

機関番号：33302
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20300171
 研究課題名（和文） 血管内皮前駆細胞の流血下捕捉による内皮化小口径人工血管：動物移植実験による検証
 研究課題名（英文） Experimental evidence of in situ capture of endothelial progenitor cells on luminal surface of artificial grafts in bloodstream on porcein model.
 研究代表者
 松田 武久（MATSUDA TAKEHISA）
 金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所・教授
 研究者番号：60142189

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1) 拍動圧に感受して脈動し、生体血管と力学的適合する骨格基材とその成型加工技術をより高精密化し、2) 流血下で内皮前駆細胞のみを選択的に捕捉し、経時的に内皮細胞への分化、増殖、単層形成化による新しい血管再建技術の設計概念、作動原理を提出し、3) そのプロトタイプ・デバイスを作製し、動物実験で検証することを目的とする。作業原理の妥当性とプロトタイプデバイスにおいて実証できた。

研究成果の概要（英文）：

This study aims at in situ capture of endothelial progenitor cells (EPCs) on blood-contacting surfaces of cardiovascular devices in bloodstream. Among various cell surface receptor/legend pairs, only surface-bound VEGF/VEGF receptor pair induced adhesion, proliferation, and differentiation of EPCs in vitro. VEGF-bound stents and artificial grafts generated EPC adhesion and colonization, followed by endothelialization on porcein model. Thus, our prototype surface architecture to propose new concept of providing nonthrombogenic potential on blood-contacting devices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体材料、細胞組織、人工血管、生体力学、動物実験

1. 研究開始当初の背景

生体内で許容され、自己化を獲得する小口径人工血管（内径 5mm 以下）の開発は、心臓血管外科領域で長年希求されてきた。多くの試みがなされたのにもかかわらず、実用化されたものはない。移植早期の血栓形成及び慢性期の内膜肥厚による狭窄につづく閉塞によるものである。研究代表者らは、この分野での約 25 年の多くの動物実験を含む研究歴から、次の 2 つの要素技術が組み込まれた時のみ、小口径人工血管は長期間存機能を発現し、汎用の臨床医療として実現できるものと考えている。

(1) 生体血管との力学的適合する骨格基材 (Mechano-Active Scaffold) とその成型加工技術、

(2) 内皮細胞を被覆して内膜形成する組織工学。

(1) の骨格基材では、代表者らの長年にわたる研究で、高電圧紡糸技術は完成しており、生体血管と同調して力学的適合性を有する人工血管を開発している。これによって、生体組織人工血管吻合部の応力集中、拍動の減衰・消滅等の組織、細胞への傷害・活性化を極力下げることができ、内膜肥厚を抑止できることは実証している。

(2) については、生体外細胞操作による自己の内皮細胞の播種によるハイブリッド血管組織工学については、研究代表者らは、精力的に 1990 年より生体移植実験による組織構築と非血栓性の実証を精力的に行ってきた。

一方、内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC) については、1997 年にその存在 (骨髄から流出) が明らかにされると直ちに着手し、内皮前駆細胞 (末梢血からの選択的純化と増殖) で被覆して人工血管およびステントの移植実験による検証を国内外で初めて行った。しかしながら、いずれの場合にも細胞の採取効率が極めて低いこと、および少なくとも約 2 ヶ月の長期間の細胞培養および操作の期間は、とても緊急性の高い臨床技術になりえない。

これらの事実と経験に基づいて、生体外操作でなく、生体内 (in situ) で EPC を捕捉すれば、全く困難とされていた小口径人工血管およびステントの臨床応用に、極めて高い可能性を与えるシステムを世界で初めて提供できると考えられる。これを実現するためには、

1) 流血下で他の大量に存在する血液細胞 (血小板、白血球) の接着は完全に阻止し、内皮前駆細胞のみを選択的に捕捉し、経時的に内皮細胞への分化、増殖、単層形成化を検証。

2) 接着した細胞の動脈流下での流体力学的安定性の確保。

3) 内皮化が完了するまでの“非血栓性”の発現・維持による新しい血管再建技術の設計概念、作動原理を提出し、そのプロトタイプ・デバイスを作製・動物実験で検証することが必須である。

