

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09258

研究課題名(和文) 大動物を用いた人工血管評価と細径人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of a novel bio-resorbable small diameter vascular graft in large animal models.

研究代表者

紙谷 寛之 (Kamiya, Hiroyuki)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30436836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細径人工血管の開発を目指して、PCLナノファイバーをスキャフォールドとした小口径人工血管の機能評価を動物モデルで行った。本研究では、抗血栓性を向上させるために親水性樹脂であるポリビニルアルコールをコーティングしたグラフト(PVA-PCLグラフト)を作成した。ラット腹部下行大動脈移植モデルにおいて、PCLグラフトは自家血管様に再生し長期に開存することを明らかにした。さらに、ブタ冠動脈バイパスモデルを確立し、PVA-PCLグラフトの機能評価を行った。その結果、PVA-PCLグラフトは短期で血栓閉塞したことから、抗血栓性を向上させたグラフト作成方法の改善が次の課題であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PCLナノファイバーをスキャフォールドとした小口径人工血管の実用可能性と今後克服すべき課題を明らかにした。また、ヒトに準じた大動物を使った手術モデルを利用することで、現在の主流である小動物モデルでは見えてこない問題を抽出することが可能になった。本研究は、小口径人工血管の作成を支える技術開発へつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：To develop a small caliber vascular graft, we fabricated a polycaprolactone nanofiber vascular graft coated with hydrophilic polymer, polyvinyl alcohol (PVA-PCL graft), and performed a function test using animal models. Using a rat abdominal aorta replacement model, we demonstrated that PVA-PCL grafts were patent for a long term with neointima formation. To evaluate a feasibility of the graft usage, we established a pig coronary artery bypass graft (CABG) surgery model. With the pig CABG model, PVA-PCL grafts were occluded in 4 hours and did not show patency, suggesting that improvement of graft preparation to add stronger antithrombogenic property will be necessary. Our study highlighted the challenge to overcome and importance to use a clinically resembling CABG model.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：Polycaprolactone 細径人工血管 3Dプリンター 人工血管 PLCグラフト

1. 研究開始当初の背景

6 mm以上の口径を有する代用血管についてはすでにテフロンやダクロンなど、化学繊維を用いた商品が実用化されており、その成績も良好である。しかし、6 mm未満の小口径代用血管、特に冠動脈バイパス術に通常使用されるような4 mm以下の小口径代用血管については、化学繊維を用いた人工血管は短期開存すらしないため、自家血管グラフトが通常使用される。しかし、自家血管は使用可能な長さに限りがあり、また品質が不良でグラフトとしての使用に適さない場合もあり、その場合は手術そのものが不可能となる。したがって、安定供給可能な代用小口径グラフトの開発は心臓血管外科学全体において長年の夢である。小口径代用血管に必要な条件として、①良好な生体適合性、②早期の閉塞を防止するための抗血栓性、③長期開存のための内膜肥厚の抑制の3つが必要となり、それらを兼ね備えた材料が研究されてきたが、未だに解決はされていない。Allograft や Xenograft を脱細胞化し、免疫反応を抑制させた状態で生体内に使用する技術は世界的に長年研究されてきており、申請者らも積極的に取り組んできたが、未だに臨床応用はされておらず、またドナー組織の安定供給性における問題もあり、実用化へのハードルは極めて高い。

一方、近年3Dプリンターを用いた電子紡績法、すなわちエレクトロスピンニング法が Tissue engineering の分野において盛んに研究されている。材料をコンピューター制御されたシリンジから高速で噴出し、ナノファイバーを用いて立体構造を作成する技術であり、工業分野において

はすでに確立された技法であり、3Dプリンターそのものは市販もされている。この3Dプリンターを用いて、ナノレベルでの微細な構造を作成し、医療に用いる各種生体材料を作成するのがこのエレクトロスピンニング法である。本研究における共同研究者であるブラジル Rio Grande 大学の Pranke 教授らは今までは主に歯科領域での Tissue engineering としてエレクトロスピンニング法を用いた材料の研究を行ってきたが、最近では同じ技法を用いてポリカプロラクトン(PCL)由来の人工血管の元となりうる繊維の作成に成功した。彼女らはその PCL 由来のグラフトを抗凝固薬であるヘパリン (Hep) と血管内皮成長因子 (VEGF) でコーティングし、その上にヒト間葉系幹細胞 (MSCs) および内皮前駆細胞 (EPCs) が生着することを証明した。[Pranke et al. Biomed. Mater 2017]。

