



Fibronectin–Hepatocyte Growth Factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve.

太田, 壮美

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3480

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003480>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 71 】

氏 名・(本 籍) 太田 壮美 (石川県)
博士の専攻分野の名称 博士(医学)
学 位 記 番 号 博い第1693号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成17年9月25日

【 学位論文題目 】

Fibronectin-Hepatocyte Growth Factor enhances
reendothelialization in tissue-engineered heart valve.
(フィブロネクチン-肝細胞増殖因子融合蛋白により
生体内での内皮化を促進させる脱細胞化異種生体弁
の検討)

審 査 委 員

主 査 教 授 横山 光宏
教 授 前田 盛
教 授 丹生 健一

【背景】

心臓弁膜症に対する治療手段として、人工弁置換術は重要な位置を占めている。しかし、従来の機械弁は感染、血栓塞栓症、抗凝固剤内服による出血などの問題を抱えている。また、生体弁は優れた血行動態を呈し、感染にも比較的強く、抗凝固剤を必要としない利点があるとされているが、その耐久性に問題が残っている。さらに、現存する人工弁全般における問題点として成長する能力を持たないことが課題となっている。これは生きて細胞が人工弁に存在しないことが原因の一つである。

これらの問題を解決するために、組織工学を応用した生体適合性の高い人工弁が開発されつつある。その一つに脱細胞化異種生体弁という概念がある。これは異種生体弁から抗原性のある細胞成分を除去し細胞外マトリックスのみを残して、免疫反応をなくし、かつ自己組織による再細胞化を図るというものである。

脱細胞化異種生体弁についてはいくつかの報告があるが、再細胞化を促進するために移植前に自己の細胞を播種し培養する必要があるとするものが多い。しかし、製作時間、コストの問題、播種する細胞の採取など臨床応用において様々な弊害がある。

今回我々は、細胞接着因子のフィブロネクチン(Fn)と血管内皮化を促進する肝細胞増殖因子(HGF)を融合した蛋白(Fn-HGF)を用いて、異種脱細胞化生体弁の生体内での再細胞化の促進につき検討した。

【方法】

ブタ大動脈基部を採取し detergent として Triton X-100、Sodium Lauryl Sulfate を使用して脱細胞化する。また、フィブロネクチンからコラーゲンやゼラチンをリガンドとする fibronectin collagen-binding domain のみを抽出し、これを baculovirus technique を用いて HGF と結合させ融合蛋白を作成した。作成した Fn-HGF に血清を加え heterodimer 化し、その溶液中に先のブタ脱細胞化生体弁を浸しコーティングした。対照として HGF のみをコーティングしたものを使用した。

作成した生体弁をビーグル犬(8~10kg)の肺動脈本幹に移植する。検体は作成した生体弁を mono-cusp パッチ (約 1.5×1.5cm) に形成し使用する。全身麻酔下に左開胸とし肺動脈を露出し、ヘパリン投与後、肺動脈を partial clamp にて遮断して先のパッチを連続縫合にて縫着した。

実験群は Fn-HGF をコーティングした異種脱細胞化弁を移植した F 群(n = 15)、HGF のみをコーティングした異種脱細胞化弁を移植した H 群(n = 12)、異種脱細胞化弁を移植した C 群(n = 12)に分けて検討した。

移植後、1 週間後と 1 ヶ月後に犠牲死し組織学的検討を行った。1 ヶ月後の弁尖の再細胞化の評価として顕微鏡下に 1mm²あたりの細胞数を比較した。また、組織中の HGF の濃度を測定し検討した。再細胞化の指標の一つとして Vimentin の組織中の量を RT-PCR 法にて測定した。

【結果】

動物の mortality

全 39 例中、5 例が死亡した (F 群:n = 1、C 群:n = 1、H 群:n = 3)。感染が 2 例、原因不明が 3 例であった。F 群は 7 例を 1 週間で、7 例を 1 ヶ月で犠牲死した。同様に C 群では 5 例を 1 週間、6 例を 1 ヶ月、H 群では 5 例を 1 週間、4 例を 1 ヶ月とした。

