

マイクロデバイスを用いた老化血管モデルの構築と ラマン分光法による評価技術の確立

清水 一 憲^{*1}杉山 夏緒里^{*2}

Establishment of an Aged Vascular Model Using Microdevices and Evaluation Techniques by Raman Spectroscopy

Kazunori SHIMIZU^{*1} and Kaori SUGIYAMA^{*2}

This study aimed to develop an aged vascular model and to elucidate the pathophysiology of vascular aging-related diseases and to develop bioactive substances that could prevent or improve these conditions. Specifically, we constructed three-dimensional tissue models from wild-type vascular smooth muscle cells using a device. Additionally, we examined methods for evaluating these tissue models. Furthermore, we constructed and evaluated models using Fbln4-deficient vascular smooth muscle cells.

1. 背景と目的

血管老化が引き起こす動脈硬化や大動脈瘤解離などの疾患は日本人死因の約25%を占める。超高齢社会において、今後さらに患者数が増大すると考えられることから予防法開発が急務である。

大動脈は、心臓とつながり、血液を全身へ送り出す人体組織の中で最も大きな血管である。その血管壁は、血管平滑筋細胞や血管平滑筋細胞が産生する細胞外マトリクス (ECM) で構成される。ECM には膠原線維 (コラーゲンなど) や弾性線維 (エラスチンなど) が含まれるが、これらが血管老化に大きく関

与する。特に加齢により、弾性線維の機能が低下することで大動脈が硬くなり、動脈硬化や大動脈瘤などの疾患へとつながる。杉山らはこれまでに Fibulin-4 (Fbln4) ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 研究において、ラマン分光法と多変量スペクトル分解により、大動脈瘤の新規バイオマーカーの同定に成功した (1)。この成果により、血管老化関連疾患の予備軍を見つけることが可能になると期待される。一方、*in vivo* 研究では、マウス個体間のバラツキや匹数の確保、長期飼育などが障壁となるため、病態解明や血管老化の予防・改善効果をもつ物質の開発を迅速に進めるのが困難である。

生体組織モデルは、マイクロデバイスを用いて培養細胞周囲の微小環境をうまく制御し、臓器特異的な生理機能を再構築・評価するための *in vitro* システムである。特に、疾患状態を模倣した病態モデルは、病態解明や予防・改善効果をもつ物質開発における新技術として非常に期待が大きい。清水らは、骨格筋モデルの開発を進め、サルコペニア (加齢性筋減弱) 予防・改善効果が期待される食品成分の開発に成功した (2)。この関連技術を基盤にして、老化血管モデルを構築することができれば、病態解明や血管老化予防・改善物質の開発を迅速に進めることができると期待される。

本共同研究では、老化血管モデルを創出するとともに、それを用いて血管老化関連疾患の病態解明及び予防・改善効果のある生理活性物質を開発することを目的とする (図1)。特に Phase1 では、1) デバイスを用いて、野生型血管平滑筋細胞から三次元組織モデルを構築すること、2) 組織モデルの評価法 (収縮能、弾性線維、ラマン分光法) を検討すること、3) Fbln4 欠損血管平滑筋細胞を用いてモデル構築とその評価を行うこと、を目指した。

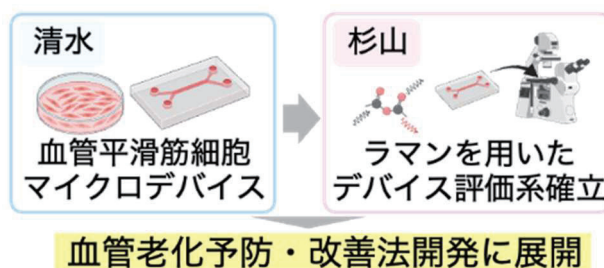


図1 本共同研究の概要。

2. 材料と方法

三次元組織モデル構築は、次のように実施した（図2）。ポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いて、2本のマイクロポストをもつデバイスを作った。次に、そのデバイスを96ウェルプレートの各ウェルにセットし、細胞を懸濁したハイドロゲル溶液をデバイスのくぼみに入れてハイドロゲルを硬化させた。最後に、培地を入れて一定期間培養を継続し、三次元組織を構築した。

