

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12643

研究課題名（和文）脂肪組織由来の間質血管細胞群を用いた静脈用シルクフィブロイン人工血管の開発

研究課題名（英文）Development of venous silk fibroin artificial vascular grafts using adipose cell-derived stromal vascular fraction

研究代表者

田中 隆志（TANAKA, TAKASHI）

東京農工大学・農学部・産学官連携研究員

研究者番号：00868200

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）：本研究において、シルクフィブロイン製人工血管は静脈に使用しても、移植後に自己組織にリモデリングする能力の高い人工血管であるということが判明した。自己血管へのリモデリングが進めば感染にも強くなるため、肝胆膵領域における人工血管としては有用であることが考えられた。

また、間質血管細胞群の最適な採取部位を評価することを目的とし、腹部皮下脂肪、肝鎌状間膜および卵巢周囲脂肪を採取した。卵巢周囲脂肪には他の部位に比べてより多くの間質血管細胞が含まれていて、活性が高い事が示された。このことから、実際の人工血管の移植を行うにあたり、より最適な部位から間質血管細胞を採取することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝がんおよび膵癌などが静脈に浸潤している症例では血管の切除および再建が必要となるケースは多く、その再建には自家静脈や凍結保存静脈が用いられてきたが、代替血管の確保に苦慮している。人工血管は事前の準備を必要とせず使用できるが、感染や石灰化のリスクが高いため使用が敬遠されている。本研究で作製したシルクフィブロイン人工血管は静脈へ移植後に石灰化を起こすことはなかった。また、移植後に自己血管へとリモデリングする能力を発揮したことから感染に強い人工血管であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was proved that the artificial vascular grafts made of silk fibroin has a high ability to remodel to self-tissue after implantation for a vein. As remodeling to autologous vessels progresses, they become more resistant to infection, so it was thought that they would be useful as artificial vascular grafts in the hepato-biliary-pancreatic region.

In addition, we collected subcutaneous abdominal fat, liver falciform ligament and peri-ovarian fat for the purpose of evaluating the optimal collection site for the stromal vascular fraction. Peri-ovarian fat contained more stromal vascular fraction than other sites, suggesting higher activity. From this result, it is possible to collect stromal vascular fraction from a more optimal site for the actual implantation of artificial vascular grafts.

研究分野：人工血管

キーワード：間質血管細胞群 シルクフィブロイン 人工血管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国内におけるがん罹患率は年々増加し、今や3人に1人はがんで死亡する時代になった。中でも、胆嚢・膵臓・肝臓のがんは50代以降の中高齢に好発し、治療の第1選択肢は早期の完全切除である。ところが、これらの部位におけるがんは単純な切除術で終わらないことが多く、容易に下大静脈、肝静脈、門脈、上腸間膜静脈などに浸潤する。そのため、外科的に完全切除を目指すために、その静脈の合併切除および再建が不可欠となる。現在の肝胆膵外科領域における血管再建方法として報告されている術式として、自家静脈、凍結保存静脈、人工血管などによる置換が行われている。患者自身の血管を採材する自家血管は安全性および開存性については優れているが、血管サイズの不一致や摘出のための侵襲が増える問題点がある。凍結保存静脈はドナーの確保や保存コストが高いため一部の限られた施設でしか実施されていない。また、人工血管においては市販されているものを用いても、術後に石灰化や感染を誘発し、選択肢に上がりにくいのが現状である。そのため、肝胆膵外科手術において利用可能な人工血管が開発されれば、置換するための血管の確保に苦慮することなく、より多くの症例に対して完全切除が可能になる。

### 2. 研究の目的

(1) 市販されている人工血管では血管内皮細胞の被覆遅延に伴う血栓形成、コンプライアンスのミスマッチによる内膜肥厚など閉塞の原因となるリスクが多く存在している。一方、シルクファイブリン (silk fibroin :SF) 製人工血管は市販されている人工血管と比べて、移植後長期の開損性を示し、さらにSFが分解されて自己組織に置換されることが期待されている。これまでに研究されてきた人工血管は動脈に用いる目的で作製されているため、強度および高弾性が求められていたが、静脈用の人工血管はこれまでに研究されておらず、求められる性能が異なるため、人工血管の静脈への最適化が必要になる。

