

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0200

研究課題名（和文）生体吸収性の小口径代用血管の開発

研究課題名（英文）Development of Biodegradable Small Diameter Vascular Graft

研究代表者

小山 恭平（Oyama, Kyohei）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00818479

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：冠動脈バイパス術のような細径血管の再建術では、臨床使用に耐えうる人工血管が存在しないため、その開発が期待されている。本研究では、生体吸収性のナノファイバーを利用し、移植後に自家血管へと置き換わる小口径人工血管の作成を目指した。ポリカプロラクトン(PCL)ナノファイバーの人工血管(PCLグラフト)を作成し、血小板吸着を抑制するコーティングや機能分子の修飾方法を開発した。PCLグラフトが長期に開閉し自家血管様に組織に再生することを動物実験で証明し、その機能性が病態下では著しく低下し治療によってグラフト機能が維持されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の医療では冠動脈バイパス術のような細径血管の再建術に、患者本人から採取した自家血管が利用される。そのため治療部位以外への侵襲を必要とする他、利用できる血管がない場合は治療そのものを行うことが困難となる。吸収性の小口径人工血管が開発されれば体内に異物を残さず治療が行えるようになるため、上記の問題に加えて感染やコンプライアンスミスマッチなど人工血管に付随した多くの問題解決に繋がる。本研究では、生体吸収性人工血管を作成するための新たな技術を確立し、その有用性と臨床応用へ向けて克服すべき課題を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：There are currently no artificial vessels available for small-diameter vascular reconstruction surgery, such as coronary artery bypass surgery. Therefore, this study aimed to create small-diameter artificial vessel grafts using biodegradable nanofibers that would replace autologous vessels after transplantation. We developed polycaprolactone (PCL) nanofiber artificial vessels (PCL grafts) and established methods to add hydrophobic coating and functional molecule modifications to inhibit platelet adhesion. Additionally, animal experiments demonstrated that the PCL grafts remain patent for long term (over 1 year) and regenerate into autologous vessel-like tissue. Furthermore, we found that the functionality of the PCL grafts significantly decreases under pathological conditions, but treatment can maintain graft function.

研究分野：小口径人工血管の開発

キーワード：ナノファイバー 小口径人工血管 PCL 自家組織再生 血行再建

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本では高齢化と食生活の欧米化に伴い、虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患が年々増加しており、重症例では冠動脈バイパス術などの外科的血行再建術が必要となる。血行再建に利用される代用血管の中で、6 mm以上の口径を有する物はすでに化学繊維を用いた人工血管が製品化されており、その臨床成績も良好である。一方で、5 mm未満の小口径代用血管、特に冠動脈バイパス術に通常使用されるような3 mm以下の小口径代用血管の場合、化学繊維を用いた人工血管は短期開存すら難しく、自家血管グラフトが使用される。しかしながら、自家血管は、その採取も侵襲的で使用可能な長さにも限りがある上に、全身性に動脈硬化が進行した患者では、血管の品質が不良でグラフトとしての使用に適さない場合も多い。その場合は、手術そのものが不可能になってしまうケースもあるため、自家血管に代わる安定供給可能な小口径代用血管の開発は、心臓血管外科学全体における最重要課題である。

(2) 現在、大口径の人工血管に使われているテフロンやダクロンは、弾力性や進展性などの物理的特徴が大血管に近いので、大血管環境において高いコンプライアンスを示す。しかし、小口径血管の環境下では血行動態力学が異なるほか、血管自体の物理的特徴も異なるために、テフロンやダクロンといった素材の血管グラフトを使用した場合、周辺血管に対するコンプライアンスが一致せず吻合部狭窄や血栓性閉塞が生じるため開存性が得られない。また、テフロンやダクロン製のグラフト表面には内皮細胞化がほとんど起こらないことが分かっており、血栓形成が閉塞へ直結する小口径血管においては、開存性を低下させる原因になる。小口径代用血管を創出するためには、これらすべての問題を解決する、①高い抗血栓性と、②内皮細胞化を促進する生体適合性、そして、③小口径血管環境に適応したコンプライアンスのすべてを兼ね備えたスキヤフォールドの開発が必須である。

(3) ポリカプロラクトン(PCL)は合成が容易で安価な生体分解性ポリマーであり、その高い生体適合性から薬物送達システムや歯科インプラントへの応用が期待されている。共同研究者のPranke教授らは、エレクトロスピンニング法で作成したPCLスキヤフォールドが、血管内皮前駆細胞と間葉系幹細胞の生着と分裂を促進することを明らかにし、血管組織の再生も誘導できる可能性を示唆した。

