

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12087

研究課題名(和文) ペプチド固定化技術による抗血栓性と内膜再生性を兼備したePTFE人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of ePTFE graft having both anti-thrombogenicity and regeneration capacity of tunica intima

研究代表者

柿木 佐知朗 (KAKINOKI, Sachiro)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：70421419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超小口径人工血管の長期開存化を見据えて、臨床実績の豊富な延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)製人工血管へ安定かつ簡便に機能性ペプチドを修飾できる基盤技術の開発に取り組んだ。独自に開発した(Tyr-Lys)₃アンカーを介してフィブロネクチン由来ペプチドをePTFEに極めて安定に固定化することに成功した。そして、ePTFEにペプチドを固定化することによって、培養系における血管内皮細胞の接着性の向上と、ラット頸動脈移植モデルでの血管内膜様組織の再生促進に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、チロシン-リジンでなるアンカー配列の酸化という極めて簡便な方法で、化学修飾の困難なePTFE表面に生理活性ペプチドを安定に固定化することに成功した。人工血管に適応できるテフロン修飾法はこれまでにほとんど例がなく、本研究の成果は学術的・社会的意義が大きい。また、本法でフィブロネクチン由来ペプチドをePTFEに固定化することで、血管内皮細胞の接着と内膜様組織の再生を促進することができた。ePTFE人工血管は内膜再生の遅延や遅発性血栓症が問題とされており、本研究の成果を利用すればこれら課題を一挙に解決できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop a novel technique to achieve the stable immobilization of bioactive peptide on expanded polytetrafluoroethylene grafts via the single-step reaction for the long patency of the small-diameter vascular graft. We successfully immobilized fibronectin-derived peptide on the ePTFE surface using the (Tyr-Lys)₃ anchor. Moreover, the adhesion of cultured-endothelial cells was improved and the regeneration of neointimal-like tissue was enhanced in the rat carotid artery implantation model.

研究分野：生体材料、人工臓器、ペプチド化学、タンパク質化学

キーワード：人工血管 ペプチド固定化 ePTFE チロシン酸化 血管内皮細胞 内膜組織再生

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)を延伸して多孔質構造にした expanded PTFE (ePTFE) は、柔軟性と強い疎水性に基づく抗血液凝固能を備えており、45年以上にわたって下肢バイパスや心疾患シャントなどの小口径人工血管の基材として用いられてきた。近年の長寿命化と生活習慣病患者の増加や若年化によって、ePTFE 製人工血管の使用症例数も急激に増加しており、使用期間(必要な開存期間)も数年から数十年に長くなっている。ePTFE は、血小板粘着を強く抑制すると同時に、血管内膜の再生に必須の血管内皮細胞の接着も抑制するため、新生内膜の再生遅延や脱落が起って長期留置時には血栓や血腫によって吻合部から狭窄して閉塞する。例えば、直径3mmのePTFE製人工血管をイヌ頸動脈に移植すると僅か2時間程で閉塞し、ヘパリンコートを実施しても5年開存率が僅か50%程度との報告がある¹。開存期間の延長には、血管内皮細胞と接着するペプチドのePTFE人工血管内腔への固定化は有効な手段と考えられるが、ePTFEは化学的に極めて安定なためその化学修飾が困難である。ePTFEへのペプチドの固定化は、プラズマ照射²や強い還元剤処理³によって炭素-フッ素結合を開裂させて生成するラジカルを利用した方法が報告されている。しかし、これらの従来法は炭化や分解(脱フッ素化)によってePTFEの抗血栓性や柔軟性が損なうため、人工血管へのペプチドの固定化には適用できない。そのため、穏和な条件でePTFEの特性を維持しつつペプチドを固定化できる新たな方法の開発が求められていた。

研究代表者らは、アミノ酸の一種であるチロシンの酸化によって生じるキノンの高い反応性を利用し、ePTFE基材へのフィブロネクチン由来血管内皮細胞接着性ペプチド(Arg-Glu-Asp-Val: REDV)の固定化に成功している^{4,5}。この方法は、N末端にチロシン残基(チロシンアンカー)を導入したREDVペプチドを、酸化を介して直接ePTFEへ固定化するものである。つまりこの方法の特徴は、プラズマ照射や強い還元剤処理を必要とせず、チロシン残基側鎖のヒドロキシフェニル基を低濃度の過酸化水素と塩化銅(II)触媒を用いた温和な反応でキノンに酸化し、そのキノンがePTFEに吸着しながら互いに結合してペプチド固定層を形成することである。この方法を利用して抗血栓性を維持しつつePTFEへの血管内皮細胞の接着を亢進できたものの、その効果は期待していたほどではなく、ペプチド固定化効率の向上が課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、『チロシンアンカーに異なる電荷のアミノ酸残基を組み合わせることで、ePTFEへのペプチド固定化量が増えるか』と『血管内皮細胞接着性ペプチドの高効率な固定化によって、ePTFE製人工血管内腔の内膜再生の促進による長期開存が達成されるのか』という2つの学術的「問い」の検討を目的とした。

