

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670506

研究課題名(和文) 生体素材のみで作る小児用新規動脈グラフトの開発

研究課題名(英文) Fabrication of biological arterial graft for congenital heart disease

研究代表者

横山 詩子 (YOKOYAMA, Utako)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：70404994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は先行研究で、ラット大動脈平滑筋細胞に細胞外基質の薄膜を作ることで細胞を積層し、高い弾性を有する多層の三次元平滑筋細胞シートを作製することに成功した。先行研究の技術をもとに、本研究ではヒト臍帯動脈平滑筋細胞を用いて生体素材のみからなる小児用の新規動脈グラフトを開発することを目的とした。積層の際の細胞密度や培養時間を改良点として、7層で50ミクロン以上の厚みのある細胞積層体を得ることが出来た。さらに、多層積層体の破断張力は、 1874 ± 255 mmHg (718-3138 mmHg)であり、ラット腹部大動脈にパッチグラフトとして移植を行ったところ、5か月後に長期開存性を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that a layer by layer method using gelatin and fibronectin enabled to fabricate three-dimensional multi-layered smooth muscle cells. Based on this technique, we aimed to fabricate implantable arterial grafts. We optimized density of cell seeding and incubation time and obtained seven-layered multilayered smooth muscle cells that have 0.05 mm in thickness. The burst pressure was 1874 ± 255 mmHg (718-3138 mmHg). We implanted the sheet into rat abdominal aorta as a patch graft and found graft patency for five month.

研究分野：循環生理学

キーワード：再生医療 循環器・高血圧 平滑筋 人工血管

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は1%もの児が罹患し、中でも複雑心奇形には外科的根治術が必要であり、人工血管が使用されることが多い。現在はePTFEなどの人工素材や異種心膜が使用されているが、異物であることから遠隔期の石灰化や再狭窄をきたすため問題となっている。近年、新岡らは生体吸収性の管腔素材に自己骨髄細胞を充填した異物の残存しない人工血管を開発し、静脈グラフトとして良好な成績を示している(Shin'oka T, et al., N Engl J Med, 2001; J Thorac Cardiovasc Surg, 2005)。しかしながら、この手法でも動脈圧に耐えられる弾性・剛性は得られていない。つまり、現在は動脈圧に耐えられる生体素材のみからなる人工血管は存在しない。小児に理想的な人工血管とは、異物の残存や石灰化がなく、成長する可能性があるものと考えられている。さらに動脈グラフトには体血圧に耐えられる高い弾性が必要である。しかしながら理想的な動脈グラフトは近年の顕著な再生医学の進歩にも関わらずいまだ実現していない。

申請者は先行研究で、高密度で培養して高度に分化させたラット平滑筋細胞の表面にフィブロネクチンのナノ薄膜を形成することで細胞を多層に積層し、わずか1週間で高い弾性を持つ多層の三次元平滑筋細胞シートを得ることに成功した(特許第4919464号、特願2013-212966、J Biomater Sci Polym Ed, 2012, Adv Drug Deliv Rev, under revision, Atherosclerosis, under revision)。先行研究で得られた技術をもとに、本研究では、血管平滑筋細胞を用いて、動脈圧に耐えられる生体素材のみからなる人工血管を開発することを着想した。

2. 研究の目的

我々は先行研究で、ラット大動脈平滑筋細胞に細胞外基質の薄膜を作ることによって細胞を

積層し、高い弾性を有する多層の三次元平滑筋細胞シートを作製することに成功した。先行研究の技術をもとに、本研究では血管平滑筋細胞を用いて生体素材のみからなる小児用の新規動脈グラフトを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 平滑筋積層細胞体の作製

Layer by Layer 法でフィブロネクチンとゼラチンをラット大動脈平滑筋細胞表面にコーティングして、細胞を7層~10層積層して平滑筋細胞積層体を作製した。

(2) 弾性線維形成の評価

弾性線維の足場蛋白であるフィブリリン分子を標的とした免疫染色を行い、またエラスチカ染色を行い評価した。

(3) 細胞積層体の遺伝子解析

Agilent社のマイクロアレイを用いて、平滑筋細胞積層体と、新生児ラット大動脈平滑筋細胞、ラット成仔大動脈平滑筋細胞、ラット大動脈の網羅的遺伝子解析を行った。

(4) 管腔状グラフトの張力測定

血管張力計測機器(DMT社製TissuePuller)を用いて、作製した細胞積層体の引っ張りに対する張力と伸展度を定量した。伸展速度は100 $\mu\text{m}/\text{sec}$ とし、応力・ひずみ曲線を求め、最大破断張力を求めた。

