

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15630

研究課題名（和文）開心術後癒着を防止するとともに心膜再生を誘導する新たな手術支援材料創出の試み

研究課題名（英文）Development of a Novel Pericardium Regenerative sheet for Prevention of Postoperative Pericardial Adhesions

研究代表者

成田 裕司 (Narita, Yuji)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60378221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、心臓手術後の癒着による収縮性心膜炎などの合併症や、再手術時の癒着剥離による臓器損傷を軽減する新たな心膜再生型癒着防止シートの創出を試みた。癒着防止には中皮細胞の再生が重要であると考え、本研究では、中皮細胞に高親和性なペプチドの探索および生体吸収性シートへの修飾条件検討、架橋フィルム法またはエレクトロスピンニング法によるシートの作成および動物実験での検討を行った。中皮細胞高親和性ペプチドを発見し、シートへの修飾に成功した。架橋フィルムP-(CL-DLLA)シートは、早期においてペプチド無しに関わらず癒着を低減した。エレクトロスピンニング法PCLシートはペプチド修飾により癒着低減を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在市販されている癒着防止剤のセブラフィルムやインターシードは、材料そのものが癒着、線維化をきたすことがある。また、臨床で使用されている代用心膜のゴアテックス心膜シートや異種心膜は、開心術後癒着防止効果は十分とは言いがたい。本研究では、心膜を構成する中皮細胞に着目し、中皮細胞高親和性ペプチドと生体吸収性シートを組み合わせた新たな心膜再生型癒着防止シートの開発を試みた。中皮細胞高親和性ペプチド探索と生体吸収性シート加工は独自技術であり、得られた研究成果は学術的意義を持つ。また、癒着に伴う合併症を防ぐ方法は未だ解決されていない現状の中、本研究の心膜癒着防止シートの開発は社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Retrosternal and pericardial adhesions after median sternotomy causes complications such as constrictive pericarditis and organ injury at the time of re-sternotomy. Regeneration of pericardium including mesothelial cells is important for prevention of adhesions. In this study, we developed a novel artificial pericardium sheet which promote regeneration of pericardium using mesothelial cells affinity peptides and biodegradable polymer. The mesothelial cells-selective adhesion short chain peptides were identified and the methods of modification to sheet was established. There were two types of novel sheet: P-(CL-DLLA) sheet was made by cross-linking film method and PCL sheet was made by electrospinning method. The P-(CL-DLLA) sheet without peptide prevented retrosternal and intrapericardial adhesions in early stage in a rabbit model. The PCL sheet with peptide showed the down-regulation of retrosternal and intrapericardial adhesion level compared to the PCL sheet without peptide.

研究分野：心臓外科、再生医学

キーワード：癒着防止 心膜再生 心臓手術後 拡張障害 中皮細胞 ペプチド 生体吸収性シート

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における心臓・大血管手術件数は増加しており、それに伴って再手術症例(冠動脈再バイパス、人工弁感染性心内膜炎、先天性心疾患の段階的な手術など)が増加している。再手術において、心臓と周囲組織の癒着によって開胸時や癒着剥離時に心房・心室等の組織損傷による致命的出血等合併症や、心室拡張障害による心不全を引き起こすことがある。現在、癒着防止、あるいはリエントリー時の損傷予防のための代用人工心膜として、ゴアテックス心膜シート(ePTFE)などが用いられているが、これらは再開胸時の臓器損傷を回避するという物理的な遮蔽という役割は果たすが、癒着を防止する機能はほとんどなく、むしろ線維化や感染源となりうる。これら癒着に伴う合併症を防ぐ方法は未だ確立されておらず、解決が望まれている。

