

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390307

研究課題名(和文) 脱細胞小口径血管の早期内皮化処理と長期開存性の達成

研究課題名(英文) Novel neointima-inducing treatment of acellular small-diameter blood vessel for good patency

研究代表者

中谷 武嗣 (Nakatani, Takeshi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：60155752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)： REDV配列を複合化した脱細胞化組織に対してヒト内皮細胞を播種した結果、大きな接着効率の向上が認められた。一方、繊維芽細胞はいずれの修飾表面にも接着しなかったことからREDV修飾表面の高い選択的細胞接着性が認められた。さらにその効果をラットの下行大動脈移植術後の開存性ならびに組織再生解析により検討した。REDV修飾により移植後1か月での開存率は20%から80%へと大きく向上した。さらに、組織染色の結果、移植血管の表面に再生した内皮組織相が確認された。以上の結果より、オリゴペプチドによる修飾により血管の開存率や組織再生能を向上させる事に成功し、大きな成果を得たと考えている。

研究成果の概要(英文)： The peptide containing collagen binding domain and endothelial cells binding sequence has been used as surface modifier for decellularized blood vessel. In this study, endothelial-cell binding peptide, Arg-Glu-Asp-Val (REDV), was conjugated with collagen-binding sequence (Pro-HydroxyPro-Gly)7 (POG)7, and the peptide was immobilized to the luminal surface of the decellularized tissue. Endothelial cell binding affinity of the decellularized tissue surface was greatly improved by the peptide modification in vitro. Decellularized rat abdominal aorta with a diameter of ca. 1 mm was prepared by the UHP treatment and peptide modification, and the peptide-modified graft was transplanted into the rat aorta. Very good patency and endothelialization were observed after 1 month transplantation, while the control grafts rapidly occluded. These results suggested that the peptide modification promoted the endothelialization and tissue regeneration on the graft, and lead to the good patency.

研究分野：移植医療

キーワード：脱細胞組織 小口径血管

1. 研究開始当初の背景

我が国では、年間約6万本の人工血管が使用され、80億円強の市場規模に達している(㈱アールアンドディ調査)が、小口径には適応できず、また、感染に極めて弱い。一つの解決法は組織移植であり、米国では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されている。国立循環器病研究センターでは1999年に組織保存バンクが設置され、提供された心臓弁や血管を凍結保存し、その移植医療を開始し、また、西日本組織移植ネットワークとの連携により円滑な組織移植の普及に努めているところであるが、我が国では年間数十件程度に留まっている。我々は、同種組織の不足を補うべく、生物由来素材を用いた再生型組織移植技術を開発してきた。用いた素材はブタ心臓弁・血管から作成した脱細胞組織である。国内外での脱細胞化技術が、界面活性剤を用いており、残存する界面活性剤の影響で細胞浸潤性に劣ることが知られている反面、国立循環器病研究センターで開発された超高压脱細胞技術(特許登録4092397)では、一切の化学試薬を使用しないために、その細胞浸潤性・内皮化性に優れ長期移植における成長性も観察されている。既に、ミニブタを用いた内径6mm程度の中口径動脈を対象とした動物実験を数十例にわたって実施してきた。

しかしながら、口径2mm以下の小口径人工血管に関しては、その開存性は満足できるものではなく、ラット腹部下行動脈置換実験において2ヶ月までの開存性は20%程度であった。これらのケースでは、内皮化の遅延あるいは不完全さが原因であると考えられ、早期内皮化促進技術の開発が有用である。一方、血管内皮前駆細胞(EPC)を集積することで内皮化を促進して遅延性血栓症を回避する目的で、抗CD34抗体コーティングシステムが報告され、生体内細胞成分の制御システムの有用性が示されている。本プロジェクトでは、脱細胞組織表面に親和性を有し、かつ、積極的細胞誘導性ペプチドプローブを開発し、早期に内皮化する脱細胞小口径血管を開発する