2. 研究の目的

In situ 捕捉の作業原理は、内皮前駆細胞だけが有する細胞膜の受容体 (レセプタ) を利用して、内皮前駆細胞のみを選択的に捕捉するものである。即ち、細胞に共通に発現している接着白質のレセプタ (インテグリン) を介さず、内皮前駆細胞のみに発現しているレセプタ (内皮増子因子 Vascular Endothelial Growth Factor VEGF) のレセプタ (Flk-1, Flt-1 等) を標的とし、VEGF あるいはレセプタの抗体を材料表面最外層に高密度表面固定する。このような発想および設計原理は国内外で皆無である。ここで予想される障害は、(1) 短期間の非血栓性の確保 (血栓形成が起こると、固定した VEGF が血栓内に埋れる)。そのためには、抗血栓性維持の強力な drug releasing system の導入が必須であり、VEGF と基材の間にヘパリン重合体およびヘパリン含有人工細胞外マトリックスの重合ゲル層を形成させる、(2) 前駆細胞が流血下で捕捉・接着し、また脱着しない接着能とその流体力学的安定性があること、の 2 つの課題を克服すること

が必須である。

上記の2つの問題点を克服できた場合には、緊急性・利便性のある血管再建デバイスとして、まったく新しい作業原理による、国内外で初めての“自己化を獲得した小口径人工血管およびステント”を開発できることになり、血管循環器系人工臓器の“究極のバイオインターフェース”を構築することになる。血管再建に大きな寄与を与えると大いに期待できる。

平成18年—19年度の基盤B（19年度終了）研究では、これらの問題を解決する設計概念 *in vitro* における動脈流の接着安定性についての流体力学的研究および加工技術としてエレクトロスピニングによる小口径人工血管の骨格形成と内腔層の設計を行った。

本研究課題では、ブタ動物実験によって作業原理が妥当であるかを検証し、また、内腔面設計の改良、高精密化を行い、上記の作業原理の妥当性と、プロトタイプデバイスの開発することである。

3. 研究の方法

1. ステント及び人工血管に水酸基を有するポリマー薄膜を塗布し、この表面を活性化して所定の蛋白質を固定する。
2. ブタ頸動脈に人工血管、ブタ冠状動脈にステントを留置。
3. 所定の留置、移植期間の後に摘出し、走査電顕及び免疫染色で付着細胞を同定。
4. RT-PCR 及び ELISA、Western Blot 法で細胞内シグナル伝達機構を解明

4. 研究成果

平成 20 年度

20年—21年度で精力的に動物（ミニブタ）〔短期（1週間）から長期（1年）〕の移植を行い、前駆細胞の接着の有無、内皮化および抗血栓を期間毎に調べ、内腔層設計の手直し改

良を行った。特に、内腔層のコーティング操作、光硬化操作は自動装置を新しく考案し、手作業での製作を省いて再現性を高めた。

具体的には、

- ① 動物移植実験（金沢大・心肺外科：渡邊教授、大竹教授）：
ミニブタの頸動脈（内径 3-4mm）に VEGF 固定化コンプライアント人工血管を移植し、経時的に摘出する。上記の移植期間は1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月とし、各 n=5 の移植実験を行った。
- ② 動物実験の評価（金沢大：渡邊教授、大竹教授、金沢工大：松田教授）：
Flk-1、Tie-2、CD34、AC133 等により接着細胞を免疫染色し、蛍光顕微鏡により前駆細胞および分化した内皮細胞を検出した。
- ③ 人工細胞外マトリックスの最適化：ヘパリン徐放量、VEGF固定化量および固定化法の改良した（金沢工大グループ）。

平成21年度

平成 20 年度に引き続いて徹底的な動物実験、評価および改良を行い、作業原理が正しいかどうか検証し、また上記の自動装置の操作パラメーターを決定した。

平成 22 年度

前駆細胞捕捉の最適化を決定し、医療における革新的アプローチであるかどうかを評価した。ミニブタの頸動脈（内径 3-4mm）に VEGF 表面固定化したコンプライアント人工血管を移植し、経時的に摘細胞表面の膜蛋白質 Flk-1、Tie-2、CD34、AC133 の蛍光免疫染色し、前駆細胞および分化した内皮細胞を検出した。走査電子顕微鏡にて血栓形成、血小板の付着等を検出した。VEGF 固定した表面の内皮細胞の Real-time PCR 法によって分化度の同定を行い、細胞内シグナル伝達機構の持続

