

生体吸収性材料内血管平滑筋細胞の増殖能に静的・動的培養が与える影響：動的培養前静的培養法(プレシーディング法)の有用性

Effects on Proliferation Ability of Vascular Smooth Muscle Cells by Static and/or Dynamic Cell Culture: Utility of Pre-Seeding Technique for Dynamic Cell Culture

横室 浩樹
小澤 司
藤井 毅郎
塩野 則次
渡邊 善側
吉原 克則
小山 信彌
岡田 光正*

Hiroki YOKOMURO, MD
Tsukasa OZAWA, MD
Takeshiro FUJII, MD
Noritsugu SHIONO, MD
Yoshinori WATANABE, MD
Katsunori YOSHIHARA, MD
Nobuya KOYAMA, MD
Mitsumasa OKADA, PhD*

Abstract

Objectives. Conventional biomaterials are not viable, do not grow, and do not provide contractile effects in cardiac tissue. Foreign synthetic material may become thrombogenic or infected. The most recent cardiac constructs consist of biodegradable material which has the potential to solve these problems. However, dynamic three-dimensional cell culture is necessary because conventional culture is limited to construct tough biografts.

Methods. Vascular smooth muscle cells derived from rat aorta were seeded to poly-L-lactide-ε-caprolactone copolymer in three groups; static culture group (static cell seeding + static cell culture), dynamic culture group (dynamic cell seeding + dynamic cell culture), and pre-seeding group [static cell seeding and culture for 1 week (pre-seeding) + dynamic cell culture]. The dynamic cell culture system used an original spinner flask. The pre-seeding technique used static cell seeding and culture before dynamic culture. The three groups were evaluated by cell proliferation and histologic studies.

Results. Vascular smooth muscle cells could be proliferated in/on the biodegradable materials. The pre-seeding group cells grew much more efficiently than the other groups. Very few cells were found in the biodegradable materials with the dynamic groups. However, there were many cells in the materials with the static culture group and pre-seeding group, especially the pre-seeding group.

Conclusions. Dynamic culture is useful for constructing tough biografts by the pre-seeding technique.

—J Cardiol 2007 Oct; 50(5): 309-316

Key Words

- Cells (dynamic culture) ■ Muscle, smooth ■ Experimental medicine
- Transplantation (biodegradable material)
- Biology, developmental (pre-seeding technique)

はじめに

心臓血管外科領域の再生医療では、重度の心筋梗塞

や心筋症などによる末期不全心や欠損組織、不全組織(先天性心疾患)に対する治療法として、細胞移植(cell transplantation)、組織工学(tissue engineering)、遺伝子

東邦大学医学部医学科 外科学講座心臓血管外科; *東邦大学理学部 生物分子科学科: 〒143-8541 東京都大田区大森西6-11-1

Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, School of Medicine, Faculty of Medicine, Toho University, Tokyo; *Department of Biomolecular Science, Faculty of Science, Toho University, Tokyo

Address for correspondence: YOKOMURO H, MD, Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, School of Medicine, Faculty of Medicine, Toho University, Omori-nishi 6-11-1, Ota-ku, Tokyo 143-8541; E-mail: hyokomuro@aol.com

Manuscript received June 4, 2007; revised July 30, 2007; accepted August 3, 2007

治療(gene therapy), サイトカイン療法などがあり, 細胞移植に関しては, 骨格筋芽細胞¹⁾, 骨髄単核球²⁾, 血管内皮前駆細胞³⁾などではすでに臨床応用がなされ良好な結果が得られている. しかし, 細胞移植は移植細胞の移植部位への駐在性や生存性に問題があるとされ, 近年はtissue engineeringが注目されている.

Tissue engineeringは培養細胞を, 細胞の足場となる人工の材料に播種し作成した人工組織を用いて不全心や欠損組織を改善しようとするものであるが, 従来の心臓血管外科の手術には, 人工材料として生体非吸収性材料が使用され, その非成長性, 非収縮性, 易感染性, 血栓性などの問題を残していた.