ePTFEの表面は高い疎水性を示し、かつ多数の電気陰性度の大きいフッ素(F)の影響でゼータ電位は負を示す。また、チロシンの酸化で生じるキノンは、アミノ基(正電荷)とマイケル付加反応によって共有結合を形成する。すなわち、チロシンアンカーの親疎水性や電荷が、ePTFEへのペプチドの固定化効率に大きく影響するであろうと予想し、ペプチドの高密度固定の実現を目指した。

また、過去の多くの研究結果から、血管内皮細胞接着性ペプチドの固定化は人工血管内腔の内膜再生に有効であると予想されるものの、従来法ではePTFE製人工血管の内腔にペプチドを固定化することが不可能であったため、それを検証することができなかった。研究代表者らが開発したチロシンアンカーを用いた方法によってePTFE製人工血管の内腔へのペプチドの固定化が可能となり、その内膜再生性の検証を進めることができると考えた。

上記2つの学術的「問い」の解決を通して、血管内皮細胞接着性ペプチドの内腔への固定化がePTFE製小口径人工血管の開存期間の延長に有効かを明確にする。

3. 研究の方法

1) チロシンを含むアンカー配列の設計

本研究では、フィブロネクチン由来のインテグリン $\alpha_4\beta_1$ リガンドである Leu-Asp-Val⁶ を細胞接着性ペプチドとして選択した。

Tyr残基をアンカーとする Y-LDV、および Tyr と Lys および Glu をアンカーとする YK3-LDV および YE3-LDV を汎用の Fmoc 固相法で合成した。各ペプチド水溶液(1.0 mM)に ePTFE 基材(ϕ 15 mm)を浸漬し、過酸化水素と塩化銅(II)を添加して 50°C で 24 時間反応させた。反応後の ePTFE 基材表面の水濡れ性を水接触角計で、元素組成を X 線光電子分光(XPS)でそれぞれ解析した。さらに、反応後の ePTFE 基材を SDS (1w/v%)水溶液および NaCl (1 M)水溶液で洗浄し、XPS で解析することで表面のペプチドリガンドの安定性を評価した。

2) ペプチド固定化 ePTFE 基材上への細胞・血小板接着性の評価

各ペプチドを固定した ePTFE 基材 (Φ15 mm) を UV 滅菌し、24 ウェルプレートに入れた。そこへ EBM-2 培地を 500 μL 加えて ePTFE 基材を洗浄および固定層を水和した。ePTFE 基材上にヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を播種(2.0×10^4 cells)し、3 時間および 8 日間インキュベート(37°C、5% CO₂)した。なお、8 日間培養する際は、細胞播種 3 日目に 1 度培地を交換した。所定期間培養後、ePTFE 試料に接着した細胞を Live Cell Tracking Kit, Green Fluorescence(AAT Bioquest)を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

健全ヒトドナーから得た全血に 10%(v/v)となるように 3.8%クエン酸三ナトリウム水和物水溶液を混合し、さらに 200 g で 15 分間遠心分離して多血小板血漿(Platelets rich plasma; PRP)を上清として回収した。この時の下層を 2200 g で 15 分間遠心分離し、上清を貧血小板血漿(Platelets poor plasma; PPP)として回収した。PRP を PPP で希釈して 2.0×10^7 platelets/mL となるように調製した。各ペプチドを固定した ePTFE 基材 (Φ15 mm) を UV 滅菌して 24 ウェルプレートに入れ、リン酸緩衝溶液 (PBS) で洗浄後、調製した PRP 500 μL を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、ePTFE 基材を PBS で穏やかにリンスして弱く粘着した血小板を除去し、ePTFE 基材に粘着した血小板数を定量および観察した(関西大学先端科学技術推進機構・倫理委員会承認番号：063)。

