

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20700393

研究課題名（和文）サケ皮由来伸縮性コラーゲンをを用いた生体置換型人工血管の開発

研究課題名（英文） Development of biodegradable vascular grafts from salmon skin-derived elastic collagen

研究代表者

永井 展裕（NAGAI NOBUHIRO）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30400039

研究成果の概要（和文）：サケ皮由来伸縮性コラーゲンチューブは、伸縮性に優れた生体置換型人工血管としての利用が期待できるが、縫合性と生体置換性に課題があった。そこで、コラーゲン線維の密度増加、高分子の混合、フィブロネクチンの固定化を検討した結果、引裂強度（縫合性）、内皮細胞接着性（生体置換性）を改善した。

研究成果の概要（英文）：Elastic collagen tubes derived from salmon skin are promising vascular grafts. However, they have some drawbacks such as poor suturability and biodegradability. In this study, we investigated the improvements of mechanical strength and endothelial cell attachment of the collagen tubes by increasing the fibrillar density of collagen matrix, mixing polymers in the collagen matrix, and adsorbing fibronectin on the tubes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：コラーゲン、人工血管、再生医療、サケ皮コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

人工血管基材（グラフト）は合成高分子のDacron（polyethylene terephthalate）とePTFE（expanded polytetrafluoroethylene）が主に利用されている。しかし、これらは生体適合性と柔軟性に乏しいため、血液凝固反応（血栓形成）による血管閉塞を起こす危険性が高い。そのため、心筋梗塞治療で用いる冠動脈バイパス用の小口径人工血管（口径5mm以下）への適用は困難である。

従って現在は自己血管を切除して利用する自己犠牲的な治療が行われている。しかしこれは患者への負担が大きい上、移植に適合する血管の質や数には限りがあるため、閉塞の起こらない小口径人工血管の開発が強く望まれている。

上記の問題を解決するために、我々は再生医療を指向した生体置換型人工血管を検討している。これは基材が組織再生の足場として働きながら分解消失して最終的に自己化

(生体置換)する血管を意味する。すなわち生分解性グラフトを用いた自己血管の完全再生を狙っている。

グラフトとしてサケ皮コラーゲン由来の伸縮性コラーゲングル (e-Gel) を利用した。この e-Gel は伸長率 230%を示す世界初の伸縮性コラーゲン担体である。e-Gel は合成高分子基材よりも優れた生物学的特性 (生分解性、細胞親和性) と力学的特性 (破裂圧 1400mmHg 以上、柔軟性) を示すため、グラフトとして最適と考えた。

e-Gel を口径 3mm のチューブに加工しラット腹部大動脈へ移植した。その結果、良好な拍動追従性と血液適合性を示し、移植 4 週後に血栓形成がほとんどなく開存性が非常に良かった。一方、内皮細胞の接着性が悪いため、生体置換に時間を要することが示唆された。また、縫合時に基材が針穴から裂けるため、縫合性の改善 (引裂強度の改善) が課題として残った。

2. 研究の目的

そこで本研究は、下記の項目を検討することを目的とした。

(1) 引裂強度改善による縫合性の改善

手術者の負担を軽減するためには e-Gel の縫合性を改善する必要がある。本研究では e-Gel の引裂強度改善を目的に、コラーゲン重合反応を促進することによって太く強靱なコラーゲン線維を持つ e-Gel を作成する。同時に血管主要成分のエラスチンを混合して、コラーゲン/エラスチンダブルネットワーク構造を持つバイオミメティック人工血管を作成する。また、コラーゲンと化学架橋する合成高分子の混合を検討する。さらにコラーゲン線維の規則正しい配向化による引裂強度改善を検討する。

(2) 内皮細胞接着性の改善

血管内腔面の内皮化は血管内の恒常性を保つ上で非常に重要である。また、内皮細胞はグラフトを生分解し、新しい組織を再生する役割を果たす。しかし、内皮細胞は e-Gel への接着が弱いため、血流 shear stress によって剥離しやすいことがわかってきた。本研究では細胞接着性タンパク質のフィブロネクチンを e-Gel に固定化し、細胞接着性を改善する。同時に血小板接着性も評価し、抗血栓性を評価する。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン重合促進

