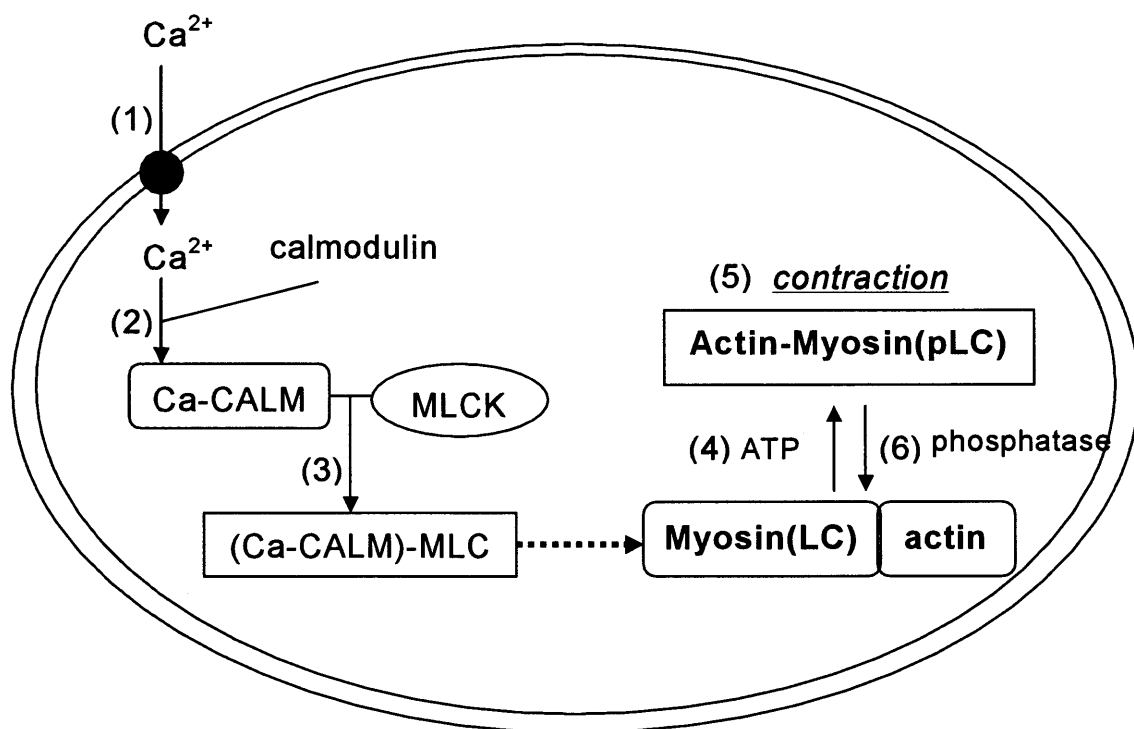


図 1-11 平滑筋細胞の収縮機構¹⁸⁾

このような伝達経路をとり、収縮を行っている。またカルボニンやカルデスモンといったアクチン結合タンパク質による収縮制御も推定されているが、その詳細についてはまだ分かっていない。

平滑筋細胞は細長い形状をし、骨格筋や心筋とは異なりフィラメントが規則正しく配列していないので横紋が存在しない。

1-6 本研究の目的

現在、組織の再生医療に関する研究として組織工学というものが注目され細胞・足場・サイトカインの相互作用についての研究がなされている。この細胞の足場となる細胞外マトリックスの研究において、マトリックスが組織構造を支える力学的な働き以外にも、細胞の機能を制御する役割を担うことが明らかにされつつある。

本研究室においても細胞と足場（細胞外マトリックス）を用いた組織工学の研究として「エラスチン」という細胞外マトリックスに注目してきた。その過去の研究より、エラスチンマトリックスに対して平滑筋細胞がそのマトリックスを認識し高い接着性を有することが確認され、組織再生用材料としての有用性が示された。

そこで本実験の目的として、エラスチンが平滑筋細胞に与える影響、特に平滑筋細胞の形質変換に与える影響について検証することを目的とした。

エラスチンは大動脈に 70%含まれるとされており、エラスチンなしでは大動脈再生は不可欠である。この生体内タンパク質であるエラスチンを足場とした人工組織作製が可能となれば、生体適合性、生分解性を有する血管代用品としての応用が期待できる。

2. 方法

この章では動脈構造・組成の検証、エラスチンの影響による細胞の表現型解析における実験方法を述べる。詳細な実験手順は 8 章付録に掲載した。

2-1. 動脈構造・組成の検証

2-1-1. 光学顕微鏡によるブタ大動脈血管の観察

ブタ大動脈血管構造を詳しく観察するために、組織の断面切片を作製し光学顕微鏡を用いて観察した。三重県松坂食肉流通センターから頂いた屠畜直後の大動脈組織を 2.5%グルタルアルデヒド(0.1M PBS 中)で 4 時間前固定した。その後、10%サッカロース溶液で 4 回洗浄し、2%オスミウム酸(0.05M PBS 中)で 30 分後固定した。その後、35%、50%、70%、95%エタノールを順に 10 分、100%エタノールを 10 分×4 回で脱水処理を行った。100%エタノール:エポキシ樹脂(1:1)を室温で 1 時間、エポキシ樹脂を室温で 1 日浸透させ、再びエポキシ樹脂を取り替えて 2 日間 60℃に保ち固化させた。包埋後、試料を小片に切り分け、ガラスナイフで厚さ 350nm の切片を作成し、ワイゲルト染色をして光学顕微鏡にて組織構造を観察した。(付録 8-3 参照)

2-2. エラスチンの影響による細胞の表現型解析

2-2-1. 細胞の採取と継代培養

Cell systems 社から購入したヒト大動脈平滑筋細胞を 37℃/5%CO₂ インキュベーター内で培養した。培地は CS-C を用い、3 日に 1 度培地交換を行った。sub-confluent(70%~80%)ほどに増殖した時点で再びトリプシン処理にて HASMC を剥離させ、細胞懸濁液を作成し継代培養を行った。(付録 8-2 参照)

2-2-2. 水溶性エラスチンの抽出

三重県松坂食肉流通センターから頂いたブタ大動脈から中膜層以外の部分を除去し、細かくミンチにした後、エタノールで脱水を行い乾燥させた。精製した不溶エラスチンをシュウ酸処理し上澄み液を透析チューブに入れ、外液の pH が 5~6 程度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をし、上澄み液を凍結乾燥させ水溶性エラスチンを得た。(付録 8-4 参照)

2-2-3. 水溶性エラスチンの分類

抽出した水溶性エラスチンを数平均分子量、凝集温度、ゲル弾性率によって各分画に分類した。本実験では各分画ElastinA-Eの名称を使用した。(付録8-4-3 参照)

2-2-4. エラスチン水溶液曝露

細胞を 10%FBS/CS-C 培地の入った培養フラスコに播種し 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養した。その後、培養液を吸引し PBS で洗浄し、各濃度のエラスチン水溶液で 3 日間曝露後測定を行った。

2-2-5. エラスチンゲル溶液曝露

細胞を 10%FBS/CS-C 培地の入った培養フラスコに播種し 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養した。その後、培養液を吸引し PBS で洗浄し、エラスチンコアセルベーションゲル溶液(濃度 20%)を加えその上に培地を添加し(ゲル : 培地 / 1 : 1v) 3 日間曝露後測定を行った。

2-2-6. ELISA 法による BrdU 細胞増殖試験

96 穴プレート上に confluent に培養した HASMC にエラスチン水溶液を曝露した。エラスチン水溶液を各濃度(10,50,100,200 μ g/ml)で調整し 100 μ l ずつ各 well に加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 72h 培養した。各ウェルに 10 μ l の BrdU ラベリング溶液を加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 6h 培養した。十分に洗浄した後、固定液を各 well に 200 μ l ずつ加え、-20°C で 30 分間細胞を固定した。洗浄後、各 well に 100 μ l のヌクレアーゼ使用液を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。再び洗浄し、anti-BrdU-POD 抗体使用液を 100 μ l ずつ加え、37°C で 30 分間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄後、100 μ l の peroxidase 基質を加え、室温で positive サンプルが緑色を呈するまでインキュベートした。サンプルの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。(付録 8-5 参照)

2-2-7. フローサイトメトリーによる細胞骨格タンパク(SM α -actin)量測定

平滑筋細胞を confluent になるまで培養し、トリプシン処理にて HASMC を剥離させ、細胞懸濁液を作成し 100G(800rpm1 分間)で遠心分離した。70%エタノールを加え 5 分間固定した後、100G(800rpm1 分間)で遠心分離した。1%BSA/PBS,0.1%を加え 5 分放置した後、100G(800rpm1 分間)で遠心分離した。細胞懸濁液に抗 SM α -actin-FITC を加え、暗室室温で 30 分インキュベートした。PBS を 2ml 加え再懸濁し、100G(800rpm1 分間)で遠心分離した。その後上澄み液を吸い取った。測定直前に細胞を PBS 500 μ l を加え再懸濁し、セルストレーナーを通して測定した。(付録 8-6 参照)

2-2-8. 細胞骨格(SM α -actin)の形態変化における定性評価(免疫化学染色)

細胞骨格タンパク、SM α -actin を免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)を用いてその形態変化を観察した。8 穴チャンバー上に confluent 培養した HASMC にアセトン/メタノール(1:1)を添加し-20℃/5 分間静置し固定した。1%BSA/PBS を加え 20 分放置し、不特定部位への 1 次抗体の吸着を抑えた。一次抗体として mouse anti-SM α -actin antibody (1:50~100)を 200 μ l/well 添加し 4℃で over night 静置した。十分に洗浄後、二次抗体には Goat anti-Mouse immunoglobulins labeled with FITC/PBS(1:200) を 200 μ l 添加し室温で 90 分間静置した。その後、十分に洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。(付録 8-8,9 参照)

3. 結果

3-1 光学顕微鏡によるブタ大動脈血管の観察

〔結果〕

ワイゲルト染色法を用いて、ブタ大動脈、ブタ脾臓を染色した。

使用した大動脈は内径 16.0mm、血管壁厚み 1.5mm。染色した画像を示す(図 3-1,2)。染色結果として、紫色を呈したことから、ブタ大動脈にエラスチンの存在が確認された。またその層間が赤色を呈したことから細胞の存在を確認することができた。この染色により血管壁はエラスチン層間に細胞が存在し、この層構造の連続からなっていることが示された。

またブタ脾臓では、赤色を呈したことによりその大部分が細胞からなる構造体であることが示された。部分的に紫色を呈したことによりエラスチンも少量含まれていることが示された(図 3-3)。

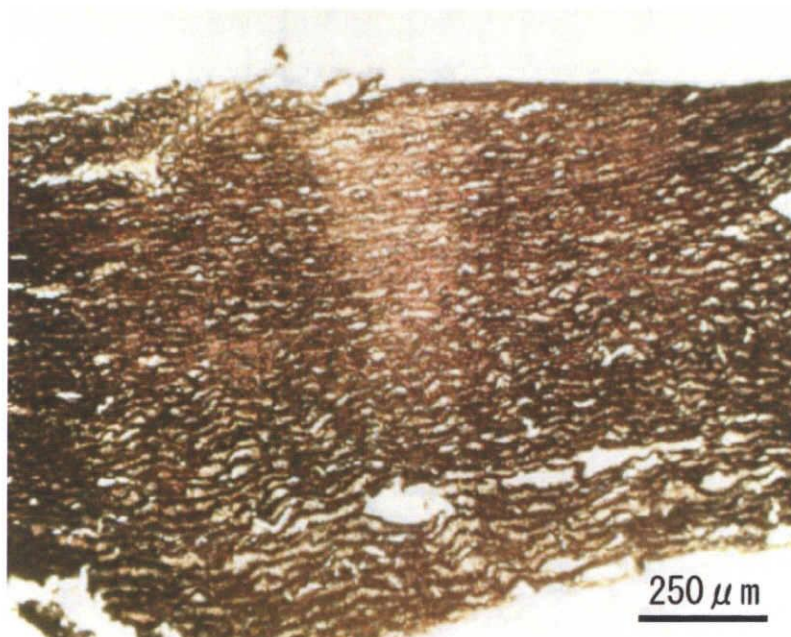


図 3-1 ブタ大動脈血管 (scale bar : 250μm 倍率×100)

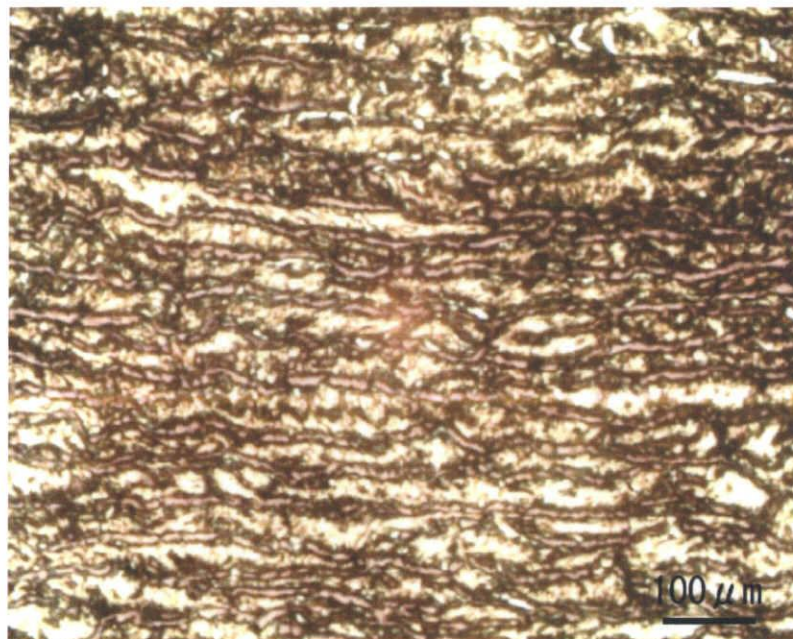


図 3-2 ブタ大動脈血管 (scale bar : 100μm 倍率×200)

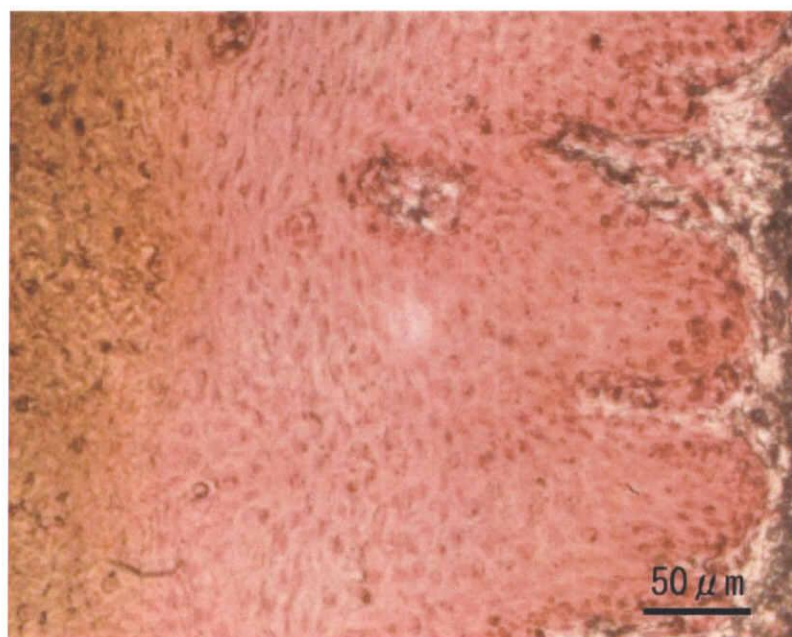


図 3-3 ブタ脾臓 (scale bar : 50μm 倍率×400)

3-2 ELISA 法による BrdU 細胞増殖試験

〔結果〕

3-2-1. 添加したエラスチンによる影響

エラスチンの培地添加による細胞増殖への影響を検証した。結果、エラスチン A～E の全分画において細胞増殖に影響を与えないことが示された。エラスチン A、B、C では濃度依存的に細胞の増殖を抑えた。エラスチン D、E では濃度依存性は見られなかったが、細胞の増殖を刺激・影響を与えないことが示された。

エラスチン A では $10\ \mu\text{g/ml}$ で 25%、 $50\ \mu\text{g/ml}$ で 33%、 $100\ \mu\text{g/ml}$ で 34%、 $200\ \mu\text{g/ml}$ で 34%の増殖抑制を示すことが確認できた(図 3-4)。エラスチン B では $10\ \mu\text{g/ml}$ で 4%、 $50\ \mu\text{g/ml}$ で 10%、 $100\ \mu\text{g/ml}$ で 12%、 $200\ \mu\text{g/ml}$ で 12%の増殖抑制を示すことが確認できた(図 3-5)。エラスチン C では $10\ \mu\text{g/ml}$ で 16%、 $50\ \mu\text{g/ml}$ で 22%、 $100\ \mu\text{g/ml}$ で 28%、 $200\ \mu\text{g/ml}$ で 26%の増殖抑制を示すことが確認できた(図 3-6)。

また FBS を加えた培地にエラスチンを添加した影響についても検証した。結果、エラスチン A,B ではコントロールに対して 20%、C に関しては 15%の増殖抑制をした。エラスチン D,E に関しては増殖に影響を与えないことが示された(図 3-9)。

