

### 3次元毛細血管様ネットワーク形成に及ぼす定常及び拍動せん断応力の影響

#### Effect of Steady and Pulsatile Shear Stress on Three-dimensional Network Formation of Endothelial Cells

80815046 阿部順紀 (Yoshinori Abe) Supervisor: 谷下一夫 (Kazuo Tanishita)

#### 1. 結論

血管新生は、既存血管から新たな毛細血管が形成される現象であり、再生医療の観点から注目されている。組織の形成・機能維持には毛細血管を介した酸素や栄養の供給が不可欠であり、再生組織への毛細血管導入が必須である<sup>[1]</sup>。

血管新生には、血流が促進的に作用することが知られている。特に、血管内腔を一層に覆う内皮細胞(ECs)には血流に起因するせん断応力が作用している。最近、せん断応力下での血管新生メカニズムを解明するため、生体外において生理条件を模擬した3次元網の広がるを有する血管様ネットワークへの定常せん断応力(SSS)の効果が報告され始めている<sup>[2]</sup>。しかしながら、せん断応力が3次元ネットワーク形成に及ぼす影響に関しては、まだ不明な点が存在する。

ECsはSSSのみでなく拍動せん断応力(PSS)に曝されており、SSSとPSSでは血管新生に関する遺伝子発現の効果が異なるということが知られている。そこで、本研究では、深さ方向への伸長を考慮した3次元ネットワーク形成に及ぼす定常及び非定常流の影響を調べた。さらに、SSSに依存したネットワーク形成にはECsの移動が重要であると考え、ECsの移動能力の指標である葉状仮足の形成と深さ方向へネットワーク形成の関係を調べた。

#### 2. 研究方法

##### 2.1 定常せん断応力の負荷

平行平板流路を用いてコラーゲンゲル上にウシ肺毛細血管内皮細胞を培養した実験モデルにSSSを負荷した。実験モデルは、ゲルの最終濃度が2.4 mg/ml, 3.2 mg/mlの2種類を用意し、SSS負荷範囲はそれぞれ0.09, 0.47, 1.38 Pa, 0.28, 0.48, 1 Paとした。培養環境は37°C, pH 7.4に保ち、30 ng/ml bFGFを添加した培養液を用いた。

##### 2.2 拍動せん断応力の負荷

上記と同様の培養環境下で、実験モデル(ゲルの最終濃度: 3.2 mg/ml)にPSS(1, 2 Hz)を負荷した。平均せん断応力は、0.28, 0.48, 1 Paとした。

##### 2.3 ネットワーク形態変化の解析

毛細血管様ネットワークは、位相差顕微鏡を用いて、48時間3次元的にタイムラプス撮影した。ネットワークの形態変化は、撮影した位相差画像とせん断応力負荷後に細胞骨格と細胞核を染色した試料の共焦点画像を用いて解析した。

#### 3. 結果および考察

SSSを負荷した結果、ゲルの最終濃度が2.4 mg/mlの場合、3次元網のネットワーク形成はせん断応力の大きさに依存した(Fig. 1A)。ネットワークの伸長を促進すると考えられている葉状仮足の形成に着目すると、葉状仮足の数・空間的分布がせん断応力依存性を示した(Fig. 1C)。また、ゲルの最終濃度が3.2 mg/mlの場合、高いせん断応力においてネットワーク深さが増加傾向を示し、葉状仮足の数・分布がせん断応力の大きさに依存した(Fig. 2B,D)。一方、実験モデルに対してPSS(1, 2 Hz)を負荷した場合、特に2 HzのPSSに関して、0.48 Paのときのネットワークの深さが1 Hzと比較し有意に増加し(Fig. 2A)、葉状仮足の形成においても30 - 100 μmの深い範囲に多く分布した(Fig. 2B)。

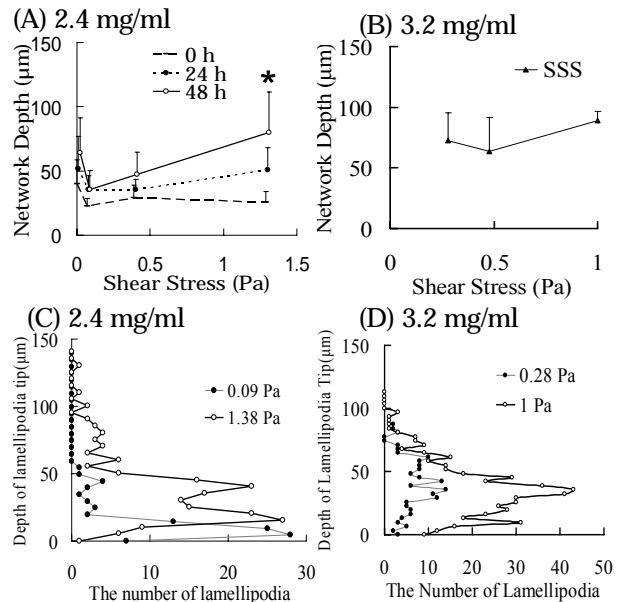


Fig.1 Network depth(A, B) and lamellipodia distribution(C, D) on SSS. Data are means  $\pm$  SD;  $n \geq 4$ . \* $P < 0.05$  vs. 0.09 and 0.47 Pa.

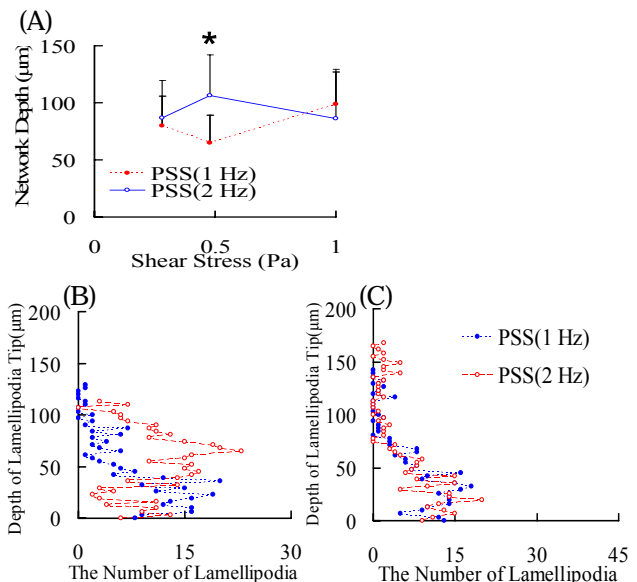


Fig.2 Network depth(A) and lamellipodia distribution (B, C) on PSS. Data are means  $\pm$  SD;  $n \geq 4$ . \* $P < 0.05$  vs 1 Hz on 0.48 Pa.

#### 4. 結論

SSS及びPPPにおいて、深さ方向へのネットワーク形成が顕著に促進された場合、ネットワークのより深い部分で葉状仮足の形成が多く認められた。

#### 参考文献

- [1] Sudo, R. et al., FASEB J.23 (2009), 2155-2164
- [2] Kang, H. et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 295(2008), 2087-2097.