

氏名 (本 (国) 籍)	島 田 香寿美 (神奈川県)		
主指導教員氏名	東京農工大学 教授	田 中	綾
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第562号		
学位授与年月日	令和2年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	東京農工大学		
学位論文題目	心筋虚血からの組織修復を目指したシルクフィブロイン足場材料の基礎的研究		
審査委員	主査	東京農工大学 教授	打出 毅
	副査	帯広畜産大学 准教授	松本 高太郎
	副査	岩手大学 准教授	星野 有希
	副査	東京農工大学 教授	田中 綾
	副査	岐阜大学 准教授	神志那 弘明

#### 学位論文の内容の要旨

心筋梗塞は、冠動脈の塞栓や狭窄によりその支配領域が虚血を起こし、心筋が壊死する疾患である。心筋梗塞の治療には、この虚血領域への血流を回復させる目的で、血栓溶解剤による内科的治療、カテーテルもしくはステントによる冠血管拡張術、自己血管を用いた冠血管バイパス術などが実施される。しかしながら、これらの治療法によっても一度壊死した心筋領域を完全に再生させることは困難である。近年、再生医療技術を用いた心筋修復デバイスの開発が進められているが、その多くは取り扱いが煩雑な培養心筋細胞や生体因子を含むことから、大量生産による産業化が難しく、経済性・汎用性の観点からの課題が指摘されている。そこで本研究では、作製過程が簡素で経済性・汎用性に優れている人工材料からなる心筋修復デバイスによる課題解決を目指し、組織工学的観点からの基礎的研究を行った。

組織工学において重要となる要素のひとつが足場材料である。本研究では、1) デバイスの生体内での自己組織化、組織修復能を決定する細胞反応性・分解性、2) デバイスに特定の機能分子を付与する際に重要となる化学修飾性、3) デバイスデザインの多様性に重要となる加工性の3点に着目し、これらの性質に優れたシルクフィブロイン(SF)を足場材料に使用した。第1章では、エレクトロスピンング法を用いてSF血管移植用シートを作製し、ラット腹部大動脈へのパッチグラフト術を実施し、生体内での細胞反応性および分解性について評価した。SF単体によるシートは硬く脆いシートとなったため、柔軟性を付与するために医療用ポリウレタン(PU)をSF水溶液に混合し、SF/PUシートを作製した。対照群として既存の非生体吸収性シート(ePTFEシート)を用いた。組織学的検査の結果より、SF/PUシートは損傷した自己血管に対し修復反応を誘導し、シートを足場として血管構造を形成した。また、ePTFEシートでは石灰化を生じたが、SF/PUシートではシート内部への細胞浸潤が認められ、SFによる細胞反応性・分解性が示唆された。しかしながら、SF/PU

シートの細胞反応性や生体内分解性は臨床応用水準にないと判断された。

第2章では、第1章で作製したSF/PUシートの細胞反応性および生体内分解性の向上を図るために、組織工学技術により足場材料に生体反応を誘導する生理活性物質を付与したシートを作製し、その有用性について検討した。生理活性物質として、血管内皮細胞の接着性、遊走性、管腔形成を促進する血管新生ペプチド(SVVYGLR:SV)に着目し、本ペプチドを付与したSF/PU/SVシートを作製した。組織学的検査の結果から、SVの付与によって、マクロファージがシートへ集簇し、細胞反応性の増強が観察された。また、SF/PU/SVシートではSVの効果の一つである管腔形成が認められ、酸素および栄養供給のための微小血管が修復組織内に形成されていると考えられた。SF/PUシートに対し血管新生ペプチドを付与することは、組織修復デバイスとしての有用性を高めるものと考えられた。しかしながら、SF、PU、SVの水溶液を混合することで作製された本シートでは、SVの足場材料への固定化が行われておらず、作製段階でSVの漏出・遊離が起こり、SVの効果限定化されている可能性が考えられた。また、心筋修復デバイスとして本シートの臨床応用性を考慮した場合、本シート形態ではその厚みによる心筋運動への影響が大きく、デバイスデザインの再検討が必要と判断された。

そこで、第3章では血管新生ペプチドを固定化するとともに、デバイスをフィルム状の形態に加工し、その有用性について評価した。SFにポリエチレングリコール(PEG)を架橋させ、得られたSF-PEGフィルムに、SVおよびKGHKの2種の血管新生ペプチドを固定化した。*in vitro*試験において、SF-PEG-SVフィルムは、高い細胞接着性および管腔形成能を示した。さらに、SF-PEG-SVフィルムを薄膜化し、心筋梗塞ラットモデルへ応用した。心臓超音波検査において、デバイス移植による心機能への悪影響は認められなかった。薄膜フィルムはハンドリングが良好であり、心臓表面に吸着し、心臓に対するデバイスとして適した形態であると考えられた。

