

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08812

研究課題名（和文）生体吸収性小口径代用血管の糖尿病モデルにおける機能評価と実用化基盤の構築

研究課題名（英文）Functional evaluation of bioabsorbable small-caliber vascular graft in a diabetic rat model to achieve a practical use

研究代表者

菊池 悠太（Kikuchi, Yuta）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80882711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、直径1mmのPVA-PCLグラフトの性能を糖尿病ラットモデルで評価した。その結果、糖尿病が移植された同グラフトの機能を低下させ、インスリンによる糖尿病治療がこの機能低下を回復させることが示唆された。様々な種類のナノファイバーを用いた小口径人工血管が開発され、その性能が健常動物モデルで試験されてきたが、我々の結果は、これらナノファイバーグラフトの性能が病態下で変化しうることを示唆している。本研究は臨床に応用可能な小口径人工血管の開発には、併存疾患をもつ患者やそれに関連する治療法を考慮し、より臨床症例を反映したモデルでの試験の重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下肢末梢血管や冠動脈のような小口径血管バイパス術において、自家血管が唯一のバイパスグラフトとなるが、患者背景により、その性状や長さに制限があり、長期開存可能な小口径人工血管の開発が期待されている。健常動物モデルにおいて多くの試験が行われ、一部で良好な成績が報告されているが、臨床において多くの患者が糖尿病のような併存疾患を有している。本研究は糖尿病および糖尿病治療が小口径人工血管に及ぼす影響について検討し、臨床応用に向けた、病態下および病態治療下における人工血管試験の重要性を再認識するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the performance of a PVA-PCL graft with a diameter of 1 mm in a DM rat model. We demonstrated that DM disrupted the function of the PVA-PCL graft and that NPH insulin treatment rescued this deterioration. Various nanofiber grafts have been developed and tested in healthy animal models. Our results indicated that the performance of these nanofiber grafts can alter in disease conditions. Therefore, it is important to clarify the mechanisms underlying how disease conditions change nanofiber vascular graft performance and develop strategies for overcoming these challenges. Thus, our study highlighted the importance of using a model that more closely reflects the cases encountered in clinical practice, considering patients with comorbidities and the related treatments, to the end of developing clinically applicable small-diameter vascular grafts.

研究分野：小口径人工血管

キーワード：Diabetes Pathological condition PCL graft Insulin treatment Endothelialization

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大伏在静脈やその他の末梢動脈などの自家血管は、冠動脈バイパス術や下肢末梢動脈バイパス術などの小口径バイパス術において唯一のバイパスグラフトである。しかし、自家血管は患者由来のものであるため、その性状や長さに制限がある。そのため、既製の小口径人工血管を作成するため様々な組織工学を応用した人工血管の開発が行われている。費用対効果、安定性、迅速供給という点から合成ポリマーは血管組織工学において最も広く研究されており、中でも生体適合性および分解性に優れたポリカプロラクトン (PCL) はその他素材とともに小口径人工血管に応用されている。しかし、PCL の疎水性は血小板凝集を活性化し、血栓形成およびグラフト閉塞に寄与する可能性がある。そのため、我々の研究グループは親水性ポリマーであるポリビニルアルコールでコーティングした PVA-PCL グラフトを開発し、健常ラットモデルでその有効性を実証した。しかし、上記バイパス術を受ける患者の多くが生活習慣病などの併存疾患を有しており、その治療を受けている場合が多くある。糖尿病は心血管疾患における最も一般的な合併症であり、バイパスグラフトを含む自家血管の劣化の主な原因である。そのため、開発された小口径人工血管は健常動物モデルとともに、実際の患者背景を反映した病態および病態治療モデルにおける試験も実用化基盤の構築に重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

ラットモデルを用いて、生活習慣病の代表である糖尿病およびそのインスリン治療が、PVA-PCL グラフトの性能に及ぼす影響を明らかにし、病態および病態治療下での人工血管試験の重要性を再認識することを目的とした。

3. 研究の方法

・グラフト作成

N,N-ジメチルホルムアミドとテトラヒドロフランに溶解した 10%ポリカプロラクトン溶液を用いて、以下の紡糸条件で PCL ナノファイバーシートを Electrospinning により作成した。印加電圧 20kV; チップコレクター距離 20cm; 流速 1.7 mL/hr; 紡糸速度 20rpm。得られたシートを幅 20mm に切断し、PTFE 軸に巻き付け、3 層シートを形成した。軸を取り除いた後、PCL グラフトをチューブ状のスカフォールドとして得た。さらに 33.3%(w/w)エタノールを含む PVA 溶液を調整し、PCL グラフトにゆっくりと浸漬させた。最後にグラフトを室温 (約 25 度) で一晩乾燥させた。

