

遺伝子導入を駆使した内皮細胞誘導型ハイブリッド
人工血管の開発

課題番号：14380387

平成 14 年度～平成 17 年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））

研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 平 田 哲

(旭川医科大学医学部)

遺伝子導入を駆使した内皮細胞誘導型ハイブリッド 人工血管の開発

課題番号 : 14380387

研究組織

研究代表者 平田 哲 (旭川医科大学医学部助教授)

研究分担者 笹嶋 唯博 (旭川医科大学医学部教授)

東 信良 (旭川医科大学医学部講師)

赤坂 伸之 (旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成 14 年度 5,300 千円

平成 15 年度 600 千円

平成 16 年度 800 千円

平成 17 年度 900 千円

計 7,600 千円

研究発表

口頭発表

- 1) Shimizu N., Azuma N., Hirata S., Sasajima T.: Inhibition of intimal hyperplasia after vein bypass grafting using nuclear factor-kappa B decoy oligodeoxynucleotide. 6th International Congress of Asian Vascular Society. 2004
- 2) 清水紀之、東信良、平田哲、西川智之、笹嶋唯博ほか.: HVJ-Envelope法を用いた NFκB decoy 導入による移植静脈グラフト内膜肥厚抑制の検討. 第 104 回日本外科学会定期学術集会. 2004
- 3) 清水紀之、東信良、平田哲、笹嶋唯博: 核酸医薬による実験的静脈グラフト内膜肥厚抑制とその作用機序の検討. 第 33 回日本血管外科学会学術総会. 2005
- 4) Shimizu N., Azuma N., Hirata S., Sasajima T : Effect and mechanism of NF-κB decoy on intimal hyperplasia after vein bypass grafting. 47th Annual World Congress of International College of Angiology. 2005

緒言

糖尿病患者の増加に伴い、下腿や足部あるいは冠動脈といった小口径領域の動脈へバイパス手術を行う機会が劇的に増加し、また、長寿化にともなって再手術も増加していることから、こうした小口径領域に使用できる代用血管が不足し、救命や救肢を行う上で問題となっている。

現在、こうした小口径領域で臨床利用可能な人工血管は皆無であり、自家の静脈や動脈を使用しているが、これら自家資源は有限であり、良質の自家血管が得られない場合にはバイパスを断念せざるを得ない。

このように、小口径人工血管の臨床成績は極めて不良であり、その理由として、ネズミやウサギなどの小動物では、人工血管内面は容易に内皮細胞の進展によって被覆され、安定した抗血栓性内面を形成するが、大動物では内皮細胞の被覆が不良で、特にヒトでは人工血管内面には内皮細胞はほとんど進展しないことがあげられる。そのため、ヒトでは、宿主と人工血管との連結部で治癒障害による内膜肥厚を起こしたり、抗血栓性を獲得できなかつたりして、早晚閉塞することが、多くの臨床標本から明らかにされている。

このように、ヒトにおける小口径人工血管のハードルは非常に高いが、血管壁に遺伝子を導入して、内皮細胞を誘導したり、内膜肥厚を抑制したりすることができれば、小口径領域においても人工血管が使用可能になると考えられる。

以上のような背景から、本研究では、1) 血管壁に対する遺伝子導入法の開発、2) 小口径代用血管への内皮細胞誘導の可能性について検討した。

(1) 血管壁に対する遺伝子導入法の開発

【目的】

小口径代用血管への内皮細胞の誘導や内膜肥厚抑制の手段として、血管壁の構成細胞に遺伝子を導入する方法を開発・確立すること目的とし、下記の実験を施行した。

【材料と方法】

ヒトの小口径血管と口径・壁厚が近似しているイヌ伏在静脈を用いて、血管壁構成細胞への遺伝子導入方法として①加圧法、②HVJ-Envelope法、③超音波

法の比較検討を行い、導入効率や血管壁への障害の程度などを比較検討した。さらに、遺伝子導入した血管を動脈環境に移植して、開存性や血管壁内に導入した遺伝子の存在証明、活性などを測定した。

導入遺伝子:①biotin 標識オリゴヌクレオチド、②NFkB decoy、③HGF plasmid (アンジェス MG 供与)

