

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20938

研究課題名（和文）分解性の向上による生体吸収性小口径人工血管の自家血管再生の促進

研究課題名（英文）Enhanced degradability of bioabsorbable small-caliber artificial vessels to promote autologous vascular regeneration

研究代表者

筒井 真博（Masahiro, Tsutsui）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00910267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：分解性向上のポリカプロラクトン（PCL）グラフト作成までは到達できなかったが、分解性を評価するために、人工血管の開存性を改良する必要がある。本研究ではPCLグラフトにポリビニルアルコール（PVA）をコーティングすることで開存性の改良を図っていたが、*in vitro*においては血小板吸着は抑制したが、全血条件では血栓形成を引き起こしていた。ここで、PVAが親水性であることに着目し、事前に超純水で親水性コーティングを活性化した状態で全血に晒すことでコーティング機能を改善する可能性が示唆された。また、分解性を長期的に評価する目的で、ラットモデルからウサギモデルへのシフトを検討し、ウサギモデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓外科領域において、即時利用可能な小口径人工血管の開発は必要不可欠である一方で、現状、一般に臨床応用されている小口径人工血管は存在しない。本研究はその開発において、特に問題となりやすい人工血管のコーティングに関する知見に関して、一定の知見を得られたと考える。親水性コーティングに関しては、一度超純水に晒すことで水の膜を形成し、親水コーティングの性能を発揮する可能性を示唆したが、今後の研究で親水性コーティングのさらなる改良が必要と思われる。また、分解性を長期的に評価する動物モデルを作成したことで、今後作成する新たなナノファイバークラフトを長期に評価し、分解性を検証、改良することが可能と考える。

研究成果の概要（英文）：Although we could not reach the point of creating polycaprolactone (PCL) grafts with improved degradability, it is necessary to improve the patency of the artificial vessels in order to evaluate their degradability. In this study, we attempted to improve patency by coating the PCL grafts with polyvinyl alcohol (PVA). *In vitro*, PVA inhibited platelet adsorption, but caused thrombus formation under whole blood conditions. Here, we focused on the hydrophilic nature of PVA, and suggested the possibility of improving the coating function by exposing the hydrophilic coating to whole blood with the hydrophilic coating activated in advance with ultrapure water. In addition, for the purpose of long-term evaluation of degradability, a shift from the rat model to the rabbit model was examined. With the rabbit model, it was possible to evaluate relatively long-term patency and establish a long-term degradability evaluation model.

研究分野：生体吸収性人工血管

キーワード：生体吸収性人工血管 ナノファイバー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦では生活習慣病の増加に伴い、外科的血行再建術の施行数は増加の一途を辿っている。冠動脈バイパス術などの細径血管(3-4 mm)に対する血行再建術では自家血管が用いられるが、長さや性状等の原因で使用が制限されることがあり、安定供給可能な小口径人工血管の創出が強く望まれる。しかし、中大口径の人工血管では十分な臨床成績を発揮するダクロンや ePTEE などの素材も、5mm 以下の小口径人工血管では短期開存すら得られないため、新規の素材開発や全く異なるアプローチ方法が必要と考えられる。

【これまでの研究成果】理想的な代用血管に期待されることは、患者の組織と一体化し自家血管の様にふるまう能力を持つことである。我々は、移植後に完全な自家血管へと再生する人工血管の開発をめざして(図 1A)、細胞の足場として機能する生体分解性ポリマーのポリカプトラクトンに着目し内径 1mm の人工血管(PCL グラフト)を作成した。ラット腹部下行大動脈に移植した PCL グラフトは、8 週間以内に自家血管様の内膜を再生し、半年以上開存することを明らかにした(図 1B、研究業績 1-5)。一方で、PCL は生体内での分解が遅く、移植後 8 か月経過してもグラフト内部の再生が殆ど進んでいないことも明らかとなった。PCL と同様に生体適合性が高い脱細胞化血管での実験から、長期に残存するスキャフォールドは石灰化の原因となり、グラフトの劣化を引き起こすことが示されており(図 1C、研究業績 5-7)、自家血管様の再生を促進するにはスキャフォールドの分解が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