・糖尿病および糖尿病治療ラットモデルの確立

本研究で実施されたすべての動物実験は、旭川医科大学の IACUC により承認された (承認番号 20129-2, R3-087-02)。

本研究では、8 から 10 週齢の雄の Wistar ラットを使用した。糖尿病を誘発するために、膵β細胞を破壊するストレプトゾトシン (STZ: 65 mg/kg) をラットに尾静注した。1 週間後、ラットの血糖値を Lab Gluco を用いて測定し、その結果、血糖値が 300 mg/dL を超えたラットを糖尿病モデルとした。対照群のラットには PBS を尾静注した。

糖尿病ラット作成後、NPH インスリンを毎日皮下注射し、5 から 7 日後に血糖値 300mg/dL 以下のラットを糖尿病治療モデル (tDM) とした。糖尿病治療対照群 (cDM) には PBS が毎日皮下注射された。被験動物の体重と血糖値は実験期間中、毎日計測を行った。

・PVA-PCL グラフトの移植と採取

8 から 10 週齢の Wistar ラットを 5%イソフルランで麻酔導入し、小動物用麻酔器を用いて 2 から 3%イソフルランで維持した。その後、腹部正中切開によりラットの腹部大動脈周囲を剥離した。そして、左腎動脈分岐下腹部大動脈および大動脈分岐部でクランプし、大動脈を切離した。その間を内径 1mm、長さ 5mm ほどの PVA-PCL グラフトで 10-0 ポリプロピレン糸を用いて置換、縫合した。

グラフト採取時には、5%イソフルランを用いて全身麻酔導入を行い、グラフト吻合の遠位大動脈の半切開部位からの脈動性出血を観察することにより、グラフト開存性を判定した。PBS を心尖部から投与して洗浄を行ったのち、4% パラホルムアルデヒド (PFA) を心尖部より注射し、グラフトの固定を行った。

・組織学的分析

採取したグラフトは4% PFAで一晩固定し、その後PBSで洗浄した。次に、近位吻合血管と遠位吻合血管を含む長軸方向に2つに切断し、OCT コンパウンドに包埋し、-80度で保存した。凍結したサンプルは、-20度でクライオスタットを用いてスライスし(5 μ m)、組織学的解析のためにスライドガラスにマウントした。

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色は、グラフト内腔の組織構造と細胞被覆を評価するために行った。標本をPBSで5分間洗浄し、ヘマトキシリン溶液に4分間浸漬、その後流水で6分間洗浄した。次に1%エオジン溶液に2分間浸漬し、その後70%エタノールで3回洗浄した。最後に得られた標本をマリノール750でカプセル化して、観察した。

免疫蛍光染色(IF)ではEDTA bufferを用いて熱誘発エピトープ発現を行い、抗体反応前にウシ血清アルブミンを用いて検体をブロックした。1次抗体として、抗CD31(1:200, #AF3628; R&D Systems Minneapolis, MN, USA)および抗 α 平滑筋抗体(1:250, #56856; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を使用した。2次抗体として、Alexa Fluor 488 conjugated anti-goat IgGとAlexa Fluor 555 conjugated anti-mouse IgG(それぞれ#A-11055と#A-31570)を用いた。核染色にはHoechst 33342(FUJIFILM, 346-07951)を使用した。

その後、一体型蛍光顕微鏡(BZ-X810)を用いてHEおよびIF像を撮影した。IF画像を用いて、近位および遠位の両吻合部からのグラフト内腔の被覆長(CD31/ α SM陽性長)およびグラフト長をImageJを用いて測定し、ICR(内皮被覆率)を下記の公式により算出した。

$ICR(\%) = (\text{被覆内皮の長さ} / \text{グラフトの長さ}) \times 100$

・定量的PCR

ラット腹部大動脈からtotal RNAを得るため、採取した組織サンプルをTrizol試薬を用いて溶解・前洗浄し、NucleoSpin RNA kitを用いて、total RNAを精製した。この全RNAをReverTra Ace qPCR RT Master Mixを用いてcDNAに変換した。その後、THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix systemを用いて、全RNAの5ngに相当するcDNAをqPCRに用いた。さらに標的遺伝子の発現と細菌のS16 rRNA量を内部コントロールであるRplp0に対して正規化し、コントロールサンプルに対応する値に対する相対値として示した。

・統計分析

全ての統計解析はGraphPad Prism 9およびEZR version 1.54を用いて行った。

4. 研究成果

・健常ラットにおけるPVA-PCLグラフトの内皮化評価(図1)

我々が先に開発したPVA-PCLグラフトの健常ラットにおける性能を明らかにするため、全身麻酔下で健常ラットの腹部大動脈にグラフトを移植し、2週間後と6週間後にグラフトを回収して解析した。その結果、2週間後および6週間後の開存率は、それぞれ100%(7/7匹)および62.5%(5/8匹)であった。さらに、グラフトの内皮化を評価するために、開存症例のHE染色およびIFを行った。HE像では2週間後および6週間後ともに自家細胞の生着とグラフト内腔の薄い細胞層の形成が観察された。さらにIF像からそれらグラフト内腔の細胞がCD31陽性、 α SM陽性細胞であることが観察され、内膜が形成されていることを実証した。また、6週間後の新生内膜は2週間後のそれよりも厚い傾向が観察された。2週間および6週間後のいずれにおいても、内皮化は近位および遠位吻合部からグラフト中央に向けて連続的に伸長していた。ICRを計算すると6週間後で有意に高かった。

・糖尿病ラットにおけるグラフトの性能評価(図2)

上記の方法で糖尿病ラットを作成し、対照群とともにグラフトの移植を行い、2週間後にグラフトを採取し、同様の検討を行った。糖尿病群では観察期間中300mg/dL以上であり、対照群は300mg/dL未満であった。また、糖尿病群で体重増加が悪かった。高血糖が本来の大動脈に及ぼす影響を明らかにするため、STZ投与1週間後の大動脈を採取し、qPCRを行った。その結果、Nos2およびNos3の遺伝子発現が、糖尿病群で有意に低下しており、内皮機能障害を示唆した。また、糖尿病群で炎症性サイトカイン(TNF α , IL6, IL1 β)およびNADPHオキシダーゼ(Nox1, Nox2)の遺伝子発現も計測し

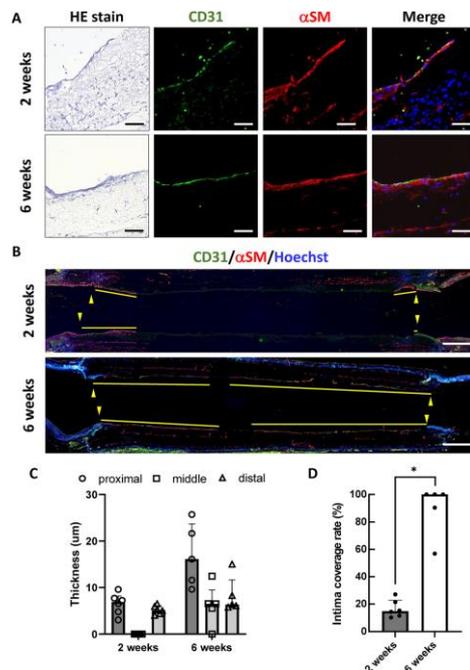


図1

たが、対照群と変化なかった。しかし、糖尿病群では最近特異的な S16rRNA 含量が有意に増加した。これらの結果は STZ 誘発糖尿病ラットモデルの確立に成功したことを示している。糖尿病群の 2 週間後の開存率は 0% で、対照群 (74.1 %) より有意に低かった。また、糖尿病群のグラフト内には血栓が観察された。対照群では上記健常モデル同様に内皮化が観察されたが、糖尿病群では観察されなかった。さらに、糖尿病群のグラフト周囲には好中球と思われる炎症細胞と細菌塊が観察され、感染が示唆された。これらの所見は糖尿病がグラフト機能を低下させていることを示している。

