

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790970

研究課題名（和文） 中膜平滑筋層を有した心臓血管組織再生法の開発

研究課題名（英文） Development of method for cardiovascular tissue engineering  
-Importance of median smooth muscle layer-

研究代表者

六鹿 雅登 (Mutsuga Masato)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80447820

研究成果の概要：

再生医療では理論的には理想的な移植材料を創出するが、心臓血管組織の様に「強靱」かつ「しなやか」な組織再生は未だ困難である。そこで本研究では、心臓血管組織の機械特性を担う「中膜平滑筋層の再生」を目指した研究を行った。まず、平滑筋細胞へ分化可能な骨髄由来間葉系幹細胞を効率的に分化するための手法を検討し、培養液中の添加因子として TGF- $\beta$ 1 とアスコルビン酸、細胞外マトリクスとしてラミニン、動脈同様の機械刺激環境下での培養などそれぞれの有効性を発見した。またそれらの細胞を脱細胞化組織へ磁力を用いて層状に播種する手法を開発した。さらに、中膜平滑筋層の再生を促す、生体吸収性材料を用いた血管の再生を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：再生医療、ティッシュエンジニアリング、血管平滑筋細胞、TGF- $\beta$ 、アスコルビン酸、メカニカルストレス、ラミニン

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療（ティッシュエンジニアリング）の概念は、理論的には理想的な移植材料を創出し得るが、心臓血管組織の様に「強靱」かつ「しなやか」な組織再生は困難である。我々は、その理由は中膜平滑筋層の再生の困難性に起因すると考えた。事実、生体吸収性材料

で、血管組織の置換を行っても、内皮化は速やかに進むが、中膜平滑筋層は 24 週以上経過しても再生しないことを我々は確認している。従って、本研究では、上述の問題点を解決すべく、播種細胞の最適化条件検討と三次元的播種方法の開発、さらには、中膜平滑筋層の再生を促進する、新しい足場材料の開

発を行うことを立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、再生医療（ティッシュエンジニアリング）技術でより良い心血管組織を再生させるための、中膜平滑筋層再生技術を、様々な角度から検討することを目的とする。ティッシュエンジニアリングの研究では、自己の細胞をキープレイヤーとして、足場材料および成長因子・サイトカインといった生理活性物質の三者を総合的に最適化する必要がある。従って、本研究も心血管組織の再生には、これら三者の最適化が目的となる。すなわち、1. 播種細胞、2. 足場材料、3. 培養法の最適化を行う。播種細胞の最適化として、採取の低侵襲化等を考慮し、間葉系幹細胞を用いる。足場材料は、機械特性に優れた脱細胞化マトリクスを用いる。また、さらには、生体吸収性材料の可能性を検討する。培養条件は、液性因子、マトリクス因子、機械刺激の3方向から検討する。

## 3. 研究の方法

上述の3項を念頭に研究を行った。細胞源としては骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた。

### ① 管腔状の足場材料への細胞播種法開発

Magnetic Cationic Liposome (MCL) を用いて細胞内に magnetite を取り込み、磁力を用いた細胞操作法による、構造体への細胞播種法の是非を検討する。

### ② MSC の平滑筋細胞 (SMC) への効率的分化誘導実験

A. TGF- $\beta$ 1 とアスコルビン酸 (AA) （これらを用いた MSC の分化誘導効率の検討）

B. 細胞外マトリクス (ECM; Laminin, Fibronectin, Collagen IV 上で MSC を培養し、分化効率を比較検討する。)

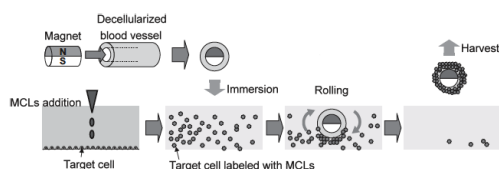
C. メカニカルストレスの影響 （①で構築した、細胞を播種した担体を、bio-mimic な環境（血圧・血流）を作るのが可能なバイオリクター（独自開発）で培養する。)

