

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12905

研究課題名(和文)心再生医療のための脱細胞化冠動脈網内腔の再内皮化

研究課題名(英文)Re-endothelialization of decellularized coronary artery for cardiac regeneration

研究代表者

山岡 哲二 (YAMAOKA, TETSUJI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50243126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラットおよびミニブタ心臓をSDS法および超高压法により脱細胞化し、HE染色およびDNA定量法により脱細胞化の完了を確認した。両手法のうち、得られた組織の透明度が比較的高いSDS法による脱細胞化心臓を選択肢、冠動脈内腔を内皮化誘導ペプチドで修飾した後に、Qdot標識HUVECの懸濁液を、上行大動脈側から心尖側へ所定期間環流した。蛍光実体顕微鏡により3次元鏡観察した結果、内腔修飾条件と環流上件の最適化により、冠動脈主幹のみならず、その下流の比較的内径が細い冠動脈網への細胞播種が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The rat and minipig hearts were decellularized by SDS method or ultrahigh pressure (HP) method, and the decellularization efficiency was confirmed by HE staining and DNA quantification method. Since the SDS-based decellularized heart was much more transparent than that of HP method and then used for cell seeding experiments. The luminal surface of the coronary artery was modified with the endothelial cell-binding peptide, and suspension of Qdot-labeled HUVEC was perfused from the ascending aorta side to the apical side for a predetermined period. Three-dimensional observation by CLMS revealed that HUVECs were seeded not only into the main coronary arteries but also into more peripheral arteries by optimizing modification conditions and cell perfusion conditions.

研究分野：再生医療・脱細胞組織・イメージング

キーワード：細胞・細胞工業材料

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患に対する再生医療として、間葉系幹細胞や骨格筋芽細胞、あるいは iPS 由来心筋細胞を心筋に移植する再生医療が注目されている。再生医療新法も施行されて、臨床化が加速すると期待されているが、その基本的機序はパラクライン効果と考えられており、長期的効果は期待できない。すなわち、初期心筋梗塞に対する処置として有効な薬物療法やステント療法などの補助的治療の域に留まる。また、重症心疾患に対しては、心臓移植あるいは Bridge/Destination 治療としての補助人工心臓(LVAS)しか選択肢は無く、心臓そのものを再生させるような根本的な解決策が期待されている。しかしながら心筋細胞の重層化や3Dプリンターによる細胞配置で心臓自体の再構成は困難である。最大の難関は血管網の構築であるが、複雑な冠動脈構造を3Dプリンターやバイオリアクターで再構成することはできず、それどころか直径3mm以下の血管の開存さえも不可能であった。我々は、最近、直径2mmで長さ30cmという小口径血管の開存化に世界で初めて成功した(Biomaterials, 2015)。具体的には、脱細胞内腔面を血管内皮前駆細胞/血管内皮細胞を捕捉できる機能性ペプチドで修飾して3日以内に内膜様組織の構築を完了させることが可能となった。この技術を用いて、新たな心臓再生戦略を検討する。

### 2. 研究の目的

本研究は、脱細胞化技術により、コラーゲン・エラスチンなどの構造タンパク質の変性を抑制し、かつ複雑な心冠動脈網構造を維持した、脱細胞化スキャホールドを作製することを目的とする。心臓全体を脱細胞処理して、心筋細胞で再細胞化するというアイデアは2012年頃から国内外で検討されているが、心筋細胞を心室・心房内に播種するなど、その3D配置のコントロールは妥当ではない。また、脱細胞心臓の冠動脈内に血液を流せば、たちまち血栓性塞栓につながることは明らかであるので、脱細胞後の冠動脈内腔の内膜化を進めなければならないが、脱細胞組織の細胞接着性は思いのほか低い。我々が、内腔2mmの血管の早期内皮化に成功した技術を冠動脈網内腔に適応し、バイオリアクターによる環流培養により、内腔への内皮細胞の播種、さらには、内膜化へと移行させることを目的とする。2mmの血管の内膜再生と、末梢では極めて細くなる冠動脈網の内膜再生が同じようには行かないが、主たる冠動脈の再生ができれば有効な手段になる。

### 3. 研究の方法

摘出したラット心臓左室にカニューレを挿入して還流装置に接続した。灌流圧77.4mmHgにより10μMのアデノシンを含むヘパリン化PBSで15分間灌流した。その後、12時間1%SDS水溶液を同条件で灌流すること

で脱細胞化した。また、我々が独自に進める高圧処理(HP)による脱細胞化も進めた。さらに、同様に、SDS脱細胞法により、ミニブタ全心臓の脱細胞化も実施した。

冠動脈内腔面の血管内皮細胞接着性を向上させる処理方法としては、コラーゲン分子に親和性を有する(Pro-Hyp-Gly)配列の7回繰り返し配列とREDV配列を有するオリゴペプチド「POG7GGGREVDV」を用いた。対象配列としては、コラーゲン結合部位の不活性配列「OPG7GGGREVDV」、繰り返し配列回数が3回の「POG3GGGREVDV」、REDV部分の不活性配列「POG7GGGREVD」、および配列のミュータントなどの4種類のコントロール配列を検討した。脱細胞処理心臓を、これらのオリゴペプチド溶液に浸漬して60分間処理する処理した。