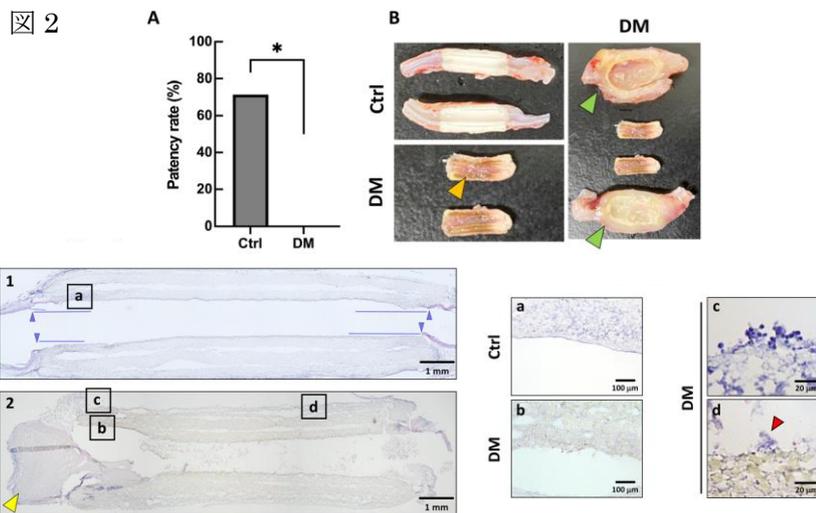


図 2

・インスリンによる糖尿病治療がグラフト機能を改善 (図 3)

我々は糖尿病に対する治療介入がグラフト機能にどのような影響を及ぼすかを上記糖尿病治療モデルを使用して検討した。糖尿病治療群および糖尿病治療対照群 (つまり糖尿病あり群) を作成し、グラフト移植後 2 週間でグラフトを採取し、上記同様の検討を行った。糖尿病治療対照群では上記糖尿病群同様に体重の増加がみられなかったものの、糖尿病治療群では健常モデル同様体重増加が観察され、血糖値も観察期間を通して 300mg/dL 未満であった。糖尿病治療群の 2 週間後開存率は 100% で糖尿病治療対照群の 20% より有意に高かった。さらに、糖尿病治療群の ICR は 16.1% であり、これは上記健常モデルとほぼ同等であった。これらの結果から、糖尿病治療がグラフト機能を著しく改善することが観察された。

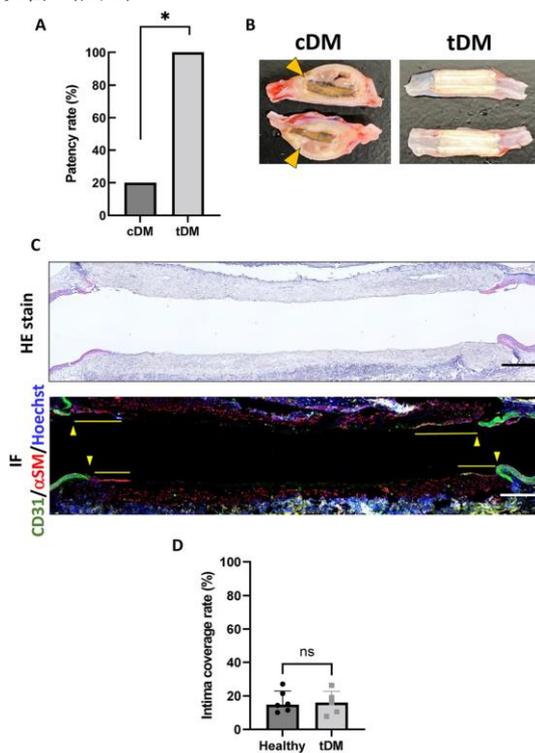


図 3

・結論

本研究では、直径 1mm の PVA-PCL グラフトの機能を糖尿病および糖尿病治療モデルを使用して評価した。その結果、糖尿病がグラフトの機能を低下させ、インスリン治療がこの機能低下を回復させることを実証した。様々な種類のナノファイバークラフトが開発され、その性能が健常動物モデルで試験されてきたが、我々の結果は、これらのナノファイバークラフトの性能が疾患条件下で変化するを示している。したがって、疾患条件下でナノファイバークラフトの性能がどのように変化するのか、そのメカニズムを明らかにし、これらの課題を克服するための戦略も同時に検討することが重要である。このように、本研究は、臨床応用可能な小口径人工血管を開発するためには、併存疾患を持つ患者や関連する治療法を考慮し、臨床現場で遭遇する症例をより忠実に反映したモデルを用いることの重要性を再認識した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuta Kikuchi, Kyohei Oyama, Takumi Yoshida, Daisuke Naruse, Masahiro Tsutsui, Shingo Kunioka, Naohiro Wakabayashi, Hiroyuki Kamiya	4. 巻 18
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuta Kikuchi
2. 発表標題 Impact of diabetes on bioabsorbable artificial vascular graft and insulin therapeutic effect
3. 学会等名 34th Conference of the Society of Organ Substitution and Regeneration Medicine
4. 発表年 2022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 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

〔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	

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