(5) 細胞積層体の移植実験

横浜市立大学医学部から承認された動物実験プロトコールに従って移植実験を行った。平滑筋細胞積層体を1ミリ×1.5ミリの楕円状にトリミングし、同じサイズのラット大動脈を切除した部分に、10-0糸12針ほどで縫合した。手術後は1週間抗生剤の投与を行った。抗凝固剤の投与は行わなかった。

4. 研究成果

(1) 平滑筋細胞の培養条件及び細胞積層体作製条件の最適化

平滑筋細胞の性質は培養経過の中で可逆的に変化するため、一定の弾性を有する細胞体を安定的に得ることが課題である。我々は、大阪大学明石研究室で開発されたフィブロネクチンとゼラチンを交互に塗布する layer by layer 法を用いて、平滑筋細胞表面に足場を作ることで、平滑筋細胞を三次元的に積層し、平滑筋積層体を作製することが出来ている。この方法を改良することで、安定的に平滑筋積層体を作製することができた。

細胞密度を 100% 以上に高く保って 3 日以上培養したのちに積層培養に供すること、ラット新生児大動脈平滑筋細胞を一日一層ずつ積層すること、を改良点として、7 層で 50 ミクロン以上の厚みのある細胞積層体を得ることが出来、フィブリリン 1 抗体を用いた染色でもラット大動脈に近い弾性線維構造を確認することが出来た（明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子：三次元組織体及びその製造方法、出願番号：JP2015-541635 日本出願日 2016 年 4 月 8 日；明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子：三次元組織体及びその製造方法、出願番号：未送付 米国出願日 2016 年 4 月 10 日）。

また、血管張力計測機器を用いて、作製した細胞積層体の引っ張りに対する張力と伸展度を定量した。市販の人工物から作製されたグラフトと同レベルの長軸方向で 1.3 倍以上の進展性を有する細胞積層体を作製することを目標とした。ラット新生児大動脈平滑筋細胞の培養条件と積層体作製のプロトコル変更することで、長軸方向に 1.3 倍以上に伸展可能な平滑筋細胞積層体を得ることが出来た（サンプル数 = 5）。

（2）細胞積層体の遺伝子発現解析

細胞から作製された産物はロット間のばらつきが大きいことが課題となっている。このため、作製した細胞積層体の品質を確認するために、マイクロアレイを用いて発現遺伝

子を網羅的に解析した。平面培養した平滑筋細胞、細胞積層体、生体の血管組織をそれぞれ比較・解析することで、細胞積層体に最適な培養条件を検討した。

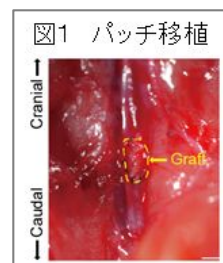
平面培養した平滑筋細胞（n=3）、細胞積層体（n=5）、生体の血管組織（n=3）の遺伝子の挙動をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。クラスタリング解析では、細胞積層体は平面培養した平滑筋細胞とラット大動脈の中間の性質を示し、明らかに平面培養した細胞より、組織に近いことがわかった。中でも細胞積層体の特定の遺伝子は、組織中のものと極めて発現量が近く、細胞積層体作製に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

細胞積層体は本研究の培養条件で適切に生体組織に近い性質を示したことから、プロトコルが現在のところ適切であることが明らかとなった。

（3）細胞積層体のラットへの移植実験（急性期）

ラット新生児大動脈平滑筋細胞を用いて積層を 1 日 1 層ごとに繰り返し、10 日間 10 層の積層体を作製した。用手的に張力を検討したところ、より弾性と剛性が必要であるとの結論に至り、アスコルビン酸添加培地で積層体を 2 週間培養する工程を加えた。

この結果、張力測定装置（DMT 社製 TissuePuller）にて測定可能な範囲である積層体が得られたため、オスラットの腹部大動脈に移植実験を行った。図 1



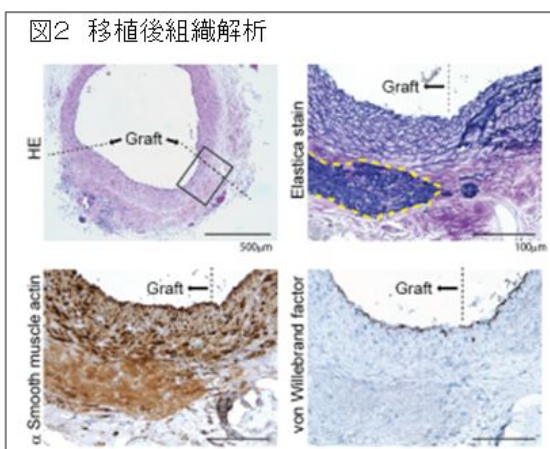
に示すように、ラット腹部大動脈を 1 ミリ × 1.5 ミリの楕円状に切除し、同部位に同じサイズにトリミングした多層積層体を 10-0 の糸で 12 針ほど縫合し、閉腹した。