コラーゲン線維マトリックスの密度増加を目的とした。市販の 1.5%コラーゲン水溶液に線維化促進用リン酸バッファーを混ぜて、コラーゲンの終濃度が 1.2%、1%、0.8%、0.5%、0.2%になるように e-gel を作成した。また、線維化バッファーの NaCl 濃度、架橋剤濃度

をそれぞれ、0-350mM、10-100mM の範囲で微調整した。引張試験機に e-gel をセットし、引裂強度を測定した。

(2) エラスチン混合

エラスチンはコラーゲンと同様に重要な細胞外マトリックスであり、血管に多く含まれており、柔軟性に寄与している。そこで、コラーゲン重合時にエラスチンを混合することを検討した。市販の α エラスチンを 0.01~1%の終濃度でコラーゲンに混合し e-gel を作成した。作製した e-gel 上で細胞培養を行い、細胞接着性と増殖性を評価した。

(3) コラーゲン線維配向化

規則正しくコラーゲン線維を配向させた構造は生体組織の機械的強度に重要である。そこで、90 度ずつ交互にコラーゲン線維を配向させた多層化 e-gel の作製を検討した。配向化は、流体力学的流動法によって行った。コラーゲン溶液をチューブから一方向に流しながら線維化させた。その後、90 度方向を変えて同様に流しながら線維化させた。これを数回繰り返した。引張試験機で引裂強度を測定した。

(4) 有機ナノチューブ混合

両親媒性分子は水中で自発的に集合して内径 10-200nm のナノチューブを形成する。本研究では、コラーゲンと架橋反応ができるカルボキシル基を有するペプチド脂質分子をコラーゲン線維化時に混合する検討を行った。引張試験機によって引裂強度を測定した。また、ラット血液を滴下し、血小板接着性を評価した。

(5) フィブロネクチン固定化

生体置換性を高めるためには血管内皮細胞の e-gel への接着が重要である。そこで、e-gel にフィブロネクチン (FN) を 25, 50, 100 μ g/ml でコートした。細胞培養によって内皮細胞の接着性と増殖性を評価した。また、また、ラット血液を滴下し、血小板接着性を評価した。

(6) 細胞培養

市販のヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を専用培地で増殖させた。e-gel に播種し、接着性と増殖性を MTT 法で評価した。

(7) 血小板接着性

ラットから血液を 3ml 採取した。遠心分離によって血小板が豊富な画分を分離した。これを e-gel 上に滴下し、30 分後に洗浄し、接着した血小板量を pNPP 法による発色によって測定した。

4. 研究成果

e-Gel チューブの引裂強度改善を目的にコラーゲンの重合反応促進とエラスチン混合を検討した。コラーゲンの重合反応促進では、コラーゲンの重合 (線維化) における温度、塩濃度、コラーゲン濃度、架橋剤濃度の最適化

を行った。その結果、コラーゲン濃度を従来の 0.2%から 1.2%に増加することによって約 4 倍引裂強度が増加した。このとき架橋剤を入れるタイミングをコラーゲン重合前から重合後に変更することによって 1.2% e-gel チューブを作成できることがわかった。また、温度と塩濃度は従来条件が最適であることを確認した。

次にエラスチン混合では、まずエラスチンの重合（コアセルベーション）条件を検討した。その結果、エラスチンはコラーゲン重合と同じ線維化バッファーで重合することがわかった。次にコラーゲンとエラスチンの共重合を検討した結果、コラーゲン：エラスチン=1:3.2 以上で混合するとコラーゲンの重合が阻害されることがわかった。最適な混合比の 1:0.8 で作成したコラーゲン/エラスチン共重合チューブの引裂強度を測定した結果、エラスチン混合によって引裂強度が低下することがわかった。また、血小板接着がエラスチンによって促進されるという課題が残った。以上より、引裂強度改善にはコラーゲン濃度アップによるコラーゲンマトリックスの密度増加が効果的であることがわかった。