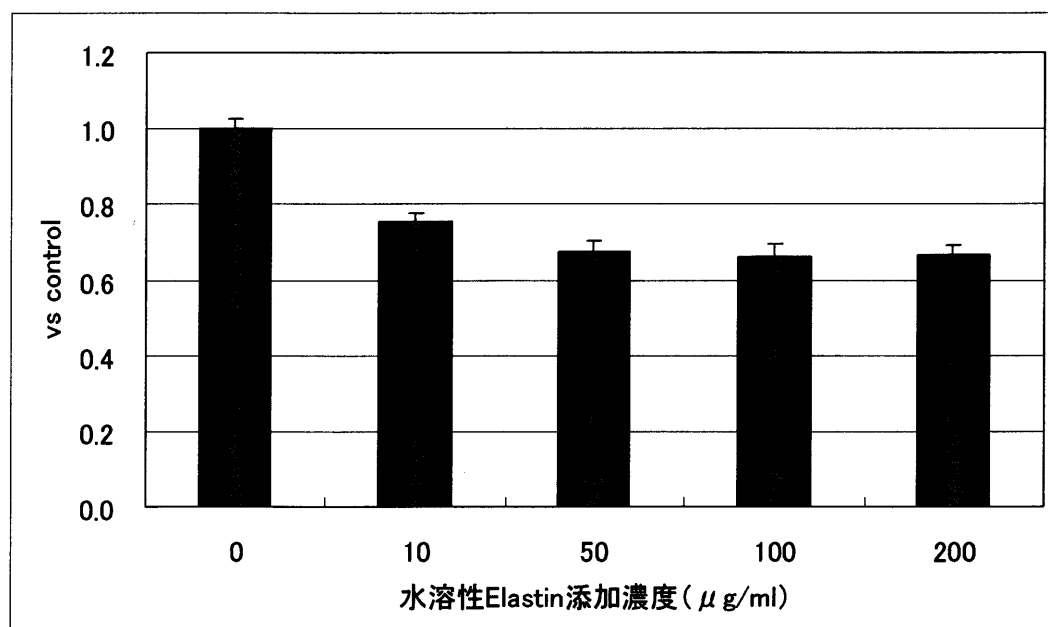


図 3-4 Elastin A における平滑筋細胞の細胞増殖性

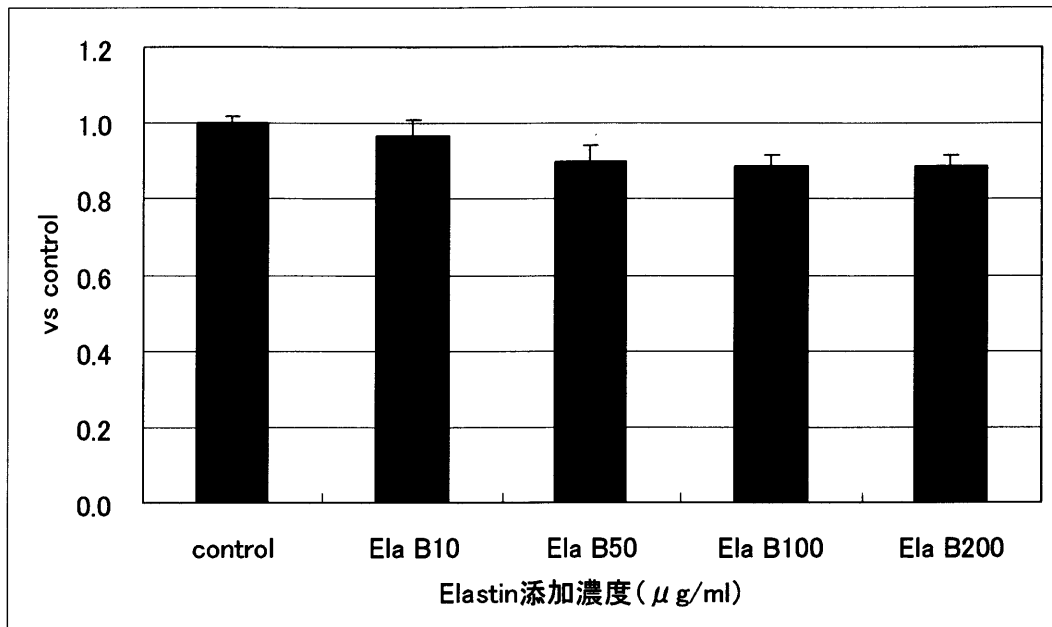


図 3-5 Elastin B における平滑筋細胞の細胞増殖性

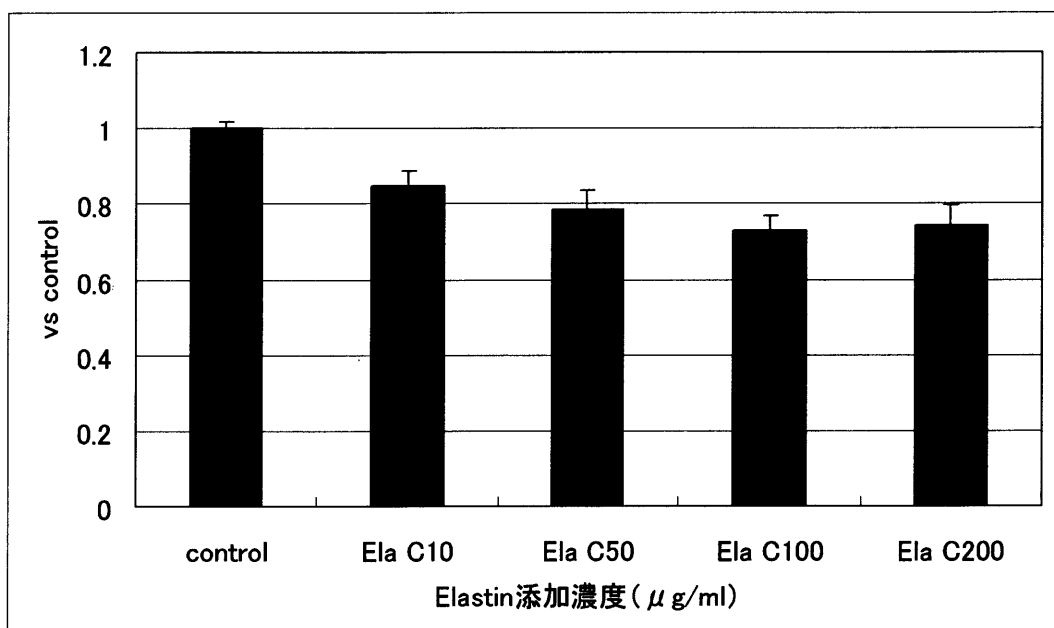


図 3-6 Elastin C における平滑筋細胞の細胞増殖性

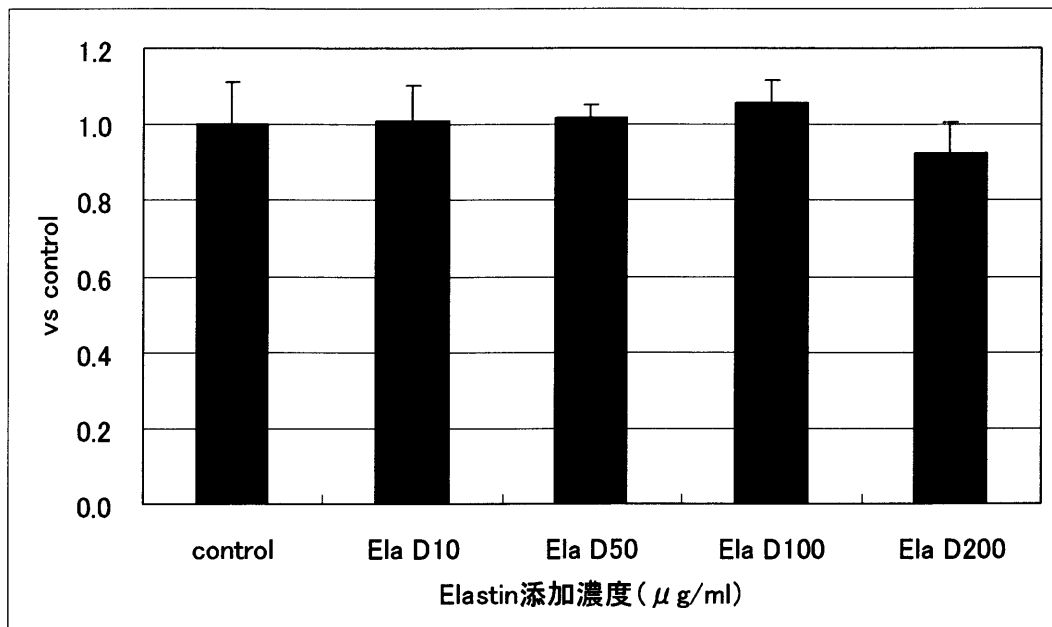


図 3-7 Elastin D における平滑筋細胞の細胞増殖性

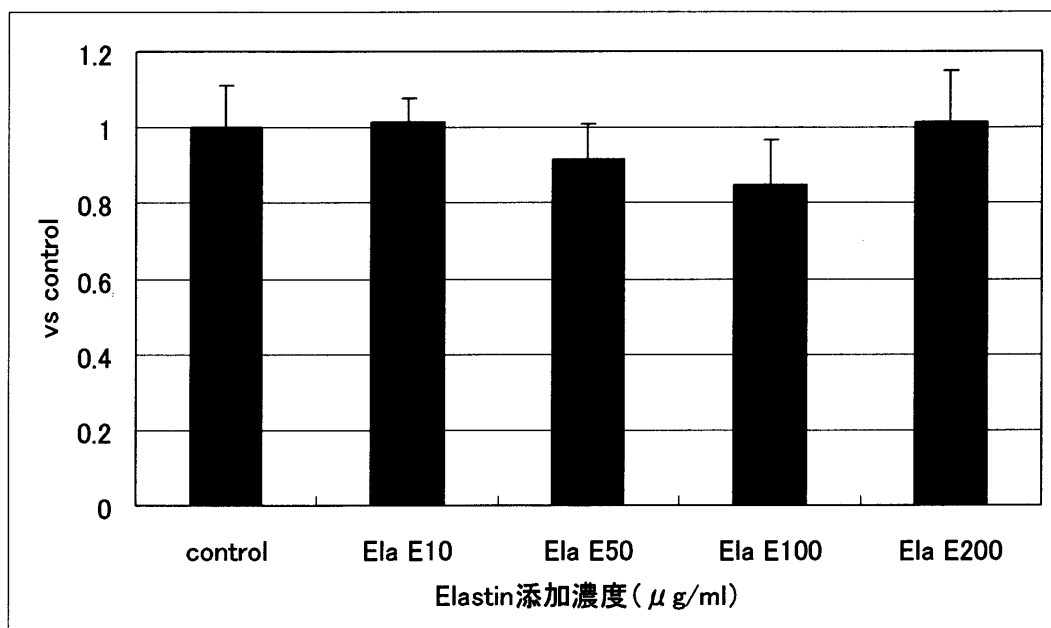


図 3-8 Elastin E における平滑筋細胞の細胞増殖性

3-2-2. 3次元エラスチンゲル培養による影響

エラスチンゲル中の細胞増殖についても検証した。ゲル中の細胞に与える増殖抑制は顕著なものであった。コントロールに対して65%の抑制を示し、添加エラスチンに比べてその増殖の半分以下に抑制された(図3-9)。

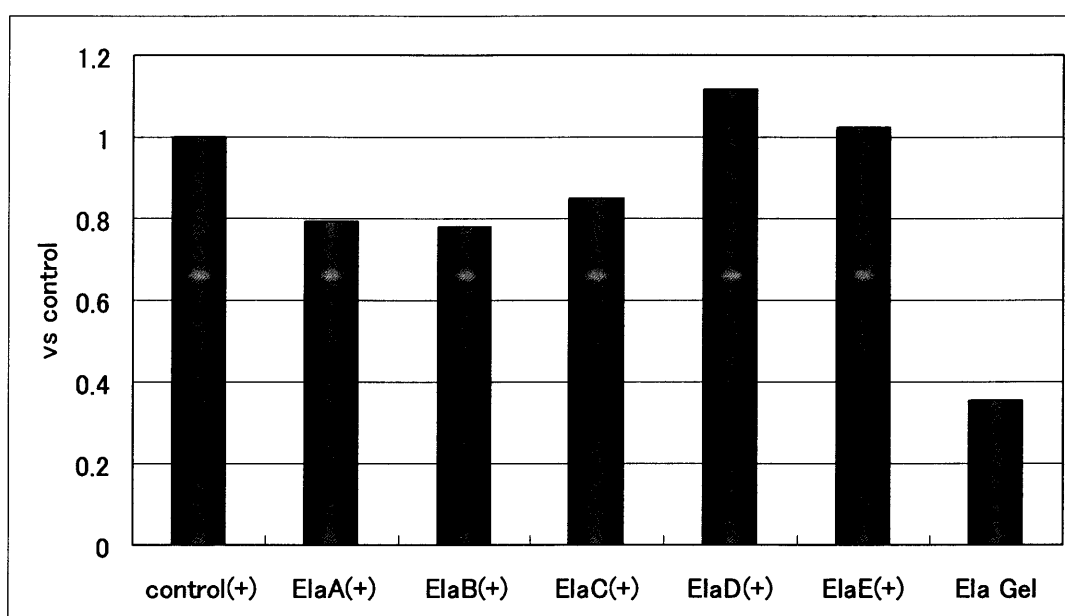


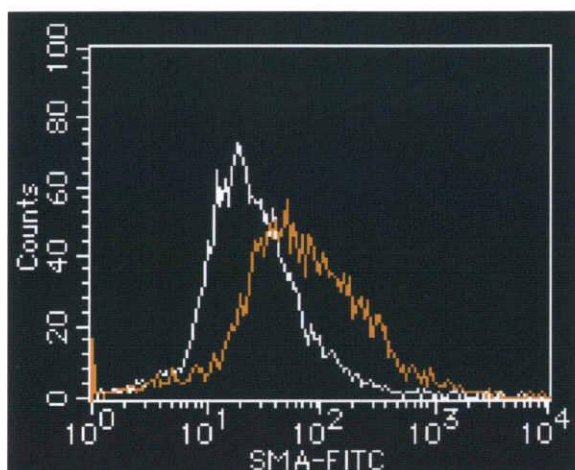
図3-9 FBS 添加による細胞増殖性

3-3 フローサイトメトリーによる細胞骨格タンパク(SM α -actin)量測定

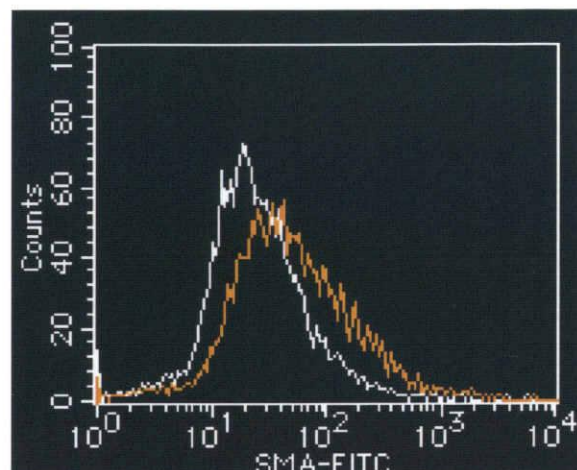
[結果]

3-3-1. 添加した各分画エラスチンによる影響

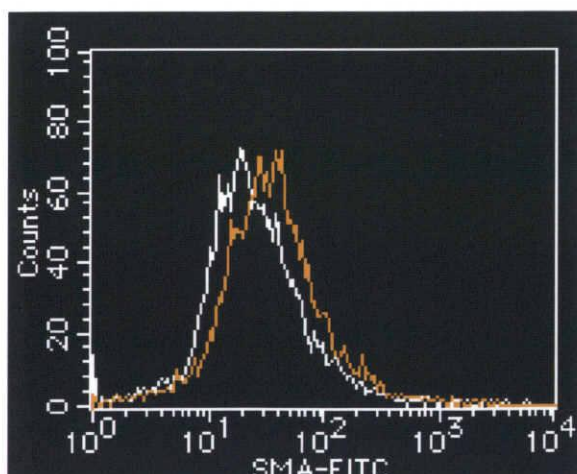
フローサイトメトリーにより、エラスチンが平滑筋細胞の細胞骨格 SM α -actin に与える影響を示した(白:コントロール、橙:エラスチン)。結果、エラスチンを添加することにより平滑筋細胞の分化マーカーである SM α -actin の蛍光強度のピーク値がコントロールに比べ右にシフトした。このことから、SM α -actin のタンパク量が増加したことが示された(図 3-10)。



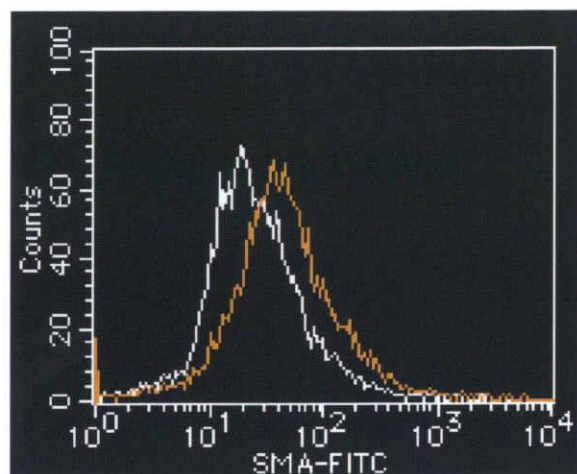
Elastin A



ElastinB



ElastinC



ElastinD

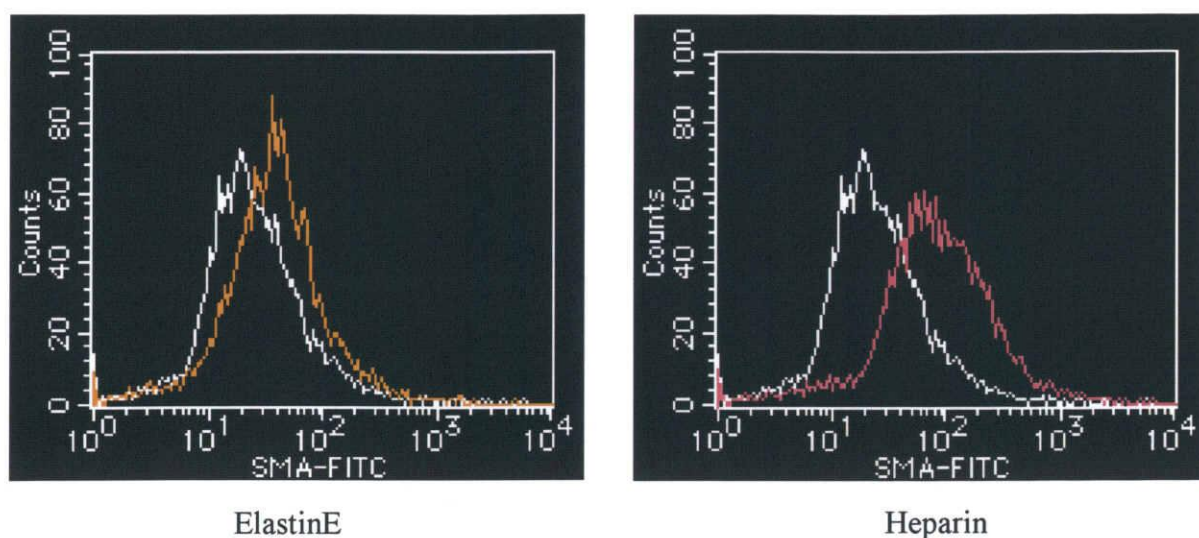


図 3-10 フローサイトメトリーによる SM α -actin 発現

このフローサイトメトリーによって得られたデータをもとに以下の式により、タンパク量を定量化した。

$$\text{SM } \alpha\text{-actin 全タンパク量} = \text{細胞数} \times \text{蛍光強度}$$

Elastin A ではコントロールに対して 2.36 倍、Elastin B は 1.84 倍、Elastin C は 1.34 倍、Elastin D は 1.55 倍、Elastin E は 2.47 倍 SM α -actin のタンパク量の増加が見られた。また、ポジティブコントロールとして加えたヘパリンでは 2.47 倍増加した(図 3-11)。

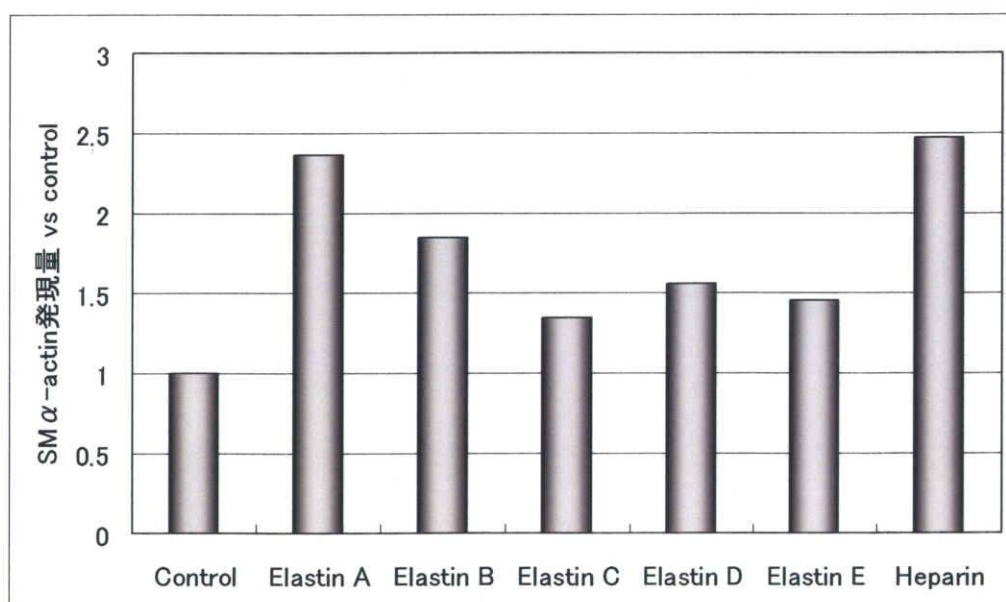
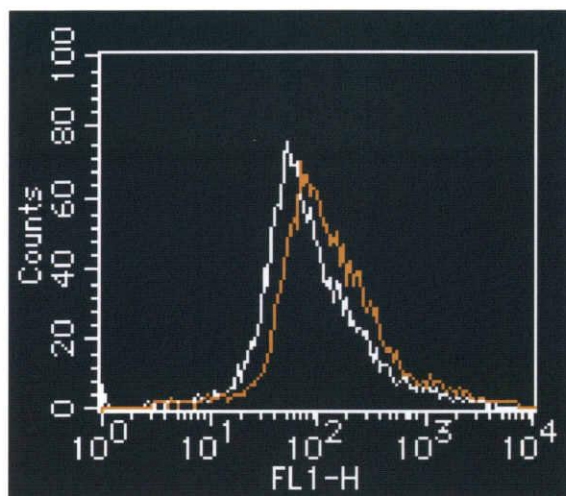


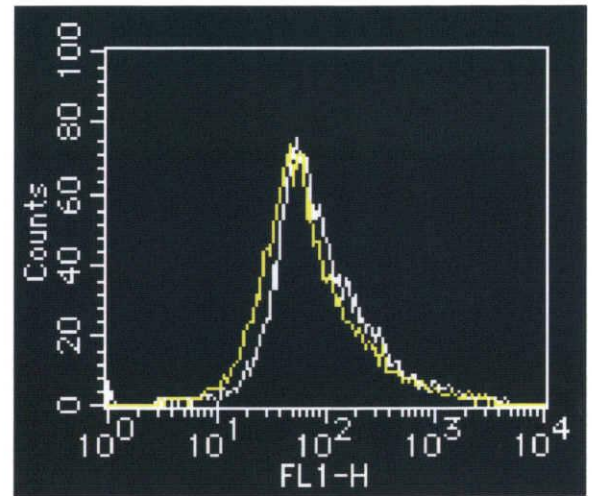
図 3-11 ElastinA-E における SM α -actin タンパク量

