

機関番号：16101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500409
 研究課題名（和文）細胞接着因子のコーティングによる小口径脱細胞化グラフトの再細胞化に関する研究
 研究課題名（英文）Recellularization of small artery graft by cellular adhesion factor coating techniques.
 研究代表者：神原 保 (KANBARA TAMOTSU)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20380082

研究成果の概要（和文）：

直径3mm程度の植物繊維からなる鋳型を使用し、豚を用いて開存性評価を行ったが、最終的に約25%程度の一ヶ月開存性しか保てなかった。原因としては、モデル動物としての豚動脈のspasmに起因する急性閉塞、加えて、細胞接着因子等でのコーティングを試みたにもかかわらず鋳型自身の血栓性を完全に排除できなかったことが挙げられる。今後、これら問題点を解決し、微小血管グラフト開発につとめたい。

研究成果の概要（英文）：

We made the vascular scaffold of 3 mm in diameter made from plant fiber, and implant these to cervical artery or femoral artery in pig. But the patency of these at one month after implantation was 25 % of all. The reasons of obstruction were indicated below. One is due to spasm of artery in pig. And another is due to acute thrombosis.

So we need to resolve these problem in near future, and try to make small artificial artery graft, which we can use in vascular surgery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学・細胞組織工学

キーワード：脱細胞化，小口径グラフト

細胞接着因子，コーティング，再細胞化

1. 研究開始当初の背景

わが国では年間2万件の冠動脈バイパス(CABG)が施行されグラフトとして大伏在静脈・内胸動脈・橈骨動脈等が用いられている。現在、良好な開存性を期待できる3mm径の小口径グラフトはいまだ開発されておらず、近年増加しているs/p CABG例や透析例では使用できるグラフトが無いことからCABGが

施行できないことがある。近年、骨髄または末梢間葉系幹細胞の存在が明らかになり、創傷治癒、組織再生における重要性が明らかになりつつあり、その役割と応用に関心が集まっている。Haverichらは、微小血栓や内膜肥厚を来さない再細胞化の誘導可能な、自己内皮様幹細胞を播種した同種脱細胞化肺動脈弁を複雑な工程で作成し、子羊モデルに移植して良好な結果を得ている

(Circulation. 2006;114[suppl I]:I-559)。また11歳と13歳の小児に移植し、弁の成長を示唆する良好な結果を報告している(Circulation. 2006;114[suppl I]:I-132-7)。Haverichらが行った方法も、同種脱細胞化肺動脈弁に自己の内皮様幹細胞を播種するといった複雑な工程を経て初めて良好な結果を得ていた。我々は、末梢血からの幹細胞分離と脱細胞化シートへの再細胞化(Masuda Y, et al. "Tissue engineered tri-leaflet heart valve assembled from small intestine submucosa with circulating endothelial progenitor cells" at 2nd Asian Pacific Scientific Forum of AHA, 2003)に関わってきたが、より単純で実際的な処理方法の必要性を痛感していた。

また、以前より、ブタ肺動脈弁の脱細胞化の研究を行ってきた。そこで、この脱細胞化技術をさらに生かして、脱細胞化細動脈を作製し、細胞接着因子コーティングすることにより、自己の内皮様幹細胞が脱細胞化細動脈に効率的に接着・誘導され、自己の内皮様幹細胞播種に代わる手段の開発ができないかと考え、本研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

脱細胞化細動脈グラフトをコラーゲン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン、ポリL-リジン、ポリD-リジン、ラミニン、テネシシン、トロンボスポンジン、N-カドヘリン等の細胞接着因子でコーティングすることにより、グラフトに骨髄由来間葉系幹細胞を播種せずとも、播種したのと同様のグラフト再細胞化が得られるか明らかにする。

3. 研究の方法

<ブタ脱細胞化細動脈グラフトの細胞接着因子によるコーティング>

(1) 脱細胞化ブタ細動脈グラフトの作製：

我々の独自の、基質の健全性を温存しながらの完全な脱細胞化が可能である水酸化アンモニウム・トライトン法を用いてブタ細動脈を脱細胞化する(Masuda Y, et al. Matrix structure of the decellularized pulmonary valve, 19th WSCTS)。脱細胞化後の組織をよく洗浄し、試薬の毒性を取り除く。

