

機関番号： 13901
研究種目： 研究活動スタート支援
研究期間： 2010 ～ 2011
課題番号： 22890081
研究課題名（和文）短鎖ペプチド-インテリジェント化担体を用いた、小口径人工血管の開発
研究課題名（英文）Development of Small Diameter Vascular Graft Using Trimeric Peptide
研究代表者 桑原 史明（Fumiaki Kuwabara）
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号： 60584761

研究成果の概要（和文）：

【背景】既存の小口径人工血管の開存率は低く臨床上問題になっている。開存率の向上には、迅速な内皮化と新生内膜肥厚の抑制が重要であると考えられている。本研究では、内皮細胞に親和性の高い4型コラーゲン由来のCAGペプチドを見だし、それを付与した人工血管を開発し、その効果を検証した。【方法】ラット頸動脈人工血管(内径0.7 mm)置換モデルを用いて、術後1, 2, 6週後に取り出し、組織学・生化学的に評価した。【結果】CAG含有小口径人工血管は、CAGを含まない群に比して、各週ともに、有意に内皮化率が向上していたCAG vs C: $64.4 \pm 20.0\%$ vs $42.1 \pm 8.9\%$ at 1 week $P=0.017$, $98.2 \pm 2.3\%$ vs $72.7 \pm 12.9\%$ at 2 weeks $P=0.001$, and $97.4 \pm 4.6\%$ vs $76.7 \pm 5.4\%$ at 6 weeks $P < 0.001$ 。Western blotでは、1週においてeNOSの発現がCAG群で高く(CAG vs C: 1.20 ± 0.37 vs 0.34 ± 0.16 , $P=0.013$)、6週において α SMAの発現がCAG群で有意に低かった(CAG vs C: 0.89 ± 0.06 vs 1.25 ± 0.22 , $P=0.04$)。【考案】CAG含有人工血管は内皮化を促進できるとともに新生内膜肥厚も抑制できる可能性があり、小口径人工血管の遠隔期開存率改善の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Background Both rapid endothelialization and the prevention of intimal hyperplasia are essential to improve the patency of small-caliber vascular grafts (SCVGs). Using the peptide array-based screening system, we identified the peptide “CAG (Cysteine-Alanine-Glycine),” which has a high affinity for endothelial cells and a low adhesive property for smooth muscle cells. In this study, we report an *in vivo* analysis of the novel SCVGs that were constructed with a biodegradable polymer (poly- ϵ -caprolactone) containing CAG peptide. **Methods** The novel SCVG, which measured 0.7 mm in diameter and 7 mm in length, was fabricated using the electrospinning technique. Carotid arterial replacement was performed on Sprague Dawley rats using SCVGs with (group CAG) or without CAG (group C). Histological and biochemical assessments were performed at 1, 2 and 6 weeks after implantation. **Results** The ratio of endothelialization was significantly higher in group CAG compared to group C (CAG vs C: $64.4 \pm 20.0\%$ vs $42.1 \pm 8.9\%$ at 1 week $P=0.017$, $98.2 \pm 2.3\%$ vs

72.7±12.9% at 2 weeks $P=0.001$, and 97.4±4.6% vs 76.7±5.4% at 6 weeks $P < 0.001$). Additionally, Western blot analysis showed that the endothelial nitric oxide synthase at 1 week of group CAG was significantly higher than that of group C (CAG vs C: 1.20±0.37 vs 0.34±0.16, $P=0.013$), and that α -smooth muscle actin at 6 weeks in group CAG was significantly lower than that of group C (CAG vs C: 0.89±0.06 vs 1.25±0.22, $P=0.04$). **Conclusions** The graft with CAG promoted rapid endothelialization and potential to inhibition of intimal hyperplasia.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野： 心臓外科学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード： 小口径人工血管 (small diameter vascular graft)、短鎖ペプチド(short chain peptide)、生体吸収性ポリマー (biodegradable polymer)、エレクトロスピンニング法 (electrospinning procedure)、ナノファイバー (nano-scaled fiber)、ティッシュエンジニアリング (tissue engineering)

1. 研究開始当初の背景

50年以上にも及ぶ人工血管開発の歴史において、大口径人工血管はその開存性や安全性について、ほぼ満足のいく結果を残しているが、既存の小口径人工血管(内径6 mm 以下)の開存率は臨床的に満足できるものではない。従って、これを必要とする患者は多くの不利益を被っている。

組織工学(ティッシュエンジニアリング)的手法を用いた人工血管は、最終的には自己の血管となるため理想的材料と考えられ、その研究は近年著しく進展しているが、動脈の再生は困難で課題も多い。

一方、小口径人工血管の開存率を改善するための重要な要素として、「抗血栓性獲得のための迅速な内皮化」と、「血管狭窄の要因である新生内膜肥厚の抑制」があげられる。様々な手法でこれら

