

脱細胞小口径人工血管の表面修飾と高開存性

Luminal surface modification and the patency of small-diameter acellular vascular grafts

○山岡哲二 (国循研セ)、三橋直人 (国循研セ・鈴鹿医科大)、佐久間貴大 (国循研セ・鈴鹿医科大)、森反俊幸 (鈴鹿医科大)、藤里俊哉 (大工大)、馬原 淳 (国循研セ)

Tetsuji YAMAOKA, National Cerebral and Cardiovascular Center (NCVC)
Naoto MIHARA and Takahiro SAKUMA, NCVC and Suzuka University of Medical Science
Toshiyuki MORITAN, Suzuka University of Medical Science
Toshiya FUJISATO, Osaka Institute of Technology
Atsushi MAHARA, NCVC

Abstract: We have been studying decellularization technology which involves the ultrahigh-hydrostatic pressure (UHP) at 1000MPa and the following washing process. Although, the decellularized aorta implanted to porcine resulted in excellent result of the patency, neointima formation, and SMCs infiltration, slight calcification was found in rare case after the long period implantation. Especially, in the case of small-diameter aorta, the transplantation result was not satisfactory may be due to the retarded endothelialization of the luminal surface. Actually, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) did not adhere onto the acellularized tissue well. In this study, luminal surface of the acellular small vascular blood vessels was modified with an EC-affinity peptide sequence, (Pro-Hyp-Gly)₇-REDV. The amount of HUVECs adhering onto the surface was increased by the peptide modification. In addition, the patency in rat abdominal descending aorta replacement system was also greatly improved.

Key Words: Acellular tissue, High pressure, Patency, vascular graft

1. 緒言

我が国においては、年間 60000 本以上の人工血管 (PET 製、PTFE 製、PU 製) が国内で使用され、16000 個の人工弁 (機会弁と生体弁が約同数) が用いられている。いずれも、優れた成績をおさめているが、合成材料やグルタルアルデヒドにより架橋処理した動物由来材料から作成されているこれらの非分解性心血管系医療部材では、抗凝固剤の必要性や、感染性、あるいは長期埋入時における石灰化が大きな問題となる。近年、多くの再生型組織の研究が進んでいるが、自己組織へと置き換わることで、これらの多くの問題点が解決できると期待されている。一つの有望な戦略は、実際の組織から細胞成分を除去した「脱細胞組織」の利用であり、当センターでは平成 12 年より厚労科研費補助金 (北村惣一郎主任) のサポートを得て研究を開始した。その後、等方静水圧印加処理を利用した心血管系組織の脱細胞化システムを構築し、その *in vivo* における性能を評価してきた (Fujisato T et al. in “Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches (Mori H. and Matsuda H. Eds)” ; 83-94 (2005))。具体的には、ブタ胸部下行大動脈血管やブタ肺動脈弁に対して、水系溶媒を媒体として 1 万気圧という高圧を印加することで細胞を処理し、その後の洗浄工程を経て、細胞破片を取り除く手法である。この手法により、生体組織特有の力学的特性も保存されたまま、組織中のドナー由来細胞を除去できることが確認でき、同種移植手術で良好な結果が得られている。

近年、同処理手法の小口径血管への適応を目指して、ラット腹部下行大動脈を脱細胞処理して、同種同所性移植の評価を続けてきたが、小口径の血管の移植後の開存性は必ずしも満足できるものではなかった。そこで、本研究では、脱細胞血管内空面の血管内皮細胞親和性を向上させることで、開存性に優れた小口径人工血管について検討した。

2. 実験

2-1 血管表面のペプチド修飾

(Pro-Hyp-Gly) の 7 回繰り返し配列と REDV 配列を有するオリゴペプチドと、コントロール配列を含む 5 種類のオリゴペプチドを設計した。ブタの下行大動脈を 8mmx8mm に細切し、1000MPa で 10 分間の UHP 処理により脱細胞処理を施した。その後、脱細胞化組織は 10 μ M のオリゴペプチド溶液に 60°C で 60 分間浸漬し徐冷した。

2-2 *In vitro* HUVEC 接着試験

Q-Dot 625 により標識された正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) はオリゴペプチド溶液に浸漬した脱細胞化組織へと播種 (2x10⁵ cells/tissue) し、37°C で 60 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、接着している細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、その数を定量化するために、接着した細胞成分を Lysis buffer に溶解させて Q-dot 625 の蛍光強度を定量した。

