

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700458

研究課題名(和文) 抗血栓性を有する脱細胞化小口径血管の解析と小口径人工血管への応用

研究課題名(英文) Analysis of decellularized small diameter blood vessel that has anti-thrombus and its application to small diameter artificial blood vessel

研究代表者

船本 誠一 (FUNAMOTO, SEIICHI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：40609947

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)：小口径血管は、早期血栓形成や血管狭窄などにより安定した移植成績を有しないため臨床使用が少ない。その原因の一つとして、血管内腔は基底膜と称される組織と内皮細胞から構成され、血管内皮細胞が抗血栓性の機能を有している。このため、小口径血管の安定性には、細胞の接着する基底膜構造の維持が、早期内皮化に重要だと考えられる。本事業では、脱細胞化した血管内腔構造の評価、また、脱細胞化血管内腔への血管内皮細胞播種を行い、基底膜構造と内皮細胞機能の関係性の探索を行った。その結果、脱細胞化小口径動脈は早期血栓形成や狭窄が認められず、移植後の細胞浸潤による組織再生が確認された。

研究成果の概要(英文)：Intravascular lumen is composed of basement membrane called tissue and endothelial cells. Vascular endothelial cells have the function of anti-thrombotic. Early Vascular endothelialization due to maintenance of basement membrane structure of decellularized blood vessel is important for the maintenance of blood flow of small-diameter vascular graft. In this project was to evaluate the decellularized vascular lumen structure. Also explored the relationship of the basement membrane structure and endothelial cell function performs a vascular endothelial cell seeding to the decellularized vascular lumen. As the results, tissue regeneration by cell infiltration after transplantation has been observed. Decellularized small-diameter artery was not recognized early thrombus formation and constriction.

研究分野：組織工学

キーワード：バイオマテリアル 循環器 脱細胞化組織

1. 研究開始当初の背景

年間 60 万件以上の血管移植が実施されており、大、中口径 (内径 6mm 以上) では、人工高分子材料血管による術式が確立されている。しかし、心臓バイパス術 (CABG・OPCAB) などでは使用される小口径人工血管 (内径 6mm 以下) では、早期血栓形成や血管狭窄などにより安定した移植成績を有しないため人工血管は選択されない。現在、これらの術式の移植血管グラフトとしての第一選択は自己血管であるが、患者への負担が大きく選択できる血管も限られかつ、再手術時の代替血管不足などの問題が指摘されている。そのため、ヒト血管グラフトとして凍結保存された他家血管移植が実施されているが、自家血管と比較して開存率に劣り、国内においては供給量も少ない。

これらの問題の解決法として、高機能化高分子材料人工血管や組織工学的的手法による人工血管開発が行われている。高分子人工血管の機能化としては、抗血栓性の付与や血管内皮細胞播種に主眼を置いた研究が試みられているが、生体血管との物性の相違や細胞接着性、内膜肥厚などの問題が報告されている。一方、組織工学的的手法において、細胞シート工学を利用した人工血管作製が広く行われ、生体血管と同程度の力学的特性を有する小口径人工血管が得られているが、作製期間や費用面において改善すべき課題が多い。コラーゲンなどの再構成タンパク質による人工血管は優れた生体適合性を示す一方、力学的強度において問題が残っている。

血管 (動脈) は、コラーゲン、エラスチン、平滑筋が主な構成要素であり、心臓からの距離により構成比率が異なる組織である。高血圧、血流速度が速い心臓付近の血管はエラスチンが多く含まれ、低血圧、血流が比較的遅い遠位動脈はコラーゲンの構成比率が高くなる。そのため使用する部位により物性が異なり、移植部位に適した人工血管が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、脱細胞化血管構造と血液・血管内皮細胞との関係性を研究し、人工血管の抗血栓性と再細胞化について検討する。これまで申請者は、高静水圧を用いた脱細胞小口径血管を開発し、血管構造の維持が、早期内皮再生を可能にし、移植成績向上に重要なことを見出した。これを踏まえて、脱細胞化血管に酵素処理や熱処理した後、細胞播種を行い血管構造中の内皮化に必要な因子の探索を行う。また、血液接触実験を行い、血液との関係性を評価する。小口径人工血管は、心臓バイパス術および脳血管バイパス術などの広い分野で必要とされている。しかしながら、早期血栓形成、血管狭窄および内皮化の遅延による低開存性により、満足できる小口径人工血管は未だに存在しない。したがって、本研究で血液・血管内皮細胞との関連性を明らかにすることで、既存人工血管の機能向上