しかし, 生体吸収性材料の開発によりそれらの問題は解決される可能性が見出され, さらに自己細胞を生体吸収性材料に播種することで, 生体吸収性材料が無害に生体内で吸収され, 自己細胞だけが残ることにより, 免疫拒絶もない自己人工組織の作成が可能となる.

本研究では, 生体吸収性材料を用いた人工組織を作成するために動的細胞培養法を取り入れ, より強度が強く, 成長性, 収縮性, 抗感染性, 抗血栓性などに優れた, 高圧系(動脈系)でも耐える人工組織の効率的な作製方法を検討する.

対象と方法

1. ラット大動脈の採取

ウイスターラットを全身麻酔下(ネンブタール: 2mg/kg腹腔内注射, セボフルレン吸入)に胸腹部正中切開で, 開胸・開腹下に上行大動脈から腹部大動脈までを摘出した. 摘出した大動脈を10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum; Invitrogen Corp.製)を含む培養液(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen Corp.製)の入ったチューブ内で冷却保存した.

2. 血管平滑筋細胞の分離・培養

大動脈を採取後, リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し, 血管外膜, 結合組織, 脂肪などを除去し, 酵素処理法0.25%トリプシン(Invitrogen Corp.製), 0.1%コラゲナーゼI(Invitrogen Corp.製), 0.2%グルコースを加え, インキュベーター内(5% CO₂, 37°C)で静置した.

20分間の静置後, 酵素液を大動脈内に数回通し, 血管内皮細胞を除去後, 細片化した大動脈に上記と同

様の酵素液を加え, 細胞浮遊液を回収し, デイッシュ(IWAKI製ポリ-L-リジンコートデイッシュ)に播種し, 5% CO₂, 37°Cインキュベーター内で血管平滑筋細胞(vascular smooth muscle cell)としてpassage 3まで培養した.

3. 生体吸収性材料(パッチ; Fig. 1)

早期に吸収される細胞の足場となるスポンジ部分で, 晩期に吸収される強度となるファイバー部分を挟み込んだ3層構造を呈する生体吸収性材料であるポリL乳酸とイプシロンカプロラクタンのハイブリット構造を持つpoly-L-lactide-ε-caprolactane copolymer [P(LA/CL)]を使用した(グンゼ株式会社開発, 製造, 提供).

4. Culture study (Fig. 2)

以下の3群で比較検討を行った.

- 1) 静的培養群(静的細胞播種+静的細胞培養4週間)
- 2) 動的培養群(動的細胞播種+動的細胞培養4週間)
- 3) プレシーディング群(静的細胞播種・培養1週間+動的細胞培養3週間)

静的培養: 培養細胞を播種したパッチを培養液入りデイッシュ内に静置し, 静止状態での培養方法(細胞数 $0.5 \times 10^6/100\text{mm}^3$).

動的培養: 細胞播種(または非播種)パッチをオリジナルホルダー(Fig. 3-a; トミー工業株式会社との共同開発, 製作)に固定, さらにオリジナルスピナーフラスコ内(トミーデジタルバイオロジー株式会社との共同開発, 製作)に固定し, 培養液を約60回転/minで回転(定常流)による培養方法(Fig. 3-b; 細胞数 $0.5 \times 10^6/100\text{mm}^3$).

プレシーディング(pre-seeding): 動的培養前に行う静的細胞播種と静的培養.