以上のことから、SFを足場材料とし血管新生ペプチドを付与した組織修復デバイスは、優れた組織修復能力を持ち、さらに修復した組織中に酸素や栄養を供給する微小血管を誘導することが期待された。また薄膜形態に加工されたデバイスにおいては、心筋梗塞ラットモデルにおいてその適応性が確認された。これらの結果は、組織工学を基にした新規心筋梗塞治療デバイス開発の一助となるものと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

医学領域では再生医療技術を用いた心筋梗塞治療デバイスの研究・開発が進められているが、その多くは取り扱いが煩雑な培養心筋細胞や生体内生理活性物質を含むことから、大量生産による産業化が難しく、経済性・汎用性の観点から課題が指摘されている。本研究では、この課題を解決するため経済性・汎用性に優れている人工材料を基盤とした心筋修復デバイスの検討を組織工学技術に着目し行っている。

組織工学では、デバイスの基盤となる材質(足場材料)の選択とデバイス形態(デバイスデザイン)が重要とされているため、本研究の第1章では足場材料としてシルクフィブロイン(SF)が選択され、このSFをエレクトロスピンニング法にて板状に展開しデザインされたSFシートについて、その細胞反応性および生体内分解性がラット腹部大動脈移植モデルにて検討された。組織学的に解析が行われた結果、既存製品である非生体性・吸収性シートにおいて問題点とされた修復部位における石灰化はSFシートにおいて認められなかったものの、SFシートの細胞反応性、生体内分解性は臨床応用水準にないと判断された。

第2章では、シートの細胞反応性および生体内分解性の向上を図るために、足場材料に生体反応を誘導する血管新生ペプチド(SVVYGLR:SV)を付与したシートが作製され、その有

用性について検討された。その結果，SVの付与によって細胞反応性の増強が観察され，SV付与は組織修復デバイスとしての有用性を高めると判断された。しかしながら，SVの足場材料への固定化が行われていない本シートでは，作製段階でSVの漏出・遊離が起り，SVの効果限定化されている可能性が指摘された。また，心筋修復デバイスとしての臨床応用性を考慮した場合，本シートデザインが移植後に心筋運動へ与える影響が危惧され，デバイスの厚みに関し再検討が必要と判断された。

第3章では，SVが化学架橋反応にて固定された足場材料をフィルム状に加工したデバイスが作製され，その有用性について検討された。培養細胞を用いた *in vitro* における検討において，フィルムデバイスの高い細胞接着性および管腔形成能が明らかにされた。また，心筋梗塞ラットモデルを用いた *in vivo* での検討において，超音波検査による機能解析上，デバイス移植後の心機能低下は認められず，薄層化フィルムデバイスの心筋運動への高い追随性が明らかにされた。

これらの結果は，人工材料を用いた心筋修復デバイスの開発に明確な方向性を示すものであり，極めて臨床的意義の大きいものと判断され，また今後の研究の発展性も高く評価された。

以上について，審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値を有するものであると判断した。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : The effect of a silk Fibroin/Polyurethane blend patch on rat Vessels  
著 者 名 : Shimada, K., Higuchi, A., Kubo, R., Murakami, T., Nakazawa, Y. and Tanaka, R.  
学術雑誌名 : Organogenesis  
巻・号・頁・発行年 : 13 (4) : 115-124, 2017

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Silk fibroin-Pellethane® cardiovascular patches: Effect of silk fibroin concentration on vascular remodeling in rat model  
著 者 名 : Chantawong, P., Tanaka, T., Uemura, A., Shimada, K., Higuchi, A., Tajiri, H., Sakura, K., Murakami, T., Nakazawa, Y. and Tanaka R.  
学術雑誌名 : Journal of Materials Science Materials in Medicine  
巻・号・頁・発行年 : 28 (12) : 191, 2017
- 2) 題 目 : Evaluation of symptomatic improvements observed by switching to alacepril from other ACE-Inhibitors in dogs with mitral valve regurgitation  
著 者 名 : Uemura, A., Hamabe, L., Shimada, K., Shimizu, M. and Tanaka, R.  
学術雑誌名 : The Thai Journal of Veterinary Medicine  
巻・号・頁・発行年 : 48 (1) : 29-36, 2018
- 3) 題 目 : Effects of high-dose alacepril on left atrial pressure and central aortic pressure in awake dogs with mitral valve regurgitation

著者名：Goya, S., Wada, T., Shimada, K., Hirao, D. and Tanaka R.

学術雑誌名：The Veterinary Journal

巻・号・頁・発行年：245：7-11, 2019

4) 題 目：自然発生糖尿病ハムスターに対して酪酸菌培養液が奏功した1例

著者名：島田香寿美, 松浦功泰, 滝澤 穰, 田中 綾

学術雑誌名：動物臨床医学

巻・号・頁・発行年：28 (2)：58-62, 2019