各導入法の実際の方法は下記のとおり、

- ① 加圧法：加圧という物理的な方法によって遺伝子導入を試みる方法。血管内に生食に希釈したオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)溶液またはプラスミド溶液を満たし、150mmHg ないし 300mmHg の圧をかけて 30 分静置。
- ② HVJ-Envelope 法：HVJ(センダイウイルス)の優れた接着能・細胞融合能を利用した方法で、ウイルスの病原性を回避する目的で、紫外線を用いてウイルスを不活性化し、その envelope のみをベクターとして用いる方法。あらかじめ、envelope 内に目的の遺伝子を封入し、そのベクター溶液で血管内腔を満たし、30 分間 37 度でインキュベーションする。
- ③ 超音波法：超音波用造影剤溶液で血管内腔をみたし、血管外から治療用超音波をあてることで、超音波用造影剤粒子を血管壁と衝突させ、その際にできる小孔を通して遺伝子を取り込む方法。レボビスト溶液で血管内腔を満たし、超音波装置の出力や超音波照射時間を調節し、条件を設定する。

【結 果】

① 加圧法：物理的な大きさに依存するので、プラスミドはほとんど導入されない。また、ODN はわずかに導入されるものの、導入のために圧をあげると血管壁の障害が生じるため、加圧法は組織の脆弱な血管への遺伝子導入法としては適切な方法ではないと判断された。

② HVJ-Envelope 法：

・導入効率・導入様式：内膜および中膜の内層まで良好に遺伝子導入された。

ODN 導入の場合、40～50%の細胞が導入遺伝子マーカーであるビオチンで染色され(Fig.1)、導入された遺伝子は、細胞内に存在して、少なくとも導入操作後 3 日間は細胞内にとどまっていることが示された。

・血管壁障害：HVJ-Envelope によって導入を行った血管の開存性は良好で、遺伝子導入による血管壁障害は明らかではなかった。ただし、細胞浸潤を認めることや、ICAM-1 発現レベルの上昇を認めることから、ウイルスの envelope に対する免疫反応あるいは非特異的炎症反応を惹起している可能性が示唆された。

③ 超音波法：

・導入効率・導入様式：内膜および中膜の内層まで良好に遺伝子導入されるが、

細胞内とともに細胞外（間質）も強く染色され、物理的に血管壁内には入ったものの有効に細胞内に到達できない遺伝子が多いことが示唆された(Fig.2)。

- ・ 血管壁障害：超音波法によって遺伝子導入した静脈を静脈グラフトとして移植したが、開存率は33%であり、超音波による物理的ダメージが影響しているものと考えられた。
- ・ 導入効率と超音波出力の調整等によって、改良の余地があるものと考えられた。

以上の検討から、血管壁という脆弱で、かつ、内面性状をきびしく追求しなければならぬ場における遺伝子導入法としては、HVJ-Envelope法が最も優れており、加圧法や超音波法といった物理的な方法よりも勝っていると考えられた。従って、以下の遺伝子導入については、HVJ-Envelope法を用いて実験を進めることとした。

ただし、HVJが有する膜蛋白に対する宿主の反応（非特異的炎症反応や免疫応答）が血管壁の炎症ひいては癒痕化を招く可能性もあり、さらに臨床応用を想定した場合には、そうしたベクターを使用することに対する倫理的配慮も必要であると考えられることから、さらに異なった手法を探求してゆく必要がある。

(2) 小口径代用血管への内皮細胞誘導

【目的】

代用血管への内皮細胞の進展・被覆が、ヒトにおける小口径代用血管の内膜肥厚を抑制し、長期開存・実用化につながるという仮説のもとで、人工血管やその他の素材、間質、細胞の種類、さらには遺伝子導入などを吟味して、内皮細胞を誘導可能な代用血管の開発を行うことを目的とした。

【材料と方法】

- ・ 下記代用血管に細胞を播種し、その細胞から出される **growth factor** 等のシグナルによって内皮細胞が誘導され、代用血管表面を被覆するかどうかを検討するため、下記のごとく播種する細胞の種類や細胞の足場として適切な **ECM(extra-cellular matrix)**の種類について **in vitro** で検討した。
- ・ 人工材料での検討に加えて、同種動脈や脱細胞化した同種動脈などの生体材料を用いた小口径代用血管についても同様の検討を行った。