5. 評価方法

各群で, 細胞播種直後, 培養開始1(プレシーディング群はプレシーディング後), 2, 3, 4週間後にそれぞれ細胞数(細胞数は前実験に従いDNA量によって反映させる)を計測し, 増殖能を比較検討し, さらに病理組織学的検討[hematoxylin-eosin (HE)染色, Elastica Van Gieson (EVG)染色, Elastica Masson Trichrome (EMT)染色, α-Smooth Muscle Actin (α-

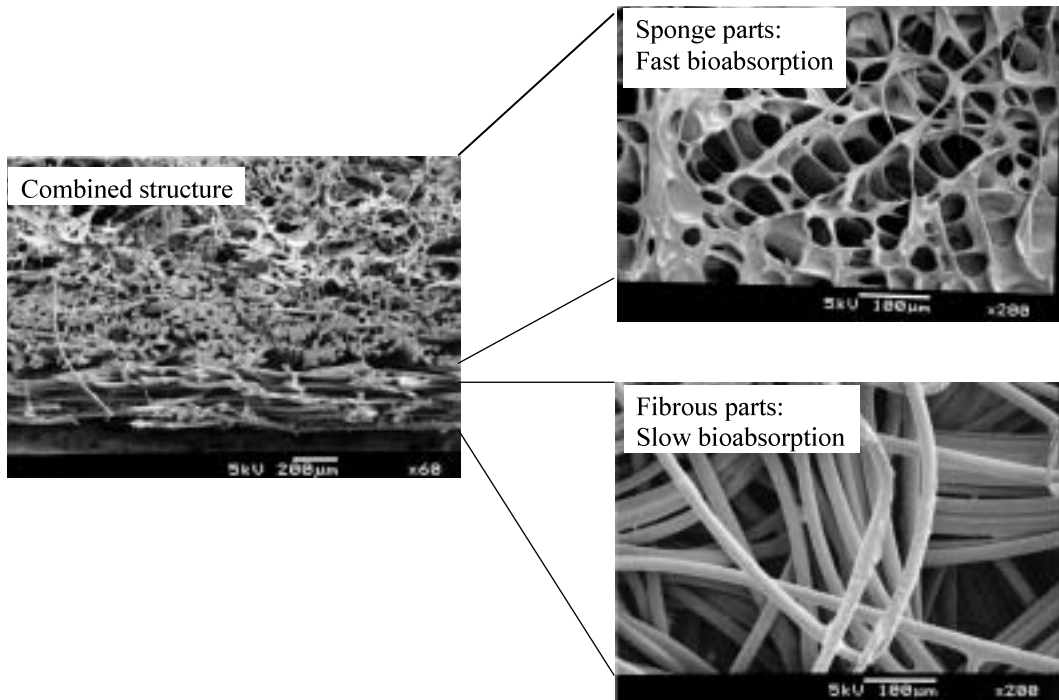


Fig. 1 Biodegradable material poly-L-lactide-ε-caprolactone copolymer [P (LA/CL)]