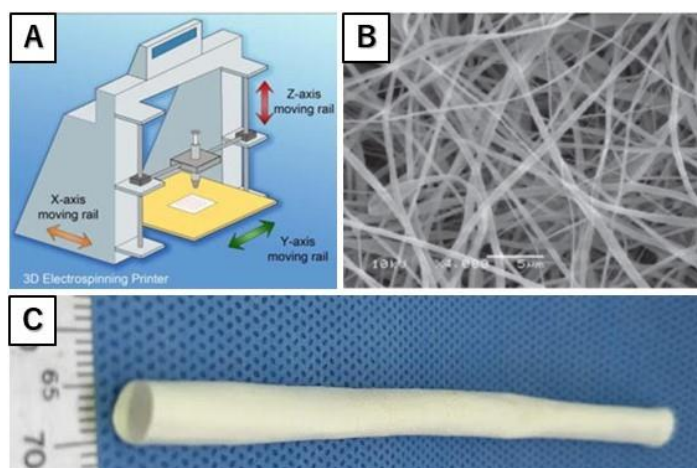


図1 Electrospinning法によるPCLグラフトの作成
A) Electrospinningプリンター、B) PCL繊維の電子顕微鏡像、
C) Electrospinningプリンターで作成したPCLグラフト

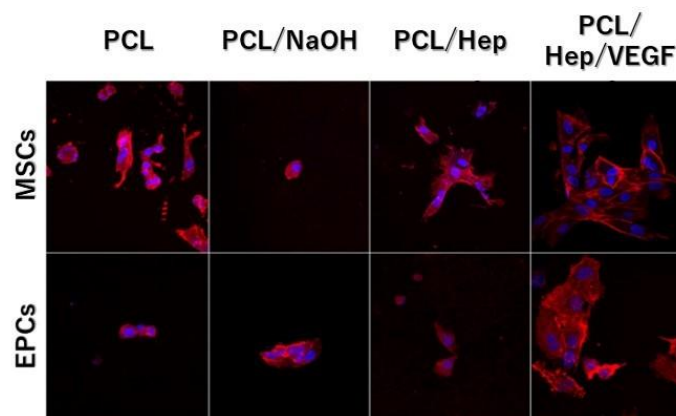


図2 Hep/VEGF修飾はPCLへのMSCsとEPCs生着を促進

2. 研究の目的

本研究では、心臓血管外科における長年の夢である細径人工血管の開発を目指して、PCL ナノファイバーをスキヤフォールドとした小口径人工血管(PCL グラフト)をエレクトロスピンニング法で作成し、動物モデルを用いて人工血管としての機能評価を行うことを目的とした。マテリアルおよび組織工学分野の先行研究から、PCL は生体適合性・分解性樹脂であるとされており、PCL グラフトは移植後にホストの細胞生着が起こり、長期的には PCL ナノファイバーのスキヤフォールドが分解し完全な自家血管化が起こると期待できるので、PCL グラフトが自家組織様に再生される過程の組織学的変化を観察し、そのメカニズムを明らかにする。

上記の実験過程において、PCL の疎水性が抗血栓性の観点から不利であることが明らかとなってきたため、PCL グラフトの抗血栓性を向上させる修飾を検討し、親水化加工を施した PCL グラフトを開発して、そのグラフトの機能評価と自家血管様再生の組織学的特徴を明らかにすることを新たに研究目的として追加した。

3. 研究の方法

1) ラットを用いた PCL グラフトの機能評価

8-9 週齢の Wistar ラットを麻酔下で開腹し、内径 1mm 長さ 5mm の PCL グラフトを腹部下行大動脈に置換した。2 週間または 8 週間後にグラフトを摘出し、グラフトの開存性と組織学的変化を評価した。

