

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5973121号
(P5973121)

(45) 発行日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01)
 A 6 1 L 27/00 Q
 A 6 1 L 27/00 S

請求項の数 30 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2009-548408 (P2009-548408)	(73) 特許権者	501102988
(86) (22) 出願日	平成20年1月30日 (2008. 1. 30)		ユニバーシティ オブ ピッツバーグ オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケーション
(65) 公表番号	特表2010-516437 (P2010-516437A)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア 15260, ピッツバーグ, サッカレイ アンド オハラ ストリーツ, ガードナー スティール カンファレンス センター 200
(43) 公表日	平成22年5月20日 (2010. 5. 20)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/052408		
(87) 国際公開番号	W02008/094971	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成20年8月7日 (2008. 8. 7)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成23年1月31日 (2011. 1. 31)	(74) 代理人	100075270
審査番号	不服2014-13007 (P2014-13007/J1)		弁理士 小林 泰
審査請求日	平成26年7月4日 (2014. 7. 4)	(74) 代理人	100101373
(31) 優先権主張番号	60/898, 356		弁理士 竹内 茂雄
(32) 優先日	平成19年1月30日 (2007. 1. 30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体内分解性ラッピングおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生静脈管状組織構造物、および

生静脈管状組織構造物の外側表面の天然の形状の上に沈着され、前記形状に沿って形成され、及び、前記形状に従う1以上の生体内分解性ポリマー繊維でできた、生静脈管状組織構造物の外側表面と接触している生体内分解性ポリマー沈着コーティングの繊維マトリクス、を含む、静脈管状組織移植片デバイス。

【請求項 2】

生静脈管状組織構造物の外側表面の天然の形状の上に、1以上の生体内分解性ポリマー繊維をエレクトロスピニングによって沈着させて、天然の形状に沿って形成され、及び、前記形状に従う1以上の生体内分解性ポリマーの沈着コーティングを形成することを含む、請求項1記載の静脈管状組織移植片デバイスの製造方法。

【請求項 3】

繊維マトリクスがエステル結合およびウレタン結合を含むポリマーを含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 4】

エステル結合およびウレタン結合を含むポリマーが、ポリ(エステルウレタン)尿素を含む、請求項3に記載のデバイス。

【請求項 5】

繊維マトリクスが、以下のもの：

-ヒドロキシ酸、ポリラクチド、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリグリコール酸、ポリ（dl-ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（l-ラクチド-co-dl-ラクチド）、ラクトンモノマーを含むポリマー、ポリカプロラクトン、カーボネート結合を含むポリマー、ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート）、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート-co-ジオキサノン）、ウレタン結合を含むポリマー、ポリウレタン、ポリ（エステルウレタン）尿素、ポリ（エステルウレタン）尿素エラストマー、エステル結合を含むポリマー、ポリアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、ポリガラクチン、天然ポリマー、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ヒアルロン酸、ゼラチン、またはそれらの全ての組合せから選択されるポリマーを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のデバイス。

10

【請求項6】

繊維マトリクスと結合する1以上の細胞、活性薬剤、またはその組合せをさらに含む、請求項1, 3, 4, 5のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項7】

生静脈管状組織が伏在静脈から得られる、請求項1, 3, 4, 5, 6のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項8】

繊維マトリクスが、-ヒドロキシ酸由来の1以上のポリマーを含む、請求項1, 3, 4, 5, 6, 7のいずれか1項に記載のデバイス。

20

【請求項9】

-ヒドロキシ酸由来の1以上のポリマーが、ポリラクチド、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリグリコール酸、ポリ（dl-ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（l-ラクチド-co-dl-ラクチド）、またはそれらの全ての組合せを含む、請求項8に記載のデバイス。

【請求項10】

繊維マトリクスがラクトンモノマーを含む1以上のポリマーを含む、請求項1, 3, 4, 5, 6, 7のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項11】

ラクトンモノマーを含む1以上のポリマーがポリカプロラクトンを含む、請求項10に記載のデバイス。

30

【請求項12】

繊維マトリクスが、カーボネート結合を含む1以上のポリマーを含む、請求項1, 3, 4, 5, 6, 7のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項13】

カーボネート結合を含む1以上のポリマーが、ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート）、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート-co-ジオキサノン）、またはそれらの全ての組合せを含む、請求項12のいずれか1項に記載のデバイス。

40

【請求項14】

繊維マトリクスが、ウレタン結合を含む1以上のポリマーを含む、請求項1, 3, 4, 5, 6, 7のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項15】

ウレタン結合を含む1以上のポリマーが、ポリウレタン、（エステルウレタン）尿素エラストマー、またはその組合せを含む、請求項14に記載のデバイス。

【請求項16】

ウレタン結合を含む1以上のポリマーが、ポリ（エステルウレタン）尿素エラストマーを含む、請求項15に記載のデバイス。

【請求項17】

50

繊維マトリクスがコラーゲンをさらに含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項 1 8】

繊維マトリクスがエラスチンをさらに含む、請求項 1 7 に記載のデバイス。

【請求項 1 9】

繊維マトリクスが、コラーゲンとエラスチンとの混合物25%wt. ~ 75%wt. を含む、請求項 1 8 に記載のデバイス。

【請求項 2 0】

繊維マトリクスがエステル結合を含む、請求項 1 , 3 , 4 , 5 のいずれか1項に記載のデバイス。

10

【請求項 2 1】

エステル結合を含む線維マトリクスが、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、またはそれらの全ての組合せを含むポリアルカノエートである、請求項 2 0 に記載のデバイス。

【請求項 2 2】

エステル結合を含む線維マトリクスがポリガラクトンを含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 3】

繊維マトリクスが、1またはそれ以上の天然ポリマーを含む、請求項 1 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 のいずれか1項に記載のデバイス。

20

【請求項 2 4】

繊維マトリクスがコラーゲンを含む、請求項 1 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項 2 5】

繊維マトリクスがエラスチンをさらに含む、請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 6】

幹細胞、前駆細胞（前駆体）細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髄由来間葉細胞および遺伝子修飾された細胞である1またはそれ以上の細胞が、繊維マトリクス、またはそれらの全ての組合せと結合されている、請求項 6 ~ 2 5 のいずれか1項に記載のデバイス。

30

【請求項 2 7】

成長因子を含む 1 またはそれ以上の活性薬剤を含み、成長因子が塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、形質転換成長因子- 、プレイオトロフィンタンパク質、ミドカイン（midkine）タンパク質、IGF-1、またはそれらの全ての組合せを含む、請求項 6 ~ 2 5 のいずれか1項に記載のデバイス。

【請求項 2 8】

薬物を含む 1 またはそれ以上の活性薬剤を含み、薬物が、非ステロイド性抗炎症性薬、抗生物質、抗凝固因子、免疫抑制剤、グルココルチコイド、イムノフィリンに対して作用する薬物、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、スタチン、一酸化窒素ドナー、またはそれらの全ての組合せを含む、請求項 6 ~ 2 5 のいずれか1項に記載のデバイス。

40

【請求項 2 9】

薬物を含む 1 またはそれ以上の活性薬剤を含み、薬物が、NSAID、サリチル酸、インドメタシン、インドメタシンナトリウム三水和物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリンダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、抗炎症性タンパク質、ステロイド性抗炎症剤、ヘパリン、Pebac、エノキサパリン（enoxaprin）、アスピリン、ヒルジン、プラビックス、ピバリルジン、プラスグレル、イドラパリナックス、ワーファリン、クーマディン、クロピドグレル、PPACK、GGACK、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナ

50

ーゼ、ストレプトキナーゼ、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン (betamethisone)、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロンアセトニド、血管新生阻害剤、フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキシソルピシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトボシド、ペガブタニブ、ルーセンテイス、トリプトファン-tRNA合成酵素、リタアン (retaane)、CA4P、AdPEDF、VEGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスタチン、JSM6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベバシズマブ (becacizumab)、ネオバスタット、抗増殖剤、シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシル基転移酵素阻害薬、FPTIII、L744、抗増殖性因子、Van 10/4、ドキシソルピシン、5-FU、ダウノマイシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作動性腸管ポリペプチド、抗体、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムス、シロリムス、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、スタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン-酸化窒素ドナーまたは前駆体、Angeli塩、L-アルギニン、ジエチルアミンNONOate、ジエチルアミンNONOate/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、(±)-S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、ニトロプルシド・ナトリウム、スベルミンNONOate、ストレプトゾトシン、抗生物質、アシクロビル、オフロキサシン (ofloxacin)、アンピシリン、アンフォテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラズリル (diclazaril)、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタンブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イトラコナゾール (iatroconazole)、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジンアミド、ピリメタミン、リファブチン、リファンピン、スパルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン、トリフルオロウリジン、硫酸トリメトプリム、Zn-ピリチオン、および塩化銀、臭化銀、ヨウ化銀、過ヨード酸塩を含む銀の塩、またはそれらの全ての組合せを含む、請求項 28 に記載のデバイス。

【請求項 30】

1またはそれ以上の天然ポリマーが、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ポリアルカノエート、ヒアルロン酸、ゼラチン、またはそれらの全ての組合せを含む、請求項 23 に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

心筋梗塞および虚血を引き起こす冠状動脈疾患は、現在は、世界中の疾病率および死亡率の原因の最上位である。現在の治療選択肢は、経皮経管的血管形成、ステント・グラフト留置術、および冠状動脈バイパス移植術 (CABG) から構成される。CABGは、動脈性導管または静脈性導管のいずれかを使用して行うことができ、そして冠状動脈狭窄症に対抗するために、最も効果的で最も広く使用されている治療法であり、500,000例近い症例が毎年行われている。さらに、およそ80,000例の下肢バイパス外科手術が毎年行われている。バイパス手術のために使用されている動脈性導管は、自家伏在静脈が最も頻度が高く、そしてこれらのバイパス手術を行う外科医の95%が選択する移植片であり続けている。American Heart Associationによれば、2004年に、249,000患者において、427,000例のバイパス手術が行われた。これらの手術の長期転帰は、内膜過形成 (IH) の結果として血管移植片または吻合部位の閉塞のために限定的であり、このことは、数ヶ月から数年の時間枠で生じる可能性がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

成功した小口径の合成または組織工学的血管移植片の開発は未だ達成されておらず、そして動脈移植片の使用（例えば、内胸動脈、橈骨動脈、または胃大網動脈）は、サイズの小ささ、小口径、そしてこれらの血管の利用性により限定される。幅広い用途にも関わらず、動脈性静脈移植片（AVG）の失敗は、依然大きな問題である。AVGの12%～27%は、最初の年に閉塞される様になるが、次の年の閉塞率は2%～4%である。AVGが成功しなかった患者は、死亡するかまたは再手術が必要となる。

【 0 0 0 3 】

IHは、最初の5年間の間の全てのAVG失敗事例の20%～40%になる。いくつかの研究により、IHが全ての成熟したAVGにおいてある程度は発生し、そしてこのことは、多数の人々から、静脈の移植に対する避けられない応答としてみなされている、と考えられている。IHは、表現型変化により特徴づけられ、その後中間および外膜平滑筋細胞（SMC）および筋線維芽細胞の、それらが増殖する場所である内膜への脱接着と遊走が生じる。多くの場合、この反応は狭窄を引き起こし、そして移植片を通過する血流の減少を引き起こす可能性がある。IHは、動脈循環の劇的な機械的環境に対して、静脈を急激に曝露することにより開始される可能性があると考えられる。

【 0 0 0 4 】

バイパス移植片として使用するために動脈循環に対して入れ替えられる静脈セグメントは、血流の増加および管腔内圧の増加にさらされ（Porter KE, Nydahl S, Dunlop P, Varty K, Thrush AJ, and London NJ. The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia. *Cardiovasc Res.* 1996;31(4): 607-14）、そしてCABGの場合には拍動する心臓に接続されることから、周期的な壁運動（曲げ、ねじりそして伸展を含む）にさらされる（Vorp DA, Severyn DA, Steed DL, and Webster MW. A device for the application of cyclic twist and extension on perfused vascular segments. *Am J Physiol.* 1996;270(2 Pt 2): H787-95）。静脈は動脈よりもずっと薄い壁でできておりそしてより脆弱であるため、静脈は、静脈回路において順応されている応力よりも、動脈回路において非常に大きな応力を受ける。実際、LiuとFungは、動脈流を再開してすぐのAVGにおける平均円周方向壁応力（CWS）が、通常的环境下での静脈中で140倍となることを示した（Fuchs JC, Mitchener JS, and Hagen PO. Postoperative changes in autologous vein grafts. *Ann Surg.* 1978;188(1): 1-15）。このCWSの劇的な増加は、動脈圧の下ではAVGがその最大径にまで膨張するためである。この組織は、この感知された損傷に対して厚くすることにより対応し、これは静脈レベルにまで戻す試みであると考えられている。しかしながら、この反応は制御不能であり、そして過剰に補填する場合があります、静脈セグメントの所望の肥厚化または“動脈化”にも関わらず、狭窄が引き起こされる。

【 0 0 0 5 】

AVGによる過形成反応は、動脈生化学的環境へそれらを急激に曝露することの結果として生じる“細胞性ショック”の直接的な結果であると示唆されてきた（Angelini GD, et al. Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3): 433-9; Campbell PA, et al. Vein grafts for arterial repair: Their success and reasons for failure. *Ann R Coll Surg Engl.* 1981;63(4): 257-60; Campeau L LJ, et al. Natural history of saphenous vein aortocoronary bypass grafts. *Mod Concepts Cardiovasc Dis.* 1984;53: 59-63; Fuchs JC, Mitchener JS, and Hagen PO. Postoperative changes in autologous vein grafts. *Ann Surg.* 1978;188(1): 1-15; Huynh TT, et al. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999;29(2): 334-44; Liu SQ et al. Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein grafts. *Ann Biomed Eng.* 1998;26(1): 86-95; Ramos JR, et al. Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts. *Ann Surg.*

10

20

30

40

50

1976;183(3): 205-28 ; Resnick N and Gimbrone MA. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *The FASEB J.* 1995;9(10): 874-82 ; Sumpio B. Hemodynamic forces and vascular cell biology. Austin: R.G. Landes Company. 1993 ; Szilagyi DE, et al. Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: Clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis. *Ann Surg.* 1973;178(3): 232-46 ; そして Zwolak RM, et al. Kinetics of vein graft hyperplasia: Association with tangential stress. *Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1987;5(1): 126-36)。外部構造支持体(または鞘)を追加することによりAVGの急性膨張を防止することは、一見したところ、静脈移植片の開存性を向上させた(Huynh TT, et al. *J Vasc Surg.* 1999;29(2): 334-44 ; Cabrera Fischer EI, et al. Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. *Artif Organs.* 2005;29(2): 122-30 ; Ducasse E, et al. Interposition vein cuff and intimal hyperplasia: An experimental study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;27(6): 617-21 ; Huynh TT, et al. External support modulates G protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts. *Surgery.* 1999;126(2): 127-34 ; Jeremy JY, et al. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6): 1766-72 ; Karayannacos PE, et al. Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. *Ann Surg.* 1978;187(2): 183-8 ; Kohler TR, et al. The effect of rigid external support on vein graft adaptation to the arterial circulation. *J Vasc Surg.* 1989;9(2): 277-85 ; Liu SQ, et al. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. *J Biomech.* 1999;32(11): 1165-75 ; Liu SQ, et al. A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. *Biomech Model Mechanobiol.* 2002;1(1): 17-27 ; Mehta D, et al. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med.* 1998;4(2): 235-9 ; Parsonnet V, et al. New stent for support of veins in arterial grafts. *Arch Surg.* 1963;87: 696-702 ; Vijayan V, et al. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9 ; そして Vijayan V, et al. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(1): 13-22)。しかしながら、1またはそれ以上の基本的な限定により、これらの従来のアプローチは、AVG開存性を改善するために臨床的に実行可能な手段をもたらさなかった。これらの従来のアプローチの全ては、生物耐久性でありおよび/または余裕のあるものであった、外膜に配置されたラップ/鞘を利用した。

【 0 0 0 6 】

内膜過形成の発生における生体力学の役割

IHは、一般的には血管内膜における細胞数の増加および/または細胞サイズの増加とその後のこれらの細胞による莫大な量のECMの沈着の結果として、血管の中間層の厚さの増加により定義される。この反応に寄与する細胞は、大部分は中膜および外膜期限のSMCである。IHは、動脈管の閉鎖における場合と同様に発生する間に生理学的に、そして血管損傷の結果として病理学的に、ともに生じる。AVG IHは、動脈循環の劇的な機械的環境に対して、静脈を急激に曝露することにより開始することができると、考えられる(Dobrin P B, Littooy FN, and Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery.* 1989;105(3): 393-

400)。しかしながら、CWSのレベルの増加がIH形成を促進することが示されたが (Huynh TT, Davies MG, Trovato MJ, Svendsen E, and Hagen PO. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999;29(2): 334-44 ;そしてGusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, and Gooch KJ. Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. *J Biomech.* 2005;38(9): 1760-9)、剪断応力に対するレベルの増加は、それを修飾する傾向がある (Huynh TT, Davies MG, Trovato MJ, Svendsen E, and Hagen PO. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999;29(2): 334-44 ;Gusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, and Gooch KJ. Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. *J Biomech.* 2005;38(9): 1760-9 ;Goldman J, Zhong L, and Liu SQ. Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 ;Jiang Z, Berceci SA, Pfahnl CL, Wu L, Goldman D, Tao M, Kagayama M, Matsukawa A, and Ozaki CK. Wall shear modulation of cytokines in early vein grafts. *J Vasc Surg.* 2004;40(2): 345-50 ;Jiang Z, Wu L, Miller BL, Goldman DR, Fernandez CM, Abouhamze ZS, Ozaki CK, and Berceci SA. A novel vein graft model: Adaptation to differential flow environments. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 2004;286(1): H240-5 ;そしてMorinaga K, Okadome K, Kuroki M, Miyazaki T, Muto Y, and Inokuchi K. Effect of wall shear stress on intimal thickening of arterially transplanted autogenous veins in dogs. *J Vasc Surg.* 1985;2(3): 430-3)。これらの2種の生体力学的因子は、一見したところAVGによる相対する過形成反応を引き起こすが、Dobrin et al.により注意深く探索され、彼らは、円周方向の伸展の増加が、剪断応力の増加により肥厚化を防止するのではなく、血管内膜の肥厚化を促進する際のより顕著な役割を果たしていることを示した (Dobrin PB, Littooy FN, and E ndean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery.* 1989;105(3): 393-400)。この研究を刺激する別の研究において、Zwolak et al.は、AVGの動脈化における生体力学的壁応力の制御的役割を示唆した (Zwolak RM, Adams MC, and Clowes AW. Kinetics of vein graft hyperplasia: Association with tangential stress. *Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1987;5(1): 126-36)。Jiang et al.は、壁剪断応力の増加が、壁の張力の増加が存在しない場合、AVGにおける過形成反応を減少させることを示した (Jiang Z, Wu L, Miller BL, Goldman DR, Fernandez CM, Abouhamze ZS, Ozaki CK, and Berceci SA. A novel vein graft model: Adaptation to differential flow environments. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 2004;286(1): H240-5)。Liu et al.によるin vivoの研究は、恒久的なポリテトラフルオロエチレン鞘を配置することを通じてAVGにおけるCWSのレベルを低下させることにより、過形成反応を減少させることができることを示した (Cabrera Fischer EI, Bia Santana D, Cassanello GL, Zocalo Y, Crawford EV, Casas RF, and Armentano RL. Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. *Artif Organs.* 2005;29(2): 122-30 ;Liu SQ, Moore MM, Glucksberg MR, Mockros LF, Grotberg JB, and Mok AP. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. *J Biomech.* 1999 ;32(11): 1165-75 ;そしてLiu SQ, Ruan YY, Tang D, Li YC, Goldman J, and Zhong L. A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. *Biomech Model Mechanobiol.* 2002;1(1): 17-27)。AVGの生体力学的環境がIHの発生に重要な役割を果たしていることは、これらの以前の研究から明らかである。特に、CWSはIHの形成を制御して

10

20

30

40

50

いる様であり、そしてこれを制御することは、本研究において記載されるアプローチの中心であった。

【 0 0 0 7 】

内臓過形成と関連する分子プロセスおよび細胞プロセス

いったん損傷が静脈により感知されると、過形成反応が動きだし、そしてその過形成反応は、異なるが相互に関連する5種類の細胞プロセスにより記述することができる：1) 増殖能が低い状態の収縮状態および静止状態から、増殖能が高い状態の合成状態までの、外膜および中膜SMCの表現型の変化；2) SMCの脱接着またはその他の細胞とECMとの接着斑の変化；3) 細胞がECMに沿って“ 歩行する ” ことを可能にする接着斑の選択的再組み立てを必要とする、外層から基底膜を介して血管内膜へのSMCの遊走；4) 増殖；そして5) コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンなど、ならびに様々なマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 等のマトリクス分解酵素を分泌する合成SMCにより引き起こされるECM組成の変化を反映する、組織のリモデリング。AVG IHの開始現象を阻害するため、当業者は、これらの5種類のプロセスのそれぞれを検討しなければならない可能性がある。IHに関連する事象の流れを示す概略図を図1に示す。

【 0 0 0 8 】

表現型の変化

SMC表現型の調節は、IHの病態における顕著な特徴である。修飾SMCが豊富なプラークが、移植後2週間程度の初期に血管内膜中に見出された。完全に分化した成体SMCは、低い増殖速度およびアポトーシス速度に暗示されるように、代謝回転が低いことが示される。しかしながら、動脈損傷の48時間後には、15~40%のSMCが分裂している。この機能性の突然の変化は、SMCが完全に合成的なものから完全に収縮性のものまでの表現型スペクトル中に存在する可能性があるという事実に関連している。合成SMCは、制御シグナルおよびサイトカインに対して応答し、そしてECM代謝回転ならびに成長因子生成を可能にする。一方、収縮SMCは、血管運動性シグナルに対して応答し、そして血管緊張を調節する。AVGは、脱分化型SMCの長期的な存在下にて、合成SMCの遊走と増殖により、そして次にI型コラーゲン生成を含む持続的なECM蓄積により、最初の2ヶ月以内に新生血管内膜を示す。

【 0 0 0 9 】

SMCの表現型状態は、周期的な伸展が*in vitro*での増殖およびh-カルデスモン発現の基質-依存的な修飾を引き起こすという観察により示されるように、機械的な力により少なくとも部分的に制御される。*In vivo*での研究により、SMCの表現型に対する機械的損傷の重要性も示された。培養液に対するバルーン拡張損傷が、SMCによるECM合成を促進すること、ならびにアクチン含量を減少させることが示された。いくつかの報告は、動脈循環に置き換えられた静脈の新生血管内膜SMCが、表現型的に変化することを示しており、このことは静脈から動脈環境への変化が表現型の変化を引き起こすという考えをサポートしている。例えば、周期的な伸展が培養ラット門脈中でのSMCの収縮機能を維持するために必要であることが見出された*ex vivo*での器官培養の研究から、さらに証拠が得られた。Goldman et al.は、ラット大静脈を動脈圧に曝露し (Goldman J, Zhong L, and Liu SQ. Degradaion of alpha-actin filaments in venous smooth muscle cells in response to mechanical stretch. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2003;284(5): H1839-47)、それにより、中間円周方向張力の大幅な増加およびそれに伴うSMCのフィラメント状のアクチン被覆の減少が引き起こされた。明らかに、静脈移植片に関連する機械的環境の変化は、壁SMCの表現型の変化を引き起こすことができ、これはおそらく、IHの発生に寄与する。