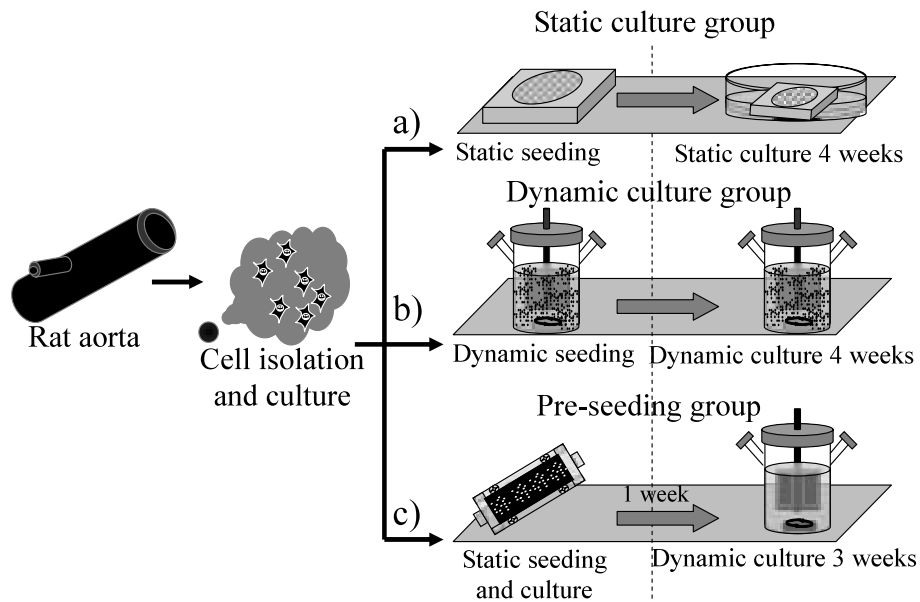


Fig. 2 Protocol

SMA)染色)]を加えた。

6. 前 実 験

【背景】生体吸収性材料内の細胞は、直接細胞を剥離し、細胞数を計測することが不可能であるため、DNA量による細胞増殖の評価が必要となった。

【方法・評価】血管平滑筋細胞の増殖率を測定するために培養開始日から0, 3, 7, 10, 14日後に細胞数を、セルカウンター(Z1 Cell and Particle counter)を用いて計測するとともに、DNAを抽出キット(QIAGEN DNeasy Tissue Kit)を用いて抽出した。抽出したDNA溶液は、紫外線の吸光度(波長は260および280nm)

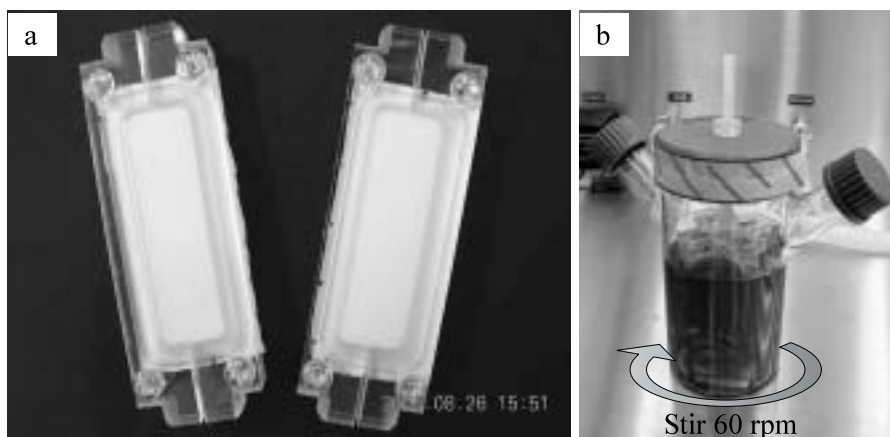


Fig. 3 Dynamic cell culture system

a: P(LA/CL) patch with original holder. *b*: Original spinner flask.
Abbreviation as in Fig. 1.

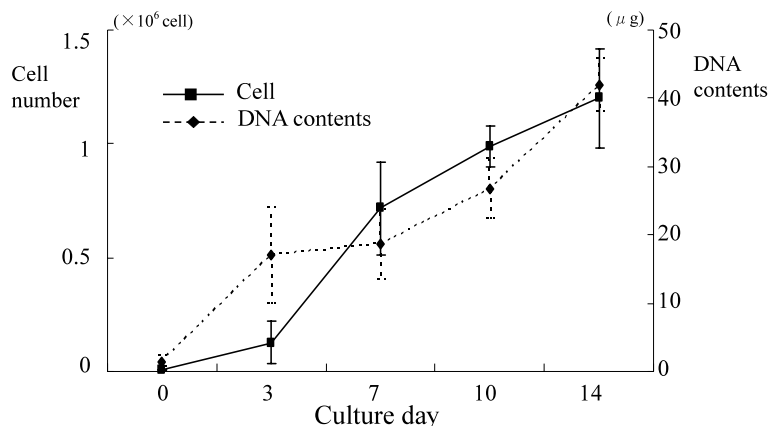


Fig. 4 Correlation between cell number and DNA contents

により定量した。

以上により得られた細胞数とDNA量の相関関係を検討した(6例)。

【結果】細胞数の増殖とともに、抽出したDNA重量も相関し増加した(**Fig. 4**)。

7. 統計処理

すべてのデータは平均±標準偏差で表し、統計処理は、各群の増殖曲線を repeated measures ANOVA および Bonferroni/Dunn で行った。