### ③ 生体吸収性材料による担体の開発

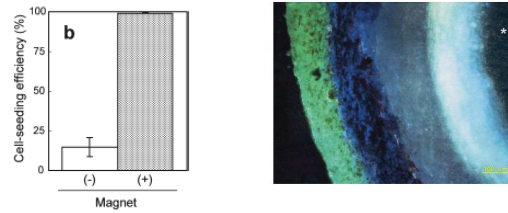
## 4. 研究成果

### ① 管腔状の足場材料への細胞播種法

MCL を用いて下図の如く細胞を磁力によって管腔構造物（脱細胞化血管）に播種した。



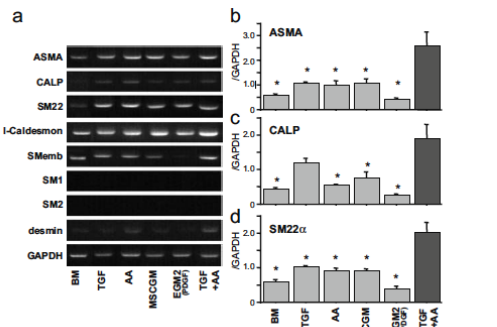
通常の滴下による播種に比して、非常に効率的に細胞播種が可能であった。



### ② MSC の SMC への効率的分化誘導

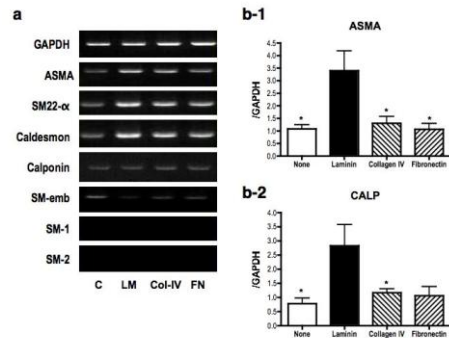
#### A. TGF- $\beta$ 1 と AA

TGF- $\beta$ 1 と AA で有意に MSC の SMC 特異的遺伝子・蛋白の発現を促進した。



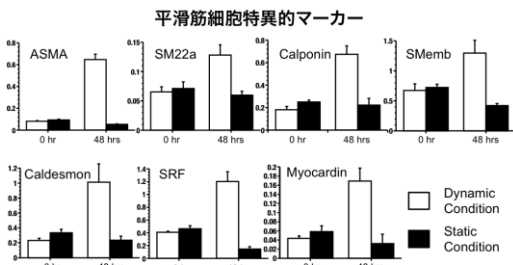
#### B. ECM

3種のECMの比較で、Laminin (LM)が有意にMSCのSMC特異的遺伝子・蛋白の発現を促進した。



#### C. メカニカルストレスの影響

MSC への生理的メカニカルストレスの負荷によって、有意に MSC の SMC 特異的遺伝子・蛋白の発現を促進した。



③ 生体吸収性材料による担体の開発

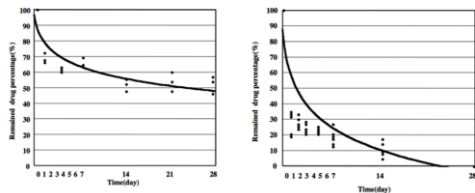
新たな足場材料として、生体吸収性の合成ポリマーを用いて、血管再生用担体を作製した。管腔構造に形成するために、エレクトロスピンニング法を用いた。

ラット頸動脈置換モデルを確立した。

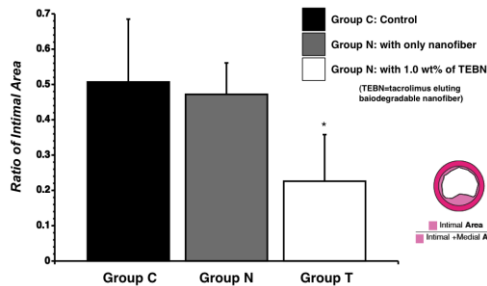


コンプライアンスミスマッチにより、吻合部狭窄が問題となるため、血管用担体と同様の生体吸収性の材料に吻合部狭窄予防（新生内膜肥厚抑制）効果の期待できる薬剤（FK506）を混和し、徐放化するドラッグデリバリーシステムを開発した。

薬剤徐放曲線



これを用いて、吻合部狭窄が予防できることが確認できた。



また、Laminin をコーティングした担体で、ラット頸動脈置換を行うと、何もしなかった群に比し、再組織化が促進された。

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 2 件)

- ①. Mutsuga M, Narita Y, Yamawaki A, Satake M, Kaneko H, Suematsu Y, Usui A, Ueda Y. A new strategy for prevention of anastomotic stricture using tacrolimus eluting biodegradable nano-fiber. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009 Mar; 137(3):

703-9. 査読有

- ②. Mutsuga M, Narita Y, Yamawaki A, Satake M, Kaneko H, Usui A, Ueda Y. Development of novel drug-eluting biodegradable nano-fiber for prevention of post-operative pulmonary venous obstruction. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2009 Jan 12. [Epub ahead of print] 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ①. Mutsuga M et al. Spinal Cord Protection during Thoracoabdominal aneurysm repair: Using vascular tube for intercostal artery reimplantation. 17<sup>th</sup> Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery. 2009. 3. 4-8. Taipei, Taiwan.
- ②. 六鹿雅登他 術後吻合部狭窄予防のための薬剤溶出担体(タクロリムス溶出ナノファイバー)の開発及び基礎的研究. 第 61 回日本胸部外科学会 2008. 10. 12-15. 福岡
- ③. Mutsuga M, et al. Development of novel drug-eluting biodegradable nano-fiber for prevention of post-operative pulmonary venous obstruction. 21<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association for Cardio-Thoracic Surgery. 2008. 9. 13-17. Lisbon, Portugal.
- ④. Mutsuga M et al. A New Strategy for Prevention of Anastomotic Stricture Using Tacrolimus Eluting Biodegradable Nano-fiber. 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Western Thoracic Surgical Association. 2008.6.25-28. Hawaii, USA
- ⑤. Mutsuga M et al. Left Ventricular Restoration for severe congestive heart failure. 16<sup>th</sup> Annual Meeting of Asian Society for the Cardiovascular & Thoracic Surgery. 2008. 3. 15 Singapore
- ⑥. 六鹿雅登他 中膜平滑筋層の再生を目指した骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の分化誘導制御 第 7 回再生心臓血管外科治療研究会 2008 年 2 月 20 日 福岡
- ⑦. Mutsuga M et al. A Quality of life after total arch replacement with Arch-first technique in elderly patients. 15<sup>th</sup> Annual Meeting of Asian Society for the Cardiovascular & Thoracic Surgery. 2007.5.18. Chiang Mai, Thailand

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：循環器治療用綿状構造物およびその製造方法

発明者：六鹿雅登、成田裕司、上田裕一、佐竹 真、兼子博章

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許出願

番号：特願 2 0 0 8 - 1 1 1 2 3 6

出願年月日：平成 2 0 年 4 月 2 2 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

六鹿 雅登 (Mutsuga Masato)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80447820