3-3-2. 3次元エラスチンゲル培養による影響

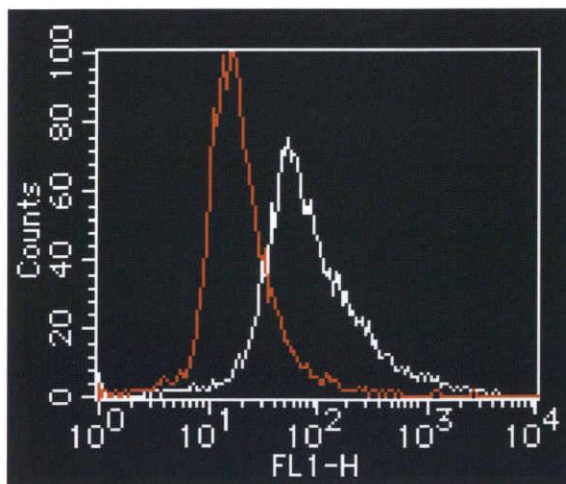
エラスチンゲルにおいても同様に SM α -actin のタンパク量の検証を行った。添加エラスチンではタンパク量は増加したが、それと比較するとエラスチンゲルでは減少が見られた。エラスチンゲルのタンパク量はコントロールに比べて 10%減少、またネガティブコントロールとして使用した FBS では 80%減少した(図 3-13)。ゲルでは FBS ほど平滑筋細胞に与える影響は少ないが、タンパク量の減少が見られた。



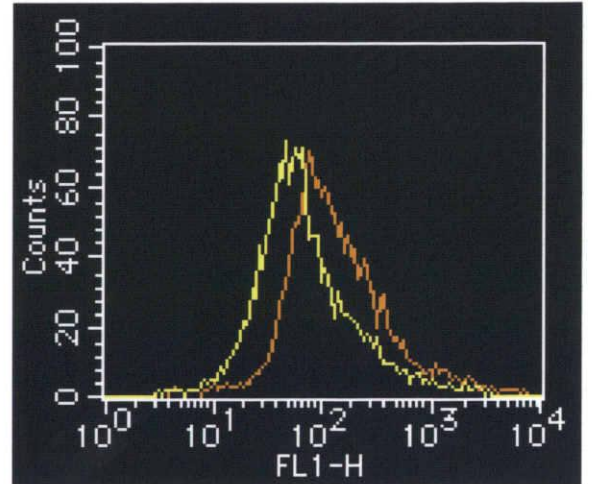
添加エラスチン



エラスチンゲル



FBS



添加×ゲル比較

図 3-12 フローサイトメトリーによる SM α -actin 発現

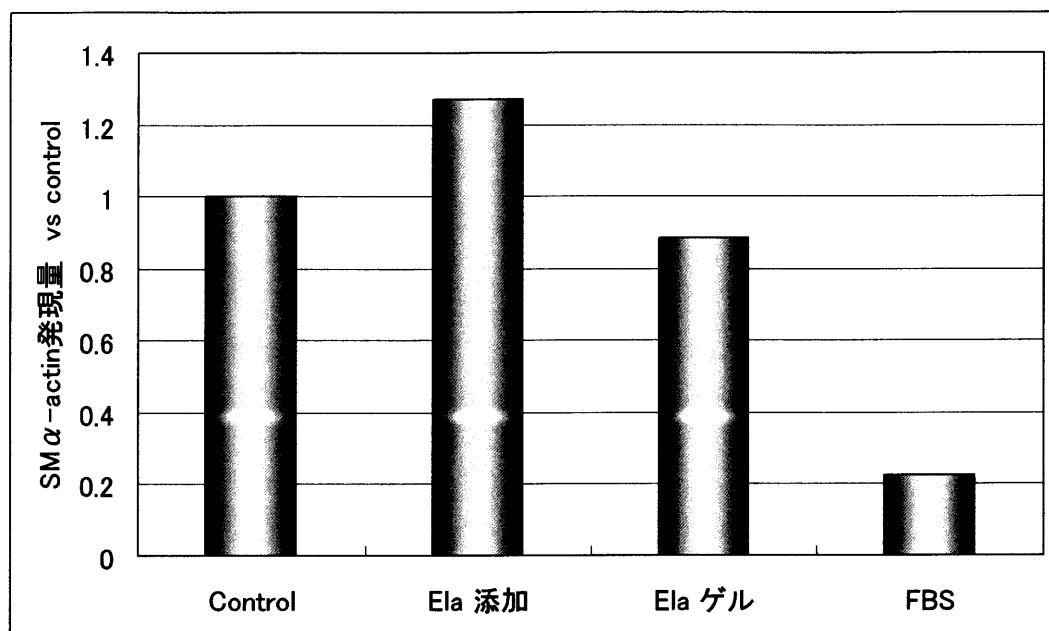


図 3-13 エラスチンゲル、添加における SM α -actin タンパク量の比較

3-4 細胞骨格(SM α -actin)の形態変化による定性評価(免疫化学染色)

[結果]

3-4-1. 添加したエラスチンによる影響

エラスチンにより刺激した細胞はコントロール、コラーゲンに比べて SM α -actin のより早い線維化が見られた。1日目での線維化した細胞の割合 (F-actin、intermediate)はコントロールで 1.4%、コラーゲンで 2.8%、エラスチンで 3.6%であった(図 3-14)。3日目ではコントロールで 4.9%、コラーゲンで 17.4%、エラスチンで 27.8%であった(図 3-15)。5日目ではコントロールで 11.8%、コラーゲンで 11.6%、エラスチンで 34.9%であった(図 3-16)。このようにエラスチンによって細胞の SM α -actin の線維形成が促進された。

1 日目

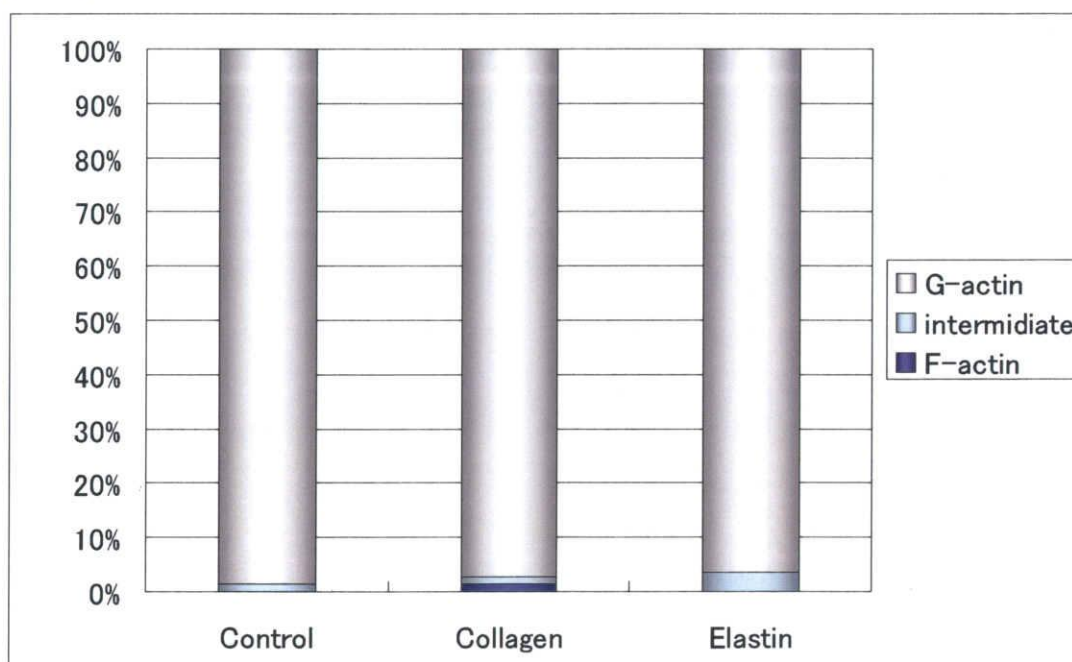


図 3-14 培養 1 日目の SM α -actin 線維形成率

3 日目

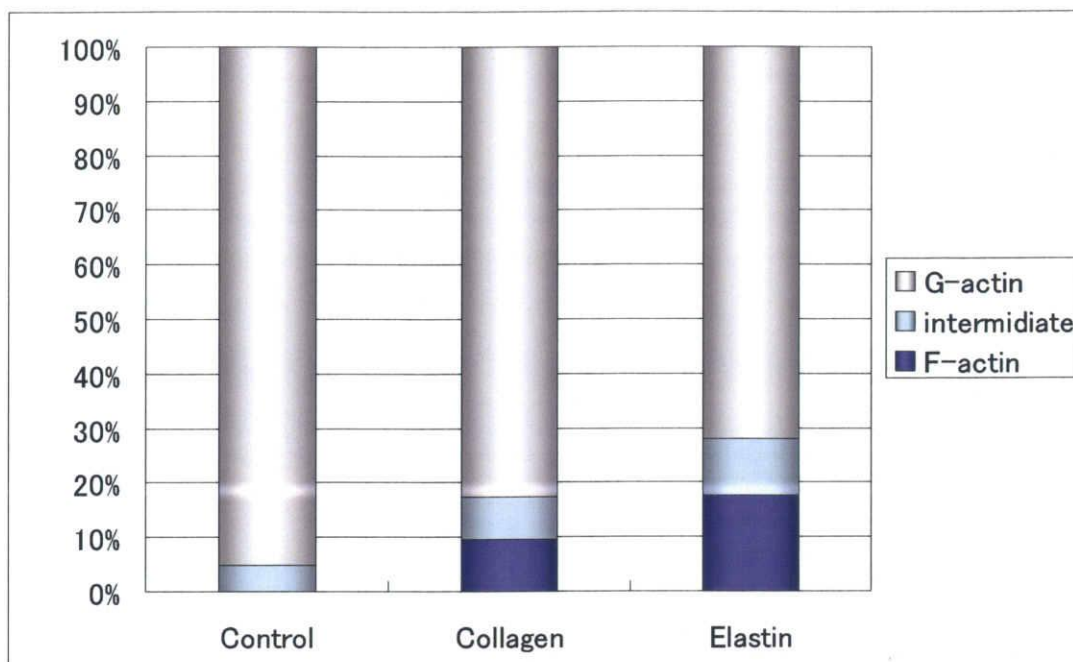


図 3-15 培養 3 日目の SM α -actin 線維形成率

5 日目

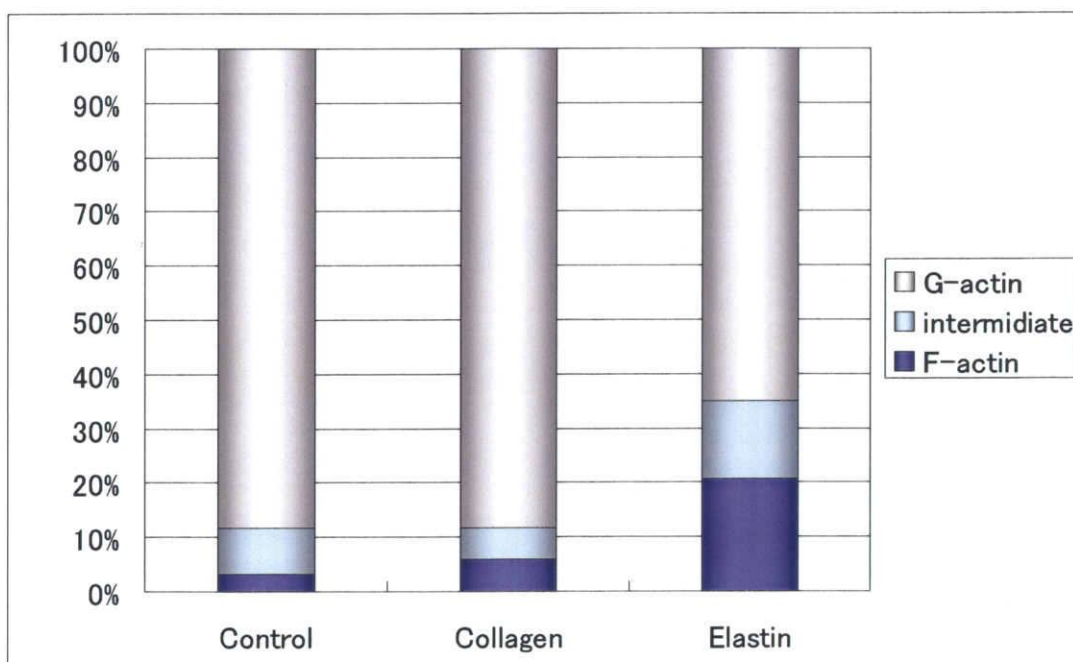


図 3-16 培養 5 日目の SM α -actin 線維形成率

3-4-2. 3次元エラスチンゲル培養による影響

エラスチンゲルについて検証した。培地に添加した場合の F-actin の割合は 35%、エラスチンゲルでは 10%未満となりコントロールと比べてもエラスチンゲルでの F-actin の割合は少ないことが示された(図 3-17)。このことからエラスチンゲルは平滑筋細胞の SM α -actin の形状を G-actin に移行させることが示された。

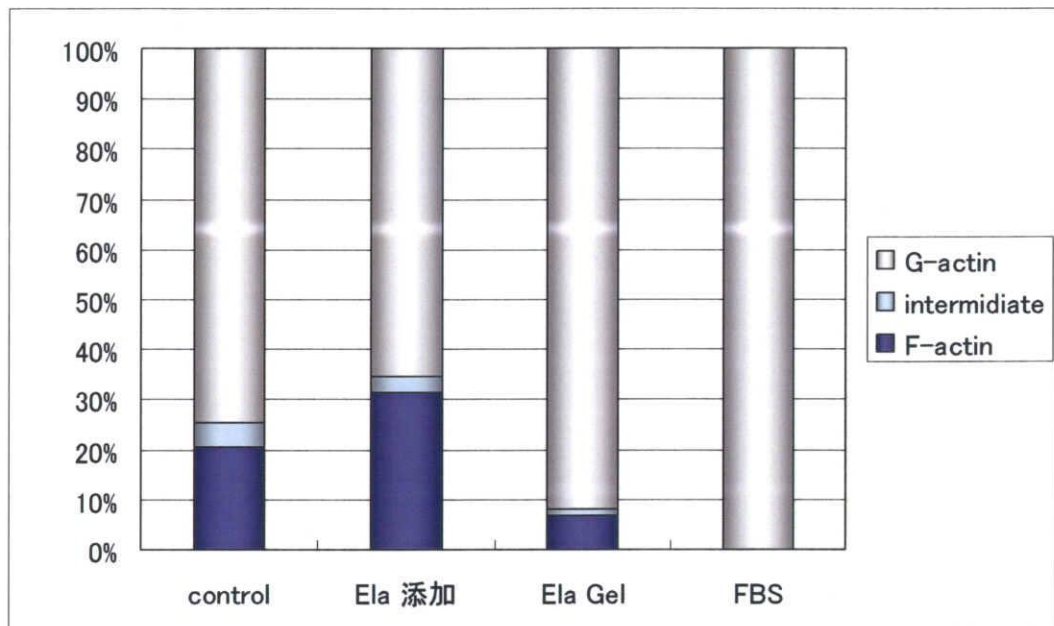


図 3-17 エラスチン添加とゲルの SM α -actin 線維形成率

4. 考察

4-1 ブタ大動脈血管壁の構造

ブタ大動脈には、豊富なエラスチンを含みそのエラスチン層の間に細胞が存在することを確認した。またエラスチンは多層構造となって存在していることが分かった。特に大動脈は心臓に最も近いところに位置する血管であるので、心臓から送られる血液によって血管にもたらされる圧力に対してそれに耐えうるための構造が必要である。そのため伸び縮みといった弾性を有するエラスチンがこの圧力に耐え構造を維持する機能に役立っているものと考えられる。また膨張した血管を収縮させる機能をもつ平滑筋細胞が層間に存在し血流の調整を行っているものと考えられる。

ブタ脾臓組織についても同様な観察を行ったところ、この組織には細胞が多く存在していることが分かった。脾臓はリンパ球を作ったり、古くなった赤血球の破壊を行い赤血球中のヘモグロビンを破壊し鉄を回収したり、大量出血などの状態では脾臓での造血が行われることがある働きがあることから⁵⁾、この組織には細胞の働きが非常に重要である。そのため細胞が豊富に存在していると考えられる。また弾性や強靱性といった機能を必要としないことから細胞外マトリックスの割合は少ないものと思われる。

このように細胞や細胞外マトリックスの割合は組織の働きに応じて最適な配分で存在し、組織構造の安定化や機能に寄与していることもと考えられる。

4-2 エラスチンが平滑筋細胞の表現型に与える影響

BrdU 試験の結果から、エラスチン水溶液を平滑筋細胞に添加することによって、細胞増殖を抑制または刺激しないことが示された。ポジティブコントロールとして増殖因子(FBS)を添加したものでは、コントロールに対して2倍以上の増殖を示した。つまりこの細胞の表現型は合成型に移行したと考えられる。他の論文等でもFBSで刺激を与えた細胞は合成型に脱分化するという報告がある。FBSにはEGF、PDGF、インスリン様成長因子、インターロイキン類など細胞増殖などに必要な種々の成分が含まれており¹⁰⁾、そのなかでもPDGFは平滑筋細胞の脱分化に影響することが知られている。²⁴⁾ このことから平滑筋細胞は細胞膜表面に存在するレセプターによってPDGFを認識し、シグナル伝達を起こし細胞周期に影響を与え、そして表現型が合成型に移行したのと考えられる。それと比較してエラスチンで刺激したものは、この増殖性は低く合成型の特性は見られない。このことからエラスチンは脱分化を促進する物質ではないことが示される。

またフローサイトメトリーおよび免疫染色から得られた SM α -actin のタンパク量増加、線維形成の促進した結果から、エラスチンにより平滑筋細胞の表現型を収縮型へ移行させたことが明らかになった。このように大動脈の血管壁の大部分を占めるエラスチンは拍動などの血流に耐える物理的・力学的な働き以外に、細胞の機能を制御する生化学的なシグナルを与える役割も担っていると考えられる。また論文等で報告されている In vivo の研究では、遺伝子疾患によるエラスチンの産生不足や血管壁の損傷によって部分的なエラスチンの欠如が起こることによって、平滑筋細胞の異常増殖が起こり血管を閉塞する病気が知られている。これは、平滑筋細胞とエラスチンの相互作用がなくなることによって、細胞の表現型が合成型へ移行して過度の細胞増殖を行ってしまい内膜肥厚などの不安定な組織構造を形成してしまうものと考えられる。このことから通常、血管内ではエラスチンが平滑筋細胞と密接な相互作用をすることにより細胞を収縮型に維持し、過度の細胞増殖やマトリックス産生をせずに安定な組織構造を形成、構造維持をしているものと考えられる。

今回、エラスチンを培地に添加することによって細胞は相互作用を示した。このことから、細胞はエラスチンを認識するレセプターを有しており細胞内にシグナル伝達を起こしたものと考えられる。細胞膜表面にエラスチン結合レセプター (EBP) があるという報告がなされているが、そのレセプターの同定は未だなされていない。現在までにエラスチン結合レセプターに PP、SASE などの複合体²⁵⁾や 67kDa エラスチンレセプター、エラスチン-ラミニンレセプターなどさまざまなレセプターの報告がなされている。^{26) 27) 28)}そしてその後の伝達経路としては G タンパク→アデニル酸シクラーゼ→cAMP→RhoA-GDP→RhoA-GTP→Rho-kinase を介したシグナル伝達経路や G タンパクから FAK を介する経路を通りアクチン重合に至るという報告がなされている(図 4-1)。²²⁾これらの細胞膜表面レセプターや伝達経路の確定ははっきりとしていないが、平滑筋細胞の形質変換の起因となる転写因子に関しては解明されてきている。増殖を刺激する転写因子 BTEB2/KLF Egr-1 を介することにより G1 期に入り細胞周期が回り始め、またその逆に Gax GATA-6 により細胞周期回転を止めて G0 期に導く。¹¹⁾つまりエラスチンはこの Gax GATA-6 の転写因子を刺激することにより、細胞周期を止めることが考えられるが、エラスチンがこれら示したシグナル伝達経路を介するのか、複合的な経路を介したものなのか、また他の経路を介し形質変換するのか、今後の研究を進めていきエラスチンと平滑筋細胞との詳細な相互関係を解明していく必要がある。

