

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08740

研究課題名(和文) 内胸動脈の細胞を立体化して新たに内胸動脈を作る基盤技術開発

研究課題名(英文) development of scaffold free three dimensional internal thoracic artery from autologous ITA cell

研究代表者

福井 寿啓 (Fukui, Toshihiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：50445045

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)：本研究ではヒト血管内皮細胞および血管平滑筋細胞、皮膚線維芽細胞などの血管を構成している主たる細胞を用い、細胞凝集現象を利用して血管組織型スフェロイドを立体構築し、血管を構成する細胞外マトリックスなどの組織学的評価を行った。内胸動脈と比較し、これらの細胞外マトリックスの産生は、血管壁内に不規則に分布する傾向があった。内皮細胞は、内皮として血管構造体の内膜を裏打ちするようには分布せず、構造体の内部には未熟な血管網構築をするように分布した。SMAの産生も構築早期から認めた。細胞のみから立体的血管組織を構築する組織工学技術を開発し、三次元化して立体血管構造体の構築を行うことが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規再生医療技術として細胞を三次元化し立体的な組織を再生する組織工学技術開発が求められている。本研究では簡便な手順、手法を用いて細胞を三次元化し立体的な心臓血管系組織を構築する技術開発を用い、動脈を構成する内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞を三次元化して、冠動脈バイパス術で使用される内胸動脈に近い構造、機能を持った組織を構築する基盤技術を開発することを目的とした。その結果、分布形態は血管としては未熟であったが細胞のみを三次元化して立体血管構造体の構築を行うことが可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we use the cells that make up blood vessels, such as human vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and skin fibroblasts, and use the cell aggregation phenomenon to construct vascular tissue-type spheroids in a three-dimensional manner to form blood vessels. Histological evaluation of extracellular matrix was performed. Compared to the internal thoracic artery, the production of these extracellular matrices tended to be irregularly distributed within the vessel wall. Endothelium cells were not distributed as endothelium to line the endometrium of the vascular structure, but were distributed inside the structure to form an immature vascular network. Production of SMA was also observed from the early stage of construction. It was possible to develop a tissue engineering technique for constructing a three-dimensional vascular tissue only from cells, and to construct a three-dimensional vascular structure in three dimensions.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 組織工学 血管再生 内胸動脈 冠動脈バイパス術

1. 研究開始当初の背景

(1) 先進諸国における動脈硬化は増加傾向にあり、その終末像である血管不全による死亡も主要な死因の上位を占めている。心臓を栄養する冠動脈の動脈硬化による重症虚血性心疾患に対する有効な治療法として冠動脈バイパス術は生命予後を改善しうる有効な外科的治療法として開発、研究、改良がなされてきた。中でも内胸動脈を用いた冠動脈バイパス術は内胸動脈の解剖学的特徴と走行、臨床成績における開存率、生命予後改善、内科的なインターベンションとの比較などのデータから極めて良好な冠動脈血行再建手段であり、冠動脈外科における gold standard な治療であり数々の有効な臨床データが示され、日本含め世界におけるガイドラインでも明確なエビデンスをもって有効性、優位性が示されている。(2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery. JACC. 2011;58:24)

(2) 内胸動脈の特徴として、他の動脈に比較し、1. 動脈硬化が極めて起こりにくい、2. グラフトとして冠動脈に吻合した場合、開存率が他の血管グラフトに比べ抜群に高い。3. 吻合部以降の冠動脈に動脈硬化や血管イベントを起こしにくいなどの特徴が示唆されており、単に動脈グラフトとしての目的以上に、動脈硬化、血管病変発症予防メカニズムの解明などに有効な動脈であると考えられている。通常、内胸動脈は in situ で使用するが、我々の臨床研究では右内胸動脈を切り離して各領域に吻合しても、開存率が高く、sequential に多枝バイパスしても開存性が高いことを示してきた。(J Thorac Cardiovasc Surg. 2012;144:824-9)

(3) 以上の背景の中で研究課題の核心をなす学術的「問い」は、内胸動脈は何故血管としてここまで臨床的に高機能なのか？内胸動脈と同等の効果をもつ血管を組織工学技術で再現し臨床応用できないか？である。