【 0 0 1 0 】

合成表現型の指標には、ゴルジ複合体および粗面小胞体の増加、そしてフィラメント状アクチンの量の減少の存在が含まれる。収縮表現型は、スムーテリン (smoothelin)、h-カルデスモン、平滑筋ミオシン重鎖、および大量のフィラメント状アクチンなどの収縮タンパク質の発現により示される、無傷の収縮装置の存在により示される。

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

脱接着および遊走

細胞の脱接着は、IHカスケードの最初期の反応の一つである。このプロセスは、接着斑および張線維を用いた強力な接着状態から、広がった細胞形状を維持しつつ、接着斑および張線維の再構築により特徴づけられるより弱い接着の状態まで、ECMに対する細胞の接着の変化のことをいう。SMC脱接着はもちろん、新生血管内膜形成に寄与するSMC遊走および増殖を可能にする。

【 0 0 1 2 】

細胞接着の制御に關与する多数の重要なタンパク質が存在する一方、本発明者らは、細胞マトリクス相互作用アダプターおよびモジュレータとして機能するマトリックス細胞タンパク質に (Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol.* 1995;130(3): 503-6および Sage EH and Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. Sparc, tenascin, and thrombospondin. *The Journal of Biological Chemistry.* 1991;266(23): 14831-4)、そして細胞接着斑部位に位置することが示された細胞内接着タンパク質に (Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ilK) binding to paxillin Id1 motif regulates ilK localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(26): 23499-505 ;そして Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell.* 2003;113: 37-47) 注目した。テネイシンC (TN-C)、トロンボスポンジン1、2 (TSP)、そして酸性でシステインが豊富な分泌タンパク質 (SPARC) は、発生および細胞損傷のあいだ非常に制御された発現を示すマトリクス細胞タンパク質である (Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest.* 2001;107(7): 785-90)。マイトジェン誘導性遺伝子2 (Mig-2) およびインテグリン結合キナーゼ (ILK) は、細胞形状修飾に (Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin Id1 motif regulates ilK localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(26): 23499-505 ;そして Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell.* 2003;113: 37-47)、そしてインテグリン媒介性シグナル伝達 (Wu C and Dhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: A new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol.* 2001;155(4): 505-10) に、それぞれ關与する細胞内タンパク質である。TN-C、TSP、およびSPARCの細胞骨格および接着斑に対する作用は、基本的には區別することができない (Greenwood JA, Theibert AB, Prestwich GD, and Murphy-Ullrich JE. Restructuring of focal adhesion plaques by pi 3-kinase. Regulation by ptdins (3,4,5)-p(3) binding to alpha-actinin. *J Cell Biol.* 2000;150(3): 627-42 ;そして Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, and Hook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol.* 1991;115(4): 1127-36)。しかしながら、これら3種のタンパク質はそれぞれ、独自の受容体を有し、そして同様のしかし別個のシグナル伝達経路を有して、細胞遊走のための前駆体である中間接着の状態を生成する (Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest.* 2001;107(7): 785-90)。Mig-2およびILKもまた、細胞接着に關与する (Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin Id1 motif regulates ilK localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(26): 23499-505 ;そして Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell.* 2003;113: 37-47)。具体的には、Mig-2は、細胞マトリクス接着とアクチン骨格との間の連結に關与し、ならび

10

20

30

40

50

に細胞形状を修飾することが示された (Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 2003;113: 37-47)。最近の研究は、ILKが、インテグリン媒介性シグナル伝達におけるメディエータとして機能することを示した (Wu C. Integrin-linked kinase and pinch: Partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *Journal of Cell Science*. 1999;112 (Pt 24): 4485-9)。さらに、Mig-2およびILKの両方ともが、接着斑を維持するために必要である (Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ilck) binding to paxillin Id1 motif regulates ilck localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(26): 23499-505 ;そしてTu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 2003;113: 37-47)。TN-C、TSP、SPARC、Mig-2、およびILKのレベルの変化を調べることにより、本発明者らは、静脈セグメント中のSMCの接着状態についての結論を得ることができると考える。TN-C、TSP、SPARC、Mig-2およびILKの細胞内局在を示す概略図を、図2に示す。

【 0 0 1 3 】

in vivoでのSMC遊走のために前もって必要なのは、周囲のマトリクスタンパク質の分解である。マトリクスメタロプロテアーゼ (具体的には、MMP-1、MMP-2、およびMMP-9) は、血管ECMの様々な構成成分を選択的に分解することができる (Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon_Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, and Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circulation Research (Online)*. 1994;75(1): 181-9; Newby AC, Southgate KM, and Davies MG. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 1994;89(Suppl 1): 59-70; Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, and London JM. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vasc. Surg*. 2002;36: 150-7;そしてSouthgate KM, Davies M, Booth RF, and Newby AC. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*. 1992;288 (Pt 1): 93-9)。MMPは、SMC遊走を制御することによる動脈病変の発生に必須であることが示された。MMP間のバランス、それらの活性化因子 (MT-1 MMP) (Lafleur MA, Hollenberg MD, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G, and Edwards DR. Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-mmp-2) by thrombin is membrane-type-mmp-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kda active species. *Biochem J*. 2001;357(Pt 1): 107-15)、およびそれらの阻害剤 (具体的には、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、およびTIMP-4) が、ECM分解のレベルを決定する (Meng X, Mavromatis K, and Galis ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp Mol Pathol*. 1999;66(3): 227-37)。多数の研究が、MMPおよびTIMPが、血行動態の変化および血管損傷にตอบสนองしたIHの初期段階において重要な役割を果たすことを示した (George SJ, Baker AH, Angelini GD, and Newby AC. Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits metalloproteinase activity and neointima formation in human saphenous vein s. *Gene Ther*. 1998;5(11): 1552-60; George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, and Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther*. 1998;9(6): 867-77;そしてLijnen HR, Soloway P, and Collen D. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. *Circ Res*. 1999;85(12): 1186-91)。例えば、動脈血行動態でex vivoでのかん流の6時間後に、MMP-2お

10

20

30

40

50

よびMMP-9の発現をヒト伏在静脈において増加させた (Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N, Ku DN, and Galis ZS. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous vein s perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 ;20(8): 1889-95)。その他のヒト伏在静脈の器官培養の研究は、動脈条件下で、MMP-9の生成の増加およびMMP-2の活性の増加を示した (Porter KE, Thompson MM, Loftus IM, Mc Dermott E, Jones L, Crowther M, Bell PR, and London NJ. Production and inhibition of the gelatinolytic matrix metalloproteinases in a human model of vein graft stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;17(5): 404-12 ;Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, and London JM. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vasc. Surg.* 2002;36: 150-7 ;そしてGeorge SJ, Zaltsman AB, and Newby AC. Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein. *Cardiovasc Res.* 1997;33(2): 447-59)。シンバスタチンなど、幅広いスペクトルのMMP阻害剤は、このモデルにおける新生血管内膜形成を阻害することが示された (Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, and London JM. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vasc. Surg.* 2002;36: 150-7 ;そしてPorter KE, Loftus IM, Peterson M, Bell PR, London NJ, and Thompson MM. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. *Br J Surg.* 1998;85(10): 1373-7)。

【 0 0 1 4 】

機械的な力は、上述した因子を直接的に制御することにより、SMCの脱接着および遊走に影響を与える可能性がある。例えば、MMP-1の発現は、静的対照と比較して、パルス状圧力に曝露された静脈SMCにおいて増加し (Redmond EM, Cahill PA, Hirsch M, Wang YN, Sitzmann JV, and Okada SS. Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: The role of urokinase and matrix metalloproteinase. *Thrombosis & Haemostasis.* 1999;81(2): 293-300)、一方、MMP-2 mRNAレベルは、周期的な伸展に曝露されたマウスSMCにおいて増加する (Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, and Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via nad(p)h oxidase-derived reactive oxygen species. *Circulation Research.* 2003;92(11): 80-6)。ヒト伏在静脈由来の培養SMCにおいて、MMP-2およびMMP-9の転写物およびタンパク質レベルは、単軸の静止張力に曝露された場合には増加したが、単軸のサイクル状張力に曝露された場合には減少した (Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, and Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(5): H1778-84)。線維芽細胞のサイクル状張力は、MT-1 MMPレベルを増加すること (Tyagi SC, Lewis K, Pikes D, Marcello A, Mujumdar VS, Smiley LM, and Moore CK. Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. *J Cell Physiol.* 1998;176(2): 374-82 [166]) としてTIMP-1レベルを低下させること (Yamaoka A, Matsuo T, Shiraga F, and Ohtsuki H. Timp-1 production by human scleral fibroblast decreases in response to cyclic mechanical stretching. *Ophthalmic Research.* 2001;33(2): 98-101) が示された。さらに、SMC遊走は、剪断応力により誘導されたECシグナリングにより制御されることが示された (Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, and Glagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *Journal of Vascular Surgery.* 1998;27(5): 910-8 ; Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, and Shigematsu H. Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol.* 2000;19(2): 142-6 ; Powell RJ, Carruth JA, Basson MD, Bloodgood R, and Sumpio BE. Matri

10

20

30

40

50

x-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration. *Journal of Vascular Surgery*. 1996;24(1): 51-7 ;そしてShigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, and Muto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol*. 2000;19(1): 39-46)。機械的な力は、上述した因子を直接的に制御することにより、SMCの脱接着および遊走に影響を与える可能性がある。SMC遊走は、剪断応力により誘導されたECシグナリングにより制御されることが示された (Garanich JS, Pahakis M, and Tarbell JM. Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5): H2244-52 ; Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, and Glagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *Journal of Vascular Surgery*. 1998; 27(5): 910-8 ; Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, and Shigematsu H. Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol*. 2000;19(2): 142-6 ; Powell RJ, Carruth JA, Basson MD, Bloodgood R, and Sumpio BE. Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration. *Journal of Vascular Surgery*. 1996;24(1): 51-7 ; Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, and Muto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol*. 2000;19(1): 39-46 ;そしてSho M, Sho E, Singh TM, Komatsu M, Sugita A, Xu C, Nanjo H, Zarins CK, and Masuda H. Subnormal shear stress-induced intimal thickening requires medial smooth muscle cell proliferation and migration. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(2): 150-60)。

【 0 0 1 5 】

増殖

いくつかの成長因子は、静脈移植片の過形成反応における主要な構成成分として関与していた。形質転換成長因子 (TGF-) は、特に重要なものであるようである。例えば、Wolf et al.は、TGF- に対する抗体の全身投与は、ラットモデルにおけるIHの発生を顕著に減少させることを示した (Wolf YG, Rasmussen LM, and Ruoslahti E. Antibody against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest*. 1994;93(3): 1172-8)。血小板由来成長因子 (PDGF) および塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) もまた、IH関連SMC増殖に関与する主要な因子であるようである。例えば、PDGFは、培養SMCにおいて用量依存的増殖反応を引き起こすが (Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, and Ueda T. The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2000;149(1): 51-9)、一方TGF- は増殖を阻害する (Mii S, Ware JA, and Kent KC. Transforming growth factor-beta inhibits human vascular smooth muscle cell growth and migration. *Surgery*. 1993;114(2): 464-70)。自家静脈移植片の死細胞および損傷細胞から放出されるbFGFは、SMCの増殖を促進する (Qian H, Zhang B, and Zhao H. [gene expression of bfgf and intimal hyperplasia of autologous vein grafts in rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1996;76(11): 826-8)。PDGF転写物のmRNAレベルおよび多数の増殖中の細胞が、ブタ静脈移植片の新生血管内膜中で最高値になっていることが示された (Francis SE, Hunter S, Holt CM, Gadsdon PA, Rogers S, Duff GW, Newby AC, and Angelini GD. Release of platelet-derived growth factor activity from pig venous arterial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;108(3): 540-8)。成長因子がIHにおいて明らかに役割を果たしているのに対して、MMPもまたSMCの増殖を制御することにより動脈病変を発生するために重要であることが示されたが (Southgate KM, Davies M, Booth RF, and Newby AC. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*. 1992;288 (Pt 1): 93-9 ; Cho A and Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and mig

10

20

30

40

50

ration after arterial injury. *Circ Res.* 2002;91(9): 845-51)、一方TIMPは、SMCのアポトーシスを促進することが示された(Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moumdjian R, and Beliveau R. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2002;35(3): 539-46)。

【 0 0 1 6 】

IHは、SMCの増殖の増加およびアポトーシスの増加および減少の両方ともに関連することが示された。血管内膜のアポトーシスの増加が、細胞数の増加と関連する症状であるIHと関連していることは、反直観的なことのようなかもしれない。しかしながら、細胞数の増加は、IHを制御する平衡の中では一つの減少にすぎないことを記憶しておかなければならない。すなわち、アポトーシスの絶対的な増加が見られる可能性があるが、細胞増殖のより大幅な増加が細胞数の全体の増加という結果をもたらす可能性もある。ツこれらの理由に関して、増殖を評価する際には、平衡の両側ともを評価することが重要である(すなわち、促進性因子と阻害性因子)。

10

【 0 0 1 7 】

増殖性細胞核抗原(PCNA)および末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ-媒介性dUTP-ビオチンin situニック末端標識(TUNEL)を使用して、無傷AVG内部の増殖性細胞およびアポトーシス細胞のそれぞれを、in vivoで(Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, and Yasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002;21(3): 250-5)、そしてin vitroで(Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Mahidhara RS, Kim PK, Taylor BS, and Tzeng E. Overexpression of mutated ikappabalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. *J Vasc Surg.* 2003;38(4): 812-9)標識した。細胞増殖およびアポトーシスは、移植後最初の週の間に静脈の外膜および静脈の中膜内部で生じる同時的なプロセスであるが、しかしながらこの平衡はその後増殖速度がアポトーシスの速度以上に増加するにつれて破綻する(Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, and Yasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002;21(3): 250-5)。再手術に際して切除された狭窄した大動脈冠動脈のバイパス移植片の中膜および新生血管内膜中での増殖レベルは、非-狭窄対照よりも顕著に高いことが示された(Hilker M, Buerke M, Lehr HA, Oelert H, and Hake U. Bypass graft disease: Analysis of proliferative activity in human aorto-coronary bypass grafts. 2002;5 Suppl 4: S331-41)。

20

30

【 0 0 1 8 】

壁応力の増加は、AVG IHに関連しており、そしてこれはSMCの増殖およびアポトーシスの機械的制御の直接的な結果である可能性がある。例えば、動脈レベルの周期的な伸展に対して曝露された場合に、動脈SMCと比較して、静脈SMCは、それらの増殖を増加させることが示された(Predel HG, Yang Z, von_Segesser L, Turina M, Buhler FR, and Luscher TF. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet.* 1992;340(8824): 878-9;そしてDethlefsen SM, Shepro D, and D'Amore PA. Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res.* 1996;33(5): 405-13)。Liu et al.は、プロモデオキシウリジン染色およびTUNEL解析を介して、動脈の血行動態による機械的伸展が細胞死を引き起こし、それがラットAVGモデルにおけるその後の細胞増殖を媒介する可能性があることを示した(Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, and Kent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery.* 2002;132(2): 317-25)。Predel et al.は、拍動性の伸展が伏在静脈のSMC増殖を刺激するが、しかし内部乳腺動脈のSMC増殖は刺激せず、そして静脈バイパス移植片疾患には寄与する可能性があることを示した(Predel HG, Yang Z, von_Segesser L, Turina M, Buhler FR, and Luscher TF. Implicat

40

50

ions of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet*. 1992;340(8824): 878-9)。静脈が動脈循環に変換される場合、それらは、壁内応力に加えて、内腔剪断応力の増加を受ける。実際、剪断応力の増加および培養SMCに対して負荷される周期的な伸展の組み合わせが、PDGF受容体を活性化することが示された (Hu Y, Bock G, Wick G, and Xu Q. Activation of pdgf receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *Faseb J*. 1998;12(12): 1135-42 [192])。

【 0 0 1 9 】

リモデリング

血管リモデリングは、一般的に、生体力学的环境の変化に応じた、血管の形態または微細構造の変化のことをいう。これは、生体力学的恒常性を回復するための(すなわち、剪断応力および壁応力を正常レベルに回復するための)組織による試みとして生じると考えられている。AVGの場合、IHは、リモデリングの病理学的形態であり、それにはSMCの遊走および増殖により生じる血管内膜の厚さの増加、血管内膜のアポトーシスの増加、ECM沈着の増加による血管内膜および中膜の硬化、そして中膜および外膜SMCの肥大が含まれる。

10

【 0 0 2 0 】

血管細胞は、コラーゲンおよびエラスチン等のECM構成成分を生成する。静脈移植片と関連するSMCの表現型変化は、I型コラーゲンおよびエラスチン生成の増加により特徴づけられるECM合成を変化させることが示された。動脈バイパス移植片として使用される静脈は、それらのECM構成成分の変化をうけ、それにより内腔領域の喪失および最終的な閉塞を引き起こす可能性がある。マトリクス合成の変化は、バルーン血管形成により生じる損傷後の最初の週の間、過形成新生血管内膜中でのコラーゲン含量の増加を直接的に引き起こす。さらに、この過形成リモデリングを受けるAVGは、新鮮な静脈と比較して伸展性の低下を示し、それがその不全を引き起こす可能性がある。

20

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 2 1 】

【 非特許文献 1 】 Porter KE, et al., *Cardiovasc Res*. 1996;31(4): 607-14

【 非特許文献 2 】 Vorp DA, et al., *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 2): H787-95

30

【 非特許文献 3 】 Fuchs JC, et al., *Ann Surg*. 1978;188(1): 1-15) .

【 非特許文献 4 】 Angelini GD, et al., *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990;99(3): 433-9

【 非特許文献 5 】 Campbell PA, et al., *Ann R Coll Surg Engl*. 1981;63(4): 257-60

【 非特許文献 6 】 Campeau L LJ, et al., *Mod Concepts Cardiovasc Dis*. 1984;53: 59-6

3

【 非特許文献 7 】 Huynh TT, et al., *J Vasc Surg*. 1999;29(2): 334-44

【 非特許文献 8 】 Liu SQ et al., *Ann Biomed Eng*. 1998;26(1): 86-95

【 非特許文献 9 】 Ramos JR, et al., *Ann Surg*. 1976;183(3): 205-28

【 非特許文献 1 0 】 Resnick N and Gimbrone MA. *The Faseb J*. 1995;9(10): 874-82

【 非特許文献 1 1 】 Szilagyi DE, et al., *Ann Surg*. 1973;178(3): 232-46

40

【 非特許文献 1 2 】 Zwolak RM, et al., the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1987;5(1): 126-36) .

【 非特許文献 1 3 】 Cabrera Fischer EI, et al., *Artif Organs*. 2005;29(2): 122-30

【 非特許文献 1 4 】 Ducasse E, et al., *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;27(6): 617-2

1

【 非特許文献 1 5 】 Huynh TT, et al., *Surgery*. 1999;126(2): 127-34

【 非特許文献 1 6 】 Jeremy JY, et al., *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(6): 1766

-72

【 非特許文献 1 7 】 Karayannacos PE, et al., *Ann Surg*. 1978;187(2): 183-8

50

- 【非特許文献 1 8】Kohler TR, et al., J Vasc Surg. 1989;9(2): 277-85
- 【非特許文献 1 9】Liu SQ, et al., J Biomech. 1999;32(11): 1165-75
- 【非特許文献 2 0】Liu SQ, et al., Biomech Model Mechanobiol. 2002;1(1): 17-27
- 【非特許文献 2 1】Mehta D, et al., Nat Med. 1998;4(2): 235-9
- 【非特許文献 2 2】Parsonnet V, et al., Arch Surg. 1963;87: 696-702
- 【非特許文献 2 3】Vijayan V, et al., J Vasc Surg. 2004;40(5): 1011-9
- 【非特許文献 2 4】Vijayan V, et al., Eur J Vasc Endovasc Surg. 2002;24(1): 13-22
- 【非特許文献 2 5】Dobrin PB, et al., Surgery. 1989;105(3): 393-400
- 【非特許文献 2 6】Gusic RJ, et al., J Biomech. 2005;38(9): 1760-9
- 【非特許文献 2 7】Goldman J, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 10
- 【非特許文献 2 8】Jiang Z, et al., J Vasc Surg. 2004;40(2): 345-50
- 【非特許文献 2 9】Jiang Z, et al., American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2004;286(1): H240-5
- 【非特許文献 3 0】Morinaga K, et al., J Vasc Surg. 1985;2(3): 430-3
- 【非特許文献 3 1】Goldman J, et al., American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2003;284(5): H1839-47
- 【非特許文献 3 2】Bornstein P., J Cell Biol. 1995;130(3): 503-6
- 【非特許文献 3 3】Sage EH and Bornstein P., The Journal of Biological Chemistry. 1991;266(23): 14831-4
- 【非特許文献 3 4】Nikolopoulos SN and Turner CE., The Journal of Biological Chemistry. 2001;276(26): 23499-505 20
- 【非特許文献 3 5】Tu Y, et al., Cell. 2003;113: 37-47
- 【非特許文献 3 6】Murphy-Ullrich JE., J Clin Invest. 2001;107(7): 785-90
- 【非特許文献 3 7】Wu C and Dedhar S., J Cell Biol. 2001;155(4): 505-10
- 【非特許文献 3 8】Greenwood JA, et al., J Cell Biol. 2000;150(3): 627-42
- 【非特許文献 3 9】Murphy-Ullrich JE, et al., J Cell Biol. 1991;115(4): 1127-36
- 【非特許文献 4 0】Wu C., Journal of Cell Science. 1999;112 (Pt 24): 4485-9
- 【非特許文献 4 1】Galis ZS, et al., Circulation Research (Online). 1994;75(1): 181-9
- 【非特許文献 4 2】Newby AC, et al., Basic Res Cardiol. 1994;89(Suppl 1): 59-70 30
- 【非特許文献 4 3】Porter KE, et al., J. Vasc. Surg. 2002;36: 150-7
- 【非特許文献 4 4】Southgate KM, et al., Biochem J. 1992;288 (Pt 1): 93-9
- 【非特許文献 4 5】Lafleur MA, et al., Biochem J. 2001;357(Pt 1): 107-15
- 【非特許文献 4 6】Meng X, et al., Exp Mol Pathol. 1999;66(3): 227-37
- 【非特許文献 4 7】George SJ, et al., Gene Ther. 1998;5(11): 1552-60
- 【非特許文献 4 8】George SJ, et al., Hum Gene Ther. 1998;9(6): 867-77
- 【非特許文献 4 9】Lijnen HR, et al., Circ Res. 1999;85(12): 1186-91
- 【非特許文献 5 0】Mavromatis K, et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(8): 1889-95
- 【非特許文献 5 1】Porter KE, et al., Eur J Vasc Endovasc Surg. 1999;17(5): 404-12 40
- 【非特許文献 5 2】George SJ, et al., Cardiovasc Res. 1997;33(2): 447-59
- 【非特許文献 5 3】Porter KE, et al., Br J Surg. 1998;85(10): 1373-7
- 【非特許文献 5 4】Redmond EM, et al., Thrombosis & Haemostasis. 1999;81(2): 293-300
- 【非特許文献 5 5】Grote K, et al., Circulation Research. 2003;92(11): 80-6
- 【非特許文献 5 6】Asanuma K, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;284(5): H1778-84
- 【非特許文献 5 7】Tyagi SC, et al., J Cell Physiol. 1998;176(2): 374-82
- 【非特許文献 5 8】Yamaoka A, et al., Ophthalmic Research. 2001;33(2): 98-101 50