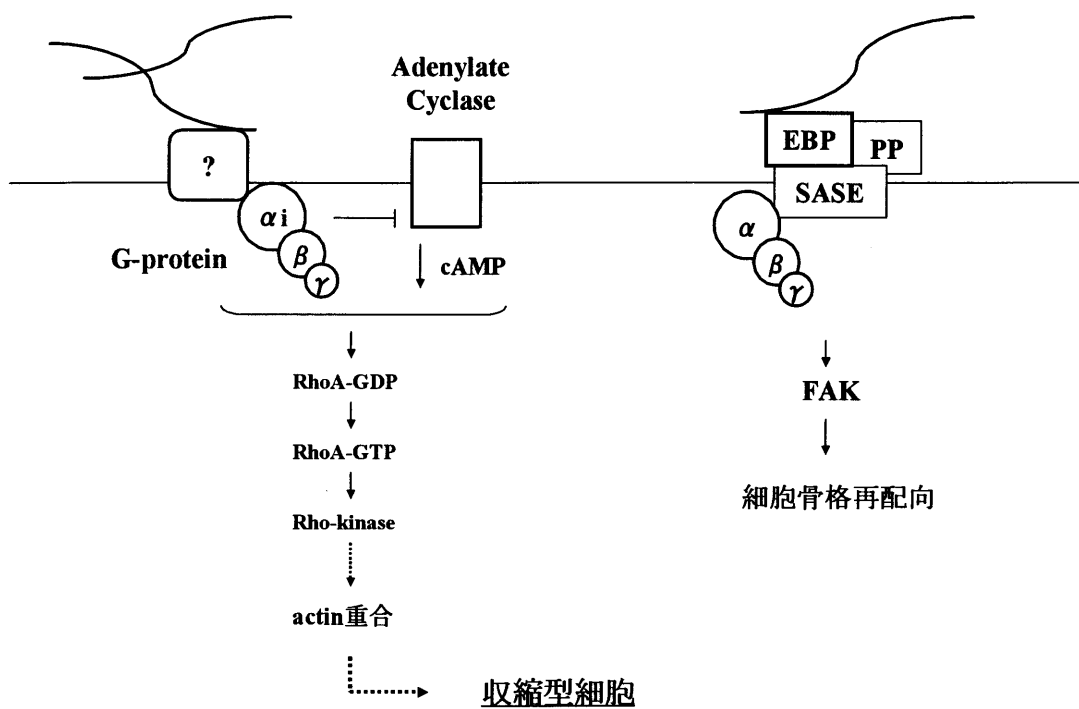


図 4-1 エラスチンからのシグナル伝達経路^{22) 25)}

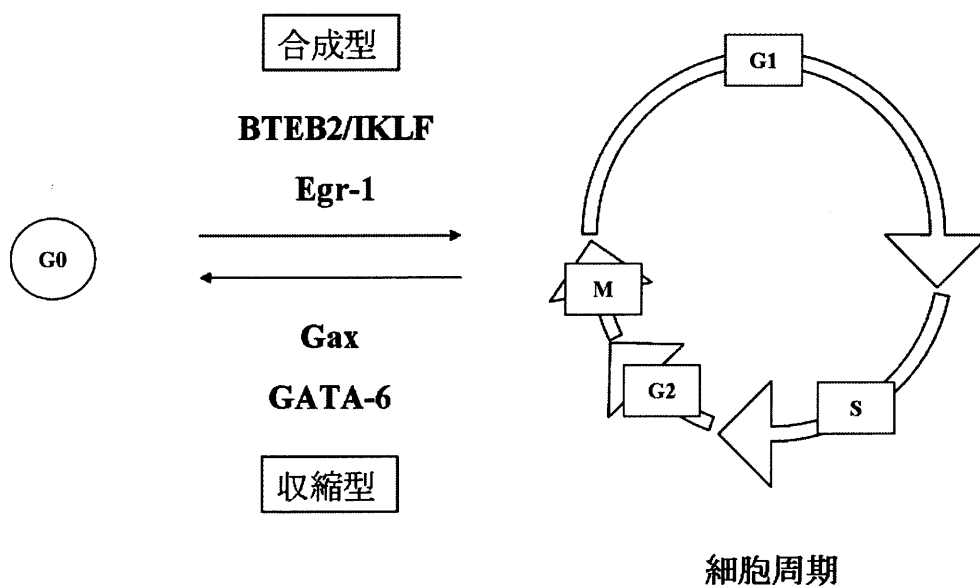


図 4-2 平滑筋細胞の形質変換に關与する転写因子¹¹⁾

4-3 分画エラスチンが与える影響の違い

本研究では、エラスチンを分画したものを使用した。この結果から分画したエラスチンはそれぞれ細胞に与える影響が異なり、特に分子量の高いエラスチン A、B に強い分化誘導を行うことが分かった。つまり低分子エラスチンに比べて高分子エラスチンには細胞がエラスチンを認識する部位であるリガンド部位が多く存在していることが予想される。この分画したエラスチンの詳細なアミノ酸配列は現在研究中であるためリガンド部位を特定することはできないが、エラスチンのどの部位を認識するかについて以下に考察する。

まず、エラスチンに特異的なアミノ酸配列として VGVAPG が存在することである。このことから高分子のエラスチンになるほどこの配列が多く存在し、高分子のエラスチンほど細胞が認識するものと考えられる。

二つ目としては架橋領域に関する配列である。現在までにエラスチン A、B の数平均分子量が 195,170kDa であり、高分子のエラスチンでは架橋となるデスモシン量が多く存在することが分かっている。トロポエラスチンが約 70kDa であることから、ここで分画された高分子のエラスチンには水溶化するとき完全に架橋部位を切断することができず部分的にデスモシンが残存した構造であり、低分子のエラスチンにはこのような架橋領域が少ない構造になっていると考えられる。つまりこのエラスチンのアミノ酸配列のなかでもデスモシンが結合している架橋領域を平滑筋細胞が認識しているのではないかと予想される。

しかし、細胞が高分子エラスチンを認識するリガンド部位はここで示した以外にも特徴的な配列が存在するかもしれない。今後、この分画エラスチンの詳細なアミノ酸配列の解明や平滑筋細胞のレセプターの認識領域の解明によってこの機序を明らかにすることができるであろう。

4-4 エラスチンゲルが平滑筋細胞へ与える影響

本研究では、添加培養に加えゲル培養も行った。添加培養では培養器の底に接着した細胞に対してエラスチン水溶液を加えるという2次元培養であったが、ゲル培養ではその培養器の上からエラスチンゲルを敷き3次元培養系を構築した。この3次元培養のねらいとしては、より生体内の組織に近い環境で検証できる点にある。3次元培養系では2次元培養と同様に BrdU 試験、フローサイトメリー、免疫化学染色により表現型についての検証をした。

BrdU 試験では、2次元培養の増殖に比べ3次元ゲル培養では大幅な抑制が見られた。またエラスチン添加した2次元培養の増殖抑制能と比較しても更なる大きな抑制が見られた。これは細胞層の上にゲルが存在することにより立体的な妨害が細胞にもたらされ増殖する空間が2次元培養に比べて減少したことによると考えられる。²⁹⁾さらにエラスチンが細胞と接触する面積が大幅に増加したことから、エラスチンによる増殖抑制効果も増大したものと考えられる。

またフローサイトメトリー、免疫化学染色の結果から、SM α -actin のタンパク量はコントロールに比べて変化せず、またその形状も G-actin が多いことが示された。これは単にエラスチンの濃度増加が細胞に影響して SM α -actin の形成が促進していくのではなく、3次元という環境に細胞が対応するために細胞自身にとって最適な接着を試みようとするために SM α -actin は G-actin として存在し遊走しやすい骨格形態になっていると思われる。そもそも SM α -actin はミオシンとずれ合うことによる相互作用により収縮機能を有する細胞骨格である。そのために平滑筋細胞の表現型が収縮型にあるときは SM α -actin が F-actin へと変化し機能する。しかしこの SM α -actin は平滑筋細胞の表現型が合成型にあるときにタンパク量が減少、G-actin に変化するのは遊走するのに必要がないためである。遊走には β -actin などの非筋細胞骨格が主にその役割を果たす。本実験で得られた SM α -actin の量が変化せず、G-actin が増加したという結果は、細胞が遊走もしくは細胞の形状を変化させるために行った変化であると思われる。過去の研究結果より(図 4-3)、でエラスチンゲル上での平滑筋細胞はゲルに対して細長い紡錘状の形状をして接着していった。

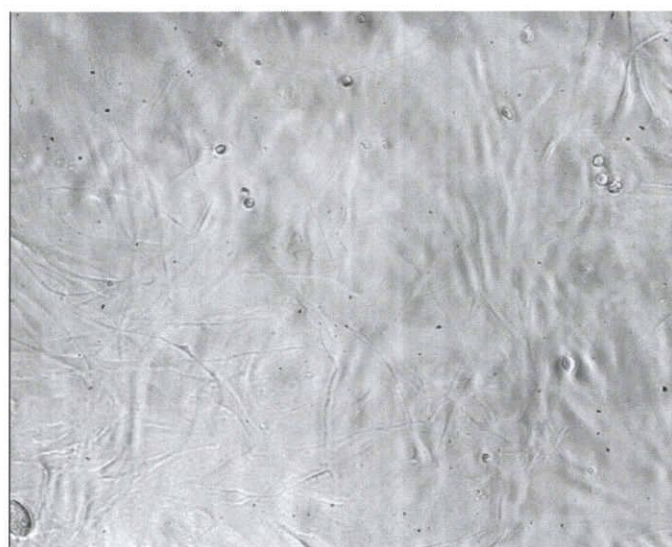


図 4-3 エラスチンゲルに対する平滑筋細胞の接着¹⁾

3次元に近いエラスチンゲル上では細長い形状をしていく性質が見られる。その収縮機能を最大限に発揮するためには2次元培養に見られるランダムな細胞の形状ではなく、紡錘状をしたより細長い形状に変化、そしてその細胞層が何層も重なり合い筋線維を形成することこそ、組織を収縮させる機能として最大限に働くことができる構造であると細胞が認識したと考えられる。

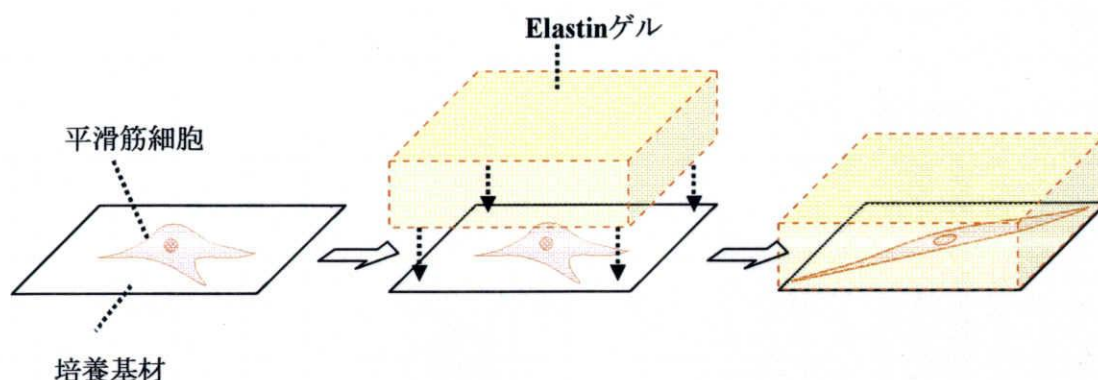


図 4-4 平滑筋細胞の形態変化

しかし、このようなエラスチンの3次元足場に対するランダムな接着では一定方向に配向していないために組織としての機能を有さない。生体内の血管では平滑筋細胞は血流方向に対して垂直に配向し、膨張した血管を収縮させる働きを担っている。このように力を効率的に加えるためには、筋層に方向性を持たせることが非常に重要となってくる。方向性を持たせる手法としては、力学的な刺激を細胞に与えることによって一方向に配向させることができる(図 4-5)。^{3) 30)}

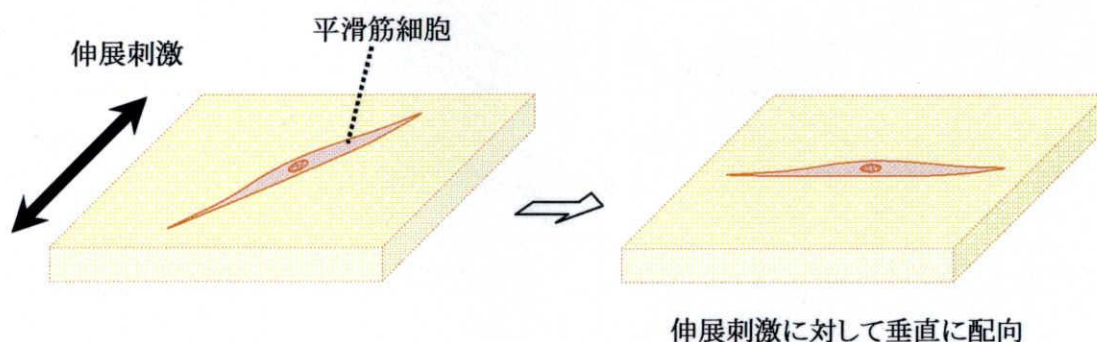


図 4-5 伸展刺激に対する平滑筋細胞の挙動

また線維に接着した細胞に力学的なストレスを与えることによって、線維方向に配向する接触誘導と呼ばれている細胞の挙動も確認されている(図 4-6)。^{3) 31)}そしてこの力学的ストレスが平滑筋細胞の表現型に影響を与え収縮型へ移行させるという報告も存在する。

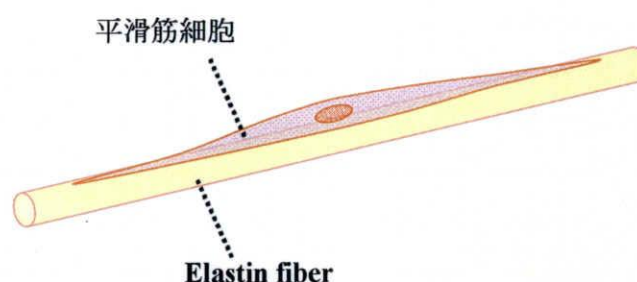


図 4-6 Elastin fiber に対する平滑筋細胞の接着・配向

以上のことから、人工血管作成にとって、平滑筋細胞の機能発現(収縮能)をさせるエラスチンの存在が不可欠であることが示された。動脈にとって重要な働きを行っている中膜の再生は、このエラスチンゲルとエレクトロスピニング法を用いて作製するエラスチン線維のハイブリッド構造を構築し、このユニットを多層構造にし、更に力学的な刺激を与えることで組織再構築を促し、生体組織に近い理想的な動脈の中膜層を再現することが可能であると考えられる。

5. 結論

- ・ 大動脈血管の組織中にはエラスチンが豊富に含まれており、血流による圧力に耐えうる構造になっていることが確認できた。
- ・ BrdU 増殖試験、フローサイトメトリー、免疫化学染色を用いることで平滑筋細胞の表現型を評価する方法を確立した。
- ・ エラスチンを刺激させることによって細胞増殖性を抑える、または影響しないことが示された。
- ・ エラスチンを刺激させることによって収縮骨格タンパクである SM α -actin のタンパク量、アクチン線維形成を促進させることが示された。
- ・ 各分画のエラスチンが与える細胞への影響が異なることを示した。

これらのことからエラスチンは平滑筋細胞の収縮型の分子マーカーの発現の増加により、表現型を収縮型に移行させる働きをすることが分かった。このことはエラスチンが分化を誘導する材料、足場となる細胞外マトリックスであることを示した。

また分画したエラスチンはそれぞれ細胞に与える影響が異なるため、エラスチンの使い分けによって細胞の分化を制御することも可能である。このようにエラスチンは細胞の異常増殖を引き起こさず、細胞が有する血管の収縮機能を持たせる機能的な材料であることが示され、血管組織再生のための足場としての有用性があることが分かった。

今後、3次元培養や力学的ストレスなど培養条件の変化によって表現型への影響を検証することにより、より生体内に近い環境下での影響を見ることができると共に人工血管の開発にとって有用なものになると期待される。

6. 参考文献

- 1) 門園 英樹; エラスチンを足場とする弾性組織再生法に関する研究/ 平成 16 年度卒業論文(2005)
- 2) 許 俊鋭; 人工臓器・再生医療の最先端/ 先端医療技術研究所(2005)
- 3) 松岡 光明; 血管医学/ メディカルレビュー社(2004)
- 4) L.P. ガードナー; 組織学/ 西村書店(2003)
- 5) 牛木 辰夫; 入門組織学/ 南江堂(1989)
- 6) 中村 桂子 et al; Essential 細胞生物学/ 南江堂(2003)
- 7) ベッカー; 細胞の世界/ 西村書店(2005)
- 8) 中村 桂子 et al; THE CELL 細胞の分子生物学/ Newton Press(1995)
- 9) 渋谷 正文; 血管研究の最前線に迫る/ 羊土社(2000)
- 10) 許 南浩; 細胞培養なるほど Q&A/ 羊土社(2004)
- 11) 渋谷 正史; 実験医学増刊 Vol.20-No.8 / 羊土社
- 12) 三木 裕明; 細胞骨格・運動がわかる/ 羊土社(2004)
- 13) 山本 雅; シグナル伝達イラストマップ/ 羊土社(2004)
- 14) 日本人工臓器学会; 人工臓器はいま/ はる書房(2003)
- 15) 三浦 祐士; 染色法のすべて/ 医歯薬出版株式会社(1988)
- 16) 平野 寛; よくわかる電子顕微鏡技術/ 朝倉書店(1992)
- 17) 西方 敬人; バイオ実験イラストレイテッド 5/ 秀潤社(1997)
- 18) <http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~kitaura/exbiolab/benkyo/smooth-caj.html>
- 19) Patel, A. et al.: Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res*, 2006; 71:40-49
- 20) Dingemans, K. P. et al.: Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec*, 2000; 258:1-14
- 21) Brooke, B. S. et al.: Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol*, 2003; 13:51-56
- 22) Satyajit. K. Karnik. et al.: A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*, 2003; 130:411-423
- 23) Elena P. Moiseeva. et al.: Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res*, 2001; 52:372-386
- 24) Poliseno, L. et al.: Resting smooth muscle cells as a model for studying vascular cell activation. *Tissue Cell*, 2006; 38:111-120
- 25) Satsuki Mochizuki. et al.: Signaling pathways transduced through the elastin receptor

- facilitate proliferation of arterial smooth. *J Biol Chem*, 2002; 277:44854-44863
- 26) Rodgers, U. R. *et al.*: Cellular interactions with elastin. *Pathol Biol*, 2005; 53: 390-398
 - 27) Fujimoto, N. *et al.*: Elastin peptides induce migration and terminal differentiation of cultured keratinocytes via 67 kDa elastin receptor in vitro: 67 kDa elastin receptor is expressed in the keratinocytes eliminating elastic materials in elastosis perforans serpiginosa. *J Invest Dermatol*, 2000; 115:633
 - 28) Hinek, A. *et al.*: 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol*, 1994 ;126:563-574
 - 29) Stegemann, J. P. *et al.*: Genetic modification of smooth muscle cells to control phenotype and function in vascular tissue engineering. *Tissue Eng*, 2004; 10:189-199
 - 30) Kanda, K. *et al.*: Behavior of arterial wall cells cultured on periodically stretched substrates. *Cell Transplant*, 1993; 2:475-484
 - 31) Kanda, K. *et al.*: Mechanical stress-induced orientation and ultrastructural change of smooth muscle cells cultured in three-dimensional collagen lattices. *Cell Transplant*, 1994; 3:481-492
 - 32) Buijtenhuijs, P. *et al.*: Tissue engineering of blood vessels: characterization of smooth-muscle cells for culturing on collagen-and-elastin-based scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004; 39:141-149
 - 33) Worth, N. F. *et al.*: Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2001; 49:130-145
 - 34) Jan P. Stegemann. *et al.*: Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype, *J Appl Physiol*, 2005; 98:2321-2327
 - 35) Roy J. *et al.* Phenotypic modulation of arterial smooth muscle cells is associated with prolonged activation of ERK1/2. *Differential*, 2001; 67:50-58
 - 36) Schauwienold D. *et al.* ERK1/2-dependent contractile protein expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 2003; 41:546-552
 - 37) Stegemann, J. P. *et al.*: Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture. *Exp Cell Res*, 2003; 283:146-155
 - 38) Copyright SCICUS K.K. All rights Reserved @ 2003

7 謝辞

本研究・修士論文の作成を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻のほどいただきました三重大学工学部 堀内孝教授、宮本啓一助教授に対し深く御礼申し上げます。

また、ウルトラミクロトム、共焦点レーザー走査顕微鏡を使用するにあたりご指導を賜りました三重大学生命科学支援センター電子顕微鏡施設 小川 寛 先生、フローサイトメトリーにおいて御協力いただいた遺伝子研究施設の近田先生にも深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、同じエラスチンをテーマとする岡井正典君、河戸仁志君、古山義紘君、稲熊章誠君、佐古圭輔君、生活において様々な形でサポートしていただいた奥田和子さん、村上節子さん、研究生活を共に過ごした生体材料化学研究室の皆様方に深く感謝いたします。

