

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09279

研究課題名(和文) 外側からのマクロファージ浸潤により血管再生を促進する吸収性動脈グラフトの開発

研究課題名(英文) The development of bioresorbable arterial graft that promote the vascular remodeling by macrophage infiltration from the outside of the graft

研究代表者

宮地 秀樹 (Miyachi, Hideki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90386235

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)：生体吸収性動脈グラフトは、生体吸収材料が吸収され消失するまでに血管構造が再生される必要がある。我々は細胞浸潤を促すスポンジ層の内層と耐圧性を維持するエレクトロスピンニング法で作成した外層の二層性グラフトを開発した。さらにグラフト外側からマクロファージ浸潤を促し血管再生を促進させる外層を作成するためにポアサイズの異なる外層シートを作成した。in vitro試験では、ポアサイズ2umと10umのシートは細胞浸潤が不十分で、20umは技術的に作成困難であった。以上から本方法での理想的な二層性グラフトの作成は困難であることが判明した。今後は吸収期間の異なる階層構造を持つグラフトを作製していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

理想的な生体吸収性動脈グラフトはいまだ開発途上であり、二層性グラフトはグラフト外側からの細胞浸潤に着目した点で血管再生を促進する可能性が考えられた。しかし理想的な細胞浸潤と耐圧性を得るための二層性グラフトは技術的に困難であった。このことから今後は階層構造を持ったグラフトの作成を行っていくこととした。今回の実験からより理想的なグラフト作製への道筋が一つ開けた可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In bioresorbable arterial graft, the vascular structure needs to be regenerated before the bioresorbable material is absorbed completely. We developed a bilayer graft with a sponge inner layer to promote cell infiltration and an electrospun outer layer to endure arterial pressure. In vitro studies revealed that sheets with pore sizes of 2um and 10um showed inadequate cell infiltration, while sheets with 20um were technically difficult to fabricate. The ideal bilayered graft was difficult to create using this method. In the future, grafts with a hierarchical structure with different absorption periods will be prepared.

研究分野：循環器学

キーワード：生体吸収性動脈グラフト 血管リモデリング 細胞浸潤性試験 血管再生 生体吸収材料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、大血管で人工血管として用いられている延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)等の素材は、耐久性に優れるものの、5年後の一次開存率は50%にとどまる。また冠動脈バイパス術では、血栓閉塞のため人工血管グラフトは使用できず、自己血管グラフトも採取できる数に限界がある。これらの背景から、より低侵襲で多選択的な治療法のため、自己血管グラフトに匹敵する長期開存率を有する小口径人工血管の開発が待たれている。

血管グラフトを含む人工物埋没術では、生体適合性もしくは生体吸収性材料への移行は必然の過程である。1990年代から台頭したTissue engineering (組織工学)では、生体吸収材料の足場(scaffold)を作製し臓器再生を試みた。新岡らは、組織工学を人工血管に応用し、ポリ乳酸/ポリカプロラクトン共重合体(PLCL)で作製したグラフトを、ヒト下大静脈に移植し、長期的に良好な成績を得た(N Engl J Med.2001, Semin Thorac CardiovascSurg.2018)。さらに血管再生の過程においてマクロファージが重要な役割をしていることを示した(Proc Natl Acad Sci USA. 2010)。しかし、生体吸収性動脈グラフトは臨床応用されていない。これは動脈の高圧系に対し、生体吸収性ポリマーの分解に伴う血管グラフトの耐久性の低下と再生血管の力学的強度のバランスが最適化されていないためである。申請者である宮地らは、PLCL製のスポンジ層の内層とポリ乳酸(PLA)で作られた機密性の高い外層を持った二層構造の動脈グラフトを開発し(特開2018-102652)、マウス腹部大動脈への移植実験で良好な開存率を得た(Ann Thorac Surg 2016)。この二層構造は、ポアサイズの大きいスポンジ層で細胞を浸潤させ血管再生を促し、気密性の高い外層で耐圧性を保持した。しかし一方でこの気密性の高い外層は、グラフト周囲からの細胞浸潤を阻害し血管再生を遅延させていた。よって細胞浸潤を促進する外層を有するグラフトの作成が重要と考えた。

2. 研究の目的

生体吸収性動脈グラフトでは、生体吸収材料の分解に伴う耐圧性の低下と再生される新生血管との力学的強度のバランスの最適化が必要である。そのためには早期の血管再生が必要であり、グラフト内への細胞浸潤を促進する外層を構築する必要がある。本研究では細胞浸潤を促進する外層を作成するために、ポアサイズや吸収期間の異なる様々な外層を作成し細胞浸潤性と力学的強度の評価を行い、その後ラット腹部大動脈へ移植し長期成績を評価することとした。