- ・上記にて作成した小口径代用血管をイヌ大腿動脈に移植し、開存成績や摘出標本の組織学的検討を行った。

使用した材料は下記のとおり

①代用血管

- ・人工血管：polybutylene terephthalate と polyethylene terephthalate による 3mm 径織布人工血管（テルモ社提供）（細胞進入、血管新生などを容易に受け入れることのできる porosity の大きな人工血管を使用）
- ・同種動脈（新鮮同種動脈移植、凍結保存脱細胞化同種動脈移植）

②使用細胞：下記の細胞を、セルカウンターを用いて細胞数をカウントし、一定数を代用血管に播種した。

イヌ大腿動脈由来内皮細胞および平滑筋細胞および市販ヒト大動脈平滑筋細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト末梢血幹細胞、ヒト線維芽細胞など

③播種細胞の足場としての各種ゲル：

コラーゲンゲル、フィブリンゲル、Pluronic gel、メビオールゲル

④導入遺伝子：HGF(hepatocyte growth factor; アンジェス MG 提供)

⑤遺伝子導入方法：HVJ-Envelope 法

【結果】

1) 平滑筋細胞播種人工血管

・培養平滑筋細胞は、人工血管線維に接着し、増殖するが、その反応は人工材料素材そのものに大きく影響を受けることが示された。すなわち、臨床で通常使用されている dacron 繊維では培養細胞の接着・増殖が乏しい(Fig.3)のに対し、polybutylene terephthalate と polyethylene terephthalate の混合繊維では、細胞の良好な接着・増殖とともに細胞外マトリックスを分泌してネットワーク様の細胞間連絡を形成した(Fig.4)。

しかし、培養液中の FGF-2、IGF、インスリンなどの増殖因子を投与・増量等によっても、線維間を埋めるような細胞増殖や ECM の旺盛な分泌は認めなかった。

・細胞環境の改善をはかり、上記 1) の問題を解決するため、コラーゲンゲルやフィブリンゲル、Pluronic gel、メビオールゲルなどを使用して、移植実験を行った。

・In vitro で作成した培養平滑筋細胞播種人工血管のイヌ大腿動脈への移植実験を行ったが、人工血管は HGF 導入群・非導入群いずれも移植後早期（3 日以内）

に閉塞した。

・人工血管の早期閉塞を回避し、移植直後から移植後早期の抗血栓性を付与する目的で、平滑筋細胞播種人工血管内面に内皮細胞を播種して、移植実験を施行したが、やはり早期血栓閉塞にいたり、この種の織布人工血管の小口径領域における限界であると判断し、下記の実験を追加した。

2) 生体材料を用いた小口径代用血管の開発

①新鮮同種動脈移植実験：

他の個体から大腿動脈または頸動脈を採取し、これを別の個体へ移植する同種動脈移植を行い、小口径領域における代用血管として使用可能であるか検討した。

・開存性は極めて良好で、参考資料として添付したラットの同種動脈実験移植結果（巻末の参考論文）と同様に、イヌ大腿動脈移植で1年までの長期開存を得、良好な内面の抗血栓性が示された。

・摘出標本では、中膜細胞は移植における拒絶反応により排除されて無細胞化した間質のみの管状構造を呈しており(Fig.5)、中膜及び外膜の脆弱化によると考えられる拡張傾向を認めた。

・内面の走査電顕所見では、宿主側からの良好な内皮細胞誘導が認められた。

以上より、同種動脈は、極めて高い内面の抗血栓性と内皮細胞誘導性を有する優れた生体材料であり、拒絶反応を軽減または回避する修飾が可能であればハイブリッド人工血管よりも実用的な生体材料となりうることを示唆された。

拒絶反応を回避する方法として、脱細胞化を行い、追加実験を施行した。

②凍結保存無細胞化同種動脈グラフト

同種動脈への拒絶反応の標的となる内皮細胞および中膜平滑筋細胞を除去するため、トリプシンによる無細胞化を行い、さらにその内面に宿主の内皮細胞を播種して、小口径代用血管として使用可能か検討した。

・イヌの頸動脈および大腿動脈を無菌的に採取し、凍害防止用保存液中で、凍結保存したのち、トリプシン溶液にて脱細胞化を行った。トリプシン濃度とトリプシン溶液浸漬時間を検討した結果、凍結動脈グラフトでは新鮮動脈グラフトに比べて脱細胞化が容易で、0.05%トリプシン溶液に24時間浸漬する方法で十分な脱細胞化が得られることが明らかとなった(Fig.6)。