自家血管へと再生する生体分解性の小口径人工血管を創出し、動脈硬化性疾患の患者へ安定した血行再建術を提供できるように、本研究では、PCL グラフトの分解性の向上と最適化を図り、自家血管の再生を促進することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、PCL グラフトの最適なスキャフォールド作成方法を確立し、分解性の促進が PCL グラフトの自家血管再生とグラフト機能を向上させるかどうかをラットの移植モデルで明らかにする。

スキャフォールド作成方法の最適化

PCL 単独のグラフトは、移植後にグラフトの外側から細胞が移入し、半年以内には内腔に成熟した内膜を再生する。よって、グラフトの生体内半減期を 6 か月に設定し、細胞の移入が早いグラフト外側の分解を早く、内腔側は分解を遅くすることで(図 2)、強度を維持したままグラフトの再生を促進できると考えられる。

<スキャフォールドの生体分解性と自家細胞による再組織化の評価>

図 2 のように、PCL ナノファイバーを基本構造として分解性の異なるポリグリコール酸(PGA)やポリ乳酸(PLA)などを任意の割合で含有したスキャフォールドのナノファイバーシートを作成する。マウスの皮下に移植後、1~6 か月で摘出しスキャフォールドの分解と自家細胞による組織化を評価する。

□ スキャフォールドの分解：摘出したスキャフォールドを脱細胞化し、電子顕微鏡観察によりスキャフォールドの分解と細胞外マトリックスの蓄積を評価する。

□ 自家細胞による組織化：HE 染色でグラフト内部に生着した細胞数を定量する。エラスチン、コラーゲン、コンドロイチン硫酸および CD90(線維芽細胞)と CD31(血管新生)との免疫染色で、スキャフォールド内部に新生する細胞外マトリックスと血管を定量する。

<人工血管の物理的強度と力学的性質の評価>

内径 1mm の PCL グラフトに対し 破断圧力試験、弾性試験、縫合保持強度試験、水漏れ試験を行い、小口径人工血管に要求される物理的強度と性質を満たすかどうか明らかにする。コントロールとして、これまで用いてきた PCL 単独のグラフトとラット腹部大動脈に相当する物理的性質を得ることを、スキャフォールド最適化の目標とする。

グラフトの in vivo 機能評価

上記の方法で最適化された PCL グラフトを、ラットの腹部下行大動脈に移植する。移植後 2 週間~半年で摘出し、開存性と自家血管様再生を評価する。

<自家血管様再生と機能性の評価>

□ 自家血管再生とスキャフォールドの分解：免疫染色で内皮細胞(CD31)、平滑筋層(aSM)、細胞外マトリックス(エラスチン、コラーゲン、コンドロイチン硫酸)の再生を定量する。電子顕微鏡観察によりスキャフォールドの分解を評価する。

□ 機能性評価：グラフトの狭窄率は、エコーを用いたグラフト内血流量の定量と、HE 染色で内膜肥厚を定量して評価する。石灰化は von Kossa 染色で評価する

4. 研究成果

スキャフォールド作成方法の最適化については、一定の成果が得られた。

我々は、現在までに以下の段階まで実験を進めることができた。

PCL, PLA, PGA のナノファイバーシートの作製

PCL, PLA, PGA のナノファイバーシートをマウス皮下へ植え込み手術。

PCL, PLA, PGA のナノファイバーシートから作製した人工血管のラット腹部大動脈移植モデルの作製。

PCL+PLA を組み合わせたナノファイバーグラフトの作製および、ラット腹部大動脈置換モデルの作製。

我々は、PCL, PLA, PGA のナノファイバーシートの作製に成功し、これをマウス皮下に植え込む手術まで進むことができたが、これを摘出し、解析中ではあり、その解析結果を基に、分解性を調整したナノファイバーグラフトを作製する予定である。

また、PCL, PLA, PGA のナノファイバーグラフトを作製し、現在ラット腹部大動脈移植手術を順次行っている段階である。

実際に、皮下環境と血管環境では分解動態が異なることが様相されるが、皮下での検証および血管環境での検証を基に、分解性を調整した人工血管の作製を目標としている。

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 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 筒井真博 |
| 2. 発表標題 糖尿病ラットにおけるインスリン治療が生体分解性小口径人工血管与える影響の検討 |
| 3. 学会等名 第53回日本心臓血管外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|