

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09148

研究課題名(和文) DLCコーティングが血中エクソソームとHMGB1を介した異物反応に与える影響解析

研究課題名(英文) A comprehensive analysis for DLC-mediated molecular interaction through a secreting platelet-derived exosomes and HMGB1

研究代表者

辻 龍典 (Tsuji, Tatsunori)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10839004

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)：ヒト全血接触後に血漿中に遊離したplatelet factor4(PF4)、 $\alpha$ -トロンボグロブリン( $\alpha$ -TG)濃度にはDLCによる有意な変化は見られなかった。SDS-PAGEにて、カルボキシル基付加DLCは通常のDLCより、ほぼすべてのヒト全血内タンパクの付着が上昇していた。Ratの腎動脈下腹部大動脈全置換術を施行し、エクソソーム解析を試みたが、全ラットに両側後肢の対麻痺が出てラットでは1対も脊髄動脈をつぶすことができないことが判明した。対麻痺を避けると置換範囲はわずか8mmほどの長さになり、人工血管の違いによる差を得ることが極めて困難で動物モデル作成が不可能であった。ウサギでも同様であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、血小板活性因子はDLCの有無で、ePTFEに対し変化はないことが分かった。また、カルボキシル基付きDLCは血漿タンパク付着が著しく通常のDLCに比べて上昇している事が判明した。主目的のエクソソーム解析であるが、予期せぬ対麻痺でラット・ウサギでの動物モデル作成が困難であった。ある程度の人工血管置の長さがないと差を得ることが困難であることは容易に予想され、問題の解決ができなかった。コーティングの生体内での血液暴露への反応に関する機能解析方法確立が本研究の大きな目的の一つであったが、十分なコーティング量を血液にIn-Vivoで暴露させるにはこれまでにない工夫が必要であると思われた。

研究成果の概要(英文)：After contact with human whole blood, no significant changes were observed in the levels of platelet factor 4 (PF4) and  $\alpha$ -thromboglobulin ( $\alpha$ -TG) in the plasma upon DLC treatment. SDS-PAGE analysis revealed that carboxyl-functionalized DLC exhibited a higher level of protein adhesion from almost all human whole blood proteins compared to regular DLC. In an attempt to perform exosome analysis, a bilateral hind limb paralysis occurred in all rats undergoing rat renal artery infrarenal abdominal aortic replacement surgery, making it impossible to occlude any spinal artery in rats. Avoiding paralysis resulted in a replacement length of only about 8mm, making it extremely challenging to obtain differences based on artificial blood vessel variations and rendering animal model creation impossible. A similar outcome was observed in rabbits.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：Diamond-like Carbon コーティング 人工血管 機能解析 血小板活性因子 プロテオーム解析 エクソソーム解析

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血管外科では、様々な血管の再建手術を行う。狭窄、閉塞した血管の再建には人工血管や大伏在静脈等の自己静脈を用いる。大動脈や径が 6mm 以上の比較的大きな動脈再建にはダクロンや延伸ポリテトラフルオロエチレン(expanded polytetrafluoroethylene: ePTFE)素材の人工血管を用い、良好な成績を得ているが、径が 6mm より小さい人工血管では極端に開存率が落ちる問題がある。

血管内長期留置型カテーテルは医療の様々な場面で使用されているが、感染と血栓形成が大きな問題であり、時に敗血症や血栓塞栓症等の重篤な合併症を引き起こす。カテーテルの抗感染性と抗血栓性の向上は医療の質向上の為に非常に重要な課題であると認識されている。

DLC は黒鉛の間の構造を持つカーボンコーティング素材である。非常に強靱、半永久的耐性、生体適合性が良くアレルギーを起こさない等、医療応用に有用と思われる性能を持つ。しかし、従来金属用であり、柔らかい有機材料にコーティングできない(コーティング中に高熱になる)、靱性が無く割れやすい、管腔状物質等複雑な形態のものにコーティングできないという欠点があり、医療への応用は進んでいなかった。当研究室では DLC の医療応用研究を行っており、低温 DLC コーティング技術、高い靱性を有した DLC コーティング技術、管腔内への DLC コーティング技術を開発した。特に、管腔内コーティングは世界初の成功例であり、本技術について国内外の特許を取得・申請し(第 6506787 号、特願 2018-165849、PCT/JP 2018/8442 等)、論文発表も行った(Nakatani et al., J. Photopolym. Sci. Technol., Vol. 31, No. 3, 2018)。これにより、カテーテル内面や人工血管内面などの管腔状医療機器内面へのコーティングが可能となった。

