

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861495

研究課題名(和文) MPCポリマーで表面改質した脱細胞血管片による小径人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of small sized vessel grafts from decellularized vessels

## 研究代表者

王 巍 (Wang, Wei)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・非常勤講師

研究者番号：60451944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は心筋梗塞など小動脈栓塞症の外科治療に欠かせない移植血管を代用する自家組織化小口径人工血管の開発を目的とする。ラットを使い、生体血管を特殊処理(抗原性を示す細胞を抜き、血液凝固防止)し、移植血管としての有効性を動物実験で検討した。主な成果は、脱細胞自動化装置(血管内と組織外同時に処理液を環流できる)の開発を成功；血管脱細胞法の最適化を確定(ドジシル硫酸ナトリウムSDS環流と超音波洗浄との併用)；脱細胞血管の細胞親和性を確認；ヘパリン、MPCポリマーなどで血管内膜抗凝固処理を試したが、移植後長期開存はできなかった。脱細胞血管内膜抗凝固処理の最適化を探るためさらに実験が必要だ。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop a highly functional, long-term reliable, off-the-shelf product of small diameter vascular graft for the surgical treatment of ischemic diseases such like cardiac infarct. rat's arteries were harvested, decellularized and anti-coagulation treated for graft use. Through our study, we invented an automatic tissue decellularizing machine with inner and outer double circulation function; we optimized the procedure for vessel decellularization with a combination of SDS and ultrasonic bath; we confirmed the cell affinity of decellularized vessels. We tried lumen immobilization of several anti coagulation substances such like haperin, MPC polymers, long-term patency was not attained. Further experiments of lumen anti coagulation is needed.

研究分野：生体材料

キーワード：再生医療 小口径人口血管 生体材料

## 1. 研究開始当初の背景

先天的な血管形成異常、外傷や腫瘍手術での切除などによる血管欠損は、遠位組織の壊死を引き起こすので、血管再建は不可欠である。その治療は大きく人工血管移植と自家血管移植の二種類の方法に分かれている。人工血管には、生体親和性、血栓抑制性、密封性、操作性、長期機能性、安全性などが求められ、現在では胸腹部大動脈用の大口径グラフト(内径 10mm 以上)はポリエステル布製が主流で、下肢、頸部、腋窩領域における動脈再建用の中口径グラフト(内径 6~8mm)には同布製及びテフロン製人工血管が多く使用されている。臨床において、中、大口径人工血管の成績に関してはほぼ満足できる状況にあるが、小口径血管(内径 6mm 未満)ではさまざまな材料が試されたが、血栓を生じて栓塞する率が高いため、自家血管移植に匹敵する有効性を持つグラフトはまだ実現されていない。一方、自家血管移植については、移植用血管組織片を採取するドナーサイトでの機能喪失が伴うため、採取する場所と大きさが限られる欠点がある。これらに対し、生体組織由来の材料を用いることも研究されている。これまでヒトあるいは動物の血管をアルコールやグルタルアルデヒドで化学的に処理して作製したものが試みられているが、臨床的には血栓で詰まりやすく、劣化しやすい欠点があるといわれている。この理由として死滅した細胞の残存とマトリックス分子の失活にあると考えられている。最近になり組織再生のために用いる生体材料の処理方法として、脱細胞化技術が注目されるようになって来ている。脱細胞化技術は生体由来の組織・臓器に界面活性剤を十分に灌流させ、細胞外マトリックスを温存しながらすべての細胞を除去し 3 次元的な足場を作製する技術である。この手法には次の利点がある。1)細胞が完全に除去されるため、拒絶反応を引き起こす抗原性が殆どない。2)基底膜などのマトリックス(コラーゲン、ラミニン、フィブロクチンなど)が温存されるため、細胞の誘導・制御機能を有する。3)組織の 3 次元構築と血管構造が保存されるため、適切な構造を有する組織を早期に形成できる。4)家畜などの異種動物から簡易に作製することができるので、経済的なグラフトとなる。ヒトとブタなどの家畜では細胞外マトリックスの分子はほとんど同じであるので、抗原性を示す細胞成分を完全に除去できれば、これらの動物から優れた再生用足場材料を作製できる可能性がある。人工真皮のような脱細胞化組織片は既に形成外科で広く臨床応用され、優れた効果を示している。さらに脱細胞化臓器に自己細胞を移植・培養し自家臓器を体外で作ろうという可能性も示唆されている。Ott HC, Taylor DA らは(Nature Medicine.2008)、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)による灌流処理が最も効果的なことを見出し、新生児マウス心筋細