2) ブタを用いた PCL グラフトの機能評価

ミニブタまたは実験用家畜ブタを全身麻酔下で胸骨正中切開による開胸を行い、心拍動下で内径 3mm の PCL グラフトを用いて冠動脈バイパス術を行う(上行大動脈-左冠動脈前下行枝)。吻合後、吻合部の中樞側で冠動脈を結紮し、全身管理下において PCL グラフトの開存を開胸のまま超短期でモニターした。

4. 研究成果

1) 簡便に PCL グラフトを作成する方法と親水化加工の開発

エレクトロスピンニング法を用いて、スキヤフォールドの厚さが均一な細径の血管グラフト構造を再現性良く作製することは技術的に困難である。そこで我々は、均一な厚さの PCL ナノファイバーシートを短冊状に切り出し、筒状の鋳型に巻き付けることで均一な厚さの PCL グラフトを再現性良く簡便に作成する方法を開発した。この方法ではナノファイバーを層化するため、中間層に補強材を挿入することが可能であり、グラフトの物理的強度を調整することも可能である。

疎水性物質は血小板を吸着する傾向が強い。PCL は疎水性樹脂のため、その疎水性は抗血栓性の観点からは不利になる可能性が考えられた。そこで我々は、親水性ポリマーであるポリビニルアルコール (PVA) でコーティングし、親水化加工を施した PCL グラフト (PVA-PCL) を開発した。

本研究で確立した、ナノファイバーを用いた人工血管の簡便な作成方法およびその親水化加工方法は特許申請中である(出願番号 特許 2022-073752)。

2) ラットを用いた機能評価における親水化 PCL グラフトの自家血管様再生

親水化加工を施した PVA-PCL グラフトをラットで機能評価を行った。ラットの腹部下行大動脈に移植した内径 1mm の PVA-PCL グラフトは、移植後 8 週間において 80%開存していた。摘出されたグラフトでは、PCL スキヤフォールド内へ自家細胞の移入・生着が認められた(図 3)。また、免疫蛍光染色の結果から、グラフト内腔には内皮細胞と平滑筋細胞は新生内膜の生着が認められ、PVA-PCL グラフトは自家血管様に再生することが明らかとなった(図 3)。

ラットを用いた機能評価において、PVA-PCL グラフトを最長移植後1年まで観察を行い、PCL スキャフォールドの分解が進むかどうか検討した。8週間で摘出したPVA-PCL グラフトと比較して移植後1年のグラフトでは、内膜における平滑筋層の明瞭な層化が認められ内膜の成熟が示唆されたが、PCL のスキャフォールドは残存しており分解している様子はほとんど観察されなかった。

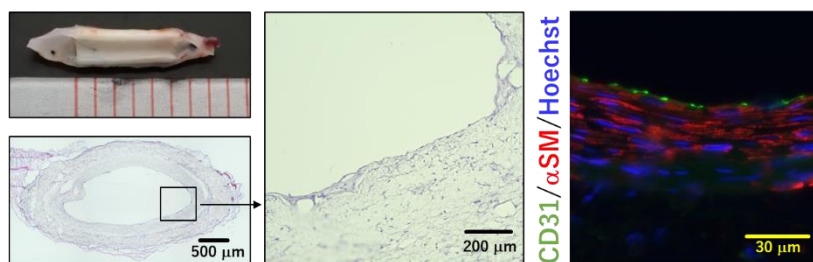


図3 ラット評価モデルにおける PVA-PCL グラフトの自己血管様再生

2) グラフト機能評価に用いるブタ冠動脈バイパスモデルの確立

小口径人工血管を開発する最大の目的は、冠動脈バイパス術など緊急性の高い治療に使える在庫可能な血管グラフトを作成することにある。しかし、グラフト機能を評価するための解剖学的にヒトに準じたモデルは、これまで報告されていない。そこで我々はまず、ブタにおいて内胸動脈を用いた冠動脈バイパス術を行い、グラフト機能を評価するための生存実験が可能かどうか検討を行った。内胸動脈を用いて冠動脈バイパス術（吻合部位の中樞側で冠動脈は結紮）を行ったブタは1週間以上生存し、術後1週間で摘出したグラフトの確認できた。この結果から、ブタ冠動脈バイパス術を用いてグラフト機能を評価可能であることが示され、ヒトに準じた動物モデルで評価系を確立できた（図4）。