3. 研究の方法

1、二層性動脈グラフトの外層シートの作成

グラフトの内層はPLCLから凍結乾燥法によって、外層はPLAからエレクトロスピンニング法によって作製される。外層は、PLAのポリマー濃度や溶媒を変更することで、様々なポアサイズを作製することができる。まずはポアサイズが2, 10, 20 μm の外層となるべきシートを作製する。

2、異なるポアサイズのシートの細胞浸潤性評価

1で作成したシートの細胞浸潤性試験を行う。In vitro試験としてマウスマクロファージを用い、セルクラウンにシートをはめ込み、マクロファージをシートの上の無血清培地上に播種し、シート下部に血清培地を加え、濃度勾配によりマクロファージがシートの下側にまで浸潤していくかを検討する。シートとしてはコントロールとしてポアサイズ1 μm のポリカーボネート

膜と、外層に当たるポアサイズ2, 10, 20 μmのPLAシート、さらに内層にあたるPLCL製のスポンジシートを用いた。

3、ラット腹部大動脈への移植実験

ポアサイズだけでなく、吸収時間の異なる生体吸収材料を様々な割合で融合することで、吸収時間の異なるシートを作成することができる。そこで吸収時間の異なる階層構造を持ったシートを作製し、ラットの腹部大動脈に移植した。

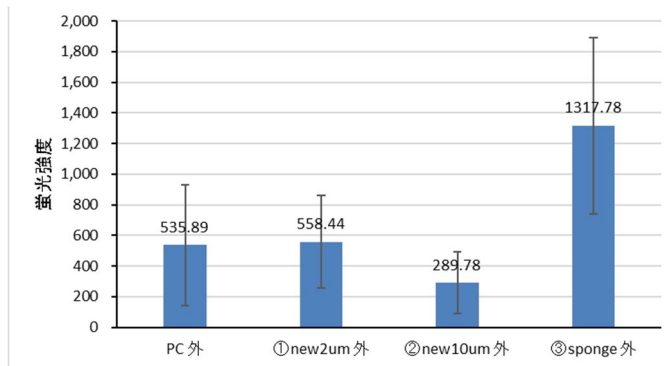
4．研究成果

1、二層性動脈グラフトの外層シートの作成

残念ながら 20μm のポアサイズを持ったシートは技術的に困難であり、耐圧性を持つシートを作成することはできなかった。一方でポアサイズ 2μm と 10μm のシートは作成し得た。

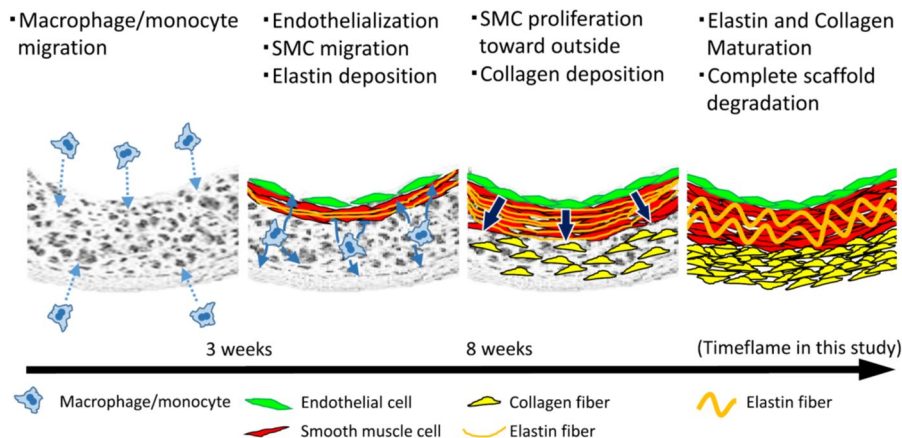
2、異なるポアサイズのシートの細胞浸潤性評価

下図のように 1μm のポリカーボネート(PC)膜でもある程度の細胞浸潤は認められたが、これをコントロールとしても、2μm および 10μm の electrospinning PLA 膜のシートも同様の細胞浸潤性であり、10μm での細胞浸潤性の優位性は示せなかった。一方でスポンジ層は明らかに細胞が浸潤していることを示した。