・脱細胞化同種動脈への宿主内皮細胞播種グラフト作成

凍結同種動脈グラフトに脱細胞処理を行い、さらに、そのグラフトを移植する宿主の内皮細胞を採取・培養して、脱細胞化同種動脈内面に播種し、内皮細胞化した脱細胞化同種動脈グラフトを作成した。内皮細胞化により、移植後早期の抗血栓性が獲得されることが期待される。内皮細胞化したグラフトの組織像を Fig.7 に示す。

考 察

小口径領域の人工血管を開発することは急務であるが、そこには、移植後早期の抗血栓性と中間期の内膜肥厚という問題が存在し、その根底には生体の人工物に対する反応という大きな障壁が存在し、人口材料が進化し分子工学や遺伝子工学が進歩した現在においても未だ困難であるのが現状である。大口径の人工血管では生体と人工物との接合部である血管吻合部に問題を生じても口径が大きく大流量なので臨床上問題にならないが、小口径の場合には、口径が細く流量も少ないので、治癒障害すなわち内膜肥厚が人工血管閉塞の原因となる。抗血栓性を優先して表面平滑な人工材料を選択すると、細胞親和性が不良で細胞が良好に接着・進展してこないため、その結果人工物の内皮細胞による被覆が起こらないというジレンマが存在する。また、大動物では細胞が人工物へ侵入する機能が齧歯類などの小動物とは明らかに異なっており、これが細胞の増殖性によるものか、細胞の移動性によるものか、あるいは人工物への反応における特殊な細胞内情報伝達が存在するのか未知の問題点が多く存在しており、小口径人工血管の開発・実用化においては、今後、そうした基礎的な問題の解明なしには解決できないものと考えられる。

また、吸収性の人工材料が近年注目されているが、動脈環境では、高圧で拍動流という状況から、瘤化の問題があり、これも実用化には至っていない。

このように、本研究ではハイブリッド人工血管開発に際して、大きな問題に直面し、開発には至らず、今後の人工材料に対するヒト細胞の反応性に関する基礎検討などの進展に期待するところとなった。

こうした人工材料の困難性を背景に、生体材料が再び注目を浴びており、我々と同時期に数カ所の研究室から、脱細胞化組織や臓器の各分野での応用が報告されるようになってきている。すなわち、生体材料の優れた骨格や細胞外マトリックスを応用して代用組織・代用臓器とするアプローチである。こうした組織骨格やマトリックスに細胞成分を付与したり、その細胞に遺伝子操作を行う

ことで、**tissue engineering** を駆使した新展開が期待される。

今後、小口径代用血管の開発に向けた研究を継続してゆく上で、本研究で得た多くの増殖因子や細胞外マトリックス使用のノウハウが役立ち、さらに本研究で取り組んだ血管壁への遺伝子導入法が役立つものと考えられる。