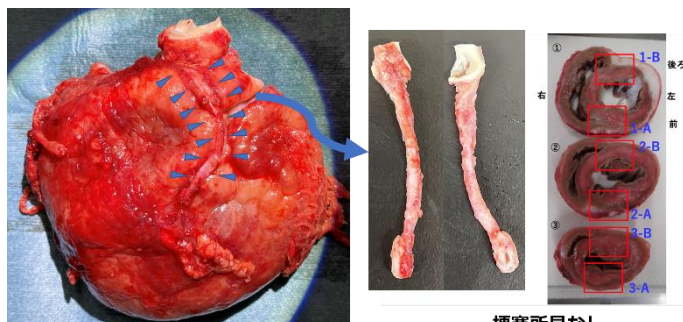


図4 ブタ冠動脈バイパスによるグラフト評価系の確立

3) PCL グラフトはブタ冠動脈バイパスモデルにおいて短期開存すらしめない

内径 3mm の PCL グラフトを、ブタ冠動脈モデルで機能評価を行った。PCL グラフトを用いた冠動脈バイパス術は実行可能であり、吻合後に血液の漏出もほとんど認められず、PCL グラフトは冠動脈バイパス術に耐える十分な強度を持っていることが確認された。しかしながら、バイパス確立から4時間以内に、心電図のST上昇および動脈血酸素飽和度の低下が認められ、心停止となった。摘出したPCL グラフトの内腔には血栓の付着が認められ、血栓閉塞であることが確認された（図5）。この結果から、グラフト作成方法の改善が必要であることが示唆された。

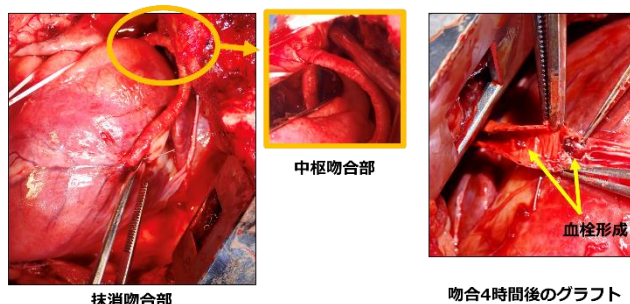


図5 ブタ CABG モデルを用いた PCL グラフトの機能評価

以上の研究成果から、PCL ナノファイバーをスキャフォールドとした小口径人工血管の実用可能性と今後克服すべき課題が明らかとなった。ヒトに準ずる大動物モデルを使うことで、現在の主流である小動物モデルでは見えてこない問題を抽出することが可能になった。本研究は、小口径人工血管の作成を支える技術開発へつなぐと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghiroli DI, Pranke P.	4. 巻 7
2. 論文標題 Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2020.592361.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若林尚宏、小山恭平、筒井真博、菊池悠太、紙谷寛之
2. 発表標題 ポリカプロラクトン製小口径代用血管の親水加工
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池悠太、小山恭平、筒井真博、若林尚宏、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病ラットを用いた生体吸収性小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池悠太、小山恭平、筒井真博、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病病態下における生体分解性小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第34 回代用臓器・再生医学研究会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若林尚宏、小山恭平、菊池悠太、紙谷寛之
2. 発表標題 ラット移植モデルにおけるPCLグラフトの 長期開存性と血管新生メカニズム
3. 学会等名 第58回 日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工血管及びその製造方法	発明者 吉田巧, 紙谷寛之, 小山恭平	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許2022-073752	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小山 恭平 (Oyama Kyohei) (00818479)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	
研究分担者	若林 尚宏 (Wakabayashi Naohiro) (20827745)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究分担者	吉田 巧 (Yoshida Takumi) (80741751)	富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・研究員 (83205)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------