2. 研究の目的

(1) 内胸動脈は冠動脈バイパスにおいてきわめて有用なグラフトであるとともに、他の動脈に比べ、抗動脈硬化作用などを有する生物学的にも機能性の高い動脈と言われているが、その機能解明、エビデンスのある内胸動脈の抗動脈硬化作用機序、他の動脈との構造的、解剖学的、組織学的、分子生物学的解析を行った研究はあり、いくつかの要因が解明されている。しかし内胸動脈の臨床上有用な機能を、実際の臨床に応用する技術は in-situ の冠動脈バイパス術以外にない。つまり、内胸動脈をさらに数本作り上げようとするこの研究はこれまでにない新たな血管外科領域の治療戦略となりうると思われる。

(2) 本研究では、内胸動脈の構造的、機能的な解析を行い、内胸動脈と他の動脈との相違点および抗動脈硬化作用などの機能解明を行いながら、ヒト内胸動脈のうち血管

内皮細胞、壁細胞、線維芽細胞を用いて3次元化内胸動脈類似の構造体を作成すること。つまり「自己細胞から新たな内胸動脈を作ること」を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 内胸動脈、大伏在静脈の解析：熊本大学病院にて行われる冠動脈バイパス術時に採取され吻合後に余剰分として残った両側内胸動脈と大伏在静脈を解析に使用。患者から採取した内胸動脈と大伏在静脈を分断し、一部は固定する前に機能解析（内径、外形、壁厚測定）を行った。残りをホルマリン固定した上で、コラーゲン、エラスチンなどの発現量、分布、解析、外中内膜の厚み、マトリックス分布様式、細胞密度、炎症細胞や動脈硬化性の変化と年齢、疾患の関連、内皮細胞機能解析、内皮細胞の配列や表面微細構造等を解析した。

(2) ヒト内胸動脈細胞からの血管組織構築：本研究期間では市販のヒト内胸動脈血管内皮細胞（Toyobo社）を、正常ヒト内胸動脈平滑筋細胞と線維芽細胞は Cell Application社から購入して使用した。拡大培養して数を増殖させた各種細胞を、内胸動脈の設計図を基にスフェロイド（細胞凝集塊）化し、その凝集塊を細胞三次元化システムを用いて血管構造体へと構築した（図1）。大量の血管組織型スフェロイドを立体構築して血管壁構造もしくは円筒型（1cm×2mm）の血管組織（グラフト）を作製。グラフトを Day1, Day3 で固定し血管を構成する細胞外マトリックスなどの組織学的評価を行った。対象として内胸動脈、伏在静脈とを比較し、基本構造、形態、タンパク質発現の有無、分布などを画像評価による比較検討を行った。HE染色、マッソン染色、EVG染色、コラーゲン Type1, 3, 4, 5, 7. α SMA, vWf を染色解析し、内胸動脈および大伏在静脈と比較した。

