

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08753

研究課題名(和文) 血小板由来内皮細胞成長因子の抗動脈硬化作用を用いた小口径人工血管開存性向上の研究

研究課題名(英文) Anti-atherosclerotic action of platelet-derived endothelial cell growth factor to improve patency of small-caliber artificial blood vessels

研究代表者

高森 督 (Takamori, Atsushi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：80397273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生体分解性ゲルをDDSとしてPD-ECGF遺伝子を用いた小口径人工血管を作製し、イヌ総頸動脈バイパスモデルにおいて、その長期開存性に対する効果を評価・検討することを目的とした。生体分解性ゲルに関しては細胞毒性及び生体寛容性の点においてフィブリンゲルが優れており、これをDDS・コーティングとして用いることとした。イヌ総頸動脈バイパスモデルにおいて抗血栓性の観点よりプラスミン処理を追加しフィブリンゲルコーティングを行った人工血管を使用した。その結果全例早期に閉塞が確認され、PD-ECGFの小口径人工血管長期開存性に対する効果を確認することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化性疾患の増加及び重症化に伴い、特に下腿領域への血行再建術において血管バイパス術は依然重要な治療法である。長期開存性の観点から自家動脈及び静脈をグラフトとして用いられることが多いが、これらは有限であることから長期化依存性に優れた小口径人工血管の開発が切望されている。

本研究は、抗動脈硬化作用を有するPD-ECGF遺伝子を用いた長期開存性に優れた小口径人工血管を開発することを目的に、PD-ECGF遺伝子を添加した人工血管についてイヌ総頸動脈バイパスモデルを用いて評価した。しかし術後早期の閉塞が確認され、長期開存性に対するPD-ECGFの効果について確認することができなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the effect of biodegradable gel on long-term patency in a canine common carotid artery bypass model by fabricating small-caliber prostheses with PD-ECGF gene as DDS.

Fibrin gel was used as the DDS/coating because of its superiority in terms of cytotoxicity and bio-tolerance.

In a canine common carotid artery bypass model, we used fibrin gel-coated artificial vessels with additional plasmin treatment from the viewpoint of anti-thrombogenicity. All grafts showed early occlusion, and the effect of PD-ECGF on the long-term patency of small-caliber prostheses

研究分野：心臓血管外科

キーワード：小口径人工血管 遺伝子治療 PD-ECGF

1. 研究開始当初の背景

今日、動脈硬化性疾患のリスクは増悪傾向にあり、心臓血管外科及び循環器科領域において、動脈硬化に起因する虚血性疾患の症例数は増加の一途をたどっている。近年、血管内治療の発展によりバイパス術を必要としない症例も見受けられるが、疾患の重症度も深刻化しており、特に下腿領域への血行再建術において血管バイパス術は依然重要な治療法である。

現在、大血管を除くバイパス術の多くは自家動脈及び静脈をグラフトとして用いられることが多いが、これは小口径人工血管と比較して、グラフト採取による新たな傷や手術時間の延長などの短所をさしおいても、長期開存性において優位であるためである。しかし、その開存性も決して満足し得るものではなく、更にこれら自家グラフトは有限である為、再手術を要する場合に使用できないことも少なくない。以上の点より、永らく心臓血管外科領域において長期開存性に優れた小口径人工血管の開発が切望されているが、未だ実用品として実現に至らないのが現状である。

申請者らはこれまでに、ヒト血小板由来内皮細胞成長因子(PD-ECGF/別名 Thymidine Phosphorylase; 以下 PD-ECGF)を用いた遺伝子治療の研究を行い、慢性虚血心筋モデルにおいて血管新生促進作用、心筋細胞のアポトーシス抑制作用、心機能改善効果を確認(Am J Physiol Heart Circ Physiol.2004、J Gene Med.2008)するとともに、虚血肢モデルにおける血管新生促進作用についても確認している(J Vasc Surg. 2006)。

一方で、PD-ECGF は血管傷害モデルにおいて傷害部の血管内膜肥厚を抑制すること(右図:Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005)、血管バイパス術静脈グラフトにおいて新生内膜肥厚を抑制する(J Vasc Surg. 2008) ことなどを確認しており、これらはいずれも内膜肥厚に主要な役割を果たす血管平滑筋の増殖を抑制した結果である。この結果は小口径人工血管におけるグラフト狭窄予防に有用と考えられる。

