

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791722

研究課題名（和文） 新しい脱細胞化技術による小口径人工血管の開発～その実用化を目指して～

研究課題名（英文） The development of novel decellularization methods; it's application for small diameter vessels

研究代表者

榊原 俊介（SAKAKIBARA SHUNSUKE）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：50444592

研究成果の概要（和文）：

われわれはこれまでに高張塩溶液を用いた組織の脱細胞化法を確立させた。本手法を小口径の血管に応用した。ラットを実験動物として用い、腹部大動脈を採取し、これを脱細胞化した（口径約3mm）。これを別の個体に顕微鏡下に移植した。経時的に採取を行い、組織学的検討を行った結果、移植より1ヶ月の時点で血管内皮細胞が生着し、その下層には平滑筋細胞の定着も認めた。また14ヶ月に渡り100%の開存を認めた。更に口径1mmにおいてもその開存を認めた。加えてワイヤーミオグラフシステムを用いて血管の収縮・拡張機能を検討した結果、NOに反応して血管拡張機能を示した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a novel decellularization method using a hyperosmotic electrolytic solution. The rat abdominal aorta was decellularized and histologically evaluated. These materials, 15 mm in length, were transplanted into the rat abdominal aorta. The hematoxylin and eosin staining and scanning electron microscopic images showed complete decellularization. All transplanted acellular vessels were confirmed to be patent (1 week to 14 months), except in the case of 1 animal, which died 14 months following transplantation. The harvested vessels displayed formation of tunica intima (endothelial cells) and tunica medulla (smooth muscle cells) layers. We also examined the physiological properties of the vessels 3 months after transplantation with a wire myograph system. The transplanted vessels did not react to norepinephrine, but did relax when exposed to sodium nitroprusside. In conclusion, our acellular vessels produced with hyperosmotic electrolytic solution showed extremely high and long-term patency with regeneration of the tunica intima and tunica medulla. In addition, we found that these regenerated acellular vessels possess the physiological properties associated with vascular reflection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学、小口径人工血管

1. 研究開始当初の背景

近年の手術技術の進歩に加え、心血管疾患・糖尿病の増加により世界的に人工血管の需要は高まっている。特にヨーロッパでは死因の4割を血管疾患が占め、また、世界中で年間に20万肢が血管障害に伴い切断されている。これに対し、人工血管の開発に多くの研究チームがしのぎを削っているが現在までで実用化されている人工血管の口径は最も小さなものでも6mmを下らない。

心筋梗塞や小児先天奇形などの冠動脈疾患や透析のシャント作成、下肢のバイパス術時に用いられる、さらにはわれわれ形成外科医が行う遊離組織移植に用いられる血管グラフトに求められる口径は3mmから4mmの物が多い一方、人工血管が利用できないために自己の静脈グラフトなどが用いられている。

現在までに様々な研究チームにより開発された小口径人工血管が報告されているがいずれも実用されえるものではなかった。小口径人工血管が実用化されるためには、①長期にわたり閉塞しないこと、②圧力に耐えられること（最低でも120mmHg）、③柔軟であり、手術操作に適していること、④弾力があり血圧の変動に生理的に対応できること、⑤生産工程が単純で安価であること、などが挙げられる。小口径血管では大口径血管に比し、閉塞しやうい。それは、これらが存在する環境での血液の流速および圧力が要因となる。

再生医療は細胞工学の応用であるため、細胞が定着し、分化し、その特異的な機能を果たすことが目的とされる。細胞がこれらの機能を果たす上で、細胞外マトリクスの重要性が示されて以来、再生医療材料においてスキヤフォールドという概念が広く浸透している。スキヤフォールドは細胞を目的に導くための絶妙なマイクロストラクチャーが前提となる。近年の合成化学の進歩は目覚ましいものがあり、現在の科学はナノテクノロジーへと歩みを進めている。理論的にはナノテクノロジーによりスキヤフォールドに最適なマイクロストラクチャーを合成できるが、現在の科学技術では時間・労力を含めたコスト面からは非現実的と考えられている。これに対し、簡便に最適なマイクロストラクチャーを提供する方法として、脱細胞化組織が開発された。脱細胞化の方法として、凍結融解法・界面活性剤法などが挙げられる。凍結融解法は脱細胞化効率が悪く、組織移植による拒絶反応率が高く、現在、その主流からは外された。代わって界面活性剤法はアロダームなど既に臨床応用されているものもあり、効率よくスキヤフォールドを提供できるものとして注目されている。しかしながら界面活