現在市販されている癒着防止剤のセプラフィルムやインターシードは、腹膜が再生するまでの約 7-10 日間のあいだフィブリン析出を遮断する物理的バリアによる癒着防止をコンセプトに開発されが、材料そのものが癒着、線維化をきたすことがあり、上述の代用心膜のゴアテックス心膜シートや異種心膜も含め、開心術後癒着防止効果は十分とは言いがたい。一方、ゼラチンやヒアルロン酸、ポリ乳酸などの生体吸収性材料による代用心膜の研究があるが、ゼラチン等は脆弱でリエントリー時の防護膜機能は期待できない。また、ポリ乳酸など通常硬い力学特性を持つ生体吸収性材料では、心膜に求められる柔軟性に乏しく、拡張傷害を惹起する可能性がある。従って、現状の技術では、研究段階の材料はすべて未だ臨床応用には至っていない。

心臓手術後の縦隔内では炎症が惹起され、フィブリンを含む癒着膜を形成し、組織同士の癒着を引き起こす。一方、正常な心膜では膜表面単層中皮細胞が存在し、中皮細胞表面の microvilli および中皮細胞から分泌される滑液が臓器同士の摩擦を軽減するだけでなく、癒着病態の中心であるフィブリン形成を防止する役割を持つ。このことから、中皮細胞の再生はフィブリン形成阻害による癒着防止、ならびに心膜再生において重要な要因になると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、心膜構成細胞で癒着の病態の中心的現象であるフィブリン形成を阻害する中皮細胞に着目し、中皮細胞再生誘導ペプチドを付与した新たな生体吸収性癒着防止シートを作成し、in vivo にて評価を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中皮細胞再生誘導ペプチドの探索と同定

ペプチド探索と評価：中皮細胞層下結合組織に含まれる Collagen type I, type III, type IV などのアミノ酸一次配列を参照し、相同性配列や物理的性質ごとに 9 残基程度のペプチドを In silico にて網羅的に探索した。PIASPAC 法(独自技術)にて、得られたペプチド配列を 96well plate に固定化しペプチドアレイを作成した。培養ヒト中皮細胞(Met-5A、市販)をペプチドアレイ上に播種し、1 時間培養して細胞接着性を評価した。比較対照群として非特異的高接着性ペプチド RGD を用いた。

#### (2) 中皮細胞再生誘導ペプチド付与条件検討

PCL には官能基がほとんどなくペプチドの修飾が困難であるため、何かしらのリンカーが必要とした。本検討では、sulfo-SANPA、アミノリシス、アルキンおよび DOPA による機材への修飾をしたのち、ペプチドを付与して線維芽細胞、中皮細胞を対象に細胞接着性の評価を行った。比較対象群として比較対照群として非特異的高接着性 RGD ペプチドや ePTFE を用いた。

#### (3) シートの作成

癒着防止シートのための材料には、米国 FDA で多くの医療材料で承認を受けている生体吸収性材料ポリ(e-カプロラクトン;PCL)およびポリ乳酸(PLA)を用いる。研究分担者の荏原ら(独立行政法人 物質・材料研究機構 MANA-ナノライフ分野)は、独自技術により PCL の分子量、分岐数、D,L-乳酸との混合などを精密に設計することで生体温度領域においてエラスチックな弾性を持ち、形状記憶特性を有する物性に变化させることができた(以下、P-(CL-DLLA)シートと表記する)。シートへの加工形成は、架橋フィルム法とエレクトロスピンニング法で作成した。ペプチド付与または付与なしシートを作成し、以下の in vivo 評価を行った。

#### (4) 架橋フィルム法による P-(CL-DLLA)シートの in vivo 評価

癒着モデル作製：ラビットの胸骨を切開して縦隔腔を露出後、心膜を切開し心臓を露出したのち心外膜表面の搔爬およびピシバニールの心膜腔へ注入することにより癒着モデルを作成した。

評価方法：癒着モデル作成と同時に、心外膜にゴアテックスシート(ePTFE)もしくは P-(CL-DLLA)シートを縫着する。実験比較検討群は、無治療群(シート無し control 群)、ePTFE 群、P-(CL-DLLA)シート群の 3 群間での比較検討を行った。2 週および 24 週間後に再開胸し、Hydorn WH ら(JThorac Cardiovasc Surg. 1987;94:291-6.)のスコア法(I:癒着なし、II:わ