3) ペプチド固定化 ePTFE 製パッチの作製と内膜再生性の評価

YK3 を前記した方法により ePTFE 製人工血管(アドバンタ PTFE 人工血管 VXT; ゲティンゲグループ・ジャパン株式会社)上に固定化した。三種混合麻酔剤で麻酔を施したラット (SD、600-650 g、雄; 日本エスエルシー株式会社)の左頸動脈を露出し、血流を遮断しながら血管壁に作製した孔(約 1.0×2.0 mm)にほぼ同サイズ成型した楕円形の未修飾 ePTFE パッチもしくは YK3 固定化 ePTFE パッチを吻合(10-0、ナイロン糸)した。ePTFE パッチを移植して 2 週および 4 週後、三種混合麻酔剤による麻酔下で左頸動脈を注意深く露出して開存状況を観察した。その後、ラットを犠牲死させて ePTFE パッチを周囲の頸動脈および組織と共に摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定に凍結乾燥して走査型顕微鏡で観察した(関西大学・動物実験委員会承認番号：1805)。

4. 研究成果

1) チロシンを含むアンカー配列と ePTFE 基材へのペプチド固定化挙動

それぞれの ePTFE 基材の水接触角は、未修飾やペプチド水溶液(酸化剤不含)に浸漬したものは約 130°であった。一方、ペプチド水溶液(酸化剤含有)中で反応後、ePTFE 基材の水接触角は、約 120° (Y-LDV・YE-LDV)と約 70° (YK-LDV)であり、アンカー配列に Lys 残基を含む YK-LDV で最も親水性を示した。

XPS では、ペプチド水溶液(酸化剤含有)中で反応後は、全てのペプチドで窒素 (N1s) が検出された。特に、YK-LDV で反応させた ePTFE 基材でその傾向が顕著であり、炭素 (C1s) でも C=N や C-O などに由来するピークが強く検出された(図 1)。YK-LDV で反応させた ePTFE 基材においてのみ、SDS (1w/v%)水溶液および NaCl (1 M)水溶液で洗浄後も、XPS でペプチドに由来する窒素および炭素のピークが強く検出されたことから、YK-LDV は ePTFE 基材表面に安定かつ高密度に固定化されていることが示唆された。

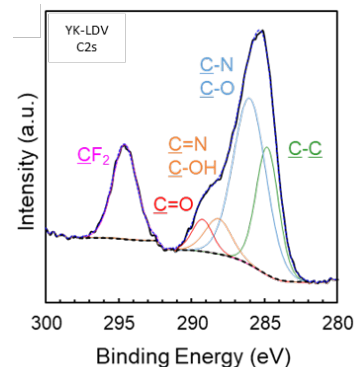


図 1. YK-LDV を固定後の ePTFE 基材の XPS スペクトル

2) ペプチド固定化 ePTFE 基材上への細胞・血小板接着性

HUVEC は、3 時間の培養では、未修飾、酸化剤溶液もしくはペプチド水溶液に浸漬した ePTFE 基材上にはほとんど HUVEC は接着しなかった。しかし、各ペプチド水溶液(酸化剤含有)で反応させた ePTFE 基材上には HUVEC は接着し、その傾向は Y-LDV = YE-LDV < YK-LDV となった(図 2)。また、この傾向は 8 日間培養すると一層顕著になり、YK-LDV を反応させた ePTFE 基材上でのみ HUVEC の接着を確認することができた。すなわち、YK-LDV が ePTFE 基材上に安定かつ高密度に固定化されることで、インテグリンリガンドの LDV と HUVEC との相互作用が強かつ長期間機能したことが示唆された。

さらに、HUVEC と同様、ヒト血小板は未修飾、酸化剤溶液もしくはペプチド水溶液に浸漬した ePTFE 基材上にはほとんど接着しなかった。つまり、酸化による ePTFE 基材表面の変質や、非特異的に吸着した各ペプチドによる非特異的な血小板粘着が生じないことが示唆された。HUVEC の接着が強かつ促進された YK-LDV 固定化 ePTFE 基材上にも血小板は粘着しなかったことから、LDV が血小板膜状の GPIIb/IIIa と

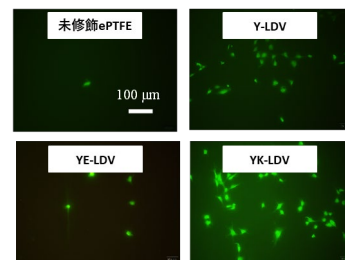


図 2. 各ペプチドを固定化した ePTFE 基材上での HUVEC 接着挙動 (培養 3 時間)

