

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09158

研究課題名（和文）理想的な血管再生を誘導する多層性動脈グラフトの創製

研究課題名（英文）A novel multilayered arterial graft to induce an ideal vessel remodeling

研究代表者

太良 修平（Tara, Shuhei）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：80465319

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）：吸収期間の長いシルクフィブロイン（SF）と吸収期間の短いポリビニルアルコール（PVA）を用いて、段階的に吐出スピードをそれぞれ変えることにより、多層構造のシートを作製した。引っ張り試験による応力・ひずみ曲線では、PVAの比率が高いほど、最大強度はやや低下するものの、ヤング率は低下することが示された。ヒト皮膚微小血管内皮細胞を用いた細胞接着試験（播種後2時間）では、多層性シートの血管内腔面にあたる組成、最外層にあたる組成の両方で良好な細胞接着を確認した。続いてラット腹部動脈への埋植試験を実施し、良好な組織リモデリングを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、多層構造により血管リモデリングの促進が示された。この結果により、人工血管の素材と構造において、これまででない新しい方向性が示された。将来的に様々な生体吸収性素材の組み合わせることにより、最適な人工血管素材を創製する足掛かりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Silk fibroin (SF) with a long absorption period, and polyvinyl alcohol (PVA) with a short absorption period, were used to fabricate a multi-layered sheet by changing the ejection speed stepwise. The stress-strain curve obtained from the tensile test showed that the higher the PVA ratio, the lower the Young's modulus and the maximum strength. In a cell adhesion test using human dermal microvascular endothelial cells (2 hours after seeding), good cell adhesion was confirmed for both the composition corresponding to the luminal surface of the blood vessel and the outermost layer of the multilayer sheet. Finally, an implantation into the rat abdominal aorta was performed, and good tissue remodeling was confirmed.

研究分野：循環器内科

キーワード：生分解性素材 人工血管 血管リモデリング 多層性構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ePTFE は、世界的に最も使用されている人工血管素材である。しかし、長期の異物反応による血栓傾向の遷延、内膜肥厚、石灰化等により ePTFE 製人工血管の 5 年後の一時開存率は 50% にとどまる。この課題を克服するため、生体分解性スキャフォールドを用いた人工血管(生分解性人工血管)が ePTFE 製に代わる人工血管として注目されてきた。図 1 に示すように、生分解性人工血管は血管再生の過程を経て、自己血管へ置換されるのが特徴である。その結果、生分解性動脈グラフトは、高い生体適合性ととも弾力性や収縮性・拡張性などの血管機能を獲得する。また、自己組織化された血管グラフトは、抗血栓性・抗炎症性や内膜過形成の抑制といった利点から、移植後の長期開存が期待できる。生分解性人工血管は、ヒト下大静脈移植での臨床応用に至ったが(N. Engl. J. Med. 2001)、より汎用性のある動脈グラフトは未だ実現していない。これは、スキャフォールドの分解に伴う耐圧性喪失と血管再生による耐圧性獲得の経時的な力学的バランスが達成されていないからではないか、と我々は考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、理想的な血管再生を誘導し高い耐圧性と耐久性を獲得する生分解性動脈グラフトを創製することである。そのために我々は、急性期の血管内腔面で発生した再生血管組織を外側に向かって効率的に誘導するため、スキャフォールドの分解過程に着目、血管内腔側から徐々に分解される多層構造を持つ全く新しいスキャフォールドを考案した(特願：2018-1081148)。しかし、動脈グラフトへ応用するためには、以下の課題を克服する最適なポリマーの組み合わせと作成条件を、工学的・生物学的に検証する必要がある。

3. 研究の方法

(1) 多層性スキャフォールドの作製

階層構造シートの作製方法は以下の通りである。吸収性の異なる 2 種類のポリマーを選択し、エレクトロスピンニング法を用いて吸収性ポリマーシートを作成する。また、内腔側から外腔側にかけてそれぞれの比率を可変させることにより階層構造とする。

(2) スキャフォールドの物性・機能性評価

スキャフォールド表面の形態観察に加え、引張強度測定、動的粘弾性測定等の物性解析を実施する。得られた物性や構造的知見は、スキャフォールドの作製条件や分解性と大きく関与するため、血管材料として適正な物性・機能性評価を検討し、作製条件にフィードバックする。