(2) 脱細胞化細動脈グラフトの細胞接着因子によるコーティング：作製した脱細胞化細動脈グラフトに細胞接着因子をコーティングする。細胞接着因子はコラーゲン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、ゼラチン、ラミニン、N-カドヘリンなどを使用する。

(3) 脱細胞化細動脈グラフトのコーティング効果の確認：細胞接着因子によりコーティングできているかどうかを、組織学および免疫染色により評価し、各細胞接着因子のコー

ティング条件をそれぞれ検討する。

<コーティング脱細胞化細動脈グラフトへの培養細胞の播種、接着実験>

(1) コーティング脱細胞化細動脈グラフトへの培養細胞の播種とその接着の評価：コーティング脱細胞化細動脈グラフトに培養線維芽細胞または内皮細胞を播種する。予め、線維芽細胞または内皮細胞をGFP(Green fluorescence protein)でラベリングしておき、共焦点レーザー顕微鏡により立体的な播種細胞の接着を観察する。

(2) 望ましいコーティング脱細胞化細動脈グラフト作成条件の決定：各細胞接着因子と播種細胞の接着効率を検討し、そのin vivo環境への移植後に流血中のEPCsを誘導し、接着、再細胞化させやすいコーティング脱細胞化細動脈グラフトを選定する。

<コーティング脱細胞化細動脈グラフトのミニブタ頸動脈モデルへの移植>

(1) コーティング脱細胞化細動脈グラフトの移植：in vitroにおいて決定した“望ましいコーティング脱細胞化細動脈グラフト”作製条件下に作製した同種グラフトをミニブタ頸動脈モデルへ移植(間置)する。対照として、コーティングしていない脱細胞化細動脈グラフトを対側の頸動脈へ移植する。

(2) 再細胞化の評価：コーティング脱細胞化細動脈グラフトとコーティングしていない脱細胞化細動脈グラフトを、移植の1ヶ月後に取り出して、その開存性について観察し、組織学的に、また免疫組織染色にて自己内皮様幹細胞がグラフト内膜面に接着しているか、再細胞化がおきているか明らかにする。また、再細胞化細胞の性格(Myofibroblast, Fibroblast, Smooth muscle cells)とその分布に関しても、免疫染色の各種細胞内骨格抗体を用いたVDA(Vimentin, Desmin, α -SMA)法により明らかにする。

4. 研究成果

植物繊維からできた直径3mmの人工血管作製し、本人工血管のmatrix自体が長い時間を経れば体内で分解され、自己組織で置換され、より自己組織に近い状態での微小血管の作成が期待し、豚での移植実験を試みた。

人工血管の機能評価のためには、実験系・評価方法の確立もまた重要であるが、我々は、食用豚50kg前後のものを全身麻酔し、頸動脈・大腿動脈を剥離し、全身ヘパリン投与後に、前述の直径3mmの人工血管にて置換する一連の系を確立した。移植後の結果としては、前述の人工血管を用いた微小人工血管の頸動脈・大腿動脈への移植実験では、吻合部の狭窄がないにもかかわらず、約二ヶ月後には

閉塞を来しており、グラフトの抗血栓性の開発が至上課題である一方、動物実験での評価方法確立は十分になしえた。

前述のすぐ血栓化した植物繊維から作成した鋳型を改良し、より porosity を改善した鋳型を作製し、豚頸動脈移植実験を再度行った。約 20-25%の確率で、約 1ヶ月後も閉塞せず、開存する結果となった。これら結果では、細部の人工血管内への浸潤が認められ、一部ではすでに組織が自己組織へと置換されてきている所見も確認し得た。

一方で、残る約 7-8割は閉塞してしまうのが現状で、その原因として①豚 spasmによる急性閉塞と②人工血管に起因する急性閉塞が考えられる。術直後に造影を行うと、移植前後で血管は収縮しており、それに起因する slow flow が確認され、しばらくすると血栓化してくる様子が確認できた。塩酸パパペリンの局所投与などを試みたが、やはり豚の種に起因する問題である。

