

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08834

研究課題名（和文）ヒト羊膜の抗炎症・抗菌作用に着目した抗感染性人工血管の作成

研究課題名（英文）Efficacy of human amniotic membrane for artificial vascular infection

研究代表者

中西 渉（Nakanishi, Wataru）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：50636024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト羊膜を用いた抗感染性人工血管の作成を目的として、小動物人工血管置換モデルと腹膜炎モデルを用いてヒト羊膜の人工血管感染予防効果を検証した。局所に感染を起こしつつ、安定した全身状態を維持するモデルの確立を目指したが、感染を起こしつつ良好な全身状態を維持するモデルを安定的に作成することが困難であった。このため、腹腔内で人工血管置換を行う模擬モデルとして、皮下に人工血管を留置し感染させる実験モデルを構築し、本模擬モデルを用いてヒト羊膜の感染防御効果について解析を行った。その結果をまとめて、2024年中に国内外の学術集会で報告するとともに、英文誌に投稿する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト羊膜は安全性が高度に確立された再生医療資源であり、体内で拒絶反応を惹起しないことが示されていることから、腹腔内使用の障壁は非常に低いと考えられる。一方、人工血管はその有用性が広く示され、実臨床において頻用されている医療用資材であるが、人工物であることから感染に弱く、一度感染が成立すると通常の抗菌薬による治療では通常治癒は困難であり、人工血管の摘除が必要となることも多い。ヒト羊膜で覆うことで感染創から人工血管を物理的に保護可能であることが示唆される結果を得ており、実臨床に直結する結果であると考えている。今後、抗菌ペプチドの産生による感染予防効果についても詳細を解析する方針である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to create an anti-infective artificial blood vessel using human amnion. Since the method for collecting human amnion for this study had already been established, the first step in this study was to create a small animal artificial vessel replacement model. Then, we worked on creating a peritonitis model, aiming to establish a model that maintains a stable systemic condition while causing local infection. However, it was challenging to develop a model that maintains a good systemic condition while causing infection. Therefore, we constructed an experimental model in which an artificial blood vessel was implanted subcutaneously and infected as a mock model for artificial blood vessel replacement in the abdominal cavity and analyzed the infection-protective effect of the human amniotic membrane using this mock model. The results will be reported at domestic and international scientific meetings and submitted to a journal by the end of 2024.

研究分野：再生医療

キーワード：ヒト羊膜 感染予防効果 人工血管

## 1. 研究開始当初の背景

胸部・腹部大動脈瘤に対する血管置換術や閉塞性動脈硬化症などに対するバイパス手術、さらには血液透析のための内シャント造設など、幅広い病態・領域において、人工血管を用いた血行再建術の有用性は確立され、血管外科領域の多くの手術において臨床使用されている。現在では、様々な材質・構造の人工血管が開発されることにより血管の径や性状に合わせて適切な人工血管を選択することが可能となり、短期成績だけでなく長期成績も安定化している。しかし、多くの血行再建術において人工血管のトラブルは重篤な転帰に繋がるものであり、対処に難渋することも少なくない。人工血管感染は発症率が 0.5-8%と報告される主要な術後合併症であり、一旦発症すると治療抵抗性で死亡率も高い。感染を制御するためには人工血管の抜去が必要となることが多いが、特に胸部領域では抜去が困難な場合も多く、感染予防が極めて重要である。感染性動脈瘤や感染人工血管抜去後など、すでに感染状態となっている状況で使用するには人工血管感染の再感染率が 10-20%程度と極めて高く、特に感染予防が重要となる。現在、感染予防に有用とされている方法として、大網や筋皮弁など体内の組織で被覆する方法が報告されているが、これらの組織が十分利用できないことも少なくない。その他、抗菌剤であるリファンピシンに浸漬することによる感染予防効果が報告されている (Erb S et al. PLoS One. 2014) が、根本的な解決には至っていない。人工血管を周囲の起因菌から防御するためには、大網や筋皮弁などによる被覆と同様、感染源となる周囲組織から人工血管を生体材料で覆うことが解決策の 1 つになり得ると考えられる。臨床使用を前提に考えると、安全性が高く、安定供給可能でかつ安価な生体材料であることが求められる。さらに、抗菌作用を有する生体材料であればより高い感染予防効果が期待され、社会的にも非常に有用である。

ヒト羊膜は胎盤の最表層を覆う薄膜で、コラーゲンやラミニンなどのタンパクの層から成る組織から構成される。羊膜には、platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)などの growth factor を含み、線維芽細胞の増加、間葉系幹細胞の動員、上皮化、血管新生などを促進する (Koob TJ, et al. Int. Wound J. 2013)、角化細胞や線維芽細胞が分化したり接着したりするための足場となる (Huang G, et al. Cell Transplant. 2013, Mahmoudi-Rad M, et al. Clin Exp Dermatol. 2013)、羊膜最内層を覆う羊膜上皮細胞は高い多分化能を有しており、羊膜上皮細胞から放出されるサイトカイン (Transforming growth factor (TGF- ), Tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and 2 (TIMP-1,2) など) は抗炎症や組織リモデリング作用などによって創傷治癒を促進する (Franz MG, et al. Eplasty. 2008, Payne WJ, et al. World J Surg. 2010) など多彩な機能があることが知られている。さらに、ヒト羊膜は胎児を感染から守るための仕組みとして、抗菌性ペプチドである  $\beta$ 3-defensin を産生するなどその抗菌作用についても報告されている (Buhimschi IA, et al. Am J Obstet Gynecol. 2004)。これらの多くのユニークな特長を有するヒト羊膜は、熱傷や皮膚潰瘍などに対する再生医療として臨床応用を目的とした研究に応用され、眼科領域では羊膜移植が保険診療としてすでに臨床実施されるに至っている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、人工血管感染という重篤な合併症に対し、ヒト羊膜という安価かつ安全な生体材料を応用することにより抗感染性人工血管を作成することにより、血管外科領域に残された本課題を克服することである。特に、ヒト羊膜が有する多彩な特長の中でも臨床的に極めて重要な抗菌効果について、実際に人工血管を用いた小動物血行再建モデルを用いてその有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、小動物人工血管置換モデルと小動物腹膜炎モデルを組み合わせることにより人工血管感染を模倣した実験モデルを確立し、この実験モデルにヒト羊膜を使用することで羊膜の感染予防効果を明らかにし、さらにその感染予防メカニズムを抗菌ペプチド効果と物理的な遮断効果の点から検証する。

