

令和元年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10228

研究課題名(和文)再生血管リモデリング異常のmicroRNA診断および治療手段の確立

研究課題名(英文)Contributing Factors for Optimal Remodeling of Tissue Engineered Vascular Graft

研究代表者

内藤 祐次(Naito, Yuji)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60328466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：再生血管を用いた先天性心疾患に対する治療法は、既存のバイオマテリアルで経験される問題を回避できる理想的な治療法である。本研究では再生血管のリモデリングを制御調節している分子生物学的因子を同定し、再生血管の品質向上を目的とした。再生血管の組織工学的手法をin vivo, in vitroから観察できる圧力印加による方法へ変更し、再生血管リモデリングを解析した。生分解性ポリマーを使用した組織工学的手法は、in vivoでのリモデリングを必要とするが、圧力印加を使用した組織工学的手法は、in vitroにて組織形成のカスタマイズが可能であり、リモデリング異常はきたしにくい可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において再生医療の基幹をなす組織工学の手法について考察した。組織工学では細胞、人工的な細胞外基質(生分解性ポリマーなど)、および増殖因子、サイトカイン等の環境因子が協調しながら組織形成が進むが、その方法論は多彩である。圧力印加による組織工学は、移植前に完成度の高い組織形成を行える可能性があり、血管だけではなく、あらゆる臓器に対応できる組織工学的手法として発展する潜在性が示された。

研究成果の概要(英文)：Tissue Engineered Vascular Graft (TEVG) emerged to solve inherent problem of biomaterial used for surgical repair of congenital heart disease. TEVG requires in vivo remodeling in which TEVG sometimes encounters unexpected tissue overgrowth. The study investigated contributing factors for optimal remodeling of TEVG. Initially, biodegradable scaffold material was used in this study, however, its availability was limited, new method was employed. Yokoyama U et al. described novel method in which arterial graft was fabricated by vascular cells periodically exposed to extremely high hydrostatic pressure (eHHP). This novel method was assembled to analyze extracellular matrix (ECM), therefore, we have employed this method for further analysis. TEVG fabricated by eHHP showed well organized ECM consistent with native vessels without unexpected tissue overgrowth. TEVG fabricated by eHHP has potential to remodel to mimic native vessels in vivo by controlled quality in vitro.

研究分野：再生医療

キーワード：再生血管 組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は 1%の頻度で発生するといわれており、遺伝的要因、環境因子など原因がある程度特定されているものは 15%程度で、残りの 85%は原因のわからない多因子遺伝といわれ、今後も一定の頻度で経験される疾患群である。根治手術には生体適合性の人工補填物（バイオマテリアル）を必要とし、血栓形成、感染源、患児の成長に伴う狭小化・劣化に伴う再手術が必要となり、患児の QOL を著しく低下させている。また、近年の臨床成績の向上に伴い、先天性心疾患を持って生まれた患児が成長した成人先天性疾患の患者は増加の一途をたどっており、成人先天性疾患における人口補填物に対する再手術も増加が見込まれている。

組織工学 (Tissue Engineering: TE) は、生分解性ポリマーを足場として生きた細胞を播種し目的組織を再生する手法で、TE 技術を用いた先天性心疾患に対する治療法は既述の問題を回避できる理想的な治療法である。単心室症に対する Fontan 型手術をはじめとして、TE 技術は臨床応用され始めているが、生分解性ポリマーの吸収過程において再生血管の狭窄 (リモデリング異常) をきたすことが明らかとなった。

近年、MicroRNA(miRNA)をはじめとした分子生物学的な解析法は、病因の解明、診断の新たなツール、また治療手段として目覚ましい進展を見せている。このような観点から、再生血管のリモデリング異常を制御する分子生物学的因子を解析し、その診断、および治療に有効な手段となりうるかを検討したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では再生血管のリモデリングを制御調節している分子生物学的因子を同定し、それらを利用したリモデリング異常の診断、予測方法を確立し、また同定された分子生物学的因子を制御することにより再生血管の品質向上につながる治療法開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では再生血管のリモデリングを制御調節している分子生物学的因子を同定し、それらを利用したリモデリング異常の診断、予測方法を確立し、また同定された分子生物学的因子を制御することにより再生血管の品質向上につながる治療法開発に関する研究を展開する。

リモデリング異常をきたした再生血管における分子生物学的因子の網羅的解析: 生分解性ポリマーより人工血管を作成し、マウスモデルにおいて血管移植術を行う。リモデリング異常をきたした再生血管より RNA を抽出し網羅的解析より、因子を特定する。

同定された分子生物学的因子がリモデリング異常の診断に有用なバイオマーカーとして活用できるかの判定: マウスモデルにおいてリモデリング異常をきたした個体の血清に分泌される分子生物学的因子を測定しその関連を調べる。

