

微小環境の恒常性維持を目指した 3 次元毛細リンパ管組織の創製

関根 秀一

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

【研究の背景】

生体に類似した 3 次元組織を構築するには、in vitro でいかに生体内により近い細胞の周辺環境をつくるかが求められる。さらには、血管吻合可能な動静脈と毛細血管網を有した構造体とする必要がある。生体内・生体外いずれにおいてもこれらの血管網無くして長期的な構造・機能維持は困難である。

これまでに我々は、小動物を用いた既存研究において生体由来の動静脈付き血管床上に血管構成細胞を含むラット心筋シートを段階的に積層化することにより血管網を付与した厚い拍動心筋組織を作製する技術を確立している^{1,2)}。毛細血管網を有する生体由来の血管床に異物を含まず細胞だけで構成される細胞シートを直接密着させることが細胞シート内での血管網誘導とそれらの新生毛細血管と血管床内毛細血管との結合に大きく貢献している。また厚みのある立体組織へ一時期に機能的血管網を付与することは世界的にも実現できなかったが、本手法では十分な毛細血管網新生を待つ段階的に細胞シートを積層化して立体化を図ることで組織内壊死を生じることない立体組織の作製を可能とした。さらに作製した立体組織は吻合可能な血管径の動静脈を有しており、血管吻合による生体内への移植後、速やかに血流が再開することで生着が可能となる。

【目 的】

より厚く高機能な組織を構築するためには、老廃物の除去や再生毛細血管から漏れ出した組織液を排導し代謝バランスの調整を行う毛細リンパ管の再生が必須となってくる。そこで本研究では、血管床を用いた血管網付与技術を基盤に再生組織中の微小環境の恒常性を維持可能とする 3 次元毛細リンパ管付き組織の構築を目指した。

【方 法】

血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞の形態比較を行うために、ヒトリンパ管内皮-ヒト脂肪由来間葉系細胞の共培養を行い、前リンパ管状態であるリンパ管内皮ネットワーク構造を構築するための共培養条件の最適化を行った。次に、リンパ管ネットワーク構造を維持した共培養細胞シートのラット生体内血管床への移植により、生体内でリンパ管が再生可能となるかを解析した。さらにヒトリンパ管内皮-ヒト心筋共培養細胞シートの作製を行い、先と同様にラット生体内血管床上へ細胞シート移植を行い、心筋組織内へリンパ管が再構築されるかを解析した。また in vitro 物質透過性アッセイを行い、リンパ管の能動的物質輸送に重要な役割を持つ輸送形態の解析を行った。

【結 果】

ヒトリンパ管内皮-ヒト脂肪由来間葉系細胞の共培養を行ったところ、培養 3 日後からリンパ管内皮ネットワーク構造を構築されることが観察された。そしてこの前リンパ管状態の最適化をするためにリンパ管内皮細胞と脂肪由来間葉系細胞の共培養の比率と VEGF-C 濃度の最適条件を見出した。そして、最適条件で共培養を行うことで、リンパ管内皮細胞の起始部の先端は、同条件での静脈血管内皮細胞の先端とは異なる袋状に閉じた形態を呈することが明らかとなった。次に、リンパ管ネッ

トワーク構造を維持した共培養細胞シートをラット生体内血管床への移植したところ、移植 2 週間後において、生体内でリンパ管が再生されることを確認した。さらにヒトリンパ管内皮細胞とヒト心筋細胞の共培養を行うと、先の最適化条件において心筋細胞シートの中にリンパ管ネットワーク構造が構築されるが確認できた。そして、そのリンパ管内皮-心筋共培養細胞シートをラット生体内血管床上へ移植を行ったところ、2 週間後の心筋組織内へリンパ管が再構築されることが明らかとなった。in vitro 物質透過性試験では、心筋細胞のみ培養の場合と比べ、リンパ管内皮-心筋共培養において、分子量 1 万のデキストランの透過性が有意に高いことが示された。またヒト平滑筋細胞を使い同様に物質透過性試験を行ったところ、心筋細胞を用いた時と同様に、平滑筋細胞のみ培養と比べ、共培養することで物質の透過性が高まることが示された。

【考 察】

本研究では、リンパ管内皮細胞と脂肪由来間葉系細胞、また心筋細胞との共培養において、細胞の比率また適切な VEGF-C の濃度を使用することで前リンパ管状態である細胞ネットワーク構造が構築されることが示され、血管床への移植においてリンパ管が形成することが明らかになったことから、リンパ管内皮細胞ネットワーク構造は、これまでに我々が示してきた血管内皮細胞ネットワーク構造と同様に毛細リンパ管網の形成を積極的に促進・付与できる可能性が示唆された。また、共培養されたリンパ管内皮細胞は起始部の先端が袋状に閉じた形をしており、また、物質透過性試験においてリンパ管内皮細胞の共培養において分子量 1 万のデキストランの透過性が高いことから、間隙が開きやすく組織液の吸収が起こりやすいというリンパ管内皮がもつ複雑な構造と機能を有している可能性が考えられた。今後は、この再生されたリンパ管の吸尿管としての疎通のメカニズムを解析していく必要がある。また生体外で作製するこのリンパ管組織のリンパ管基底膜、繫留フィラメントの経時的かつ空間的な解析とリンパ管新生の過程における構造変化を確認することで、再生メカニズムを明らかにすることが可能となると考える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で示した 3 次元毛細リンパ管組織の構築は、再生メカニズムや浮腫の原因を解明する手掛かりを得る開発研究である。本研究の進展により、リンパ管の新生・再疎通による微小環境の恒常性維持メカニズムの解明に寄与することのみならず、リンパ浮腫をはじめとする難治性疾患に対する病因の解明や新治療法の技術開発が可能となり、再生医療へ大きく貢献すると考える。

【参考・引用文献】

1. Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Joseph Yang et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB Journal*. 20:708-10, 2006.
2. Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Katsuhisa Sakaguchi et al. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nature Communications*. 4:1399, 2013.