

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04522

研究課題名(和文)小口径合成人工血管の新生内膜誘導化修飾とミニブタ移植による開存化実証

研究課題名(英文)Small diameter synthetic vascular grafts: modification for neointima formation and its patency

研究代表者

山岡 哲二 (Yamaoka, Tetsuji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、血管内膜の再生に寄与する末梢血循環単核球細胞を補足する小口径血管戦略を、脱細胞化血管で報告してきた。この技術を産業化に優位な延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)血管に搭載するために、(1)高い細胞補足能と低い血小板粘着性を有するペプチドを独自に見出し、(2)表面修飾が困難なePTFEへの新しい表面グラフト重合反応を確立し、(3)ePTFE自体の凝固誘導性を抑制するためにリン脂質高分子を導入した。特に、ePTFEのアルゴンプラズマ後に続く光反応を利用した新たな表面グラフト重合は効率よく進行し、高い抗血栓性と細胞補足能を、ミニブタ体外循環モデルおよび末梢血管移植モデルで実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環末梢血単核球を補足する小口径人工血管開発戦略は、動物組織由来血管であり、また再生型的人工血管であるという特性から、その実用化には多くのハードルが存在する。すでに世界中で実績を有するePTFE性の血管に我々の技術を搭載できれば、世界で初めての小口径人工血管の開発事例となる。しかしながら、ePTFEの抗血栓性は小口径血管の開存化には不十分である。本研究では、搭載した3つの開存化戦略がいずれも有効に機能することがin vitroのみならずin situ、およびin vivoで示された。今後、その開存率の検証を進めることで、下肢救済のみならず冠動脈バイパスへの応用にも期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed an original strategy for small-diameter vascular grafts, in situ capture of circulating mononuclear cells on decellularized vessels, and reported its good patency in porcine models. In order to apply this strategy to expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) blood vessels, some new technologies were developed and tested: (1) a novel peptide with high cell capturing ability and very low platelet adhesion, (2) a new surface modification reaction applicable to the chemically stable ePTFE, (3) a phospholipid polymer-based graft polymer on the luminal surface. In particular, the new surface graft polymerization of ePTFE using photoreaction after argon plasma treatment proceeded extremely efficiently, and its high antithrombogenicity and cell capturing ability were demonstrated in a mini-pig extracorporeal circulation model and a peripheral vessel transplantation model.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：小口径人工血管 延伸PTFE 内膜誘導 ペプチド修飾

1. 研究開始当初の背景

世界中で小口径人工血管の開発が精力的に進められて来たが、内径 5 mm 未満の人工血管は臨床的意義を有する性能を発揮できない。販売されている内径 5 mm の延伸ポリテトラフルオロエチレン (ePTFE) 製の人工血管の人工透析における外シャントであっても、その一次開存率 (バルーンなどの開存化処置を施さない場合の開存率) は満足できるものではなく、中口径血管であってもまだまだ改良が必要である。我々は、合成材料の改質戦略のみでは有効な開存化は困難と考え、ダチョウ頸動脈を素材として選択し、脱細胞化小口径血管 (内径 2mm) の大動物での開存化に成功した (Mahara et al., Biomaterials, 2015)。その基盤となる戦略は、血管内腔面に対して、末梢血単核球を捕捉するペプチド (REDV) 修飾を施すものであり、ミニブタ移植モデルの結果、移植 1 日後に内腔面は全長に亘って循環細胞で覆われることを証明するとともに、このペプチド修飾脱細胞化内腔面が抗血栓性に非常に優れていることを明らかにした。しかしながら、これまでの検討の結果、脱細胞化血管と同じ戦略では ePTFE など合成系人工血管の開存化には成功しておらず、次世代の小口径“合成”血管の開発には、新たな機能や戦略を導入することが必須と考えた。