(3) スキャフォールドに対する細胞評価実験

血管内皮細胞を用いた接着試験を実施する。

(4) スキャフォールドの移植実験

最適な条件を有するスキャフォールドを管腔様に成形し、ラット腹部大動脈へ移植する。移植後、スキャフォールドを摘出し、以下の解析を行う。

血管再生プロセスの評価

経時的なスキャフォールドの分解と血管再生の進行(内皮化、平滑筋細胞の増殖、エラスチンの沈着・成熟、コラーゲンの沈着)を組織学的に評価する。

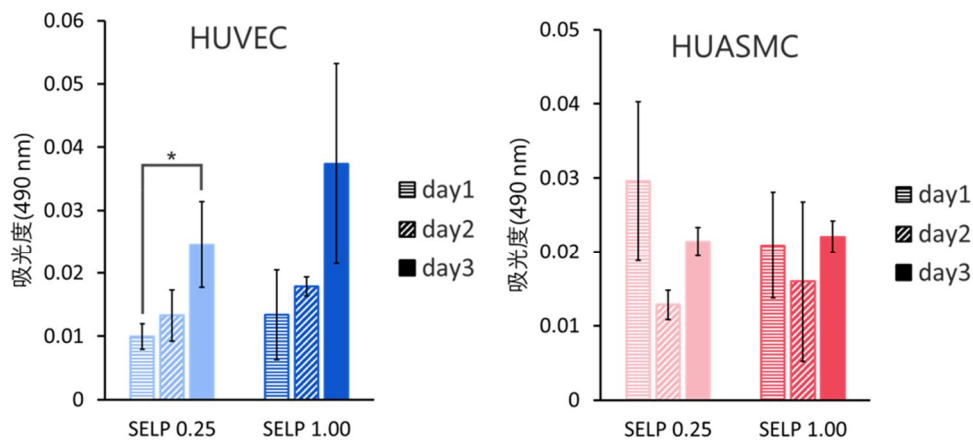
4. 研究成果

効果的な血管リモデリングを達成する人工血管の創製のため、吸収期間の異なる 2 つの素材を用いてエレクトロスピンニング法による多層性シートを作成した。具体的には、吸収期間の長いシル

クフィブロイン (SF) と吸収期間の短いポリビニルアルコール (PVA) を用いて、段階的に吐出スピードをそれぞれ変えることにより、多層構造とした。PBSに7日間浸漬させた重量損失率は、PVAの比率が高いほど高いことが示された。また、引っ張り試験による応力・ひずみ曲線では、PVAの比率が高いほど、最大強度はやや低下するものの、ヤング率は低下する（弾性力が高い）ことが示された。この傾向は、PBS浸漬7日目においても同様であった。ヒト皮膚微小血管内皮細胞を用いた細胞接着試験（播種後2時間）では、多層性シートの血管内腔面にあたる組成、最外層にあたる組成の両方で良好な細胞接着を確認した。

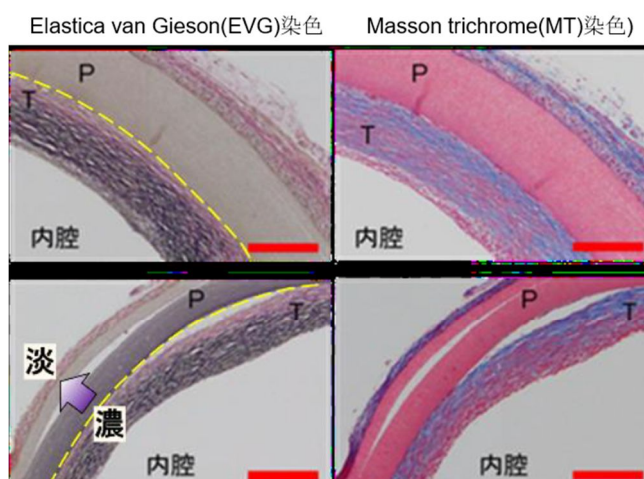
これらの *in vitro* の結果をもって、ラット腹部動脈への埋植試験を実施した。SF単体では、シートのハンドリングが悪く縫合部の締め上げにより狭窄を来してしまうため、SFにポリウレタンを混合した素材を使用、PVAとの多層構造性のシートを作製し、埋植した。結果、良好な開存と組織リモデリングを確認した。

より安全で生体適合性の高いシートの創製を目指して、同様のコンセプトでPVAをシルクエラスチン (SELP) に変更して実験を行った。SELPを培養液に添加し血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の接着と増殖を観察し、これらのタンパク質が接着や増殖を妨げないことを確認した（下図）。



HUVEC、HUASMCにおける細胞増殖試験結果 (n=4, *: p < 0.05)

最後にラット腹部動脈に 4 週間埋植し、良好な血管リモデリングが起きていることを確認した（下図）。



各シートのEVG, MT染色結果

P: シート, T: 新生組織, 点線: PとTの境界

EVG: エラスチン(黒紫色),

MT: 膠原繊維(青), 線維素(紅赤色), 細胞核(黒紫色~紫赤色), scale bar: 200 μ m

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

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4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太良修平
2. 発表標題 生分解性動脈グラフトの血管リモデリングにおける血管平滑筋の役割
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太良修平
2. 発表標題 臨床現場で求められる循環器系医療材料
3. 学会等名 2020年つくば医工連携フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太良修平
2. 発表標題 循環器領域における生分解性素材の光と影
3. 学会等名 2020年繊維学会秋季研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太良修平
2. 発表標題 高分子材料を用いた生分解性人工血管の開発
3. 学会等名 2022年プラスチック成型加工学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 多孔質体、及び、医療用材料	発明者 太良、中澤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、16/972603	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 多孔質体、及び、医療用材料	発明者 太良、中澤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、19815108.6	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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	中澤 靖元 (Yasumoto Nakazawa) (20456255)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

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