を成し遂げる研究が行われている。

本研究グループでは、以前よりこれらを改善する要素について研究を進めてきた。内皮化の促進のためには内皮細胞親和性の高い分子で人工血管をインテリジェント化する必要があると考え、なかでも、内皮細胞を裏打ちする血管基底膜、さらに基底膜を構成する主要蛋白(細胞外マトリックス)である、IV型コラーゲンに注目した。I型からV型までのコラーゲンに含まれる全てのアミノ酸3残基の短鎖ペプチドの中から、IV型コラーゲンにのみ含まれ、特に繰り返しの多い114配列を抽出して、網羅的に細胞の親和性を検索したところ、その中で最も内皮細胞に対する選択性の高い(内皮細胞親和性が高く、平滑筋細胞に親和性の低い)短鎖ペプチドとして、システイン-アラニン-グリシン配列(CAGペプチド)を発見

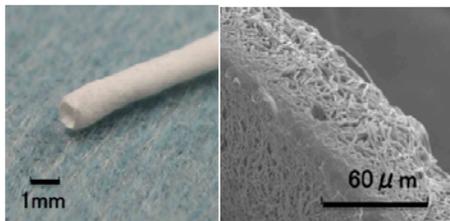
した。この短鎖ペプチドを、生体吸収性材料で作製した人工血管に付与することで、内皮化促進、さらには平滑筋細胞の接着を抑制することによる、新生内膜肥厚抑制効果を期待し、自己組織化する動脈の再生を期待する。

2. 研究の目的

本研究では、ティッシュエンジニアリング的手法で生体吸収性材料に内皮細胞親和性の高いペプチドを付与し、エレクトロスピニング法で小口径人工血管を作製し、その有効性を検討する。

3. 研究の方法

生体吸収性ポリマーである poly- ϵ -caprolactone (PCL) を、エレクトロスピニング法を用いて紡糸し、内径0.7mm の人工血管を作製した。



ラットの頸動脈置換術を、CAG ペプチドを含有する人工血管 (CAG群28例) と含有しない人工血管 (C群31例) で行った。手術は10-0 ナイロンを用いた結節縫合にて端々吻合を行った。置換術後1 週間、2 週間、6 週間で血管を摘出した。

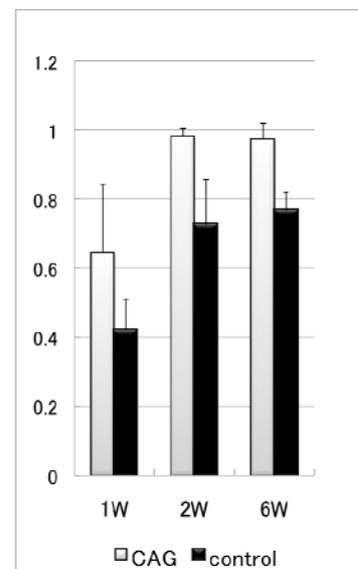
評価方法は、(1)内皮化率の計測=免疫染色(von Willebrand因子(vWF))による、走査型電子顕微鏡所見(SEM)による(2)Western blot法で内皮細胞特異的蛋白(内皮細胞型一酸化窒素合成酵素(eNOS)、トロンボモジュリン(TM))あるいは平滑筋細胞特異的蛋白(α 型平滑筋アクチン(ASMA)、カルポニン(CALP))の発現を定量的に評価
さらには、最長72週にわたる長期開存性

および組織学的変化に関しても調査した。

4. 研究成果

(1)内皮化率

vWF による蛍光免疫染色では、両群において週数が経過するにつれて内皮細胞がより多く人工血管内腔壁に接着するのが観察できた。その結果を用いて内皮化率(vWF 陽性の人工血管内腔/全人工血管内腔)を算出すると、全ての週数において有意にCAG 群の方が高かった(1 週間後CAG 群 vs C 群; $64.4 \pm 20.0\%$ vs $42.1 \pm 8.9\%$, $P=0.017$, 2 週間後CAG 群 vs C 群; $98.2 \pm 2.3\%$ vs $72.7 \pm 12.9\%$, $P=0.001$, 6 週間後CAG 群 vs C 群; $97.4 \pm 4.6\%$ vs $76.7 \pm 5.4\%$, $P<0.001$)。また、2 way ANOVA による解析では、週数比較 ($F=51.740$, $P<0.001$)、群間比較 ($F=55.294$, $P<0.001$) とも、その差は有意であった。

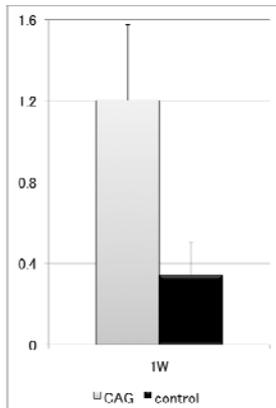


SEM による内皮組織の観察でも同様に、経時的に人工血管内腔壁を覆う内皮細胞の面積は広がっていくが、CAG 群の方がC 群よりその内皮細胞占有面積は大きい傾向にあった。