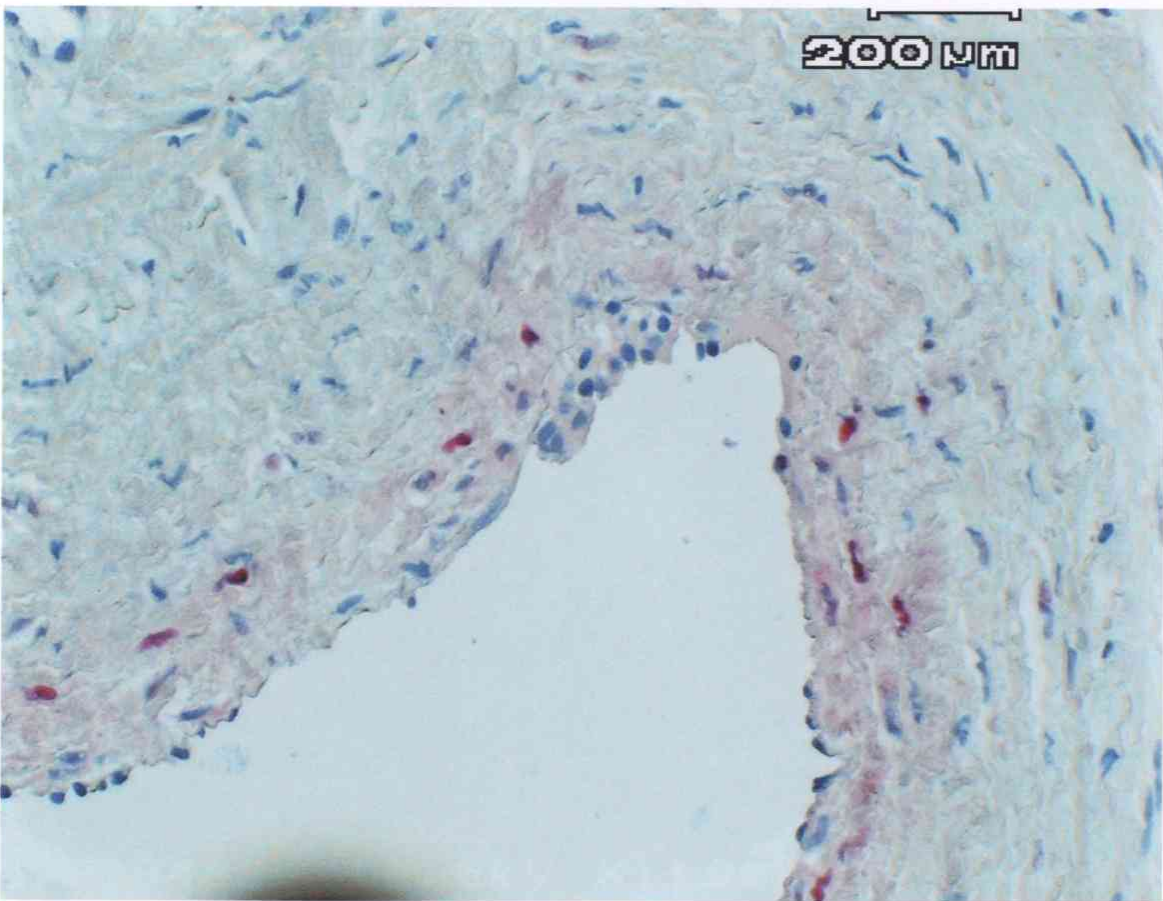


Fig. 1. Gene transfer to canine vein graft using HVJ-Envelope vector (Avidin-ALP stain with Hematoxyline counter stain)

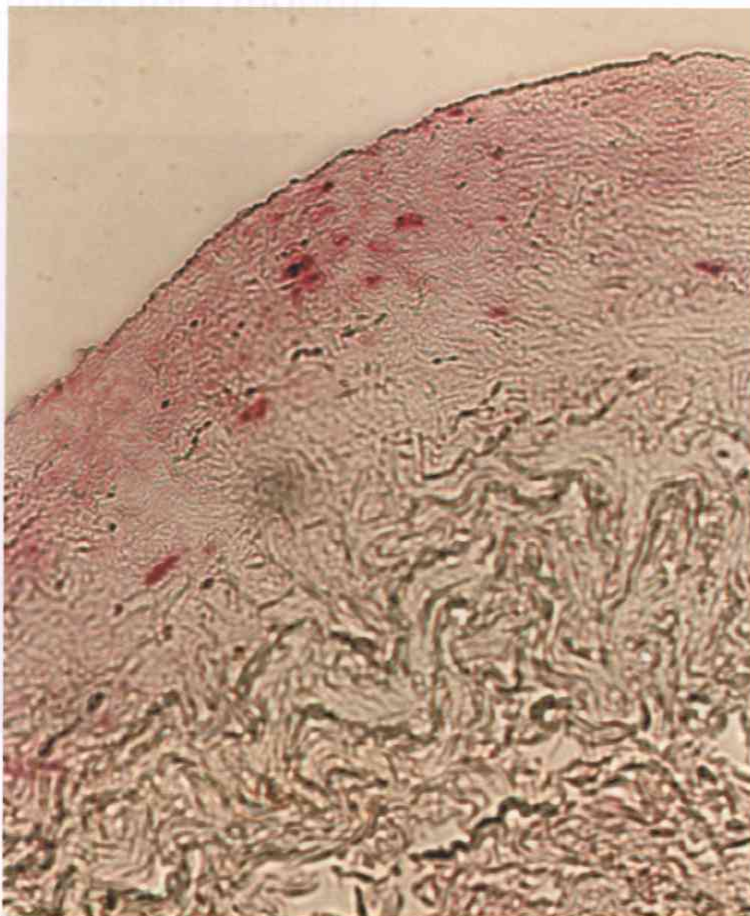


Fig. 2. Gene transfer to canine vein graft using Ultrasonic technique (Avidin-ALP stain)