性剤法にはいくつかの問題点が挙げられる。

①界面活性剤という細胞毒性のある薬品を使用すること、②界面活性剤処理は一定の確率でスキヤフォールドとなる基底膜などのECMの破壊が免れえないことである。①は徹底した洗浄により対処できるが、②は脱細胞化組織の脆弱性、細胞の定着・分化効率の低減につながる。皮膚や神経など比較的静的な条件に存在する組織に対して②は大きな問題とならないが、血管、特に動脈に関しては特異な流体力学環境に対応できなくてはならないのみならず、流体力学環境を作り出す生理的環境を提供できなくてはならない。このことが小口径人工血管が開発に及ばなかった大きな原因といえる。われわれは界面活性剤を用いない新たな方法により組織を脱細胞化することに成功し、現在、特許を申請している。われわれはこれまで、本方法を小口径血管（口径2-3mm）に応用し、脱細胞化に成功した。この組織をラットの腹部大動脈に移植することで、現在までで半年での開存を確認した。また、その開存率は現時点で100%である。組織学的に検討した結果、図に示すように内皮細胞が内膜に、平滑筋細胞が中膜に存在し、正常血管とほぼ相同な小口径での再生血管を作成することに成功した。

2. 研究の目的

ここまでの研究成果を踏まえ、今後、実用化に向けた評価が必要となる。本研究課題では次の事を目的とした。

- ① 脱細胞化血管の物性評価
- ② 血管内皮細胞および平滑筋細胞の由来の探索
- ③ 再生血管の生理的評価

現在までに得られたデータを鑑み、脱細胞化血管ではそのマイクロストラクチャーが十分に保存されていること、それ故に十分な耐圧性を維持していることが予測されるが、可視的にあるいは数値的にその裏付けを行いたい。また、損傷された血管での血管内皮細胞は血液中の前駆細胞に由来するとされており、同様の機序が作用すると考えるが、平滑筋細胞の由来はいくつかの候補が挙げられる。一つには隣接する血管からの脱分化した平滑筋細胞の浸潤、一つには周皮細胞の分化、もう一つには骨髄由来のCD34陽性細胞の分化が考えられる。これまでの知見では血管修復過程においてCD34陽性細胞の関与が示されてきたが近年では周皮細胞の関与が大きいという報告もあり議論が分かれている。本研究は血管修復機序の解明においても大きな示唆を与える。また、小口径血管として体内の生理機能に順応した血管の収縮・拡張に同調することが望まれる。再生血管での

平滑筋は血管の収縮・拡張に寄与するの、本研究課題により明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

①血管組織の採取と脱細胞化

実験動物にはラット(Wistar系)を用いた。ペントバルビタール系麻酔剤を腹腔内に投与後、顕微鏡下に腹部大動脈を採取した。1M NaCl 溶液中で24時間震盪したのちに7日間、PBS 中で震盪した。これをPBS 溶液中に浸漬させ、4℃で保存した。一部は薄切したのち、HE 染色を行い、顕微鏡下に観察を行った。また一部は2%グルタルアルデヒドで固定を行ったのちにオスミウム溶液で後固定を行った。白金を蒸着させたのち、走査型電子顕微鏡で撮影を行った。

②脱細胞化血管の移植

①で得られた脱細胞化血管を別の個体のラット腹部大動脈に顕微鏡下に移植を行った。移植片の長さは10~15mmであった。

③移植後の脱細胞化血管の採取

移植後、1週間、2週間、5週間、3ヶ月、5ヶ月、14ヶ月の時点においてそれぞれ採取を行った。⑥のワイヤーミオグラフィシステムに利用する物以外はホルマリン溶液中で固定を行った。ワイヤーミオグラフィシステムに利用する物はリンゲル中に保存した。

④移植前後の脱細胞化血管の組織学的検討

③で得られた移植後の脱細胞化血管を長軸方向に6μm厚の凍結切片を作成し、抗vWF抗体、抗α-SMA抗体により蛍光免疫組織化学法によりそれぞれ血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の染色を行った。

⑤平滑筋細胞の由来についての組織学的検討

脱細胞化血管移植後2週間の時点で、移植血管を採取し、ホルマリンで固定を行った後、抗SMA抗体および抗PCNA抗体を用いて2重蛍光染色を行った。蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

⑥ワイヤーミオグラフィシステムによる移植後の脱細胞化血管の生理機能の検討

脱細胞化血管移植後3ヶ月の時点で、移植血管を採取し、リンゲル液中に保存した。これを幅約1mmの輪切りにしたのち、ワイヤーミオグラフィシステムのワイヤーにフッキングし、1gの牽引力をかけた。安定化を待った後、5μMのノルエピネフリンを添加し反応を観察した。さらに安定化をみた後に5μMのニトロプルシドナトリウム溶液を添加したのち、反応を観察した。

4. 研究成果

①血管組織の採取と脱細胞化

高張塩溶液により脱細胞化した血管の組織切片を作成しHE染色により観察を行った

ところ、図1の様にヘマトキシリンで染色される細胞核は脱落しており、エオジンで染色される細胞外マトリクスの温存が認められた。また、電子顕微鏡(SEM)下でも同様に脱細胞化と細胞外マトリクスの温存が確認された。(図2)

②脱細胞化血管の移植および開存率

移植後、1週間(n=2)、2週間(n=1)、5週間(n=2)、3ヶ月(n=2)、5ヶ月(n=2)、14ヶ月(n=2)の時点においていずれも開存を認めた(100%)。14ヶ月において老衰で死亡した1個体ではその開存は不明であった。

③移植後の脱細胞化血管の組織学的検討

移植後の脱細胞化血管では、移植後1週間では内腔面にvWF陽性の細胞の浸潤が認められた。5週間目ではvWF陽性細胞は内腔面に1層の細胞層を形成し、その下方(深層)にはαSMA陽性の平滑筋細胞が細胞層を形成していた。移植後3ヶ月では同様の所見を呈したが、平滑筋細胞の形態はより球形に近づき、正常の平滑筋細胞に類似した形態を示した。移植後5ヶ月、14ヶ月(図3)では3ヶ月と同様の所見であった。なお、内膜肥厚は認められなかった。

④平滑筋細胞の由来についての組織学的検討

移植後2週間の時点で脱細胞化血管の採取を行った。これを長軸方向に薄切し、抗αSMA抗体(緑色)および抗PCNA抗体(赤色)による2重蛍光染色を行ったところ、移植血管の中心部近傍にはSMA陽性細胞は認められなかった。また細胞の浸潤は縫合側に多く、平滑筋細胞は縫合断端の正常血管からの分裂・浸潤によるものと考えられた。また浸潤してきていると考えられる細胞塊の中心側(浸潤の先端)の細胞はSMA陽性であり、かつPCNA陽性でもあった(図4)ことから、浸潤とともに細胞分裂を伴う事が示唆された。したがって、脱細胞化血管に定着していた平滑筋細胞は血液中のCD34陽性細胞によるものではなく、周囲からの浸潤によるものである事が考えられる。

⑤ワイヤーミオグラフィシステムによる移植後の脱細胞化血管の生理機能の検討

移植後3ヶ月の時点での脱細胞化血管を成果③と同様に組織学的に検討を行ったところ、内皮細胞および平滑筋細胞の定着を認めた。この血管に対してワイヤーミオグラフィシステムを導入した。まずノルエピネフリンを添加したところ、血管の収縮反応は認められなかった。次にNOのキャリアであるニトロプルシドナトリウム溶液を添加したところ、血管の拡張反応が認められた。

