

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09266

研究課題名(和文) 筋収縮・弛緩応答を可能にする循環器系組織工学基材の開発と移植用小口径血管への応用

研究課題名(英文) Development of cardiovascular tissue engineering substrate that enables muscle contraction/relaxation response and application to small-diameter blood vessel for transplantation.

研究代表者

宮本 啓一 (Miyamoto, Keiichi)

三重大学・工学研究科・教授

研究者番号：70252343

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)：生体物質のみの構造・機能を模倣再現した小口径(1～4mm)人工血管を開発した。細胞外基質製の伸縮性線維シート、連続孔弾性線維ゲル、膠原繊維シートおよび、平滑筋細胞、内皮細胞の動的刺激培養を複合化させることで作成した。組織培養した小口径人工血管は、拍動型動的培養および循環培養により、機能的特徴として血管収縮および弛緩応答を有することが確認できた。ラット大腿動脈へ人工血管を置換移植した。その後、2週間観察を行い、マイクロX線CTにより流路を観察し開存していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

足場材料を用いた組織工学的な小口径人工血管には(1)平滑筋細胞とコラーゲンを混ぜて管状構造を作成し、内腔面を内皮細胞で覆う方法、(2)生体血管と同様の機械的刺激を与えリモデリングを促進させる方法等が有望とされる。しかし足場材には、従来人工血管に用いられている合成高分子材料やコラーゲン足場を複合化させる等の数多くの方法が試みられてきたが実用性に乏しい。本研究は、こうした開発状況の中でも未だ試みられていない素材のエラスチンとフィブリリンを用いることで生体血管に類似した収縮・弛緩応答などの血圧調節機能を有した小口径の組織工学的な人工血管としての開発に成功し、実用化に向けた展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a small-diameter (1-4 mm) artificial blood vessel that mimics and reproduces the structure and function of only biological substances. It was prepared by combining a stretchable fiber sheet made of extracellular matrix, a continuous pore elastic fiber gel, a collagen fiber sheet, and a dynamic stimulation culture of smooth muscle cells and endothelial cells. It was confirmed that the tissue-cultured small-diameter artificial blood vessels had vasoconstriction and relaxation responses as functional features by pulsatile dynamic culture and circulation culture. An artificial blood vessel was replaced and transplanted into the rat femoral artery. After that, observation was performed for 2 weeks, and the flow path was observed by micro X-ray CT, and it was found patency.

研究分野：生体材料化学

キーワード：エラスチン コラーゲン フィブリリン 再生医療 人工血管 収縮弛緩 リモデリング 組織工学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口径 4mm 以下の小口径人工血管は、心臓血管外科や脳血管外科領域においては血管疾患に対する代替治療法として要求が高い生体材料である。しかし、過去 30 年以上にわたる組織工学を応用した小口径人工血管の開発を鑑みると、多くの研究者の努力・工夫にもかかわらず、血栓および内膜肥厚現象の抑制は困難で未だ実用化には至っていない。合成高分子材料による単純な小口径管状構造では血栓形成阻止は困難であり、内面に血管内皮細胞を利用する限られた方法のみが有効とされている。これまでの循環器系組織工学においては、細胞足場材料としてのコラーゲンゲルや生体吸収性合成高分子に、血管細胞を混合して管状構造にして培養する方法が多く試みられてきたが、一時的には血栓形成は防げるが、本質的には病的血管に近い。理由は、生体内で吸収される過程でリモデリングが不可能で、血管壁は肥厚・硬化し、周辺とのコンプライアンス差から血栓形成が生じるからとされる。

近年ではこの小口径人工血管の開発の困難さから、組織工学分野においては生体組織から脱細胞化させる技術や、異物を挿入することで生体内に管状構造を作らせる新技術が期待されている。しかし、実用化のための大量生産性、品質管理や移植部位の生体血管との適合性などを考慮すると、従来の足場材料設計による方法も工夫の余地はある。

### 2. 研究の目的

多くの先行研究の中には、血管構造の成分組成、構造、機能を完全に再現することを目的とした例は驚くほど少ない。本研究は循環器系組織工学のために、申請者がこれまで開発した生体材料である伸縮性弾性線維シート、連続孔弾性線維ゲル、膠原繊維シート、および平滑筋細胞、内皮細胞の動的刺激培養により、生体由来物質のみによる口径 4mm 以下の小口径人工血管の作製を目的とする。特に移植する人工血管として、収縮・弛緩刺激応答が生体血管と同期でき、長期にわたり力学物性や初期構造を維持したままリモデリングする培養技術を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 循環器系組織工学基材の開発

材料作成：ブタ血管組織由来のコラーゲン、エラスチンとフィブリリンを高純度原料として抽出精製した。エレクトロスピニング法によるエラスチンファイバーシートを作成した。また、数種類の抽出した水溶性エラスチンを用いることで、相分離法を用いた連続孔型ハイドロゲルを作成した。血管は三層構造（内膜、中膜、外膜）からなることから、中膜構造として、弾性組織線維シート上に平滑筋細胞を円周方向に配向接着させたユニット構造を、数層に重ね、生体血管構造としてはエラスチンファイバーシート、コラーゲンファイバーシート、連続孔型ハイドロゲルを複合させ作成した。血管平滑筋を一層構造で重なる多層構造に作成し静的培養および拍動型動的培養条件を検討した。

評価方法：作成した組織工学的人工血管は、構造評価として組織切片を作成し蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いた観察を行った。力学特性評価は弾性率測定装置およびコンプライアンス計測装置により、血管コンプライアンスおよびバースト圧を評価した。機能評価には、薬剤による収縮・弛緩機能試験を行い総合的に有効性を評価した。

#### (2) 移植用小口径血管の生体内評価

動的培養した組織工学的人工血管（内径 1mm）を用いて、動物（ラット）移植試験を行った。移植前拍動型動的培養として、小口径人工血管の力学特性を測れるフォースゲージ、ひずみゲ-

ジを取り付けた培養装置により 60Hz,ひずみ 10%で 1 週間培養し力学特性を評価した。ラット大腿動脈に移植後 2 週間目での評価は、X線CTにより開存性を観察、また組織切片による構造観察検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 循環器系組織工学基材の開発

エラスチンファイバーシートとコラーゲンファイバーシートを組み合わせ、血管平滑筋細胞を多孔性エラスチンハイドロゲルで包埋して作成した、内径 1mm の組織工学的人工血管の H E 染色画像を Fig.1 に示した。

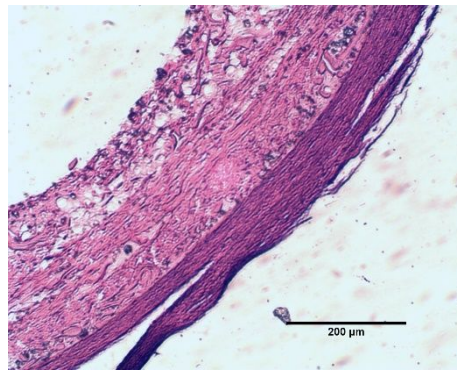


Fig.1 組織工学的人工血管断面(HE 染色)

外側に膠原繊維層、内側に弾性線維層その弾性線維層板間に一層の血管平滑筋細胞が配向して配置される、生体血管同様の組成・構造を有する人工血管が作成できた。ファイバーシートを複合化させるエラスチンハイドロゲルは連続多孔性の構造を有していることから、細胞の生存が良好で長期培養も問題が見られなかった。

対照試験として行った静置培養では、力学特性としての血管コンプライアンスは培養時間とともに増加し、基質の分解が予想された。しかし、拍動型動的培養することでコンプライアンスの長期維持が確認でき、分解と基質産生の調和が保たれていた。バースト圧は静置培養では培養開始と 1 週間後では変化が見られなかったが、拍動型動的培養では 1 週間後には増加し 370mmHg と通常の生体血管と変わらない値になった。

機能評価として、収縮・弛緩応答を薬剤刺激により内腔面積変化率として測定した。収縮剤にはフェニレフリン(PE)、弛緩剤としてニトロプルシドナトリウム(SNP)を用いた。結果を Fig.2 に示した。細胞無しのコントロールでは薬剤刺激による内腔面積変化が見られないことから、静置培養、拍動型動的培養ともに平滑筋細胞の収縮弛緩機能が血管全体に生じていることが分かった。特に拍動型動的培養した人工血管では、収縮剤や弛緩剤にたいする変化率差が大きいことから応答性が強いことがわかった。