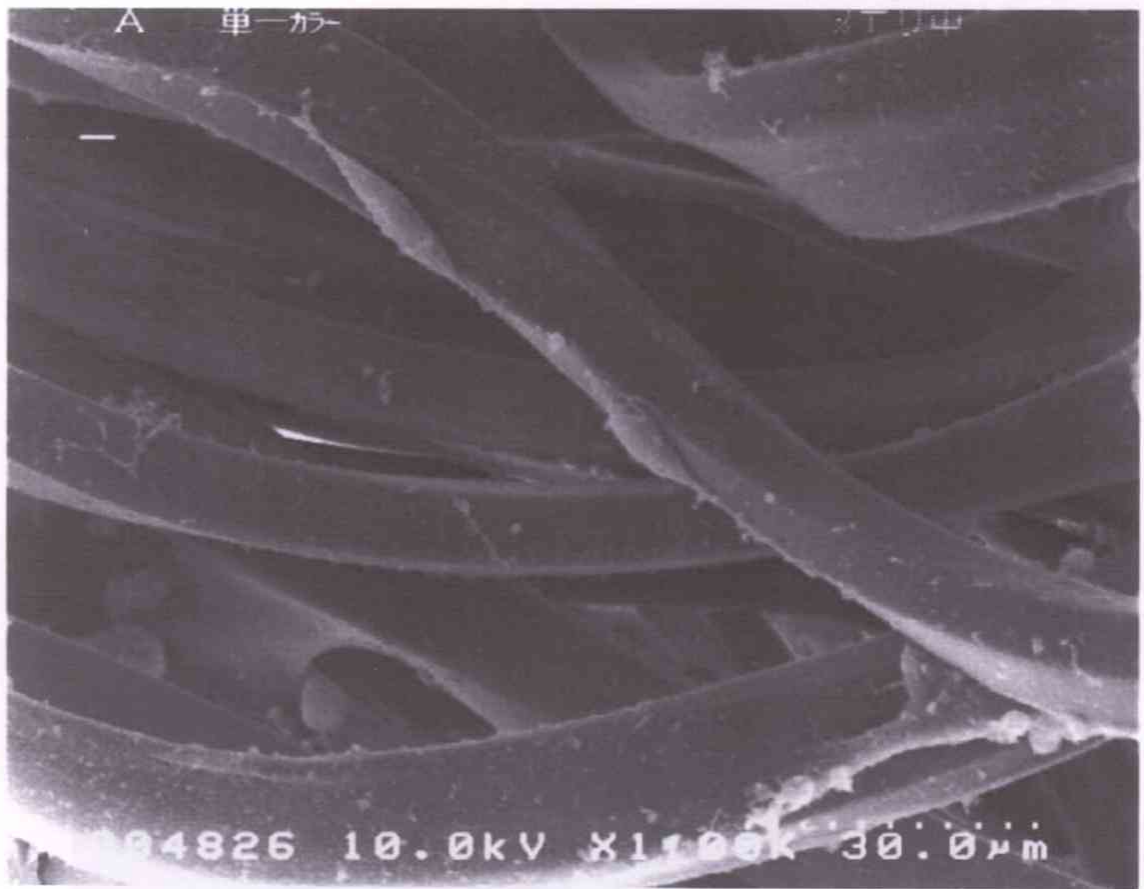


Fig. 3. Vascular smooth muscle cell seeded Dacron graft
(cultured for 1 month)