手術後、尾動脈での血圧も保たれ、腸管運

動も阻害されることなく良好な経過であり、多層積層体は動脈圧に十分耐えられることが確認できた。

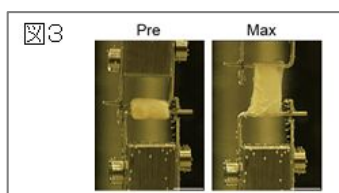
(4) 細胞積層体の移植後の組織解析

移植後のラットは、5か月後に長期開存性を確認することができた。超音波検査により、パッチ移植部位より遠位での血流は層流であることが確認され、狭窄所見は無かった。また、組織学的検討では、図2に示すように、完全に開存が確認できたほか、グラフトとして移植した積層体部分では α smooth muscle actinの発現が認められ、生存性が示唆された。また、ホストのラット大動脈から積層体に連続して、全周性に内皮細胞が被覆されていること、線維芽細胞が外周を被覆していることが確認できた。



(5) 管状グラフトの作製と性能試験

パッチ移植が成功したため、管状グラフトの作製を行いその破断張力を測定した。多層積層体を直径1ミリのガラス管に巻きつけてアスコルビン酸添加培地で2週間培養したのちに張力を測定した。多層積層体の破断張力は、 1874 ± 255 mmHg (718 - 3138 mmHg)であり、十分に動脈圧に耐えられることが確認できた(図3)。



これは、現在冠動脈バイパス移植に用いられている、生体のヒト伏在静脈と同等以上の強さであった。

以上、Layer by Layer法により、ラット平滑筋細胞から多層積層体を作製し、ラットへの移植実験の結果、これらが動脈圧に耐えられることが示された。

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22件)

Yokoyama U, Tonooka Y, Koretake R, Akimoto T, Gonda Y, Saito J, Umemura M, Fujita T, Sakuma S, Arai F, Kaneko M, and Ishikawa Y, Arterial graft with elastic layer structure grown from cells. *Sci Rep*, 査読有, 2017. 7: 140. DOI:10.1038/s41598-017-00237-1.

Akagi S, Nakamura K, Yokoyama U, Kasahara S, Sarashina T, Ejiri K, and Ito H, Enhanced EP4 Expression in a Pulmonary Artery Aneurysm With Dissection in a Patient With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Cardiovasc Imaging*, 査読有, 2017. 10. DOI:10.1161/CIRCIMAGING.116.005839.

Yokoyama U, Ichikawa Y, Minamisawa S, and Ishikawa Y, Pathology and molecular mechanisms of coarctation of the aorta and its association with the ductus arteriosus. *J Physiol Sci*, 査読有, 2017. 67: 259-270. DOI:10.1007/s12576-016-0512-x.

Chetprayoon P, Matsusaki M, Yokoyama U, Tejima T, Ishikawa Y, and Akashi M, Use of Three-Dimensional Arterial Models To Predict the In Vivo Behavior of Nanoparticles for Drug Delivery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 査読有, 2016. 55: 4461-4466. DOI:10.1002/anie.201509752.

Kato Y, Yokoyama U, Yanai C, Ishige R, Kurotaki D, Umemura M, Fujita T, Kubota T, Okumura S, Sata M, Tamura T, and Ishikawa Y, Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読有, 2015. 35: 2617-2625. DOI:10.1161/ATVBAHA.115.306534.

Yokoyama U, Prostaglandin E-mediated molecular mechanisms driving remodeling of the ductus arteriosus.

Pediatr Int, 査読有, 2015. 57: 820-827. DOI:10.1111/ped.12769.
Yamagishi Y, Masuda T, Matsusaki M, Akashi M, Yokoyama U, and Arai F, Microfluidic perfusion culture system for multilayer artery tissue models. Biomicrofluidics, 査読有, 2014. 8: 064113. DOI:10.1063/1.4903210.
Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, Yanai C, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Asou T, Masuda M, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Yokota S, and Ishikawa Y, Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction. Cardiovasc Res, 査読有, 2014. 104: 326-336. DOI:10.1093/cvr/cvu199.
Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, and Ishikawa Y, Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. J Clin Invest, 査読有, 2014. 124: 2785-2801. DOI:10.1172/JCI64784.
Ishiwata R, Yokoyama U, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Akashi M, and Ishikawa Y, Three-dimensional multilayers of smooth muscle cells as a new experimental model for vascular elastic fiber formation studies. Atherosclerosis, 査読有, 2014. 233: 590-600. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.045.
Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, and Ishikawa Y, Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. Circulation, 査読有, 2014. 129: 487-496. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004726.

