

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10737

研究課題名(和文)小口径人工血管の開発につながる血管内皮細胞生着ダクロンシートの開発

研究課題名(英文)The development of the vascular endothelial cell-coated dacron sheet preceding the narrow graft to utilize coronary artery bypass grafting

研究代表者

林 秀憲 (Hayashi, Hidenori)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30648788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工血管材料であるダクロンシートに血管内皮細胞をcoatingして内皮化する技術を確立し、将来的に冠動脈バイパス術(CABG)に使用可能な小口径人工血管の開発を最終目標とした translational researchにつなげていくことを目的としていたが、ダクロンシートに血管内皮細胞をcoatingしかつ血管内皮細胞の細胞機能を保持できるようにする技術を確立することができず、当初の研究目的を果たすことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的が達成できれば、冠動脈バイパス術に使用可能な小口径人工血管の開発につながる可能性があったが、今回は当初の目的を達成することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Our purpose was to develop the novel method to prepare the vascular endothelial cell-coated dacron sheet to precede the extremely narrow graft to utilize coronary artery bypass grafting. But we could not establish the technique. Therefore, we could not achieve the our aim.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：冠動脈バイパス術 小口径人工血管 血管内皮細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、虚血性心疾患 (ischemic heart disease : IHD) 患者の保存的治療の発達により、IHD 患者の高齢化が進んでいる。また、我が国の食生活等の欧米化が進み、糖尿病合併 IHD 患者や透析導入 IHD 患者の数の増加など、患者背景も複雑化している。それに伴い冠動脈病変も多数かつ複雑化している。2013 年に発表された SYNTAX trial (Mohr FW et al., *Lancet* 381(9867) : 629-638, 2013) では左前下行枝・左回旋枝・右冠動脈のすべてに狭窄あるいは閉塞を有する三枝病変、もしくは左冠動脈主幹部病変を合併する二枝病変に対する冠動脈カテーテル治療 (percutaneous coronary intervention : PCI) に対する CABG の優位性が報告され、日本循環器病学会も上記の病変に対する CABG の適応をエビデンスレベル IA としている (「虚血性心疾患に対するバイパスグラフトと手術術式の選択ガイドライン (2011 年改訂版)」)。日本の胸部外科学会の最新の集計では、2014 年に日本で 15629 例の CABG が行われている。上記の背景で、CABG の標的血管が複数であったり、あるいは透析導入患者で CABG を受けたりする症例は多くなっている。このような症例ではグラフトに制限があることが多い。

グラフトで多く用いられているのは、内胸動脈 (internal thoracic artery : ITA) ・橈骨動脈 (radial artery : RA) などの動脈グラフトや、大伏在静脈グラフト (saphenous vein graft : SVG) のような患者本人から採取された自己の血管であり、人工血管が用いられることはない。大血管の手術では、人工血管が用いられるが、CABG のみならず、膝下より末梢の下肢閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans : ASO) に対するバイパス術など、細い血管には人工血管では血栓閉塞するため用いられない。現在最も細い人工血管は 3mm である。一方、CABG で用いる血管は 2mm 以下であるが、生体の血管は細くても閉塞しない。生体の血管と人工血管の最大の違いは血管内皮の存在であり、人工血管では、移植時は血管内皮が存在しない。現在、人工血管置換術で用いられている woven Dacron の人工血管は、ゼラチンに coat されており、これが、吸収とともに、生体組織に置き換わり、表面が内皮化されると考えられている。ならば、予め in vitro で血管内皮細胞を coating してから移植することで、移植グラフトの血栓閉塞を防ぐことができ、人工血管の細径化を図ることができるのではないかと考えられる。人工血管の事前内皮化についてはこれまでも多数の研究が行われており、生体組織を利用するもの、ePTFE に接着分子のリガンド蛋白のコーティングを行うものなど、多数試みられてきた。しかし、実用化されて臨床で用いられているものはいまだ存在しない。woven Dacron の人工血管は、現時点では最も汎用され、臨床での安定した長期成績が得られており信頼のおける人工血管である。この woven Dacron graft に 最小限の改変を加えて内皮化を促進させることができれば、それが、最も早く臨床応用に到達する手段となると考えられる。我々は、woven Dacron graft の被覆ゼラチンの基質成分を調整することにより、in vitro での事前内皮化に適した人工血管に改良することを考えた。

