

小口径脱細胞血管を開存させる攻撃的抗血栓化処理技術の開発

An Offensive Strategy for Antithrombogenic Small-Diameter Acellular Blood Vessel

○山岡哲二¹、染川将太^{1,2}、北井麻里奈^{1,3}、
大矢裕一³、木村良晴²、馬原 淳¹

(¹国立循環器病研究センター研究所、²京都工芸繊維大学、³関西大学)

Tetsuji YAMAOKA¹, Shota SOMEKAWA^{1,2}, Marina KITAI^{1,3},
Yuichi OHYA³, Yoshiharu, KIMURA², Atsushi MAHARA¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Fujishiro-dai Suita Osaka, 565-8565, JAPAN, ²Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan, ³Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamatecho, Suita, Osaka 565-8680, Japan)

Abstract: Medium and large-diameter vascular prosthesis prepared from the synthetic polymers have been clinically employed for the vascular reconstruction surgery. However, the small-caliber vascular graft with the diameter smaller than 3 mm has not been used in the clinical stage because of the thrombogenic formation and stenosis. We have developed the surface modifier for the decellularized tissue. The peptide could promote the endothelial cell binding in vitro and the endothelialization in vivo. The carotid artery of the ostrich has long length and small diameter, and the peptide-modified carotid artery would be suitable for the long-bypass graft in the vascular surgery.

Key Words: Small-diameter vascular graft, Acellular tissue, EPC

1. 緒言

血管再建術では、DacronTMや GORETEXTMなどの合成高分子製の中・大口径人工血管が臨床的に使用されている。再生型的人工血管としては、1965年に Winberg と Bell らにより細胞とコラーゲンからなる人工血管の論文が報告されて以来、数多くの成果が報告されてきた。しかしながら、臨床現場において切望されているにも関わらず内径が 3mm 以下の小口径人工血管は、未だ実用化できていない。

小口径人工血管の開発研究において、外科的な移植手術に耐える物理強度の達成や、これまで報告されてきたような動物実験による検証のみでは、現状を打開することは出来ない。臨床での使用部位で要求されるアスペクト比(内径と長さ)を有し、また、組織学的にヒトに近い大動物を用いて、有用性の有無を検証することが不可欠である。同時に、移植部位において負荷される体血圧や血流などの物理的負荷環境において人工血管の開存性を評価することも極めて重要である。このような実験系の確立によって、移植初期に惹起される血管内腔での血栓形成による塞栓を抑制できるマテリアルを設計開発することが可能となる。

我々は、脱細胞人工血管内腔面に、血中循環血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cells) を捕捉するペプチド分子を配向する技術を開発した⁽¹⁻²⁾。その細胞特異性など、基礎的検討は、in vitro においてモデル細胞を用いて検討した。また、その開存性実証のための第一次スクリーニングとし

て、ラット腹部下行大動脈置換実験を行い、内腔処理の有無の影響を詳細に検討した。さらに、この技術が臨床の場において有用かどうかを、さらに検証するために、上述の条件を満たす大動物実験を立ち上げて実施した。すなわち、内径 2mm 長さ 20-30cm の脱細胞化小口径血管を作製し、ブタ移植モデルにより評価した。人工血管のマトリックスとして、食用ダチョウの頸動脈を採取し、当センターで開発された超高压処理技術により脱細胞化した⁽³⁾。これを上述した EPC 接着性ペプチド配列で修飾し、ミニブタ大腿動脈-大腿動脈交叉バイパス術 (FF バイパス術) に応用してその有用性を検証した。

2. 実験

脱細胞組織表面修飾分子として、(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 に細切り、1000MPa で10分間の UHP 処理により脱細胞処理を施し、10 μ M のオリゴペプチド溶液に 60 $^{\circ}$ C で 60 分間浸漬して徐冷した。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 (2x10⁵cells/tissue) し、37 $^{\circ}$ 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

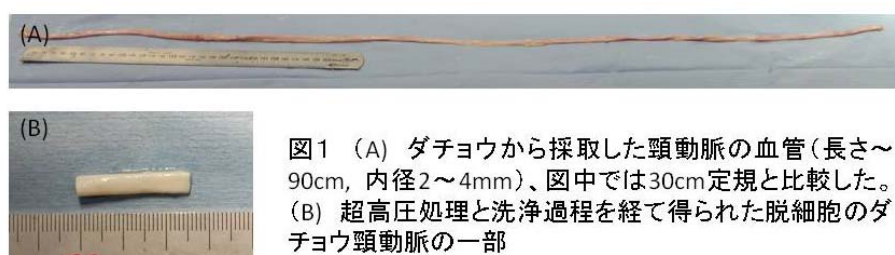


図1 (A) ダチョウから採取した頸動脈の血管(長さ~90cm, 内径2~4mm)、図中では30cm定規と比較した。(B) 超高压処理と洗浄過程を経て得られた脱細胞のダチョウ頸動脈の一部