結 果

ラット大動脈から分離した血管平滑筋細胞はディッシュ上同様、生体吸収性材料[P(LA/CL)]内でも増殖が可能であった。

培養ラット血管平滑筋細胞は、 α -SMA染色により約70.3%の陽性細胞が認められた(**Fig. 5**)。

生体吸収性材料内に接着した細胞はトリプシンなどで detachment できないため、通常の方法では細胞数のカウントは不可能である。そのため前実験を行い、生体吸収性材料内細胞の細胞増殖は抽出したDNA量によって反映されることを確認した。

培養開始1週間後および4週間後のDNA量は、静的培養群で 5.08 ± 2.6 , $10.45 \pm 3.6 \mu\text{g}/100\text{mm}^3$, 動的培養群で 1.98 ± 0.4 , $14.76 \pm 3.7 \mu\text{g}/100\text{mm}^3$, プレシーディング群で 3.66 ± 1.5 , $27.34 \pm 5.8 \mu\text{g}/100\text{mm}^3$ であった(**Fig. 6**)。

培養4週間後の細胞増殖率は、静的培養群, 動的培養群, プレシーディング群でそれぞれ 2.30 ± 0.9 倍, 7.86 ± 3.1 倍, 4.25 ± 1.8 倍であった(**Fig. 7**)。

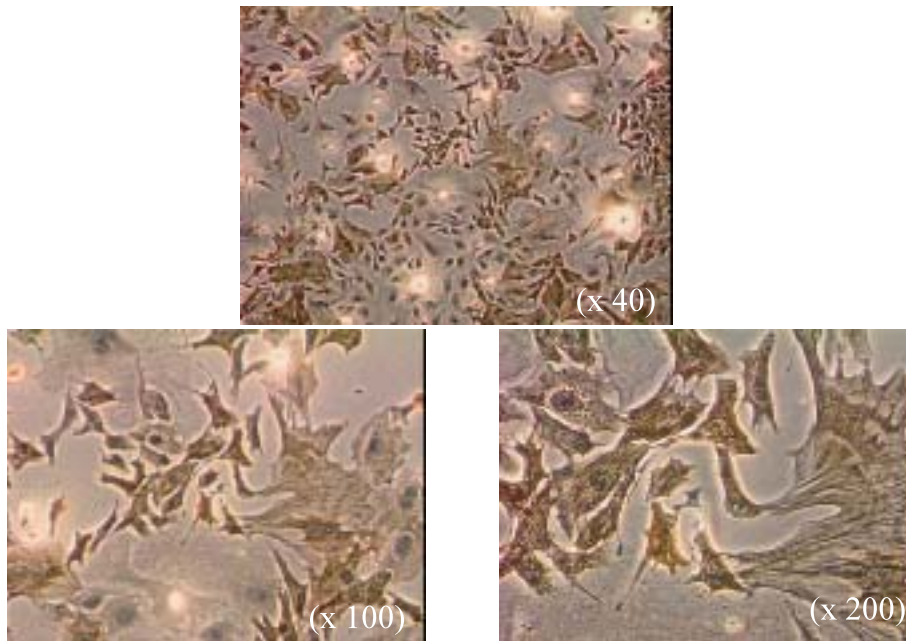


Fig. 5 Cultured vascular smooth muscle cell
 α -Smooth Muscle Actin staining (Avidin-Biotin Complex method; approx. 70.3%)