の知見が得られると考えている。

3. 研究の方法

(1)血管の採取

成体ブタ頸動脈は東京芝浦臓器株式会社より入手した。血管周囲の結合組織を除去し、Alsever's solution で洗浄した。界面活性剤による血管脱細胞化処理は、血管を 0.25 % w/v TritonX-100, 0.25 % w/v sodium deoxycholate (SDC) 溶液に 24 時間、37 振盪条件で浸漬し、Hanks balanced salt solution に 72 時間 4 静置条件で浸漬した。100 μ g/ml RNase, 150 U/ml DNase, 50mmol/l MgCl₂ in PBS に浸漬し 24 時間、37 振盪条件下で洗浄した。超高压処理による血管の脱細胞化処理は、冷間等方加圧装置、Dr. CHEF ((株)神戸製鋼所)を用い、30 にて 10,000 気圧の超高压印加処理を 10 分間行った後、0.2 mg/ml DNase、0.4 μ l/ml hydrocortisone、1 μ l/ml ascorbic acid、1 μ l/ml GA-1000、1 μ l/ml heparin 含有 EGM-2 培地で 14 日間、37 振盪(UHP/37) / 4 静置(UHP/4) 条件下で洗浄し、80% EtOH in Alsever's solution で 3 日間洗浄した。

(2)組織学的評価

未処理および脱細胞化血管を 10%中性緩衝ホルマリン液固定し、エタノールで段階脱水、パラフィン包埋後、ミクロトームを用いて厚さ 4 μ m の薄層切片を作製した。脱パラフィン後、切片をヘマトキシリン・エオジン (HE)染色、エラスチカワンギーソン (EVG)染色し、光学顕微鏡による観察を行った。

(3)残存 DNA 定量

凍結乾燥した脱細胞化血管約 20 mg に組織溶解液 (50 mM Tris-HCl, 50 μ g/ml Proteinase K, 1 % w/v SDS, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA-2Na)を加え、55 にて 12 時間、組織を分解した。フェノール/クロロホルム法によりゲノム DNA の抽出を行い、エタノール沈殿後、紫外-可視分光光度計を用いて 260 nm の吸光度を測定し、残存 DNA 量を算出した。

(4)切片コラーゲン定量

血管中のコラーゲン定量のために、色素結合法によるコラーゲン定量を行った(9)。厚さ 20 μ m の組織切片を作製し、コラーゲン定量キットを使用して切片中のコラーゲン量を測定した。連続切片を作製し、HE 染色後 Image J により組織面積を測定し、単位面積当たりのコラーゲン量で示した。

(5)走査型電子顕微鏡観察

未処理血管、脱細胞化血管を 2.5 %グルタルアルデヒドで常温にて 8 時間固定し、段階エタノール脱水後、t-ブチルアルコール凍結乾燥を行った。血管横断面観察のために、凍結切断により血管断面サンプルを作製した。乾燥終了後、150 μ m Au コーティングし、SEM による観察を行った。

(6)力学特性評価

脱細胞化処理による力学強度の変化を調べるために、破裂圧試験、suture retention

test を行った。破裂圧試験は水圧計を使用した。血管末端を鉗子で結紮し、もう一方の末端からシリンジを用いて水圧をかけ、血管破裂時の圧力を測定した。suture retention test は、血管断端を引っ張り試験にセットし、もう一方の断端から 3 mm の位置に 5-0 シルク縫合系を通し、50 mm/min の速度で垂直方向に引っ張り、血管が破断するまでの最大値を測定した。破断するまでの最大値を suture retention force とした。

(7)血管内皮細胞播種

脱細胞化頸動脈を長軸方向に切開後、血管内腔を上方向に 12well plate dish に置き、サンプルを抑えるように滅菌したアクリルモールド(直径 22 mm、厚さ 1.5 mm、中心に 10 x 10 mm の空隙)をセットした。モールド空隙に血管内皮細胞用培地(EBM)を 1 ml 添加し 37 °C、5 % CO₂ 環境下に 15 分静置した。EBM 除去後、5.0 x 10⁵ cells/ml の HUVEC(Human umbilical vascular endothelial cell)懸濁液 1 ml を空隙に添加した。4 時間後、懸濁液を 700 μl 除去、等量の EBM を添加した。EBM 添加 4 時間後にモールドを除去し、37 °C、5 % CO₂ 環境下にて 10 日間培養した(10)。培養終了後、細胞接着を HE 染色、SEM により評価した。

(8)動物実験

脱細胞化血管の生体適合性評価の動物モデルとして、Wistar rat (male, 0.3 kg weight, 10-12-weeks-old)を用いた。ラット頸動脈を採取し、ブタ頸動脈と同様の超高压脱細胞化(UHP/37 °C・UHP/4 °C)を行い、移植用脱細胞化血管とした。

