

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462168

研究課題名(和文) 組織工学的手法による生体内で修復治癒する人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of a tissue-engineering, small-caliber vascular graft

研究代表者

西部 俊哉 (Nishibe, Toshiya)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10261306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 人工血管は抗血栓性の良好であるが、仮性内膜形成が不良であるため、吻合部内膜過形成による狭窄や閉塞が問題となっている。本研究では抗凝固物質であるヘパリンとフィブロネクチンを同時に共有結合固定して、抗血栓性を保持したまま生体内で修復治癒する人工血管の作成を目指した。フィブロネクチンとヘパリンをそれぞれePTFE人工血管に共有結合固定する至適条件を決定することができた。ただ、フィブロネクチンとヘパリンと同時に共有結合固定するまで研究が進まず、今後設備を整えて条件を明らかにしていきたい。

研究成果の概要(英文)：Tissue engineering has emerged as a promising approach to generate biologically functioning prosthetic vascular grafts exhibiting rapid neointima formation without subsequent degenerative change. We demonstrated that, in a canine model, covalent bonding of fibronectin enhanced the healing of small-caliber, long-fibril ePTFE vascular grafts. However, in a pig model, the fibronectin-bonded grafts did not exhibit powerful antithrombogenicity by the luminal endothelial cells until graft healing was completed, and therefore subsequent graft thrombosis occurred. We therefore hypothesized that, with further modifications by an anti-thrombotic molecule coating, covalent bonding of fibronectin may have great potential in the development of better small-caliber arterial prosthetic grafts. We could determine the optimal condition of covalent-bonding of fibronectin as well as heparin, and are continuing to develop the optimal method of simultaneous covalent-bonding of fibronectin and heparin.

研究分野：血管外科

キーワード：人工血管 フィブロネクチン ヘパリン 共有結合

1. 研究開始当初の背景

小口径人工血管として期待されているもののひとつとして抗血栓性の良好な expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) 人工血管がある。しかし、ePTFE 人工血管は移植晩期における吻合部内膜過形成による狭窄、閉塞が問題となる。その原因は仮性内膜形成が不良なことにあり、仮性内膜の基盤になる血栓繊維素膜が簡単に剥離、脱落してしまうこと、細胞侵入や毛細血管の発達に乏しく繊維化、器質化が障害されることに起因する^{1,2)}。ePTFE 人工血管は小結節と微細繊維が連結されたマイクロ多孔質構造となっており、平均繊維長を延長すると仮性内膜形成が良好になる³⁻⁷⁾。研究代表者らは血性や漏水性、耐久性が低下を来さない平均繊維長の長い ePTFE 人工血管を開発した^{8,9)}。

研究代表者らはマトリックス蛋白のひとつであるフィブロネクチンを使用して ePTFE 人工血管にさらに効率よく内皮細胞に覆われた血管壁を作らせる研究を行ってきた^{10, 11)}。フィブロネクチンは A 鎖と B 鎖がジスルフィド結合した二重鎖の多機能接着蛋白質であり、各ドメインにフィブリン、ヘパリン、コラーゲン、細胞、増殖因子などの結合部位が有するが、逆に血小板膜糖蛋白である GPIIb/IIIa 複合体の受容体と結合し、血小板凝集を起し血栓を形成しやすい¹²⁾。

一方、ヘパリンはグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸の一種であり、-D-グルクロン酸あるいは -L-イズロン酸と D-グルコサミンが 1,4 結合により重合した 5000 ~ 30000 Da の高分子であり、アンチトロンピンを活性化し、抗凝血作用能の賦活を通して凝固系を抑制することにより強力な血液凝固阻止作用を発揮する¹³⁾。ヘパリン固定された ePTFE 人工血管が臨床応用されており、良好な初期・中期成績が報告されている¹⁴⁾。

以上の結果を基にして、ヘパリンとフィブロネクチンを ePTFE 繊維に結合させることに

より、平均繊維長の長い ePTFE 人工血管において抗血栓性を損なわずに内皮細胞に覆われた血管壁を効率良く作成できると考えた¹⁵⁾。

2. 研究の目的

ヘパリンとフィブロネクチンを ePTFE 繊維に結合させることにより、ePTFE 人工血管において抗血栓性を損なわずに内皮細胞に覆われた血管壁を効率良く作成すること。