組織学的検索

1 週間後の検体では、C 群 H 群では再細胞化が認められないのに対し、F 群では部分的にグラフトの表面に 1 層からなる細胞を認め、同細胞は factor VIII 陽性細胞であった。1 ヶ月後の検体では、F 群においてグラフト表面すべてに均一な 1 層の factor VIII 陽性細胞を認めた。H 群でも同様の細胞を認めたが、一部分のみであった。C 群においても同様の細胞をわずかに認めるが H 群のそれに対し少なかった。弁尖に関しても、再細胞化は F 群において、C 群 H 群よりも多く認めた。また、1 ヶ月後の F 群の検体で、数層の細胞からなる部分を一部に認め、同部位では表層の 1 層が factor VIII 陽性細胞で、その下層にある細胞群は幼若な間葉系細胞で陽性となる Vimentin が陽性の細胞であった (図)。

HGF の免疫染色では、移植前の F 群の検体と H 群の検体ではどちらも陽性であったが、前者の方が染色される部分が厚い像が得られた。1 週間後の検体では F 群では部分的に陽性であったが、H 群では陰性であった。

弁尖の細胞数

1 ヶ月後の弁尖の細胞数は、F 群で $220.4 \pm 53.3 / \text{mm}^2$ であるのに対し、H 群で $75.2 \pm 19.2 / \text{mm}^2$ ($p < 0.001$)、C 群で $26.0 \pm 9.7 / \text{mm}^2$ ($p < 0.001$)であった。

HGF 定量

脱細胞処理前のブタの大動脈基部では HGF は検出されなかった。移植前の検体では F 群で $342.3 \pm 42.3 \text{ ng/g}$ であり H 群では $161.6 \pm 24.8 \text{ ng/g}$ ($p = 0.01$)であった。1 週間後の検体では、F 群で $12.9 \pm 1.6 \text{ ng/g}$ 、H 群で $2.1 \pm 0.7 \text{ ng/g}$ ($p < 0.001$)であった。1 ヶ月後の検体ではどちらの群も HGF は検出されなかった。

Vimentin RT-PCR

ビーグル犬の肺動脈組織中の Vimentin mRNA を 100%とすると、1 ヶ月の検体で、F 群では $71.0 \pm 15 \%$ 、H 群で $16.8 \pm 5.6 \%$ 、C 群で $2.8 \pm 0.2 \%$ であった。

【考察】

今回我々は、脱細胞化生体弁に HGF を導入することで早期の内皮の再細胞化が可能ではないかと仮説をたて検討した。さらに HGF の生理学的活性を最大限に生かすためフィブロネクチンを利用した。フィブロネクチンは様々な生体活性をもつが、そのうちコラーゲンやゼラチンに特異的に接着する domain を抽出し、これを HGF と融合することにより、Fn

のもつコラーゲン接着因子が、脱細胞化生体弁の細胞外マトリックスに接着し HGF をより長くグラフトに留まらせて、その生理活性が持続する効果を目的としている。本研究では、移植前および移植後 1 週間後で Fn-HGF コーティング検体の HGF 染色、定量が HGF コーティング検体のそれより有意に HGF 高値を示していることから、Fn の目的としている効果があると考えられた。また、Fn-HGF コーティング検体において 1 週間後、1 ヶ月後ともにコントロール群より有意に早期の内皮化を認めたことは、HGF がグラフト周囲に長く留まりその生理活性のひとつである内皮化の促進が起こったからであると思われる。