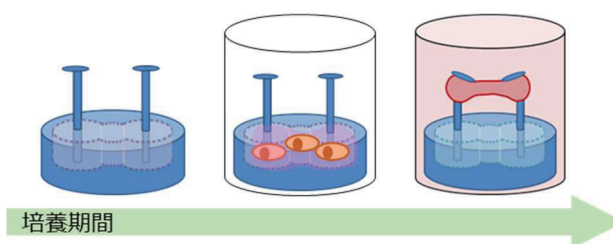


図2 三次元組織モデル構築の手順。

3. 結果と考察

初めに、野生型血管平滑筋細胞から三次元組織モデルを構築することを試みた。既報（3）で骨格筋組織構築に使用したフィブリンとマトリゲルを用いて組織構築を行ったが、構築した組織は数日で破断してしまった。老化血管の特性を評価するためには、一週間以上は三次元組織の形状を維持することが望ましいと考えられたことから、ハイドロゲルや培地成分の検討を行った。その結果、三次元組織の形状を維持した状態で一週間以上培養することに成功した（図3）。

次に、組織モデルの評価法（収縮能、弾性線維、ラマン分光法）を検討した。血管平滑筋細胞はKC1に応答し収縮する。そこで、構築した三次元血管平滑筋組織モデルをKC1で処理し

た。その結果、血管平滑筋組織モデルが収縮し、デバイスの2本のマイクロポストが内側に動いた。その変位量を測定することで、収縮力を定量することに成功した。また、三次元組織モデルの蛍光免疫染色を行い、弾性線維を構成するフィブリンやエラスチンの存在を可視化することができた。ラマン分光法による三次元組織の評価法も検討した。三次元組織をガラススライドに乗せ、ラマン分光イメージングを行うことができた。

最後に、Fb1n4欠損血管平滑筋細胞を用いてモデル構築とその評価を行った。これまでに見出した条件を用いることで、三次元Fb1n4欠損血管平滑筋組織モデルの構築が可能であった。また、Fb1n4欠損を修復した対照細胞でも同様に三次元組織モデル構築ができた。KC1添加による収縮能を比較したところ、欠損モデルと対照モデルで収縮力に差が見られた。

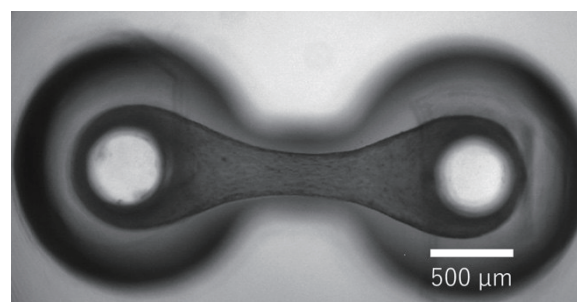


図3 デバイス上で構築した三次元血管平滑筋組織モデル。

4. 結論と今後の展望

既報（2，3）で対象としてきた骨格筋細胞と異なる点が多々あり、様々な条件検討が必要であったが、三次元血管平滑筋組織モデルの構築と長期間培養が可能になった。三次元組織の評価に関しては、収縮力比較、弾性線維の定量評価、ラマン分光イメージングが可能であることが明らかになった。

今後の展望として、三次元組織モデルの新たな評価法開発を進める予定である。本研究で行った評価法に加え、血管の質を反映すると考えられる「硬さ」の評価技術を開発することを考えている。また病態モデルマウスも利用することで、動物個体で観察される症状と三次元組織モデルで観察される特性との相関を検証する予定である。

REFERENCES

- 1) K. Sugiyama, *et al.*, *Cell Rep Med.*, **2** (2021) 100261.
- 2) A. Nagai, *et al.*, *J Agric Food Chem.*, **71** (2023) 8952-8958.
- 3) K. Yamamoto, *et al.*, *Biotechnol Bioeng.*, **119** (2022) 2196-2205.