### (1) ヒト羊膜の採取と凍結保存

東北大学病院産婦人科・手術部との協力体制の下、定期手術で行われる帝王切開手術時に娩出される胎盤から無菌的に羊膜を剥離する。採取されたヒト羊膜は滅菌保存液に浸漬し実験使用するか液体窒素内で次の実験まで凍結保存する。

### (2) 小動物人工血管感染モデルの作成

小動物人工血管置換モデルとしてラットの腎動脈下大動脈を PTFE 人工血管にて置換するモデル (Shojaee M et al. 2017. Acta Biomaterialia) を用い、これに小動物腹膜炎モデル (Brealey D et al. 2004. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol) を組み合わせることでラット人工血管感染モデルを構築する。

### (3) 小動物を用いたヒト羊膜の短期的感染予防効果の検証

上記人工血管感染モデルを用いてヒト羊膜の短期的感染予防効果を検証する。具体的には、人工血管置換部全体をヒト羊膜で被覆した「羊膜使用群」と被覆しない「羊膜不使用群」の 2 群間で経時的に人工血管部における感染状態を比較する。

術後 3 日目, 5 日目, 7 日目, 14 日目 (予備実験の結果で変更あり) に人工血管壁の感染状況をスワブ法で確認するとともに、被覆羊膜の状態、腹腔内膿瘍の形成の有無および部位 (人工血管に接しているかどうか) を評価する。

術後 14 日目に適切な方法で安楽死させ、周囲組織を含む形で人工血管を切除する。切除標本は 5mm 幅で分割して、A. 物理的感染防御効果、B. 抗菌作用、C. 抗炎症効果の 3 つの観点からヒト羊膜の感染制御効果のメカニズムの検討を行う。

A. 物理的感染防御効果：免疫組織学的に切除標本を染色し、ヒト羊膜被覆部におけるコラーゲンやラミニンなどのマトリックスタンパク、および羊膜上皮細胞の有無や形態を評価する。

B. 抗菌作用：切除標本から Total RNA を抽出し、逆転写により採取した cDNA を用いて、Real-time PCR にて抗菌性ペプチドである beta3-defensin の発現量を 2 群間で比較する。

C. 抗炎症効果：2 群の切除標本を冷 PBS 中でホモジナイズした後に、遠心し上清を採取する。その上清を用いて、炎症性・抗炎症性サイトカインに対する ELISA を行い、そのサイトカイン量を比較して抗炎症効果を検討する (炎症性サイトカイン：IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , 抗炎症サイトカイン：IL-10, TGF- $\beta$ 1, IGF-1)。

## 4. 研究成果

人工血管でラットの腎動脈下大動脈を置換し、さらに置換した人工血管に感染を起こす安定した実験モデルの確立が困難で想定以上の時間を要したため、人工血管感染をラットの皮下にて起こすモデルに切り替え、ヒト羊膜の感染防御効果を検証した。ヒト羊膜は感染が惹起されたラット皮下においても物理的に安定していることを確認した。その上で、グラム染色および組織学的評価により、ヒト羊膜が炎症性細胞の人工血管への浸潤に対し予防的に機能することを明らかにした。

組織標本に加えて、PCR のための組織検体の採取・保管を行っており、それらの検体を用いて免疫染色や PCR、炎症性サイトカインの解析に向けて準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Teruhisa Udagawa, Kazuaki Tokodai, Yuki Watanabe, Yuto Muranami, Kaoru Okada, Takashi Kamei, Takanori Ishida
2. 発表標題 Efficacy of Amniotic Membrane for Artificial Vascular Infection
3. 学会等名 30th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔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	戸子台 和哲 (Tokodai Kazuaki) (50581641)	東北大学・大学病院・准教授  (11301)	
研究分担者	菅原 宏文 (Sugawara Hirofumi) (60451572)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師  (11301)	
研究分担者	赤松 大二朗 (Akamatsu Daijiro) (40420012)	東北大学・医学系研究科・准教授  (11301)	
研究分担者	齋藤 昌利 (Saito Masatoshi) (00451584)	東北大学・医学系研究科・教授  (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	星合 哲郎  (Hoshiai Tetsuro)  (10569560)	東北大学・大学病院・講師    (11301)	
研究 分 担 者	宮城 重人  (Miyagi Shigehito)  (00420042)	東北大学・大学病院・准教授    (11301)	

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