レシピエントラットはドミトールおよびソムノペンチルを筋肉注射により麻酔した。頸部切開後、頸動脈を露出させ、血流を遮断し、切断した。切断部にカフ(内径 0.6 mm、外径 0.9 mm)を取り付け、血管回転後に 6-0 シルク縫合系で結紮した。脱細胞化ラット頸動脈を近位部から血管断端のカフにかぶせ、縫合系にて結紮した。一時血流再開し血液漏出の有無を確認後、遠位部も同様にカフをかぶせ結紮した。脱細胞化血管結合後、血流を再開した。頸部切開部を 5-0 シルク縫合系で縫合し、イソジン消毒、アンチセダン、パイトリルを筋肉注射した。所定期間後、麻酔下で血管拍動、開存を評価し、移植血管採取後にラットを麻酔薬にて犠死した。採取したグラフトを 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、HE 染色にて血栓形成、細胞浸潤を評価した。

(9)機能化のための組織含浸技術の検討

脱細胞化した小口径血管のさらなる機能化のため、食品技術に活用されている真空含浸技術を用いて、血管壁組織内へのヘパリンの機能化を検討した。脱細胞化した血管を -80 °C になるように毎分 -1 °C の速度で凍結処理し、その後 100mTorr で 24 時間以上の条件で乾燥処理を行った。凍結乾燥させた脱細胞化血管を用いて、真空化にて組織と機能化

させたい物質の水溶液を接触させ、その後 10Pa で加圧して、脱細胞化血管へ機能化処理を行った。処理後に組織を切開し、目視的に組織内を観察した。

4. 研究成果

(1)血管の脱細胞化と組織学的評価

採取したブタ頸動脈は、内径が 1-4 mm、長さ約 10 cm であった。TritonX-100/SDC による脱細胞化血管は管腔構造が維持されず、HE、EVG 染色ではエラスチン線維の断裂とコラーゲン脱落が観察された。超高压法による脱細胞化において、UHP/37 °C 脱細胞化サンプルでは、コラーゲン脱落とエラスチン線維配向の乱れが認められ、血管の管腔構造維持は見られなかった(Fig 1)。UHP/4 °C 脱細胞化血管は管腔構造を維持し、コラーゲンとエラスチン配向の乱れが最も軽微だった(Fig 2)。全ての脱細胞化手法において、細胞核は観察されなかった。

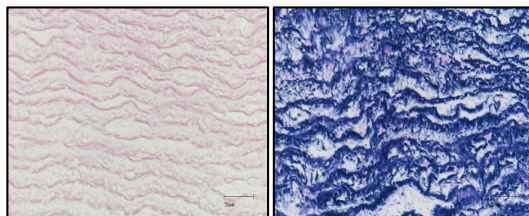


Fig 1 Photographs and histological evaluations of decellularized porcine carotid using UHP37 treatment.

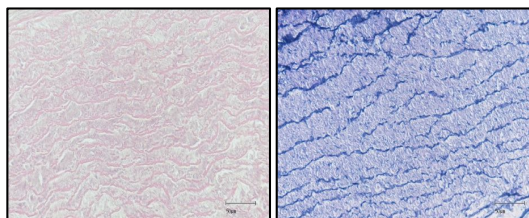


Fig 2 Photographs and histological evaluations of decellularized porcine carotid using UHP4 treatment.

(2)残存 DNA 定量

脱細胞化処理後の血管に残存する DNA の定量結果において、脱細胞化処理により組織内の残存 DNA 量が減少した。UHP/37 °C 脱細胞化処理のみ、未処理血管との間に有意差が見られたが、TritonX-100/SDC 脱細胞化頸動脈と UHP/37 °C 脱細胞化血管、UHP/4 °C 脱細胞化血管と UHP/37 °C 脱細胞化血管には有意差がなかった。

(3)切片コラーゲン定量

ブタ頸動脈において、Triton X-100/SDC および UHP/37 °C による脱細胞化血管では、未処理血管と比較してコラーゲン量が 50% 以下に減少した。一方、UHP/4 °C 脱細胞化血管では、コラーゲン減少が抑制され、未処理血管の約 65%のコラーゲンが残存した。