ずかな癒着、III: 中程度癒着、IV: 重度癒着、V: 剥離不能) にて癒着評価を行った。また、組織学的評価(HE 染色)を行った。

#### (5) エレクトロスピンニング法による P-(CL-DLLA)シートの in vivo 評価

癒着モデル作製：同上

評価方法：癒着モデル作成と同時に、心外膜にゴアテックスシート(ePTFE)もしくは P-(CL-DLLA)シートを縫着する。実験比較検討群は、無治療群(シート無し control 群)、ペプチドなしシート群、ペプチド付与シート群の 3 群で検討を行った。評価は同上とした。

### 4. 研究の結果

- (1) In silico にて、collagen や fibronectin, laminin などヒト基底膜由来タンパクを 41 種類抽出したのち、各アミノ酸配列最初から 9 残基区切り、7 残基ずらして設計して 8999 配列を得た。この 8999 配列の中から相同配列となっていた 84 配列を、中皮細胞再生促進ペプチドの候補として絞り込んだ。84 配列すなわち 84 種類のペプチドを独自技術ペプチドアレイ法にて 96wellplate の底に固定化し、そこに線維芽細胞または中皮細胞を播種して 1 時間培養したところ、線維芽細胞では接着細胞数が少なく、かつ中皮細胞の接着細胞数が多い、細胞選択性ペプチド 5 種類を新規発見した(図 1)。

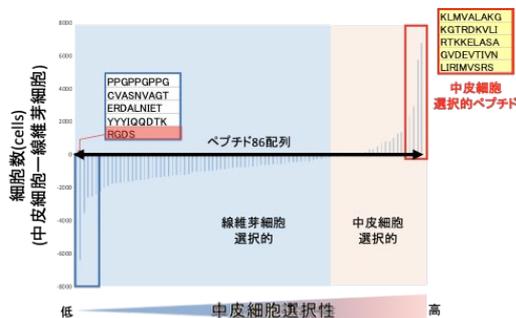


図1 中皮細胞選択的ペプチドの発見

#### (2) 中皮細胞再生誘導ペプチド付与条件検討

Sulfo-SAMPA、アミノリシスでリンカーを PCL に修飾することができたが、PCL の変性の恐れや、ペプチド付与量の調節不可であることがわかった。次に行ったアルキン修飾 PCL では、ペプチド付与に成功し、PCL 表面にあるペプチドを定量測定することができた。RGD ペプチドをアルキン修飾 PCL に付与したところ、ペプチド付与なしと比べて細胞接着性が亢進した。接着効果をより強化するため、アルキン鎖を増加させたところ、細胞接着性が向上した。一方、チロシンキナーゼや銅触媒を利用したバイオマテリアル基材へのペプチド付与が報告されている。生体適合性を高めつつ、ペプチド付与効率の向上を目指すため、DOPA 修飾による検討を行った。ePTFE 表面に DOPA 修飾による中皮細胞再生誘導ペプチド付与を行ったところ、ペプチド付与なしではほとんど接着細胞が観察されなかったのに対して、中皮細胞再生誘導ペプチド付与では、線維芽細胞数は少なく、かつ、中皮細胞特異的に多く接着しており、DOPA 修飾によるペプチド付与の方法は有用であることがわかった。しかし、ePTFE は元々細胞非接着性材料であるが、PCL は細胞接着性材料である。したがって、PCL 表面を何かしらで非接着性にしてから、DOPA 修飾ペプチド付与をする必要があることがわかった。