2. 研究の目的

内皮化特性と細胞浸潤性に優れた脱細胞化小口径人工血管を開発する。生体弁や人工血管の多くの問題を解決しようと、欧米では脱細胞アログラフトの研究開発が盛んである。このように優れた生体組織類似性を有する脱細胞組織であっても、小口径人工血管に関しては、その抗血栓性および内皮化特性のみでは高い開存性は得られない。これまでの多数の検討から、早期に内皮化・細胞化を達成した脱細胞小口径血管の術例では開存性が高く、初期の内皮化の重要性が明確に示されてきた。本申請では、内皮化促進性を付与できる新たな自己組織化ペプチドを用いた

脱細胞組織表面修飾を行い、小口径血管開存性の向上を図り、ラットなど小動物でその有効性とメカニズムを実証する。

3. 研究の方法

脱細胞血管の作成 小口径血管をターゲットするために、ラット腹部下行動脈、ならびに、ウサギ大腿動脈を用いる。高压処理により脱細胞化した下行大動脈はその血管壁が脆弱となることが確認されていることから、形状を維持することは容易ではないので、洗浄条件の再考察を行うとともに、その力学的強度、コラーゲン繊維の保存性などを詳細に検討する。

機能性プローブの化学合成と生合成 内皮細胞結合性配列(REDV)、コラーゲン様ペプチド(CLP)およびその複合ペプチド(REDV-CLP)を、定法であるFmoc固相合成法によって合成する。得られた内皮化プローブとコラーゲン分子やエラスチン分子との相互作用の速度論的、定量的解析を、表面プラズモンレゾナンス解析装置(BIACOA)により進めることで、最適な分子構造と配列を有するプローブの設計を進める。一方、これらプローブを様々な濃度、様々な塩濃度の溶液を調製し、脱細胞組織に対して、湿潤環境下、および、乾燥環境下で接触させ、1~24時間37度でインキュベートする。表面に自己組織化結合したプローブ量の測定は、蛍光ラベルした機能性内皮化プローブを用いて測定し、自己組織化の実証は、ATR-IR法を用いて行う。

In vitro HUVEC 接着実験 Q-Dot 625により標識された正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)はオリゴペプチド溶液に浸漬した脱細胞化組織へと播種(2x10⁵cells/tissue)し、37°Cで60分間インキュベートした。PBSで洗浄後、接着している細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、細胞成分を溶解させてQ-dot 625の蛍光強度を定量する。

移植実験 ラット腹部下行動脈への移植実験は常法により行う。従来は、動物犠牲死後にその開存性が評価されてきたが、動物実験3R観点からもMRIを用いた低侵襲的評価法を導入することで、動物実験数を減少するのみならず、移植組織の詳細な経時的評価が可能となる。脱細胞血管群としては、CLP-REDV修飾血管、未修飾脱細胞血管、CLP修飾血管、ELP修飾血管とする。移植1週、1カ月後に、動物を犠牲死させ、その内皮化の程度を直接観察する。

4. 研究成果

(Pro-Hyp-Gly)の7回繰り返し配列とREDV配列を含むオリゴペプチド溶液に浸漬した脱細胞化組織に対して細胞を播種した結果、表面に多くの接着細胞が観察された。また、溶解液の蛍光スペクトル測定から、約80%程度の細胞が接着していることを確認した。一方でコントロール配列のオリゴペプチドを用いた場合や、オリゴペプチド溶液に浸漬しな

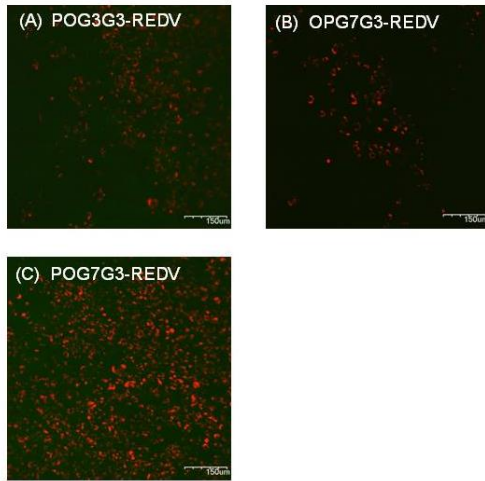


Figure 1 CLSM images of Q-dot 625 labeled HUVEC cells harvested on oligopeptide treated decellularized tissue. Scale bar is 150 μ m.