平成 19 年 3 月

門園 英樹

8. 付録

8-1. 培地、試薬の調整

[試薬・器具・機器]

- | | |
|---|-------------------------|
| • CS-C Complete Medium | (4Z0-500/cell systems) |
| • CS-C Medium (WITHOUT GF) | (4Z0-500S/cell systems) |
| • F-12HAM | (74K2321/SIGMA) |
| • Insulin Transferin Selenate(ITS) | (I-3146/SIGMA) |
| • L-Glutamine(L-G) | (G-7513/SIGMA) |
| • Penicillin-Streptomycin Solution(P-S) | (P-0781/SIGMA) |
| • Hydrocortisone(HC) | (H-0888/SIGMA) |
| • Fetal bovine serum(FBS) | (EQUITCH-BIO) |
| • Trypsin-EDTA solution (10x) | (T-4174/SIGMA) |
| • 各種アシストチューブ | (アシスト) |
| • 各種シリンジ | (テルモ) |
| • 孔径 0.22 μ m フィルター(Millex-GV) | (SLGV025LS/MILLIPORE) |
| • Stericup フィルターユニット | (SCGVU05RE/MILLIPORE) |

[培地の調整]

F-12 培地

サプリメントの調製と保存方法

- ITS
ITS (液体)を 1.5ml アシストチューブに 500 μ l ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。
- L-G
15 ml 遠沈管に 5 ml ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。
- P-S
5 ml アシストチューブに 5 ml ずつ分注し、冷凍庫にて -20℃で保存した。
- HC
HC 4 mg を 2 ml の無水 ethanol で溶解し、DEPC 処理水 2 ml を加えて濾過した。0.5 ml アシストチューブに 200 μ l ずつ分注し、室温で保存した。

〔操作〕

- ① P-S は 37℃の温水に浸し、解凍した。
- ② 500ml の F-12 培地に対して L-G、P-S は 5 ml、ITS、HC は 50 μ l を添加量とした。
- ③ マイクロピペットで採集したサプリメントをシリンジで吸引し、0.22 μ m フィルター滅菌を行い、F-12 培地に添加した。泡立たないように混ぜた。
- ④ 培地の容器に開封及び添加した日付を書き、冷蔵庫で保存した。
この方法で作成した培地を F-12 とし、各実験に用いた。

培地の pH の調整

培地は 1N-HCl や 2N-NaOH を使用して pH7.2 に調整した。pH メーターは 2 点補正 (pH7, 9) をして測定を行った。pH の調整後の培地は 0.22 μ m フィルター滅菌を行った。

〔各溶液の調製〕

FBS (牛胎児血清) の不活性化、分注、保存

〔操作〕

- ・ 37℃の温水で解凍した後、数回振り、55～56℃の温水で、時折振り混ぜながら 30 分間加温した (不活性化)。
- ・ Stericup フィルターユニットでフィルター滅菌を行い、30 ml アシストチューブに 25 ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌状態で行った。
- ・ 分注後の溶液は冷凍庫 (−20℃) で保存した。

Trypsin-EDTA solution (10x)

〔操作〕

- ・ 37℃の温水で解凍した後、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、冷凍庫 (−20℃) で保存した。

滅菌水の作成

- ① 脱イオン水を密閉できるガラスビン (赤蓋の 1L メディウムビン) に入れる。
- ② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し 121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

8-2. 細胞培養

〔試薬・器具・機器〕

- | | |
|-------------------------------------|---------------------|
| ・ Phosphate Buffered Saline (PBS) | (D-8537/SIGMA) |
| ・ セルバンカー | (日本全薬工業) |
| ・ バンバンカー | (日本ジェネティクス) |
| ・ 75cm ² 培養フラスコ | (MS-21250/住友ベークライト) |
| ・ φ35 シャーレ、各種プレート | (住友ベークライト) |
| ・ Chamber slide 8 chamber(8 穴チャンバー) | (117745/Nunc) |
| ・ 各種遠沈管 | (住友ベークライト,Nunc) |
| ・ エルマ血球計算盤 | (Erma) |
| ・ CO ₂ インキュベーター | (池本理化工業) |
| ・ 遠心機 | (2010/KUBOTA) |
| ・ ボルテックス | (S-100/TAITEC) |
| ・ 恒温槽 | (BT-15/Yamato) |

〔継代培養 ―ヒト大動脈平滑筋細胞―〕

I 細胞の洗浄

- ① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌する。
- ② 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引する。
- ③ PBS 溶液 5ml/25 cm²フラスコ又は 10ml/75 cm²フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄する。
- ④ 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引する。

II 培養細胞の剥離方法

- ① 冷凍保存してあるトリプシン 0.6ml に PBS 溶液 5.4ml を加え、10 倍希釈する。(以下トリプシン溶液)
- ② トリプシン溶液 2ml/25 cm²フラスコ又は 6ml/75 cm²フラスコを加え、1 分間放置する。
- ③ 顕微鏡で細胞がはがれたことを確認後、FBS1ml/25 cm²フラスコ又は 2ml/75 cm²フラスコを加える。
- ④ 細胞をピペッティングで培養フラスコから剥離させる。
- ⑤ 滅菌済み 10ml のピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml

遠心管に入れる。

- ⑥ 100G(800rpm) 5分間遠心分離する。
- ⑦ 培養フラスコに CS-C(+)培地を入れ、37℃の 5%CO₂インキュベーター内にて放置しておく。
- ⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引する。
- ⑨ CS-C(+)培地を 1ml 又は 3ml を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回ピペッティングを行う。
- ⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに播種し、37℃の CO₂ インキュベーター内にて培養する。

※細胞懸濁液濃度は血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 10 μ l を注入して、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。1mm² の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1mm としたときの細胞懸濁液濃度は 細胞測定数 $\times 10^4$ cells/ml とした。

〔培地交換と培地・懸濁液量〕

培地交換

〔操作〕

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37℃の温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。
- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

容器	培地量	懸濁液播種量
φ 35 シャーレ	2ml	0.2ml
75cm ² フラスコ	15ml	1ml
6 穴プレート(1 穴)	2ml	0.2ml

培地量と細胞懸濁液(濃度 5×10^5 cells/ml)播種量

96 穴プレート(1 穴)	100 μ l	10 μ l
8 穴チャンバー(1 穴)	300 μ l	50 μ l
12wells Transwell	0.5ml(apical)-1.5ml(basal)	50 μ l(apical)

表 8-1. 各容器に対する培地量と懸濁液播種量

〔細胞の凍結〕

大動脈血管平滑筋細胞の凍結はセルバンカーの凍結液を用いた。

(参考:内皮細胞-セルバンカー、バンバンカー 線維芽細胞-セルバンカー)

〔操作〕

- ① 継代培養の手順に従い、II 培養細胞の剥離方法の⑧まで行った。
- ② 上澄み液を除去し、凍結液 1ml を加えてピペッティングすることで凍結用細胞懸濁液を作成した。
- ③ 2ml アシストチューブに細胞懸濁液を加え、 -80°C の冷凍庫内で凍結した。

※冷凍庫の温度変化は細胞へ大きく影響を与えるため、発泡スチロールの入れ物などに入れ、凍結後の温度変化を防いだ。

〔細胞の解凍〕

〔操作〕

- ① 75cm^2 フラスコに CS-C(+) を 14ml 入れ、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベート内でプレインキュベートした。
- ② -80°C で凍結してあった内皮細胞の 2ml アシストチューブを、 37°C の温水で解凍した。僅かに氷が残る程度に加温を抑えた。
- ③ 解凍した細胞懸濁液を、あらかじめ用意しておいた 15ml 遠沈管中の 9ml の CS-C(+) に加えた。
- ④ ボルテックス後、800rpm で 5 分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液をとり、1ml の CS-C(+) を加えてピペッティング後、 75cm^2 フラスコに加えた

8-3 光学顕微鏡によるブタ大動脈血管の観察

8-3-1. 超薄切片の作製¹⁵⁾

[測定原理]

組織構造を観察するために、エポキシ樹脂による固定化を行い、超薄切片を作製し光学顕微鏡を用いて組織構造を観察した。

[使用装置・器具・試薬]

- ・ ウルトラミクロトーム ライヘルトU4
- ・ PBS (GIBCOBRL, Lot No.1028669, Cat No.10010-0223)
- ・ 0.1N リン酸 Na 液 200ml
NaH₂PO₄·2H₂O (Wako, Lot No.LDH2678, Cat No.192-02815)0.593g
Na₂HPO₄ (Wako, Lot No.KCG5195, Cat No.197-02865)2.3g
これらを脱イオン水で 200ml に調整。
- ・ 前固定液: 2.5%glutaraldehyde in 0.1N sodium phosphate buffer pH7.4 (25ml)

{	0.1N HCl	0.75ml
	0.1N sodium phosphate buffer	12.5ml
	25%glutaraldehyde	2.5ml
	glutaraldehyde (TAAB, BATCH No.39360, Cat No.G015)	
	蒸留水	9ml

pH 測定し、1N NaOH を加え、pH7.4 に調整後、蒸留水で全量を 25ml にする。
- ・ 10%サッカロース in 0.05N sodium phosphate buffer、pH7.4 (100ml)

{	0.1N sodium phosphate buffer	50ml
	0.1N HCl	6.2ml
	蒸留水	2ml
	サッカロース	10g

(Wako, Lot No.CAE0363, Cat No.196-00015)
pH 測定し、0.1N HCl で pH7.2 に調整後、蒸留水で全量を 100ml にする
- ・ オスミウム酸 (TAAB 社)

・ 包埋用レジン

{	Quetol 812	6.3ml	(日新 EM 社)
	MNA	3.7ml	(日新 EM 社)
	DDSA	13.9ml	(日新 EM 社)
	DMP-30	0.3ml	(日新 EM 社)
	Total	24.2ml	

[操作]

I. 12well Transwell を用いた培養細胞の電顕用固定

- ① Transwell を PBS で 2 回洗浄した。
- ② 前固定液を apical に 0.5ml、basal に 1.5ml 添加した。RT、4h
- ③ PBS で 2 回洗浄した。
- ④ 10%サッカロース溶液を apical に 0.5ml、basal に 1.5ml 添加した。5min×4 回 RT
- ⑤ 1～2%オスミウム酸と 10%サッカロース(in 0.05N sodium phosphate buffer)、を使用直前に当量混和し plate のふたに 0.2ml 添加し、その上に chamber を乗せ、apical に 0.2ml 添加する。30min RT
- ⑥ 蒸留水ですばやく 3 回洗浄した。
- ⑦ 下記の順にエタノールを添加し脱水した。

35%EtOH	10min
50%EtOH	10min
70%EtOH	10min
95%EtOH	10min
100%EtOH	10min×4 回
- ⑧ 下記の条件で試料を包埋した。

1:1 100%EtOH:レジン	1h
100%レジン	RT 1day
100%レジン	60°C 2day

II. 光顕超薄切片の作成

- ① chamber のフィルター断面が見えるように包埋した試料をのこぎりで切断した。
- ② 型取りした台に接着剤で貼り付けた。
- ③ ガラスナイフで厚さ 350nm の光顕用薄片を作成した。

8-3-2. ワイゲルト法(レゾルシン・フクシン染色)

〔測定原理〕

弾性繊維に含まれるポリペプチド鎖、粘液多糖鎖と結合したタンパクがレゾルシン・フクシンと化学結合して紫黒色を呈する。レゾルシン・フクシンを用いた弾性線維の単染色で、後染色にはケルンエヒテロートで核を赤色に染色する。簡便な染色で、弾性線維の染色においては心、血管系病変の表現には欠かせぬ染色である。

〔使用装置・試薬〕

- ・ レゾルシン・フクシン液 (Cat.No.233-01655/Lot.No.RWF9317 /Wako)
- ・ ケルンエヒテロート液
ヌクレアファーストレッド(ケルンエヒテロート)
(Cat.No.142-4331/Lot.No.CEL2941 /Wako)
- ・ 硫酸アルミニウム (Cat.No.018-09745/Lot.No.EWQ6517 /Wako)
- ・ 蒸留水
- ・ Nikon DIAPHOT 300

〔操作〕

I. 試薬調整

ケルンエヒテロート 0.1g、硫酸アルミニウム 5g、蒸留水 100ml を 60℃に加熱しながら溶解するまで攪拌した。(濁った赤色)

- ① 作製した溶液を冷水で冷却した。(赤紫色)
- ② 溶液を濾紙にて濾過を行った。(透き通った赤紫色)

II. 試料染色

- ① 試料(超薄切片)をレゾルシン・フクシン液に室温で 60 分浸した。
- ② 試料を 70%エタノールで洗浄した。
- ③ 試料を流水洗浄した。
- ④ 十分に洗浄した試料をケルンエヒテート液に室温で 5 分間浸した。
- ⑤ 試料を十分に流水洗浄した。
- ⑥ 光学顕微鏡で観察し、画像をPCに取り込んだ。

8-4 エラスチンの調整

8-4-1. 不溶性エラスチンの抽出

〔使用装置・器具・試薬〕

- ・ 豚大動脈 (三重県松坂食肉流通センター)
- ・ 塩化ナトリウム (WAKO)
- ・ 99.5%エタノール (WAKO)
- ・ アルミ圧力鍋
- ・ ミキサー
- ・ メッシュ
- ・ 500ml ビーカー

〔操作〕

- ① 血管を水道水で洗浄した。
- ② 血管の表面に付着している組織や血塊をはさみで切り取り、水道水で洗浄した。
- ③ 塩水(10%)に漬けて、冷蔵庫の中で一日保存した。
- ④ 透明になったコラーゲンをはさみで切り取った。
- ⑤ 塩水(10%)に漬けて、冷蔵庫の中で一日保存した。
- ⑥ 新しい塩水(10%)と交換し、さらに冷蔵庫の中で一日保存した。
- ⑦ 水道水で洗浄後、圧力鍋に入れ一時間煮た。
- ⑧ 圧力鍋から取り出して水道水でよく洗浄した後、ミキサーにかけた。
- ⑨ 圧力鍋に移して、灰汁を取り除いた後、さらに一時間煮た。
- ⑩ メッシュに移して、水道水でよく洗浄した後、一日流し洗いをを行った。
- ⑪ よく水をきってから洗濯機に移し入れ、蒸留水で 10 分間洗浄した。(×4 回)
- ⑫ 洗浄後、よく水をきってからビーカーに移し、50%エタノールを加え 30 分間放置した。
- ⑬ 50%エタノールを取り除いて、70%エタノールを加え 90 分間放置した。
- ⑭ 70%エタノールを取り除いて、90%エタノールを加え一日放置した。
- ⑮ デシケーターに入れ乾燥した。(1～2 週間)

8-4-2. 水溶性エラスチンの調整

〔使用装置・器具・試薬〕

- ・ 不溶性エラスチン
- ・ シュウ酸(wako)
- ・ 50ml 遠沈管(IWAKI)
- ・ 50ml 遠沈管(nunc)
- ・ 吸引瓶(VIDREX)
- ・ ガラスフィルター(ADVANTEC)
- ・ 凍結乾燥瓶(APPROX)
- ・ 透析用セルロースチューブ(三光純薬株式会社)
- ・ オイルバス OSB-200(EYELA)
- ・ 遠心分離機 CT-6D(HITACHI)
- ・ 凍結乾燥機 FZ-4.5(LABCONCO)
- ・ pH メーター D-50(HORIBA)

〔操作〕

I. 前処理

- ① 不溶性エラスチンを 10 g ずつ取ってガラス製遠沈管に入れた。
- ② 0.25 M のシュウ酸を 45 ml ずつ加え、冷蔵庫に一晩保存した。

II. シュウ酸処理

- ① 前処理したものを 100 °C の油槽で、一時間加熱した。
- ② 氷水で十分に冷やしてから、遠心分離(3000rpm、6min)した。
- ③ 上澄み液を除去分子量 10000～14000 のセロハン透析チューブに入れた。
- ④ 上澄み液回収後、新たに同濃度のシュウ酸 20 ml を加え、再度 100 °C で一時間加熱した。
- ⑤ エラスチンが全て溶けるまで①～④の操作を繰り返した。上澄み液を入れた透析チューブを、水道水で 2～3 日流し洗いしてから、脱イオン水で透析し、外液のpHが 5～6 程度になるまで透析を行った

III. 水溶性エラスチンの取り出し

- ① チューブから上澄み液を取り出して、遠心分離(3000rpm、6min)した。
- ② 上澄み液をガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液を 2～3 日凍結乾燥することで水溶性エラスチンを得た。

8-4-3. エラスチンの分画

上述で得られた水溶性エラスチンを以下の数平均分子量、凝集温度、ゲル弾性率によって各分画に分類した。本実験では Elastin A-E までの各分画の名称を使用した。

	数平均分子量(kDa)	凝集温度(°C)	ゲル弾性率(Pa)
Elastin A	195.1	20-22.5	45000
Elastin B	169.7	22.5-25	25000-45000
Elastin C	77.5	25-30	5000-25000
Elastin D	37.8	30-35	5000-測定不能
Elastin E	22.2	35	ゲル化不可

表 8-2 エラスチンの各分画における性質

各溶液の調整

エラスチン水溶液の調整

[試薬・器具・機器]

- ・ Elastin PES-(A),(B),(C),(D),(E) (Lot.004-FEI101220060809/ECM Lab)
- ・ 滅菌水
- ・ 各種シリンジ (テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター(Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)

[方法]

- ① 各分画水溶性エラスチンを 50mg 秤量し、50ml の滅菌水に溶解させた。
- ② エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、冷蔵庫で保存した。

この方法で作成した 1mg/ml エラスチン水溶液に培地を加え 10 倍希釈し、各実験に用いた。

エラスチンゲル溶液の調整

〔試薬・器具・機器〕

- ・ Elastin PES-(A) (Lot.004-FEI101220060809/ECM Lab)
- ・ 滅菌水
- ・ 各種シリンジ (テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター(Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)

〔方法〕

- ① 各分画水溶性エラスチンを 750mg 秤量し、3ml の培地に溶解させ 20%溶液を作製した。
 - ② エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、37℃の恒温槽に約 1 時間浸した。
 - ③ 凝集したエラスチン水溶液の上澄み液を取り除いた。
- この方法で作成したエラスチンゲル溶液を各実験に用いた。

ヘパリン水溶液の調整

〔試薬・器具・機器〕

- ・ HEPARIN SODIUM (CE-4848/SCI.PRO.Lab)
- ・ 滅菌水
- ・ 各種シリンジ (テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター(Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)

〔方法〕

- ① ヘパリンを 13.3mg 秤量し、5ml の滅菌水に溶解させた。
 - ② エラスチン水溶液をシリンジで吸引し、0.22 μm フィルター滅菌を行い、冷蔵庫で保存した。
- この方法で作成した 500U/ml ヘパリン水溶液に培地を加え 10 倍希釈し、各実験に用いた。

8-5 ELISA 法による BrdU 細胞増殖試験

〔測定原理〕

96 穴プレートで培養した細胞において、 $10\mu\text{M}$ の BrdU を、細胞周期のS期で新たに合成されるDNA中に特異的に取り込ませ、0.5Mエタノール/塩酸溶液で固定する。その後、ヌクレアーゼ処理により、BrdU が取り込まれなかった部分のDNAを消化し、anti-BrdU-POD 抗体で BrdU を認識させる。そして、水溶性の色素前駆体である ABTS を加えると、結合した標識抗体である peroxidase がそれを分解し、緑色に可視化する。その分解され呈色した ABTS の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。

〔使用装置・器具・試薬〕

- ・CO₂ インキュベーター (池本理化工業株式会社)
- ・恒温槽 (Yamato)
- ・ボルテックス (TAITEC)
- ・遠心機 (KUBOTA2010) (KUBOTA)
- ・Microplate Reader Model 550 (BIO-RAD)
- ・オートクレーブ滅菌済みクリーンベンチ内器具
- ・ピペットおよびディスペンサー
- ・チップ各種およびマイクロピペッター (ピペットマン) 各種
- ・パスツールピペット
- ・吸引ポンプ
- ・エルマ血球計算盤 (Erma)
- ・96 穴プレート (Cat.No.MS-8096F/住友ベークライト株式会社)
- ・BrdU Labeling&Detection Kit III (Cat.No.1444611/ロシュ・ダイアグノスティックス)
- ・Medium 199 (Cat.No.M2154/SIGMA)
- ・FBS (Cat.No.10437-028/Invitrogen Corporation)
- ・Phosphate Buffered Saline (PBS) (Cat.No.D8537/SIGMA)