[学会発表](計42件)

Yokoyama U, Saito J, Sakuma S, Arai F, Kaneko M, Ishikawa Y. In vitro fabrication of functional arterial

graft by suprphysiological hydrostatic pressurization. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2017.3.17-19, 石川県立音楽堂、石川県金沢市)

Horade M, Kaneko M, Tsai CHD, Ito H, Higashino N, Akai T, Yokoyama U, Ishikawa Y, Sakuma S, Arai F. ON-CHIP CELL GYM. The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (2017.1.22-1.26, Las Vegas, USA)

Ishikawa Y, Yokoyama U, Gonda Y, Akimoto T, Sakuma S, Arai F, Kaneko M. Functional arterial graft fabricated from pressurized cell-layers. European Society of Cardiology (2016.8.29, Rome, Italy)

横山 詩子, 石川 義弘 「細胞工学による動脈グラフトの開発」第19回小児心血管分子医学研究会(2016.7.6, 東京ドームホテル、東京)

Taniguchi T, Kaneko M, Yokoyama U. The behavior of different cell groups after the partition wall removal. ROBOMECH2016 (2016.6.8-11, パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

Higashino N, Kaneko M, Yokoyama U, Ishikawa Y. The behavior of cells during Cell Exercise. ROBOMECH2016 (2016.6.8-11, パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

Tonooka Y, Yokoyama U, Koretake R, Sakuma S, Kaneko M, Ishikawa Y. Periodic hydrodynamic pressurization promotes layered structure of human arterial smooth muscle cells. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2016.3.22, 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市)

Gonda Y, Yokoyama U, Koretake R, Sakuma S, Kaneko M, Ishikawa Y. Fabrication of layered elastic fibers in rat arterial constructs by periodic hydrodynamic pressurization. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2016.3.22, 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市)

Chetprayoon P, Matsusaki M, Yokoyama U, Ishikawa Y, Akashi M. New Method for Evaluation of Nano-Drug Carriers by 3D-Arterial Wall Models for Atherosclerosis Treatment. Annual meeting of Society for Biomaterials (2015.4.15-4.18, Charlotte, USA)

Tonooka Y, Yokoyama U, Koretake R, Ishiwata R, Sakuma S, Kaneko M, Ishikawa Y. Fabrication of tissue-engineered human arterial

constructs by cyclic hydrostatic pressure. The 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2015.3.20, 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)

〔図書〕(計2件)

Yokoyama U, Ishiwata R, Ishikawa Y. Eicosanoids and Aortic Aneurysm. *Bioactive Lipid Mediators. Current Reviews and Protocols*. Editors: Yokomizo T, Murakami M. 総頁数 426, ISBN 978-4-431-55669-5, p267-278, 2015, Springer

Yokoyama U, Ishikawa Y., Reconstruction of elastic fibers in three-dimensional smooth muscle cells. *corresponding author *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application*. Editors: Akashi M, Akagi T, Matsusaki M. 総頁数 271, ISBN 978-4-431-55139-3, p159-174, 2014, Springer

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：三次元組織体及びその製造方法
発明者：明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子
権利者：大阪大学・公立大学法人横浜市立大学
種類：特許
番号：PCT/JP2014/ 7708
出願年月日：平成 26 年 10 月 9 日
国内外の別： 国外

名称：三次元組織体及びその製造方法
発明者：明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子
権利者：大阪大学・公立大学法人横浜市立大学
種類：特許
番号：米国 15/028,204
出願年月日：平成 28 年 4 月 10 日
国内外の別： 国外

名称：三次元組織体及びその製造方法
発明者：明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子
権利者：大阪大学・公立大学法人横浜市立大学
種類：特許
番号：JP2015-541635
出願年月日：平成 28 年 4 月 8 日
国内外の別： 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 詩子 (YOKOYAMA, Utako)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：7 0 4 0 4 9 9 4

(2) 研究分担者

郷田 素彦 (GODA, Motohiko)
横浜市立大学・附属病院・講師
研究者番号：3 0 6 4 4 5 7 0

安田 章沢 (YASUDA, Shota)
横浜市立大学・市民総合医療センター
・助教
研究者番号：2 0 4 6 8 1 6 9

(3) 連携研究者

益田 宗孝 (MASUDA, Munetaka)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：1 0 1 9 0 3 6 5

松崎典弥 (MATSUSAKI, Michiya)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号：0 0 4 1 9 4 6 7

(4) 研究協力者

なし