い場合では、接着細胞はほとんど観察されなかった (Figure 1)。また、繊維芽細胞を播種した場合には、配列特異的細胞接着は認められなかった。以上の結果より、オリゴペプチド溶液に脱細胞化組織を浸漬することで、表面に REDV 配列を修飾することが可能であり、配列特異的に内皮細胞が脱細胞化組織へ接着することが示された。

次いで、オリゴペプチドによる表面修飾効果について検討するため、オリゴペプチド溶液に浸漬した脱細胞化血管をラットの下行大動脈へ移植し、開存性ならびに組織再生について検討した。(Pro-Hyp-Gly) の 7 回繰り返し配列と REDV 配列を含むオリゴペプチド溶液で修飾された脱細胞化血管を移植した結果、移植後 1 か月において約 80% の割合で血管が開存していることが MRI 画像から示唆された (Figure 2)。さらに、組織染色の結果、移植血管の表面に再生した血管組織 (平滑筋細胞と内皮細胞) が示された。しかし、コントロール配列を用いた場合や非修飾の脱細胞化組織では 20~40% 程度の開存率に留まり、有意な内皮化形成は認められなかった。以上の結果よりオリゴペプチドによる修飾

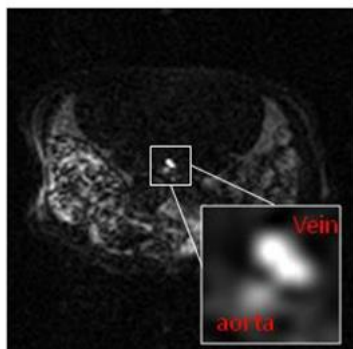


Figure 2 MRI images of abdominal aorta and vein after 1 month transplantation of the decellularized blood vessels modified with POG7G3REDV.

により血管の開存率や組織再生能を向上させたことから、コラーゲン結合性オリゴペプチドにより脱細胞化組織を迅速に修飾できることが示された。

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 18 件)

Toda K, Fujita T, Kobayashi J, Shimahara Y, Kitamura S, Seguchi O, Murata Y, Yanase M, Nakatani T, Impact of preoperative percutaneous cardiopulmonary support on outcome following left ventricular assist device implantation, *Circulation Journal*, 76, 88-95, 2012, 査読有

M. C. Munisso, A. Mahara, Y. Tachibana, J.H. Kang, S.Obika, and T. Yamaoka, Hepatocyte-specific gene delivery with galactose-bearing cationic polymers with different molecular structures, *Advances in Science and Technology*, 86, 86-91, 2013, 査読有

N. Kato, A. T. Kawaguchi, A. Kishida, and T. Yamaoka, Static Cardiomyoplasty with Synthetic Elastic Net Suppresses Ventricular Dilatation and Dysfunction after Myocardial Infarction in the Rat : A Chronic Study, *Artificial Organs*, 37, 593-599, 2013, 査読有

Fujita T, Kobayashi J, Hata H, Seguchi O, Sato T, Yanase M, Murata Y, Sunami H, Nakatani T, Aortic valve closure for rapidly deteriorated aortic insufficiency after continuous flow left ventricular assist device implantation, *J Artif Organs*, 16, 98-100, 2013, DOI IO.1007/s10047-012-0661-5, 査読有

Suwa H, Seguchi O, Fujita T, Murata Y, Hieda M, Watanabe T, Sato T, Sunami H, Yanase M, Hata H, Nakatani T, Paracorporeal ventricular assist device as a bridge to transplant candidacy in the era of implantable continuous-flow ventricular assist device, *J Artif Organs*, 17, 16-22, 2014, DOI 10.1007/s10047-013-0731-3, 査読有

S. Kakinoki, J-H. Seo, Y. Inoue, K. Ishihara, N. Yui, and T. Yamaoka, A large mobility of hydrophilic molecules at the outmost layer controls the protein adsorption and adhering behavior with the actin fiber orientation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(11), 1320-1332 (2013), doi:10.1080/09205063.2012.757726, 査読有

T. Yamaoka, E. Njatawidjaja, A. Kasai, C. A. Agudelo, T. Ehashi, S. Kakinoki, S. Kato, and A. Mahara, Elastic/adhesive double-layered PLA-PEG multiblock copolymer membranes for postoperative adhesion prevention, *Polymer Degradation and Stability*, 98(11), 2168-2176 (2013), 査読有

中谷武嗣、瀬口 理、村田欣洋、佐藤琢真、角南春樹、築瀬正伸、堀 由美子、和田恭一、植込型左室補助人工心臓装着患者における PT-INR 自己管理, *CLINICIAN*, 13(624), 1140-1146, 2013, 査読無

山岡哲二, 人工血管—脱細胞組織をベースにした再生型小口径血管—, *人工臓器*, 42(3), 184-187

(2013) 査読無

Nakajima S, Seguchi O, Murata Y, Fujita T, Hata H, Yamane T, Hieda M, Watanabe T, Sato T, Sunami H, Yanase M, Kobayashi J, Nakatani T, Left coronary artery occlusion caused by a large thrombus on the left coronary cusp in a patient with a continuous-flow ventricular assist device, *J Artif Organs*, 17, 197-201, 2014, DOI:10.1007/s10047-014-0758-0, 査読有

Ueda H, Ikeda Y, Matsuyama T, Ohta-Ogo K, Sato T, Seguchi O, Yanase M, Fujita T, Kobayashi J and Nakatani T, The pathological implications of heart transplantation: Experience with 50 cases in a single center, *Pathology International*, 64, 423-431, 2014, Doi:10.1111/pin.12189, 査読有

Fujita T, Kobayashi J, Hata H, Murata Y, Seguchi O, Yanase M, Shimahara Y, Sato S, Nakatani T, Off-pump coronary artery bypass grafting for a left main lesion due to cardiac allograft vasculopathy in Japan: first report of a case, *Surg Today*, 44, 1949-1952, 2014, DOI 10.1007/s00595-013-0651-0, 査読有

Y. Liu, Y. Inoue, S. Sakata, S. Kakinoki, T. Yamaoka, and K. Ishihara, Effects of molecular architecture of phospholipid polymers on surface modification of segmented polyurethanes, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(5), 474-486 (2014) DOI: 10.1080/09205063.2013.873282, 査読有

S. Sakakibara, Y. Ishida, K. Hashikawa, T. Yamaoka, and H. Terashi, Intima/medulla reconstruction and vascular contraction-relaxation recovery for acellular small diameter vessels prepared by hyperosmotic electrolyte solution treatment, *Journal of Artificial Organs*, 17, 169-177 (2014) DOI 10.1007/s10047-014-0760-6, 査読有

A. Mahara, N. Morimoto, T. Sakuma, T. Fujisato, and T. Yamaoka, Complete cell killing by applying high hydrostatic pressure for acellular vascular graft preparation, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) DOI: 10.1155/2014/379607, 査読有

Y. Liu, Y. Inoue, A. Mahara, S. Kakinoki, T. Yamaoka, and K. Ishihara, Durable Modification of Segmented Polyurethane for Elastic Blood-Contacting Devices by Graft-type 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Copolymer, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25, 1514-1529 (2014) DOI 10.1080/09205063.2014.920172, 査読有

S. Kakinoki, A. Mahara, and T. Yamaoka, Endothelial cell adhesion on ePTFE substrate immobilized with REDV peptide via tyrosine residue, *Peptide Science*, 2014, 321-322 (2014) 査読有

馬原 淳、山岡哲二、リガンド分子を固定化した幹細胞親和界面の医工学的応用、*バイオマテリアル-生体材料-*, 32(2), 120-126 (2014) 査読無

[学会発表] (計 13 件)

越智裕之, 和田恭一, 老田 章, 桑原 健, 藤田知之, 戸田宏一, 宍戸稔聡, 四倉寛子, 瀬口 理, 村田欣洋, 築瀬正伸, 中谷武嗣, 心臓移植患者の真菌感染制御に liposomal smphotericin B が有効であった一例, 第 48 回日本移植学会総会, 2012 年 9

月 21 日, ウィンクあいち (名古屋市)