〔試薬の調整〕

- ① BrdUラベリング試薬を使用直前に滅菌済みPBSで1:90の割合で希釈した。(96穴プレート1枚につき、12 μ lのBrdUラベリング試薬を1.068mlのPBSで希釈した。)
- ② 濃縮洗浄緩衝液を再蒸留水で1:10の割合で希釈し、洗浄緩衝液を調整した。(96穴プレート1枚につき、6mlの濃縮洗浄緩衝液を54mlの再蒸留水で希釈した。)冷蔵庫で保管した。
- ③ 再蒸留水で希釈した50%(w/v)グリセリン1.3mlをヌクレアーゼストック液とし、 -20°C で保管した。
- ④ ヌクレアーゼストック液を、使用直前に、インキュベーション緩衝液で1:100の割合で希釈した。(96穴プレート1枚につき、100 μ lのヌクレアーゼストック液を9.9mlのインキュベーション緩衝液で希釈した。)
- ⑤ anti-BrdU-POD抗体を1.25mlの再蒸留水で希釈(最終濃度20U/ml)し、anti-BrdU-POD抗体ストック液を調整した。
- ⑥ anti-BrdU-POD抗体ストック液を、使用直前に、10mg/mlのBSA入りの洗浄緩衝液で1:100の割合で希釈し、anti-BrdU-POD抗体使用液を調整した。(96穴プレート1枚につき、100 μ lのanti-BrdU-POD抗体ストック液を9.9mlのBSA-洗浄緩衝液で希釈した。)
- ⑦ 基質緩衝液にABTSの粉末を入れ、室温で透明になるまで攪拌し、Peroxidase基質を調整した。遮光し、冷蔵庫で保管した。
- ⑧ 固定液を調整した。96穴プレート1枚につき、100%エタノール7mlを2.33mlの再蒸留水で希釈し、25%の塩酸を670 μ l加え、 -20°C で保管した。使用前は冷蔵庫で冷やしておいた。

[操作]

- ① 96 穴プレートに細胞を播種(細胞密度: 2.0×10^3 cell/well)し、CS-C(+)溶液 100 μ l 加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 72h 培養した。
- ② 培地を吸引し、PBS を 250 μ l 加え洗浄した。
- ③ エラスチン水溶液を CS-C(-)溶液で各濃度(10,50,100,200 μ g/ml)に希釈した。
- ④ 培地を吸引し、調整した溶液を 100 μ l ずつ各 well に加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 72h 培養した。(エラスチンゲル溶液 100 μ l をいれ、その上に CS-C(-)培地を 100 μ l 加えた。
- ⑤ 各ウェルに 10 μ l の BrdU ラベリング溶液を加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 6h 培養した。
- ⑥ ラベリング溶液を含んだ培地を吸引し、250 μ l の 10%FBS/F-12 溶液で 2 回洗浄した。
- ⑦ 培地を吸引し、予め冷やしておいた固定液を各 well に 200 μ l ずつ加え、-20°Cで 30 分間細胞を固定した。
- ⑧ 固定液を吸引し、250 μ l の 10%FBS/F-12 溶液で 3 回洗浄した。
- ⑨ 培地を吸引し、各 well に 100 μ l のヌクレアーゼ使用液を加え、37°Cで 30 分間インキュベートした。
- ⑩ ヌクレアーゼ使用液を滅菌済みパスツールで吸引し、250 μ l の 10%FBS/F-12 溶液で 3 回洗浄した。
- ⑪ 洗浄液を吸引し、anti-BrdU-POD 抗体使用液を 100 μ l ずつ加え、37°Cで 30 分間インキュベートした。
- ⑫ 抗体を除き、250 μ l の洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。
- ⑬ 洗浄緩衝液を吸引し、100 μ l の peroxidase 基質を加え、室温で positive サンプルが緑色を呈するまでインキュベートした。
- ⑭ 490nm をリファレンスにして、405nm でのサンプルの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

8-6 フローサイトメトリーによる細胞骨格タンパク(SM α -actin)量測定

[フローサイトメトリーの測定原理]

蛍光染色を施した細胞を浮遊液の状態にして、細い管の中を通過させる。これにレーザー光線を当てると、細胞に当たった光は散乱光と蛍光の2種類の光となる。散乱光のうち、前方散乱光は相対的な細胞の大きさを、側方散乱光は細胞の内部構造の複雑さを反映する。一方、蛍光は検索対象とした細胞の生物学的特徴(DNA 量、細胞表面抗原、細胞内抗原など)を反映する。これらの光は、直進方向あるいは直角方向に設置された検出器により電気的信号に変換、増幅され、オシロスコープ上にサイトグラムあるいはヒストグラムとして表示される。すなわち、顕微鏡を用いることなく、個々の細胞から複数の情報を、同時に、迅速に、かつ客観的に収集することができる。

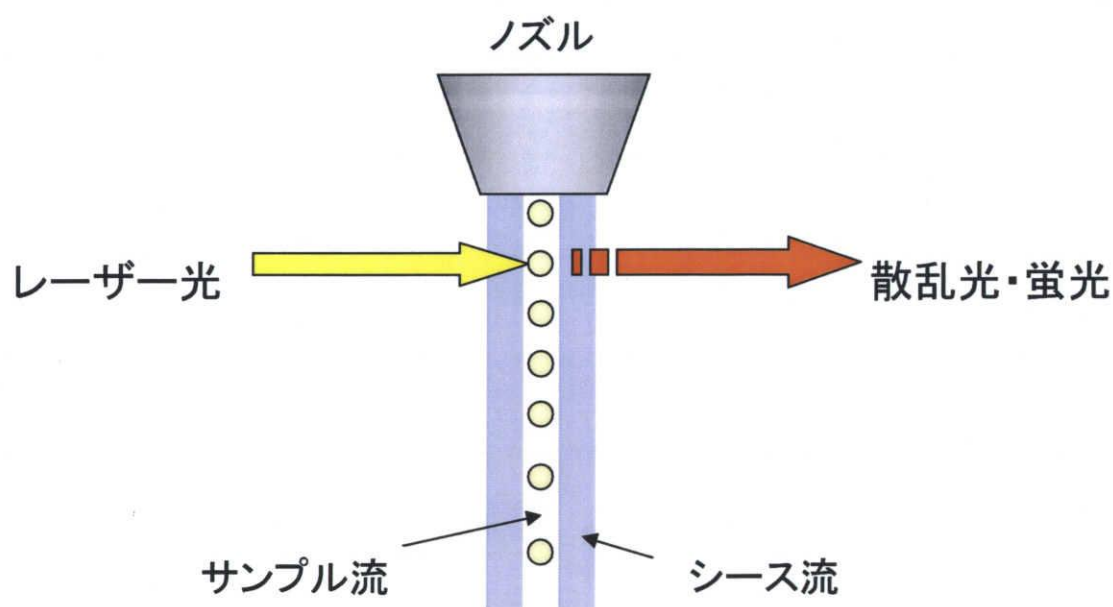


図 8-1 個々のサンプルにレーザー光が当たる仕組み

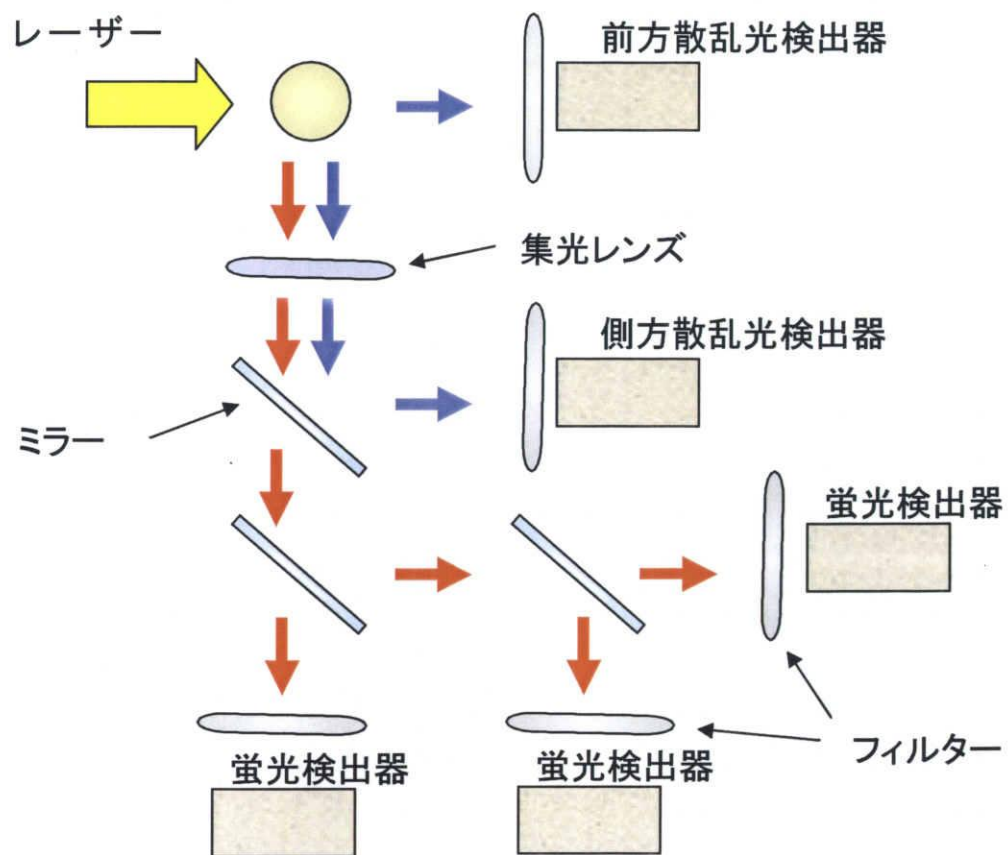


図 8-2 散乱光・蛍光の検出機構

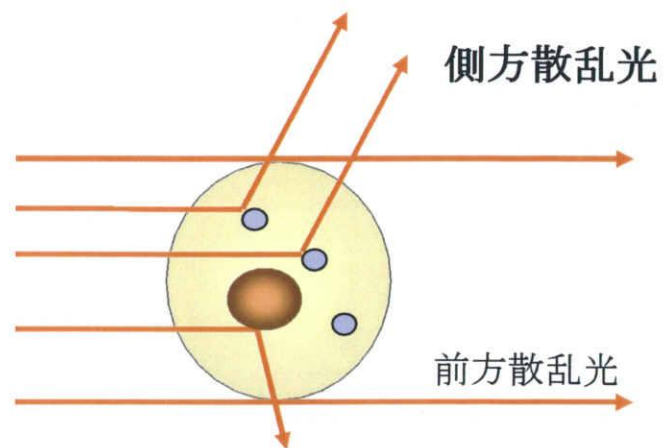


図 8-3 散乱光発生図

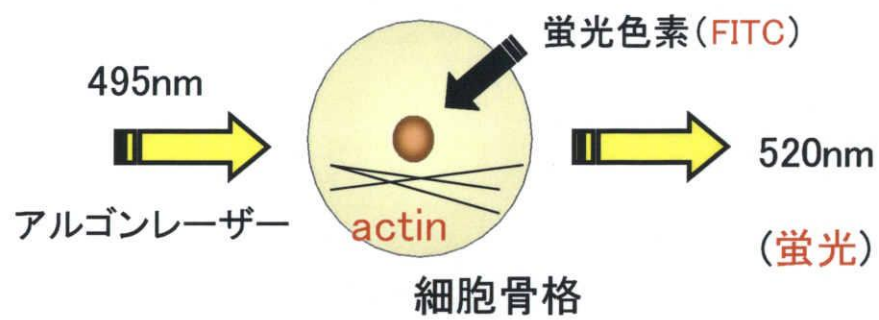


図 8-4 蛍光発生図

[使用装置・器具・試薬]

- ・ FACSCalibur (Becton Dickinson、遺伝子研究施設)
- ・ 35 μ m セルストレーナー (Cat.No.352235/Becton Dickinson)
- ・ 6well プレート (MS-80060/SUMILON)
- ・ Monoclonal Antibody to Human Actin, Alpha-Smooth Muscle -FITC
(Cat.No. DM001F/Lot.21835/AcrisAntibody)
- ・ TritonX-100 (Cat.No.T8787/SIGMA/50ml)
- ・ PBS (SIGMA)
- ・ Albumin, Bovine (LEL2192/Wako)
- ・ CS-C Medium (WITHOUT GF) (4Z0-500S/cell systems)
- ・ Elastin PES-(A),(B),(C),(D),(E) (Lot.004-FEI101220060809/ECM Lab)

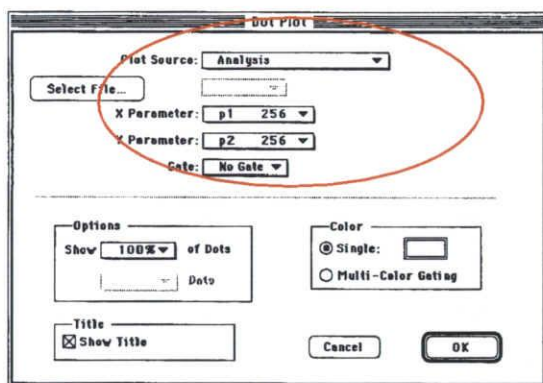
[方法]

- ① 6 穴プレートに 10%FBS/CS-C(-)を 2ml/well 入れ、細胞密度 1.0×10^5 cell/well で播種し 3 日間プレインキュベートした。
- ② PBS 溶液 2ml/well を添加し、前後左右に振り洗浄した。
- ③ PBS 溶液を吸引した後、調整した各溶液を well に入れ 3 日間プレインキュベートした。
- ④ 各溶液を吸引した後、PBS 溶液 2ml/well を添加し、前後左右に振り洗浄する。
- ⑤ PBS 溶液を吸引後、トリプシン溶液 2ml/well 加え、1 分間放置した。
- ⑥ 細胞が well から剥離した後に FBS を 1ml/well 加え 100G (800rpm, 1 分間) で遠心分離した。
- ⑦ 上澄み液を吸い取り 70%エタノールを加え 5 分間固定した後、100G (800rpm 1 分間) で遠心分離した。
- ⑧ 1%BSA/PBS, 0.1%Triton-X100 を加え 5 分放置した後、100G (800rpm, 1 分間) で遠心分離した。
- ⑨ 細胞懸濁液に抗 SM α -actin-FITC を 2ml 加え、暗室室温で 30 分インキュベートした。
- ⑩ 測定直前に細胞を PBS 500 μ l を加え再懸濁し、セルストレーナーを通して測定した。

8-7 FACSCalibur 操作法(細胞表面抗原解析-FITC 標識-)

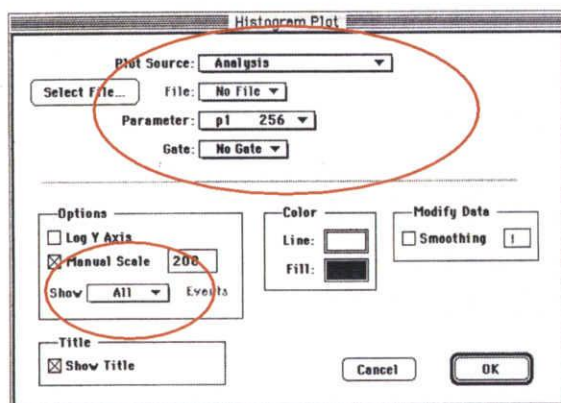
1. データの取り込み

- ① アップルメニューより CELL QUEST を起動させる
⇒ソフトが立ち上がり、白紙画面表示
- ② Plots メニューの Dot Plot を選択する
⇒Dot Plot ダイアログボックスが表示される



- Plot Source を Acquisition に設定した。
- X Parameter を FSC、Y Parameter を SSC に設定し OK をクリックする
⇒FSC vs SSC ドットプロットが表示される

- ③ Plots メニューの Histogram plot を選択する
⇒Histogram plot ダイアログボックスが表示される



- Plot Source を Acquisition に設定する
- Parameter を FL1-H(FITC 標識の場合) に設定する
- Show Events ポップアップメニューで表示 event 数を all に設定し、OK をクリックする
⇒FL1-H ヒストグラムが表示される

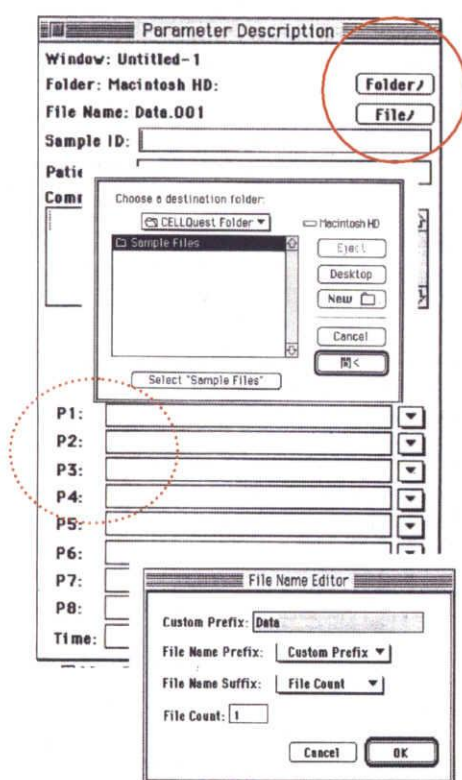
- ④ Acquire メニューの Counters を選択する
⇒Counters ウィンドウが表示される
- ⑤ Acquire メニューの Connect to Cytometer を選択する

⇒Acquisition Control ウィンドウが表示される



⑥ Acquire メニューの Parameter Description を選択する

⇒Parameter Description ウィンドウが表示される



•Folder を選択する

⇒destination folder ダイアログボックスが表示される

•Desktop →

New の順に選択し、
folder 名を入力した後に
Select“フォルダ名”を選択

•File を選択する

⇒File Name Edit ウィンドウが表示される

•Custom Prefix に

ファイル名を入力

•File Name Suffix を選択し

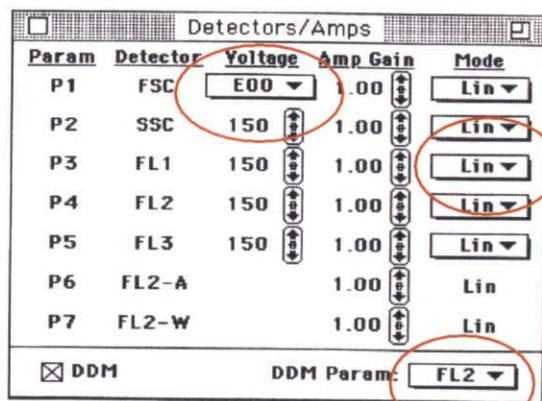
None に設定し、OK を
クリックする

※Dot Plot、Histogram plot の順に作成した場合、ドットプロットの X 軸(=P1)、Y 軸(=P2)

ヒストグラムの X 軸(=P3)、Y 軸(=P4)に対応している

⑦ Cytometer メニューの Detectors/Amps を選択する

⇒Detectors/Amps ウィンドウが表示される

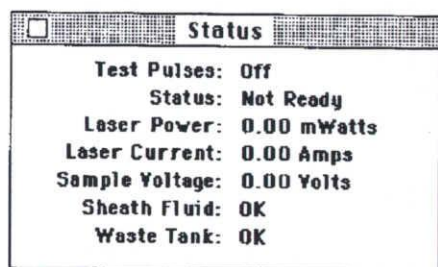


- FSC の Voltage を E00 に設定する
- Detector: FL1 の Mode を log に設定する
(FITC 標識の場合)
- DDM Param を FL1 に設定する
(FITC 標識の場合)

平滑筋細胞 (SM α -actin の場合)

SSC 350 Amp Gain 5.74
FL1 560

- ⑧ Cytometer メニューの Status を選択する
⇒Status ウィンドウが表示される



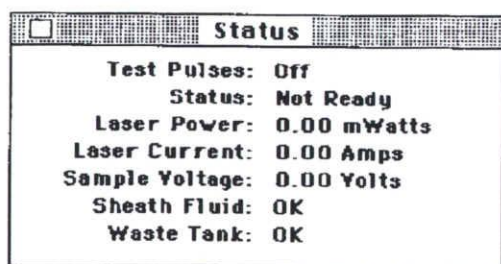
•Not Ready:レーザーのウォームアップ状

シースタンクが空の状態

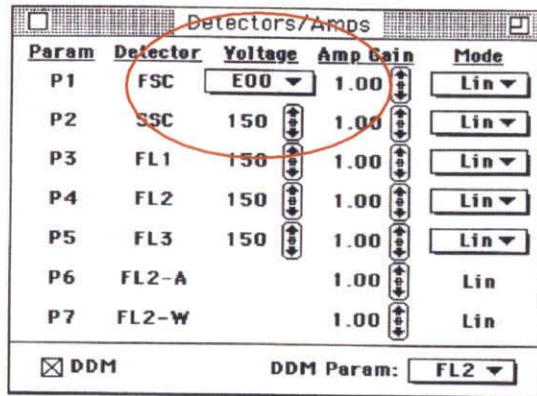
廃液タンクが満タンの状態

- ⑨ サンプルを準備し、本体で流速を「Low」に設定し、「Run」ボタンを押す
⇒サンプルが流れる(5 秒程度で安定する)