(2) また本研究では脂肪組織から脂肪細胞を除いた間質血管細胞群 (stromal vascular fraction :SVF) の潜在能力を活用する。これらはもともと血管の周囲に局在していることが指摘されており、血管内皮細胞への分化能を有しているとされている。実用化に向けて足場材料としてSF製人工血管を用い、これにSVFを併用することで、そのリモデリング能力を向上させることが可能であるか、そのSVFの最適な適用方法も含めて検討していく。

### 3. 研究の方法

#### (1) SVF 調整方法の確立

脂肪組織内には多くの脂肪前駆細胞が含まれているが、手術中に調整が可能であれば、緊急医療にも対応できるためより実践的な手法となる。人医療では皮下脂肪の利用が一般的であるが、肝臓手術などでは腹腔内脂肪の術中利用も可能であり、腹腔内脂肪の成分は皮下脂肪よりも再生医療に向いているとの報告もある。そのため、すでに報告されている方法も含め、脂肪採取部位 (皮下、腹腔内) や採取量も含めて簡便かつ効率的な手法を確立する。

#### (2) SF 製人工血管の移植実験

生体内への移植後の人工血管がどのような挙動をとるのかは、血管組織再生に非常に重要な役割を果たす。人工血管をラットの腹部血管に移植し、1ヶ月経過した後に人工血管を取り出し病理組織評価を行う。また、イヌの腹部血管にも同様に移植し大型実験動物での生体内評価を行う。

### 4. 研究成果

(1) 現状では静脈用が開発された人工血管は存在しておらず、本研究で使用するSF製人工血管

が静脈置換する人工血管に適しているのか、既存の動脈用の人工血管との比較を行なった。SF製人工血管は移植4週間後に血管内皮細胞が人工血管の内側を中皮細胞が人工血管の外側を覆っている事が観察された(図1)。このことから、SF製人工血管は移植後に自己組織にリモデリングする能力の高い人工血管であるということが判明した。リモデリングが進めば感染にも強くなるため、肝胆膵領域における人工血管としては有用であることが考えられた。

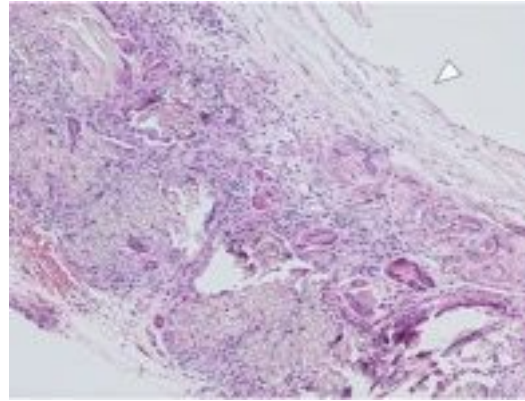


図1 移植4週間後のSF製人工血管  
人工血管の内腔に血管内皮細胞が確認された

(2) 犬のSVFの最適な採取部位を評価することを目的とし、腹部皮下脂肪、肝鎌状間膜および卵巣周囲脂肪を採取した。卵巣周囲脂肪には他の部位に比べてより多くのSVFが含まれていて活性が高い事が示された。このことから、実際の人工血管の移植を行うにあたり、より最適な部位からSVFを採取することが可能となった。

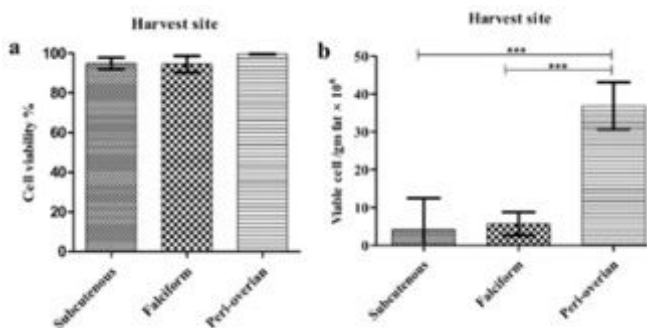


図2 採取部位における間質血管細胞群の細胞生存率

卵巣周囲脂肪から採取された間質血管細胞の量が多く、脂肪あたりの細胞生存率が最も高かった

(3) SF製人工血管を作製するにあたって移植時の血液の漏出を防ぐ目的でコーティング処理が施されるが、SFでコーティングを行った場合に硬く分解されにくくなるという問題点があった。そこでSFにポリウレタンを混合させることでより柔軟なコーティング方法の開発を行った。従来のポリウレタンでは生分解性ではないため、SFと混合させても生体内で残存してしまうが、本研究で用いたポリウレタンは生分解性を有しており、SFと共に生体内で分解され、自己組織へのリモデリングを妨害することなく、高い開存性にも寄与した。このことから生分解性のポリウレタン混合SFコーティングが人工血管のコーティングとして有用である可能性が示唆された。