(4)走査型電子顕微鏡観察

脱細胞化処理による細胞外マトリクスの

微細構造変化を評価するため、電子顕微鏡による観察を行った。頸動脈において、未処理血管内腔は内皮細胞で覆われ、内弾性板は均一な波状構造を有し、エラスチン線維間にコラーゲンが存在していた。TritonX-100/SDC 処理血管は、内腔基底膜損傷、内弾性板断裂、コラーゲン配向の乱れが見られた。UHP/37 脱細胞化血管において、TritonX-100/SDC サンプル同様の基底膜損傷が観察され、内弾性板は断裂していなかったが、コラーゲン減少が観察された。UHP/4 脱細胞化血管では、損傷のない血管内腔基底膜、規則的な波状構造を維持した内弾性板、コラーゲン配向が観察された。

(5)力学特性評価

脱細胞化血管の力学特性を破裂圧試験、suture retention test により評価した。破裂圧試験では、未処理、UHP/37、UHP/4 脱細胞化頸動脈は測定限界の 1750 mmHg においても破裂しなかった。TritonX-100/SDC 脱細胞化頸動脈は 925 ± 47 mmHg での破裂が確認された。suture retention test において、全ての血管の suture retention force に有意差は見られなかったが、TritonX-100/SDC 脱細胞化血管が最も低値であった。

(6)血管内皮細胞播種

脱細胞化頸動脈の内皮細胞接着性を HUVEC 播種実験により評価した。UHP/37、UHP/4 脱細胞化頸動脈ともに、10 日間培養後に HUVEC が単層で血管内腔表面を覆っていた。HUVEC 播種面積は 10×10 mm だったが、培養 10 日目の SEM 観察により、血管内腔全域に細胞がみられ、脱細胞化頸動脈上での HUVEC 増殖が認められた。

(7)ラット移植実験

UHP 処理後の各洗浄条件における脱細胞化頸動脈の in vivo 評価として、ラット頸動脈を使用した移植実験を行った。ブタ頸動脈超高压脱細胞化と同様の手法でラット頸動脈(wistar rat, male 10-15 weeks)を脱細胞化した。HE 染色より、UHP/37、UHP/4 ともに細胞除去が確認された。

レシピエント Wistar rat (male, 10-12 weeks) への頸動脈移植実験において、UHP/37 脱細胞化血管移植群では、移植 3 日・1 週間の開頸時において、移植血管の拍動が見られ、開存が確認された。UHP/37 脱細胞化頸動脈の移植 1 週間後の HE 染色より、グラフト外膜側からレシピエント細胞が浸潤していたが、赤血球の浸潤も同時に見られた。UHP/37 脱細胞化頸動脈移植後 2 週間評価では、血栓形成により閉塞していた。血栓はグラフト全域に見られ、赤血球を主とした赤色血栓であった。一方、UHP/4 脱細胞化血管群において、移植後 2 週間評価で開存が確認された。移植血管内の吻合部付近で少量の血栓が見られたが、グラフト内にはほとんど血栓形成は認められなかった。HE 染

色の所見より、移植血管の中膜と外膜への少量の細胞浸潤と単層の内皮化が示された。以上のことより、脱細胞化小口径動脈は早期血栓形成や狭窄が認められず、移植後の細胞浸潤による組織再生が示された。

(8)機能化のための組織含浸技術の検討

真空加圧含浸処理した血管においては、単純浸漬した血管と比較し、単純浸漬群では組織表面までした物質の浸透はできなかったが、含浸処理群では、組織内部にまで機能性物質を染み込ませることが確認された(Fig3)。

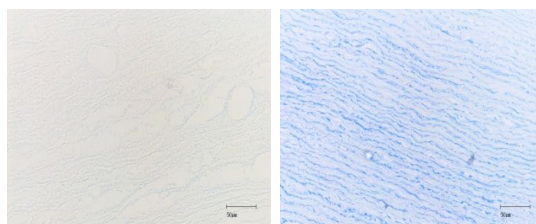


Fig 3 Toluidine O blue stained sections of the immersion treated aorta (left) and VPI treated aorta (right).

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 2 件)

Jun Negishi, Yoshihide Hashimoto, Kwangoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida. Application of a Vacuum Pressure Impregnation Technique for Rehydrating Decellularized Tissues. Tissue Engineering Part C. (査読有) Volume 20, Number 9. 2014

Negishi J, Nam K, Kimura T, Hashimoto Y, Funamoto S, Higami T, Fujisato T, Kishida A. Fabrication of a heparin-PVA complex hydrogel for application as a vascular access. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. (査読有) 102(7) 2014

[学会発表](計 16 件)

宮木 靖子、根岸 淳、船本 誠一、木村 剛、南 広祐、藤里 俊哉、樋上 哲哉、岸田 晶夫 細胞外マトリクス粉末を用いたヒフ癒着抑制の検討 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日~2014 年 09 月 26 日 北海道