医療材料、特に血管内に留置する人工血管やカテーテル等には高度な血液適合性が要求される。現在、ガイドラインには溶血性試験以外の血液適合性に関しては明確な試験方法の記載がなく、概ね血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の 5 つの試験項目について、資料に応じて適宜試験系が選択される(Biological Evaluation of Medical Devices Part 4 Selection of Tests for Interactions with Blood: ISO 10993-4)。現在、国立医薬品食品衛生研究所などが新たな簡易生体適合性評価法の確立に向けて研究を行っており、医療材料接触時の細胞挙動を解析する手法(遺伝子・タンパク質網羅的解析など)を提案している(日本化学会第 96 春季年会 2016、齋島由二、医療機器の実用化促進を支援する施策と生体適合性評価の基本的考え方)。今後も新規医療材料開発の迅速化、動物試験の削減化を目指す研究は、ますます重要になるとと思われる。人工血管のような医療材料に対するコーティングへの生体反応を詳細に解析できるモデルの確立が望まれている。

### 2. 研究の目的

以下のリサーチクエスチョンを解決したい。

- 管腔材料への DLC コーティングは血小板活性や溶血にどのように影響するか？
- 人工血管に施した DLC コーティングを血液に暴露させて、血小板由来 exosomes 組成変化、HMGB-1(近年注目されている炎症関連の重要なバイオマーカーの一つ)増減はどのようなものか？

### 3. 研究の方法

(全血での接触試験)

- 溶血試験: 健常者からの全血(ヘパリン 2U/mL 含む)と基材(6cm<sup>2</sup>/mL 血液)を 37℃、2 時間、振とう培養(60rpm)後、PBS にて血液を 7:1 に希釈。穏やかに転倒混和、遠心後に上清を分離。PBS で希釈し 576、540nm の吸光度を測定。
- 血小板活性: 健常者からの全血(ヘパリン 2U/mL 含む)と基材(6cm<sup>2</sup>/mL 血液)を 37℃、2 時間、振とう培養(60rpm)後、CTAD(citrate theophylline adenosine dipyridamole: 血小板刺激抑制)処理後、ELISA により -TG( -トロンボグロブリン: 血小板放出因子)( -TG 測定キット、日研ザイル株式会社)、PF4(platelet factor 4: 血小板第 4 因子)( PF4 測定キット、日研ザイル株式会社)を測定。

(ラットを用いた vivo 試験 (DLC 管腔材料を埋め込んだ際の反応))

ラット腹部大動脈を 2mm の ePTFE 人工血管(DLC 有り無し)で置換する(Filipe, E.C. et al. J Am Coll Cardiol Basic Trans Science. 2018; 3(1): 38-53.)。DLC-ePTFE(n=18)、non-DLC-ePTFE(n=18)で、各群とも 3 日、4 週、12 週で 6 匹ずつ採血後に人工血管を摘出し、ホルマリン固定後に人工血管の内腔面を観察する。採血検体から血漿中タンパク測定・exosomes 抽出、埋植後の人工血管内面の組織学的検証を行う。

(血漿中 HMGB-1 測定)

EDTA 採血から血漿分離、ELISA 法にて HMGB-1 測定。また、血漿中の血小板および exosomes を

単離し、フローサイトメトリーにて HMGB-1 陽性率の定量。

(埋植後の人工血管観察)

ホルマリン固定後にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、内腔面の観察・開存率を判定する(4週、12週それぞれ)。人工血管表面の好中球活性化(オートファジー)評価に専用キットを用いてイメージング解析する(Cyto-ID® オートファジー検出キット、コスモバイオ)。HMGB-1の局在を免疫染色にて観察(HMGB-1 antibody, Funakoshi)。電子顕微鏡にて内腔面の血小板、マクロファージ、好中球を観察する。さらに、血管内皮細胞の生着・観察にCD31、vWF、内皮障害の指標としてE-selectinの免疫染色を行う。

(電子顕微鏡による内腔観察)