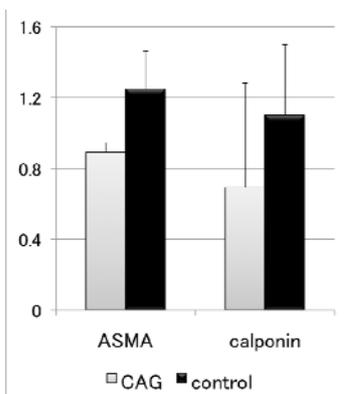
(2)細胞特異的蛋白発現

Western blot 法を用いた蛋白発現解析では1 週目に摘出した検体のeNOS 発現

はCAG 群で有意に高く (CAG vs C: 1.20 ± 0.37 vs 0.34 ± 0.16 , $P=0.013$)、TM 蛋白発現もCAG群で多い傾向にあった。



ASMA による蛍光免疫染色ではすべての週数において、人工血管中間層に現れたASMA 陽性細胞の占拠面積は両群間に差はなかったが、6 週で摘出した検体を用いてWestern blot 法による解析を行うとASMA 蛋白発現はCAG 群で有意に低く (CAG群 vs C 群: 0.89 ± 0.06 vs 1.25 ± 0.22 , $P=0.04$)、calponin 蛋白発現も有意差はなかったがCAG 群に低い傾向にあった。



以上の結果から、CAG 群は間葉系細胞を含む平滑筋細胞の接着あるいは増殖が抑制される可能性があることが示唆された。

(3)長期遠隔期

最長で72週間観察したが、破裂・瘤状変化や石灰化は認めなかった。さらに、

生体吸収性材料は残存しており、内皮化は内腔全面に起こっていたにもかかわらず、平滑筋層の再生は不十分であった。さらなる長期遠隔期の観察が必要であろう。

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 1 件)

①Kuwabara F, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Kanie K, Kato R, Satake M, Kaneko H, Oshima H, Usui A, Ueda Y. Novel small-caliber vascular graft with trimer peptide for acceleration of endothelialization. *Ann Thorac Surg* 2012;93:156-63. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

①Narita Y, Kuwabara F, Yamawaki-Ogata A, Kanie K, Kato R, Satake M, Honda H, Ueda Y. Development of novel tissue engineered small diameter vascular graft using trimer peptide. *TERMIS-EU 2011 Meeting Granada, Spain. June 7-10, 2011*

②Kuwabara F, Narita Y, Ogata A, Satake M, Kaneko H, Oshima H, Usui A, Ueda Y. Long-term results of tissue-engineered small caliber vascular grafts using rat carotid arterial replacement model. *Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21th ATCSA. Phuket, Thailand. May 26-29, 2011*

③成田裕司、桑原史明、蟹江 慧、加藤竜司、佐竹 真、兼子博章、田中啓介、荒木善盛、水谷真一、大島英揮、碓氷章彦、上田裕一. 短鎖ペプチドを修飾した小口径人工血管の有用性 第 111 回日本外科学会定期学術集会紙上開催 2011 年 5 月

④桑原史明、成田裕司、緒方藍歌、佐竹 真、兼子博章、田中啓介、荒木善盛、水谷真一、大島英揮、碓氷章彦、上田裕一. 生体吸収性超小口径人工血管のラット頸動脈置換後一年以上の遠隔期成績 第 39 回日本血管外科学会学術総会 沖縄 2011 年 4 月 20-22 日

⑤蟹江 慧、大脇潤己、加藤竜司、趙 瑛梓、桑原史明、佐竹 真、本多 進、兼子博章、成田裕司、本多裕之. 細胞選択的接着ペプチドによる再生促進型医療機器設計 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011 年 3 月 1-2 日

⑥大脇潤己、蟹江 慧、加藤竜司、趙 瑛梓、**桑原史明**、佐竹 真、本多 進、兼子博章、成田裕司、本多裕之。再生促進型医療機器のための細胞選択的接着ペプチド探索法の確立 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011 年 3 月 1-2 日

⑦**桑原史明**、碓氷章彦、田中啓介、荒木善盛、成田裕司、水谷真一、大島英揮、上田裕一。内皮化を促進する短鎖ペプチド含有小口径人工血管の開発 第 41 回日本心臓血管外科学会学術総会 浦安 2011 年 2 月 23-25 日

⑧**Kuwabara F**, Narita Y, Ogata A, Kanie K, Kato R, Satake M, Oshima H, Usui A, Ueda Y. Novel small caliber vascular prosthesis with specific trimer peptide. The Society of Thoracic Surgeons 47th Annual Meeting, San Diego, CA, USA. Jan 31-Feb 2, 2011.

⑨**桑原史明**、成田裕司、佐竹 真、兼子博章、田中啓介、荒木善盛、水谷真一、大島英揮、碓氷章彦、上田裕一。短鎖ペプチド-インテリジェント化担体を用いた小口径人工血管の開発 第 63 回日本胸部外科学会 大阪 2010 年 10 月 25-27 日

⑩ Kanie K, Kato R, Narita Y, Zhao Y, **Kuwabara F**, Satake M, Kaneko H, Honda H. Screening of cell-specific adhesion peptides for medical device coating. The 31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Danmark, Sep 5-9, 2010

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 史明 (KUWABARA HUMIAKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60584761

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし