

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：24791459

研究課題名(和文)薬剤溶出性またはペプチド含有生体吸収性担体を用いた大動脈瘤手術材料の開発

研究課題名(英文)Development of drug eluting or peptide containing materials for aortic surgery

## 研究代表者

寺澤 幸枝(Terazawa, Sachie)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50566990

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)：大動脈手術は侵襲度の高い手術である。本研究では、その侵襲度を軽減するための手術材料を開発することを目的とした。現状の大動脈手術では、大動脈吻合部の解離や仮性動脈瘤の発症予防のために、フェルト材等が用いられてきた。フェルト材に変わる材料として、動脈リモデリングを抑制するように、生体吸収性の素材を用い、加えてその材料に組織化を促すよう、細胞親和性の高いペプチドを付与した材料を作製した。生体吸収性材料は、動脈同様に伸縮性のある素材をポリカプロラクトンとD-ラクチドの共重合対で作製し、ペプチドはインテグリンリガンドのRGDを付与した。この材料をイヌ大動脈吻合に補強に用い良好な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Aortic aneurysm is a silent but life-threatening disease associated with aging and atherosclerosis. Surgery for aortic aneurysm have high morbidity and mortality. In this study, we developed novel surgical tool for aortic surgery that was composed biodegradable polymer and peptide which has high affinity of fibroblast to reduce aortic remodeling after surgery. This material will be used for reinforcement of anastomosis or wrapping in aortic surgery same as felt. We tried to create appropriate material which has elastic mechanical property. The peptide was attached to the material by use of cross linker (sulfa-SANPHA) technique. The peptide liked material was significantly increased attached cells compared to non-peptide material. This material was implanted canine descending aorta with aortic anastomosis. Pseudo aneurysm or/and aortic dissection were not fund in anastomosis site, however, infiltration of the cells were not significantly increased in material with peptide.

研究分野：心臓大血管外科学

キーワード：大動脈瘤 大動脈解離 大動脈手術 フェルト 生体吸収性材料 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤や大動脈解離に対する大動脈手術は、大動脈瘤の破裂に対して絶大な効果をもたらすが、非常に侵襲度の大きい手術であるのと同時に、術後の合併症も決して無視できない頻度・割合で発症する。仮性動脈瘤や吻合部解離など大動脈の血管リモデリングに伴う術後遠隔期の合併症も患者の予後を大きく左右する。ところが、今まで臨床においても研究においても、血管リモデリングの制御を考慮した手術材料はない。本研究では血管リモデリングの制御を考慮し術後合併症を軽減する、革新的な手術材料を創出する研究開発を行うことにした。

これまでに、当研究室および共同研究施設・企業において、ナノファイバー化した生体吸収性の材料に、薬剤を混和させることによる、ドラッグデリバリーシステムを開発していたため、その手法を血管リモデリング抑制に用いることにした。また、材料に特定の細胞親和性の高いペプチドを付与することで、その細胞を材料に引き寄せる技術も同様に血管リモデリング抑制に用いることにした。上記2つの技術を用いて、大動脈手術に用いる材料開発を試みることにした。

\*ところが、前者の生体吸収性材料を提供研究協力企業が研究途中で事業を縮小化したため、予定していた材料および開発協力が得られなくなり、上述の前者（ドラッグデリバリーによるリモデリング抑制材料の開発）は事実上遂行することが難しくなった。従って、本研究は後者（ペプチドを付与し、血管リモデリングを抑制する材料の開発）集約することとなった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管リモデリングを制御する薬剤溶出あるいはペプチド含有生体吸収性担体に基づく、新たな大動脈手術支援材料（フェルト・ラッピング材）の開発である。

3. 研究の方法

(1) 生体吸収性材料に薬剤を混和し、その溶出課程を *in vitro* および *in vivo* で計測した。ドキシサイクリンはマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) をキレートし、大動脈瘤の発症および進展を抑制するといわれており、この薬剤を徐放化することを試みた。

薬剤：ドキシサイクリン

生体吸収性材料：ポリ乳酸 (PLA) をエレクトロスピンニング法で不織布として作成

① *in vitro*; PBS 溶液中に攪拌し経時的に担体内に残留する薬剤濃度を計測

② *in vivo*; ラット背部皮下に移植し、経時的に取り出して残留薬剤濃度を計測

計測方法：HPLC 法

(2) ペプチド探索：吻合部の組織化を促す細胞成分として、線維芽細胞・間葉系幹細胞に親和性の高いペプチドを、我々独自の技術で

あるハイスループットペプチドアレイ細胞アッセイ法で探索する。

(3) 材料の開発：基材となる材料を開発する。生体吸収性の材料で、吻合しやすいテクスチャーを持ちかつ、しなやかな素材を開発目標とする。材料；ポリカプロラクトンおよび DL ポリラクチドを様々な割合で混合し、引っ張り試験でテクスチャーを検討し、マウス背部皮下埋入試験でその材料の吸収速度を検討した。