今後、試験動物として豚が適切かどうか再度検討を要すると考えられた。また後者の人工血管に起因する急性閉塞に関しては、本グラフトをもとに細胞接着因子やヘパリンなどの付着を試みたものの、やはりグラフトへの安定的な定着性が問題となり、結果改善にはつながらなかった。

人工血管の機能評価のためには、実験系・評価方法の確立もまた重要であるが、我々は、食用豚 50kg 前後のものを全身麻酔し、頸動脈・大腿動脈を剥離し、全身ヘパリン投与後に、前述の直径 3mm の人工血管にて置換する一連の系を確立したが、前述のように動脈攣縮が問題であり、今後、この予防を如何に行った上で実験を行うかが重要であると思われる。

今後、本研究中に得られた知見を活用して、微小人工血管の急性期血栓によるグラフト閉塞の防止を主眼に置いて、実用化に向けてさらに改良を加えて行きたい。

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 4 件)

1. Fujimoto E, Yoshizumi M, Kanbara T, Kurobe H, Motoki T, Sugano M, Nakayama T, Kitaichi T, Kitagawa T
Functional restoration of endothelial cells of the cryopreserved heart valve.
Gen Thorac Cardiovasc Surg.
59(3):169-74. 2011 査読有

2. Kurobe H, Urata M, Ueno M, Ono S, Ishizawa Y, Fukuhara Y, Gukuhara Y, Yu L, Ripen AM, Kanbara T, Aihara K, Ishizawa K, Akaike M, Gonzalez FJ, Tamaki T, Takahama Y, Yoshizumi M, Kitagawa T, Tomita S.
Role of Hif-1 α in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling American Heart Association Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 30(2):210-7, 2010
査読有

3. Matsui N, Nakane S, Nakagawa Y, Kurobe H, Takizaw H, Mitsui T, Kondo K, Kitagawa T, Takahama Y, Kaji R
Undeclared Regulatory T Cells in the Thymus of Myasthenia Gravis Patients Neurology 74(10):816-20, 2010 査読有

4. Yoshida H, Kitaichi T, Urata M, Kurobe H, Kanbara T, Motoki T, Kitagawa T
Syngeneic Bone Marrow Mononuclear Cells Improve Pulmonary Arterial Hypertension Through Vascular Endothelial Growth Factor Upregulation.
J Thorac Surg:88(2):418-24, 2009 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 神原 保
術後長期遠隔期に縦隔炎、感染性瘻孔を形成した大動脈弁置換術の一例
第 53 回関西胸部外科学会学術集会
2010 年 6 月 24 日 名古屋国際会議場
2. Taisuke Nakayama
Perioperative management of cardio-thoracic surgery in renal transplant recipients
第 18 回アジア心臓血管外科学会総会
2010 年 2 月 28 日 インド
3. 神原 保
既製品のステントグラフト導入前後の開腹腹部大動脈瘤手術症例の検討

第 37 回日本血管外科学会学術総会
2009 年 5 月 13 日 名古屋国際会議場

4. 神原 保

虚血肢に対するエリスロポエチン誘導自己
末梢血単核球移植治療の有用性
第 39 回日本心臓血管外科学会学術総会
2009 年 4 月 22 日 富山国際会議場

5. 神原 保

当院におけるエリスロポイエチン誘導自己
末梢幹細胞移植治療の検討
第 109 回日本外科学会定期学術集会
2009 年 4 月 2 日 福岡国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.toku-cvs.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原 保 (KANBARA TAMOTSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教

研究者番号：20380082

(2) 研究分担者

北川 哲也 (KITAGAWA TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・教授

研究者番号：80240886

川人 伸次 (KAWAHITO SHINJI)

徳島大学病院・講師

研究者番号：60284296

黒部 裕嗣 (KUROBE HIROTSUGU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教

研究者番号：30380083

浦田 将久 (URATA MASAHISA)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：40448337

(H20)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：