2. 研究の目的

以前、我々は、in vitro での検討により人工血管被覆ゼラチンの基質成分に細胞外基質タン

パク質に富む腫瘍である EHS マウス肉腫細胞から単離した再構成基底膜成分である Matrigel®を添加する調整をした結果、血管内皮由来細胞株をテフロンシート状に生着・増殖させ、細胞と人工繊維との composite graft を作成できる可能性を示唆した（データ未発表）。しかしながら、上記の検討では内皮細胞の生着率は 14%程度であり、このままでは臨床応用に足る血管内皮細胞生着小口径人工血管を開発するには不十分である。

そこで我々は血管内皮細胞の生着率を上昇させるために、in vitro での細胞培養での feeder 細胞としてよく利用される線維芽細胞を血管内皮細胞と共に生着させることで、生着率の向上を見込めるといふ仮説を立てた。本研究では、上記の仮説を検討することにより、CABG への臨床応用可能な小口径人工血管の開発へつなげることを目的とした。

本研究の目的を達成するために血管内皮細胞成長因子（vascular endothelial growth factor : VEGF）を過剰発現させるように遺伝子改変した線維芽細胞が人工血管の材料であるダクロンシートへの血管内皮細胞の生着作用に影響を与えるかどうかを、再生医療分野ですでに臨床応用されている塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor : bFGF）徐放性 collagen gel を利用して調べる。

3．研究の方法

平成 29 年度には人工血管材料であるダクロンシート上に、ブタ線維芽細胞が生着するために最適な bFGF 添加ゼラチンの条件化を行う。平成 30 年度には HVJ-E を用いてブタ Fb に VEGF 発現プラスミドを導入し、VEGF 過剰発現 Fb 株の確立を目指す。平成 31 年度では前々年および前年度で確立された、bFGF 徐放性 collagen および VEGF 過剰発現ブタ Fb 株を用いて、血管内皮細胞の増殖に及ぼす効果を評価する。平成 31 年度では bFGF 徐放性 collagen および VEGF 過剰発現ブタ Fb 株を用いて、実際にダクロンシート上に効率よく血管内皮細胞を生着させる方法を確立する。

4．研究成果

本研究を進めていく上で、線維芽細胞がダクロンシート上に生着するために最適な bFGF 添加ゼラチンの条件を確立することが必要不可欠であった。しかしながらその条件化が困難であった。また、当初は移植細胞をダクロンシートに生着させる方法を、ゼラチンを細胞の足場として生着させることを細胞濃度や、ゼラチンの濃度を変えることによって、さらには細胞培養用人工基底膜マトリクスである Matrigel®を添加するなどの方法を試みたが、ゼラチンを足場としての方法では、移植細胞を人工心膜シートに生着することは困難であった。また、本研究の目的を遂行するために必要不可欠なもう一つの技術である、血管内皮細胞成長因子を過剰発現させるように遺伝子改変させた線維芽細胞の培養株を樹立に関しても、その VEGF 過剰発現ブタ線維芽細胞株の安定した培養系を確立することができず、これらの理由から、当初の研究目的を成果としてあげることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	金子 政弘 (Kaneko Masahiro) (40433346)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	
研究分担者	吉増 達也 (Yoshimasu Tatsuya) (60316099)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	
研究分担者	西村 好晴 (Nishimura Yoshiharu) (70254539)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	畑田 充俊 (Hatada Atsutoshi) (70508027)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	

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