3. 研究の方法

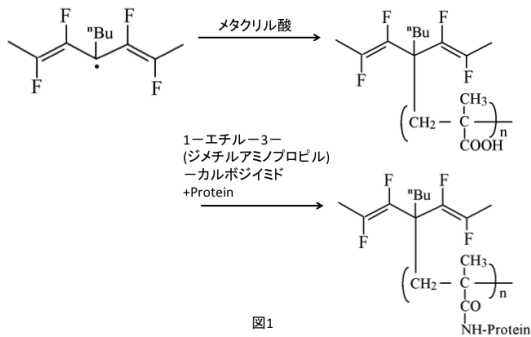
タンパク質の共有結合固定法

以前の共同研究者が開発した方法に基づいて¹⁶⁾、タンパク質の共有結合固定を行った。以下に方法を示す(図1)。

1 材料の全表面に官能基を導入する方法として、ePTFE の場合はアルカリ金属化合物を用いて脱フッ素化した後に、分子内にカルボキシル基、水酸基、アミノ基、エポキシ基等を有する化合物を付加させて官能基を導入する。アルカリ金属化合物としてメチルリチウムを用いるが、フッ素を引き抜く作用を高めるため、ヘキサメチルホスホリックトリアミドのキレート試薬を添加する。分子内にカルボキシル基を含有する物質として(メタ)アクリル酸を使用する。

2 ePTFE をメチルリチウムのジエチルエーテル溶液に浸漬し、ヘキサメチルホスホリックトリアミドを添加して ePTFE のフッ素原子を引き抜いて、反応溶液を除去する。アクリル酸のテトラヒドロフラン溶液を加えて反応させる。反応後に余剰のアクリル酸やその重合体を洗浄除去して、アクリル酸を ePTFE に重合する。

3 タンパク質を固定する結合方法は、固定することによって生体組織誘導作用を失うことなく、内膜が形成するまでの時間分解せずに存在する結合を選択する。フィブロネクチンやヘパリンは、カルボキシル基が脱水縮合により共有結合を形成する。



4. 研究成果

(1) フィブロネクチン及びヘパリンの共有結合法の最適化

以前の共同研究者らが報告した方法に基づいて¹⁶⁾、フィブロネクチン及びヘパリンの共有結合の至適条件が得られた。

試薬として、*n*-ブチルリチウム溶液(1.6Mヘキサン溶液、アルドリッチ)、ヘキサメチルホスホルアミド(アルドリッチ)、メタクリル酸(和光純薬、減圧蒸留精製して使用)、血漿フィブロネクチン(牛血漿由来、シグマ-アルドリッジ)、ヘパリンナトリウム塩(シグマ-アルドリッジ)、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(同仁化学)。テトラヒドロフラン(和光純薬)は金属ナトリウムを加えて蒸留し、溶解している水を除去した後、溶媒として使用した。

まず、ePTFE人工血管とMAAの重合を行った。アルゴン雰囲気下273Kにおいて、*n*-ブチルリチウム溶液とヘキサメチルホスホルアミドをモル比率1:1で混合し、同温度で15分間振とうし、混合溶液を作成した。混合溶液5mmolにePTFE人工血管を浸漬して273Kで0.5時間震盪した。ePTFE人工血管から反応溶液を除去し、テトラヒドロフランで洗浄した後、メタクリル酸を加えさらに353Kで8時間反応させた。混合物を330Kの蒸留水で24時間洗浄して水溶性の不純物を除去し、エタノール、アセトンで24時間ずつ洗浄して有機系の不純物を除去した。ポリメタクリル酸グラフト重合ePTFE人工血管に、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(5mg)存在下で

pH=1.5でフィブロネクチンの0.3wt%水溶液あるいは10%ヘパリン水溶液を4時間反応させた後、蒸留水で24時間洗浄し、フィブロネクチンまたはヘパリン共有結合ePTFE人工血管を得ることができた。

(2) フィブロネクチンとヘパリンの同時共有結合法の開発

フィブロネクチンとヘパリンの混合溶液を使用して共有結合固定を行う計画であったが、フィブロネクチンには3つのヘパリン結合部位が存在し、ヘパリンがePTFEに結合せずにフィブロネクチンに結合することが予想された¹⁷⁾。1)に示したフィブロネクチンの0.3wt%水溶液と10%ヘパリン水溶液の組み合わせだけでなく、各種濃度の組み合わせの混合溶液を使用して共有結合固定を行う計画である。