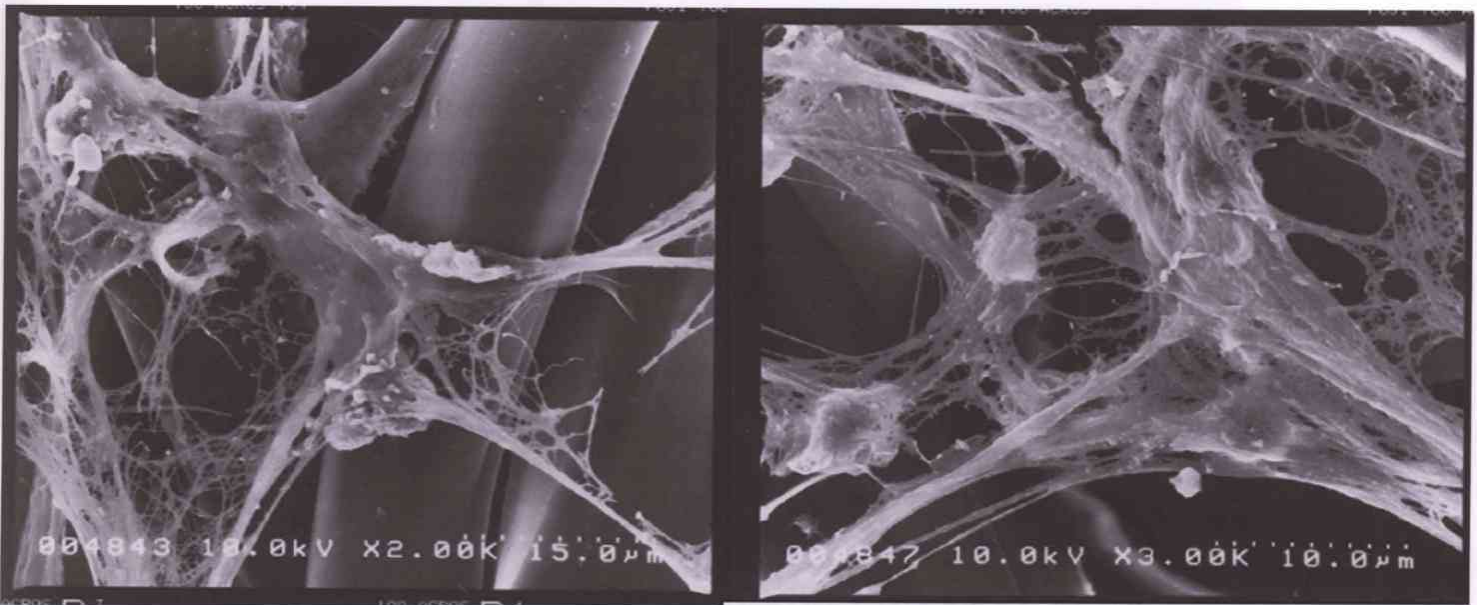
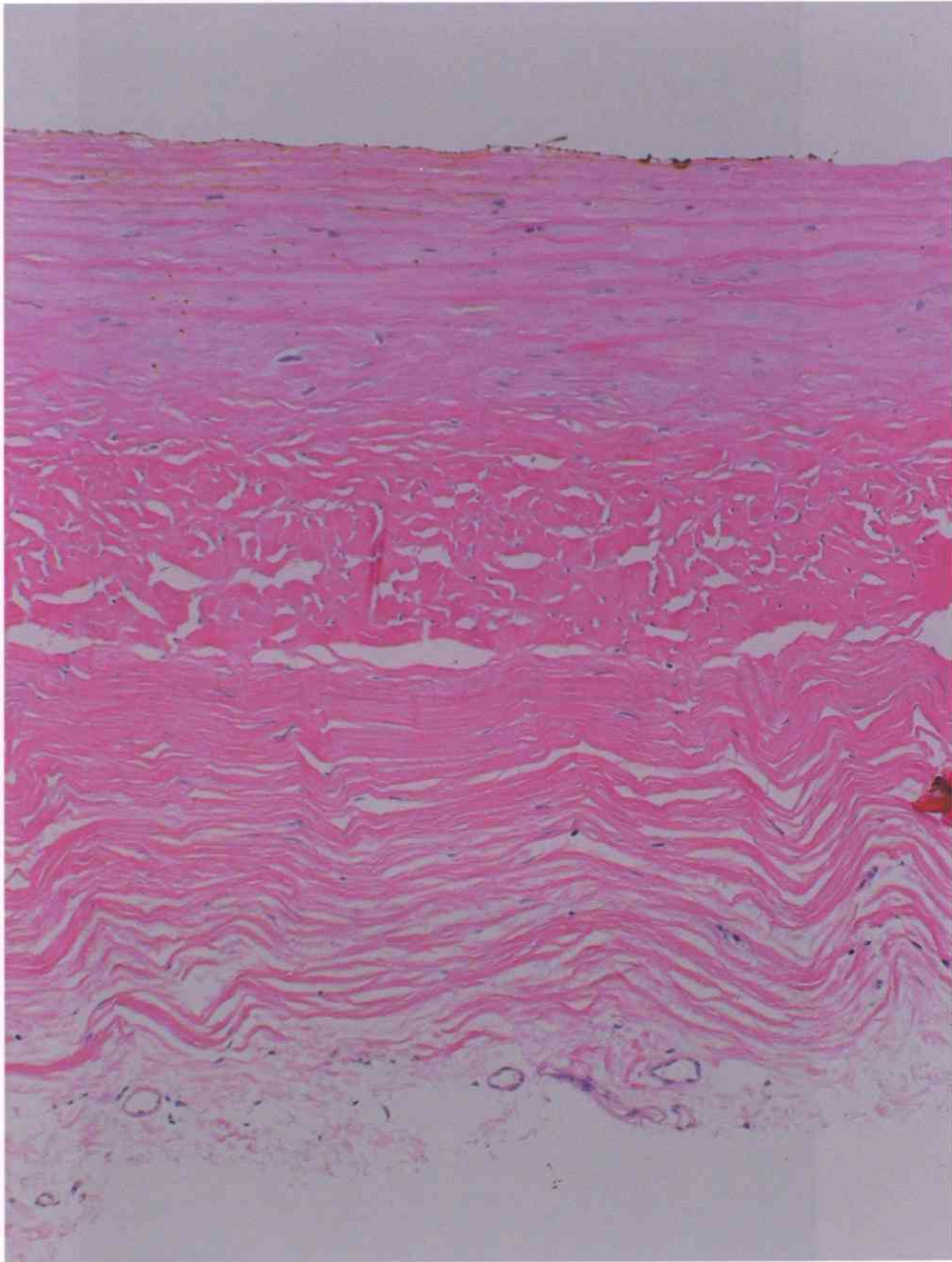