- 【非特許文献 5 9】 Bassiouny HS, et al., Journal of Vascular Surgery. 1998;27(5): 910-8
- 【非特許文献 6 0】 Nakazawa T, et al., Int Angiol. 2000;19(2): 142-6
- 【非特許文献 6 1】 Powell RJ, et al., Journal of Vascular Surgery. 1996;24(1): 51-7
- 【非特許文献 6 2】 Shigematsu K, et al., Int Angiol. 2000;19(1): 39-46
- 【非特許文献 6 3】 Garanich JS, et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(5): H2244-52
- 【非特許文献 6 4】 Sho M, et al., Exp Mol Pathol. 2002;72(2): 150-60
- 【非特許文献 6 5】 Wolf YG, J Clin Invest. 1994;93(3): 1172-8 10
- 【非特許文献 6 6】 Uzui H, Atherosclerosis. 2000;149(1): 51-9
- 【非特許文献 6 7】 Mii S, et al., Surgery. 1993;114(2): 464-70
- 【非特許文献 6 8】 Qian H, et al., Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 1996;76(11): 826-8
- 【非特許文献 6 9】 Francis SE, et al., J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;108(3): 540-8
- 【非特許文献 7 0】 Cho A and Reidy MA. Circ Res. 2002;91(9): 845-51
- 【非特許文献 7 1】 Annabi B, et al., J Vasc Surg. 2002;35(3): 539-46
- 【非特許文献 7 2】 Nishibe T, et al., Int Angiol. 2002;21(3): 250-5
- 【非特許文献 7 3】 Zuckerbraun BS, et al., J Vasc Surg. 2003;38(4): 812-9
- 【非特許文献 7 4】 Hilker M, et al., Bypass graft disease: Analysis of proliferative activity in human aorto-coronary bypass grafts. 2002;5 Suppl 4: S331-41 20
- 【非特許文献 7 5】 Predel HG, et al., Lancet. 1992;340(8824): 878-9
- 【非特許文献 7 6】 Dethlefsen SM, et al., J Vasc Res. 1996;33(5): 405-13
- 【非特許文献 7 7】 Liu B, et al., Surgery. 2002;132(2): 317-25
- 【非特許文献 7 8】 Hu Y, et al., Faseb J. 1998;12(12): 1135-42
- 【発明の概要】
- 【 0 0 2 2 】
- IHプロセスの初期現象を阻害するための信頼性のある手段を開発することは、動脈バイパス手術の結果の改善に寄与する可能性がある。従って、動脈性静脈移植片、またはいずれかの管状組織（生細胞構造物）を、一般的には、自家移植術、同種異系移植術、異種移植術（しかしこれらには限定されない）において、機械的に調整する方法を、本明細書中で提供する。この目的のため、静脈、動脈、尿道、腸、食道、気管、気管支、尿管および卵管を含む（しかしこれらには限定されない）管状組織をラッピングする方法を、本明細書中で提供する。この管状組織を、生体内分解性（生分解性または生体吸収性ともいう）ポリマーの拘束性繊維マトリクスを用いて、管状組織の周囲についてラッピングする。非限定的な一態様において、マトリクスは、エレクトロスピニングにより管状組織上に沈着される。非限定的な具体的な一態様において、この管状組織は、伏在静脈などの静脈であり、それを例えば冠動脈バイパス術などの動脈バイパス術において使用する。
- 【 0 0 2 3 】
- ポリマーマトリクスの生分解速度を、操作し、最適化し、あるいは調整し、それによりマトリクスを有用な時間をかけて分解することができる。例えば、冠動脈バイパスの場合、移植片に対して実質的な急激なストレスをかけることを防止するため、マトリクスを12時間以上かけて溶解することが好ましい。このポリマーは、所望の期間かけて分解され、それによりポリマーマトリクスによりもたらされる機械的サポートが時間の経過とともに徐々に減少し、そして静脈が徐々に増加するレベルのCWSに曝露されることとなる。
- 【 0 0 2 4 】
- この新しいアプローチは、2種類の潜在的な用途を有している。第1の非限定的な用途において、マトリクスを、AVGとして使用することを意図している静脈セグメントの修飾のための、外科周辺ツール（peri-surgical tool）として使用することができる。静脈またはその他の管状解剖学的構造の修飾は、身体から取り出してすぐ後にそして例えば動脈バ 50

バイパス外科手術（これらには限定されない）など移植する直前に、静脈をベッドサイドで処理することにより、行うことができる。一つの限定的ではない例において、伏在静脈を取り出した後、そして外科医が外科手術部位を開放している間に、このポリマーラップを、バイパス術用を使用する直前に、静脈に対してエレクトロスピンニングすることができる。

【0025】

第2の非限定的な態様において、このポリマーマトリクスを、支持体をAVGに対して送達するための新たなビヒクルとして使用することができる。静脈移植片の機械的環境を時間をかけて修飾することそれ自体によりAVG開存性を改善することができる一方、活性薬剤の送達およびAVGに対する生物学的（細胞）支持体は、多くの事例において好ましいことが示される可能性がある。活性薬剤および/または生体物質が取り込まれたエレクトロスピンニングされたポリマーラップを調整して、所望の速度で分解することにより、これらの支持体様式の送達速度を調節することができた。

【0026】

一態様に従って、管状組織移植片デバイスが提供される。デバイスは、管状組織および管状組織の周囲の生体内分解性ポリマーの拘束性繊維マトリクスを含む。マトリクスは、管状組織の少なくとも一部（部分）の周囲に、典型的に隣接するかまたは本質的に隣接する。一態様において、管状組織は、静脈から得られ（静脈であり）、例えば、限定的ではないが、静脈管状組織は伏在静脈の一部から得られる。別の態様において、管状組織は、動脈、尿道、腸、食道、尿管、気管、気管支、および卵管の1またはそれ以上のから選択される（それらから選択される器官/組織から得られる）。デバイスのマトリクスは典型的には、in situで（移植された場合）12時間～2週間の期間をかけて生体内分解し、このことはマトリクスの支持性状が時間とともに分解されるが、マトリクスが完全に生体内分解する訳ではないことを意味している。

【0027】

一態様において、デバイスを、管状組織上にポリマー繊維をエレクトロスピンニングすることにより調製する。ポリマー繊維は、いずれかの有用な生体内分解性ポリマー組成物を含むことができる。以下に示される一態様において、繊維は、例えば（限定的ではないが）ポリ（エステルウレタン）尿素を含む、エステル結合およびウレタン結合を含むポリマーを含む。別の態様において、繊維は、1またはそれ以上の以下のもの： -ヒドロキシ酸由来のポリマー、ポリラクチド、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリグリコール酸、ポリ（dl-ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（l-ラクチド-co-dl-ラクチド）、ラクトンモノマーを含むポリマー、ポリカプロラクトン、カーボネート結合を含むポリマー、ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート）、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート-co-ジオキサノン）、ウレタン結合を含むポリマー、ポリウレタン、ポリ（エステルウレタン）尿素、ポリ（エステルウレタン）尿素エラストマー、エステル結合を含むポリマー、ポリアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、ポリガラクトシン、天然ポリマー、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ヒアルロン酸およびゼラチン、から選択されるポリマーを含む。一態様において、このポリマー組成物は、約25%wt.～約75%wt.のコラーゲンとともにポリ（エステルウレタン）尿素を含む。このポリマーもまた、例えば（限定的ではないが）、コラーゲンとエラスチンとの混合物約25%wt.～約75%wt.で（一態様に従っておよそ（約）等量である）、エラスチンを含むことができる。

【0028】

さらに別の態様において、細胞と治療剤（例えば、薬物、サイトカイン、化学誘因物質、抗生物質、抗炎症性剤、など）の一方または両方が、マトリクスと関連する（結合する、吸収される、吸着される、増殖する、連結する、など）。一態様において、細胞は、マトリクスと関連し、例えば（限定的ではないが）、幹細胞、前駆細胞（前駆体）細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髄由来間葉細胞、およ

10

20

30

40

50

び遺伝子修飾された細胞の1またはそれ以上のものが、マトリクスと関連する。別の態様において、成長因子、例えば（限定的ではないが）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、形質転換成長因子-、プレイオトロフィンタンパク質、ミッドカインタンパク質およびIGF-1の1またはそれ以上のものから選択される成長因子は、マトリクスと関連する。別の態様において、薬物はマトリクスと関連する。非限定的な特定の態様において、薬物は、非ステロイド性抗炎症性薬、抗生物質、抗凝固因子、免疫抑制剤、グルココルチコイド、イムノフィリンに対して作用する薬物、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、スタチン、および一酸化窒素ドナーの1またはそれ以上のものから選択される。そのほか、薬物は、NSAID、サリチル酸、インドメタシン、インドメタシンナトリウム三水和物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリンダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、抗炎症性タンパク質、ステロイド性抗炎症剤、ヘパリン、Pebac、エノキサパリン（enoxaprin）、アスピリン、ヒルジン、プラビックス、ピバリルジン、プラスグレル、イドラパリナックス、ワーファリン、クーマディン、クロピドグレル、PPACK、GGACK、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン（betamethisone）、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロンアセトニド、血管新生阻害剤、フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキシソルピシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ペガブタニブ、ルーセンティス、トリプトファン-tRNA合成酵素、リタアン（retaane）、CA4P、AdPDF、VEGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスタチン、JSM6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベバシズマブ（becacizumab）、ネオバスタット、抗増殖剤、シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシル基転移酵素阻害薬、FPTIII、L744、抗増殖性因子、Van 10/4、ドキシソルピシン、5-FU、ダウノマイシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作動性腸管ポリペプチド、抗体、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムス、シロリムス、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、スタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン一酸化窒素ドナーまたは前駆体、Angeli塩、L-アルギニン、遊離塩基、ジエチルアミンNONOate、ジエチルアミンNONOate/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、(±)-S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、塩酸塩、ニトロプルシド・ナトリウム、二水和物、スペルミンNONOate、ストレプトゾトシン、抗生物質、アシクロビル、オフロキサシン（afloxacin）、アンピシリン、アンフォテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラズリル（diclazaril）、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタンブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イトラコナゾール（itraconazole）、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジンアミド、ピリメタミン、リファブチン、リファンピン、スパルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン、トリフルオロウリジン、硫酸トリメトプリム、Zn-ピリチオン、および塩化物、臭化物、ヨウ化物および過ヨウ素物などの銀塩の1またはそれ以上のものから選択される。

【0029】

管状組織の周囲（外側表面、周囲）に生体内分解性ポリマーの繊維マトリクスを沈着させて、管状組織移植片デバイスを作製することを含む、管状移植片を調製する方法もまた

10

20

30

40

50

、提供する。マトリクスは、典型的には、管状組織の少なくとも一部（部分）の周囲に、隣接または本質的に隣接する。一態様において、マトリクスを、エレクトロスピンングにより沈着する。上述したように、典型的には、in situで12時間～2週間の時間をかけてマトリクスを生体分解する。

【0030】

一態様において、管状組織を静脈から、例えば（限定的ではないが）、静脈管状組織を伏在静脈の一部から得る。別の態様において、管状組織を、動脈、尿道、腸、食道、尿管、気管、気管支、および卵管の1またはそれ以上のものから選択する（それらから選択する器官/組織から得る）。

【0031】

ポリマー繊維は、いずれかの有用な生体内分解性かつ生体適合性ポリマー組成物を含むことができる。以下に示す一態様において、繊維は、例えば（限定的ではないが）、ポリ（エステルウレタン）尿素を含む、エステル結合およびウレタン結合を含むポリマーを含む。別の態様において、繊維は、1またはそれ以上の以下のもの： -ヒドロキシ酸に由来するポリマー、ポリラクチド、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（L-ラクチド-co-カプロラクトン）、ポリグリコール酸、ポリ（dl-ラクチド-co-グリコリド）、ポリ（l-ラクチド-co-dl-ラクチド）、ラクトンモノマーを含むポリマー、ポリカプロラクトン、カーボネート結合を含むポリマー、ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート）、ポリ（グリコリド-co-トリメチレンカーボネート-co-ジオキサノン）、ウレタン結合を含むポリマー、ポリウレタン、ポリ（エステルウレタン）尿素、ポリ（エステルウレタン）尿素エラストマー、エステル結合を含むポリマー、ポリアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノン、ポリガラクチン、天然ポリマー、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ヒアルロン酸、およびゼラチン、から選択されるポリマーを含む。一態様において、ポリマー組成物は、約25%wt.～約75%wt.のコラーゲン（その間の徐々に増加する量）とともに、ポリ（エステルウレタン）尿素を含む。このポリマーは、エラスチン、例えば（限定的ではないが）コラーゲンとエラスチンとの混合物約25%wt.～約75%wt.（一態様に従っておよそ（約）等量である）、を含んでもよい。

【0032】

別の態様において、この方法は、細胞および治療剤（例えば、薬剤、サイトカイン、化学誘因物質、抗生物質、抗炎症性剤など）の一方または両方を、マトリクスと関連させること（結合させること、吸収させること、吸着させること、増殖させること、関連させることなど）を含む。一態様において、細胞はマトリクスと関連しており、例えば（限定的ではないが）、幹細胞、前駆細胞（前駆体）細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髄由来間葉細胞、および遺伝子修飾された細胞の1またはそれ以上の細胞が、マトリクスと関連する。別の態様において、成長因子はマトリクスと関連し、例えば（限定的ではないが）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、形質転換成長因子- β 、プレイオトロフィンタンパク質、ミッドカインタンパク質およびIGF-1の1またはそれ以上のものから選択される成長因子が、マトリクスと関連する。非限定的な特定の態様において、薬物は、非ステロイド性抗炎症性薬、抗生物質、抗凝固因子、免疫抑制剤、グルココルチコイド、イムノフィリンに対して作用する薬物、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、スタチン、および一酸化窒素ドナーの1またはそれ以上のものから選択される。そのほか、薬物は、NSAID、サリチル酸、インドメタシン、インドメタシンナトリウム三水合物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、抗炎症性タンパク質、ステロイド性抗炎症剤、ヘパリン、Pebac、エノキサパリン（enoxaprin）、アスピリン、ヒルジン、プラビックス、ピバリルジン、プラスゲレル、イドラパリナックス、ワーファリン、クーマディン、クロピドグレル、PPACK、GGACK、組織プラスミノゲン活性化因

10

20

30

40

50

子、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン (betamethisone)、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロンアセトニド、血管新生阻害剤、フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキシソルピシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ペガブタニブ、ルーセンティス、トリプトファン-tRNA合成酵素、リタアン (retaane)、CA4P、AdPEDF、VEGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスタチン、JSM6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベバシズマブ (becacizumab)、ネオバスタット、抗増殖剤、シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシル基転移酵素阻害薬、FPTIII、L744、抗増殖性因子、Van 10/4、ドキシソルピシン、5-FU、ダウノマイシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作動性腸管ポリペプチド、抗体、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムス、シロリムス、インターフェロン、TNF結合タンパク質、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、スタチン、アトルバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン-酸化窒素ドナーまたは前駆体、Angeli塩、L-アルギニン、遊離塩基、ジエチルアミンNONOate、ジエチルアミンNONOate/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、(±)-S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、塩酸塩、ニトロプルシド・ナトリウム、二水和物、スベルミンNONOate、ストレプトゾトシン、抗生物質、アシクロビル、オフロキサシン (ofloxacin)、アンピシリン、アンフォテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラズリル (diclazaril)、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタンブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イトラコナゾール (iatroconazole)、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジンアミド、ピリメタミン、リファブチン、リファンピン、スパルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン、トリフルオロウリジン、硫酸トリメトプリム、Zn-ピリチオン、および塩化物、臭化物、ヨウ化物および過ヨウ素物などの銀塩の1またはそれ以上のものから選択される。

【0033】

さらに別の態様において、冠状動脈を、静脈および静脈の周囲に隣接する生体内分解性ポリマーの拘束性繊維マトリクスを含む管状組織移植片デバイスによりバイパスすることを含む心臓のバイパス方法が提示される。隣接する生体内分解性ポリマーマトリクスは、上述したようにそして明細書の開示全体を通じて、いずれかのマトリクスであり、そして上述した追加の治療剤が含まれていてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1：内膜過形成の進行の概略図を示す。注：IEL、内部弾性板；SMC、平滑筋細胞。図は、Robbins Pathologic Basis of Disease、1999 (Kumar V, Fausto N, and Abbas A. Robbins & Coltran pathologic basis of disease. Saunders. 2004) から採用した。

【図2】図2：テネイシン-C (TN-C)、トロンボスポンジン-1,2 (TSP)、酸性でシステインリッチな分泌タンパク質 (SPARC)、マイトジェン誘導性遺伝子2 (Mig-2) およびインテグリン結合キナーゼ (ILK) の局在性を示す概略図を示す。注：ECM、細胞外マトリクス；および、インテグリン。

【図3】図3：閉鎖-ループかん流/器官培養システムの一つの概略図を示す。このループは、拍動性の圧力および流れ (A)、熱交換器 (D)、組織-ハウジングチャンバ (C)、近位圧力変換器 (B1) および遠位圧力変換器 (B2)、可変抵抗値 (E)、流量プローブ (F)

10

20

30

40

50

、回収容器 (G)、そして血管バイパス (H) を提供するBiomedicusの遠心ポンプから構成される。示してはいないが、構成成分には、外膜バスループ、He-Neレーザーマイクロメータ、およびデータ取得システムが含まれる。より詳細については、Labadie (1996) et al. (Labadie, R.F., J.F. Antaki, J.L. Williams, S. Katyal, J. Ligush, S.C. Watkins, S.M. Pham, and H.S. Borovetz, "Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue", American Journal of Physiology, 1996. 270(2 Pt 2): p. H760-8) を参照。

【図4】図4: ブタ内頸静脈セグメントの圧力vs. 直径反応。

【図5】図5: 一番上の3枚のパネルは、ベースライン対照 (BASE)、"静脈" 48時間かん流後の対照 (静脈)、そして"動脈" 48時間かん流後 (動脈) のブタ内頸静脈静脈セグメントの内腔の代表的な走査型電子顕微鏡画像を示す。無傷内皮細胞層の敷石像に注目してもらいたい。上から2列目のパネルは、代表的な微細構造および各群のH&E染色を介した生存核を示す (200×倍率)。上から3列目のパネルは、各組織群中における代表的な生存細胞 (元々は緑色) および死細胞 (元々は赤色) を示す (200×倍率)。BASE対照組織と比較した場合、かん流組織における壊死のレベルが増加することは見られないことに注目すべきである。最下段の3枚のパネルは、同一の48時間のかん流実験に由来する組織の代表的なTUNELアッセイ画像を示す (油浸の下で400×倍率)。BASEと比較して、かん流組織におけるアポトーシスのレベルが増加することは見られないことに注目すべきである。全てのパネルにおいて、矢印は血管内腔を示す。

【図6】図6: VEN vs. ARTのex vivoかん流実験を示す概略図である。

【図7】図7: ART vs. cARTのex vivoかん流実験を示す概略図である。

【図8】図8: ART vs. wARTのex vivoかん流実験を示す概略図である。

【図9】図9: 静脈/ラッピング複合体の横断断面を示す概略図である。

【図10】図10: 評価項目解析のためのかん流後静脈セグメントプロセッシングの概略図である。所定の長さは、負荷をかけていない血管静止長を示す。

【図11】図11: シャムPIJVとスピニングされたPIJVの両方についてのPIJVの正規化された外径反応を示す。スピニングされたPIJV (wART) とシャム対照PIJVは両方とも、120/80 mmHgの圧力および100 ml/分の平均流速のART条件の下、かん流された。スピニングされた静脈の正規化された径は (N=7)、シャム対照 (N=5) と比較して劇的に減少することに注目すべきである。圧力をかけた外径 (ODp) は、圧力をかけていない外径 (ODup) に対して正規化され、そしてデータを平均±平均の標準誤差として示す。

【図12】図12: 表1における各組合せのそれぞれについて、エレクトロスピニングされたポリマーでラッピングされたPIJVセグメントの24時間のex vivoかん流から得られたCWS vs. 時間の結果を示す。下側の点線の横ばい線は、静脈条件下でのラッピングされていない静脈において測定された平均CWSレベルを示し (CWS₀約25 KPa)、そして真ん中の点線の横ばい線は、冠状動脈での平均CWSを示す (約120 KPa) (Labadie RF, et al. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2): H760-8)。上側の点線は、ART条件下でラッピングされていない静脈において測定された平均CWSを示す (シャム対照)。この点に関して、ETはエレクトロスピニング時間を示す。全てのCWS値をCWS₀に対して正規化した。データは、平均±平均の標準誤差を示す。

【図13】図13: エピネフリン (EPI) およびニトロプルシド・ナトリウム (SNP) を使用して、スピニングされたPIJVセグメントおよびシャム対照PIJVセグメントの両方を刺激することにより得られた、代表的な血管運動性チャレンジの結果を示す。EPIで刺激した組織の自然な弛緩を観察した直後にSNPを投与した。すなわち、組織の自然な弛緩が (EPIによる刺激後) 観察された時点に依存して、シャムPIJVおよびスピニングしたPIJVについて異なるタイミングでSNPを投与した。実験の期間にわたっての各PIJVセグメントの外径測定値を、EPIの最初の投与を行う前に測定したベースラインの外径に対して正規化した。

【図14】図14: 血管運動性チャレンジ実験から得た結果を示す (N=4)。シャム対照PIJVおよびスピニングされたPIJVとの間の収縮または拡張のレベルには、有意な差は存在し

10

20

30

40

50

ない様である。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図15A】図15：シャムPIJV (A&C) およびスピニングされたPIJV (B&D) の両方について24時間のあいだコンプライアンス計算および剛性計算した結果をしめす。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図15B】図15：シャムPIJV (A&C) およびスピニングされたPIJV (B&D) の両方について24時間のあいだコンプライアンス計算および剛性計算した結果をしめす。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図15C】図15：シャムPIJV (A&C) およびスピニングされたPIJV (B&D) の両方について24時間のあいだコンプライアンス計算および剛性計算した結果をしめす。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図15D】図15：シャムPIJV (A&C) およびスピニングされたPIJV (B&D) の両方について24時間のあいだコンプライアンス計算および剛性計算した結果をしめす。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図16】図16：かん流前およびラッピング手順の後 (A, C) および24時間のex vivoかん流後 (B, D) の両方についての、H&E像 (A, B) およびMassonのトリクロム像 (C, D) を示す。かん流前のポリマーラッピングの均一な厚さ、そしてかん流後の画像におけるポリマーラッピングの欠如に注目すべきである。片側矢印は、血管内腔を示す。(A) および(C) における両側矢印は、ポリマーラッピングの厚さを示し、それは(B) または(D) においては検出できなかった。

【図17】図17：ピクロシリウスレッド (ピクロシリウス赤) で染色した静脈切片の代表的な複屈折像を示す (元々はカラー像)。実験条件は：20 mmHg圧力と20 ml/分の流速のVENOUS (VEN) 条件；120 / 80 mmHg圧力および100 ml/分の平均流速の拍動性動脈 (ART) の条件；およびラッピングされた静脈セグメントをART条件下で24時間ex vivoでかん流したラッピング動脈 (wART) 条件；として定義する。矢印は血管内腔を示す。

【図18】図18：静脈組織切片のMovatのペンタクロム染色を示す (元々はカラー像)。それぞれの像において、コラーゲンは黄色に染色され、エラスチンおよび核は黒色に染色され、そして筋肉は赤色に染色される。wART切片の外膜側における赤色染色は、培養液タンパク質の非特異的染色であり、ex vivoかん流実験のあいだにポリマー中に捕捉されることとなる。矢印は血管内腔を示す。

【図19】図19：(A) は、エレクトロスピンニングしたポリマーをその外膜表面に沈着させた、PIJVセグメントの低倍率のSEM像を示す。(B) は、ポリマーラッピングを適用した後のPIJVの外膜表面のSEM像を示す (500×倍率で撮影)。ポリマーラッピングの高い多孔性に注目すべきである。(C) は、ポリマーラッピングの静脈への接着を示す、SEM像である (500×倍率で撮影)。(D) は、SEM像を示し (静脈の内腔表面の500×倍率) そして無傷で維持された様に見える連続的内皮層を示す。