(4) 生体分解性のバイオマテリアルとして、PCLの他に、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリグリセロールセバシン酸(PGS)、コラーゲン、エラスチン、キトサン、シルクなど、異なる物理的性質と生物学的半減期を示す合成および天然のポリマーが多数開発されており、組織再生を誘導するスキヤフォールドとしての研究が組織工学分野で進んでいる。これらの素材を組み合わせることで、小口径血管環境に適応したコンプライアンスを維持しつつ、組織再生を促進するのに十分な生体分解性が得られるようにスキヤフォールドの最適化を行えば、理想的な小口径代用血管を作成できると考えられる。

2. 研究の目的

自家血管に頼ることなく安定した血行再建術を提供できるように、自家組織へと再生する生体分解性の小口径代用血管の創出を目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 分解性ナノファイバー人工血管の作成方法

エレクトロスピニング法を用いて分解性ナノファイバーシートを作成した。ナノファイバーシートを 20mm 幅に裁断した後、直径 1-3mm の軸に巻き付け実験モデルに応じた内径のナノファイバー人工血管(ナノファイバークラフト)を作成した(図 1、図 2)。実験に応じて、親水性ポリマーのポリビニルアルコール(PVA)を内腔側から流し込み、ナノファイバークラフトをコーティングした。ナノファイバークラフトの微細構造は電子顕微鏡で観察し、物理的性質は Kawabata evaluation system で評価した。

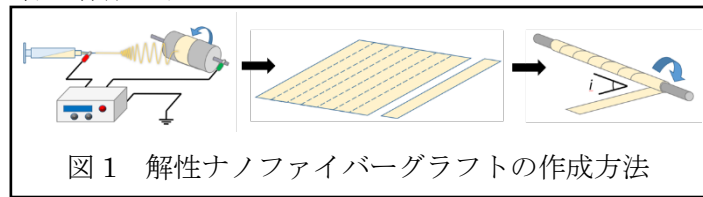


図 1 解性ナノファイバークラフトの作成方法

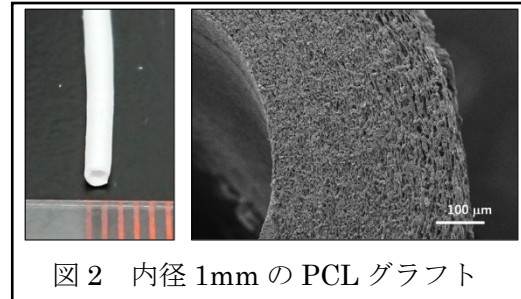


図 2 内径 1mm の PCL グラフト

(2) in vivo 機能評価モデルと組織再生の観察

ナノファイバークラフトをラットの腹大動脈、またはブタ冠動脈に移植してグラフト機能を in vivo 評価した。摘出したグラフトを病理染色や免疫染色し、組織再生とグラフトの劣化を評価した。内皮細胞を抗 CD31 抗体で、平滑筋細胞を抗 α -Smooth muscle 抗体で染色し、新生内膜の再生を判断した。ナノファイバースキャフォールドの分解は、Size-exclusion chromatography (SEC) と電子顕微鏡観察で評価した。

4. 研究成果

(1) PCL グラフトに対する PVA コーティングの効果

PCL など多くの生体吸収性ナノファイバーは、疎水性が高く血小板などの血液成分を吸着しやすい。これは血栓閉塞の原因となるため、親水性ポリマーの PVA をコーティングし親水性を付加した PCL グラフト(PVA-PCL グラフト)を開発した。PVA-PCL グラフトでは PCL 単独と比較して優位な水接触角の低下が認められた。また、ヒト濃縮血小板に接触させ電子顕微鏡観察すると、PVA-PCL グラフトでは吸着された血小板数が優位に減少した(図 3A)。PVA-PCL グラフトをラット腹部下降大動脈に移植すると、2 週間以内にグラフトの吻合部付近から新生内膜の生着が観察され始め、8 週間以内に長さ 1cm の PVA-PCL グラフト全長が新生内膜で覆われ自家血管様に再生した(図 3B)。PVA-PCL グラフトは、ラットのモデルにおいて 1 年以上の開存性を示すことを明らかにした。