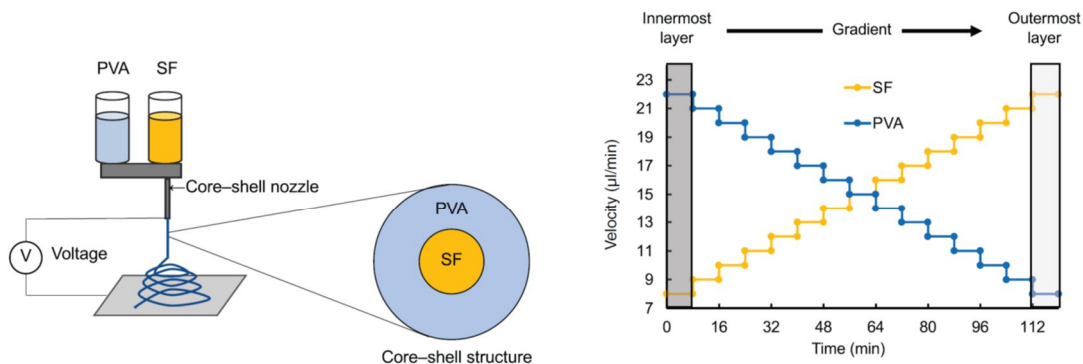
3、ラット腹部大動脈への移植実験

本研究の仮説であったポアサイズの大きいシートの方が、細胞浸潤が多いという結果を示すことができなかった。これは我々の方法で作成した PLA での Electrospinning 膜では有効な細胞浸潤を示すことができなかっただけであり、異なる作成方法では有効な細胞浸潤を示せる可能性がある。一方で大きすぎるポアサイズではグラフトの耐圧性を保持できないことから、本方法では理想的な外層を持つ二層性の動脈グラフトの作成は技術的に困難であることが判明した。一方で、以前から進めていた二層性動脈グラフトの動物実験において、血管リモデリングの構成方法としては、まずは内層のスポンジ層が血管内腔側より分解吸収され、その部位に再生された新生血管が置換されることを示した。(下図, JVS Vasc Sci. 2020;1:57-67)

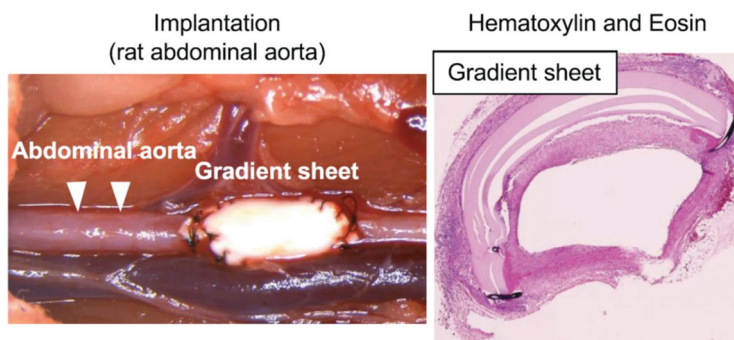


以上の知見から、我々は吸収時間の異なる生体吸収材料を 2 種類 (シルクフィブロイン(SF)と

ポリビニルアルコール(PVA)を用い、その割合を変えることで、内腔側からより早く吸収分解されるシートを作成することを思い付き、それをラットの腹部大動脈に移植する実験を行った。(下図、J Biomed Mater Res A.2022;110:576-584)



グラフトの形に成型するのが現技術では困難であったことからまずはシートを血管の一部に下記の如く植込みを行った。今後階層性シートをグラフトにして長期成績を発表していくとともに、血管リモデリングの形成過程も明らかにしていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuzaki Yuichi, Miyamoto Shinka, Miyachi Hideki, Sugiura Tadahisa, Reinhardt James W., Yu-Chun Chang, Zbinden Jacob, Breuer Christopher K., Shinoka Toshiharu	4. 巻 15
2. 論文標題 The evaluation of a tissue-engineered cardiac patch seeded with hips derived cardiac progenitor cells in a rat left ventricular model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234087	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
1. 著者名 Drews JD., Pepper VK., Best CA., Szafron JM., Cheatham JP., Yates AR., Hor KN., Zbinden JC., Chang Y, Mirhaidari GJM., Ramachandra AB., Miyamoto S, Blum KM., Onwuka EA., Zakko J, Kelly J, Cheatham SL., King N, Reinhardt JW., Sugiura T, Miyachi H, Matsuzaki Y, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Spontaneous reversal of stenosis in tissue-engineered vascular grafts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaax6919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aax6919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hideki Miyachi, Shuhei Tara, Satoru Otsuru, Tai Yi, Yong-Ung Lee, Joseph D. Drews, Hidetaka Nakayama, Shinka Miyamoto, Tadahisa Sugiura, Toshihiro Shoji, Christopher K. Breuer, Toshiharu Shinoka	4. 巻 -
2. 論文標題 Imatinib attenuates neotissue formation during vascular remodeling in an arterial bioresorbable vascular graft.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JVS: Vascular Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvssci.2020.03.002	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 -
1. 著者名 Koyanagi Eri, Tara Shuhei, Sakata Chiemi, Shimada Kazumi, Kato Konosuke, Miyachi Hideki, Tanaka Ryou, Nakazawa Yasumoto	4. 巻 110
2. 論文標題 A novel gradient and multilayered sheet with a silk fibroin/polyvinyl alcohol core?shell structure for bioabsorbable arterial grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 576 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.37309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	中澤 靖元 (Nakazawa Yasumoto) (20456255)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	大石 由美子 (Oishi Yumiko) (80435734)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

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
---------	---------