【図20】図20：エレクトロスピンニング後のPIJV、およびエレクトロスピンニング後の静的培養を18時間行った後および92時間行った後のもの、における壊死レベルを評価するための定量化Live/DeadTMの結果を示す。示されたデータは、1回の実験についてのものであり、そして誤差はPIJVセグメントあたり解析された10箇所視野からの結果をあらわす。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図21】図21：蛍光ベースのTUNEL解析からの代表的な免疫組織化学像を示す (元々はカラー像)。一番上の2つのパネルは、24時間のVEN (A) vs. ART (B) の実験に由来するものである。次の2つのパネルは24時間のART (C) vs. cART (D) の実験に由来するものである。3番目の列のパネルは72時間のART (E) vs. cART (F) の実験に由来するものである。一番下の2つのパネルは、24時間のART (G) vs. wART (H) の実験に由来するものである。矢印はアポトーシス細胞を示す。LはPIJV内腔を示す。

【図22】図22：ex vivo血管かん流実験の全てに由来するPIJV中のアポトーシス細胞の割合を評価するため、蛍光ベースのTUNEL解析に由来する定量化免疫組織化学の結果を示す。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図23】図23：HRP / ABCベースのPCNA解析に由来する代表的な免疫組織化学像を示す (

10

20

30

40

50

元々はカラー像)。一番上の2つのパネルは、24時間のVEN (A) vs. ART (B) の実験に由来するものである。次の2つのパネルは、24時間のART (C) vs. cART (D) の実験に由来するものである。3番目の列のパネルは、72時間のART (E) vs. cART (F) の実験に由来するものである。一番下の2枚のパネルは、24時間のART (G) vs. wART (H) の実験に由来するものである。矢印は、増殖中の細胞を示す。LはPIJV内腔を示す。

【図24】図24: ex vivo血管かん流実験の全てに由来するPIJV内における増殖中の細胞の割合を評価するための、HRP / ABCベースのPCNA発現解析に由来する定量化免疫組織化学の結果を示す。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図25】図25: HRP / ABCベースのゴルジ複合体解析に由来する代表的な免疫組織化学像を示す(元々はカラー像)。一番上の2枚のパネルは、24時間のVEN (A) vs. ART (B) の実験に由来するものである。次の2つのパネルは、24時間のART (C) vs. cART (D) の実験に由来するものである。3番目の列のパネルは、72時間のART (E) vs. cART (F) の実験に由来するものである。一番下の2枚のパネルは、24時間のART (G) vs. wART (H) の実験に由来するものである。矢印は、陽性に染色された細胞を示す。LはPIJV内腔を示す。

10

【図26】図26: ex vivo血管かん流実験全てに由来するPIJV中のゴルジ複合体に関して細胞染色陽性の割合を評価するため、HRP / ABCベースのゴルジ複合体発現解析に由来する定量化免疫組織化学の結果を示す。データは、平均±平均の標準誤差として示される。

【図27】図27: 左: エレクトロスピンングプロセス中のラッピングされたPIJVセグメント。中: ここで提案されている、頸動脈介在性移植片として移植されたラッピングされたPIJV。右: ラッピングされていないPIJV移植片。ラッピングされたPIJV (B) は、ラッピングされていない静脈 (C) と同様に、動脈圧の下では拡張しないことが示された。

20

【図28】図28: スピンングされたAVGおよびシャムAVGの両方ともからの蛍光透視鏡血管造影像を示す。

【図29】図29: IHの形態学的測定のために使用した代表的なMovatsペンタクローム染色像を示す(元々はカラー像)。中膜厚対内膜厚比を、上記の式を使用して計算した。

【図30】図30: IHの形態学的測定に由来する、定量化した結果の概要を示す。P < 0.05は、統計的に有意と考えられた。統計的有意性に対する傾向が観察されたことにのみ注目すべきである。

【図31】図31: AVGが閉塞されたin vivo実験に由来する、低倍率(30x)のSEM像を示す。AおよびBは、移植片が完全に開存された実験に由来した。CおよびDは、移植片が部分的にのみ閉塞された実験に由来する。これらの像は、静脈移植片と頸動脈との間の血管吻合接合部を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0035】

本明細書中において、典型的には(しかしこれらに限定されないが)自家移植術、同種異系移植術または異種移植術において、動脈性静脈移植片またはいずれかの管状組織を機械的に調整する方法を提供する。この目的のため、静脈、動脈、尿道、腸、気管、食道、尿管および卵管を含む(しかしこれらに限定されない)管状組織をラッピングする方法を提供する(移植片用の組織供給源のいずれの部分であっても良いことを意味し、全体の構造または実質的に全体の構造を使用することが一つの選択肢ではあるが、全体で述べられた解剖学的構造が移植片の目的のために使用されることを意味しない。したがって、管状組織が伏在静脈等の静脈であるという場合、このことは全体の伏在静脈を使用しなければならないことを意味しない。この構造は、管状組織の周囲を生体内分解性ポリマーの拘束性繊維マトリクスでラッピングする。本明細書中で記載されるように、“繊維”は、伸長された、細長い、伸長された、糸状のおよび/またはフィラメント状の構造のことを意味する。“マトリクス”は、構成要素の二次元配置または三次元配置(例えば、繊維)、規則正しい配置(例えば、織りメッシュまたは不織メッシュ)またはランダムな配置(典型的にはエレクトロスピンングにより作製される繊維マットの様なもの)のいずれかのことである。

40

50

【0036】

マトリクスは、典型的には、管状組織の周囲に実質的にまたは本質的に隣接しており、このことはマトリクスが表面上および部分の周囲に連続的で支持的なリングを形成するが、必ずしも管状組織の全体表面にわたっているわけではない（例えば、長さ）ことを意味する。マトリクスが“拘束性”であるということは、マトリクスが管状組織の外側表面と実質的に接触しており、そして移植された場合に管状組織の実質的な円周方向の展開を拘束し、妨害しおよび/または阻害することを意味する。マトリクスによる拘束の程度は、典型的には、典型的な動脈圧の下、管状組織がその組織に対して実質的に最大の膨張直径となるまで膨張しないようにする様な程度である（例えば、図4を参照）。マトリクスは、それが拘束性である限りは、伸縮性のものであってもよい。マトリクスが生体内分解性である場合、マトリクスの拘束性の性質は、マトリクスが破壊されるにつれて時間とともに減少する。

10

【0037】

非限定的な一態様において、マトリクスは、環状の解剖学的構造または器官などの管状組織上に、エレクトロスピニングにより沈着させる。非限定的な具体的な一態様において、解剖学的構造は、例えば、冠状動脈バイパス術などの動脈バイパス術において使用される、伏在静脈などの静脈である。

【0038】

細かい繊維を管状組織の表面上に沈着させるいずれの有用な方法であっても使用することができるが、エレクトロスピニングが、そのような表面上に実質的に均一に繊維を沈着させる有用な方法である。エレクトロスピニングにより、天然の細胞外マトリクス（ECM）のスケールおよび繊維性の性質に類似する足場の製作が可能になる。ECMは、繊維、微細孔、およびミクロン以下でナノメートルサイズスケールでのその他の表面の特徴から構成される。そのような特徴は、遊走および方向性などの合成材料との細胞相互作用に直接的に影響を与える。エレクトロスピニングによりまた、方向付けられた繊維の製作が可能になり、もともと異方性を有する足場を生じる。これらの整列された足場は、細胞成長、形態およびECM生成に影響を与える可能性がある。例えば、Xu et al.は、平滑筋細胞（SMC）のポリ（L-ラクチド-co-ε-カプロラクトン）繊維との整列を見出し（Xu C.Y., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S., “Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential for blood vessel engineering”, *Biomaterials* 2004 (25) 877-86.）、そしてLee et al.は機械的刺激に対して整列された非-生分解性ポリウレタンを開示し、そして整列された足場上で培養された細胞が、ランダムに配置された足場上での場合よりも多くのECMを産生することを見出した（Lee C.H., Shin H.J., Cho I.H., Kang Y.M., Kim I.A., Park K.D., Shin, J.W., “Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast”, *Biomaterials* 2005 (26) 1261-1270）。

20

30

【0039】

一般的に、エレクトロスピニングのプロセスには、針の先端またはピペットの先端などの小さな開口部と定量ポンプとを備えた容器中に、ポリマー-含有流動体（例えば、ポリマー溶液、ポリマー懸濁液、またはポリマー溶解液）を配置することが関連する。高電圧源の一つの電極もまた、ポリマー-含有流動体または開口部と電氣的に接触させる様に配置されるが、一方その他の電極は標的（典型的にはコレクタースクリーンまたは回転心棒）と電氣的に接触させるように配置される。エレクトロスピニングのあいだ、ポリマー-含有流動体は、高電圧を溶液または開口部に対して印加する（例えば、約3~15 kV）ことにより荷電され、そしてその後一定流量をもたらす定量ポンプにより強制的に小さな開口部を通す。開口部でのポリマー-含有流動体は通常、表面張力により半球状の形状を有する可能性があるが、一方高電圧の印加により、それがなければ半球状の形状をしていたポリマー-含有流動体が、開口部において、伸長してTaylorコーンとして知られる円錐形が形成される。十分な高電圧がポリマー-含有流動体および/または開口部に対して印加された場合、荷電されたポリマー-含有流動体の斥力静電力が表面張力を克服し、そして流

40

50

動体の荷電された噴出がTaylorコーンの先端から射出され、そして標的に向けて加速され、それに典型的には-2~-10 kVのあいだのバイアスをかける。場合によっては、印加されたバイアス（例えば、1~10 kV）とともに合焦リングを使用して、ポリマー-含有流動体の荷電された噴出の軌道を方向付けることができる。流動体の荷電された噴出がバイアスをかけられた標的に対して移動するため、それは複雑なしなるような動きと曲げる動きとを受ける。流動体がポリマー溶液または懸濁液である場合、溶媒は典型的に、飛行途中に蒸発し、バイアスをかけられた標的上にポリマー線維が残される。流動体がポリマー溶液である場合、融解されたポリマーは飛行途中に冷却されそして凝固し、そしてバイアスをかけられた標的上でポリマー線維として回収される。ポリマー線維はバイアスをかけられた標的上に蓄積するため、不織の多孔性メッシュ（マトリクス）がバイアスをかけられた標的上に形成される。

10

【0040】

エレクトロスピニングしたエラストマーマトリクスの特性は、エレクトロスピニング条件を変更することにより、調整することができる。例えば、バイアスをかけられた標的が開口部に対して相対的に近い場合、得られたエレクトロスピニングしたメッシュは、不均一な厚さの線維を含有する傾向があり、それにより線維のある領域は“ビーズ-様”の外観を有する。しかしながら、バイアスをかけられた標的が開口部からさらに遠くへ移動されるにつれて、不織メッシュの線維がより均一な厚さになる傾向がある。さらに、バイアスをかけられた標的を開口部に対して移動させることができる。特定の態様において、バイアスをかけられた標的を定期的周期的に前後に動かし、それにより不織メッシュの線維を実質的に互いに平行にする。この様な場合、線維に垂直な方向である場合と比較して、得られた不織メッシュは、線維と平行な方向では、緊張に対してより高い抵抗性を有することができる。別の態様において、バイアスをかけられた標的を開口部に対してランダムに移動させて、それにより不織メッシュの面での緊張に対する抵抗性を等方性にする。標的はまた回転心棒であってもよい。この場合、不織メッシュの特性は、回転速度を変化させることにより変化させることができる。エレクトロスピニングしたエラストマーの足場の特性はエレクトロスピニングシステムに印加する電圧の大きさを変化させることにより変化させることもできる。特に好ましい態様において、エレクトロスピニング装置には、12 kVにまでバイアスのかけた開口部、-7 kVにまでバイアスのかけた標的、そして3 kVにまでバイアスのかけた合焦リングが含まれる。さらに、有用な開口部直径は0.047”（I.D.）であり、そして有用な標的直径は約23 cmである。ポリマー懸濁液または溶液に対して印加すべき高電圧の有用な範囲は、0.5~30 kVであり、より好ましくは5~25 kVであり、さらにより好ましくは10~15 kVである。

20

30

【0041】

エレクトロスピニングを、2またはそれ以上のノズルを使用して行うことができ、ここでそれぞれのノズルは異なるポリマー溶液の供給源である。生じる不織ポリマーメッシュの物理学的特性および化学的特性を調整するため、これらのノズルには、異なるバイアスまたは同一のバイアスを用いてバイアスをかけることができる。さらに、多数の異なる標的を使用することができる。平坦で、プレート状の標的に加えて、円筒（心棒）を標的として使用することができる。

40

【0042】

エレクトロスピニングをポリマー懸濁液を使用して行う場合、懸濁液中のポリマー構成成分の濃度を変化させて、エラストマー性の足場の物理学的特性を修飾することができる。例えば、ポリマー構成成分が相対的に低い濃度で存在する場合、エレクトロスピニングした不織メッシュの生じる線維は、ポリマー構成成分が相対的に高い濃度で存在する場合よりも、小さな直径を有する。この理論により限定されることを意図することなく、より低い濃度の溶液はより低い粘性を有し、それにより開口部を通じてより早い流速を引き起こし、より薄い線維を生成すると考えられる。当業者は、ポリマー濃度を調整して、所望の特徴を有する線維を得ることができる。ポリマー構成成分のための濃度の有用な範囲には、約1%wt.~約15%wt.、約4%wt.~約10%wt.、そして約6%wt.~約8%wt.が含まれる

50

【0043】

使用する際、円筒は管状組織（例えば、静脈）の内部に配置され、そしてポリマー繊維を円筒を回転させることにより、その組織の少なくとも一部分の周囲に沈着させる。円筒をスピナレットとコレクターとの間で縦方向に往復運動して、管状組織の覆いを増加させることができる。

【0044】

マトリクスの厚さは、沈着させるポリマー組成物の粘性を調整しおよび/またはエレクトロスピンニングの期間を調整するかのいずれかにより調節することができる。より粘性のポリマー組成物を使用すると、より厚い繊維を形成することができ、それにより所望の厚さのマトリクスを沈着させるために必要な時間をより少なくする。より低い粘性のポリマー組成物を使用すると、より薄い繊維を形成することができ、それにより所望の厚さのマトリクスを沈着させるために沈着の増加が必要である。マトリクス内部でのマトリクスと繊維の厚さは、マトリクスの生体内分解の速度に影響を与える。マトリクスの末端での使用法に依存してこれらのパラメータを最適化し、所望の生理学的作用または最適な生理学的作用を得られる。

【0045】

ポリマーマトリクスの生分解速度を操作し、最適化し、またはそうでなければ調整することができ、それによりマトリクスが有用な時間をかけて分解する。例えば、冠状動脈バイパスの場合、移植片に対する実質的に急激な応力を阻害するため、マトリクスは12時間またはそれ以上をかけて溶解することが好ましい。ポリマーを所望の期間かけて分解し、それによりポリマーマトリクスにより提案された機構的支持体は、その期間ををかけて徐々に減少し、そして静脈を、徐々に増加させるレベルのCWSに対して曝露する。

【0046】

この新しいアプローチは、2つの潜在的な用途を有する可能性がある。第1の非限定的な用途において、マトリクスを、AVGとして使用することを意図していた、静脈セグメントの修飾用の外科周辺ツールとして使用することができる。静脈またはその他の管状組織または解剖学的構造の修飾は、ベッドサイドで行うことができ、身体から取り出した直後そして移植直前に、例えば（限定的ではないが）、動脈バイパス外科手術のあいだに、急いで行うことができる。一つの限定的ではない例において、伏在静脈を採取した後、そして外科医が外科的（移植片）部位を開いているあいだ、ポリマーラッピングを静脈上にエレクトロスピンニングして、直後にバイパス術のために使用される。

【0047】

第2の非限定的な態様において、ポリマーマトリクスを、支持体をAVGにまで送達するためのピヒクルとして使用することができる。静脈移植片の機構的環境の時間をかけた修飾は、それ自体AVG開存性を改善することができる一方、活性薬剤およびAVGに対する生物学的（細胞的）支持体の送達は、多くの事例において好ましいことを証明することができる。活性薬剤および/または生物学的製剤が取り込まれる、エレクトロスピンニングしたポリマーラッピングを調整して、所望の速度で分解することにより、これらの支持体様式の送達速度を変更することができる。

【0048】

支持体をAVGへと送達するためのラッピングの血管周囲配置のための以前のアプローチは、臨床解釈のための律速的なバリアを有し、そしてエレクトロスピンニングした生分解性ポリマーを使用した本明細書にて提示したアプローチは、これらの限定に対処する。

【0049】

静脈移植片の周囲に外部鞘を使用することは、Parsonnet et al.らにより初めて記述された。彼らは、鞘が拡張を防止したこと、それが宿主組織により良好に許容されたこと、そして支持あり血管と支持なし血管との間には、引っ張り強度の差異は存在しなかったことを示した（Parsonnet V, Lari AA, and Shah IH. New stent for support of veins in arterial grafts. Arch Surg. 1963;87: 696-702）。Karayannacos et al.は、支持体な

10

20

30

40

50

し対照移植片と比較して、Dacronメッシュ鞘のゆるめのフィッティングおよびきつめのフィッティングの両方を用いて、AVGにおける血栓形成および内皮下増殖の減少を示した (Karayannacos PE, Hostetler JR, Bond MG, Kakos GS, Williams RA, Kilman JW, and Vasko JS. Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. *Ann Surg.* 1978;187(2): 183-8)。Mehta et al.は、外部の、マクロ多孔性で、限定的ではない、ポリエステルステントを配置することにより、ブタ静脈移植片における新生血管内膜形成を低下させることを示した (Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Izzat MB, Southgate KM, Bryan AJ, Newby AC, and Angelini GD. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenousbypass grafting. *Nat Med.* 1998;4(2): 235-9)。より最近では、ポリテトラフルオロエチレン鞘を使用して、AVGが動脈圧の下で拡張することを永久的に制限しそしてこれによりブタモデルにおけるIH形成の低下を引き起こした (Liu SQ, Moore MM, Glucksberg MR, Mockros LF, Grotberg JB, and Mok AP. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. *J Biomech.* 1999;32(11): 1165-75)。

【 0 0 5 0 】

AVGへの永久的な機械的支持体の臨床解釈は、これまで報告されておらず、これはほとんどの場合、血管適用した際の生物耐久性合成材料に対する好ましくない免疫応答のためと考えられる (Bunt TJ. Synthetic vascular graft infections. I. Graft infections. *Surgery.* 1983;93(6): 733-46 ;そしてEdwards WH, Jr., Martin RS, 3rd, Jenkins JM, Edwards WH, Sr., and Mulherin JL, Jr. Primary graft infections. *J Vasc Surg.* 1987;6(3): 235-9)。この限定により、Vijayan et al.およびJeremy et al.は動機付けを得て、ポリグラクチンに基づく生分解性鞘を使用して、AVGにおけるIHを減少させた (Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, Vijayan V, Shukla N, Smith FC, and Angelini GD. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6): 1766-72 ;Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9 ;そしてVijayan V, Smith FC, Angelini GD, Bulbulia RA, and Jeremy JY. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(1): 13-22)。含まれる顕著な有益な効果は、ラッピングされていない対照に対する新生栄養血管の発生を亢進した (Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9)。しかしながら、これらの生分解性鞘は、ゆったりしたものであり、そしてAVGを動脈圧のもとでそれらの最大直径にまで伸長させることができ、そして従ってCWSのレベルの増加に対する構造的なサポートをもたらさなかった。Vijayan et al. (Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9 ;そしてVijayan V, Smith FC, Angelini GD, Bulbulia RA, and Jeremy JY. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(1): 13-22) およびJeremy et al. (Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, Vijayan V, Shukla N, Smith FC, and Angelini GD. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6): 1766-72) により使用されたアプローチよりも前には、Huynh et al.が一次的な外部コラーゲンチ

10

20

30

40

50

ューブサポートを使用して、ウサギ静脈移植片におけるIH形成を減少させた。これらのコラーゲンチューブは非-拘束性でもあり、そして分解速度についての言及は全く報告されなかった (Huynh TT, Iaccarino G, Davies MG, Safi HJ, Koch WJ, and Hagen PO. External support modulates g protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts. *Surgery*. 1999;126(2): 127-34)。エレクトロスピンニングした架橋コラーゲンが水溶液中で非常に急速に分解されることが報告され (Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, Roh S, Cho JJ, Park WH, and Min BM. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*. 2006;27(8): 1452-61) そして従ってコラーゲンのみから構成される鞘によりAVGに対して提示された構造的なサポートは、非常に一次的で長期的には効果的ではない可能性がある。Liao et al.により開発された外部AVG鞘は、時間をかけて徐々にCWSをAVGへと移動させるため、所望の速度で分解するように設計された。ポリ(乳酸-co-グリコール酸)シートを、テフロン(登録商標)をロッドの周囲にラッピングすることにより、チューブ中に事前に形成したことから、従ってそれぞれのAVGごとにカスタマイズすることができない (Liao SW, Lu X, Putnam AJ, and Kassab GS. A novel time-varying poly lactic-co glycolic acid external sheath for vein grafts designed under physiological loading. *Tissue Eng*. 2007;13(12): 2855-62)。すなわち、以前のアプローチと同様に、Liao et al.のアプローチは、いずれかの機構的サポートを送達する前に、動脈圧の下でAVGの発現を可能にする。ここで記載されるような中間-AVG-壁中ではなく、鞘における分解速度および結果としてのCWS vs. 時間プロファイルが報告された。本発明者らのアプローチは、上述した以前の業績と関連する、特に生物耐久性および/または非-拘束性外部鞘に関する、2種類の主要な限定に対するものである。

【 0 0 5 1 】

機構的サポートのAVGへの送達は、外膜ラッピングについてのわずか一つの可能性に過ぎない。その他の用途は、生化学物質、薬剤、遺伝子、または細胞の局所送達のためのビヒクルとしてのものであってもよい。Kanjickal et al.は、シクロスポリンのAVGへの持続性局所送達のためにポリ(エチレングリコール)ヒドロゲルを使用した。そして吻合部IH発症をうまく減少させた (Kanjickal D, Lopina S, Evancho-Chapman MM, Schmidt S, Donovan D, and Springhetti S. Polymeric sustained local drug delivery system for the prevention of vascular intimal hyperplasia. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(3): 489-95)。別の研究においては、Cagiannos et al.はポリテトラフルオロエチレン鞘を使用して、ラパマイシン(シロリムス)をAVGへと局所的に送達し、そしてブタモデルにおいて吻合部IHを効果的に減少させた (Cagiannos C, Abul-Khoudoud OR, DeRijk W, Shell Dht, Jennings LK, Tolley EA, Handorf CR, and Fabian TC. Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model. *J Vasc Surg*. 2005;42(5): 980-8)。より最近には、Kohler et al.は、生分解性メッシュを使用して、パクリタキセルを送達し、透析アクセスヒツジモデルにおける移植片-静脈吻合部でのIHを効果的に減少させた (Kohler TR, Toleikis PM, Gravett DM, and Avelar RL. Inhibition of neointimal hyperplasia in a sheep model of dialysis access failure with the bioabsorbable vascular wrap paclitaxel-eluting mesh. *J Vasc Surg*. 2007;45(5): 1029-1037; discussion 1037-8)。そのような活性は、理論的にはエレクトロスピンニングしたポリマーラッピング技術を使用して取り込むことができ、エレクトロスピンニングしたポリマーラッピングの分解速度を調節することにより、ある程度は送達速度を調節する可能性がある。