宮木 靖子、根岸 淳、船本 誠一、木村 剛、南 広祐、藤里 俊哉、岸田 晶夫 細胞外マトリクス粉末のラット急性心筋梗塞モデル中期評価 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日~2014 年 09 月 26 日 北海道

樋上 哲哉、根岸 淳、船本 誠一、木村 剛、南 広祐、藤里 俊哉、岸田 晶夫 脱細胞

化ブタ動脈の構造と特性評価 2 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日 ~ 2014 年 09 月 26 日 北海道

宮木 靖子、根岸 淳、船本 誠一、木村 剛、南 広祐、藤里 俊哉、樋上 哲哉、岸田 晶夫 脱細胞化ブタ動脈の構造と特性評価 1 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日 ~ 2014 年 09 月 26 日 北海道

樋上 哲哉、根岸 淳、船本 誠一、木村 剛、南 広祐、藤里 俊哉、岸田 晶夫 脱細胞化ブタ橈骨動脈の作製と評価 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日 ~ 2014 年 09 月 26 日 北海道

田淵 正樹、船本 誠一、根岸 淳、南 広祐、木村 剛、藤里 俊哉、岸田 晶夫、樋上 哲哉 ラット急性心筋梗塞モデルにおける脱細胞化粉末の組織治癒の検討 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日 ~ 2014 年 09 月 26 日 北海道

樋上 哲哉、根岸 淳、船本 誠一、木村 剛、南 広祐、藤里 俊哉、岸田 晶夫 脱細胞化ブタ頸動脈の作製と評価 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 2014 年 09 月 24 日 ~ 2014 年 09 月 26 日 北海道

船本 誠一、根岸 淳、橋本良秀、樋上哲哉、岸田晶夫 凍結乾燥生体由来組織への VPI の応用 第 5 回日本材料科学会 医用・生体材料分科会講演会 2014 年 03 月 08 日 ~ 2014 年 03 月 08 日 東京

田淵正樹、船本 誠一、根岸 淳、南 広祐、木村剛、藤里俊哉、岸田晶夫、樋上哲哉 脱細胞化加工材料を用いた組織治癒の検討 第 51 回人工臓器学会大会/第 5 回国際人工臓器学術学会 2013 年 09 月 27 日 ~ 2013 年 09 月 29 日 横浜

船本 誠一、根岸 淳、田淵正樹、南 広祐、木村剛、岸田晶夫、樋上哲哉 脱細胞化方法を利用した小口径血管の作製と評価 第 4 回医用・生体材料分科会 2013 年 03 月 04 日 ~ 2013 年 03 月 04 日 東京

岸田晶夫、根岸 淳、中村奈緒子、呉平麗、南 広祐、木村剛、藤里俊哉、小林尚俊、船本 誠一、樋上哲哉、岩田博夫 ECM 移植からの生体反応の考察 第 15 回日本異種移植研究会 2012 年 12 月 08 日 ~ 2012 年 12 月 08 日 京都

橋本英子、増沢徹、尾関和秀、丸岡寛明、青代敏行、樋上哲哉、船本 誠一、岸田晶夫、木村剛 複合低エネルギーを用いた組織接合法の in vivo 評価 第 50 回日本人工臓器学会大会 2012 年 11 月 22 日 ~ 2012 年 11 月 24 日 福岡

根岸 淳、船本 誠一、橋本良秀、南 広祐、木村剛、樋上哲哉、岸田晶夫 脱細胞化血管の構造と特性評価 第 50 回日本人工

臓器学会大会 2012 年 11 月 22 日 ~ 2012 年 11 月 24 日 福岡

根岸 淳、船本 誠一、橋本良秀、木村剛、南 広祐、樋上哲哉、岸田晶夫 脱細胞化血管の構造と特性評価 本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 2012 年 11 月 26 日 ~ 2012 年 11 月 27 日 仙台

原田亮、船本 誠一、根岸 淳、南 広祐、木村剛、岸田晶夫、樋上哲哉 生体組織接着のための組織融着装置の開発と基礎的検討 第 51 回日本生体医工学会大会 2012 年 05 月 10 日 ~ 2012 年 05 月 12 日 福岡

中村奈緒子、橋本良秀、船本 誠一、南 広祐、木村剛、藤里俊哉、岩田博夫、岸田晶夫 血液産生を目的とした人工骨髄環境の構築 第 51 回日本生体医工学会大会 2012 年 05 月 10 日 ~ 2012 年 05 月 12 日 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船本 誠一 (FUNAMOTO SEIICHI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：40609947