Fig. 4. Vascular smooth muscle cell seeded hybrid artificial graft
with polybutylene terephthalate and polyethylene terephthalate.
(cultured for 1 month)



**Fig. 5. Canine arterial allograft as small caliber prostheses.
(one year after transplantation, H-E stain)**

Fig. 7. Decellularised arterial allograft with acellular
cell matrix (H-E stain)

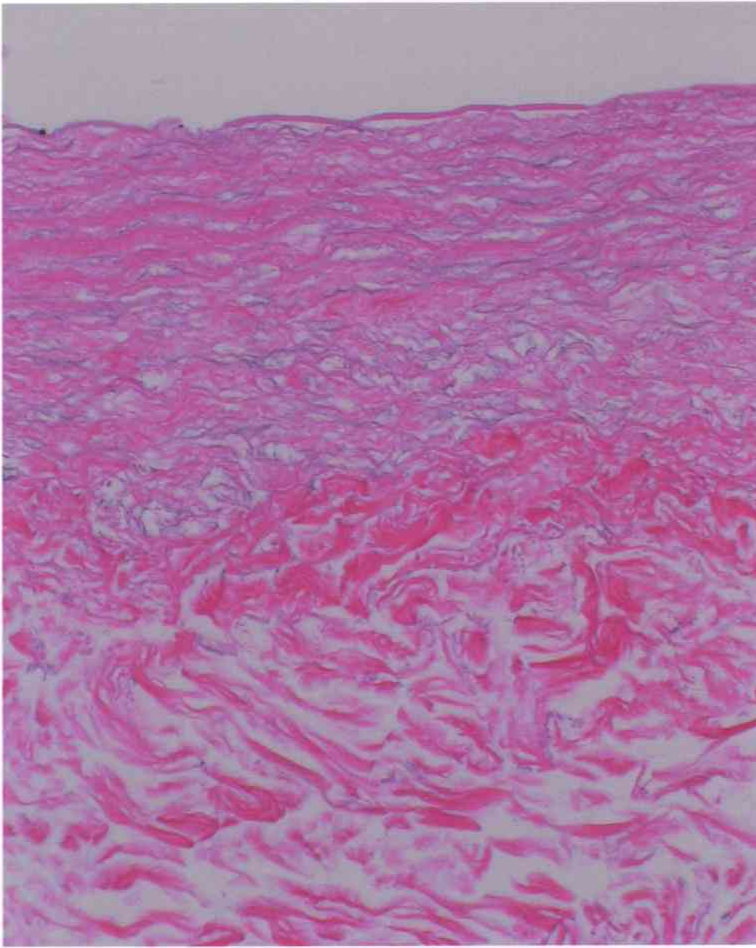


Fig. 6. Decellularized arterial allograft (H-E stain)



Fig. 7. Decellularized arterial allograft with endothelial cell seeding (H-E stain)