このチューブをラット腹部大動脈に移植したところ、縫合時にまだ裂けやすいことがわかった。そこで、コラーゲン濃度アップの効果に加えて、コラーゲン線維化条件と架橋剤濃度を最適化する検討を行った。その結果、ラット腹部大動脈に縫合可能な e-gel チューブの作成に成功した。ただし、それでも引裂強度は十分といえず縫合数を増やさざるを得なかった。

そこでさらなる強度改善を目指し、コラーゲン線維の配向制御、および有機ナノチューブの混合化を検討した。コラーゲン線維の配向制御は、e-gel を作成する際に、流れを付加することで流動方向への線維配向を促進した。さらに、その e-gel 上に 90 度傾けた垂直方向に流れを付加し、最初の配向と垂直方向に配向させた。これを数回繰り返し、ラメラ構造を持つ e-gel チューブを作成した。電子顕微鏡観察の結果、コラーゲン線維の配向が 90 度ずつ交互に向きを変えたラメラ構造を有していることを確認した。さらに、引張強度試験の結果、配向制御していないものと比較して高いことを確認した。

次に e-gel の作製前に有機ナノチューブ (NT) を混合する検討を行った。NT 混合はコラーゲン線維化を抑制しないことを確認した。また、混合によって引裂強度を改善することができた。NT は官能基を有するため、架橋剤によってコラーゲンと架橋を形成していることが示唆された。一方、血小板接着試験を行った結果、NT 混合によって若干の血小板接着増加を認めた。従って、血小板接着を

増加させない程度に混合することにした。以上の強度改善を行った e-gel チューブをラット腹部大動脈に移植し、長期の開存性を観察中である。

次に、細胞接着の改善として細胞接着性タンパク質のフィブロネクチン (FN) の e-gel 上への固定化を検討した。免疫染色法によって e-gel への FN 固定を確認した後、臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の接着数を評価した結果、100 μ g/ml の FN を固定化したときに細胞接着性プラスチック培養プレート (TCP) と同程度まで改善できることがわかった。また増殖性も TCP と同程度まで改善できた。さらに血小板接着性を評価した結果、FN 固定化 e-gel への血小板接着数は小さく、抗血栓性を維持したまま HUVEC の接着性を改善することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Nobuhiro Nagai, Ryosuke Kubota, Ryohei Okahashi, Masanobu Munekata. “Mechanical and biological properties of bio-inspired nano-fibrous elastic materials from bovine collagen” *Biomaterial / Book 1* edited by Rosario Pignatello. Intech (Book chapter), in press (2011). (査読あり)
- ② Nobuhiro Nagai “Tissue engineering using collagen for treatment of intractable diseases” *Proc Clin Electron Microsc*, 29, 13-16 (2009). (査読なし)

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 永井展裕 : 「コラーゲンを利用した再生医工学研究～難治性疾患治療法開発の試み～」第 60 回東北臨床超微形態懇話会、東北大学医学部大会議室 (2009 年 6 月 18 日) 招待講演
- ② 永井展裕、岡橋亮平、中山泰秀、周粵みん、高見沢計一、棟方正信 : 「コラーゲンを利用した生体置換型人工血管の開発」第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台国際センター (2009 年 6 月 16 日)
- ③ 窪田亮輔、永井展裕、棟方正信 : 「伸縮性サケ皮コラーゲングルの人工血管材料への応用」北海道再生医療・医用工学研究の公開拡大シンポジウム、北海道医療大学札幌サテライトキャンパス (2008 年 12 月 11 日)
- ④ 永井展裕、岡橋亮平、中山泰秀、周粵みん、高見沢計一、棟方正信 : 「Regenerative Medicine-originated

Vascular Grafts: Salmon Collagen Tubes」北海道再生医療・医用工学研究の公開拡大シンポジウム、北海道医療大学札幌サテライトキャンパス（2008年12月11日）

- ⑤ 窪田亮輔、永井展裕、棟方正信：「伸縮性サケ皮コラーゲンの人工血管材料への応用」日本生物工学会、第60回日本生物工学会大会、東北学院大学（2008年8月27日～29日）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 展裕 (NAGAI NOBUHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30400093

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

棟方 正信 (MUNEKATA MASANOBU)
北海道大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：50261326