【 0 0 5 2 】

我々の知る限り、生分解性AVGラッピング/鞘を介して細胞を送達することは、以前には報告されておらず、そして従って外膜ラッピングのこの可能性のある将来的な用途は新規であろう。本発明において使用されたポリマーは、特定されており (Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-m

10

20

30

40

50

icron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4): 603-14)、そして生きたSMCとともにうまくマイクロ集積化され(Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, and Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. Biomaterials. 2006;27(5): 735-44)、そしてこのこと自体に対して可能性のある将来的な用途をもたらす可能性がある。

【0053】

生分解性ポリマーは、ポリマーおよびその分解産物が実質的に非-毒性である点(非-発ガン性である点や非-免疫原性である点を含め)で、そして実質的な毒性作用を伴わずに、生物(患者)等の生物学的システムにおいて排除されるかまたは分解される点で、“生体適合性”である。生物学的システム中での分解機構の限定的ではない例には、化学反応、加水分解反応、および酵素切断が含まれる。生分解性ポリマーには、天然ポリマー、合成ポリマー、そして天然ポリマーと合成ポリマーとの混合物が含まれる。例えば(限定的ではないが)、天然ポリマーには、キトサン、コラーゲン、エラスチン、アルギネート、セルロース、ポリアルカノエート、ヒアルロン酸、またはゼラチンが含まれる。天然ポリマーは、天然の供給源から得ることができ、または本願明細書中で記載される技術の文脈においてそれらを使用する際、(組換え法による場合を含め)合成法により調製することができる。合成ポリマーの限定的ではない例には：ホモポリマー、ヘテロポリマー、コポリマー、ブロックポリマーまたはブロックコポリマーが含まれる。

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語“ポリマー組成物”は、1またはそれ以上のポリマーを含む組成物である。クラスとして、“ポリマー”には、ホモポリマー、ヘテロポリマー、コポリマー、ブロックポリマー、ブロックコポリマーが含まれ、そして天然のものであっても合成のものであってもよい。ホモポリマーは、1種類の基礎的要素、またはモノマーを含有するものであり、一方、コポリマーは、1種類以上のモノマーを含有する。例えば(限定的ではないが)、ポリラクチド、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ポリ(L-ラクチド-co-カプロラクトン)、ポリグリコール酸、ポリ(dl-ラクチド-co-グリコリド)、ポリ(l-ラクチド-co-dl-ラクチド)を含む、 α -ヒドロキシ酸から由来するモノマーを含むポリマー；ポリヒドロキシブチレート、ポリヒドロキシバレレート、ポリジオキサノンおよびポリガラクトンを含むエステルに由来するモノマー；ポリカプロラクトンを含むラクトン類に由来するモノマー；ポリカーボネート、ポリグリコネート、ポリ(グリコリド-co-トリメチレンカーボネート)、ポリ(グリコリド-co-トリメチレンカーボネート-co-ジオキサノン)を含むカーボネート由来のモノマー；ポリウレタン、ポリ(エステルウレタン)尿素エラストマーを含む、ウレタン結合を介して結合されるモノマー、が含まれる。

【0055】

非限定的な態様に従って、ポリマー組成物は、コラーゲンおよびエラスチンの一方または両方を含む。コラーゲンは、一般的なECM構成成分であり、そして典型的には多数の合成生体内分解性(bioerodable)ポリマーよりも速い速度でin vivoで分解される。従って、ポリマー組成物中のコラーゲン含量の操作を、in vivoでの生体分解速度を修飾する方法として使用することができる。コラーゲンは、約40%wt.~約75%、約75%wt.および約42.3%wt.を含む全ての範囲そしてその間に含まれる全ての点を含めて、約2%wt.~約95%wt.を含む(限定的ではないが)いずれかの有用な範囲で、しかしより一般的には約25%wt.~約75%wt.の範囲で、ポリマー組成物中に存在することができる。弾力性の増加をもたらすために、エラスチンをポリマー組成物中に取り込むことができる。エラスチンを使用することにより、静脈等の管状組織を補助するため、動脈使用などの新たな機能に適合させるため、拘束性マトリクスのわずかながら円周方向への伸長を可能にすることができる。エラスチンは、約40%wt.~約42.3%wt.を含む全ての範囲そしてその間に含まれる全ての点を含めて、全ての整数およびそのあいだに含まれる全ての点およびそれらの均等値を含めて、約2%wt.~約50%wt.を含む(限定的ではないが)、いずれかの有用な範囲でポリマー組成物中に存在することができる。非限定的な一態様において、コラーゲンお

よびエラスチンは、ポリマー組成物中にてほぼ等量で存在し、別の態様において、ポリマー組成物中のコラーゲンおよびエラスチン含量の合計は、約2%wt. ~ 約95%wt. を含む（限定的ではないが）、いずれかの有用な範囲であり、しかしより典型的には約40%wt. ~ 約75%を含み、約75%wt. および約42.3%wt. を含む全ての範囲そしてその間に含まれる全ての点を含めて、約25%wt. ~ 約75%wt. の範囲である。

【0056】

本明細書中で言及される全ての範囲または数値は、用語“約”が前についていてもいなくても、そう書かない限りは、測定の正確性および機能的に均等な範囲の変動を説明するため、用語“約”が前についているものとみなされる。例えば、コラーゲンは、ポリマー組成物中10%wt. で存在するものとして述べるができるが、しかし、測定変動のため、10%wt. \pm 0.05%wt.、0.10%wt. または1.0%wt. で事実上存在する可能性があり、そしてそのような重量%では同様に機能するはずである。

10

【0057】

本明細書中で使用する場合、用語“含む”およびその変形は、末端が限定されていないことを意味する。単数形の用語は、1またはそれ以上を意味するものとして意図される。

【0058】

本明細書中で使用する場合、用語“患者”または“被検体”は、ヒトを含む（しかしこれには限定されない）動物界の構成メンバーを意味する。

【0059】

モノマーがポリマー中に取り込まれる場合に、ポリマーは、上述したモノマーを“含む”または上述したモノマーに“由来する”。従って、ポリマーが含む取り込まれたモノマーは、どう少なく見積もっても、特定の末端基がポリマー骨格中に取り込まれている点で、ポリマー中に取り込まれる前のモノマーとは同一ではない。ポリマーは、特定の結合型がポリマー中に存在する場合、その結合を含むと言われる。

20

【0060】

本明細書中で記載される生分解性ポリマーは、生体内分解性であると言われる。“生体内分解性”により、ポリマーが、いったん移植されそして生体流動体および組織と接触する場所に設置されると、生体流動体および/または組織との化学反応を通じて、典型的にそしてしばしば好ましくは数時間、数日、数週間、または数ヶ月の期間をかけて、部分的にまたは完全に分解されることを意味する。そのような化学反応の限定的ではない例には、酸/塩基反応、加水分解反応、および酵素切断が含まれる。特定の態様において、ポリマーは、不安定な化学的部分を含有し、この例には、エステル、無水物、ポリ無水物、またはアミドが含まれる。あるいは、ポリマーは、いったん *in situ* に設置されると化学反応を受けやすい基礎的要素として、ペプチドまたは生体高分子を含有していてもよい。例えば、ポリマーは、ポリマーに対する酵素不安定性をもたらす、ペプチド配列アラニン-アラニン-リジン含有していてもよい。別の態様において、ポリマーには、基礎的要素として、コラーゲンなどの細胞外マトリクスタンパク質が含まれていてもよい。

30

【0061】

1または複数のポリマーは、典型的には、*in situ* で時間とともに分解し、組織の機械的条件付けを最適化する様に選択することができる。有用な *in situ* 分解速度の限定的ではない例には、12時間 ~ 2週間の時間が含まれ、そしてその間の1、2、3、6、12、24および/または48時間が含まれる。

40

【0062】

本明細書中で有用な生分解性ポリマーは、エラストマー性であってもよい。一般的に、置換されるかまたは修復される軟部組織の特性と類似する特性を有するいずれかのエラストマー性ポリマーが適切である。例えば、特定の態様において、ラッピングを形成するために使用されるポリマーは、非常に膨張性である。適切なポリマーの限定的ではない例には、100% ~ 1700%の破断歪み、より好ましくは200% ~ 800%の破断歪み、そしてさらにより好ましくは325% ~ 600%破断歪みを有するポリマーが含まれる。特に好ましい態様において、ポリマーの破断歪みは、5% ~ 50%であり、10% ~ 40%であり、そしてさらによ

50

り好ましくは20%～30%である。さらに、10 kPa～30 MPaの引っ張り強度、より好ましくは5～25 MPaの引っ張り強度、そしてさらにより好ましくは8～20 MPaの引っ張り強度を有するポリマーを選択することがしばしば有用である。特定の態様において、初期モジュールは、10 kPa～100 MPaであり、より好ましくは10～90 MPaであり、そしてさらにより好ましくは20～70 MPaである。

【0063】

特定の態様において、本明細書中で使用されたポリマーもまた、患者の体内で分解された場合に、治療剤を放出する。例えば、ポリマーの個々の基礎的要素を、基礎的要素それ自体が分解プロセスを通じてin situで放出された場合に治療的有効性をもたらすように、選択することができる。特に好ましい一態様において、ポリマー基礎的要素の一つはブ

10

【0064】

一態様において、繊維は、生分解性ポリ(エステルウレタン)尿素エラストマー(PEUU)を含む。そのようなPEUUの例は、ポリカプロラクトンジオール(MW 2000)および1,4-ジイソシアナートブタンと、鎖延長剤としてのブトレッシンなどのジアミンとから構成されるエラストマー性ポリマーである。適切なPEUUポリマーは、ポリカプロラクトンジオール(MW 2000)、1,4-ジイソシアナートブタン、およびブトレッシンを2:1:1モル比で混合することにより、2-工程重合化プロセスにより作成することができる。最初の重合化工程において、DMSO中1,4-ジイソシアナートブタンの15 wt.%溶液をDMSO中ジオールの25 wt.%溶液とともに連続的に攪拌する。2番目の工程において、ジ(2-エチルヘキサン酸)スズ(II)(stannous octoate)を添加し、そして混合物をトリエチルアミンを添加して溶解を補助しながら、75 °Cにて3時間反応させた。エラストマー性ポリマーは、ポリ(エーテルエステルウレタン)尿素エラストマー(PEEUU)であってもよい。例えば、PEEUUは、ポリカプロラクトン-b-ポリエチレングリコール-b-ポリカプロラクトントリブロックコポリマーを1,4-ジイソシアナートブタンとブトレッシンと反応させることにより作製することができる。好ましい態様において、PEEUUを、1,4-ジイソシアナートブタン:トリブロックコポリマー:ブトレッシンの2:1:1反応物化学量論を使用して、2-段階反応により得る。最初の重合化工程において、DMSO中1,4-ジイソシアナートブタンの15 wt.%溶液をDMSO中トリブロックコポリマー(triblock copolymer)ジオールの25 wt.%溶液ととも

20

30

【0065】

別の態様において、少なくとも1つの治療剤を、生体内分解性繊維に対して添加する。有用な治療剤には、患者に対して治療的有効性をもたらすことができる生体内分解性繊維の上にコートし、接着し、吸収し、吸着し、包埋し、またはそれと関連することができる、いずれかの物質が含まれる。ポリマーをプロセッシングしながら、治療剤をポリマーとブレンドすることができる。例えば、治療剤を溶媒(例えば、DMSO)中に溶解することができ、そしてプロセッシングのあいだポリマーブレンドに対して添加することができる。別の態様において、治療剤をキャリアポリマー(例えば(限定的ではないが)、ポリエチレングリコールヒドロゲルまたはポリ乳酸-グリコール酸微小粒子)と混合し、それを引き続いてエラストマー性ポリマーとともにプロセッシングする。治療剤をキャリアポリマーまたはエラストマー性ポリマーそれ自体とブレンドすることにより、治療剤の放出速度をポリマー分解速度により調節することができる。一態様において、活性薬剤または細胞を含む生体内分解性ヒドロゲルを、管状組織の表面に適用した後、生体内分解性繊維に対して適用する。

40

【0066】

50

本明細書中で使用する場合、“生分解性”、“生体吸収性”および“生体内分解性”は同義語である。同様に、記述し“環状”は一定の直径および環状の切断面を有する、幾何学的に完全な管のことを具体的に言うわけではない。それには、非-環状の切断面や変化のある切断面を有する組織も含まれ、そして様々な直径を有していてもよく、従って管腔（すなわち、それらは中空）を囲む隣接した壁を有し、液体、固体または期待が一方の開口部から他方の開口部に通ることができる管腔中における2つの開口部を有するいずれかの形状を有することができる。本明細書中で示されるように、特定の限定的ではないが、管状組織の例示的な例には、動脈組織、尿道組織、腸管組織、食堂組織、尿管組織、気管組織、気管支組織、そして卵管組織が含まれる。

【0067】

さらに、生体内分解性繊維に取り込むことができるその他の活性薬剤には、抗炎症剤、例えば、（限定的ではないが）、サリチル酸、インドメタシン、インドメタシンナトリウム三水和物、サリチルアミド、ナプロキセン、コルヒチン、フェノプロフェン、スリダク、ジフルニサル、ジクロフェナク、インドプロフェンナトリウムサリチルアミド、抗炎症性サイトカイン、および抗炎症性タンパク質などのNSAID（非ステロイド性抗炎症性薬）またはステロイド性抗炎症剤；抗体；ヘパリン、Pebac、エノキサパリン（enoxaparin）、アスピリン、ヒルジン、ブラビックス、ビパリルジン、プラスグレル、イドラパリナックス、ワーファリン、クーマディン、クロピドグレル、PPACK、GGACK、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、およびストレプトキナーゼなどの抗凝固因子；成長因子；が含まれる（しかしながら、これらには限定されない）。その他の活性薬剤には：（1）免疫抑制剤；ヒドロコルチゾン、ベタメタゾン（betamethisone）、デキサメタゾン、フルメタゾン、イソフルプレドン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、およびトリアムシノロンアセトニドなどのグルココルチコイド；（2）フルオロウラシル、パクリタキセル、ドキシソルピシン、シスプラチン、メトトレキセート、シクロホスファミド、エトポシド、ペガブタニブ、ルーセンティス、トリプトファン-tRNA合成酵素、リタアン（retaane）、CA4P、AdPEDF、VEGF-TRAP-EYE、AG-103958、アバスチン、JSM 6427、TG100801、ATG3、OT-551、エンドスタチン、サリドマイド、ベバシズマブ（becacizumab）、ネオバスタットなどの血管新生阻害剤；（3）シロリムス、パクリタキセル、ペリリルアルコール、ファルネシル基転移酵素阻害薬、FPTIII、L744、抗増殖性因子、Van 10/4、ドキシソルピシン、5-FU、ダウノマイシン、マイトマイシン、デキサメタゾン、アザチオプリン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メトトレキセート、モフェチル、血管作動性腸管ポリペプチド、およびPACAPなどの抗増殖剤；（4）抗体；シクロスポリン、ゾタロリムス、エベロリムス、タクロリムスおよびシロリムス（rapamycin）、インターフェロン、TNF結合タンパク質などのイムノフィリンに作用する薬剤；（5）パクリタキセルおよびドセタキセルなどのタキサン；アトルバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチンおよびロスバスタチン（rosuvastatin）などのスタチン；（6）Angeli塩、L-アルギニン、遊離塩基、ジエチルアミンNONOate、ジエチルアミンNONOate/AM、Glyco-SNAP-1、Glyco-SNAP-2、（±）-S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、S-ニトロソグルタチオン、NOC-5、NOC-7、NOC-9、NOC-12、NOC-18、NOR-1、NOR-3、SIN-1、塩酸塩、ニトロプルシド・ナトリウム、二水和物、スベルミンNONOate、ストレプトゾトシンなど（限定的ではないが）の一酸化窒素ドナーまたは前駆体；そして（7）アシクロビル、オフロキサシン（afloxacin）、アンピシリン、アンフォテリシンB、アトバクオン、アジスロマイシン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、ダブソン、ジクラズリル（diclazaril）、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エタンブトール、フルコナゾール、フルオロキノロン、フォスカネット、ガンシクロビル、ゲンタマイシン、イトラコナゾール（iatroconazole）、イソニアジド、ケトコナゾール、レボフロキサシン、リンコマイシン、ミコナゾール、ネオマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、パロモマイシン、ペニシリン、ペンタミジン、ポリミキシンB、ピラジンアミド、ピリメタミン、リファブチン、リファンピン、スパルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルファジアジン、テトラサイクリン、トブラマイシン

10

20

30

40

50

、トリフルオロウリジン、硫酸トリメトプリム、Zn-ピリチオン、および塩化物、臭化物、ヨウ化物および過ヨウ素物などの銀塩などの抗生物質（しかしこれらに限定されない）；が含まれる（しかしながら、これらには限定されない）。

【0068】

細胞を、様々な方法を使用して、反応性の生体内分解性マトリクス中に微小組込み（microintegrated）することができる。例えば、マトリクスを、目的とする細胞のための適切な増殖培地中に浸漬することができ、そしてその後直接的に細胞に対して曝露する。この細胞を、表面上で、そしてマトリクスの中で増殖させることができる。次いで、マトリクス増殖培地から取り出し、必要であれば洗浄し、そして移植する。しかし、エレクトロスピンした不織布は総体的に小さな孔をしばしば有するため（例えば、塩分溶脱または温度誘導性相分離などのその他の方法により作製された不織布の孔サイズと比較して）、エラストマー性足場の表面のごく近くに細胞の微小組込みが望まれる場合、足場の表面上で細胞を培養することが、通常使用される。

【0069】

別の態様において、目的とする細胞を、適切な溶液（例えば、増殖培地またはバッファー）中に溶解し、そして次いで、マトリクスをエレクトロスピンにより形成させつつ、反応性の生体内分解性マトリクス上にスプレーする。非常に細胞が多い組織工学的構造物が所望される場合に、この方法は、特に適切である。一態様において、加圧スプレー（すなわち、加圧下でノズルから細胞をスプレーする）を使用して、細胞を沈着させる。別の方法では、細胞を、エレクトロスピンした不織メッシュ上にエレクトロスプレーする。本明細書中で記載するように、エレクトロスプレーには、適切な粘性および濃度を有する細胞-含有溶液を、細胞を含有する溶液の小さな荷電液滴のスプレーを作製するために十分な電場にかけることが関連する。一つの実験において（示さず）、異なる条件下でまかれた平滑筋細胞（SMC）について、細胞生存率を調べた。これらの異なる条件には、スプレーのみ、-15 kVに荷電した標的上へのスプレー、-15 kVに荷電した標的上へのPEUUエレクトロスピンによるスプレー、-15 kVで荷電した標的上への10 kVでのエレクトロスプレー、そして-15 kVに荷電した標的上へのPEUUエレクトロスピンによる10 kVでのエレクトロスプレー、が含まれる。SMC生存率の顕著な減少は、ノズルを通して細胞をスプレーする結果であった。理論により束縛されることを希望することなく、加圧スプレーの物理的力を細胞のプロセッシング溶媒への曝露と組み合わせることで、生存率は、スプレーのみでもそしてエレクトロスピンしたPEUU（e-PEUU）構成のあいだにスプレーすることによっても同程度（ましてやより多ければより）でともに失われたことから、この結果を引き出すことができたと考えられる。細胞エアロゾルスプレー由来の生存率の低下は、その他の研究グループにより報告されており、そしてノズル直径、スプレー圧力、そして溶液粘性に多くは依存することが見いだされた（Veazey W.S., Anusavice K. J., Moore K., "Mammalian cell delivery via aerosol deposition", J. Biomed. Mater. Res. 2005 (72B)334-8.）。従って、細胞をゼラチンを添加した培地からスプレーして、粘性を増加させ、そして機械的応力および化学的応力から細胞を守る補助した。生存率を回収し、しかし、繊維ネットワーク中でのゲル化のために、PEUUマトリクスの機械的完全性を破壊されなかった。

【0070】

加圧スプレー、細胞のエレクトロスプレーは、細胞の生存率または増殖に顕著な作用を有さなかった。細胞が、高電圧電場に対する曝露を生き延びることができるように、このことは、他者による報告と一貫している（例えば、Nedovic V.A., Obradovic B., Poncellet D., Goosen M.F.A., Leskosek-Cukalovic O., Bugarski B., "Cell immobilization by electrostatic droplet generation", Landbauforsch Volk 2002, (241) 11-17; Temple M.D., Bashari E., Lu J., Zong W.X., Thompson C.B., Pinto N.J., Monohar S.K., King R.C.Y., MacDiarmid A.G., "Electrostatic transportation of living cells through air", Abstracts of Papers, 223 ACS National Meeting, Orlando, FL, April 7-11, 2002を参照）。PEUUエレクトロスピン存在下であっても、SMC生存率は低下し

10

20

30

40

50

なかった。これはおそらく、正に荷電したエレクトロスピニング流およびエレクトロスプレー流が、互いに排斥しそして沈着に先だって細胞を溶媒に曝露することを回避させたためであろう。同様に、エレクトロスピニング距離が23 cmと総体的に大きいため、PEUU繊維は、沈着する時間までに溶媒が存在しない様であった。ゼラチンを添加した培地からのエレクトロスプレーは、ゼラチンを含まない培地からのエレクトロスプレーと比較して、結果的に生細胞の数が多かった。しかしながら、ゼラチンを使用すると、構造物の機械的特性の低下を引き起こす。従って、多くの場合において、培地のみからのエレクトロスプレーは、好ましい細胞取り込み方法であってもよい。

【0071】

生分解性マトリクス上に取り込むかまたはその中に取り込むことができる細胞には、幹細胞、前駆細胞（前駆体）細胞、平滑筋細胞、骨格筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮前駆細胞、骨髄由来間葉細胞、および遺伝子的に修飾された細胞が含まれる。特定の態様において、遺伝的に修飾された細胞は、成長因子などの治療物質を発現することができる。適切な成長因子の例には、血管形成因子または神経栄養因子が含まれ、これらの場合によっては組換え技術を使用して得ることができる。成長因子の限定的ではない例には、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、酸性線維芽細胞成長因子（aFGF）、血管内皮成長因子（VEGF）、肝細胞成長因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、形質転換成長因子、プレイオトロフィンタンパク質、ミドカインタンパク質が含まれる。好ましい一態様において、成長因子はIGF-1である。

【実施例】

【0072】

自家伏在静脈は依然として、冠状動脈バイパス手術（年間500,000例）および抹消動脈バイパス手術（年間80,000例）の両方とも移植片の選択肢である。AVGの失敗は、主要な問題点であり、そしてうまく生着しなかった移植片を伴う患者は、死亡するかまたは再手術の必要がある。IHは、すべてのAVGの失敗のうちの20%～40%をしめる。IHは、過酷な新しい動脈循環の生体力学的環境そして動脈システムに関連するCWSのレベルの上昇（天然の静脈条件と比較して140倍の上昇）に対してAVGを急激に曝露することにより引き起こされると考えられる。IH反応を、AVGを動脈レベルのCWSに対して徐々に曝露することにより低下させまたは排除することができるというのが、本明細書中の仮説である。すなわち、その新しい環境のストレスに適合しそして再構築するための十分な機会がAVGに対して与えられる場合に、細胞の傷害を低下させることができ、そしてIHの機構を開始することを制限することができる。明らかに、IHプロセスの初期現象を阻害するための信頼性のある手段を開発することは、動脈バイパス手術の臨床的転帰の改善に大きく寄与する可能性がある。従って、本研究の長期的な目標は、外膜辺縁に位置した生分解性ポリマーラッピングの形状で新規な機構的条件付けパラダイムを開発して、AVGをin situで安全にそして機能的に“動脈化”することである。ポリマーラッピングは、所望の期間をかけて分解する様に調整し、それにより提示される機構的支持は減少され、そして静脈を徐々に増加するレベルのCWSにin situで曝露する。

【0073】

本明細書中で記載された分子シグナルのいくつか、そして本研究についての終点としてそれらを選択するための原理を、表1にまとめる。

【0074】

10

20

30

40

【表1】

表1：本研究において選択された終点についての原理の概要

本研究において提案される終点	IHにおける役割	文献によりサポートされる原理
ゴルジ複合体	表現型修飾 タンパク質合成	合成 vs. 収縮 SMC の量の増加 ^a 。
PCNA	増殖	急激に曝露された AVG の細胞増殖の増加 ^b 。
TUNEL	アポトーシス	急激に曝露された AVG のアポトーシスの変化 ^c 。
コンプライアンス	臨床成績	AVG 開存性の重要な予測 ^d 。コンプライアンスは急激に曝露された動脈化 AVG を減少させ、それによりコンプライアンスミスマッチを増加させる ^e 。
剛性	臨床成績	AVG 開存性の重要な予測 ^d 。剛性は急激に曝露された動脈化 AVG を増加させ、そして臨床成績の低下に寄与する可能性がある ^f 。

^a Morisaki N, et al. Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin i2 in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1988;71(2-3): 165-71 ; Campbell GR, et al. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(10): 977-86 ; そして Nagai R, et al. Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cdna cloning and immunoblot analysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(17): 9734-7.