< 引用文献 >

- Mathisen SR, Wu HD, Sauvage LR, Usui Y, Walker MW. An experimental study of eight current arterial prostheses. *J Vasc Surg.* 1986;4(1):33-41.
- Clowes AW, Kirkman TR, Clowes MM. Mechanisms of arterial graft failure. II. Chronic endothelial and smooth muscle cell proliferation in healing polytetrafluoroethylene prostheses. *J Vasc Surg.* 1986;3(6):877-84.
- Branson DF, Picha GJ, Desprez J. Expanded polytetrafluoroethylene as a microvascular graft: a study of four fibril lengths. *Plast Reconstr Surg.* 1985;76(5):754-63.
- Hirabayashi K, Saitoh E, Ijima H, Takenawa T, Kodama M, Hori M. Influence of fibril length upon ePTFE graft healing and host modification of the implant. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(11):1433-47.
- Golden MA, Hanson SR, Kirkman TR,

- Schneider PA, Clowes AW. Healing of polytetrafluoroethylene arterial grafts is influenced by graft porosity. *J Vasc Surg.* 1990;11(6):838-44.
- . Nagae T, Tsuchida H, Ishimaru S, Wilson SE. Enhanced neointima formation and attachment on the high-porosity inner surface of modified PTFE vascular grafts. *J Invest Surg.* 1995;8(4):235-42.
- . Hazama K, Miura H, Shimada T, Okuda Y, Murashita T, **Nishibe T**. Relationship between fibril length and tissue ingrowth in the healing of expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Surg Today.* 2004;34(8):685-9.
- . Miura H, **Nishibe T**, Yasuda K, Shimada T, Hazama K, Katoh H, Watanabe S, Okuda Y, Kumada T. The influence of node-fibril morphology on healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Eur Surg Res.* 2002;34(3):224-31.
- . Isaka M, **Nishibe T**, Okuda Y, Saito M, Seno T, Yamashita K, Izumisawa Y, Kotani T, Yasuda K. Experimental study on stability of a high-porosity expanded polytetrafluoroethylene graft in dogs. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;12(1):37-41.
- . **Nishibe T**, Okuda Y, Kumada T, Tanabe T, Yasuda K. Enhanced graft healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts by covalent bonding of fibronectin. *Surg Today.* 2000;30(5):426-31.
- . **Nishibe T**, O'Donnel S, Pikoulis E, Rich N, Okuda Y, Kumada T, Kudo F, Tanabe T, Yasuda K. Effects of fibronectin bonding on healing of high porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts in pigs. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2001;42(5):667-73.
- . Mosher DF, Furcht LT. Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J Invest Dermatol.* 1981;77(2):175-80.
- . Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep.* 2002;19(3):312-31.
- . Pulli R, Dorigo W, Castelli P, Dorrucchi V, Ferilli F, De Blasis G, Monaca V, Vecchiati E, Pratesi C. Midterm results from a multicenter registry on the treatment of infrainguinal critical limb ischemia using a heparin-bonded ePTFE graft. *J Vasc Surg.* 2010;51(5):1167-1177.
- . 奥田泰弘、名取耕一郎、林文弘、熊田敏彦、**西部俊哉**、三浦秀彦：**再表** 00/072894
- . 林文弘、奥田泰弘、奥村豊：特開平 05-269198
- . Laterra J, Silbert JE, Culp LA. Cell surface heparan sulfate mediates some adhesive responses to glycosaminoglycan-binding matrices, including fibronectin. *J Cell Biol.* 1983;96(1):112~123.
- 5 . 主な発表論文等
〔学会発表〕(計 5 件)
- . _____

日露医

療セミナー(ハバロフスク・イルクーツク 2017年5月31日・6月2日)

- ・ **西部俊哉** 血管内治療ばかりやってアホちゃうか？ー循環器内科に負けない教養を身につけるー 第45回日本血管外科学会ランチョンセミナー（広島 2017年4月19日）
- ・ **西部俊哉** そんなことも知らなかった閉塞性動脈硬化症ー治療を変えた4つの発明ー 第44回日本血管外科学会総会ランチョンセミナー（東京 2016年5月26日）
- ・ **西部俊哉** どうなる？血管外科 歴史から紐解く PAD 最新治療 第56回日本脈管学会総会イブニングセミナー（東京 2015年10月29日）
- ・ **西部俊哉** 血管外科医からみた血管内治療の常識・非常識 第55回日本脈管学会総会ランチョンセミナー（倉敷 2014年10月31日）

6. 研究組織

(1)研究代表者

西部 俊哉 (NISHIBE, Toshiya)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10261306

(2)研究分担者

荻野 均 (OGINO, Hitoshi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60393237