DLC、non-DLC 両群とも、各ポイントで n=2 ずつを電子顕微鏡観察用に供する。人工血管摘出後、2%グルタルアルデヒドにて前固定、オスミウム酸で後固定を行い走査型電子顕微鏡(SEM)にて内腔構造を観察する。主に、付着細胞の形状(血小板やマクロファージの形態変化)に着目する。

#### 4. 研究成果

ePTFE、シリコン、ポリエチレン、ポリウレタン、塩化ビニル、5つの基材で溶血試験を行ったが、有意差は得られなかった。

ヒト全血接触試験で、血小板活性化因子-TG(α-TG(β-トロンボグロブリン: 血小板放出因子)とPF4(platelet factor 4: 血小板第4因子)の分泌量に有意な変化は認められなかった。

Ratの腎動脈下腹部大動脈全置換術を施行し、エクソーム解析を試みたが、全ラットに両側後肢の対麻痺が出てラットでは1対も脊髄動脈をつぶすことができないことが判明した。対麻痺を避けると置換範囲はわずか8mmほどの長さになり、人工血管の違いによる差を得ることが極めて困難で動物モデル作成が不可能であった。ウサギでも同様であった。ある程度の人工血管置の長さがないと差を得ることが困難であることは容易に予想され、問題の解決ができなかった。コーティングの生体内での血液暴露への反応に関する機能解析方法確立が本研究の大きな目的の一つであったが、十分なコーティング量を血液にIn-Vivoで暴露させるにはこれまでにない工夫が必要であると思われた。

溶血試験と血小板活性化因子の測定はこれまで我々が施行してきたDLCの血液適合性試験に追加されるDataであり、DLCの安全性を示す結果の一つとして重要であると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 中谷達行, 逢坂大樹	4. 巻 675
2. 論文標題 特集「表面処理とトライボコーティングの最近の動向」医療分野に貢献する日本医用DLC 研究会の設立と今後の展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 潤滑経済	6. 最初と最後の頁 17-21
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 無
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 中谷達行, 藤井泰宏	4. 巻 37
2. 論文標題 交流高電圧バーストプラズマ CVD 法による人工血管内壁への生体適合性 DLCコーティング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NEW DIAMOND 第140号	6. 最初と最後の頁 25-30
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 無
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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuichi Imai, Tatsuyuki Nakatani, Kazuhiro Kanda, Shinsuke Kunitsugu, Yasuhiro Fujii, Daiki Ousaka, Susumu Ouzawa, Tomio Uchi
2. 発表標題 Biomimetic Diamond-like Carbon Coating on a Lumen of Small-diameter Long-sized Tube Functionalized by Oxygen Plasma Treatment
3. 学会等名 Material Research Meeting 2021 (MRM2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Fujii; Takashi Goyama; Genya Muraoka; Daiki Ousaka; Yuichi Imai; Susumu Oozawa; Yasushi Sasai; Tatsuyuki Nakatani
2. 発表標題 Application of Diamond-Like-Carbon (DLC) for the Medical Fields; New Technologies and Potential for Innovation
3. 学会等名 THERMEC 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田憲明
2. 発表標題 DLC人工血管のAntimicrobial test
3. 学会等名 日本医用DLC研究会第3回総会・研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuyuki Nakatani, Yuichi Ima, Yasuhiro Fujii, Daiki Ousaka and Susumu Oozawa
2. 発表標題 Present trends and future prospects for medical applications of diamond-like carbon
3. 学会等名 第36回プラズマプロセッシング研究会 (SPP-39) 第31回プラズマ材料科学シンポジウム (SPSM-34)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 龍典
2. 発表標題 DLC人工血管を用いたラット腹部大動脈置換術
3. 学会等名 第二回医用DLC研究会
4. 発表年 2021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	大澤 晋  (Oozawa Susumu)  (20643414)	岡山大学・大学病院・講師    (15301)	

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	藤井 泰宏  (Fuji i Yasuhiro)  (40534673)	岡山大学・大学病院・客員研究員    (15301)	
研究分担者	中谷 達行  (Nakatani Tatsuyuki)  (50520920)	岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・教授    (35302)	
研究分担者	逢坂 大樹  (Ousaka Daiki)  (70839141)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	

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