- ⑩ Status ウィンドウの Status が Ready になっていることを確認し、Acquisition Control ウィンドウ
の Acquire を選択する
⇒データの取り込み開始

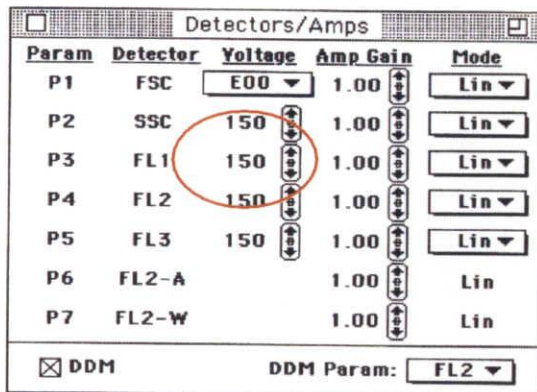


- ⑪ Detectors/Amps ウィンドウ画面で FSC の Amp Gain と SSC の Voltage を調節する
⇒FSC vs SSC ドットプロットに表示されている細胞集団が移動

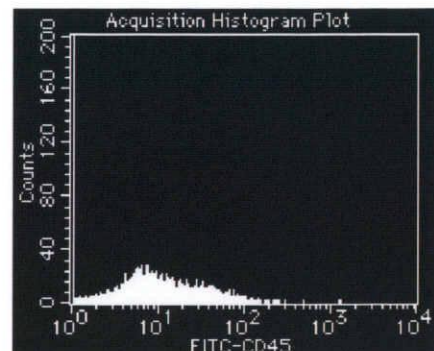


・FSC vs SSC ドットプロット:細胞集団が画面中央に来るように設定する
(細胞集団が FSC vs SSC ドットプロットにおいて右側にへばりついてしまっている場合、FSC の Voltage を E-1 に設定する。)

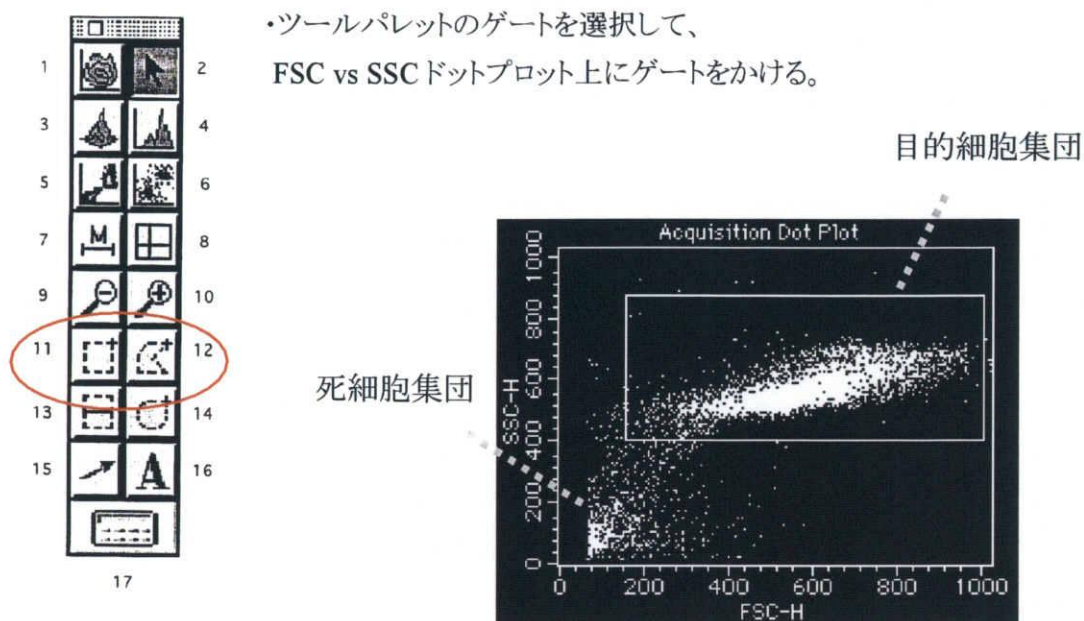
- ⑫ Detectors/Amps ウィンドウ画面 FL1-H の Amp Gain を調節する
⇒FL1-H ヒストグラムに表示されている細胞集団が移動



・FL1-H の log 値が 10^{-1} にくるように設定する
(コントロール細胞とする)

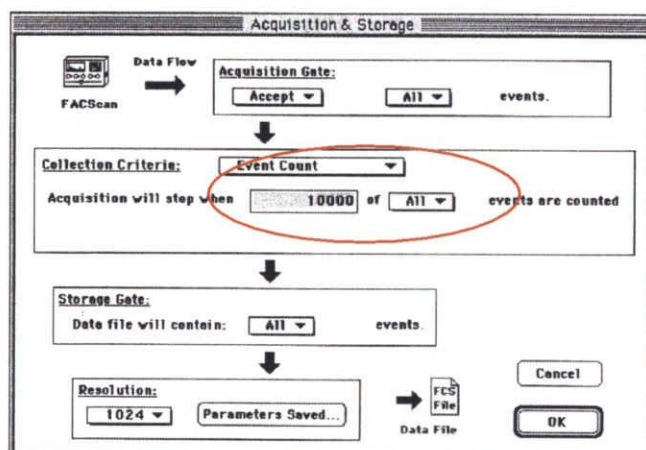


- ⑬ ・FSC vs SSC ドットプロットで同一細胞集団にゲート R1 をかける



- ⑭ Acquireメニューの Acquisition & Storage を選択する

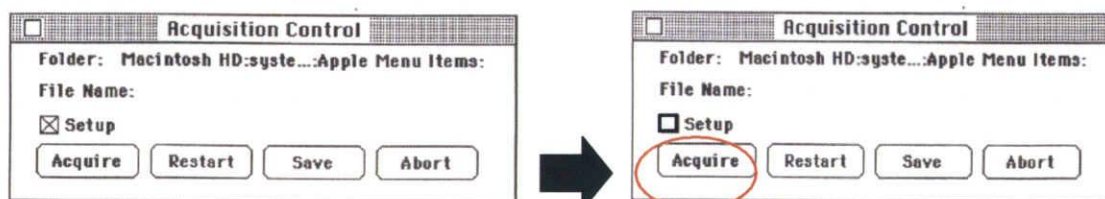
⇒ Acquisition & Storage ウィンドウが表示される



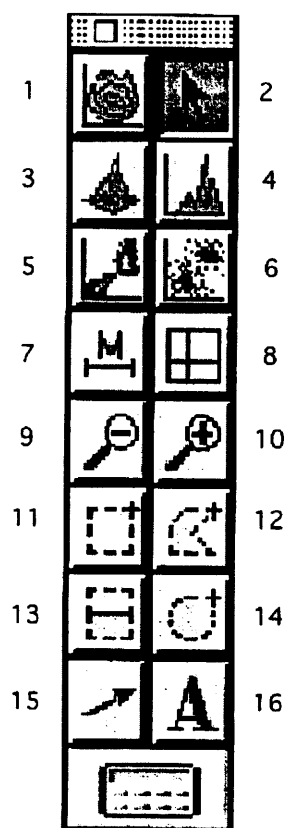
・細胞カウント数を 10000 of
GateR1 に設定し、OK を
クリックする

- ⑮ Acquisition Control ウィンドウの Setup 前のチェックボックスを解除し、Acquire を押す

⇒ データ取り込み開始



※ツールパレット使用法



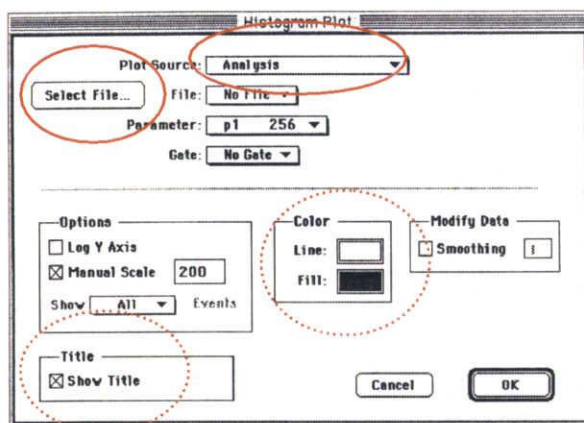
17

	ツールの名称 および機能	使用方法
1	Contour-Plot (コンタープロットの作成)	ツールを選択後、使用していないドキュメント内をクリックし、プロットのサイズが適切になるようにドラッグします
2	Selection (表示の移動、拡大、縮小)	ツールを選択後、ドキュメント内の1つ、またはそれ以上の項目を選択し、サイズを変更したり、移動したりすることができます
3	3D-Plot (3Dプロットの作成)	ツールを選択後、使用していないドキュメント内をクリックし、プロットのサイズが適切になるようにドラッグします
4	Histogram-Plot (ヒストグラムの作成)	ツールを選択後、使用していないドキュメント内をクリックし、プロットのサイズが適切になるようにドラッグします
5	Density-Plot (デンシティブロットの作成)	ツールを選択後、使用していないドキュメント内をクリックし、プロットのサイズが適切になるようにドラッグします
6	Dot-Plot (ドットプロットの作成)	ツールを選択後、使用していないドキュメント内をクリックし、プロットのサイズが適切になるようにドラッグします
7	Histogram Marker (ヒストグラムマーカーの設定)	ツールを選択後、ヒストグラム内をクリックし、マーカーの左側の位置を設定してから、マーカーの右側の位置を設定するようにドラッグします
8	Quadrant Marker (蛍光四分画マーカーの設定)	ツールを選択後、ドットプロット、デンシティブロット、コンタープロットのいずれかの中をクリックし、蛍光四分画マーカーの位置を設定します
9	Zoom-Out (拡大表示の縮小)	拡大したプロットを元のサイズに戻すときに、ツールを選択後、拡大したプロットをクリックします
10	Zoom-In (表示の部分拡大)	ツールを選択後、プロット内の拡大したい部分をクリックしながらドラッグし、点線で囲みます Zoom-Outを選択し、拡大したプロットをクリックすると、元のサイズに戻ります

	ツールの名称 および機能	使用方法
11	Rectangler-Region (四角形ゲートの作成)	ツールを選択後、ドットプロット、デンシティブロット、コンタープロットのいずれかの中をクリックし、ゲートのサイズが適切になるようにドラッグします
12	Polygon-Region (多角形ゲートの作成)	ツールを選択後、ドットプロット、デンシティブロット、コンタープロットのいずれかの中をクリックし、まずゲート設定の開始ポイントをクリックし設定後、対象とする細胞集団の周囲にポイントを移動させ、クリックしながら多角形で囲んでゆき、最後に最初にクリックした開始ポイントをクリックすることによって、ゲートを閉じます
13	Histogram-Region (ヒストグラムゲートの作成)	ツールを選択後、ヒストグラムプロット内をクリックし、ゲートの左側の位置を設定してから、ゲートの右側の位置を設定するようにドラッグします
14	Elliptical-Region (楕円形ゲートの作成)	ツールを選択後、ドットプロット、デンシティブロット、コンタープロットのいずれかの中をクリックし、ゲートのサイズが適切になるようにドラッグします
15	Arrow (矢印の記入)	ツールを選択後、矢印の始点としたいドキュメント内の部分をクリックし、矢印の終点としたい位置までドラッグします
16	Text (文字の入力)	ツールを選択後、ドキュメント内の文字を入力したい場所をクリックし、文字を入力します 入力終了後は、文字入力場所以外のどこかをクリックし、確定します
17	Calculator (統計計算結果の再計算)	Auto RecalculateがOFFになっている場合、ツールを選択することにより、データの統計計算結果を再計算します

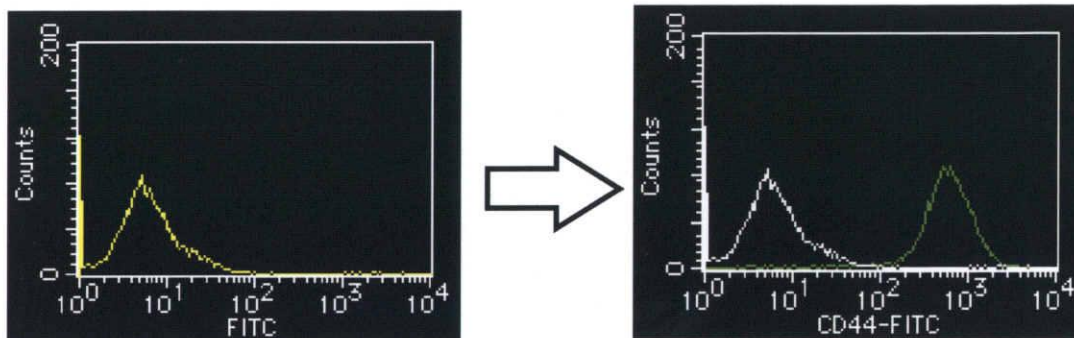
2. データ解析

- ① File メニューの Quit を選択する
⇒CELL QUEST が終了する(Don't save を選択)
- ② アップルメニューから CELL QUEST を起動させる
⇒ソフトが立ち上がり、白紙画面表示
- ③ Plots メニューの Histogram plot を選択する
⇒Histogram plot ダイアログボックスが表示される



- Plot Source を Analysis に設定する
- select file から取り込んだ file を選択する。
⇒FL1-H ヒストグラムが表示される
(グラフの色などの設定を変更したいとき Color で設定を変える)
- Title の Show Titl のチェックをはずす
⇒title 表示が off になる

- ④ 作成したヒストグラムを選択して、Plots メニューから over ray を選ぶ
⇒over ray histogram ダイアログボックスが表示される
select file から取り込んだ file を選択する。⇒dver ray FL1-H ヒストグラムが表示される



- ⑤ ヒストグラムの作成が終了したら、画像を MO ディスクに保存する
("shift"と"アップルキー"を押しながら"3"を押す＝スクリーン記録)
- ⑥ HD 上のデータはゴミ箱に移し、ゴミ箱を空にする

8-8 細胞骨格(SM α -actin)の形態変化における定性評価(免疫化学染色)

〔測定原理〕

免疫化学染色は、特定のタンパク質を検出する方法で、各々の細胞の特異的なタンパク質を標識し、それを確認することにより細胞の同定を行う。

特定タンパクに一次抗体を認識させ、さらにその一次抗体を抗原として認識する蛍光物質を標識した二次抗体を用いる。二次抗体には特定の動物種の免疫グロブリンを認識する抗体を利用する。同じ動物種の由来の一次抗体であれば二次抗体が認識可能である。

それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する。

(図 8-5)

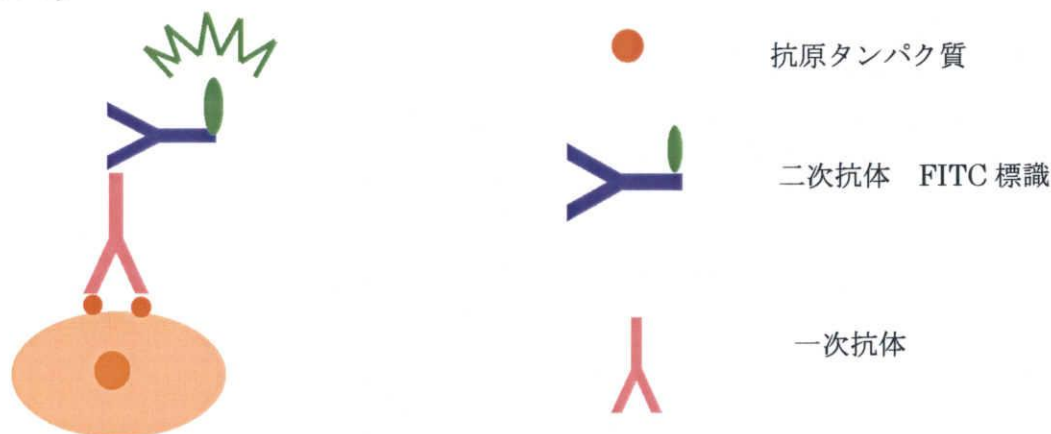


図 8-5 抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

・FITC (fluorescein isothiocyanate)

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が高い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

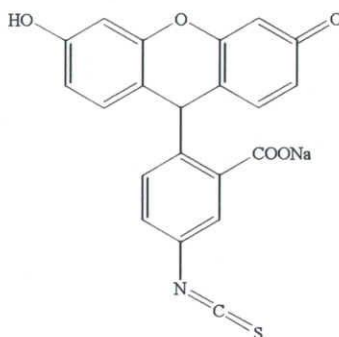


図 8-6 FITC

〔使用装置・器具・試薬〕

- ・ 共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000 倒立顕微鏡 IX81)
- ・ Chamber Slide 8Chamber (Cat. No. 117745/NUNC)
- ・ Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4
(Cat. No. M0851/Lot. No. 00004710/Dako)
- ・ GOAT ANTI-MOUSE IgG (H+L) FLUORESCCEIN CONJUGATED
SECONDARY ANTIBODY (Cat. No. AP308F/Lot. No. 24110620/WAKO)
- ・ acetone (WAKO)
- ・ methanol (WAKO)
- ・ CS-C Medium (WITHOUT GF) (4Z0-500S/cell systems)
- ・ Elastin PES-(A),(B),(C),(D),(E) (Lot.004-FEI101220060809/ECM Lab)

〔操作〕

I. 8wells チャンバーへの播種 (培地:平滑筋細胞 CS-C 無添加)

- ① 8well チャンバーに 10%FBS/CS-C(-)を 300 μ l/well 入れ、細胞密度 5.0×10^3 cell/well で播種し 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養した。
- ② プレインキュベート後、継代培養により作成した細胞懸濁液を 30 μ l/well 添加し 3 日間プレインキュベートした。
- ③ 培地を吸引した後、調整した各溶液を加え 3 日間プレインキュベートした。

I. 溶液の調整

- ① ウシ血清アルブミン 300mg を調整し、PBS30mL に溶解させ 1%BSA/PBS を作製した(2 本作製)。
- ② ①で作製した 1%BSA/PBS に tritonX-100 を加え、1 % BSA、0.02%tritonX-100/PBS を作製した。
- ③ acetone、methanol を 15mL ずつ加え、acetone/methanol (1:1)の固定液を作製し、-20°Cで保管した。

II. 固定

- ① 固定細胞を 8 穴 glass chamber slide 上で confluence になるまで培養し、培地を取り除き PBS で洗浄した。
- ② -20°Cの acetone/methanol (1:1)にて室温で 5 分間固定した後、固定液を除き 10 分間風乾した。
- ③ この状態で測定まで-4°Cに保存した。(保存は 2 週間以内)

Ⅲ. 一次抗体

- ① 1%BSA/PBS で 20 分間置換した。
- ② 細胞に 200 μ L(希釈:1%BSA、0.02%tritonX-100/PBS)の一次抗体を加え、4℃、飽和湿度で overnight させた。
- ③ 一次抗体を吸引除去し、1%BSA/PBS で 3 回洗浄した。

Ⅳ. 二次抗体

- ① 二次抗体を 200 μ L(希釈:1%BSA、0.02%tritonX-100/PBS)加え、90 分間、暗所室温で放置した。
- ② 二次抗体を取り除き 1%BSA/PBS で 3 回洗浄した。
- ③ slide strip より well wall を取り除き、シーラーを剥がした。
- ④ slide glass を乾燥した。(オーブン、ドライヤー etc)
- ⑤ 共焦点レーザー顕微鏡で観察し撮影した。

抗体名		濃度	希釈率
一次抗体 (anti-Human)	α -Smooth muscle actin	70mg/l	1:50~100
二次抗体	Goat anti-Mouse IgG FITC		1:200~250

表 8-3 各抗体の調整

8-9 共焦点レーザー顕微鏡

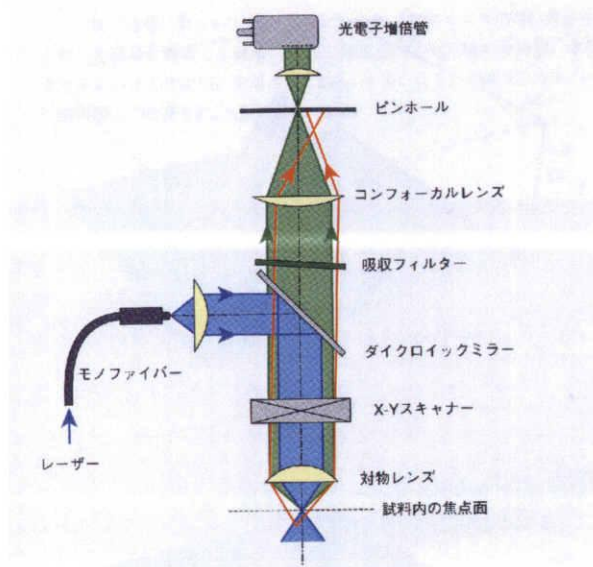
〔共焦点レーザー走査顕微鏡の原理〕

普通の顕微鏡を使っていると、焦点外のぼけの重なりによるコントラストの低下がしばしば観察の障害になる。高倍率になるとなおさらである。これを解決するものが共焦点レーザー走査顕微鏡である。最大の特徴は、ぼけを排除できること、高倍率でも鮮明な画像が得られ、立体観察も容易である。切片像を無浸襲で得られるので、組織や細胞を生きたまま詳細に見ることも可能である。