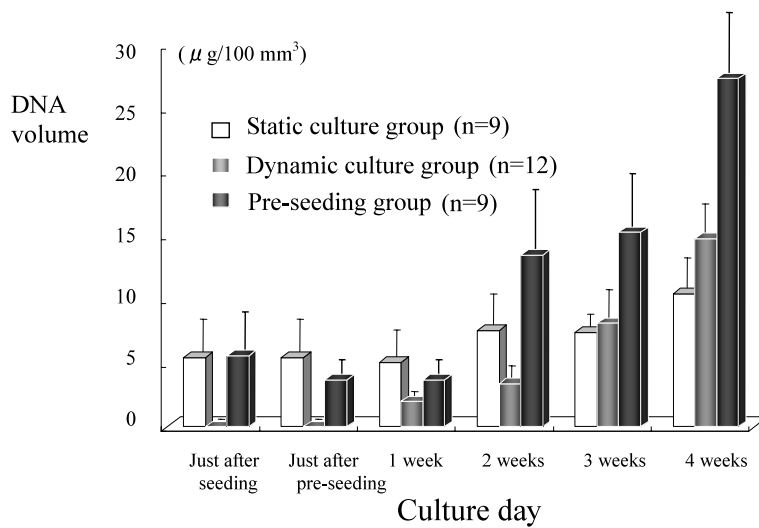


Fig. 6 DNA contents in P (LA/CL)
 Abbreviation as in Fig. 1.

病理組織学的には、一般染色 (HE 染色) で、培養 1 週間後では、静的培養群およびプレシーディング群において、生体吸収性材料表面に細胞の接着と生体吸収性材料内部にも細胞の侵入が認められたが、動的培養群では、生体吸収性材料表面、内部ともにほとんど細胞の接着は認められなかった。

4 週間後では、静的培養群では、細胞表面および内部で軽度細胞が増殖していたが、生体吸収性材料の背面には細胞接着は認められなかった。また、動的培養

群ではごく少量の細胞接着、増殖しか認められなかったが、背面にも細胞の接着が認められ、内部の細胞は増殖が認められた。プレシーディング群では、生体吸収性材料内部、表面ともに著しい細胞増殖が認められた (Fig. 8)。

特殊染色 (EVG 染色, EMT 染色) では、3 群ともに生体吸収性材料表面、内部で増殖した細胞は、生体吸収性材料との境界に比べ細胞層の表面近くにより多くの筋肉系細胞が認められ、免疫学的染色 (α -SMA) で

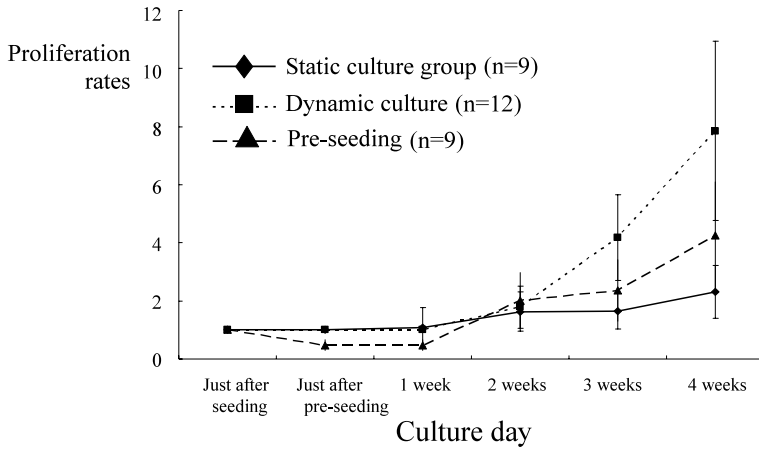


Fig. 7 DNA proliferation rates in P (LA/CL)
Abbreviation as in Fig. 1.