^b Nishibe T, et al. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol*. 2002;21(3): 250-5 ; そして Zuckerbraun BS, et al. Overexpression of mutated ikappabalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. *J Vasc Surg*. 2003;38(4): 812-9.

^c Wang GJ, et al. Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10): 2081-7 ; そして Wang AY, et al. Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts. *Cardiovasc Surg*. 2001;9(4): 319-28

^d Davies AH, et al. Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass. *Ann R Coll Surg Engl*. 1992;74(6): 434-5

^e Jacot JG, et al. Early adaptation of human lower extremity vein grafts: Wall stiffness changes accompany geometric remodeling. *J Vasc Surg*. 2004;39(3): 547-55.

^f Tai NR, et al. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg*. 2000;87(11): 1516-24 ; そして Jacot JG, *J Vasc Surg*. 2004;39(3): 547-55.

【 0 0 7 5 】

実施例1 - PEUU構造の構成

シリンジポンプにより、4.5"直径のアルミニウム心棒上に直角に懸架した13-cmのステンレススチールキャピラリー中に、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) 中5%wt. のPEUU溶液を1.0 mL/hで供給した。PEUUを+12 kVで荷電し、そしてアルミニウム標的を高電圧生成器 (Gamma High Voltage Research) を使用して-7 kVで荷電した。整列させたPEUU繊維を、0.0~13.8 m/sの範囲のスピードで回転する標的上に、エレクトロスピンングにより形成した。足場を室温で一晩乾燥させ、そしてその後、減圧下にて30 で48時間静置した。各サンプルの一部を解析のための標準X-線回折ホルダーにマウントし、そして繊維の方向性をX-線ビームに平衡にした。サンプルを、銅照射を使用してPANalytical X'Pert

Pro回折計に流した。PEUUの数平均分子量および重量平均分子量は、それぞれ228,700および87,600であり、多分散性指数2.61を生じた。DSCは、-54.6 のガラス遷移温度を示し、そして41.0 でのPEUU軟セグメントの溶融温度を示した。

【0076】

血管組織工学のためのエレクトロスピニングした管状構造

この実施例は、実質的なエラストマー性機械的支持を提供することもできる、高度に細胞化された血管構造物を作製する一つの方法を記述する。この方法には、マイクロ集積アプローチが関連し、ここでミクロン以下のエラストマー性繊維のメッシュワークが、細胞の配置プロセスを用いてまたは用いずに血管壁中に構成される。細胞性は、in vitro 培養方法またはin vivoを通じて発生させることができる。これらの方法は、本明細書中

10

【0077】

本実施例は、本明細書中で記載されるように、管状組織をコーディングするために使用することができる小直径のエレクトロスピニングしたポリウレタン導管を管腔表面に埋め込む方法を提供する。エレクトロスピニング技術を使用して、足場製作のあいだ細胞を取り込んで、組織発育をよりよく活性化する。

【0078】

ポリ(エステルウレタン)尿素を、プトレッシン鎖伸長を用いて、ポリ(-カプロラクトン)ジオールおよび1,4-ジイソシアナートブタンから合成した。PEUUをヘキサフルオロイソプロパノール中6%wt.で溶解し、そしてエレクトロスピニングした。エレクトロスピニング条件には、1.0 mL/hrの溶液容積測定流速、13.5 cmのノズルと標的との間の距離、そしてノズルに対して+12 kVそして標的に対して-3 kVの電圧が含まれる。移植用の小直径チューブの製作のために使用した標的は、1.3 mmの直径のType 316ステンレススチール心棒であり、それを250 rpmで回転させた。

20

【0079】

円筒を、線形ステージ上でその心棒に沿って8 cm、約8 cm/sのスピードで平行移動させ、より均一な導管厚を生成した。サンプルを15分間エレクトロスピニングして、150~200 μmのオーダーの壁厚を有する多孔性管状構造物を生成した。内皮化の研究のため、4.7 mmのステンレス心棒を同一のプロセス条件とともに代わりに使用した。

【0080】

HFIP中6%wt.のPEUUを、マイナスに荷電した回転心棒上に250 rpmでエレクトロスピニングして、管状構造物を生成した。エレクトロスピニングしたチューブを、1.3 mmの内径、8 cmまでの長さそして150~200 μmの壁厚に処理した。繊維サイズは、およそ1000 μmの範囲であった。さらに、これらの構造物を縫合することができ、そしてそれらの管腔を維持した。

30

【0081】

製作の後、より簡単にそれをスチールの心棒から除去するために、円筒を70%エタノール中に浸漬した。次いで、導管を脱イオン水中で複数回すすぎ、ふき取って乾燥させ、そして減圧下にて室温で24~48時間乾燥させた。次いで、導管をその全体の構造について解剖顕微鏡を用いて調べ、またはそれらの繊維性の形態を走査型電子顕微鏡を用いて調べた。遮断されていない繊維性断面を見るため、サンプルを液体N₂中に1分間浸漬し、そして次いで破壊してから、SEMのためのスパッタコーティングを行った。

40

【0082】

PEUU導管(4.7 mm)をオーダーメイドで設計された回転式減圧播種装置の内部に配置し、そして20 × 10⁶個の筋肉由来幹細胞(MDSC)を播種した。より具体的には、エレクトロスピニングした導管を金属の突出部に配置し、そして軽い減圧を導管の外部に適用した。次いで、事前培養したMDSCを導管の管腔を通してかん流し、そして減圧によりチューブの繊維状管腔側壁に押しつけた。構造物を、静的条件下にて、ペトリ皿中で24時間培養した。24時間の静的培養の後、細胞は生存しており、管腔に接着し、そして単層を形成していた。

50

【0083】

多孔性で1.3 mmの内部直径の管状のエレクトロスピニングした足場を、挿置移植片としてラットの腹部大動脈に移植した。構造物は縫合可能であり、そしてin vivoでその管腔を容易に維持した。250~300 gの体重のメスのルイスラットを1%イソフルランと2.5 mg/100 gのケタミンを用いて麻酔した。腹部中央部切開を行い、そして後腹膜腔を曝露した。腎臓レベルより下の下行大動脈を切り出し、近位側切断点および遠位側切断点を鉗子で止めて1 cmの間隔を作製した。次いで、エレクトロスピニングした導管を、10.0プロレン縫合を使用して、末端-末端様式で移植した。鉗子で止める前に、静脈内部に200 Units/kgでヘパリンを投与した。腹壁を2.0 Vycril縫合で二層で閉じた。手足の機能を維持しつつ、ラットを外科手術から回復させることができた。ラットを2週間で犠死させ、そしてサンプル外植片を10%中性バッファホルマリンで室温で固定した。移植後2週間後に、移植片は明らかでありそして機能的であり続けた。次いで、サンプルをパラフィン中に包埋し、そして切片を作成して、ヘマトキシリンおよびエオジンまたはMassonのトリクロムにより、染色した。ヘマトキシリンおよびエオジン染色により、外植移植片周囲の外部カプセル形成が示された。Massonのトリクロム染色で示されたカプセルは、整列されたコラーゲンと新たに展開した毛細血管の存在とともに構成されていた。増殖中の細胞および組織を、コラーゲンの発達の存在により、構造物全体にわたり観察した。細胞が、構造物管腔の周囲の位置において単層を形成したことが示された。

10

【0084】

以前の事例においてはin vivoアプローチが提供されたのに対して、生分解性および細胞適合性のエラストマー性ポリ(エステルウレタン)尿素を、ラットモデルにおける移植に適した小直径のチューブにおいて、エレクトロスピニングした。

20

【0085】

以前の実施例と同様に、本実施例は、実質的なエラストマー性機械的サポートも提供する、高度に細胞化した血管構造物を作成するための方法を提供する。しかしながら、以前のモデルは、生分解性で細胞適合性でのin vivoでのアプローチであったが、エラストマー性ポリ(エステルウレタン)尿素を、ラットモデルにおける移植に適した小直径チューブ中でエレクトロスピニングした。本実施例は、in vitroアプローチを提供し、ここで、マイクロ集積技術を使用する足場製作と同時に、SMCをエレクトロスピニングしたナノ繊維中に播種した。

30

【0086】

ラット大動脈から単離した血管平滑筋細胞(SMC)を、10%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したDulbecco改変イーグル培地(DMEM)のもとで、組織培養ポリスチレン(TCPS)培養プレートで増殖させた。マイクロ集積を、以前に記載された方法と同様にして、より小さな直径のエレクトロスプレー/心棒のエレクトロスピニングを可能にするいくつかの改良を施して行った。

【0087】

7.5×10^6 SMC/mLを培地中で事前培養し、そして8.5 kVで荷電しそして標的から4.5 cm離れた位置に配置された滅菌Type 316ステンレススチールキャピラリー中に0.1 mL/分の速度で供給した。HFIP中6%wt.のPEUUまたは6%wt.のPEUUIコラーゲン(75/25)を、12 kVに荷電しそして標的から23 cm離れた位置に配置されたキャピラリー中に、1.5 mL/分の速度で供給した。標的は、その軸に沿って1.6 mm/sの速度で8-cm平行移動させながら、-3 kVに荷電しそして250 rpmで回転させている滅菌ステンレススチール心棒(4.7 mm直径)から構成された。30分の製作時間を使用して、マイクロ集積した導管のそれぞれを作成した。製作の後、導管および心棒を、ローラーボトル中に無菌技術を用いて穏やかに配置し、そして16時間静的に培養した。16時間後、サンプルを培養のために円筒から穏やかに取り出した。次いで、サンプルを15 mmの長さで切り出し、そして金属製スタブに縫合し、そして図3中に実質的に示される通りの装置中で3日間、拍動性の流れにより培地をかん流した。

40

【0088】

50

製作後1日および4日の時点で、サンプルを特性決定した。MTTミトコンドリアアッセイを使用して、細胞生存率を測定した。組織学的調査のため、サンプルを10%中性バッファーホルマリン中で室温にて固定した。次いで、サンプルをパラフィン中に包埋し、切片を作成し、そしてヘマトキシリンおよびエオジンにより染色した。サンプルを、製作直後にそれらの生体力学的特性について解析した。測定された特性には、環強度、動的コンプライアンス、および破裂圧が含まれた。環強度を測定するため、ステンレススチールホチキスを、5 mm長の管状切片中に挿入し、そして次いで一軸引張試験機 (A TS) のグリップ中に挿入した。10 lbの負荷細胞および10.05 mm/分の変位率を使用して、サンプルを破断するまで引っ張った。

【0089】

10

動的コンプライアンスおよび破裂圧に関して、15 mm長の管状サンプルを遠心ポンプ (Biomedicus) により駆動されるフローループ中にマウントし、そしてPBS中に37 °Cで浸漬した。標準的なインライン張力-ゲージ圧力変換器およびPC収集ボードを使用して、圧力をモニタリングしそして30 Hzで記録した。血管構造物を拍動性の流れ (110/70 mmHg、1.2 Hz) を用いてかん流し、そして動的コンプライアンス、C、を、He-Neレーザーマイクロメーター (Beta Lasermike) を使用してサンプルの外部直径を記録することにより測定した。コンプライアンスは、それぞれのパルスにつき：

【0090】

【数1】

$$C = \frac{(D_{\max} - D_{\min})}{D_{\min}(P_{\max} - P_{\min})}$$

20

【0091】

のように計算した (ここで、D = 最大直径または最小直径、P = 最大圧力または最小圧力)。コンプライアンス研究において、マイクロ集積したPEUUとの比較のための対照として、ブタ乳腺動脈を使用した。破裂圧を測定するため、サンプル出口をシールし、そして流れをチューブが破裂するまで増加した。破裂する前の最大圧力を、破裂圧として記録した。

【0092】

細胞マイクロ集積の技術を小直径チューブにまで拡張するため、4.7 mm直径のステンレススチール心棒を、シートマイクロ集積のために以前に使用された19 mm直径の心棒の代わりに使用した。高度に細胞性でありそして血管のない管状構造物をマイクロ集積するため、以前の方法と比較して、エレクトロスプレー距離を0.5 cmほどわずかに減少し、そして円筒マイナスイオン電圧を-10 kV ~ -3 kV低下させることが有用であった。製作のあいだ、PEUUは、ピンク色の外観であり、均一な細胞エレクトロスプレーの指標である円筒上のキラキラした輝きを示した。心棒からはずした後、PEUUまたはPEUU/コラーゲン (75/25) のいずれかのサンプルは、それらが縫合可能でありそして圧縮した後においてもその管腔を維持することができた点で、機械的に頑強であることがわかった。

30

【0093】

SMCマイクロ集積された構造物中の細胞の配置および生存率を、最初に調べ、その後再び静的培養またはかん流培養を4日間行った後に調べた。かん流後、サンプルをスタブから穏やかに取り出し、次いでMTTおよび組織学的のために代表的な切片を作成した。MTTの結果は、製作の1日後に生存細胞があることを示した。さらに、細胞は、静的培養またはかん流培養のいずれかで4日の時点でも生存しており、細胞数の値は、かん流培養の方が若干高いことが報告された。サンプルを固定し、そしてヘマトキシリンおよびエオジン染色により染色した。H&E染色により、管状構造物中での均一な初期細胞集積が示された。

40

【0094】

環強度、破裂圧、および縫合保持強度を、製作後に、マイクロ集積した構造物中で評価した。小さなチューブ切片 (環) は機械的に頑強かつ柔軟性があり、最大応力値および引

50

っ張り値はそれぞれ6.3 MPaおよび170%であった。環状サンプルは、それぞれの場合においてきれいには破断されず、そして最大の応力値の後に引き裂かれるかまたは薄層に裂けるようであった。マイクロ集積した構造物の動的コンプライアンスを算出するため、サンプルを拍動性の流れに曝露し、そして圧力/直径関係を評価した。この関係を、同一の拍動性の流れに曝露したブタ乳腺動脈(pMA)と比較した。pMAおよびマイクロ集積したPEUUの両方とも機械的な反応は、非常に類似しており、両サンプルについてのの値が互いの値の範囲に入っていた。コンプライアンス値は、pMAについて $1.02 \pm 0.33 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ であり、そしてSMCマイクロ集積したPEUUについて $0.71 \pm 0.13 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ であった。全てのサンプルについての破裂圧値は、1500 mmHgを超えていた。破裂圧値は、マイクロ集積したチューブの多孔性の性質のため、近似値であった。

10

【0095】

この方法により、高度に細胞化したエラストマー性足場を作製した。細胞は、製作後も生存しており、そしてかん流培養の下で増殖した。この技術を拡張して、血管の原型としての小直径の管状構造物中に細胞をマイクロ集積するため、可変のいくつかのプロセスを修飾することが好ましかった。例えば、より小さな直径の心棒上に細胞を標的化しそしてエレクトロスプレーするため、エレクトロスプレーノズルと心棒との間の距離を短くすることが有用であった。同様に、心棒上の大きなマイナスのバイアスを回避することが有用であった。高いマイナス荷電を回転心棒に対して使用することにより、標的は、ポリマー突出部欠損を生じるか、または導管完全性および細胞生存率を破壊することができるチューブ中の“スパイク”を生じた。従って、心棒の荷電を低下させて、均質な細胞性および

20

繊維性管状導管を生じることが有用であった。次いで、これらの構造物をかん流バイオリアクタ中で培養し、チューブ内部の細胞に対して、栄養、廃棄物、そして酸素のより良好な交換を促した。H&EおよびMTTの結果は、製作後およびかん流培養後に構造物中に存在する生存細胞を示した。

【0096】

実施例2 - 静脈移植片の動脈化のための機械的特性の変化

動脈圧の範囲において、AVGは、過剰に膨張している程度のため、本質的に硬いチューブである(Stooker W, Gok M, Sipkema P, Niessen HW, Baidoshvili A, Westerhof N, Jansen EK, Wildevuur CR, and Eijnsman L. Pressure-diameter relationship in the human greater saphenous vein. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(5): 1533-8)。このことを確認

30

するため、本発明者らは、圧力引き上げ実験を行った。この実験の結果は、図4に示される。静脈は、約30 mmHgで最大膨張に到達することを見出すことができる。結果的に、動脈レベルの圧力では静脈は非常に硬く、そして本発明者らは、外部構造支持体に一次的に生分解性外膜ラップを提供することにより、この現象を是正することを希望した。

【0097】

AVG膨張の程度は、コンプライアンスなどの静脈特性と直接的に関連し、それが翻ってDavies et al.による開存性率と関連している(Davies AH, Magee TR, Baird RN, and Horrocks M. Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass. *Ann R Coll Surg Engl.* 1992;74(6): 434-5;そしてDavies AH, Magee TR, Baird RN, Sheffield E, and Horrocks M. Pre-bypass morphological changes in vein grafts. *Eur J Vasc Surg.* 1993;7(6): 642-7)。Davies et al.は、末梢バイパス外科手術において、より低い適合性のAVGのより低い開存性率を報告した。この低下した開存性は、AVGと移植される天然の動脈との間のコンプライアンスミスマッチに大きく寄与していた(Bandyk DF and Mills JL. The failing graft: An evolving concept. *Semin Vasc Surg.* 1993;6(2): 75-7; Bassiouny HS, White S, Glagov S, Choi E, Giddens DP, and Zarins CK. Anatomic intimal hyperplasia: Mechanical injury or flow induced. *J Vasc Surg.* 1992;15(4): 708-16; discussion 716-7;そしてBerkowitz HD, Fox AD, and Deaton DH. Reversed vein graft stenosis: Early diagnosis and management. *J Vasc Surg.* 1992;15(1): 130-41; discussion 141-2)。静脈は、動脈よりも適合性がもともと低く(Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, and Seifalian AM. Compliance properties o

40

50

f conduits used in vascular reconstruction. Br J Surg. 2000;87(11): 1516-24)、そして急激に曝露された動脈化の際にさらに低い適合性となる (Jacot JG, Abdullah I, Belkin M, Gerhard-Herman M, Gaccione P, Polak JF, Donaldson MC, Whittemore AD, and Conte MS. Early adaptation of human lower extremity vein grafts: Wall stiffness changes accompany geometric remodeling. J Vasc Surg. 2004;39(3): 547-55)。AVGコンプライアンスの変化は、AVGの失敗の重要な指標であると思われる。

【0098】

実施例3 - 拘束性ポリマーマトリクスによりコーティングされたAVG

本明細書中で提供したデータは、進行中の研究の2つの別個の領域：i) 無傷静脈セグメントの動脈血行動態に対する機械病理学的反応の調査、そしてii) 外膜ラップとして使用するための生分解性のエレクトロスピニングしたポリマーの開発；をカバーする。

10

【0099】

ex vivo血管かん流装置を開発し、無傷血管セグメントおよび移植片の現実的な十分にコントロールされた生体力学的条件および代謝的条件に対する反応を研究した。図3は、そのような装置を示す。この装置により、ブタ内頸静脈セグメントを精密にコントロールされた血行動態および溶解ガス (pH、 pO_2 、 pCO_2) に対してex vivoで曝露させて、静脈および現実的なAVG環境を含む様々な条件をシミュレートすることができる。これらのコントロールされた条件を得ることは、2種の独立したかん流/器官培養システムを使用することにより達成される (図3に概略を示す)。閉鎖ループかん流デザインにより、無菌かん流液 (1% ウシ胎児血清、0.5 g/リットルのセフォキシチンを添加した組織培養液199) の循環が可能になる。2番目のローラーポンプは、シールされたチャンバー中にマウントされた試料の周囲に、外膜浴 (1% ウシ胎児血清および0.5 g/リットルのセフォキシチンを含むDMEM) を循環させる。

20

【0100】

天然の静脈、血行動態およびバイオメカニクスをシミュレートするため、ローラーポンプおよびかん流ループの流れ抵抗器を、20 ml/分の非拍動性の流れおよび20 mmHgの圧力を提供するように設定する。AVG血行動態をシミュレートするため、ポンプおよび流れ抵抗器を設定して、120/80 mmHgの拍動性の圧力波形と100 ml/分の平均かん流液流量を提供する。“AVG調製”方法を、初めにかん流システムを設定して上述した動脈条件を提供することにより、開始する。円周方向壁応力におけるかん流された静脈セグメントは、調整された生分解性の血管周囲にエレクトロスピニングしたポリマーラッピングの適用を介して調節することができる。すなわち、中静脈壁円周方向壁応力vs. プロファイルが、静脈レベル (およそ25 KPa) から動脈レベル (およそ140 KPaのピーク) まで、徐々に負荷することが関連し、それにより24時間または192時間かけて直線的に増加する。この所望の分解速度を達成することにより、AVGのin vivoでの機械的調整が、可能性のある代替治療となる可能性があり、全てのAVGにおける開存性率をおそらくは改善する。

30

【0101】

ex vivoかん流の能力をさらに確認するため、静脈条件vs. 条件の下でかん流された静脈セグメントの組織生存率解析を行い、そして結果を組織生存率のベースラインレベルに対して比較した。48時間のex vivoかん流の後、操作電子顕微鏡、H&E染色、Live/Dead™染色、およびTUNEL解析を行った (図5を参照)。操作電子顕微鏡およびH&E染色から、組織の形態学的完全性は、採取した後そしてかん流の48時間後まで、無傷であったことを示した。Live/dead解析およびTUNEL解析は、48時間の時点でベースラインと比較した場合、静脈条件または動脈条件のいずれかにおいて、顕著な壊死またはアポトーシスをそれぞれ何も示さなかった。同様の観察が、このシステムの初期型を使用して、14日間持続するかん流に対しても行われた (Ligush, J., R.F. Labadie, S.A. Berceli, J.B. Ochoa, and H. S. Borovetz, Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. The Journal of Surgical Research, 1992. 52(5): p. 416-21)。これらの実験は、無菌条件を維持しそして組織生存率を維持しながら、曝露されたex vivoブタ内頸静脈にかん流を行う能力を示す。

40

50

【 0 1 0 2 】

数セットのex vivo血管かん流実験を行った。最初に、1セットの実験（1セットあたりN=6の動物）を行って、動脈生体力学的条件に対して急激に曝露されたPIJVの急性過形成反応を確立し、そして天然静脈条件に対して曝露されたPIJVに対するこの応答を比較した。図6は、この実験デザインを示す概略図であり、これはまた以下に詳細に記載する。次いで、本発明者らは、有効なex vivo血管かん流システム（EVPS）圧力を手動調整することを通じて、ブタ内頸静脈セグメント（PIJV）を所望のCWSプロファイルに対して徐々に曝露することにより、この急性過形成反応を減弱することを試みた。図7は、この実験デザインを示す概略図であり、以下に詳細に説明する。これらの実験は、急激に曝露された動脈条件と比較して追加的にex vivoでかん流された新たに切り出された静脈セグメントにより、急性過形成反応の低下を達成することが必要なCWSプロファイルを確認することに直接的に関連していた。これらの結果を使用して、本発明者らはまた、同一のCWSプロファイルを達成するために、外膜生分解性ポリマーラッピングの分解速度を調整することを希望し、そしてその後このラップを使用して、ラッピングされていない対照と比較して、PIJVにおける急性過形成反応を減弱することを希望した。図8は、実験デザインを示す概略図であり、以下に詳細に記載される。上述した実験のそれぞれは、動物-対-動物の多様性を明らかにするために“ペア”のものであり、そして一般には以下の様にして行われた。両側性PIJVを若年ブタから外科的に採取し、そして別個の独立したEVPS中に結びつけた（以下を参照）。調査中の終点の大多数がこれらの時間点の数時間以内にうまく検出されたため（表1の言及を参照、上述）、血管かん流実験を24または72時間のあいだ行った。各実験の終了時に、組織を生物学的アッセイのために処理して（以下を参照）、表1に概要を記載した終点を評価した。

【 0 1 0 3 】

組織採取および輸送

ブタ内頸静脈（PIJV）をモデルとして選択した。これは、ヒトのより大きな伏在静脈と内径および壁厚の点で類似性を有するため、そしてこの組織を以前に使用して、動脈血流力学的条件に曝露した静脈の病理学的反応を調べていたためである。この外科的な採取手順を、バイパスのための伏在静脈切除術の方法で実行した。概略を述べると、麻酔した動物を仰臥位に保定し、頸部切開を両側性で行い、そして頸部の血管筋膜に層内で切開を行った。各PIJVを同定し、そして頸部交会部の近位側そして頸静脈孔の遠位側を切開した。全ての支流を同定し、そして注意深く結紮して、漏出を防止した。所望の長さ（6~8 cm）を曝露したのち、アヒルのくちばしの様な形をした血管カニューレの各末端で、セグメントにカニューレを挿入した。外植の直前に、特注血管鉗子（Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416-21）をカニューレの両端に接続し、取り出された後の血管のin vivoの長さを維持する。次いで、血管を、鉗子で止めたカニューレと結紮部との間のそれぞれの側で切断した。取り出した直後に、血管を、滅菌輸送箱（ヘパリン（500 units/liter）、パパベリン（60 mg/liter）、およびセフォキシチン（1.0 g/liter）を添加した乳酸加リンガー溶液を含有する）中に設置した。組織採取と以下に記載するかん流システムへのマウントとの間の時間は、常に1時間未満であった。

【 0 1 0 4 】

エレクトロスピニングした生分解性ポリマーラップの血管周囲配置

外膜ラップを形成するために使用される生分解性ポリマー組成物は、Guan et al. (Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, and Wagner WR. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. J Biomed Mater Res. 2002;61(3): 493-503) により開発され、そしてStankus et al. (Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4): 603-14; 及びStankus JJ, Guan J, Fujimoto K, and Wagner W

10

20

30

40

50

R. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials*. 2006;27(5): 735-44) により形成されたエレクトロスピンニングしたフォーマットにおいてさらに特性決定を行った、ポリ(エステルウレタン)尿素(PEUU)材料に基づくものであった。このポリマーは、in vitroで非-細胞傷害性分解生成物にまで加水分解を受け、そしてin vivoにておよそ3ヶ月でほぼ完了するように分解が示された(Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T, and Wagner WR. In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. *Ann Thorac Surg*. 2007;83(2): 648-54; 10
そしてFujimoto KL, Tobita K, Merryman WD, Guan J, Momoi N, Stolz DB, Sacks MS, Keller BB, and Wagner WR. An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(23): 2292-300)。ラップの分解速度を調節するため、PEUU、コラーゲン、およびエラスチンタンパク質の組成物を、質量喪失を加速するために使用されるタンパク質付加とともに利用した。

【0105】

PEUUを、プロテシリン鎖伸長を用いて、ポリ(ε-カプロラクトン)ジオールおよび1,4-ジイソシアナートブタンから合成した。PEUU、コラーゲン、およびエラスチンを、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)中の溶液中で混合し、次いで文献中に詳細に説明される手順を用いて、PIJVセグメント上にエレクトロスピンニングした(Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70(4): 603-14)。概略を述べると、エレクトロスピンニング条件には、0.28 μL/sの混合物溶液容積測定流速、17 cmのノズルと標的の間の距離、そしてノズルに対して+12 kV、そして標的に対して-3 kV、電気的な荷電が含まれた。移植のためのスピニングされたAVGを製作するために使用される標的は、3 mmの直径のType 316ステンレススチール心棒であり、それが、内皮の損傷を回避するために、注意深くAVG管腔中に挿入された。円筒および同軸静脈を、250 rpmで一緒に回転させ、そして約8 cm/sの速度で10 cm以上、軸方向にリニアステージ上に平行移動して、より均一なコーティング厚を生成した。

【0106】

ポリマーの機械的特性および分解速度を調整するために使用されたパラメータが3種存在した：1) 混合物溶液中の最終ポリマー濃度；2) 混合物溶液中のPEUU：コラーゲン：エラスチン比；そして3) エレクトロスピンニング時間と比例していたラップ厚。これらのパラメータの試験された全ての組合せの概要を表2に示す。

【0107】

【表2】

表2：ポリマー調整パラメータの組み合わせの概要

組み合わせ	PEUU : コラーゲン : エラスチン (%)	エレクトロスピンニングの時間 (min)	最終濃度 (%)
A	14.3:42.3:42.3	20	6
B	25:75:0	15	6
C	50:50:0	15	6
D	50:50:0	20	12

【0108】

Ex vivoかん流条件

静脈セグメントを、我々の定評のある有効なex vivo血管かん流/器官培養システム中にマウントした(EVPS、例えば、Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Liguish J, Watkins SC, Pham SM, and Borovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vi

10

20

30

40

50

vo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol . 1996;270(2 Pt 2): H760-8 ; Severyn DA, Muluk SC, and Vorp DA. The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro. J Surg Res. 2004;121(1): 31-7 ; そしてMuluk SC, Vorp DA, Severyn DA , Gleixner S, Johnson PC, and Webster MW. Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1998;27(3): 521-7を参照)。概略を述べると、閉鎖されたループかん流デザインにより、無菌かん流液（1%ウシ胎児血清および1.0 g/literセフォキシチンを添加した組織培養液199）の循環が、血管セグメントを介してならびにシーリング処理されたチャンバ内での外膜浴（1%ウシ胎児血清および1.0 g/literセフォキシチンを含むDMEM）の循環を介して、可能になる。かん流液および浴培地の両方とも、37 で維持され、そして生理学的レベルの溶解ガスを維持された。実験では、2種のシミュレートされた血流力学条件（Severyn DA, Muluk SC, and Vorp DA. The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro. J Surg Res. 2004;121(1): 31-7 ; そしてMuluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC, and Webster MW. Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1998;27(3): 521-7） - 天然の静脈条件（VEN）または動脈条件（ART）のいずれか - のうちの1つを使用した。VENでの血行動態をシミュレートするため、かん流ループを設定して、20 ml/分の非拍動性の流れそして20 mmHgの圧力を提供した。ART血行動態をシミュレートするため、このシステムを設定して、100 ml/minの平均かん流液流量を有する120/80 mmHgの拍動性の圧力波形を提供した。別の実験を行って、VEN条件またはART条件のもとラッピングされていない静脈を調べ、そしてART条件（wART）のもとラッピングされた静脈を調べた。各かん流実験を24時間継続し、管腔内圧、外径および流速を毎時間測定した。次いで、静脈セグメントを上述したように、組織学的または免疫組織化学を介して解析した。

【 0 1 0 9 】

VEN vs. ART実験

図6は、行われた最初のセットのex vivo実験を示す概略図である。これらの実験において、本発明者らは、ART条件に対して急激に曝露されたPIJV vs. 24時間VEN条件に曝露したPIJVに対する生分解性のエレクトロスピンしたポリマーラッピングの有益な作用を評価した。

【 0 1 1 0 】

ART vs. cART実験

図7は、行われた2番目のセットのex vivo実験を示す概略図である。これらの実験において、本発明者らは、PIJV vs. 24時間および72時間ART条件に対して急激に曝露されたPIJVに対する機械的な調整実例（cART条件）の作用を評価した。

【 0 1 1 1 】

ART vs. wART実験

図8は、行われた3番目のセットのex vivo実験を示す概略図である。本発明者らは、ART条件（wART条件）に対して曝露されたPIJV vs. 24時間ART条件に対して曝露されたラッピングされていないPIJVに対する調整された生分解性ポリマーラッピングの有益な作用を評価した。

【 0 1 1 2 】

化合物シリンダーにおけるCWS算出

AVGを動脈レベルのCWSに対して急激に曝露することは、それらの不全様式に寄与する可能性があると考えられているため、本発明者らは、エレクトロスピンした生分解性ポ

10

20

30

40

50

リマーラッピングのある可能性のある適用は、AVGを動脈レベルのCWSに対して徐々に曝露することであると考える。外部鞘を使用してCWSを制限するための以前の試みは、それらが生物耐久性であるかおよび/またはだぶついた状態かのいずれかであったため、完全には成功しなかった。ラップがどのようにしてCWSを修飾することができるのかを調べるため、ラップが所望の結果を達成するためにどのようにして調整されるのかを調べるため、本発明者らは、表1に示されるラップの組合せのそれぞれについてCWS-対-時間プロファイルを調べ、そしてこれらを静脈条件または動脈条件に対して曝露されたラッピングされていない静脈セグメントと比較した。このことは、ex vivoかん流実験から回収されたデータおよびCWSについての数学的モデルを使用して達成された。

【0113】

10

生体力学的モデリングの目的のため、静脈/ラップ複合体の理想的な切断面を示す図9中の概略図を検討する。二重層複合チューブ (compound tube) の外部層は、エレクトロスピニングしたポリマーラッピングとして得られ、そして同心の中間層は静脈セグメントである。

【0114】

その後、以下の仮定を行った (Vorp DA, Raghavan ML, Borovetz HS, Greisler HP, and Webster MW. Modeling the transmural stress distribution during healing of bioresorbable vascular prostheses. Ann Biomed Eng. 1995;23(2): 178-88) :

- i) 層間に滑り (slipping) または剥離 (detachment) は存在しない
- ii) 接触面を横断する変形の融和性は維持される
- iii) 平均動脈圧の下ではわずかな変形のみが存在する
- iv) このシステムは平面応力の状態の下にある
- v) 両層は非圧縮性で、等方性で、均質でそして直線的に伸縮性の材料である
- vi) それぞれの別個の層は、内部圧力および外部圧力にさらされる、単一の、厚みのある壁を有するシリンダーとして一般化することができる。

20

【0115】

Vorp et al.により開発された数学的モデル (Id.) は、図9により示されるモデルについて適合させた。簡単に説明すると、本発明者らは、放射状方向および円周方向の壁応力 (それぞれ、および) について古典的なラメ (Lame) 溶液を使用し、そして内部圧力および外部圧力の作用のもとでの開放末端を有し厚みのある壁を有するシリンダーにおける、いずれかの半径での放射状変形 (u_r)、 r 、を使用した (Id.)。図9に示される内部 (静脈) 層について、本発明者らは (Id.) を得る :

30

【0116】

【数2】

$$\sigma_{r,v} = \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} - \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r^2} \quad (15a)$$

$$\sigma_{\theta,v} = \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} + \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r^2} \quad (15b) \quad a \leq r \leq b \text{ の場合} \quad 40$$

$$u_{r,v} = \frac{1 - \nu_v}{E_v} \frac{(a^2 P_i - b^2 P_2) r}{b^2 - a^2} + \frac{1 + \nu_v}{E_v} \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r} \quad (16)$$

【0117】

式中、下付き "v" は静脈に関する量のことを意味し、そしてaおよびbは、それぞれ静脈層の内径および外径である。P_iは内部圧力であり、そしてP₂は同心のシリンダの2つの層の間に作用する、それらの機械的特性の差異から生じる接触面圧力である。ポワソン比であり、Eはヤングの弾力性モジュールである。図9に示される外部 (ラップ) 層に関し

50

て、本発明者らは、以下の式を有する：

【 0 1 1 8 】

【 数 3 】

$$\sigma_{r,w} = \frac{b^2 P_2 - c^2 P_0}{c^2 - b^2} - \frac{(P_2 - P_0) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r^2} \quad (17a)$$

$$\sigma_{\theta,w} = \frac{b^2 P_2 - c^2 P_0}{c^2 - b^2} + \frac{(P_2 - P_0) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r^2} \quad (17b)$$

$b \leq r \leq c$ の場合

10

$$u_{r,w} = \frac{1 - \nu_w}{E_w} \frac{(b^2 P_2 - c^2 P_0) r}{c^2 - b^2} + \frac{1 + \nu_w}{E_w} \frac{(P_2 - P_0) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r} \quad (18)$$

【 0 1 1 9 】

式中、下付き“W”はラップにより示される領域の量のことを意味し、そしてbおよびcはそれぞれラップ層の内径および外径である。P₀は外部圧力である。接触面を横断する変形の融和性により、以下の様でなければならない：

20

【 0 1 2 0 】

【 数 4 】

$$r = b \text{ で } u_{r,v} = u_{r,w} \quad (19)$$

【 0 1 2 1 】

(16) および (18) を (19) と置換することにより、 $\nu_w = \nu_v = 0.5$ とし (両方の材料ともに非圧縮性であると仮定する)、 $P_0 = 0$ と設定し (すなわち、気圧)、そしてP₂について解いて、以下を得る：

【 0 1 2 2 】

【 数 5 】

$$P_2 = \frac{a^2 P_i (1 - \nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1 + \nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 P_i}{b^2 (1 - \nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1 - \nu) a^3 E_v (b^2 - a^2) + (1 + \nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 + c^2 E_v b (b^2 - a^2)} \quad (20)$$

30

【 0 1 2 3 】

P_i および外径 (すなわち、c) を本発明者らのex vivoかん流実験において測定したことを思い出してもらいたい。従って、本発明者らは、測定されたP_i およびcのそれぞれの組について、内径 (r = a) および界面径 (r = b) を計算しなければならなかった。本発明者らが静脈とラップの両方ともが非圧縮性の材料であり、そのためにいずれかの変形状態でそれぞれのシリンダーの容量が一定であることが必要であるという前提を利用したため：

40

【 0 1 2 4 】

【 数 6 】

$$\left[\pi (r_o^2 - r_i^2) L \right]_u = \left[\pi (r_o^2 - r_i^2) L \right]_p \quad (21)$$

【 0 1 2 5 】

でなければならず、ここでr_oおよびr_iはそれぞれ外径および内径であり、そしてLは各シリンダーの長さであり、そして下付き文字uおよびpは非圧縮状態および圧縮状態をそれぞれ意味する。式 (21) を図9における“ラップ”シリンダーの形状に適用することにより：

【 0 1 2 6 】

50

【数7】

$$b_p = \sqrt{\frac{c_p^2 L_p - (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p}} \quad (22)$$

【0127】

が得られる。

【0128】

従って、測定された c_p および L_p のいずれかに関して、 b_p の値を計算することができる。同様に、図9における“静脈”シリンダーのみを考慮してそして b_p について式(22)を使用して、本発明者らは：

10

【0129】

【数8】

$$a_p = \sqrt{\frac{\left(\frac{c_p^2 L_p (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p}\right) L_p - (b_u^2 - a_u^2) L_u}{L_p}} \quad (23)$$

【0130】

式(20)、(22)および(23)を式(15b)に置換すること、そして平均動脈圧で評価すること、そして

20

【0131】

【数9】

$$r = \frac{a_p + b_p}{2},$$

【0132】

で評価することにより、本発明者らは、ポリマーラッピングされた静脈における中間壁CWSを計算することができることを見出した。本発明者らは、計算において、 $E_w = 7.5$ MPa (Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffold folds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4): 603-14)、そして $E_v = 600$ KPa (Wesly RL, Vaishnav RN, Fuchs JC, Patel DJ, and Greenfield JC. Static linear and nonlinear elastic properties of normal and arterialized venous tissue in dog and man. Circulation Research (Online). 1975;37(4): 509-20)と仮定した。

30

【0133】

血管運動性チャレンジ実験

エレクトロスピンニングプロセスの組織生存率に対する作用を評価するため、本発明者らは、適所にポリマーラッピングあり(“スピニング”)と適所にポリマーラッピングなし(“シャム”)、ならびに非処理新鮮切り出し組織(“対照”)を用いて、PIJVセグメントを調べた。エレクトロスピンニングしたポリマーラッピングなしのシャムPIJVセグメントに関して、本発明者らは、実際にポリマーラッピングを配置する時点まで(すなわち、円筒を挿入することを含み、そして静脈を電場中で回転/平行移動させる)エレクトロスピンニングプロセスを模倣した。組織機能性を、以前に記載したように、ex vivo血管運動性チャレンジを使用して評価した(Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Liguish J, Watkins SC, Pham SM, and Borovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2): H760-8;そしてLiguish J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416

40

50

-21)。簡単に言うと、血管セグメントをカニューレし、20 mmHgの一定の管腔内圧の下におき、そして徐々に増加する量のエピネフリン (EPI) に対して曝露する。実験を通じて、外部血管直径 (D) はレーザーマイクロメータにより継続的に測定された (Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, and Borovetz H S. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. *Am J Physiol.* 1996;270(2 Pt 2): H760-8; Brant AM, Rodgers GJ, and Borovetz HS. Measurement in vitro of pulsatile arterial diameter using a helium-neon laser. *J Appl Physiol.* 1987;62(2): 679-83; そして Ligush J, Labadie RF, Berceci SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. *J Surg Res.* 1992;52(5): 416-21)。ベースラインの直径 ($D_{baseline}$) を、EPIの最初の投与の注射前に測定した。続いて、1分、4.5分、および10分にそれぞれ 2×10^{-5} 、 2×10^{-4} 、および 2×10^{-3} mg/mlの最終濃度のEPIを注射した。それぞれの投与による最大の血管収縮を測定した後、それぞれの続いての用量を投与した。EPIの最大投与量を投与し、そして最大レベルの収縮 ($D_{constricted}$) を観察した後、2 mlの25 mg/mlニトロプルシド・ナトリウム (SNP) を注射して、0.125 mg/mlの最終濃度を得た。完全な拡張が観察された時に、 $D_{dilated}$ を記録した。EPIに対する収縮レベルを以下の様にして算出した (% Constriction = % 収縮) :

【 0 1 3 4 】

【 数 1 0 】

$$\% \text{ Constriction} = \frac{D_{baseline} - D_{constricted}}{D_{constricted}} * 100 \quad (24)$$

【 0 1 3 5 】

同様に、SNPに対する拡張レベルを以下の様にして算出した (% Dilatation = % 拡張) :

【 0 1 3 6 】

【 数 1 1 】

$$\% \text{ Dilatation} = \frac{D_{dilated} - D_{constricted}}{D_{constricted}} * 100 \quad (25)$$

【 0 1 3 7 】

コンプライアンスおよび -剛性の測定

外径 (OD) および管腔内拍動性圧力 (P) の時間毎の測定を上述したART 24時間かん流実験 vs. wART 24時間かん流実験 (N=6) のあいだに行った。これらの測定値を使用して、スピニングしたPIJVおよびシャム対照PIJVの両方についてのコンプライアンス (C) および -剛性 () を算出した。150 Hzのサンプリング周波数を使用して、時間毎の測定を5秒間行い、それによりデータについてのおよそ5回の完全な“心臓周期”を採取した。次いで、得られたシグナルをフィルタリングしそしてプロットした。各サイクルについての最大値 (OD_s および P_s) および最小値 (OD_d および P_d) を使用して、式26を使用してCを算出し、そして式27を使用して を算出した (Hayashi K. Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls. *J Bio mech Eng.* 1993;115(4B): 481-8)。5つの値を平均し、そしてCおよび の一つの値を毎時毎に算出した。

【 0 1 3 8 】

【数 1 2】

$$C = \frac{(OD_s - OD_d / OD_d)}{P_s - P_d} \quad (26)$$

$$\beta = \frac{\ln(P_s - P_d)}{(OD_s - OD_d / OD_d)} \quad (27)$$

【 0 1 3 9 】

10

かん流後組織処理

本発明者らは、1日、および3日の期間の実験から終点を評価する。本発明者らは、新たに切り出した血管セグメントを使用した場合に、組織生存率の維持がこのかん流期間のあいだ得られることを明らかにした (Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416-21)。静脈の過形成反応は、1.2節にまとめられた様々な注意深く選択された終点を測定することにより、定量化される。これらの終点は、求められる組織処理に基づいて、以下の3つのカテゴリーに分類することができる：i) 組織学 (微細構造 / 超微細構造を含む)；ii) RNA解析；そしてiii) タンパク質解析。全ての静脈セグメントを断片化し、そして図

20

10に従って処理した。

【 0 1 4 0 】

生物学的解析

上記に提示された生物学的終点を、必要とされるアッセイ型に関して、組織学に基づくか、または分子的に基づくかのいずれかとして特徴づけることができる。組織学的終点には、微細構造、アポトーシス、増殖、SMC表現型マーカー、および細胞-接着マーカーの評価が含まれた。タンパク質発現および遺伝子発現の終点には、タンパク質およびRNAの単離が必要であり、そして分子的に分類される。

【 0 1 4 1 】

組織学的解析 (図10) 専用のサンプルを冷凍庫から取り出し、そしてTissue Freezing Medium™ (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) 中にすぐに包埋しそして-65で凍結した。5 μmの横断切片をクリオトームを使用して切り出し、そして正に荷電した、ガラス顕微鏡スライド上に配置した。組織学的アッセイまたは免疫組織化学的アッセイのために処理することができるまで、スライドを-80 で保存した。

30

【 0 1 4 2 】

組織学

ex vivoかん流システムから静脈を取り出した後、それらを4%パラホルムアルデヒド中で4にて4時間固定し、30%スクロースにより4で一晩固定した。5 mmの組織環を切り出し、PBSで洗浄し、Tissue Freezing Medium™ (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) 中に包埋し、そして5 μmの切片に切り出した。組織切片を、ヘマトキシリンとエオジン染色 (H&E)、Massonのトリクロム染色 (MTC)、ピクロシリウス赤染色、またはMovatのペンタクロム染色のいずれかにより染色した。次いで、染色した組織切片をOlympus Provis光学顕微鏡 (Olympus, Center Valley, PA, USA) を使用して可視化し、そして定量的に比較した。

40

【 0 1 4 3 】

走査型電子顕微鏡

エレクトロスピンニングラッピングしたPIJVを、走査型電子顕微鏡 (SEM) の下で測定した。簡単に説明すると、SEM用の組織セグメントを超高純度2.5%のグルタルアルデヒド中で固定し、段階的なエタノール溶液系列の中で脱水し (30~100%)、臨界点乾燥し (Emscope, CPD 750, Ashford, Kent, UK)、その後蒸発炭素により上をコーティングした (

50

Cressington Freeze Fracture Device, Cressington, Cranberry, PA, USA)。組織を、J EOL JEM-6335F電解放出電子銃SEM (JEOL, Peabody, MA, USA) を使用して可視化した。