Fujita T, Toda K, Domae K, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Kobayashi J, Nakatani T, Benefit of tricuspid repair concomitant with left ventricular assist device implantation, *International Society for Heart and Lung Transplantation. 32nd Annual Meeting and Scientific Sessions*, 2012 年 4 月 19 日, Praha, Czech Republic

A. Mahara, Kristi L. Kiick and T. Yamaoka, Elatsin-like polypeptide hydrogel for small-caliber vascular graft, 9th World Biomaterials Congress, 2012 年 6 月 5 日, Chengdu, China

馬原 淳, Kristi L. Kiick, 山岡哲二, エラスチン様ポリペプチドによる小口径人工血管の開発, 第 4 回医用高分子シンポジウム, 2012 年 6 月 25 日, 東京大学 (東京都)

松田祐汰, 馬原淳, 森反俊幸, 山岡哲二, 脱細胞人工血管の自己組織再生に与える線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の影響, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 29 日, 名古屋大学 (名古屋市)

佐藤琢真, 築瀬正伸, 中島誠子, 角南春樹, 瀬口理, 大郷恵子, 松山高明, 池田善彦, 秦 広樹, 藤田知之, 植田初江, 中谷武嗣, 心臓移植における抗体関連型拒絶反応 (移植後冠動脈病変との関連について), 第 50 回日本移植学会総会, 2014 年 9 月 12 日, 京王プラザホテル (東京都)

佐藤琢真, 築瀬正伸, 角南春樹, 瀬口 理, 瀬口周, 金海仁在, 大郷恵子, 松山高明, 池田善彦, 河合 健, 和田恭一, 宮田茂樹, 植田初江, 中谷武嗣, 心臓移植における抗体関連型拒絶反応, 第 23 回日本組織適合性学会大会, 2014 年 9 月 15 日, 長崎大学 (長崎市)

中谷武嗣, 心臓移植管理, 第 19 回日本心臓血管麻酔学会学術大会, 2014 年 9 月 21 日, ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)

中谷武嗣, 遠藤美代子, シンポジウム 19 重症心不全治療の現状と今後 (ハートチームセッション), 第 18 回日本心不全学会学術集会, 2014 年 10 月 12 日, 大阪国際会議場 (大阪市)

馬原 淳, 染川将太, 小林直樹, 平野義明, 木村良晴, 藤里俊哉, 山岡哲二, 小口径脱細胞化人工血管の組織再生メカニズムの検討, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014 年 5 月 29 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

馬原 淳, 染川将太, 北井麻里奈, 大矢裕一, 木村良晴, 藤里俊哉, 山岡哲二, 小口径脱細胞化人工血管の組織再生メカニズムの検討, 第 43 回医用高分子シンポジウム, 2014 年 7 月 29 日, 産業技術総合研究所臨海副都心センター (東京都)

馬原 淳, 染川将太, 北井麻里奈, 大矢裕一, 木村良晴, 藤里俊哉, 山岡哲二, 小口径脱細胞化人工血管の早期内皮化機構の解析, 第 52 回日本人工臓器学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 京王プラザホテル 札幌 (札幌市)

Maria Chiara Munisso, Tetsuji Yamaoka, Selection of endothelial progenitor cell-specific peptides for circulating cell capturing technology, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 19 日, パシフィコ横

浜（横浜）

〔図書〕（計 4 件）

西岡 宏，林 輝行，中谷武嗣，重症集中ケア，日総研出版，57-65，2012

藤並 潤，宮下史生，豊田一則，築瀬正伸，中谷武嗣，脳と循環，メディカルレビュー社，17(3)，243-247，2012

中谷武嗣，今日の循環器疾患治療指針，医学書院，348-349，2013

中谷武嗣，今日の循環器疾患治療指針，医学書院，349-350，2013

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI, Takeshi)

国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：60155752

(2) 研究分担者

山岡 哲二 (YAMAOKA, Tetsuji)

国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

藤里 俊哉 (FUJISATO, Toshiya)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：60270732

馬原 淳 (MAHARA, Atsushi)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

員

研究者番号：80416221

(3) 連携研究者

該当無し