また PD-ECGF には内皮細胞の遊走を促す作用も有しており、このことは人工血管の抗血栓性に寄与すると考えられる。

これらの結果は小口径人工血管の長期開存性改善に非常に有用な知見である。

また上記慢性虚血心筋モデルの研究に際し種々の生体分解性ゲルを、遺伝子を導入する手法(Drug Delivery System; DDS)として用いてきた。生体溶解性、寛容性、遺伝子導入効率などその特性も様々であり、例えばエラスチンゲルには PD-ECGF 遺伝子同様、血管平滑筋細胞増殖抑制作用があることが知られている。また、ヒアルロン酸ゲルは生体溶解性及び生体寛容性に優れているという特徴がある(Artif Organs. 2009)。

以上のことはいずれも長期開存性に優れた小口径人工血管開発の可能性を十分に裏付けるものであり、これらを併用することにより更なる効果向上が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では、PD-ECGF 遺伝子及び生体分解性ゲルを DDS として用いた小口径人工血管を作製し、イヌ総頸動脈バイパスモデルにおいてその長期開存性について評価・検討することにより、長期開存性に優れた小口径人工血管開発の可能性を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト PD-ECGF 遺伝子を組み込んだプラスミドベクター (pCIhTP) の大量精製
ヒト PD-ECGF 遺伝子を組み込んだプラスミドベクター pCIhTP、及び対照遺伝子である LacZ 遺伝子を組み込んだベクター pCILacZ を Qiagen の Endofree plasmid Extraction Giga kit を用い大量精製する (2種類のベクターはすでに作成済み、当研究室が保有している)。

(2) 生体分解性ゲルの生体分解性、寛容性の比較

生体分解性ゲル(ヒアルロン酸ゲル、キトサンゲル、フィブリンゲル、エラスチンゲル)について、その生体分解性、寛容性について評価し比較検討する。

生体分解性はラット大腿部へゲルを挿入し、2及び4週間における分解性を評価する。

寛容性は先述のラット大腿部の組織標本における免疫細胞の浸潤及び周囲の繊維化 (in vivo)。

ラット血管平滑筋細胞を用いた MTT assay (in vitro) にて評価を行う。

(3) 生体分解性ゲルコーティング小口径人工血管の作製

先ず 3mm のノンコーティング Dacron 製人工血管を用い、上記2の結果を踏まえ、PD-ECGF 遺伝子及びコントロールとして LacZ 遺伝子をそれぞれ含ませた生体分解性ゲルにてコーティングを行い、人工血管を作製する。

(4) イヌ頸動脈バイパスモデルの作製

雌性ビーグル犬を用い頸動脈バイパスモデルを作製する。

全身麻酔下、仰臥位にて総頸動脈にアプローチ。全周性に剝離し、ヘパリンを投与した後に遮断。

25mm 長を切除し、同長の人工血管を 8-0 モノフィラメント糸連続縫合にて吻合・置換する。

置換した人工血管により

ノンコーティング人工血管にて置換した群

生体分解性ゲルコーティング (PD-ECGF 遺伝子を含まず) 人工血管にて置換した群
生体分解性ゲルコーティング (PD-ECGF 遺伝子を含む) 人工血管にて置換した群
生体分解性ゲルコーティング (対照遺伝子 LacZ 遺伝子を含む) 人工血管にて置換した群に群分けする。

(5) 超音波検査 (頸動脈エコー) による血管の評価
術前及び術直後、術後 2 週、4 週、8 週において超音波検査を行い血管の評価を行う。
血管内径、内・中膜複合体厚、パルスドプラ血流波形を測定し、内膜肥厚の有無、狭窄度を評価する。

4. 研究成果

(1) 先ず当研究室にて保存していたヒト PD-ECGF 遺伝子を組み込んだプラスミドベクター (pC1hPD-ECGF) 及び対照遺伝子である LacZ 遺伝子を組み込んだベクター (pC1LacZ) を大量精製した。

(2) 次に生体分解性ゲル (フィブリンゲル、ヒアルロン酸ゲル、キトサンゲル、エラスチンゲル) を用いて生体分解性及び生体寛容性の比較を行った。

生体分解性に関してはラット大腿部へゲルを挿入した後、2 及び 4 週間後に組織を採取、組織切片を作成し、ゲルの形態を確認することにより比較した。その結果フィブリンゲル及びヒアルロン酸ゲルは 2 週間で溶解されていることが確認された。

生体寛容性に関しては細胞毒性に関し MTT assay にて評価を行い、この検査ではフィブリンゲルがその他のゲルと比較して細胞毒性が低いことが示された。また組織染色にてフィブリンゲルが炎症細胞浸潤などの反応が低いことが示された。