的活性化が観測された。

以上、作業原理の妥当性と実証、プロトタイプ技術が開発できた。

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 24 件)

1. “Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at in situ capture of endothelial progenitor cell”, Miyazu K, Kawahara D, Ohtake H, Watanabe G, Matsuda T, *J.Biomed.Mater.Sci.*, 94B: 53-63.2010 査読有。

2. “Experimental use of an elastomeric surgical sealant for arterial hemostasis and its long-term tissue response”, Oda S, Morita S, Tanoue Y, Eto M, Matsuda T, Tominaga R, *Interactive CardioVascular Thorac Surg.* 10:258-261,2010. 査読有

3. “Reversible Hydrogel Formation Driven by Protein-Peptide-Specific Interaction and Chondrocyte Entrapment”, Fuyu Ito, Kengo Usui, Daigo Kawahara, Atsushi Suenaga, Tei Maki, Satoru Kidoaki, Harukazu Suzuki, Makoto Taiji, Masayoshi Itoh, Yoshihide Hayashizaki, Takehisa Matsuda, *Biomaterial.* 31(1):58-66,2010. 査読有

4. “Polymerization of trimethylene carbonate in aqueous solutions: Reaction mechanism and characterization”, Takao Okada, Yukari Imamura, Takehisa Matsuda, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry.* 48(7):1485-1492,2010. 査読有

5. “Multiscale fabrication of a transparent circulation type blood vessel simulator”, Takuma Nakano, Taro Itoyama, Keisuke Yoshida, Yu Sawada, Seiichi Ikeda, Toshio Fukuda, Takehisa Matsuda, Makoto Negoro, and Fumihito Arai. *American Institute of Physics.* 046505-1 ~ 046505-10. 2010. 査読有

6. “Kinetic study on huisgen reaction catalyzed by copper (I): triazol formation from water-soluble alkyne and alkyl azide”, Y. Kasuga, M. Ito, W. Onoda, Y. Nakamura, S. Inokuma, T. Matsuda, J. Nishimura, *Heterocycles.* 78(4), 983-997, 2009. 査読有

7. “Nanoscale elongating control of the self-assembled protein filament with the cystein-introduced building blocks”, Usui K,

Maki T, Ito F, Suenaga A, Kidoaki S, Itoh M, Taiji M, Matsuda T, Hayashizaki Y, Suzuki H, *Protein Science.* 18(5); 960-969. 2009. 査読有

8. “Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells”, D.T. Chang, E. Colton, T. Matsuda, J.M. Anderson, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A.* 91A(4);1210-1220, 2009. 査読有

9. “Kinetic study on Huisgen reaction catalyzed by copper(I): triazol formation from water-soluble alkyne and alkylazide”, Y. Kasuga, M. Ito, W. Onoda, Y. Nakamura, S. Inokuma, T. Matsuda, J. Nishimura*, *Heterocycles*, 78(4): 983-997 (2009). 査読有

10. “Nanoscale elongating control of the self-assembled protein filament with the cysteine-introduced building blocks”, K. Usui, T. Maki, F. Ito, A. Suenaga, S. Kidoaki, M. Itoh, M. Taiji, T. Matsuda, Y. Hayashizaki*, H. Suzuki, *Protein Science*, 18(5): 960-969 (2009). 査読有

11. “Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells”, D.T. Chang, E. Colton, T. Matsuda, J.M. Anderson*, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A.*, 91A(4): 1210-1220 (2009). 査読有

12. “Reversible hydrogel formation driven by protein-peptide-specific interaction and chondrocyte entrapment”, F. Ito, K. Usui, D. Kawahara, A. Suenaga, T. Maki, S. Kidoaki, H. Suzuki, M. Taiji, M. Itoh, Y. Hayashizaki, T. Matsuda*, *Biomaterials*, 31(1): 58-66 (2009). 査読有

