

エラスチンペプチドによる細胞遊走能制御に関する研究

Studies on the control cell migration by elastin peptides

○境 淳志 (三重大) 塩崎 大介 (三重大) 財部 龍太郎 (三重大)

神谷 歩 (三重大) 中村 雅広 (三重大) 水谷 直紀 (三重大)

宮本 啓一 (三重大) 堀内 孝 (三重大)

Atsushi Sakai (Mie University), Daisuke Shiosaki (Mie University), Ryutarou Takarabe (Mie University)
Ayumu Kamiya (Mie University), Masahiro Nakamura (Mie University) Naoki Mizutani (Mie University)
Keiichi Miyamoto (Mie University), Takashi Horiuti (Mie University)

Abstract: We have been studying for the purpose of production of artificial blood vessel tissue engineering. We investigated the effect on smooth muscle cell migration by elastin contained in the blood vessel media. It was investigated by transwell migration test and image analysis of cell images for each one hour. As a result, the difference in isotypic-elastin, there is a difference in the migration ability. In conclusion, by using the isotypic-elastin, we can expect the development of artificial blood vessel tissue engineering to control the migration of smooth muscle cells, to induce regeneration in the media.

Key Words: Elastin, Cell migration, Vascular Smooth Muscle Cell, Tissue Engineering

1. 緒言

動脈硬化症の治療に用いられる人工血管は、血栓の形成による血管内腔の閉塞が生じるために、約 4mm 以下といわれる小口径の人工血管は開発されていない。この問題点を解決するために、組織工学的人工血管の作製が求められている。そこで本研究では、力学的強度を担う血管中膜に着目し、その血管中膜を再生させる組織工学的人工血管を作製するための材料として血管中膜に含まれ、弾性の特性をもつタンパク質である elastin を人工血管材料として選択した。組織再生には、細胞が埋め込んだ材料の方向へと遊走していく必要がある。そのため、elastin が血管中膜に含まれる平滑筋細胞(SMC)の遊走にどのように影響を与えるかを調査することを目的とした。

2. 方法

2-1 elastin の抽出と分画

本研究では、ブタ大動脈から抽出した不溶性 elastin を熱シュウ酸処理により水溶性 elastin にし、elastin 溶液の凝集温度と elastin をゲル化させた時の弾性率から A~E にクラス分けし、elastinA、elastinC、elastinE を用いて試験を行った。

Table 1 Classification of water-soluble elastin

Elastin Type	Coacervation temperature(°C)	Modulus of elasticity (kPa)
A	~22.5	50~
B	22.5~25	25~50
C	25~30	5~25
D	30~35	~5
E	35~50	Not gelling

2-2 transwell 遊走試験

elastin の SMC の遊走能への影響を確認するために、transwell を使用し、遊走試験を行った。upper chamber 内に SMC を 10,000cells/well 播種し、lower chamber 内には各 elastin を添加した無血清 CS-C medium を加えた。Control

には elastin 添加なしの CS-C medium を使用した。10 時間インキュベート後、upper chamber、lower chamber 内の培地を回収し、血球計算盤を用いて細胞数をカウントした。transwell 膜の upper 側を綿棒で擦ることで、upper に接着した細胞を除去した。染色液で transwell 膜の lower 側に接着した細胞を染色してカウントすることで遊走した細胞の割合を算出した。

2-3 elastin コーティングシャーレ上での遊走試験

各 elastin をコーティングしたシャーレ上での細胞の遊走能を評価するために、12 時間の細胞の顕微鏡画像を画像解析した。シャーレに elastin コーティング処理を施した後、無血清 CS-C medium を添加し、SMC を播種した。シャーレを顕微鏡付属培養装置内に置き、撮影位置を固定した状態で、12 時間一定の時間間隔で顕微鏡画像を撮影し続けた。その画像の 1 時間毎の細胞画像を画像解析し、細胞の重心座標を細胞のいる位置として、細胞の遊走能の変化を確認した。

3. 結果

3-1 transwell 遊走試験

抽出した elastin の分画の違いにより、SMC の遊走活性に違いが生まれた。そのため、SMC の遊走能を制御する材料として分画 elastin が有用なタンパクだと確認できた。

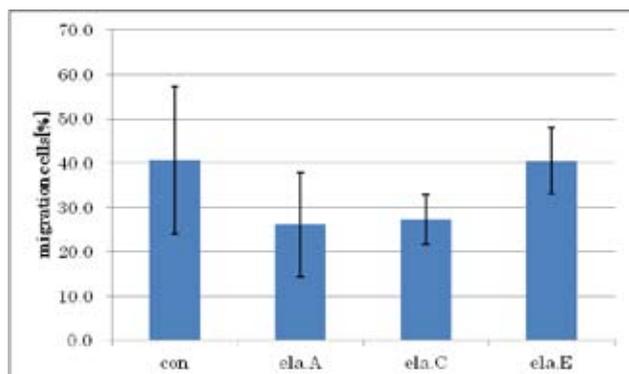


Fig.1 Difference in isotypic-elastin affects the ability of SMC migration in transwell migration test

3-2 elastin コーティングシャーレ上での遊走試験

コーティングした elastin 溶液の違いにより、遊走活性に違いが生まれた。そのため、細胞足場に elastin が存在しても遊走能が変化することを確認できた。

4. 考察

抽出した分画 elastin の違いにより、SMC の遊走能に違いが生まれた原因として、elastin に含まれる KAAK のアミノ酸配列が作る分子間架橋 desmosine の含有量、未知の細胞認識配列があげられる。

抽出した elastin にはそれぞれ desmosine の含有量に違いがあり、desmosine の付近に SMC の elastin 認識配列である VGVAPG 配列が存在する。そのため、架橋の存在により立体障害が生まれ、SMC が認識配列をしづらくなり、遊走活性に変化があったことが考えられる。

Table 2 Difference in desmosine content and number average molecular weight of isotypic-elastin

	elastinA	elastinC	elastinE
Percentage of desmosine content[mol%]	2.867	2.525	0.944
Number average molecular weight[kDa]	25.2	18.7	10.1

SMC がレセプターを介して VGVAPG 配列を認識すると、増殖能や遊走能が高い合成型に脱分化誘導することが報告されている⁽¹⁾⁽²⁾ために、desmosine が多く含まれる elastinA が存在する条件下で、SMC は脱分化誘導が抑制されたことが結果に影響したと考えられる。

また、elastin には VGVAPG 配列以外にも未知の認識配列があると報告されている⁽³⁾。elastinA の方が elastinE に比べ、数平均分子量が大きく、ペプチド鎖も長いと考えられるので、未知の認識配列が含まれる可能性も高い。そのため、未知の認識配列を細胞が認識し、そこからシグナルが伝達することで、結果に違いが生まれたことが考えられる。

5. 結論

本実験結果から抽出し、分画した elastin を用いることで、SMC の遊走を制御することができた。

今後は、組織工学材料としての elastin の利用を考え、elastin ゲルなどの三次元足場での細胞の遊走能を評価し、細胞遊走と elastin の相互作用を確認、細胞遊走のメカニズムの解明をしていく必要がある。

6. 参考文献

- (1)Satsuki M et al. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *Biological Chemistry*, vol. 277, no.47, pp.44854-63, 2002
- (2)Satyajit K.Karnik et al. Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG. *Matrix Biology*, vol. 22, pp.409-425, 2003
- (3)Simon T et al. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis*, vol.29, pp.511-522, 2012