## 胞を脱細胞化成マウス

心臓に注入し、灌流培養 4 日目に自律的心臓拍動を観察し、8 日目には収縮力が成マウス心臓の 2% に達することを確認した。Uygun BE らは(Nature Medicine.2010)、Adult ラット肝臓細胞を脱細胞化ラット肝臓門脈に注入し、一時的に in Vitro で培養してから、ラット腹内に移植し、腎動静脈と吻合して 8 時間後、機能する肝臓組織が確認されたと報告している。また Song JJ, Ott HC らは(Nature Medicine.2013)、ラットの脱細胞腎臓に上皮と内皮細胞を混合播種し、バイオリアクターで一時間培養した後、同所移植したら、尿管から尿の分泌を確認した。血管においても Wilshaw SP らは(Tissue Engineering A. 2012)、ヒトの大腿動脈を脱細胞化し、良い細胞親和性と十分な研究目的(つづき)力学強度を In Vitro で確認した。一方、良い材料があっても、小口径血管グラフトにおいては抗凝固処置は大変重要である、一般的にはヘパリン修飾が用いられるが、効果の維持時間が短く不十分である。そこで、より強力な表面抗凝固措置を求めて、生体膜を構成するリン脂質と同じ極性基をもつ 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーの修飾が候補に入った。“MPC のホスホリルコリン基は中性であり、高含水特性を示す。MPC ポリマーはタンパク質と相互作用せず、非特異的なタンパク質吸着を抑制する。また、細胞に与える影響も小さく MPC ポリマーを内面被覆したポリマーバック内で血小板の活性化を惹起することなく保存できた。現在までに様々な医用ポリマーの表面修飾が実施され、特に、抗血栓性に優れた循環器系メディカルデバイスの実用化が進められている。”ヒト、動物由来の血管を上記の脱細胞処理法で処理すると血管壁の基底膜、弾性板、弾性線維、膠原線維などの構造がほぼ完全に温存される。血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞はこの天然スキャフォールドのもとで自発的に遊走、着床、増殖し、正常なレイヤー構造を持つ血管が短期間で再生すると期待できる。さらに MPC ポリマーを内面修飾することにより、着実かつ安定な抗凝固機能が得られ、信頼性の高い血管機能の再建が期待できると考えられる。われわれは既に予備実験で脱細胞化血管組織片の吻合操作性と密封性を確認した。再生医療の最新進歩である灌流脱細胞化処理法を生かし、組織構造と生体活性をそのまま温存した脱細胞化血管グラフトの可能性を見出し、今回の研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、同種および異種動物由来の小口径血管組織を対象として、種々の条件で脱細胞化処理および MPC ポリマー修飾による抗凝固加工処理を行ない実験用グラフトを作製する。そして実験動物の血管欠損部位に移

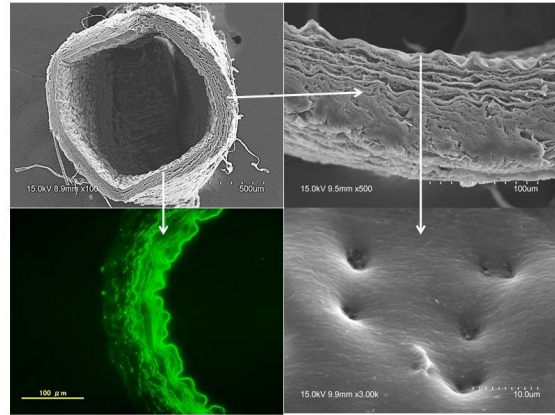
植し、血管グラフトとしての機能を評価して最適な処理条件を見出して、脱細胞化血管グラフトの臨床応用の可能性を検討する。具体的には、1.血管組織片脱細胞処理の最適化を目指し、超音波処理の併用と全身灌流の有効性を検討する。2.ヘパリンと MPC ポリマー修飾の抗凝固効果を比較する。3.脱細胞化処理を施した同種と異種小口径血管移植片をラットの大腿動脈に移植し、自家血管移植を対照として、小口径血管再建の効果を定量的に評価する。