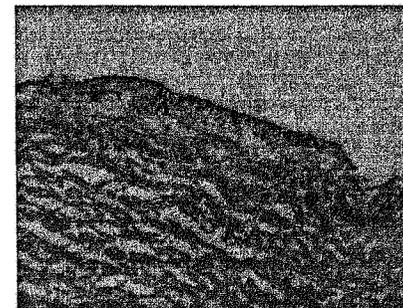
HGF は元々肝細胞の分裂を促進する因子として発見されたが、他にも多くの作用を有している。そのうち本研究において、重要な活性のひとつが、内皮細胞の誘導である。しかし、HGF は血管の再構築において重要な細胞である平滑筋細胞は誘導しないと考えられている。一般的に血管の正常な営みにおいて内皮細胞は、重要な位置を占めており、その欠損や損傷は血管の動脈硬化の悪化や血栓による閉塞などを招くとされている。ゆえに、体内に移植されるグラフトは早期に正常な内皮細胞が定着することが重要であると思われる。本研究では脱細胞化異種生体弁に Fn-HGF を導入することで早期の内皮細胞の定着が得られ、さらに移植後 1 ヶ月後の検体において Vimentin 陽性細胞が内皮細胞の下に認められたことはその内皮細胞の存在により間葉系の細胞が誘導された可能性があり、良好な再細胞化を示唆するものであった。

【結論】

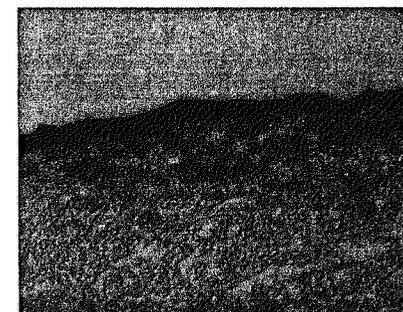
脱細胞化異種生体弁は、Fn-HGF の導入により生体内での早期の内皮化が可能であり、早期の再細胞化が可能な生体弁となる可能性が示唆された。

☒

H.E.



Factor VIII



Vimentin



論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1694号	氏 名	太田 壮美
論文題目 Title of Dissertation	Fibronectin-Hepatocyte Growth Factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve. フィブロネクチン-肝細胞増殖因子融合蛋白により生体内での内皮化を促進させる脱細胞化異種生体弁の検討		
審査委員 Examiner	主 査 柳山光彦 Chief Examiner 副 査 前田 盛 Vice-examiner 副 査 丹生 健一 Vice-examiner		
審査修了日	平成 17 年 8 月 17 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

心臓弁膜症に対する治療手段として、人工弁置換術は重要な位置を占めている。しかし、従来の機械弁は感染、血栓塞栓症、抗凝固剤内服による出血などの問題を抱えている。また、生体弁は優れた血行動態を呈し、感染にも比較的強く、抗凝固剤を必要としない利点があるとされているが、その耐久性に問題が残っている。さらに、いずれの人工弁も成長する能力を持たないことが課題となっている。

これらの問題を解決するために、組織工学を応用した生体適合性の高い人工弁が開発されつつある。その一つに脱細胞化異種生体弁という概念がある。これは異種生体弁から抗原性のある細胞成分を除去し細胞外マトリックスのみを残して、免疫反応をなくし、かつ自己組織による再細胞化を図るというものである。

脱細胞化異種生体弁についてはいくつかの報告があるが、再細胞化を促進するために移植前に自己の細胞を播種し培養する必要性があるとするものが多い。しかし、製作時間、コストの問題、播種する細胞の採取など臨床応用において様々な弊害がある。

今回我々は、細胞接着因子のフィブロネクチン(Fn)と血管内皮化を促進する肝細胞増殖因子(HGF)を融合した蛋白(Fn-HGF)を用いて、異種脱細胞化生体弁の生体内での再細胞化の促進の可能性につき検討した。

ブタ大動脈基部を採取し detergent として Triton X-100、Sodium Lauryl Sulfate を使用して脱細胞化する。また、フィブロネクチンから fibronectin collagen-binding domain のみを抽出し、これを baculovirus technique を用いて HGF と結合させ融合蛋白を作成した。作成した Fn-HGF に血清を加え heterodimer 化し、その溶液中に先のブタ脱細胞化生体弁を浸しコーティングした。対照として HGF のみをコーティングしたものを使用した。

作成した生体弁をビーグル犬の肺動脈本幹に移植する。検体は作成した生体弁を mono-cusp パッチに形成し使用する。全身麻酔下に肺動脈を露出し、ヘパリン投与後、肺動脈を partial clamp にて遮断して先のパッチを連続縫合にて縫着した。