図1 脱細胞化後の HE 染色。ヘマトキシリンで染色される細胞核は除去されている。

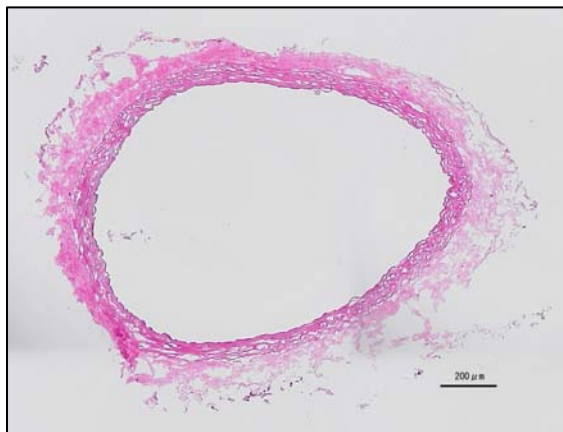


図2 脱細胞化血管の電子顕微鏡写真。細胞外マトリクスは温存されている。

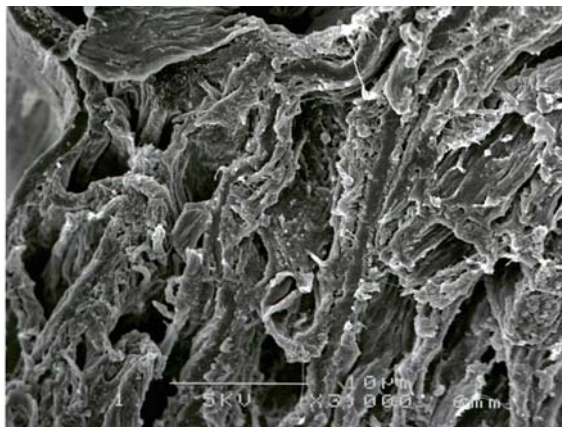


図3 移植後14ヶ月時点での血管内皮細胞および平滑筋細胞の評価。それぞれ緑色の蛍光標識で示される。

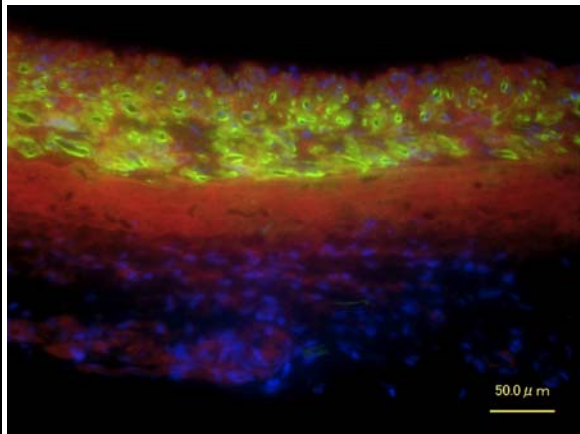
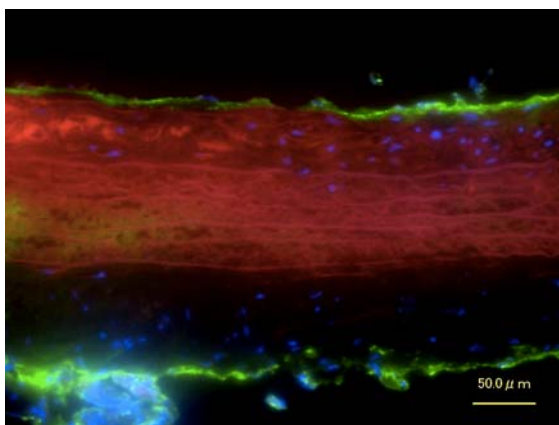


図4 移植後2週間。平滑筋細胞は緑色の蛍光で、PCNA陽性細胞は赤色の蛍光で示される。右側が移植された脱細胞化血管の中核側に該当する。

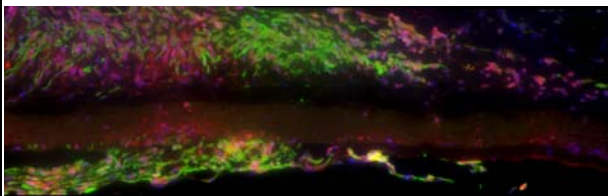
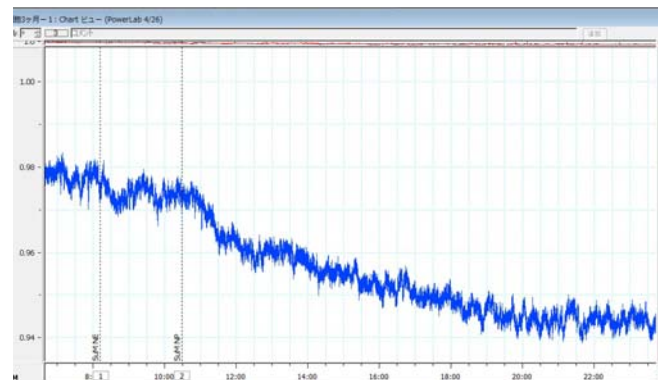


図5 ワイヤーミオグラフィシステムによる血管生理機能の評価。移植後3ヶ月での脱細胞化血管の評価を行った。左の破線はノルエピネフリン添加、右の破線はニトロプルシドナトリウム添加を行った。ニトロプルシドナトリウムに反応して弛緩作用を示した。



以上より、本手法により得られた脱細胞化血管は、実験動物レベルでは移植することにより高い開存率を示し、また、細胞が定着した後は内皮細胞の層の深部に平滑筋細胞の層を形成し、正常血管に近い形態がみられた。また、この再生された脱細胞化血管の平滑筋細胞は薬剤に対して弛緩作用を示す事から、機能型再生血管としての利用がきたいできる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①A simplest method of flap monitoring
Sakakibara S, Hashikawa K, Omori M,
Terashi H, Tahara S.
J Reconstr Microsurg. 2010; 26(7):433-4

[学会発表] (計3件)

①榑原 俊介
脱細胞化組織を用いた小口径人工血管の開
発とその評価
第20回日本形成外科学会基礎学術集会 201
1.10.6-7 東京

②榑原 俊介
脱細胞化組織を用いた小口径人工血管の開
発とその評価
第38回日本マイクロサージャリー学会学
術集会 2011.11.10-12 新潟

③榑原 俊介
高張塩溶液脱細胞化法による脱細胞化血管
の開発とその評価
第37回日本マイクロサージャリー学会
2010.11.18 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)
神戸大学・医学研究科・特命助教
研究者番号：50444592

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者