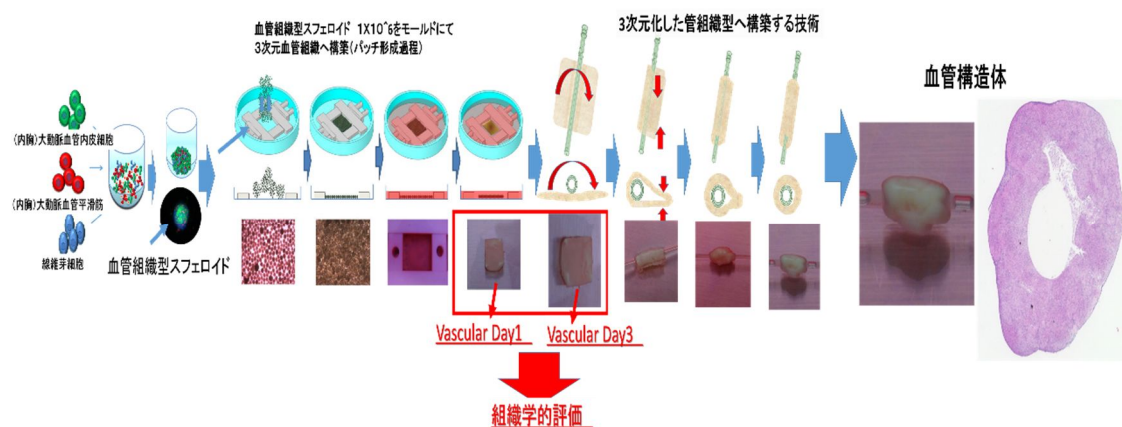


図1. スフェロイドおよびグラフトの作成。培養して数を増殖させた各種細胞を、スフェロイド化し、その凝集塊を細胞三次元化システムを用いて血管構造体へと構築。

4 . 研究成果

(1) Day1, Day3 のグラフト内には、血管構築に必須のコラーゲンの Type1, 3, 4, 5 の発現を Day1 のグラフト内から早期に発現していた。内胸動脈と比較すると、これらの細胞外マトリックスの産生は、血管壁内に不規則に分布する傾向があった（図 2）。

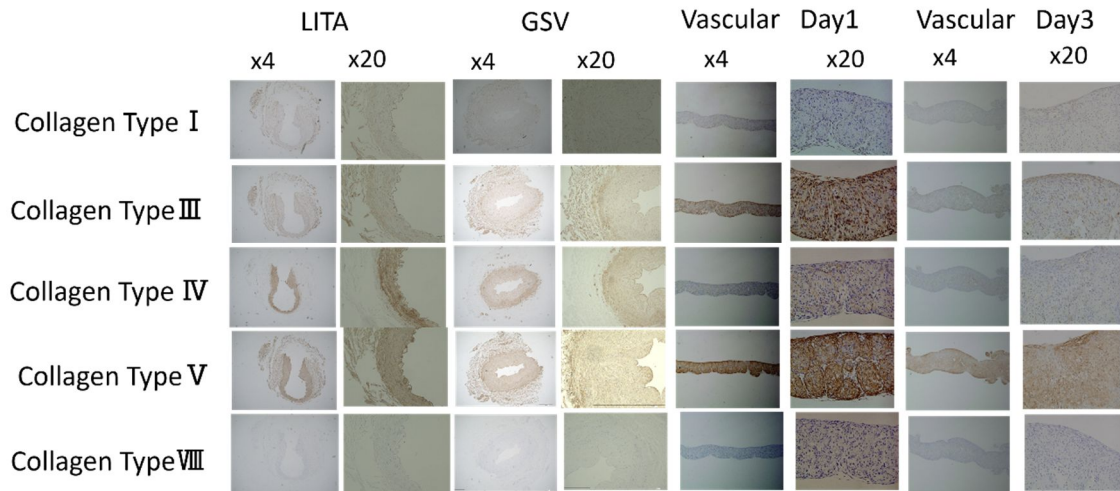


図 2. 内胸動脈、大伏在静脈、グラフトのコラーゲン発現の比較。Day1、Day3 のグラフト内には、血管構築に必須のコラーゲンの 、 、 の発現を認めた。少量かつ正常な血管と比較し分布もまばらであった

(2)内皮細胞は、内皮として血管構造体の内膜を裏打ちするようには分布せず、構造体の内部には未熟な血管網構築をするように分布した。αSMA の産生も構築早期から認めた。内胸動脈と比較すると動脈壁というよりも静脈に近い分布形態で血管としては未熟と考えられた（図 3）。