(4) 材料へのペプチド付与技術の開発：①ポリマー表面にクロスリンカーを用いてペプチド結合による材料への付与を行う。②ポリマー自体に混和することでペプチドを付与する。この付与方法による差異を検討する。

(5) *in vitro* 細胞親和性テスト：ペプチドを付与した担体（生体吸収性材料）に線維芽細胞を播種し、接着の程度・増殖の程度をペプチド付与なしの担体と比較・検討する。

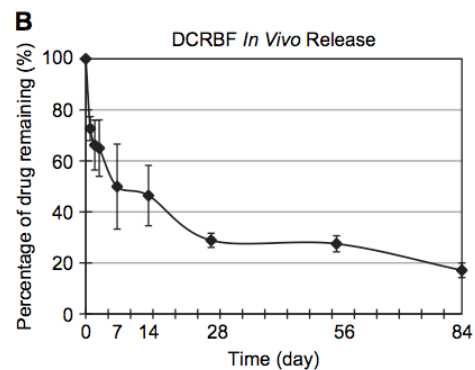
(6) *in vivo* 大動物血管吻合テスト：ペプチドを付与した担体を用いてイヌ下行大動脈吻合を行い、その操作性の評価と、組織学的な検討を行う

4. 研究成果

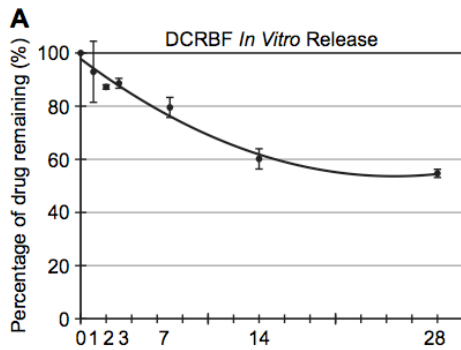
(1) 薬剤溶出試験：

ドキシサイクリン溶出試験 PLA にドキシサイクリンを混和して、エレクトロスピンニング法でナノファイバー化した不織布 (Docxycyclin controlled-release biodegradable fiber: DCRBF) を PBS 内に浸漬攪拌 (*in vitro*) あるいはラット皮下に移植 (*in vivo*) し、経時的に担体内に残留したドキシサイクリンを HPLC 法で計測する。

① *in vitro* : 1 日で約 5%、14 日で約 40%、28 日で約 55% 溶出した。

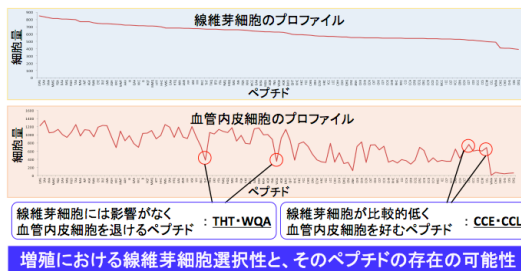


② *in vivo* : 1日で約25%、7日で約50%、14日で55%、28日で70%溶出した。



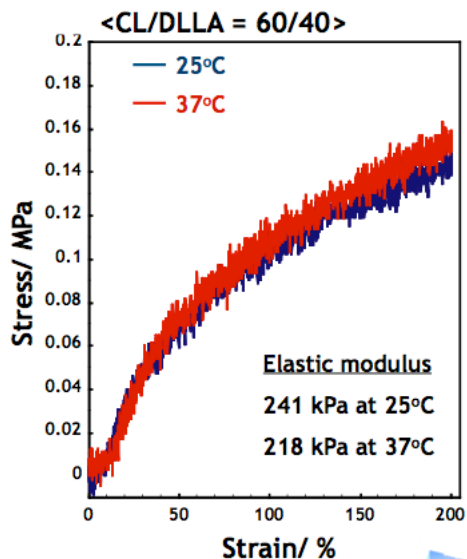
(2) ペプチド探索：ハイスループット・ペプチドアレイ細胞アッセイ法

線維芽細胞に比較的影響なく親和性が高く、内皮細胞の接着を避けるペプチドとして THT (トレオニン-ヒスチジン-トレオニン) と WQA (トリプトファン-グルタミン-アラニン) が挙げられた。I (イソロイシン) や K (リシン) では RGD よりも有意に高い間葉系幹細胞の接着性を示した。



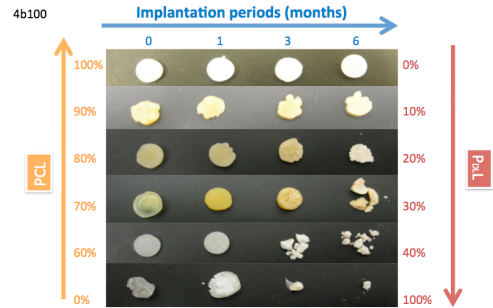
(3) 生体吸収性材料の開発

弾性評価：ポリカプロラクトンと DL ポリラクチドを 60:40 の比率で共重合 (複合) 化することで適度な弾性を獲得した。



吸収性評価：マウス皮下に埋込み吸収速度を検証した。担体は 60:40 で、約 6 ヶ月の時点では細分化されるが、すべてが吸収されるわけではなかった。

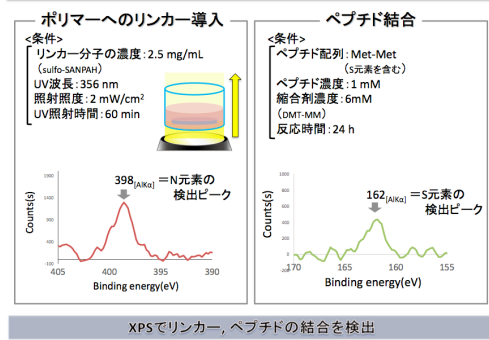
Degradation profiles of crosslinked P(CL-DLLA) *in vivo*