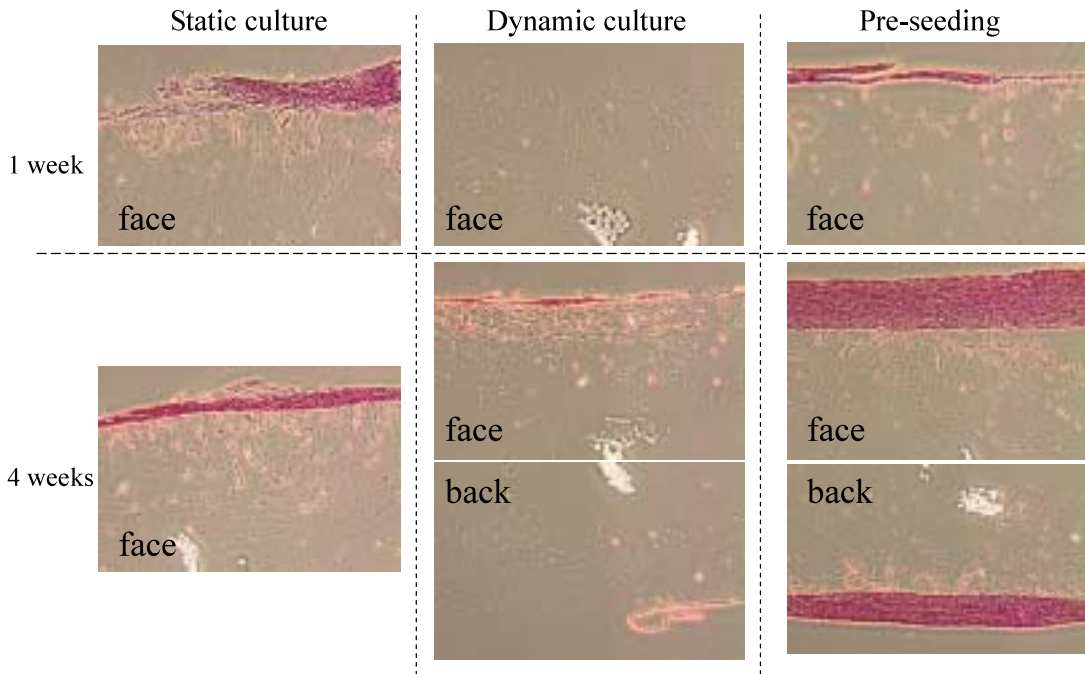


Fig. 8 Photomicrographs of smooth muscle cell seeded P (LA/CL) patch (hematoxylin-eosin staining X40)
Abbreviation as in Fig. 1.

多数の陽性細胞が認められた。

考 察

平滑筋細胞は、血管からの採取、分離培養が容易であり、その増殖能が高い。平滑筋細胞は成人平滑筋細胞にみられる収縮型と幼若平滑筋細胞にみられる合成型の2つの表現型があり、収縮型は生理的刺激により収縮を起こすが、増殖能や蛋白合成能は認められない。

合成型は、収縮能はないが、増殖能、蛋白合成能に優れておりエラスチンやコラーゲンなどの細胞外マトリクスを産生する。通常の血管内に存在する平滑筋細胞は収縮型であるが、分離することで合成型へと変化するため、人工組織を作成するときの筋肉系播種細胞としては、理想的な細胞となる^{4,5)}。

心臓血管外科の手術には従来から生体非吸収性材料が使用され、その非成長性、非収縮性、易感染性、血

栓性などの問題を残していたが、今回使用した細胞播種の足場は、生体吸収性材料であり、その問題が解決できるとともに、自己細胞を播種することで、拒絶反応を誘発しない、完全なる自己組織を作成できる。

生体吸収性材料としては、スポンジ状の Gelatin Sponge やフェルト状の Knitted Polyglycolic Acid Felt などが以前から使用されていたが、高圧系(左心系)への移植組織としては強度に問題があり、今回は、高圧系に加えて、手術手技にも耐えうるポリエル乳酸とイプシロンカプロラクタンの合材である P(LA/CL) を使用した。

理想的な生体吸収性材料に、至適細胞の効率の良い細胞播種、培養方法を検討したが、動的培養法を取り入れることで、有意差をもって細胞増殖能は亢進された。しかし、動的培養のみでは、生体吸収性材料に効率の良い細胞接着が得られず、増殖率は増加したものの、組織としての十分な細胞量を確保できなかった。

動的培養前に静的細胞播種、培養を1週間行うことで、生体吸収性材料に接着する細胞は飛躍的に増加し、その増殖率も増加した。

動的培養だけでは、生体吸収性材料への垂直方向の細胞播種形態が得られず、動的培養前に生体吸収性材料に対して垂直方向の播種が可能となるプレシーディングを行うことで、十分な細胞接着が得られ、さらに、動的培養を行うことで、細胞に付加が加わり、その接着性は低下することなく、増殖能が亢進した。

結 論

効率的に人工組織を作成するためには、細胞の接着性、増殖能を考慮して、静的細胞播種・培養+動的培養が必要であり、プレシーディング法の有用性が証明された。

謝 辞

本研究で使用した生体吸収性材料[P(LA/CL)]の研究、開発、提供を、奈良県立医科大学住居医学講座教授 筏 義人先生、グンゼ株式会社研究開発センター 松田晶二郎先生にご協力いただきました。病理組織学的標本は、株式会社三菱化学ビーシーエル(MBC)との共同研究により作製されました。ここに誌面をお借りして厚く感謝いたします。

本研究は日本私立学校振興・共済事業団の「学術研究振興資金」の支援を受けて、行われました。

要 約

目 的: 心臓血管外科領域で従来から使用されている人工材料は、非成長性、非収縮性などが問題となり、さらに体外異物として易感染性、血栓性が認められる。近年の生体吸収性材料の開発は上記の問題を解決できる可能性が見出された。しかし、臨床に必要な耐久性のあるバイオグラフトを作製するには、従来の培養方法では限界があり、動的・三次元的な培養方法が必要となる。

方 法: 細胞は、ラット大動脈由来血管平滑筋細胞を使用し、バイオグラフトとして生体吸収性材料である poly-L-lactide-ε-caprolactone copolymer に播種した以下の3群で比較検討した。a) 静的播種+静的培養群(9例)、b) 動的播種+動的培養群(12例)、c) 静的播種+動的培養群(9例)。動的培養は Spinner flask culture system を使用し、細胞播種(または非播種)パッチを培養液を約60回転/minで回転培養した(細胞数 $0.5 \times 10^6/100\text{mm}^3$)。静的培養は培養増殖させた細胞をパッチに播種し静止状態で培養した(細胞数 $0.5 \times 10^6/100\text{mm}^3$)。プレシーディング法とは、動的培養前に静的培養を行う方法とした。3群で、培養開始1, 2, 3, 4週間後にそれぞれパッチ内の細胞数と、組織学的に細胞播種の状態と増殖性について検討した。細胞数はDNA量によって評価した。

結 果: 静的および動的培養ともに生体吸収性材料内での細胞の増殖が確認された。4週間での細胞増殖率は動的培養では静的培養に比較し有意に高率となったが、1週間培養後のパッチ内細胞数は静的培養のほうが有意に高値となった。1週間のプレシーディング法を行うことで細胞のパッチ内への接着効率、増殖率ともに他のグループに比べて高率となった。

結 論: プレシーディング法を用いた動的・三次元的な細胞培養法は、より効率的に強度の強いバイオグラフトを作製するために、有用な方法であることが見出された。

文 献

- 1) Menanche P: Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis* 2005; **16**: 105–110
- 2) Mocini D, Staibano M, Mele L, Giannatoni P, Menichella G, Colivicchi F, Sordini P, Salera P, Tubaro M, Santini M: Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am Heart J* 2006; **151**: 192–197
- 3) Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002; **105**: 732–738
- 4) Bochaton-Piallat ML, Clowers AW, Clowers MM, Fischer JW, Redard M, Gabbiani F, Gabbiani G: Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 949–954
- 5) Hirst SJ, Twort CH, Lee TH: Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; **23**: 335–344