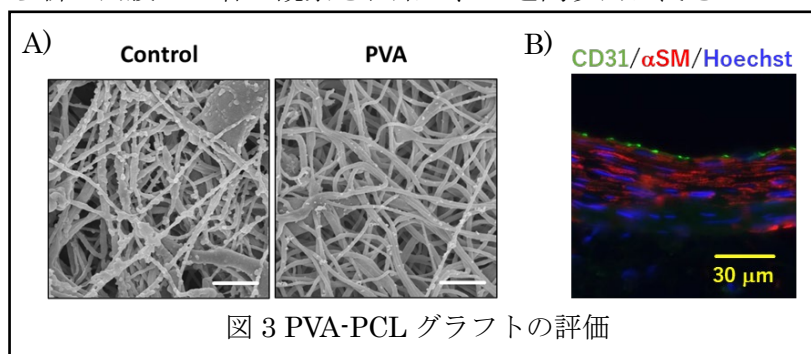


図 3 PVA-PCL グラフトの評価

(2) PCL グラフト機能に対する病態の影響

実臨床で冠動脈バイパス術や下肢動脈バイパス術のような小口径血管の再建術を受ける患者の多くは、糖尿病や動脈硬化症などの基礎疾患を持っていることが殆どである。そのため、病態が生体分解性ナノファイバー人工血管の機能に与える影響を理解するこ

とが、臨床応用へ向けて必要である。本研究では、ストレプトゾトシン(STZ)を用いて糖尿病ラットモデルを作成し、糖尿病が PCL グラフト機能に与える影響を検討した。健康なコントロールラットにおいて PCL グラフトの 2 週間開存率は約 75%であったが、糖尿病ラットでは全例血栓閉塞していた(図 4)。糖尿病ラットにおいて閉塞したグラフトでは炎症細胞の浸潤と細菌塊が認められ、炎症と感染がグラフト機能の低下に関与していると考えられる。このような PCL グラフト機能の低下は、インスリン治療で血糖値をコントロールすることにより抑制され、インスリン治療を行った糖尿病群では 2 週間開存率が 100%となった。また、健康なコントロール群と同様に、2 週間時点において内膜の再生が観察された(図 5)。このように、糖尿病は PCL グラフト機能を著しく低下させるが、治療で病態をコントロールすることで、グラフト機能を維持できることを明らかにした。

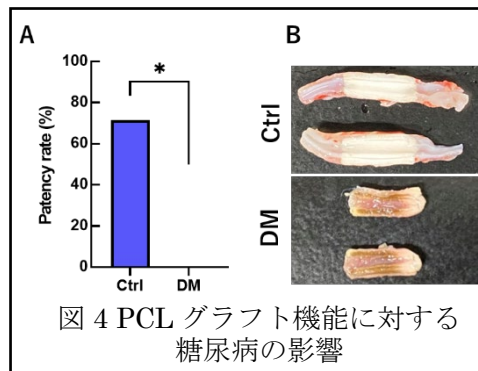


図 4 PCL グラフト機能に対する糖尿病の影響



図 5 PCL グラフト機能低下に対するインスリン治療の効果

このように、糖尿病は PCL グラフト機能を著しく低下させるが、治療で病態をコントロールすることで、グラフト機能を維持できることを明らかにした。

(3) ブタ冠動脈バイパスモデルでの PCL グラフト機能評価

内径 3mm の PVA-PCL グラフトを作成し、ブタ冠動脈バイパス (CABG) モデルでそのハンドリング性能と機能性を評価した。PVA-PCL グラフトを中枢側から吻合し、末梢への良好なフローを確認した後に冠動脈へ吻合した。その後、Native の冠動脈を結紮した。PVA-PCL グラフトは吻合や血圧に耐える十分な強度を有しており、問題なくバイパスを確立出来た。バイパス確立直後、心臓の動きは良好であったが、2 時間後には徐々に ST 上昇を認め 4 時間後には心停止したため、グラフトを採取したところ、血栓閉塞していた(図 5)。PVA-PCL グラフトは、ラット腹部下降大動脈移植モデルで長期開存が得られるが、ブタ CABG モデルでは短期に閉塞することが明らかとなった。この違いの原因は明らかではないが、CABG モデルで PCL グラフトの開存を得るためには強力な持続的な抗血栓機能の付加が必要である。

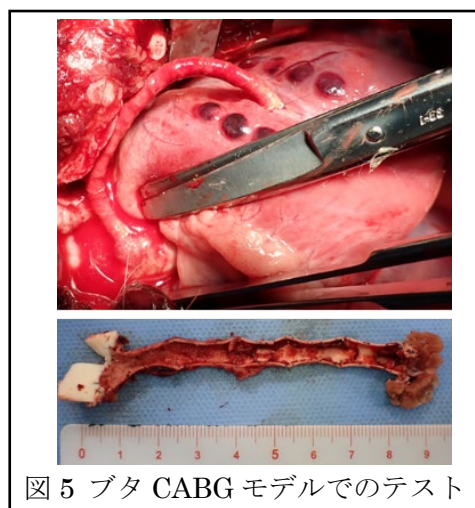


図 5 ブタ CABG モデルでのテスト

(4) 種々ナノファイバーの生体分解性評価

PCL、PLA、PCL/PLA のナノファイバーグラフトを作成し、ラット腹部下降大動脈環境での分解挙動を SEC で評価した。全てにおいて経時的な平均分子量の低下が認められた。PCL は 1 年後の平均分子量が約 75%であり、PLA と PCL/PLA は共に約 40%まで低下していた。これらの結果から、PCL より分解性の早い PLA を利用することで、移植後早期に自家血管へと置き換わる生体吸収性人工血管を作成できる可能性が示唆された。今後、分解性の促進が自家血管様再生にどのような影響を示すか確認する必要がある。

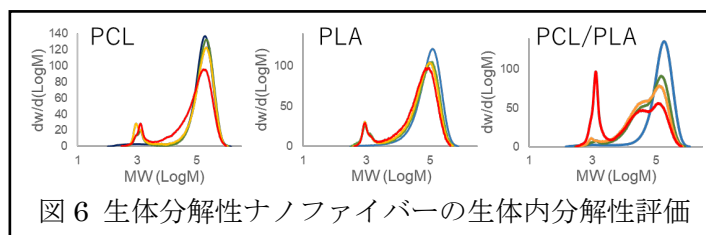


図 6 生体分解性ナノファイバーの生体内分解性評価

これらの結果から、PCL より分解性の早い PLA を利用することで、移植後早期に自家血管へと置き換わる生体吸収性人工血管を作成できる可能性が示唆された。今後、分解性の促進が自家血管様再生にどのような影響を示すか確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wakabayashi Naohiro, Yoshida Takumi, Oyama Kyohei, Naruse Daisuke, Tsutsui Masahiro, Kikuchi Yuta, Koga Daisuke, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Polyvinyl alcohol coating prevents platelet adsorption and improves mechanical property of polycaprolactone-based small-caliber vascular graft	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 946899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2022.946899	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 Kikuchi Yuta, Oyama Kyohei, Yoshida Takumi, Naruse Daisuke, Tsutsui Masahiro, Kunioka Shingo, Wakabayashi Naohiro, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Insulin therapy maintains the performance of PVA-coated PCL grafts in a diabetic rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 5208 ~ 5215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2bm00531j	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 Leal Bruna B. J., Wakabayashi Naohiro, Oyama Kyohei, Kamiya Hiroyuki, Braghirolli Daikelly I., Pranke Patricia	4. 巻 7
2. 論文標題 Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 592361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2020.592361	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 該当する
1. 著者名 Oyama Kyohei	4. 巻 2023
2. 論文標題 Development of Biodegradable Small Diameter Vascular Graft	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 36 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2023.2.36	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 紙谷寛之、小山恭平、筒井真博、國岡信吾、若林尚宏、広藤愛菜、吉田巧、成瀬大輔、竹吉大輔、甲賀大輔
2. 発表標題 Polycaprolactoneナノファイバー小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第60回 日本人工臓器学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 紙谷寛之、小山恭平、國岡信吾、菊池悠太、吉田巧、成瀬大輔、筒井真博、若林尚宏、甲賀大輔
2. 発表標題 分解性ナノファイバーを用いた小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第53回 日本心臓血管外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 筒井真博、小山恭平、菊池悠太、國岡信吾、広藤愛菜、吉田巧、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病ラットにおけるインスリン治療が生体分解性小口径人工血管与える影響の検討
3. 学会等名 第53回 日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 若林尚宏、小山恭平、筒井真博、菊池悠太、紙谷寛之
2. 発表標題 ポリカプロラクトン製小口径代用血管の親水加工
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池悠太、小山恭平、筒井真博、若林尚宏、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病ラットを用いた生体吸収性小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池悠太、小山恭平、筒井真博、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病病態下における生体分解性小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第34 回代用臓器・再生医学研究会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若林尚宏、小山恭平、菊池悠太、紙谷寛之
2. 発表標題 ラット移植モデルにおけるPCLグラフトの 長期開存性と血管新生メカニズム
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 小山恭平、若林尚宏、紙谷寛之
2. 発表標題 ポリカプロラクタン製小口径代用血管の親水化加工
3. 学会等名 第32 回 代用臓器・再生医学研究会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工血管及びその製造方法	発明者 吉田巧, 紙谷寛之, 小山恭平, 他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許2022-073752	出願年 2022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	紙谷 寛之 (Kamiya Hiroyuki) (30436836)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	
研究 分担者	若林 尚宏 (Wakabayashi Naohiro) (20827745)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究 分担者	菊池 悠太 (Kikuchi Yuta) (80882711)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	

	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 協力者	吉田 巧 (Yoshida Takumi) (80741751)	富山県産業技術研究開発センター・主任研究員	
研究 協力者	國岡 信吾 (Kunioka Shingo) (30882724)	旭川医科大学・医学部・助教	

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			
ブラジル	リオグランデ・ド・スル大学			