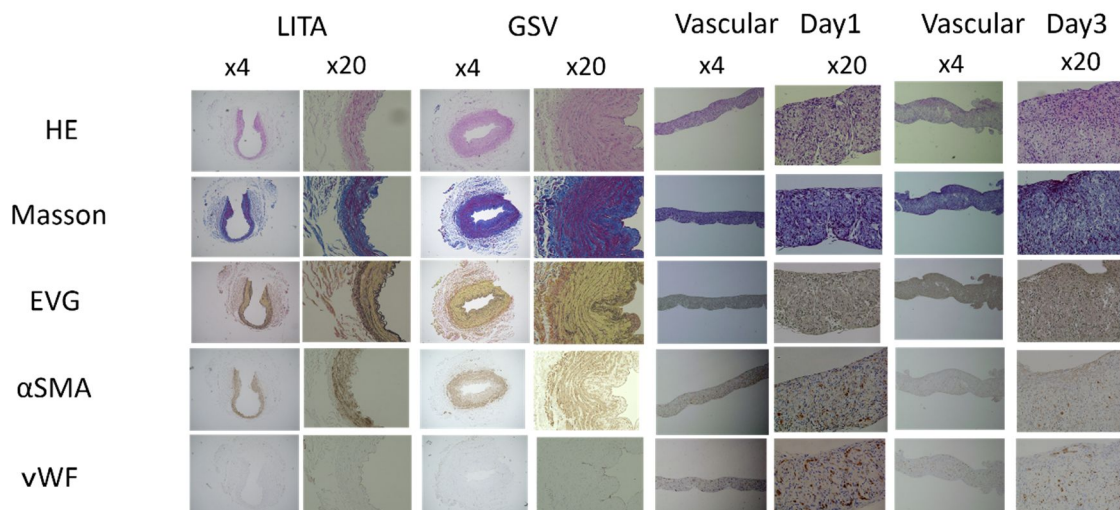


図 3. 内胸動脈、大伏在静脈、グラフトの組織学的比較。EVG 染色では弾性線維の出現はグラフト内には認めなかった。内皮細胞は、内皮として血管構造体の内膜を裏打ちす

るようには分布せず、構造体の内部に未熟な血管網構築をするように分布した。

(3) 細胞のみを三次元化して立体血管構造体の構築を行うことが可能であった。作成後数日で、血管に特徴的な細胞外マトリックスの産生はみとめるものの、血管として十分に機能させるには不十分と考えられた。今後の課題としてサイトカイン添加・培養条件検討により、血管構造体は生物学的活性を発現させ血管として成熟させる技術をさらに開発する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukui T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Bilateral Internal Thoracic Artery Graft in Coronary Artery Bypass Grafting.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Coronay Artery Disease	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishigawa K, Fukui T, Hagiya K, Tobaru T, Uemura K, Takanashi S.	4. 巻 55
2. 論文標題 Propensity score-matched analysis of coronary artery bypass grafting versus second-generation drug-eluting stents for triple-vessel disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Cardiothorac Surg.	6. 最初と最後の頁 1152-1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejcts/ezy415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 .Antonopoulos A, Odutayo A, OikonomouEK, Trivella M, Petrou M, Collins GS, Antoniadis C, Akoumianakis I, Channon KM, Herdman L, Margaritis M, Neubauer S, Thomas S, Karkhanis R, Rade J, Fukui T, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a Risk Score for Early Saphenous Vein Graft Failure: An Individual Patient Data Meta-analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Cardiovasc Surg.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtcvs.2019.07.086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tabata N, SuetaD, Arima Y, Okamoto K, Shono T, Hanatani S, Takashio S, Oniki K, Saruwatari J, Sakamoto K, Kaikita K, Sinning JM, Werner K, Nickenig G, Sasaki Y, Fukui T, and Tsujita K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytotoxin-Associated Gene-A-Seropositivity and Interleukin-1 Polymorphisms Influence Adverse Cardiovascular Events.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJC Heart & Vasculature	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcha.2020.100498	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福井寿啓
2. 発表標題 熊本大学心臓血管外科の取り組み
3. 学会等名 第136回熊本麻酔学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井寿啓
2. 発表標題 手術手技獲得のプロセス
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井寿啓
2. 発表標題 複雑冠動脈病変に対する外科的冠血行再建術
3. 学会等名 第126回日本循環器学会九州地方会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口亮、福井寿啓ら
2. 発表標題 細胞のみを3次元化させ細径動脈を作製する技術開発 内胸動脈との構造比較
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田爪 宏和 (Tazume Hirokazu) (10648273)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	岡本 健 (Okamoto Ken) (20372782)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師 (17401)	
研究分担者	若山 友彦 (Wakayama Tomohiko) (70305100)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	野口 亮 (Noguchi Ryo) (70530187)	熊本大学・病院・助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------