相互作用しないことも示唆された。

3) ペプチド固定化 ePTFE 製パッチの内膜再生性

ラット頸動脈を露出させて血流を遮断し、動脈壁に開けた孔に ePTFE パッチを吻合する一連の工程に 1 時間半ほど要したが、移植後は拍動流が再開し、ラットが生存する手技を確立することができた (図 3)。ePTFE パッチを移植して 3 日後の生存率は、未修飾 ePTFE 基材では 45.5% 程度で会ったのに対し、YK-LDV を固定化した ePTFE 基材では 85.7% となり、YK-LDV の固定化によって生存率が優位に向上した。この理由は明確ではないが、未修飾 ePTFE 基材で生じた微小血栓が脳や肺の毛細血管を閉塞したと予想している。

移植 2 週後に摘出した ePTFE パッチの内腔面を観察したところ、未修飾よりも YK-LDV で組織による表面の被覆が進んでいることが分かった。さらに移植 4 週間後には、未修飾 ePTFE パッチも組織で被覆され、YK3-ox と顕著な差は認められなかった。ラット頸動脈への移植モデルでは、小口径 ePTFE 血管の閉塞を再現できなかったものの、YK アンカーを介した LDV インテグリンリガンドの固定化によって ePTFE 基材上への内膜様組織の再生が亢進されることが示唆された。

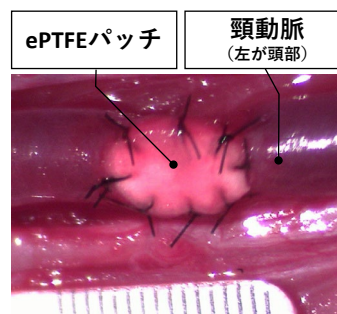


図 3. ラット頸動脈へ移植した ePTFE パッチ

<引用文献>

1. P. Klinkert, P.N. Post, P.J. Breslau, J.H van Bockel, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 27 (2004) 357.
2. C. Li, A. Hill, M. Imran, *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.*, 16 (2005) 875.
3. Y.W. Tong, M.S. Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res.*, 42 (1998) 85.
4. S. Kakinoki, T. Yamaoka, *Bioconj. Chem.*, 26 (2015) 639.
5. S. Kakinoki, K. Takasaki, A. Mahara, T. Ehashi, Y. Hirano, T. Yamaoka, *J. Biomed. Mat. Res. A*, 106 (2018) 491.
6. A. Komoriya, L. Green, M. Mervic, S. Yamada, K. Yamada, M. Humphries, *Biol. Chem.*, 266 (1991) 15075.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西岡悟、平野義明、山岡哲二、柿木佐知朗
2. 発表標題 細胞接着性リガンドの直接固定化によるePTFE表面の生理的機能化
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有地祐貴、西岡悟、平野義明、山岡哲二、柿木佐知朗
2. 発表標題 インテグリンリガンドの直接かつ安定な固定化によるePTFE表面の生理的機能化
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有地祐貴、西岡悟、平野義明、山岡哲二、柿木佐知朗
2. 発表標題 インテグリンリガンド固定化ePTFEパッチのin vivoにおける血管内膜様組織の再生
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西岡悟、平野義明、山岡哲二、柿木佐知朗
2. 発表標題 ペプチドリガンドの直接固定化によるePTFEへの細胞接着性の付与
3. 学会等名 第64回高分子研究発表会（神戸）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西岡悟、平野義明、山岡哲二、柿木佐知朗
2. 発表標題 チロシン-リジンアンカーの酸化を介したePTFE基材への細胞接着性リガンドの固定化
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック第13回関西若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西岡悟、伊井正明、平野義明、山岡哲二、柿木佐知朗
2. 発表標題 ペプチドアンカーを介したePTFE基材への細胞接着性リガンドの安定な固定化
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柿木佐知朗、西岡悟、有地祐貴、平野義明、伊井正明、山岡哲二
2. 発表標題 インテグリンリガンドの直接かつ安定な固定によるePTFE基材表面の細胞機能化
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018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	伊井 正明 (Ii Masaaki) (10442922)	大阪医科大学・研究支援センター・講師 (34401)	令和元年8月8日に研究分担者変更承認申請書を提出済

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
---------	---------