### 3. 研究の方法

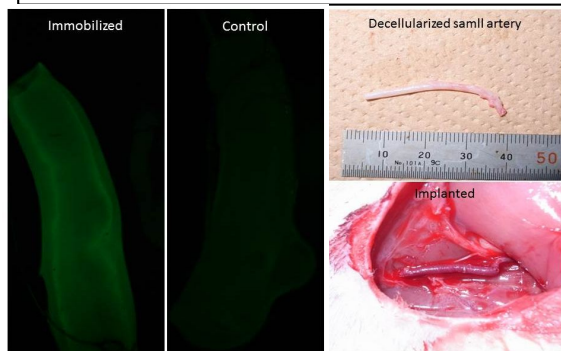
1. 血管組織片の脱細胞処理の最適化を目指し、超音波処理の併用と全身灌流の有効性を検討する。2. 走査電子顕微鏡 (SEM) と免疫蛍光染色法を用いて、脱細胞化血管組織片の構造を特定する。3. 脱細胞血管上に線維細胞を培養し、細胞親和性を見る。4. ヘパリンと MPC ポリマー修飾の抗凝固効果を移植実験で比較する。5. 脱細胞化処理を施した同種と異種の小口径血管移植片をラットの大腿動脈に移植し、自家血管移植を対照として、小口径血管グラフトの有効性を定量的に評価する。

### 4. 研究成果

主な成果は、脱細胞自動化装置（血管内と組織外同時に処理液を環流できる）の開発を成功；血管脱細胞法の最適化を確定（ドジシル硫酸ナトリウム SDS 環流と超音波洗浄との併用）；脱細胞血管の細胞親和性を確認；ヘパリン、MPC ポリマーなどで血管内膜抗凝固処理を試したが、移植後長期開存はできなかった。脱細胞血管内膜抗凝固処理の最適化を探るためさらに実験が必要だ。

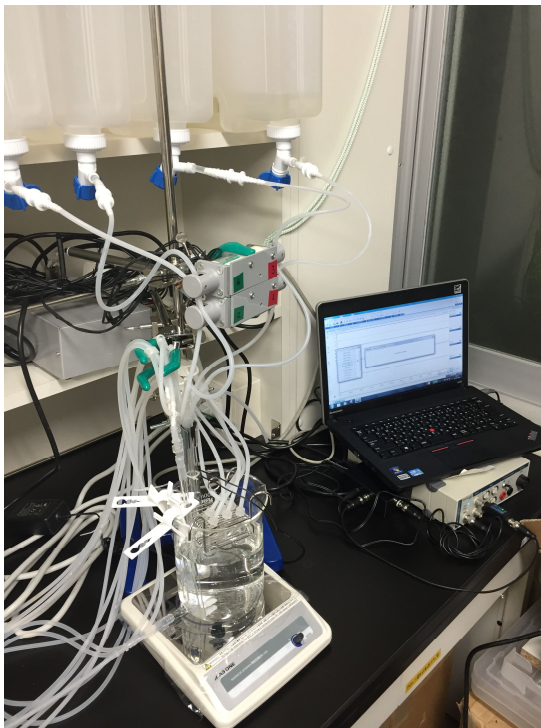


Detergents decellularized small vessel:  
extracellular matrix is preserved well.



Anticoagulation  
substance immobilized.

Implanted  
decellularized  
vessel.



Automatic tissue decellularizing device

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 巍 (Wang, Wei)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
非常勤講師  
研究者番号：60451944

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：