13. “Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials”, J.A. Jones A.K. McNally, D.T. Chang, L.A. Qin, H. Meyerson, E. Colton, Il K. Kwon, T. Matsuda, J.M. Anderson, *Journal of biomedical materials research. Part A* 84(1): 158-66 (2008). 査読有

14. “Development of biodegradable scaffolds based on patient-specific arterial configuration”, T. Uchida, S. Ikeda, H. Oura, M. Tada, T. Nakano, T. Fukuda, T. Matsuda, M. Negoro, F. Arai, *Journal of Biotechnology* 133(2): 213-218 (2008). 査読有

15. “Simultaneous Processing of Fibril Formation and Cross-Linking Improves Mechanical Properties of Collagen”, S. Yunoki, T. Matsuda, *Biomacromolecules* 9(3): 879-885 (2008). 査読有

16. “Cartilaginous tissue formation using a

mechano-active scaffold and dynamic compressive stimulation”, Y.M. Jung, S.H. Kim, S-H. Kim, Y.H. Kim, J. Xie, T. Matsuda, G.G. Min, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 19(1): 61-74 (2008). 査読有

17. “In situ harvesting of adhered target cells using thermoresponsive substrate under a microscope: Principle and instrumentation”, H. Takamatsu, S. Uchida, T. Matsuda, *Journal of Biotechnology* 134(3-4): 297-304 (2008). 査読有

18. “Instability of self-assembled monolayers as a model material system for macrophage/FBGC cellular behavior”, J.A. Jones, L.A. Qin, H. Meyerson, Il K. Kwon, T. Matsuda, J.M. Anderson, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* 86A(1): 261-268 (2008). 査読有

19. “Electrospinning fabrication of high-trackable catheter tip with gradually graded or gradient flexibility”, T. Matsuda, D. Kawahara, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* 87B(1): 35-41 (2008). 査読有

20. “Antibody-bound cell microarray for immunophenotyping: surface modification and lymphocyte subpopulations”. Y. Fujii, J.M. Anderson, T. Matsuda, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* 87B(2): 525-537 (2008). 査読有

21. “Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production”, D.T. Chang, J.A. Jones, H. Meyerson, E. Colton, Il K. Kwon, T. Matsuda, J.M. Anderson, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* 87A(3): 676-687 (2008). 査読有

22. “Robotics-based fabrication technologies for engineered tissue”, T. Matsuda, *Seitai Ikogaku* 46(4): 400-406 (2008). 査読有

23. “Development of tailor-made scaffolds for vascular tissue engineering”, T. Uchida, F. Arai, S. Ikeda, H. Oura, M. Negoro, T. Matsuda, T. Fukuda, *Seitai Ikogaku* 46(4): 407-413 (2008). 査読有

24. “Microelastic gradient gelatinous gels to induce cellular mechanotaxis.” S. Kidoaki, *T. Matsuda, *Journal of Biotechnology* 133(2): 225-230 (2008). 査読有

[学会発表] (計 1 件)

“Robotics-based Fabrication of Vascular Graft”, T. Matsuda, The 2nd World Congress of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, Boston USA, 31st August

2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称 : 埋め込み部材
発明者 : 松田武久、渡辺 剛、山岸正和、大竹裕志
権利者 : 金沢工業大学、金沢大学
号 : 特願 2009-250134
出願年月日 : 2009 年 10 月 30 日
国内外の別 : 国内

2. 名称 : 埋め込み部材
発明者 : 松田武久、渡辺 剛、山岸正和、大竹裕志
権利者 : 金沢工業大学、金沢大学
号 : 特願 2009-250130
出願年月日 : 2009 年 10 月 30 日
国内外の別 : 国内

[その他] (計 0 件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 武久 (MATSUDA TAKEHISA)
金沢工業大学・ゲノム生物学研究所・教授
研究者番号 : 60142189

(2) 研究分担者

渡辺 剛 (WATANABE GO)
金沢大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号 : 60242492

大竹 裕志 (OOTAKE HIROSHI)
金沢大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授
研究者番号 : 60283131

(3) 連携研究者

なし