実験群は Fn-HGF をコーティングした異種脱細胞化弁を移植した F 群、HGF のみをコーティングした異種脱細胞化弁を移植した H 群、異種脱細胞化弁を移植した C 群に分けて検討した。移植後、1 週間後と 1 ヶ月後に犠牲死し以下の検討を行った。

1. 全 39 例中、5 例が死亡した。感染が 2 例、原因不明が 3 例であった。
2. 組織学的検索によって 1 週間後の検体では、C 群と H 群ではグラフトの再細胞化が認められないのに対し、F 群では部分的にグラフトの表面に 1 層からなる細胞を認め、同細胞は factor VIII 陽性であった。1 ヶ月後の検体では、F 群においてグラフト表面すべてに均一な 1 層の factor VIII 陽性細胞を認めた。H 群でも同様の細胞を認めたが、一部分のみであった。C 群においても同様の細胞をわずかに認めるが H 群のそれに対し少なかった。弁尖に関しても、

再細胞化は F 群において、C 群と H 群よりも多く認められた。また、1 ヶ月後の F 群の検体で、数層の細胞からなる部分を一部に認め、同部位では表層の 1 層が factor VIII 陽性細胞で、その下層にある細胞群は幼若な間葉系細胞で陽性となる Vimentin 陽性細胞であった。

HGF の免疫染色では、移植前の F 群の検体と H 群の検体ではどちらも陽性であったが、前者の方が染色される部分が厚い像が得られた。1 週間後の検体では F 群では部分的に陽性であったが、H 群では陰性であった

3. 1 ヶ月後の弁尖の細胞数は、F 群で $220.4 \pm 53.3 /\text{mm}^2$ であるのに対し、H 群で $75.2 \pm 19.2 /\text{mm}^2$ ($p < 0.001$)、C 群で $26.0 \pm 9.7 /\text{mm}^2$ ($p < 0.001$)であった。
4. 脱細胞処理前のブタの大動脈基部では HGF は検出されなかった。移植前の検体では F 群で $342.3 \pm 42.3 \text{ ng/g}$ であり H 群では $161.6 \pm 24.8 \text{ ng/g}$ ($p = 0.01$)であった。1 週間後の検体では、F 群で $12.9 \pm 1.6 \text{ ng/g}$ 、H 群で $2.1 \pm 0.7 \text{ ng/g}$ ($p < 0.001$)であった。1 ヶ月後の検体ではどちらの群も HGF は検出されなかった。
5. ビーグル犬の肺動脈組織中の Vimentin mRNA を 100% とすると、1 ヶ月の検体で、F 群では $71.0 \pm 15 \%$ 、H 群で $16.8 \pm 5.6 \%$ 、C 群で $2.8 \pm 0.2 \%$ であった。

今回我々は、脱細胞化生体弁に HGF を導入することで早期の内皮の再細胞化が可能ではないかと仮説をたて検討した。さらに HGF の生理学的活性を最大限に生かすためフィブロネクチンを利用し、コラーゲンやゼラチンに特異的に接着する domain を抽出し、これを HGF と融合することにより、Fn のもつコラーゲン接着因子が、脱細胞化生体弁の細胞外マトリックスに接着し HGF をより長くグラフトに留まらせて、その生理活性が持続することを目的とする。血管の正常な営みにおいて内皮細胞は重要な位置を占めており、その欠損や損傷は血管の動脈硬化の悪化や血栓による閉塞などを招く。ゆえに、体内に移植されるグラフトは早期に正常な内皮細胞が定着することが重要であると思われる。本研究では脱細胞化異種生体弁に Fn-HGF を導入することで早期の内皮細胞の定着が得られ、さらに移植後 1 ヶ月後の検体において Vimentin 陽性細胞が内皮細胞の下に認められたことはその内皮細胞の存在により間葉系の細胞が誘導された可能性があり、良好な再細胞化を示唆するものであった。

本研究は脱細胞化ブタ大動脈弁をフィブロネクチンと肝細胞増殖因子を融合した蛋白でコーティングしたものをを用いて、犬肺動脈基部に移植し in vivo で再細胞化を調べたものであるが、従来ほとんど行われなかったグラフトへの早期の再内皮化が誘導されるという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。