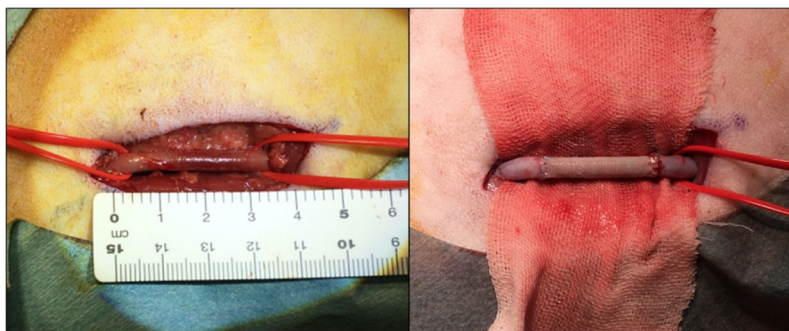
上記結果及びフィブリンゲルが既に臨床使用で承認されていることから DDS としては最も望ましいと考えられた。

(3) (4) (5)

これまでの結果を踏まえ、用意した 3mm のノンコーティング Dacron 製人工血管に遺伝子 (PD-ECGF、LacZ) 添加フィブリンゲルコーティングを使用したイヌ頸動脈バイパスモデルを作成し、PD-ECGF の開存性に対する効果の評価を行った。

バイパスモデル作製に先立ち、雌性ビーグル犬を鎮静下に右側臥位にて左総頸動脈の血管超音波検査を施行し、3mm 人工血管でのバイパスが可能であることを確認した。

バイパスモデルは雌性ビーグル犬を用い全身麻酔下、右側臥位にて左総頸動脈にアプローチを行った。全周性に剥離し、ヘパリンを投与した後に左総頸動脈を中枢・抹消にて遮断した。25mm 長を切除し、同長の人工血管を 8-0 モノフィラメント糸単結節縫合にて端々吻合・置換する方法にて作製した。



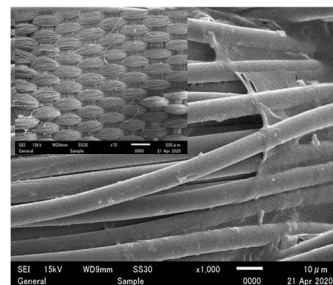
先ずノンコーティング人工血管を用いたバイパスモデルを作成し、その後人工血管周囲にフィブリンゲルを塗布する方法にて評価を行った。

その結果 PD-ECGF 群及び対照群ともに全例において術後 2 週間での血栓閉塞が確認された。

この結果を踏まえ事前に人工血管へのコーティングを行い、コーティングされた人工血管を用いてバイパスモデルを作成することとした。コーティング方法は以前の報告 (Jpn J Artif Organs 25(1), 224-229) に従い、プラスミン処理を追加した。

作成に当たり、コーティングについて組織学的な確認は困難であったため、電子顕微鏡を用い十分にコーティングされていることを確認し、バイパスモデルに使用した。

しかし、作製したバイパスモデルは再び全例術後早期での閉塞が確認された。



このため、術後 2 週間の時点で人工血管を摘出し、組織学的な評価を行ったが、血管内皮細胞層形成の進展や吻合部に於ける内膜肥厚の程度などに差異を認めることはできなかった。

これを踏まえコーティング方法及び生体分解性ゲルの見直しが必要となったが、ここで本学動物実験棟の改修に伴い大動物 (イヌ) の飼育ができず、イヌバイパスモデルの作成が困難となった。これに対しウサギなどの別動物での頸動脈バイパスモデルによる実験継続を試みた。しかし、この場合必要なノンコーティング人工血管のサイズが異なり、この確保を試みるも難しく、断念した。

このため本研究では PD-ECGF の小口径人工血管に於ける長期開存性への効果を証明するには至らなかった。

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〕

〔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	腰地 孝昭 (Koshiji Takaaki) (40273536)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・教授 (13401)	
研究分担者	森岡 浩一 (Morioka Kouichi) (80210144)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・教授 (13401)	
研究分担者	山田 就久 (Yamada Narihisa) (00397283)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師 (13401)	
研究分担者	田邊 佐和香 (Tanabe Sawaka) (00401993)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教 (13401)	
研究分担者	川村 祐子 (Kawamura Yuuko) (70791929)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教 (13401)	
研究分担者	矢野 啓太 (Yano Keita) (90795634)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水永 妙 (Mizunaga Tae) (90828758)	福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・特命助教 (13401)	

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