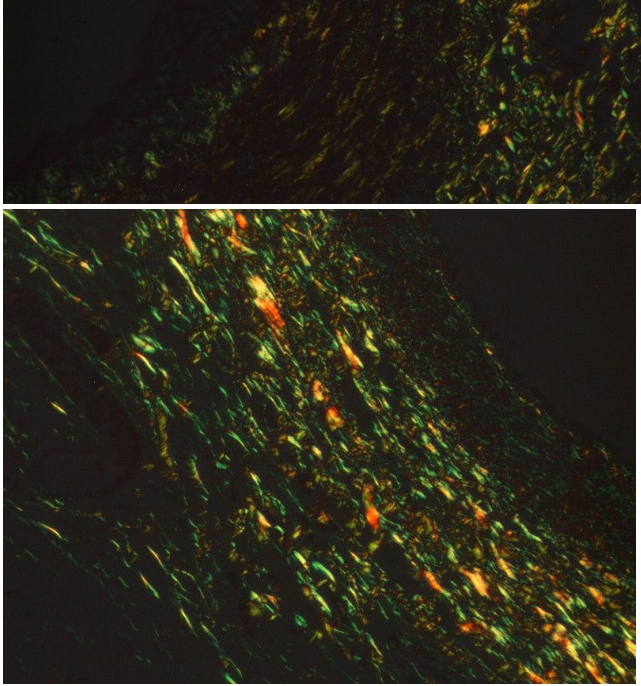
再生血管のリモデリング異常に対する治療技術の開発: 同定された分子生物学的因子は、その発現を制御すること、もしくはそれを投与することにより再生血管のリモデリング異常を予防もしくは治療できるか判定する。

4. 研究成果

当初の計画では、生分解性ポリマーから人工血管を自作にて作成しマウスに移植する予定であったが、国内での生分解性ポリマーの入手が困難であり、再生血管の作成方法を変更せざるを得なくなった。

再生血管の作成方法を Yokoyama らの方法 (Yokoyama U, et al. Sci Rep. 2017;7:140) に変更した。圧力印加による組織培養を用いた組織工学は、新しい組織工学的手法で、コラーゲン、エラスチン等の血管組織の主要な細胞外基質を生理的に構築できることが判明していた。当初の計画では生分解性ポリマーを使用した再生血管におけるリモデリング異常についての研究を予定していたが、リモデリングの過程では細胞外基質の生理学的な再構築が重要であり、圧力印加による組織工学的手法を用いたりモデリングの考察は、重要な知見を得られると考えられた。

圧力印加による組織工学にて作成された人工血管は重層した細胞シートからなり、当初予定していたマウスへの移植は困難と判断し、ラットの腹部大動脈への移植術を行った。移植された再生血管は組織染色にて内膜、および中膜に相当する組織の形成が確認され、また、中膜に相当する組織には免疫染色にて alpha-SMA 陽性細胞が増生していた。特記すべきは、弾性線維染色にて native 血管と同等の弾性線維の増生を認めていた。また、Sirius red 染色にて I 型、および III 型 collagen の再生を認め、機能的にも動脈圧に耐えうる組織が形成されていることが推測された。



また、圧力印加による細胞の変化を捉えるために RNAseq 解析を行った。細胞重層に重要なフィブロネクチンと細胞表面のインテグリンに結合し、フィブロネクチンの安定化に参与する分子である Angiopoietin-like 4 の発現量が圧力負荷によって増加することを見出した。Angiopoietin-like 4 は圧力印加に対する細胞応答の一端を担っている可能性が示唆された。

血管の再生には、細胞外基質，細胞，それぞれが native 組織と同等に統合されることが重要である。生分解性ポリマーを使用した組織工学的手法は，in vivo でのリモデリングを必要とするが，圧力印加を使用した組織工学的手法は，in vitro にて組織形成のカスタマイズが可能であり，リモデリング異常はきたしにくい可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 齋藤純一、横山詩子、高山俊男、洞出光洋、伊藤弘明、須郷慶信、倉澤健太郎、宮城悦子、金子真、石川義弘. 周期的加圧培養による移植可能な血管グラフトの作製. 第 17 回日本心臓血管発生研究会. 2018.12.6 (Session: 2018.12.6). 慶應義塾大学医学部 (東京都新宿区):
2. 齋藤純一、横山詩子、石川義弘. 細胞だけで創る小児用血管グラフトの開発. 第 17 回横浜小児先端医療セミナー. 2017.7.28 (Session: 2017.7.28). ホテル横浜キャメロットジャパン (神奈川県横浜市):
3. Saito, J., Yokoyama, U., Ishikawa, Y. Human gene analysis identified tissue plasminogen activator as a mediator of disrupting the internal elastic lamina in the ductus arteriosus. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.3.XX (Session: 2017.3.28-30). ACT CITY Hamamatsu (Hamamatsu, Shizuoka, Japan):
4. Yokoyama, U., Saito, J., Sakuma, S., Arai, F., Kaneko, M., Ishikawa, Y. In vitro fabrication of functional arterial graft by suprphysiological hydrostatic pressurization. The 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2017.3.XX (Session: 2017.3.17-19). Ishikawa Ongakudo (Kanazawa, Ishikawa, Japan):

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：磯 達也

ローマ字氏名：ISO, tatsuya

所属研究機関名：群馬大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：研究員

研究者番号 (8 桁): 10400756

研究分担者氏名：黒部 裕嗣
ローマ字氏名：KUROBE, hirotsugu
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部
職名：特任講師
研究者番号(8桁): 30380083

研究分担者氏名：粕谷 健一
ローマ字氏名：KASUYA, kenichi
所属研究機関名：群馬大学
部局名：理工学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁): 60301751

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、研究者個人に帰属されます。