

## 人工タンパク質「シルクエラスチン®」の細胞応答性解析 および生体吸収性動脈グラフトへの応用

(農工大院・工<sup>1</sup>、三洋化成<sup>2</sup>、農工大院・農<sup>3</sup>、日本医大・医<sup>4</sup>)

○足代萌恵<sup>1</sup>、亀井陽平<sup>1</sup>、川端慎吾<sup>2</sup>、杣本聡<sup>2</sup>、  
島田香寿美<sup>3</sup>、太良修平<sup>4</sup>、秋岡翔太<sup>1</sup>、中澤靖元<sup>1</sup>

### 【緒言】

既存の小口径人工血管(内径 6 mm 未満)は内膜肥厚等による開存率の低下が課題であり、自己組織置換により長期開存が見込まれる生体吸収性動脈グラフトの開発が求められている。人工血管を埋植した際の材料表面における組織再生は、一般的に血管内腔側から進行する。そこで本研究では、血管組織再生が先行して生じる血管内腔側から優先的に分解する吸収性動脈グラフトの開発を指向し、内腔側にはシルクフィブロイン(silk fibroin, SF)とエラスチン(elastin, EL)の主要な反復配列から構成される人工タンパク質 (シルクエラスチン®(silk-elastin like protein, SELP))、外腔側には SELP と比較して吸収性の低い SF を多く配置した「傾斜シート」を作製した。本研究では、傾斜シートの血管リモデリングを評価するため動物埋植試験を、SELP 存在下における血管を構成する細胞の増殖性を解析するため溶液を用いた細胞増殖試験を実施し、生体吸収性動脈グラフトへの応用について検証した。

### 【方法】

傾斜シートは、SELP と SF を質量比 90:10 で 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解させた 5.0 (w/v)% 溶液の吐出量を 0  $\mu\text{L}/\text{min}$  から 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  に、SF を HFIP に 5.0 (w/v)% に溶解させた溶液を 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  から 16  $\mu\text{L}/\text{min}$  に、1  $\mu\text{L}/\text{min}$  ずつ段階的に変化させて電界紡糸を行うことで作製した。比較対象として、SF 溶液のみを用いた SF シートを作製した。各シートをラット腹部大動脈に 4 週間埋植後、自家血管ごと摘出し、 $\alpha$ -Smooth muscle actin(SMA)染色をはじめとした各種染色により組織解析を実施した。また *in vitro* による細胞増殖試験では、4.0 (w/v)% の SELP 水溶液と SF 水溶液、1.0 (w/v)% の EL 水溶液を、2 倍濃度のリン酸緩衝液(PBS)にそれぞれ当量ずつ混合し、更に増殖培地と当量ずつ混合させることで、各種試験用培地を調製した。EL 水溶液は 4.0 (w/v)% において試験中にゲル化したため、希薄溶液を用いた。各培地はそれぞれ SF4.00、SELP4.00、EL1.00 と表記し、比較対象として PBS と増殖培地を当量ずつ混合させたものを用いた。各培地を用いてヒト臍帯動脈平滑筋細胞(Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells, HUASMC)を培養し、MTS 発色試薬添加後に吸光度測定を実施した。

### 【結果・考察】

Fig.1 には、SF および傾斜シートの SMA 染色結果を示す。傾斜シートでは SF シートと比較して、平滑筋細胞などが構成する層の厚みが薄くなっており、埋植 1 ヶ月時点で内膜肥厚を抑えていると言える。また Fig.2 に示す HUASMC の増殖試験結果より、SF4.00 と EL1.00 は PBS と同程度の増殖を示し、SELP4.00 において 3 日目以降最も増殖が促進された。溶液を用いた場合は立体構造の違いよりも配列の影響が最も大きく表れると考えられる。そのため SELP の一次配列が細胞増殖の促進に寄与したと推察される。以上より本研究では、SELP が血管リモデリングの早期において細胞を増殖させ、その後は増殖を制御することで細胞の過増殖による内膜肥厚を抑制し、開存率を維持できる可能性を示した。発表では、各培地によるヒト臍帯静脈内皮細胞における増殖試験の結果についても報告する。

【謝辞】 本研究では一部、科学研究費補助金(海外連携研究)(23KK0202)により実施した。

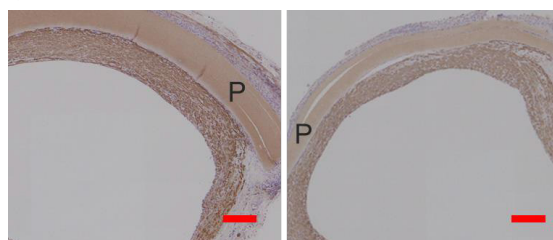


Fig.1 SF(左)及び傾斜シート(右)の SMA 染色像  
P: 不織布シート, scale bar: 200  $\mu\text{m}$

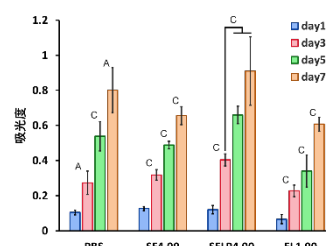


Fig.2 MTS 試験の吸光度  
A:  $p < 0.05$ , C:  $p < 0.005$

Cellular Responsiveness of Silk-Elastin-Like-Protein “Silk Elastin®” for Bioabsorbable Arterial Grafts, Moe AJIRO<sup>1</sup>, Youhei KAMEI<sup>1</sup>, Shingo KAWABATA<sup>2</sup>, Satoshi SOMAMOTO<sup>2</sup>, Kasumi SHIMADA<sup>3</sup>, Shuhei TARA<sup>4</sup>, Shota AKIOKA<sup>1</sup> and Yasumoto NAKAZAWA<sup>1</sup>: <sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan, <sup>2</sup>Sanyo Chemical Industries, LTD., 11-1 Ichinohashinomoto-cho, Higashiyama-ku, Kyoto, Kyoto 605-0995, Japan, <sup>3</sup>Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-8-1 Harumi-cho, Fuchu, Tokyo 183-8538, Japan, <sup>4</sup>Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan, <sup>1</sup>Tel: 042-388-7612, <sup>1</sup>E-mail: y-nakazawa@go.tuat.ac.jp