2-3 *In vivo* 移植実験

In vivo でのオリゴペプチド修飾効果を検討するため、

脱細胞化したラットの下行大動脈をオリゴペプチド溶液に浸漬し、その後SDラット（7-8 week old）に移植した。血管の開存性は、MRI およびレーザードップラー解析により評価した。移植後の組織再生の様子は、組織染色により評価した。

3. 結果と考察

（Pro-Hyp-Gly）の7回繰り返し配列とREDV配列を含むオリゴペプチド溶液に浸漬した脱細胞化組織に対して細胞を播種した結果、表面に多くの接着細胞が観察された。また、溶解液の蛍光スペクトル測定から、約80%程度の細胞が接着していることを確認した。一方でコントロール配列のオリゴペプチドを用いた場合や、オリゴペプチド溶液に浸漬しない場合には、接着細胞はほとんど観察されなかった（Figure 1）。また、繊維芽細胞を播種した場合には、配列特異的細胞接着は認められなかった。以上の結果より、オリゴペプチド溶液に脱細胞化組織を浸漬することで、表面にREDV配列を修飾することが可能であり、配列特異的に内皮細胞が脱細胞化組織へ接着することが示された。

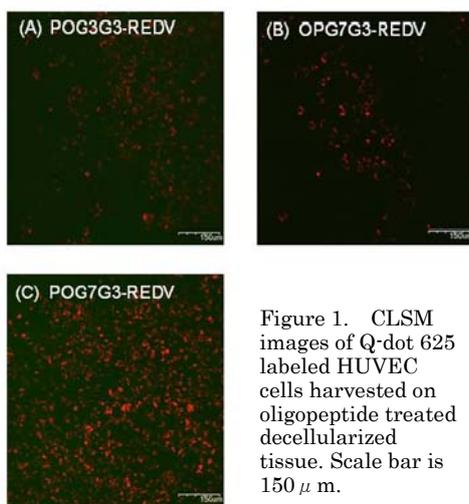


Figure 1. CLSM images of Q-dot 625 labeled HUVEC cells harvested on oligopeptide treated decellularized tissue. Scale bar is 150 μ m.

次いで、オリゴペプチドによる表面修飾効果について検討するため、オリゴペプチド溶液に浸漬した脱細胞化血管をラットの下行大動脈へ移植し、開存性ならびに組織再生について検討した。（Pro-Hyp-Gly）の7回繰り返し配列とREDV配列を含むオリゴペプチド溶液で修飾された脱細胞化血管を移植した結果、移植後1か月において約80%の割合で血管が開存していることがMRI画像から示唆された（Figure 2）。さらに、組織染色の結果、移植血管の表面に再生した血管組織（平滑筋細胞と内皮細胞）が示された。しかし、コントロール配列を用いた場合や非修飾の脱細胞化組織では20~40%程度の開存率に留まり、有意な内皮化形成は認められなかった。コラーゲン模倣ペプチドである（Pro-Hyp-Gly）7の優れた脱細胞組織親和性は、ストランド

インベージョンに基づくものと考えられ、その結果、安定なREDVペプチドの固定化が行えたものと考えられる。

以上の結果よりオリゴペプチドによる修飾により血管の開存率や組織再生能を向上させたことから、コラーゲン結合性オリゴペプチドにより脱細胞化組織を迅速に修飾できる可能性が強く示唆された。

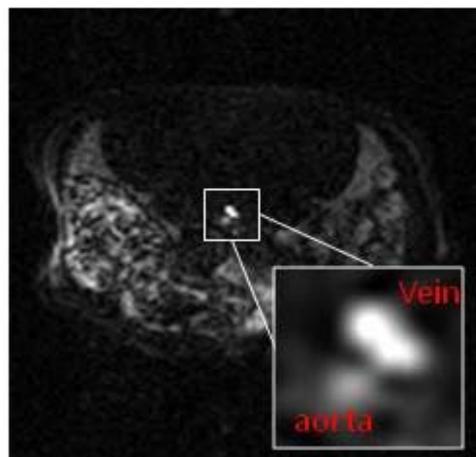


Figure 2 MRI images of abdominal aorta and vein after 1 month transplantation of the decellularized blood vessels modified with POG7G3REDV.

参考文献

- (1) Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, et al. In: Mori H, Matsuda H, editors. Cardiovascular regeneration therapies using tissue engineering approaches. Tokyo: Springer; 2005. P.83-94.
- (2) Mo X, An Y, Yun C-S, and Yu S.M, Nanoparticle-Assisted visualization of binding interactions between collagen mimetic peptide and collagen fibers, Angew. Chem. Int. Ed 2006, 45, 2267-2270..