得られた、ペプチド修飾脱細胞心臓に対して、所定濃度のQdot標識HUVECの懸濁液を、上行大動脈側から心尖側へ環流し、CO2インキュベータ内で5日間灌流を続け、PBSで洗浄後、10%ホルマリン液で固定し、蛍光実体顕微鏡観察した。

### 4. 研究成果

ラット心臓をSDS法、およびHP法で脱細胞した後の組織切片のHE染色により、いずれの脱細胞化手法においても、数日間の洗浄でほぼ細胞成分が除去されており、さらに、DNA定量においても残存DNAが検出限界まで減少した。しかしながら、図1に示したように、SDS水溶液の灌流により心臓組織はほぼ透明になったが、HPによる脱細胞では不透明な状況であった。

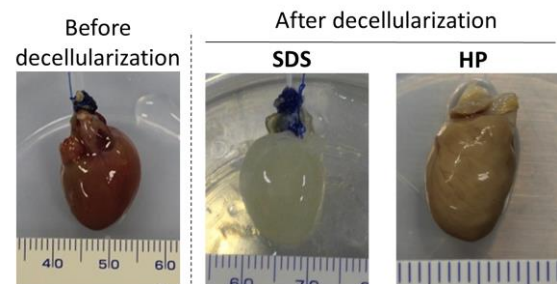


図1 ラット心臓の脱細胞後の外観

一方で、ミニブタ心臓の心筋は厚く、SDS法で2週間洗浄することで図2に示したようにほぼ完全に脱細胞することが出来た。

SDS法による脱細胞化処理では、細胞外マトリックス(ECM)の変性度合いが大きいことが懸念されるが、図1から明らかなように、その脱細胞後の透明度に大きな差があり、今回は、播種細胞の生着を直接観察することが可能なSDS脱細胞化心臓組織を用いて実験を進めることとした。

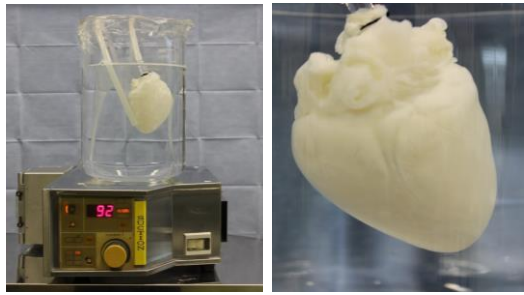


図2 ミニブタ心臓の脱細胞後の外観

ペプチドを固定化した、ラット脱細胞化心臓に対して、灌流培養装置を用いて HUVEC 細胞を循環させた結果、心臓内部において、Qdot625 由来の蛍光発光がみられ、細胞播種が可能であった。しかしながら、内径が大きな一部の血管内への細胞播種にとどまった。そこで、播種上件を変更し図3のような装置を構築して播種効率の向上を図った。



図3 ペプチド修飾脱細胞心臓への HUVEC 播種

改良システムにより播種した HUVEC 細胞 (赤色蛍光標識) の共焦点レーザー顕微鏡観察による 3D 像を図4に示した。冠動脈主幹部だけで無く、その後の分枝の状況も観察することができており、本法により血管内皮細胞を、ある程度の内径の冠動脈に生着させることができたと考えられる。

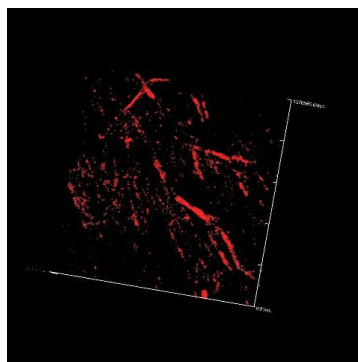


図5 冠動脈網内に播種された蛍光標識 HUVEC の 3D—CLMS 像

心尖部側も含めて、さらに末梢方向への播種効率を向上させることが有効であると考

えられる。我々のグループでは、ラットへの脱細胞血管移植と内皮化実験において、内径 0.5mm の血管の内皮化に成功していることから、リガンドペプチドの固定化条件の再提起かと灌流培養の上件最適化が有効であると考えている。

#### 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3件)

(1) M. C. Munisso, A. Mahara, T. Yamaoka  
Design of in situ porcine closed-circuit system for assessing blood-contacting biomaterials, *Journal of Artificial Organs*, in press (2018) 査読有  
DOI: 10.1007/s10047-018-1042-5