図3 ポリウレタン混合シルクフィブロイン人工血管の顕微鏡写真  
移植後に自己組織へのリモデリングが確認された

(4)これまでラットでの移植実験においては良好な開存結果が得られていたが、イヌの腹部静脈へ SF 製人工血管を移植した際に人工血管が閉塞する問題点があった。人工血管の直径が大きくなった際に、腹圧などの外的要因が生じると人工血管が潰れてしまうことが原因と考えられた。そこで、従来は SF コーティングを用いてきたが、強度を増すためにエラスチンでコーティングを行った。エラスチンでコーティングを行うと基盤の隙間にコーティング材が入り込むことにより強固なコーティングが可能となった。また、エラスチンの成分によってリモデリングの促進、血管内皮細胞の付着促進および血小板の付着の抑制などの効果が示された。これらの結果から、静脈用のシルクフィブロイン製人工血管においてエラスチンは優れたコーティング材であることが示された。

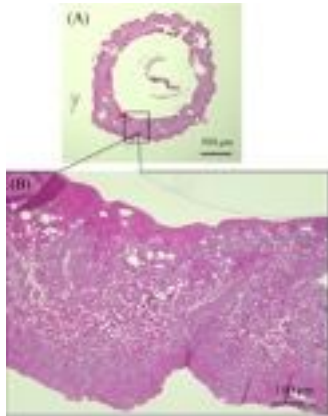


図4 ヘマトキシリン・エオジン染色した移植前のエラスチンコーティング人工血管

ダブルラッセル編みの SF 線維の隙間をスポンジ状のエラスチンが入り込んでいるのが確認された

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tanaka T, Tanaka R, Ogawa Y, Takagi Y, Sata M, Asakura T	4. 巻 6
2. 論文標題 Evaluation of small-diameter silk vascular grafts implanted in dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JTCVS Open	6. 最初と最後の頁 148-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjon.2021.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Ibe Y, Jono T, Tanaka R, Naito A, Asakura T	4. 巻 26
2. 論文標題 Characterization of a Water-Dispersed Biodegradable Polyurethane-Silk Composite Sponge Using <sup>13</sup> C Solid-State Nuclear Magnetic Resonance as Coating Material for Silk Vascular Grafts with Small Diameters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26154649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Tanaka R	4. 巻 9
2. 論文標題 Small-Diameter Artificial Vascular Grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Medicine & Surgery	6. 最初と最後の頁 427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35248/2329-6925.21.9.427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiritani S, Kaneko J, Ito D, Morito M, Ishizawa T, Akamatsu N, Tanaka M, Iida T, Tanaka T, Tanaka R, Asakura T, Arita J, Hasegawa K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Silk fibroin vascular graft: a promising tissue-engineered scaffold material for abdominal venous system replacement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78020-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hanan Hendawy, Akiko Uemura, Danfu Ma, Ryosuke Namiki, Haney Samir, Mahmoud F Ahmed, Ahmed Elfadadny, Hussein M El-Husseiny, Cheng Chieh-Jen, Ryou Tanaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Tissue Harvesting Site Effect on the Canine Adipose Stromal Vascular Fraction Quantity and Quality	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani11020460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Abe Y, Cheng CJ, Tanaka R, Naito A, Asakura T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of Small-Diameter Elastin-Silk Fibroin Vascular Grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 622220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.622220.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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	中澤 靖元 (Nakazawa Yasumoto)  (20456255)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授  (12605)	
研究分担者	朝倉 哲郎 (Asakura Tetsuo)  (30139208)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・名誉教授  (12605)	
研究分担者	田中 綾 (Tanaka Ryo)  (70334480)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授  (12605)	

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