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。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。

ダチョウから採取した頸動脈をトリミング後、超高压処理ならびに洗浄することで、脱細胞化小口径血管を調製した (Figure 1)。

ラット腹部下行大動脈と同様の方法で、内腔面にペプチド分子を固定化した。作製した、内径 2mm, 長さ 20-30cm の脱細胞化小口径人工血管をミニブタの左大腿動脈へ単側吻合し、右大腿動脈へ接続することで血流を再建した。右大腿動脈の上流側は結紮により血流を遮断することで、大腿動脈大腿動脈交叉バイパス術 (FF bypass) のモデルとした。血流は、レーザードップラー、血管内視鏡、血管内超音波画像診断 (IVUS) により検討した。

3. 結果

蛍光修飾したオリゴペプチドを用いて、内腔面の修飾を可視化したところ、表面から 50 μ m の深さまで、ペプチドが浸入して固定化されていることが判った。(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では、接着細胞はほとんど観察されなかった。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。

次に、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。ラットでは、腹部下行大動脈がゆっくりと塞栓した場合には死亡することなく、外観から判別することは出来ない。したがって、経時的開存率を検討するためには、設定期間ごとに多くのラットを犠牲死させる必要がある。今回我々は、ラット用 MRI を導入し、腹部断面の MRI 像より血管の開存性を経時的に検討する系を立ち上げた (Figure 2)。

内腔面未修飾の脱細胞血管の開存性は時間とともに低下し、1ヶ月での開存率は 20% であった。さらに、コラーゲン様配列である (Pro-Hyp-Gly)₇ の繰り返し回数を減少させたり、配列を入れ替えて (Hyp-Pro-Gly)₇ としたコントロール配列を用いた場合には開存率は 40% 程度であり、いずれの場合にも、明確な有意な内皮化形成は認められなかった。これに対して、(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た。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。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

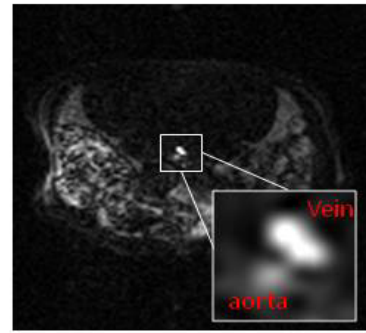


Figure 2 MRI images of abdominal aorta and vein after 1 month transplantation of the decellularized blood vessels modified with POG7G3REDV.

でき、また、得られた修飾脱細胞小口径血管の効果は十分に期待できるものである。しかしながら、上述したように、ラット下行大動脈置換実験は、内径 1mm と極めて細井にもかかわらず、様々な材質の血管の開存が古くから報告されている。このことを考えると、これらの結果より、本血管が臨床の場で使用可能と結論づけることは妥当ではない。

そこで、食用ダチョウの頸動脈から内径 2mm 長さ 30cm の小口径人工血管を作製し、これまで開存の報告がない極めて厳しい条件の下で検証を進めることとした。まず、作製した小口径脱細胞化人工血管の応力-ひずみ曲線を測定した結果、典型的な J カーブが認められ、その破断強度は 1.4-1.6MPa であった。ミニブタの大腿動脈に対して、内腔にペプチドを修飾した脱細胞化小口径血管を FF bypass として移植した。一般的な外科用縫合糸により人工血管を移植した結果、血流の拍動 (血圧変化) に追従して人工血管の拍動が認められた。また、移植後 10~20 日に血管の開存性を評価した結果、ペプチドを修飾した血管では全例で開存が認められた (N=3)。血管内視鏡において in vivo で内腔面を観察した結果、血栓の形成は認められなかった。また、IVUS により内腔のサイズを評価した結果、移植前とほぼ同等の口径を有している事が示された。一方で、ペプチドを修飾していない脱細胞化小口径人工血管を移植した結果、移植後 7 日ですでに血栓形成による塞栓が認められた。以上の結果より、作製した脱細胞化小口径人工血管は、動脈系へも適応可能な新たな組織再生型小口径人工血管としての有効性を示すことが出来たと考えている。

今後、自己組織との置き換わりなど、検討項目は多く存在するが、最も大きな第一関門を通過できたことは極めて意義深いと確信している。

4. 引用論文

- 1) 山岡哲二、馬原 淳、人工血管および人工血管の製造方法、特願 2012-237258
- 2) 山岡哲二、馬原 淳、人工血管および人工血管の製造方法、特願 2013-259510
- 3) 藤里 俊哉、岸田 晶夫、船本 誠一、中谷 武嗣、北村 惣一郎、特許第 4092397 号 (平 20.3.14)

5. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費、循環器病研究開発費、および、科学技術振興機構・戦略的イノベーション創出推進プログラム (S-イノベ) の支援によるものである。