(4) 材料へのペプチド付与技術

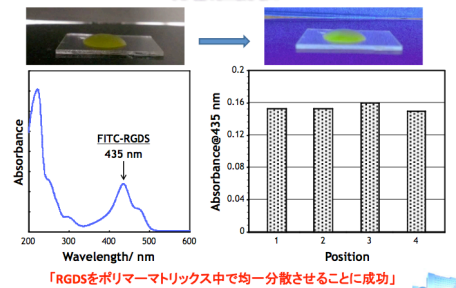
① ポリマー表面にクロスリンカー (sulfo-SANPHA) を付与することによってペプチド (RGDS) を修飾することに成功した。

RGDS結合60/40-100ポリマーの*in vitro*評価



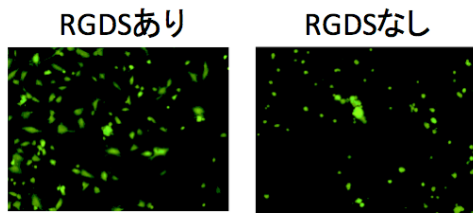
② 単純混合ではペプチドとポリマーは混和せず、乳化剤 HIFP/H<sub>2</sub>O 混合溶媒を用いてほぼ均等に分散混和することに成功した。

ペプチド混合分散したポリマー調製と分散性評価



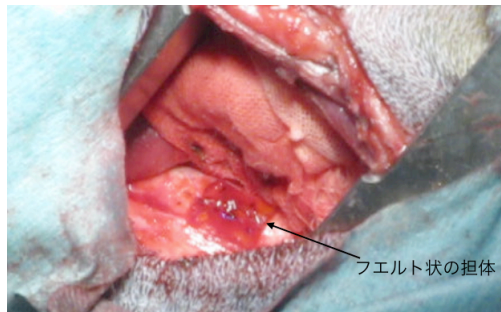
(5) *in vitro* 細胞親和性試験：線維芽細胞を接着させ、24 時間後観察。ペプチド (RGDS) を付与した担体の方が、明らかに細胞接着が良好で、細胞の進展も観察

された。

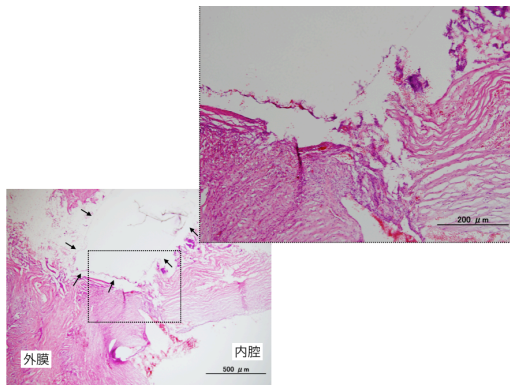


#### (6) *in vivo* 大動物血管吻合テスト

手術所見：作成した材料は伸縮性に富み、吻合も容易であったが、糸でカッティングが発生し、追加吻合が必要になるなど、改良の余地があると判断した。



植込み1ヶ月後の組織所見：仮性動脈瘤や解離など、担体の作用不全による変化は認めなかった。肺などの周辺組織の癒着は高度であった。細胞の浸潤や線維化の程度などは、ペプチド付与によって明らかに増大している所見は得られなかった。



#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

1. 寺澤幸枝、大島英揮、末永啓人、大野 司、蒔苗 永、伊藤英樹、八神 啓、徳田順之、藤本和朗、六鹿雅登、荒木善盛、成田裕司、阿部知伸、碓氷章彦 TEVER 後ステントグラフト抜去を伴う開胸大動脈手術を要した症例の検討 第45回日本心臓血管外科学会学術総会 2015年2月21日国立京都国際会館 京都府京都市
2. 寺澤幸枝、大島英揮、阿部知伸、成田裕司、荒木善盛、藤本和朗、六鹿雅登、岡田正穂、蒔苗 永、八神 啓、大野 司、末永啓人、碓氷章彦 超高齢者(80歳以上)に対する胸部大血管手術のリスク評価 第44回日本心臓血管外科学会学術総会 2014年2月17日 ホテル日航熊本、熊本県民交流館パレア、鶴屋ホール 熊本県熊本市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

寺澤幸枝 (TERAZAWA SACHIE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50566990

##### (2) 研究分担者

なし