2. 研究の目的

そこで、本申請研究では、合成材料のなかでも比較的細い (内径 5 mm) 血管で、ある程度の期間の一次開存性が報告されている ePTFE を基材として選び、その内腔面の化学修飾法によって抗血栓性の向上を図った。我々が従来から選択してきた REDV ペプチドの抗血栓性は必ずしも十分ではなく、脱細胞化組織との組み合わせのみで有効な血管の開存化が可能であった。すなわち、ePTFE 用の内腔修飾には、さらに優れた抗血栓性を有する細胞補足ペプチドが必要であると考え、新たに血液適合性ペプチド (HCP-1、Hemocompatible peptide-1) を選択して用いた。もう一つの大きな課題は、ePTFE が化学的に安定であるためにペプチド修飾が困難なことである。我々は、いくつかの検討を経て、ePTFE のアルゴン (Ar) プラズマ処理により導入された反応性基に対する 2 つのペプチド度入反応 ; (1) グリシジルメタクリレートを用いるアンカー法、および、光反応性基との結合による光反応法による安定かつ有効なペプチド修飾を検討した。

さらにその抗血栓性評価として、従来型 *in vitro* 試験に加えて、独自に開発したミニブタ体外循環システム (Munisso et al., J Artificial Organs, 2018) によって、全血接触 *in situ* 試験を実施した。In vitro 抗血栓性に関する研究報告は多く存在するが、生体内での抗血栓性に外挿可能な検証は容易ではない。一方で、人工血管の有効性にはサイズの要因が大きく、大動物を用いた研究でしか検証が困難であることも研究を困難にしている。また、血液の生理的性質が大きく異なるラット等の齧歯類での検討では、臨床で有用な情報が得られないことも課題である。本研究では、Off the Shelf の小口径人工血管の開発のために、実用化に道標を提示することができる基礎研究および前臨床 POC 情報の集積を目的とするために、*in vitro* 実験から *in situ* 実験、および *in vivo* 急性実験を目標とした。

3. 研究の方法

(1) ePTFE 表面修飾法 (グリシジルメタクリレートアンカー法)

ePTFE は化学的安定性が高く、従来のプラズマ処理後のビニルモノマーグラフト重合法では表面処理が困難であった。そこで、ePTFE (多孔質構造) および PTFE シートに対して Ar プラズマ処理後にグリシジルメタクリレート (GMA) をアンカー分子として導入することで反応正規を導入し、続けてメタクリル酸誘導体モノマーで処理することで、効率良くグラフト重合できることを見いだした (Liu et al., Biomat. Sci., 2018)。この方法で表面修飾した ePTFE サンプルを、血小板粘着試験、全血接触試験、*in vivo* 評価試験に供したが、その効果は十分に満足できるものではなかった。

(2) ePTFE 表面修飾法 (光反応法)

HCP-1 ペプチド (HGGVRLY) に光反応性基を導入した。LC-MS により光反応性基の導入率を測定した。得られた光反応性ペプチドの最適溶媒を選定して実験に用いた。Ar プラズマ処理した ePTFE 試料をペプチド溶液に浸漬して減圧することでペプチド溶液を多孔質構造内部に浸透させた後に UV 光を照射して固定化し、ペプチド修飾は XPS によって確認した。

(3) ミニブタ体外循環モデルによる全血接触評価

ペプチド修飾した ePTFE グラフトは、*In situ* ミニブタ体外循環モデルにより血液適合性を評価した。ゲッチングミニブタ (25 ~ 35 kg) を、イソフルランの吸入とケタミンおよびエクスラジン筋注により麻酔した。引き続き、2.5% イソフルラン吸入で術中を維持した。未修飾および修飾 ePTFE グラフトを体外血液循環システムに接

続いて4時間灌流した。実験中は動脈血をモニターして急性毒性などが無いことを確認した。取り出した移植片は生理食塩水で洗浄し、免疫蛍光染色分析(CD41、CD16、CD14、マクロファージマーカー、CD34)により、移植片内腔表面に付着している細胞を識別した。すべての動物実験は、厚生労働省の動物実験ガイドラインおよび国立循環器病研究センター研究所の動物実験倫理委員会の承認を受けて行った。

In vitroでの抗血栓性実験の結果が、in vivoでの有効性につながらないことが多い。また、ウサギ静脈内への繊維留置モデルも報告されているが、ヒトでは血液凝固系も内膜誘導挙動も大きく異なる。そのために、in vivo移植実験での評価が有効であるが、多くのミニプタやイヌ等に移植して、その開存性を評価法とする検討戦略には課題も多い。そこで、今回、in situモデルを選択することで、in vivoでの移植系に近い形で全血接触試験を実施しミニプタの犠牲死数を最低限に押さえることができた。

4. 研究成果

(1) ePTFE表面修飾法(光反応法)

本プロジェクトで新たに開発した光反応法においては、Ar処理のみでUV照射を行わなかった場合に比べて、Ar処理とUV照射した修飾ePTFEはXPSにおけるN/F比が有意に向上した。一方、ArおよびUVで処理しないサンプル(物理吸着)では、すべてのペプチドが洗い流された。修飾効率(密度)は、従来のアンカー法に比べて飛躍的に向上しており、様々なPTFE医療機器への応用が可能である。

(2) 内皮細胞親和性および抗血小板粘着性

HCP-1修飾によるePTFEへの内皮細胞の接着親和性は大きく向上した(図3)。未処理ePTFE、Ar処理ePTFEでは細胞接着性に乏しかったが、反応させるペプチド溶液濃度の向上とともに細胞接着性が向上した。また、SEMによる細胞形態の観察の結果、HUVECが修飾ePTFEの繊維構造間で接着して伸長している様子が確認され、HCP-1修飾ePTFEが優れた無い細胞接着性を提供することが示された。

HCP-1ペプチドは、上述のごとく低血小板粘着特性を有するペプチドとして我々が見出した。そこでHCP-1修飾ePTFEの抗血小板接着能力を評価したところ、未処理およびAr処理に比較して、反応ペプチド濃度の向上とともに血小板粘着が大きく抑制された。SEM撮像において修飾したePTFE繊維上には殆ど血小板は確認できなかった。

(3) In situ全血接触試験

HCP-1修飾ePTFEグラフトの血液適合性を、in situプタ体外循環モデル(図1)にて4時間灌流した後に、表面に付着した細胞分画を解析することで評価した。SEM観察では、HCP-1修飾により、血小板、赤血球、細胞付着が大きく抑制されることが明確であった。特に、血小板粘着は、抗血小板薬使用しない状況下にもかかわらず、大きく抑制されていた。さらに、免疫蛍光分析により、多くのCD34陽性細胞が修飾ePTFE上に確認されたが、未修飾ePTFEグラフトの内腔表面には確認されなかった。これらは、いずれもHCP-1の低い血小板粘着性と標的細胞親和性を示す結果であり、今回のePTFE表面への表面修飾戦略とともに有用な小口径血管開発の戦略となることが示された。

【後日公開】

図1 ePTFE多孔質内部へのペプチド修飾。(左)Ar/UV処理なし、(右)Ar/UV処理有り。

【後日公開】

図2 ePTFE多孔質内部へのペプチド修飾。(左)Ar/UV処理なし、(右)Ar/UV処理有り。

【後日公開】

図3 HCP-1固定化による、内皮細胞接着性の向上(上)と、血小板粘着性の抑制(下)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. -I Hsu, A.Mahara and *T. Yamaoka	4. 巻 136
2. 論文標題 Identification of circulating cells interacted with integrin 4 1 ligand peptides REDV or HGGVRLY	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	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.peptides.2020.170470	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 H.Yamanaka,A.Mahara,N.Morimoto and T. Yamaoka	4. 巻 110(3)
2. 論文標題 EDV-modified decellularized microvascular grafts for arterial and venous reconstruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 547-558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a37305	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 Mahara Atsushi, Kojima Kentaro, Hirano Yoshiaki, Yamaoka Tetsuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Arg-Glu-Asp-Val Peptide Immobilized on an Acellular Graft Surface Inhibits Platelet Adhesion and Fibrin Clot Deposition in a Peptide Density-Dependent Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 2050 ~ 2061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbiomaterials.0c00078	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 Mahara Atsushi, Kitai Marina, Masunaga Hiroyasu, Hikima Takaaki, Ohya Yuichi, Sasaki Sono, Sakurai Shinichi, Yamaoka Tetsuji	4. 巻 108
2. 論文標題 Modification of decellularized vascular xenografts with 8 arm polyethylene glycol suppresses macrophage infiltration but maintains graft degradability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 2005 ~ 2014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36960	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 Liu Yihua, Munisso Maria Chiara, Mahara Atsushi, Kambe Yusuke, Yamaoka Tetsuji	4. 巻 193
2. 論文標題 Anti-platelet adhesion and in situ capture of circulating endothelial progenitor cells on ePTFE surface modified with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) and hemocompatible peptide 1 (HCP-1)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111113 ~ 111113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2020.111113	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 Mahara Atsushi, Li Minglun, Ohya Yuichi, Yamaoka Tetsuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Small-Diameter Synthetic Vascular Graft Immobilized with the REDV Peptide Reduces Early-Stage Fibrin Clot Deposition and Results in Graft Patency in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 3092 ~ 3101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.0c00457	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 Liu Yihua, Mahara Atsushi, Kambe Yusuke, Hsu Yu-I., Yamaoka Tetsuji	4. 巻 9
2. 論文標題 Endothelial cell adhesion and blood response to hemocompatible peptide 1 (HCP-1), REDV, and RGD peptide sequences with free N-terminal amino groups immobilized on a biomedical expanded polytetrafluorethylene surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0bm01396j	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 A.Mahara,K.Kitagawa,A.Otaka,T.Nakaoki,K.Ishihara and T.Yamaoka,	4. 巻 129
2. 論文標題 Impact of REDV peptide density and its linker structure on the capture,movement, and adhesion of flowing endothelial progenitor cells in microfluidic devices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mater Sci Eng C Mater Biol Appl	6. 最初と最後の頁 112381-112391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112381	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 35.Hue Thi Le , A. Mahara, T. Nagasaki, T. Yamaoka	4. 巻 147
2. 論文標題 Prevention of anastomotic stenosis for decellularized vascular grafts using rapamycin-loaded boronic acid-based hydrogels mimicking the perivascular tissue function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomater Adv	6. 最初と最後の頁 213324-213336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioadv.2023.213324	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山岡哲二
2. 発表標題 小口径脱細胞化血管内空の内膜誘導能をePET血管へ搭載する戦略
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤 今日子
2. 発表標題 PTFE表面機能化を可能にするアルゴンプラズマ処理 / 光反応ハイブリッドプロセス
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岡哲二
2. 発表標題 Clinical application of ultrahigh hydrostatic pressure engineering
3. 学会等名 2022 Hawaii - Joint Symposium - SFB + JSB (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岡 哲二
2. 発表標題 ePTFE血管への内膜再生誘導性ペプチド固定化と評価
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岡 哲二、徐 于懿、山中 浩気、古島 健太郎、ムニツソ マリア、森本 尚樹、平野 義明、馬原 淳
2. 発表標題 脱細胞化小口径血管開存のために要求される内腔表面特性
3. 学会等名 第49回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 倫之、山岡 哲二
2. 発表標題 ペプチド修飾ePTFEと血球との相互作用解明
3. 学会等名 第49回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岡 哲二、徐 于懿、ムニツソ マリア、東 倫之、馬原 淳
2. 発表標題 血中循環細胞捕捉能を有する小口径脱細胞化血管の開存メカニズム解析
3. 学会等名 第63回 日本形成外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wei Zhang, kyoko Hukazawa, Atsushi Mahara, Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 A photoreactive peptide for improving surface antithrombosis and endothelialization of aPTFE grafts
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脱細胞化組織の製造方法及び脱細胞化組織	発明者 山岡哲二、馬原 淳、森本尚樹、山本 敬史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-187307	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	東 倫之 (Tomoyuki Azuma) (70846534)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動 研究員 (84404)	削除：2020年9月10日

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