理由として、動的刺激により、平滑筋細胞の表現型が合成型から収縮型へ形質変化したことで、生体組織同様の機能性が向上したと考えられた。

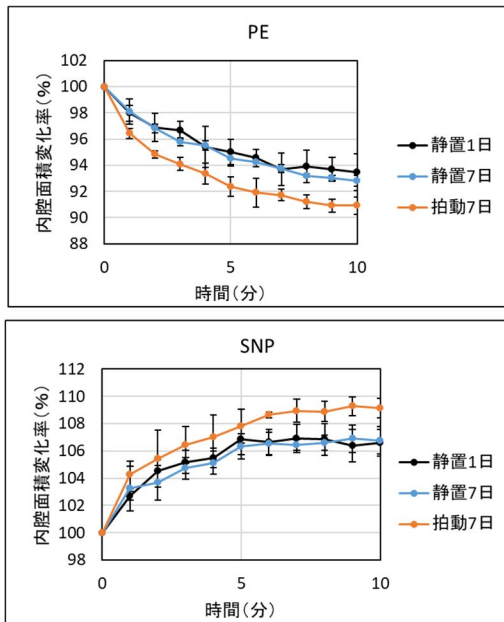


Fig.2 薬剤刺激による収縮・弛緩応答

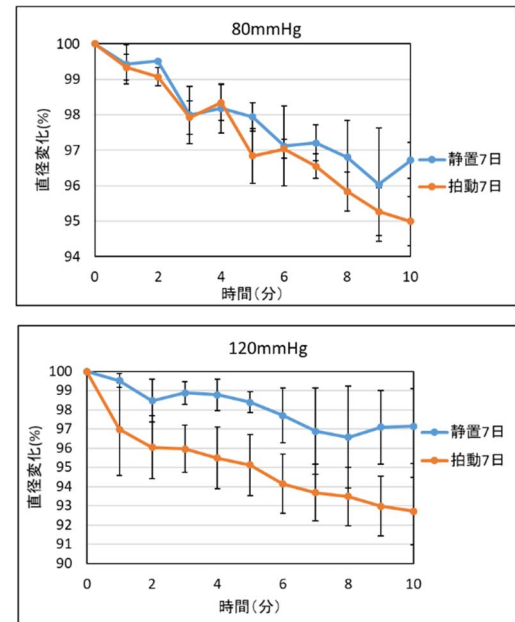


Fig.3 圧力刺激による収縮・弛緩応答

また、血管の血圧調節機能として血圧が上がると収縮して流量を下げる性質が知られることから、圧力による収縮・弛緩応答を調べた結果を Fig.3 に示す。圧力下においては 80mmHg および 120mmHg でも収縮することが示された。特に 120mmHg の高圧化では拍動型動的培養により作成した人工血管の応答が顕著であることがわかり、より生体血管に類似した収縮特性がリモデリングできることが示された。

## (2) 移植用小口径血管の生体内評価

開発した組織工学的人工血管を、ラットの大腿動脈にグラフトした。麻酔下で生体血管と人工血管を完全に置換して2週間観察した。2週間後に X 線 CT を用いた血管造影法により、移植した人工血管部分に血流を確認した。移植片の免疫染色による組織学的観察から血管内皮細胞の導入確認と、平滑筋細胞の配向性確認、コラーゲンやエラスチン等の新規基質産生の確認により良好なりモデリングが確認できた。今後は生体内でのより長期の観察および血流の異なる部位での導入など、臨床応用に向けた検討が必要な段階にあることが示された。

移植用小口径人工血管の作成技術に関して、これまで試みられ比較的有効とされた技術には (1)平滑筋細胞とコラーゲンを混ぜて管状構造を作成し、内腔面を内皮細胞で覆う方法、(2)生体血管と同様の機械的刺激を与えリモデリングを促進させる等がある。基本となる足場素材は、従来人工血管に用いられている合成高分子材料や合成エラストマーなどであり、必要に応じてコラーゲンを化学的または物理的にコーティングあるいはコラーゲン足場として複合化させ使用した数多くの方法が試みられてきた。本研究は、こうした開発状況の中でも未だ試みられていない素材のエラスチンとフィブリリンを用いて血管構造の作製・培養・リモデリングに成功した。特に、生体血管に類似した収縮・弛緩応答などの血圧調節機能を有した小口径の組織工学的人工血管としての開発に成功し、今後は実用性に向けた品質管理や安全性試験、リモデリングメカニズムの解明などの研究として発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 濱口慎也, 晝河正希, 宮本啓一 ほか
2. 発表標題 脳動脈バイパス血管としての血圧調節型組織工学的小口径人工血管の開発
3. 学会等名 第58回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S Hamaguchi, M Hirukawa, K Miyamoto et.al
2. 発表標題 Development of blood-flow regulation type tissue engineering small diameter vascular graft as bypass graft that of cerebral artery
3. 学会等名 10th International Symposium for Sustainability by Engimeering at MIU (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M Koyama, M Hirukawa, K Miyamoto
2. 発表標題 Development of high elongation and high elastic modulus materials using Elastin-Fibrillin Hybrid Gel.
3. 学会等名 10th International Symposium for Sustainability by Engimeering at MIU (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金澤 友希, 晝河正希, 宮本啓一ほか
2. 発表標題 エラスチンを用いた組織工学的人工血管の収縮弛緩特性
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 T KANAZAWA, M Hirukawa, K Miyamoto et al.
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF ARTIFICIAL BLOOD VESSELS THAT CAN CONTRACT AND RELAX
3. 学会等名 9th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T KANAZAWA, M Hirukawa, K Miyamoto et al.
2. 発表標題 Development of tissue engineered grafts that can contract and relax.
3. 学会等名 Life support engineering 2019
4. 発表年 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	晝河 政希  (Hirukawa Masaki)  (40823456)	三重大学・工学研究科・助教    (14101)	

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