原理はシンプルで、その中核になるのは点光源とピンホールの2つである。これらが巧妙に配置されている。

レーザーから出力されたビームは、光ファイバーを通して共焦点顕微鏡に導かれ、点光源として用いられる。その光をレンズによって平行光に変換し、ダイクロイックミラーによって落射照明にされ、対物レンズの試料側の焦点に収束する。

対物レンズの焦点に収束した照明光は、試料の蛍光色素を励起する。そこから発した蛍光を、対物レンズが集めて結像させる。この結合位置にあわせてピンホールを置くと、ピンホールに結像した光が通過し、検出器によって電気信号に変換されたものを観察する。



〔使用装置〕

- ・ 共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (OLYMPUS)
- ・ 倒立型顕微鏡 IX81 分光タイプ (OLYMPUS)

[方法]

I システムの立ち上げ

- ① パソコンを ON にした。
- ② レーザーを ON にした。
- ③ モニター上にパスワード入力画面が表示された後、水銀ランプを ON にした。
- ④ ユーザー名・パスワードを入力し WindowsXP へログオン。

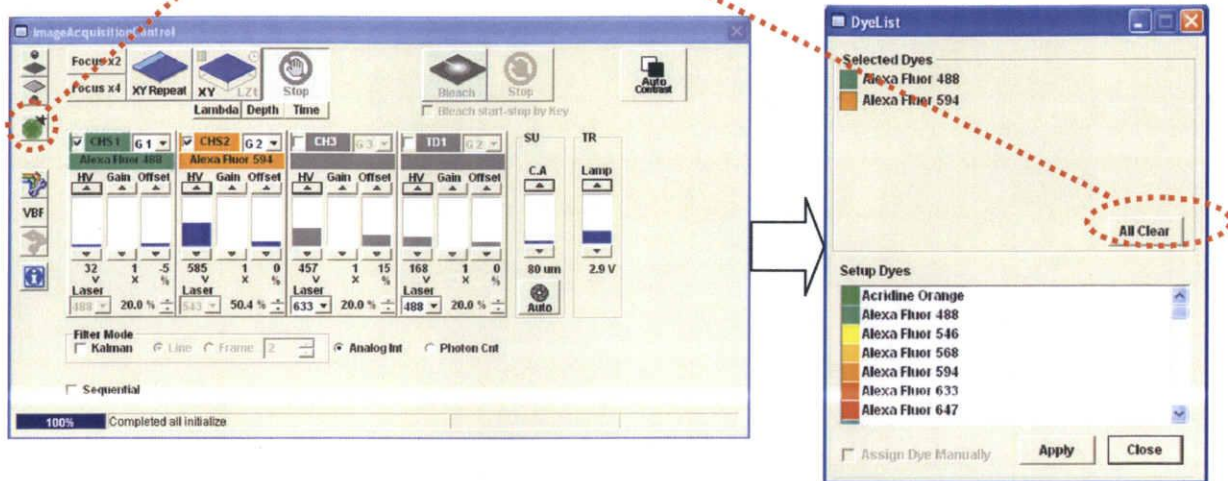
User ID: Administrator
Password: fluoview

- ⑤  をダブルクリックしユーザー名・パスワードを入力、
FV10-ASW ソフトウェアを起動した。

User ID: Administrator
Password: Administrator

II 蛍光試薬選択

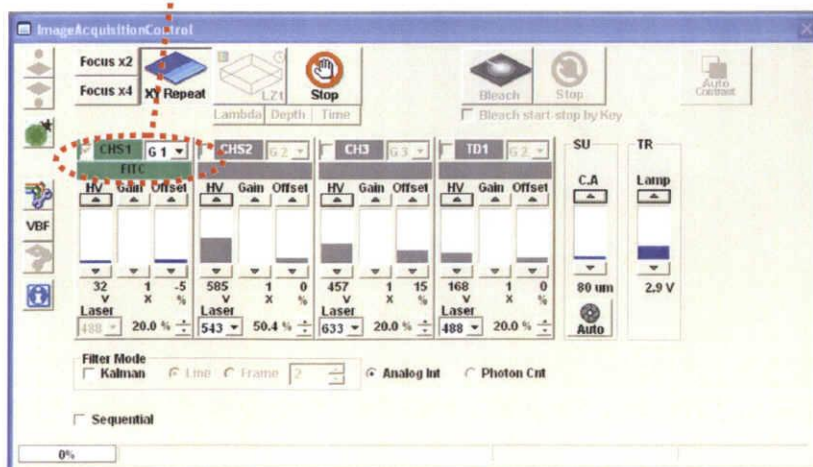
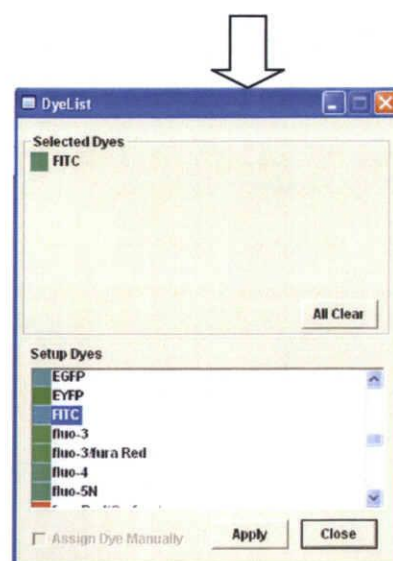
- ① DyeList ボタンをクリックし、All Clear ボタンをクリックしリセットした。



- ② DyeList パネルから観察する蛍光試薬を選びダブルクリックした。

- ③ Apply ボタンをクリックして閉じる。

- ④ CHS1 の蛍光試薬が変更したことを確認した。



II 顕微鏡で目視観察

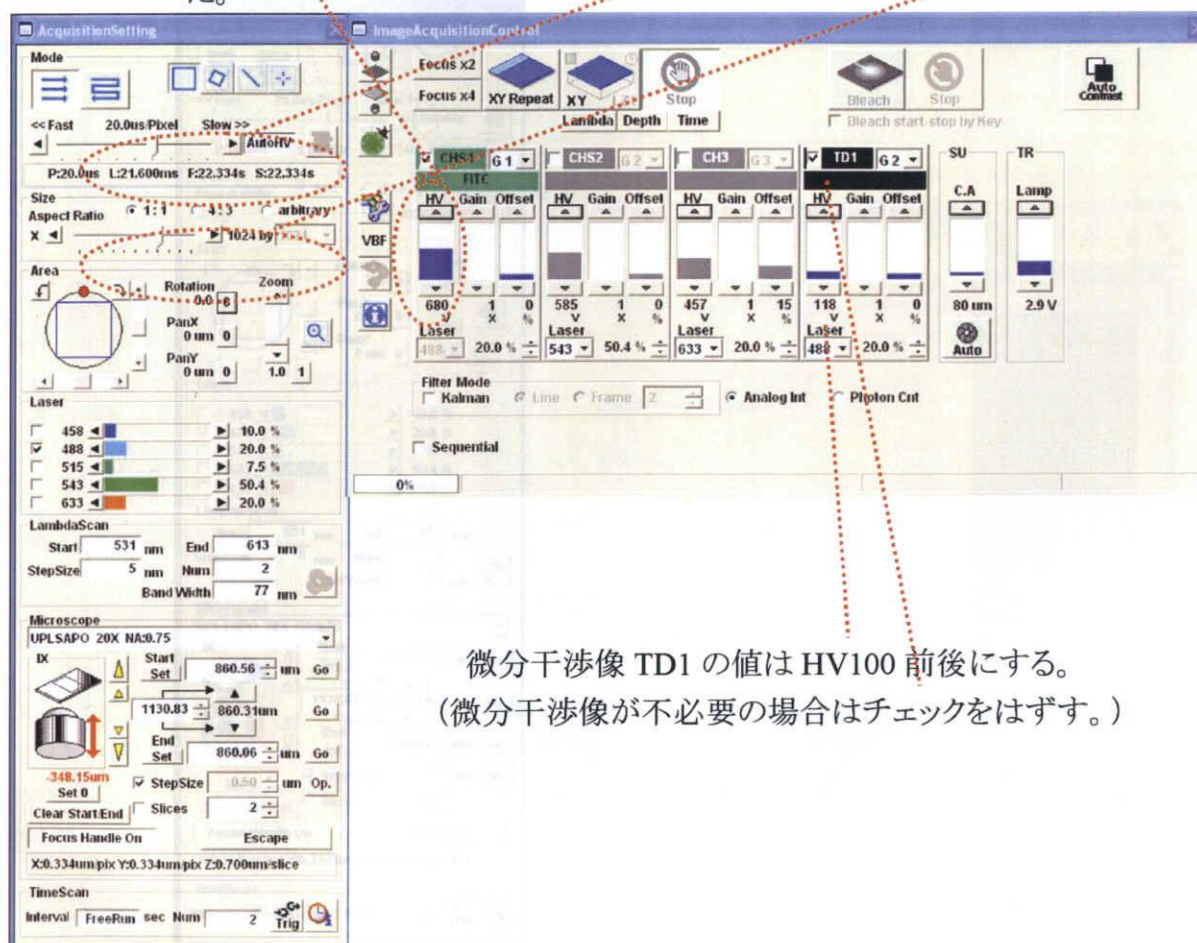
- ① ハンドスイッチで対物レンズを選択した。
(10,20 倍レンズ:ドライ 40,60 倍レンズ:オイルを用いた。)
- ② パソコン上のアイコンをクリックし、ハロゲンランプ、蛍光レーザーの ON、OFF をした。



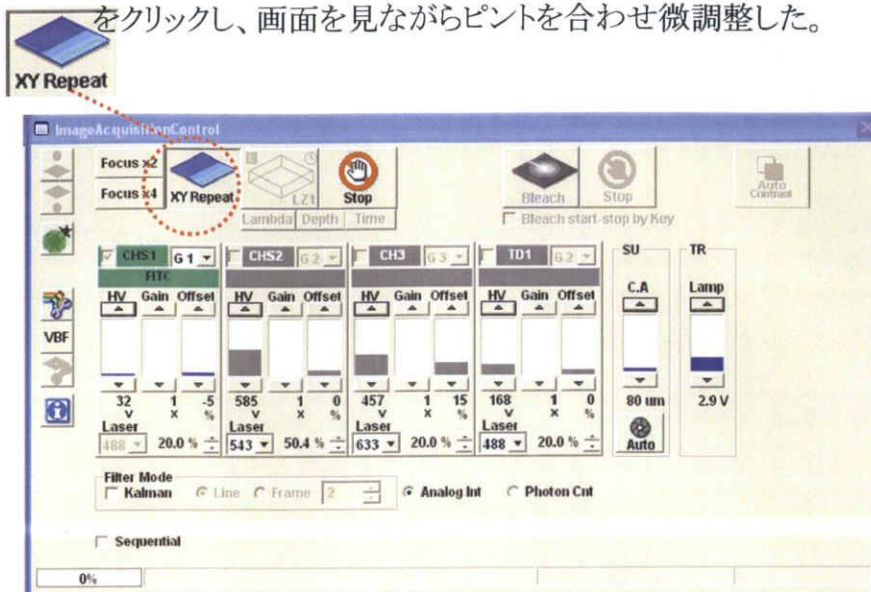
- ③ 顕微鏡手前のフォーカススイッチ等によりピント調節した。

III 画像の取得(試し撮り)

- ① HV の値を 600~680、スキャン速度 8.0us/Pixel、画素数 512by にセットした。

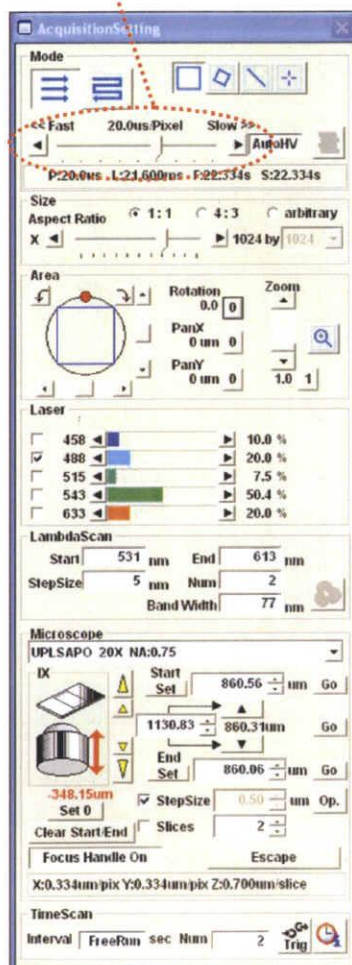


- ②  をクリックし、画面を見ながらピントを合わせ微調整した。

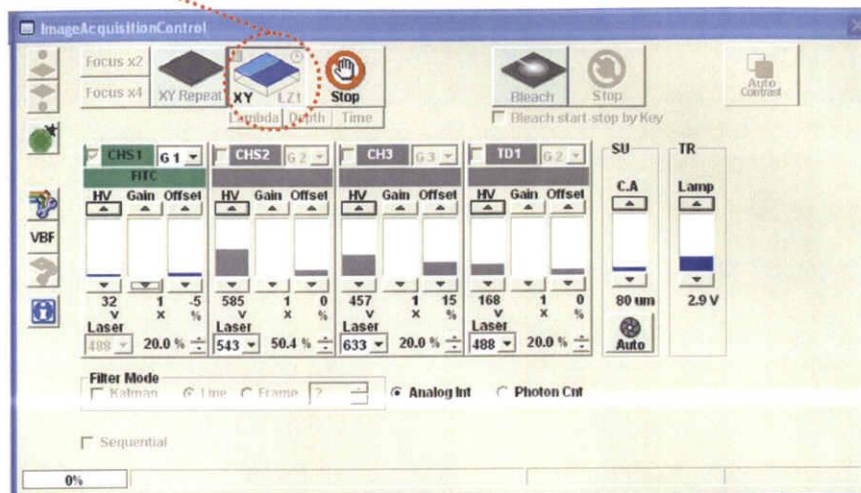


IV 画像の取得(本番)

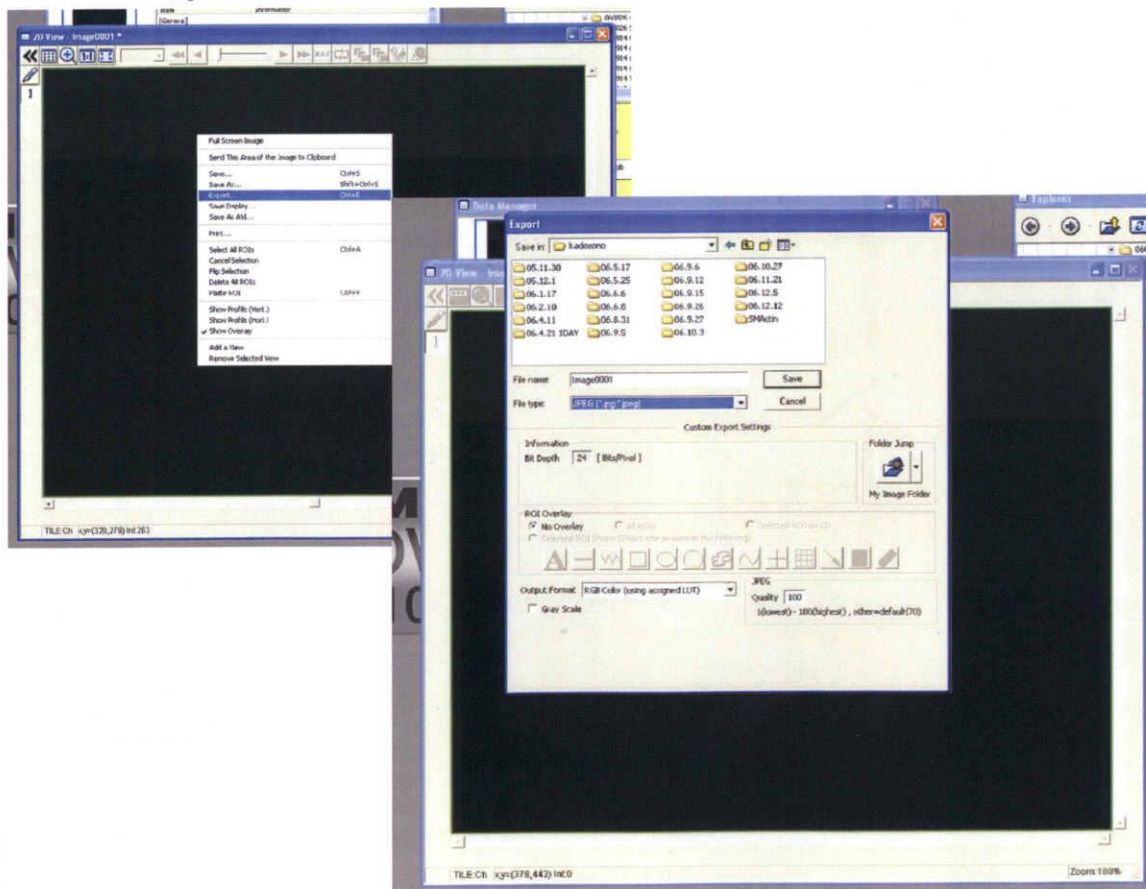
- ① 40.0us/Pixel に設定を変更した。



- ②  をクリックし、画像を取得した。



- ③ 取得した画像の上で、右クリックし Export を選択、名前をつけて保存する。



V システムの終了

- ① FV10-ASW ソフトウェアを終了した。
- ② WindowsXP を終了した (Start/ShutDown→「ShutDown」を選択)。
- ③ レーザーを OFF にした。
- ④ 水銀ランプを OFF にした。

補足

The screenshot displays two windows from the FV10-ASW software. The 'AcquisitionSetting' window (top left) includes controls for Mode, Size, Aspect Ratio, Area, Rotation, Zoom, Laser, and LambdaScan. The 'ImageAcquisitionControl' window (bottom right) shows controls for Focus, XY Repeat, XY, Lambda, Depth, Time, Bleach, Stop, Auto Contrast, and various channel settings (CHS1, CHS2, CHS3, TD1, SU, TR) including HV, Gain, and Offset. A 'Filter Mode' section at the bottom of the ImageAcquisitionControl window has checkboxes for Kalman, Line, Frame, and Sequential.

Annotations in Japanese:

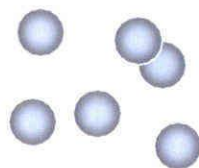
- 向き・角度の調整
試料を動かさずに撮影可能
- デジタルズーム
対物レンズを換えずに高倍率で観察可能
- 通常、Offset を 0 にしておく。
HV だけ値を変える。
- 単染色ではチェックを入れない。

8-9 SM α -actin の形態による定性評価

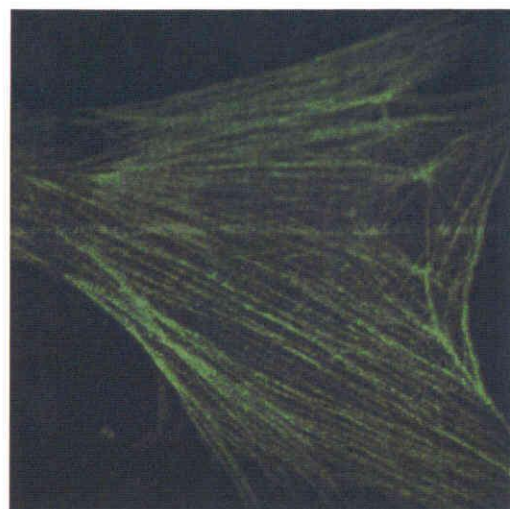
撮影した画像をもとに、細胞内の骨格タンパク SM α -actin の形状を球状アクチン (G-actin)、線維状アクチン (F-actin) と区分し、SM α -actin の線維化する細胞の割合を測定した。



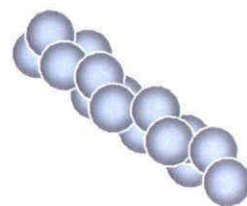
a



Globular-actin: 球状アクチン



b



Fibrous-actin: 繊維状アクチン

図 8-7 a: 球状アクチン (G-actin) b: 線維状アクチン (F-actin)