(2) A. Mahara, K. L. Kiick, and \*T. Yamaoka  
In vivo guided vascular regeneration with a non-porous elastin-like polypeptide hydrogel tubular scaffold, *Journal of Biomaterials Research: Part A*, 105(6), 1746-1755 (2017) IF3.076 査読有  
DOI: 10.1002/jbm.a.36018

(2) M. C. Munisso, \*T. Yamaoka  
Novel peptides for small-caliber graft functionalization selected by a phage display of endothelial-positive/platelet-negative combined selection, *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 9354-9364 (2017) 査読有  
DOI:10.1039/C7TB02652H

[学会発表] (計11件)

- (1) 古島健太郎、馬原淳、平野義明、山岡哲二、血管内皮細胞を選択的に誘導する脱細胞血管の新規修飾法、第17回日本再生医療学会総会、口頭、国内、2018年3月
- (2) 馬原淳、古島健太郎、平野義明、山岡哲二、組織再生誘導型小口径脱細胞血管の長期移植と組織応答、第17回日本再生医療学会総会、口頭、国内、2018年3月
- (3) 古島健太郎、馬原淳、平野義明、山岡哲二、シランカップリング修飾剤を用いた組織再生型脱細胞血管への細胞親和性付与、第39回日本バイオマテリアル学会大会、ポスター、国内、2017年11月20日
- (4) 北川和宜、馬原篤、中沖隆彦、山岡哲二、REDV 固定化表面上での血管内皮前駆細胞ホーミングの定量解析、第39回日本バイオマテリアル学会大会、国内、ポスター、2017年11月
- (5) 山岡哲二、山中浩気、Munisso Maria、鈴木茂彦、馬原淳、世界最小口径の脱細胞

胞化血管の要求特性解明と長期開存例、第 66 回高分子討論会、口頭、国内、2017 年 9 月

- (6) 馬原 淳、古島健太郎、平野義明、山岡 哲二、血中循環内皮前駆細胞によるペプチド修飾脱細胞血管の早期内膜形成、第 55 回日本人工臓器学会大会、口頭、国内、2017 年 9 月
- (7) 北川和宜、馬原淳、中沖隆彦、山岡哲二、REDV ペプチドを介した細胞ホーミングのリアルタイム観察、日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第 12 回関西若手研究発表会、口頭、国内、2017 年 8 月 31 日
- (8) 森岡聖文、馬原淳、山岡哲二、ブタ心臓の脱細胞化と冠動脈再内皮化、第 16 回日本再生医療学会総会、ポスター、国内、2017 年 3 月
- (9) 馬原淳、maria chiar munisso、大高晋之、山岡哲二、組織再生誘導型小口径脱細胞血管の開発 1 ～ 内膜の再生誘導を狙ったリガンドペプチドの役割、第 16 回日本再生医療学会総会、口頭、国内、2017 年 3 月
- (10) (2) T. Yamaoka、Novel blood compatible surfaces for cardiovascular biomaterials 、2nd Bone and Biomaterials workshop、口頭、海外、2016 年 8 月
- (11) T. Yamaoka、EPC capturing technology for improving patency of small-diameter(2mm ID) and long(30cm length) acellular blood vessels、3rd International Symposium on Advances in Sustainable Polymers 、口頭、国内、2016 年 8 月

[図書] (計 4 件)

- (1) 山岡哲二、田中昭文堂印刷、特集「再生医療用バイオマテリアルとしての細胞外マトリックス」「バイオリジカルスキヤホールド：脱細胞化組織」バイオマテリアル ー生体材料ー36(2) 142-145 (2018)
- (2) 馬原 淳・山岡哲二、CMC 出版、医療・診断をささえるペプチド科学ー再生医療・DDS・診断への応用ー、機能性ペプチド修飾による脱細胞小口径血管の開存化 第 4 章、157-164 (2017) ISBN 978-4-7813-1267-5 142-145 (2018)
- (3) 馬原 淳、山岡哲二、化学工業社、「界面修飾技術を応用した新たな医療デバイスの開発」、月刊「化学工業」、68(5)、13-16、(2017)
- (4) 山岡哲二、人口臓器、「人工血管と再生型血管」、45(1)、62-66、(2016)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

(1) 名称：血管内皮系細胞に特異的に結合するペプチドの使用、及びペプチド  
発明者：山岡哲二、マリアムニツ、馬原淳、山本敬氏  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：:PCT/JP2018/002886  
出願年月日：平成 30 年 1 月 30 日  
国内外の別： 国外

(2) 名称：血管内皮系細胞に特異的に結合するペプチドの使用、及びペプチド  
発明者：山岡哲二、マリアムニツ、馬原淳、山本敬氏  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2017-014800  
出願年月日：平成 29 年 1 月 30 日  
国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

(1) 「動物の動脈から人工血管」  
日経産業新聞、2017 年 2 月 7 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

馬原 淳 (MAHARA ATSUSHI)  
国立循環器病研究センター・研究所・室長  
研究者番号： 80416221