#### (3) シートの作成

図 2 に示す架橋フィルム法またはエレクトロスピンニング法による P-(CL-DLLA)シートの作成に成功した。



図2 ゴアテックス(ePTFE)と新規作成シート

#### (4) 架橋フィルム法による P-(CL-DLLA)シートの in vivo 評価

Control 群と ePTFE 群は 2 週間後において、胸骨に縦隔膜および脂肪組織の癒着、心膜と心臓表面の癒着を認めた。一方、P-(CL-DLLA)シート群ではこれら癒着が低減していた(スコア、無治療群: 2.4、ePTFE 群: 4、P-(CL-DLLA)シート群: 0.6)。24 週間後では、どの群でも癒着が観察された(図 3)。P-(CL-DLLA)シートは完全に吸収されていた。吸収過程で炎症が惹起され、癒着が起こった可能性が示唆された。

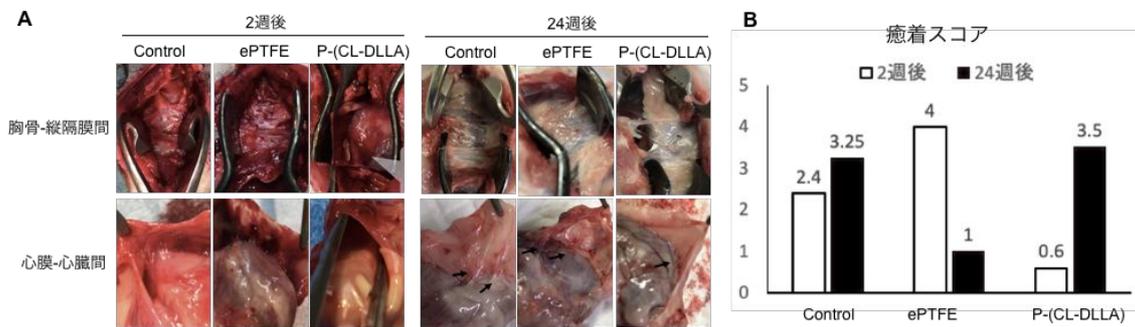


図3 架橋フィルム法シートによる観察所見と癒着スコア

(5) エレクトロスピンニング法による P-(CL-DLLA)シートの in vivo 評価

2 週間後の評価では、ペプチドなし群、ペプチド付与群のどちらにおいても control 群と変わらず、胸骨に縦隔膜および脂肪組織の癒着、心膜と心臓表面の癒着を認めた。スコアは、無治療群：2.4、ペプチド付与なし群：3.6、ペプチド付与群：2.8 だった（図4）。

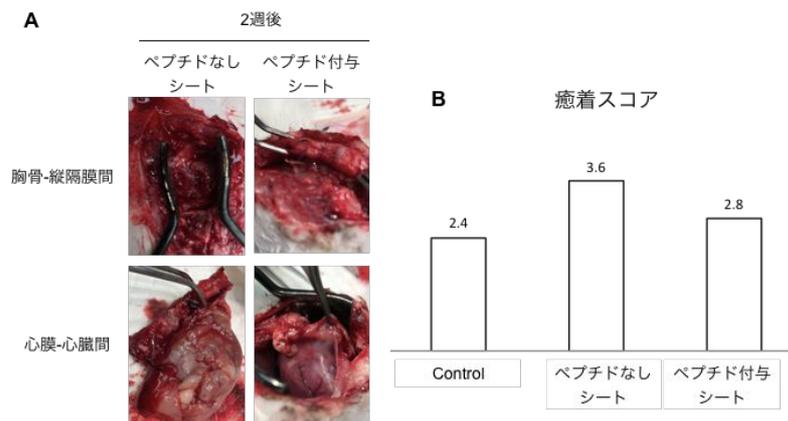


図4 エレクトロスピンニング法シートによる観察所見と癒着スコア

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：荏原 充宏

ローマ字氏名：EBARA, Mitsuhiro

所属研究機関名：国立研究開発法人物質・材料研究機構

部局名：国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点

職名：MANA 准主任研究者

研究者番号（8桁）：10452393

研究分担者氏名：蟹江 慧

ローマ字氏名：KANIE, Kei

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：創薬科学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：80636407

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。