【0144】

壊死

エレクトロスピンニングプロセスの組織生存率に対する作用を評価するため、本発明者らは、スピニングしたPIJVセグメントとシャムPIJVセグメント、ならびに非処理の新たに切り出した組織(“対照”)を調べた。組織壊死を、製造者の指示に従って、凍結切片のLive/Dead™染色(Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)により調べた。Live/Dead™染色について示された各セグメント(対照、シャム対照、およびスピニングあり)を半分に切断し、標準的なインキュベーター条件下で、ペトリ皿中での静的培養中に静置した。各セグメントの半分を培養18時間後に評価し、残りを培養92時間後に評価した。5 mmの環を各サンプルから切り出し、凍結マトリクス(TBS, Durham, NC)中に包埋し、その後凍結した。5枚の8 μm切片を各環から切り出し、落射蛍光顕微鏡(epifluorescent microscope) (Nikon, Model E800, Melville, NY, USA) を使用して20×倍率で画像化した。各切片あたり2つの画像を撮り、それによりPIJVセグメントあたり全部で10視野を定量化した。Scion Image (Version Beta 4.02, NIH, Bethesda, MD) を使用して、視野中の細胞数をカウントした。視野中の生細胞の割合を調べるため、死細胞を手作業でカウントし、細胞の総数で割り、そして100%を掛けた。死細胞の割合を、100%から差し引いて、生細胞の割合を算出した。

10

【0145】

アポトーシス

アポトーシスをIn Situ細胞死キット、フルオレセイン(TUNEL) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を使用して評価した。このアッセイは、アポトーシスのゲノムDNA切断構成要素を同定するTUNEL技術を使用する。簡単に説明すると、切片を、37 °Cにて20分間乾燥し、4%パラホルムアルデヒド中で20分間固定し、そしてリン酸緩衝塩類溶液(PBS) 中で30分間再水和した。次いで、サンプルを膜の透過化のため、10 μg/mlのProteinase K中で、その後新たに調製した0.1% Triton X-100および0.1% クエン酸ナトリウムの溶液により、室温にて10分間インキュベーションした。DNA鎖切断を、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼおよびフルオレセイン標識dUTP (両方ともRocheから購入したキット中で提供される) を用いて、37 °Cにて1時間インキュベーションすることにより同定した。核をHoechst 33258により対比染色した。サンプルの少数のセットを100 U/mlのDNase Iを用いて処理し、アッセイを行ったそれぞれについて陽性対照として使用して、効率を確認した。インキュベーション時間、温度、および試薬濃度を含む全てのサンプル調製パラメータを、DNase I処理された陽性対照を使用して最適化した。陰性対照をトランスフェラーゼ酵素なしで標識dUTPとともにインキュベーションした。

20

30

【0146】

TUNEL陽性細胞の割合の定量化を、手作業でのカウント手順を使用して行った。所定の5 μm切片に由来する5つのFOV(視野)のそれぞれから得た陽性細胞を平均し、その切片についての陽性細胞の平均割合を規定した。1つのセグメントに由来するTUNEL陽性細胞の平均割合(図10)を測定した。

40

【0147】

増殖

増殖を免疫組織化学により測定した増殖生細胞核抗原(PCNA)の発現により評価した。5 μmの切片を乾燥させ、固定し、そしてTUNELアッセイ用に上述したように透過化した。抗体の非特異的結合を、サンプルをPBS中1%ウマ血清を用いて15分間インキュベーションすることによりブロッキングした。この後、サンプルを、ヒトPCNAに対するマウスモノクローナル一次抗体(Dako Cytomation, Clone PC10, Denmark)を用いて、4 °Cにて一晩、サンプルが乾燥することを防止するために湿度の高いチャンバー中でインキュベーションした。その後、PBS中で洗浄することにより、非結合抗体を除去した。次に、切片をVectastain Elite™ホース-ラディッシュペルオキシダーゼおよびアビジン-ビオチン検出シス

50

テム (Vector Labs, Cat.# PK-6200, Burlingame, CA) の一部であるユニバーサル (抗-マウスおよび抗-ウサギ) ビオチン化二次抗体とともに、37 °C で60分間、湿度の高いチャンパー中でインキュベーションし、そして次いでPBSを用いて3回すすいだ。次いで、Vectastain™試薬を用いたインキュベーションを、室温にて30分間行った。陽性に染色された細胞を検出するため、ジアミノベンジジン (DAB) 基質 (Vector Labs, Cat.# SK-4100, Burlingame, CA) を使用した。酵素反応により、PCNA陽性細胞が茶色に染色され、それを所望レベルの染色が得られるまで顕微鏡を介して可視化した (100×倍率)。次いで、スライドを脱イオン水中におくことにより、反応を停止した。核可視化のため、細胞を、製造者の指示に従い、ヘマトキシリン (Vector Labs, Cat.# H-3401, Burlingame, CA) により対比染色した。PCNA陽性細胞の割合の定量化を、TUNELについてと同様の方法を使用して行った。

10

【0148】

SMC表現型

合成SMC表現型を検出するため、本発明者らは、ヒトゴルジ複合体に対して作製されたマウスモノクローナル抗体 (Abcam, Cat.# ab14487, Cambridge, MA) を使用した。上述した手順 (PCNAについて) と同一の手順を使用して、静脈セグメントあたりのゴルジ複合体陽性細胞の平均割合を定量化した。

【0149】

統計

血管運動性チャレンジデータについて、そして免疫組織化学像定量化データについて、平均についての対応あるスチューデントのt-テストを行い、そして $P < 0.05$ を統計的に有意であるとみなした。特に記載されていない限り、全てのデータは、平均 ± 平均の標準誤差として示される。

20

【0150】

結果

CWSプロファイル

ラップにより静脈に対して提供された構造的サポートは、本発明者らが図11において外径プロファイルを調べる際に、明らかになる。ラップを伴う静脈は、ラップなしの静脈と同じ程度のART条件の下では拡張しないことが示された。直径の減少は、以下に記載する動脈圧レベルと同一のレベルの下、静脈壁におけるCWS vs. ラッピングされていない対照におけるCWSにおいて効率的に減少した。

30

【0151】

表3.1のポリマー溶液組合せについてのCWS-対時間プロファイルは、極めて可変であった (図12)。一例 (組合せB) において、ラップは急速に分解され、そしてART条件下でのCWSの急速な増加を引き起こした。その他の組合せ (CおよびD) では、十分には急速に分解されず、そして24時間の間にはCWSの検出できる程度の増加は生じなかった。組合せAは、CWSのVENレベルとARTレベルとの間の24時間の期間にわたりほぼ直線的な変化を生じる速度で分解された。この組合せを繰り返し (N=7) そして作用が再生可能であることを見出した。

【0152】

血管運動性チャレンジの結果

典型的な血管運動性チャレンジ実験の結果を、図13に示す。シャムPIJVセグメントは、EPIによる刺激に対して、予測可能なように用量依存的に反応し、一方でスピニングされたPIJVは、最低用量のEPIによって開始する1回の収縮を示した。SNPに応答する血管拡張は、対照PIJVおよびスピニングされたPIJVの両方ともについて同様であり、それぞれの場合にベースラインの場合よりもより大きな外径を生じ、そのことは、シャムPIJVおよびスピニングされたPIJVの両方ともにおいて、特定のレベルの基本的なトーンであることを示唆する。全体としては、シャムPIJVセグメントおよびスピニングされたPIJVセグメントのあいだで、収縮レベル (図14A) または拡張レベル (図14B) の有意差は存在しなかった。

40

【0153】

50

コンプライアンスおよび -剛性

図15Aおよび図15Cにおいて、本発明者らは、動脈レベルの圧力に曝露された場合、PIJVが非常に堅い（そして従って柔軟性が非常に低い）ことを見出した。同一の血流力学条件のもと、PIJVの外膜表面にスピニングされた調整されたポリマーラッピングは、構造的な支持構造を提供され、このことは剛性の低下（図15B）およびコンプライアンスの増加（図15D）から明らかである。技術的な問題のため、シャム対照の1つについての圧力および直径の測定値は可能性がなく、そしてそのためスピニングされた群（N=6）よりも一つ少ないデータセットであった（N=5）ことに注意すべきである。

【0154】

生物学的解析

組織学

組織学的像は、それらがポリマーラッピングが静脈の外膜表面に十分に接着していたことも示された点、そしてほぼ均一な厚さでエレクトロスピンニングされていた点で、（図15Aおよび図19C）SEM像と一貫していた。さらに、ポリマーは、24時間のかん流時間の後に、ほぼ完全に分解された（図16Bおよび図16D）。

【0155】

図17は、ピクロシリウス赤で染色された静脈切片の代表的な複屈折像を示す。それぞれの像において、赤色から緑色までの色の範囲が、コラーゲン繊維の組織化の範囲を示し、赤色は最も組織化されていることそして緑色は最も組織化されていないことを示す。染色の顆粒状の外観は、天然の襞状コラーゲン繊維状態を示し、一方伸展した繊維は顆粒状ではなく筋状の外観である。これらの結果から、ART条件のもとで24時間ex vivoでかん流された対照PIJVセグメントと比較して、ポリマーラッピングは、コラーゲン繊維伸展のレベルを低下させることが示唆される（より組織化されそしてより襞状が低下したことを含む）。

【0156】

Movatのペンタクロムで染色された組織切片の代表的な像を、図18に示す。VEN条件およびwART条件の両方ともと比較した場合、ART条件のもとでかん流されたPIJVにおいて、内部弾性板が破壊されているようである。ピクロシリウス赤染色と同様に、このデータにより、ポリマーラッピングがART条件に曝露された場合の静脈壁中の伸展レベルの減少に成功したことが示唆される。

【0157】

SEM

エレクトロスピンニングした外膜ラップは、高い多孔性を示し、そして静脈の外膜表面に緊密に接着していた（図19A～図19C）。このことから、組織中への外膜からの栄養やガス拡散を阻害することなく、ラップがAVGに対する構造的サポートをもたらしていることが示唆される。別の重要な知見は、エレクトロスピンニングプロセスが、内皮層を損傷せず、連続性を維持していた、ということであった（図19D）。

【0158】

壊死

各時点についての各実験群のあいだで、組織生存率に有意差は存在しなかった（図20）

【0159】

アポトーシス

図21は、上述した4種全てのex vivo血管かん流実験に由来する、代表的なTUNEL染色の蛍光免疫組織化学像の組合せを示す。図22は、これらの実験に由来する定量化TUNEL解析の結果を示す。ART条件に対して急激に曝露されたPIJVにおけるアポトーシス細胞は、VEN対照と比較して、統計的に有意に上昇していることを見取することができる。しかしながら、cART条件を通じて（24時間および72時間の両方について）負荷されそして生分解性のエレクトロスピンニングしたポリマーラッピング（wART条件）を通じて負荷される機械的調整系列（mechanical conditioning paradigm）は、PIJV中のアポトーシス細胞の数を、AR

10

20

30

40

50

T対照条件と比較して統計的に有意に減少させた。

【0160】

増殖

図23は、上述した4種全てのex vivo血管かん流実験に由来する、代表的なHRP/ABCに基づくPCNA染色の免疫組織化学像の組合せを示す。図24は、これらの実験に由来する定量化PCNA解析結果を示す。ART条件に対して急激に曝露されたPIJVにおける増殖性細胞が、VEN対照と比較して、統計的に有意に減少していることを見取ることができる。しかしながら、cART条件（24時間）通じて負荷され、そして生分解性のエレクトロスピンングしたポリマーラッピング（wART条件）を通じて負荷された機械的調整系列（mechanical conditioning paradigm）は、PIJV中の増殖性細胞の数を、ART対照条件と比較して、統計的に有意に減少させた。cART条件に対して72時間曝露されたPIJVにおける増殖性細胞の数は、ART対照の場合と比較して統計的に有意には相違しなかった。

10

【0161】

SMC表現型

図25は、上述した4種全てのex vivo血管かん流実験に由来する、代表的なHRP/ABCに基づくゴルジ複合体染色の免疫組織化学像の組合せを示す。図26は、これらの実験に由来する定量化したゴルジ複合体解析の結果を示す。ART条件に急激に曝露されたPIJVにおけるゴルジ複合体についての細胞染色陽性の数は、VEN対照と比較して、統計的に有意に上昇していることを見取することができる。cART条件（24時間および72時間の両方について）を通じて負荷され、そして生分解性のエレクトロスピンングしたポリマーラッピング（wART条件）を通じて負荷される機械的調整系列（mechanical conditioning paradigm）は、PIJV中でゴルジ複合体について陽性に染色される細胞数の増加を、ART対照条件と比較して、統計的に有意に阻害する傾向のみが示唆される。

20

【0162】

検討

この節で示される結果は、生分解性のエレクトロスピンングしたポリマーラッピングが均一に（図16）そして安全に（図13および図14）静脈セグメント上にエレクトロスピンングすることができることを示し、そしてラップを完全に分解して（図16）、CWSを所望の速度でAVGに対して適用することができることを示す（図12）。外膜に配置したエレクトロスピンングしたポリマーラッピングの生分解速度を制御することにより、AVGにおけるIHを減弱するための3つの有益と考えられる支持様式を、それ自体にもたらすことができた。ここで示されるように、生体力学的支持を、所望の速度で送達することができる。結果的に、生化学的支持の送達（薬物性）、および生物学的支持の送達（細胞性）は両方とも、理論的には同じアプローチを使用して達成することができる（Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, and Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials*. 2006;27(5): 735-44 ;そしてStankus JJ, Soletti L, Kazuro F, Hong Y, and Vorp DA. Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization. 2007;Accepted)。

ポリマーラッピングのAVG微細構造に対する有益と考えられる作用が、ピクロシリウス赤染色およびMovatペンタクロム染色から得られた（それぞれ、図17および図18）。ポリマーラッピングは、AVGに対して構造的支持をもたらすようであり、コラーゲン繊維のより天然の襞状の構造（図17）、ならびに内部弾性板のより低い損傷（図18）を生じた。AVG壁を含む構造的タンパク質の完全性を維持することは、血管のECやSMCにより受け取られる有害な機械的誘因を最小化することに役に立つことができ、そしてAVGにおけるIHを減弱することの役に立つこともできる。本発明者らは、エレクトロスピンングしたPIJVにおいて、Live/DeadTM染色を介して壊死レベルも評価し、そしてシャム対照および静的対照に対して、エレクトロスピンングによる壊死の見取取ることができる増加は示されなかった（図19）。血管運動性チャレンジデータに加えてこのデータは（図13および図14）、組織生存率がエレクトロスピンングにより影響を受けないことを示すことがより明らかである。

30

40

50

【 0 1 6 3 】

免疫組織化学の結果により、AVGを動脈レベルのCWSに対して急激に曝露することと比較して、穏やかに曝露することが有益である可能性があることが示唆される。それぞれ図22および図24において示されるように、PIJVをART条件に対して急激に曝露することにより、VEN対照と比較して、アポトーシスと増殖との間のバランスが破壊されることが示された。ART条件に対してかん流されたPIJVにおいて、アポトーシスの増加および増殖の減少が観察されたことにより、静脈の生体力学的環境の変化により、細胞機能における急激な変化が存在することが示唆される。静脈内の細胞機能のこの変化は、cART ex vivoかん流条件およびwART ex vivoかん流条件を通じて、CWSの動脈レベルのより穏やかな負荷により、阻害されることが示された。さらに、予想されたように、ART条件に対して曝露されたPIJVにおけるゴルジ複合体発現レベルは、VEN対照と比較して増加した（図26）。このことにより、SMC表現型を、より合成状態へと修飾することが示唆される。この観察された細胞機能の変化は、cART条件またはwART条件を通じてARTレベルのCWSに対して徐々に曝露されることによっては、統計的に有意には阻害されなかった。しかしながら、この変化の阻害に関して観察された傾向は、図26に示された。この傾向が統計的に有意となるかどうか、追加の実験が必要である。

10

【 0 1 6 4 】

ART条件に対してPIJVを曝露することから生じるSMC表現型の観察された変化は、以前に報告されたデータと一致する（Simosa HF, Wang G, Sui X, Peterson T, Narra V, Altieri DC, and Conte MS. Survivin expression is up-regulated in vascular injury and identifies a distinct cellular phenotype. *J Vasc Surg.* 2005;41(4): 682-90 ; Zhang WD, Bai HZ, Sawa Y, Yamakawa T, Kadoba K, Taniguchi K, Masuda J, Ogata J, Shirakura R, and Matsuda H. Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999;30(1): 169-83 ;そしてWolff RA, Malinowski RL, Heaton NS, Hullett DA, and Hoch JR. Transforming growth factor-beta1 antisense treatment of rat vein grafts reduces the accumulation of collagen and increases the accumulation of h-caldesmon. *J Vasc Surg.* 2006;43(5): 1028-36)。AVGに対して動脈レベルのCWSをより徐々に負荷するというこの概念は、以前には報告されていなかったものであるが、しかしSMCの表現型変化を遅らせるかまたは阻害するための手段を生じることができ、過形成反応を結果的に減少させることができる。ARTに対して曝露されたPIJVにおけるアポトーシスの低下も、VEN条件と比較して、公開された結果と一致している（Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, and Kent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery.* 2002;132(2): 317-25 ; Pintucci G, Saunders PC, Gulkarov I, Sharony R, Kadian-Dodov DL, Bohmann K, Baumann FG, Galloway AC, and Mignatti P. Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of topical mapk inhibition in arterialized vein grafts. *Faseb J.* 2006;20(2): 398-400 ; Alcocer F, Whitley D, Salazar J, Jordan W, and Bland KI. Mutual exclusion of apoptosis and hsp70 in human vein intimal hyperplasia in vitro. *J Surg Res.* 2001;96(1): 75-80 ; Igase M, Okura T, Kitami Y, and Hiwada K. Apoptosis and bcl-xs in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries. 1999;96(6): 605-12 ; Kamenz J, Seibold W, Wohlfrom M, Hanke S, Heise N, Lenz C, and Hanke H. Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3): 766-76 ;そしてWang GJ, Sui XX, Simosa HF, Jain MK, Altieri DC, and Conte MS. Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10): 2081-7)。しかしながら、ARTかん流されたPIJVにおける増殖の減少は、VEN群、cART群、およびwART群と比較して、いくつかの公開されたデータとは一致していなかった（Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, and Yasuda K. Induction of angiotensin converti

20

30

40

50

ng enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002;21(3): 250-5; Predel HG, Yang Z, von_Segesser L, Turina M, Buhler FR, and Luscher T F. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet.* 1992;340(8824): 878-9 and Dethlefsen SM, Shepro D, and D'Amore PA. Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res.* 1996;33(5): 405-13)。しかしながら、Liu et al.は、動脈血行動態による機械的な伸張が、細胞死を引き起こし、それがおそらくはそれに続いて生じる細胞増殖を媒介すると示唆した (Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, and Kent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery.* 2002;132(2): 317-25)。この文献において研究された短時間の時間点は、ARTかん流したPIJVにおけるアポトーシスの初期の増加後の増殖が増加することを示すためには、十分な長さではなかった。

【 0 1 6 5 】

この節のいくつかの限定に注意しなければならない。Live/Dead™アッセイは生細胞および生組織中の壊死を評価するために広く使用されているが、本発明者らの用途のためには理想的には適していなかった。これは、血管組織の厚みを介して拡散することができる距離が限定されていたためである。染色が静脈壁の血管内膜層および外膜層において主として生じるのに対して、培地はシグナルを大幅に欠損したことが観察された。ポリマーラッピングと静脈壁との接触領域(すなわち、外膜)において、ならびに円筒と静脈壁との接触領域(すなわち、管腔)において、エレクトロスピンングプロセスの有害作用が存在したことは確かである。Live/Dead™アッセイは、これらの領域の両方ともで十分に機能したようであり、そして対照組織と比較した場合に壊死レベルの見て取ることができる増加は示されなかった。さらに、血管運動性チャレンジデータは、スピニングされたPIJVが、シャム対照と同じ強度で接触することができたことが示され、それが組織の中間層を含むSMCの生存性を示した。最後に、本発明者らは、ベースライン対照反応 - すなわち、新たに切り出されたPIJVセグメントを有するもの - に対するシャムPIJVとスピニングされたPIJVの血管運動性反応を概念的に比較した。しかしながら、本発明者ら動物あたり2つのPIJVセグメントしか得ることができなかつたため、迅速な試験のためにPIJVの3番目のセグメントを得ることは実現できなかつた。本発明者らがエレクトロスピンングのみと関連する差異を評価することを求めた点で、本発明者らは、ベースライン対照に対するシャム対照の選択が許容可能であったと考える。

【 0 1 6 6 】

結論

本発明者らはここで、生存率または機能を低下させることなく、調整可能なポリマーラッピングを静脈セグメントに対して適用することができることを示し、そして1つの潜在的な適用を示した；すなわち、動脈レベルの圧力に対して曝露されたラッピングされた静脈において、中間壁CWSを徐々に負荷することである。急激な曝露ではなく、動脈レベルのCWSに対して徐々に負荷すること、AVGの過形成反応を減少させるための重要な新たな手段であり、それどころか安全な動脈化を促進する可能性がある。

【 0 1 6 7 】

医薬品または細胞のいずれかを外膜ポリマーラッピング中に含ませることは、可能性のある将来の適用を示しており、そしてAVGの開存性をさらに向上させる可能性がある。本発明者らの知見のため、生分解性AVGラップ/鞘を通じた細胞性支持の対照化された送達は、以前に報告されておらず、そして従って、外膜ラップの可能性のある将来的な適用は新規である。この報告中で使用されたポリマーは特性決定されており、そして可視的SMCによりうまくマイクロ集積化され、そしてそれ自体にこの可能性のある将来的な適用をもたらすことができる。

【 0 1 6 8 】

実施例4 - In Vivo動脈性静脈移植

8例 (n=8) の“概念実証”頸動脈挿置静脈移植片実験を行った。本発明者らは、頸動脈挿置移植片として、前臨床モデルにおいて移植された静脈セグメントの急性そして慢性増殖反応に対する、エレクトロスピンニングしたPEUU外膜ラップの穏やかな作用を評価したかった。このため、本発明者らは、ブタについて片側性自家頸動脈挿置移植片プロトコルを使用した。ブタを2群に分けた：“スピニング”したAVG群と“シャム対照”AVG群である。それぞれの動物は、それ自体の静脈移植片ドナーとしての役割を果たした。簡単に述べると、PIJVを実施例2において記載したように回収し、そしてそれを実施例2で記載されたエレクトロスピンニングを使用して実施例2において記載された同一のラップ組成物および厚さでスピニングするか、またはシャム対照として記載した。同様に、エレクトロスピンニングしたポリマーラッピングなしのシャムPIJVセグメントに関して、本発明者らは、実際にポリマーラッピングを設置する点まで（すなわち、円筒の挿入を含み、そして電場中で静脈を回転し/平行移動する）エレクトロスピンニングプロセスを模倣した。次いで、AVGを、頸動脈挿置移植片として（以下に記載した通り）シャム対照群においてIHが限定的に明らかになるために十分な移植期間である30日間（または不可逆性の合併症が観察される際）移植し（Angelini GD, Bryan AJ, Williams HM, Morgan R, and Newby AC. Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3): 433-9; Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9; そしてJeremy JY, Dashwood MR, Timm M, Izzat MB, Mehta D, Bryan A J, and Angelini GD. Nitric oxide synthase and adenylyl and guanylyl cyclase activity in porcine interposition vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 1997;63(2): 470-6）、それに対してスピニングした群を比較した。血管造影を介して開存性を評価することに加えて、取り出したAVGをIHの組織学的評価のために処理した。in vivo研究の定量した終点は、厳密に組織学的性質のものであったことに注意すべきである。

【0169】

方法

片側性ブタ頸動脈挿置移植

動物を実験の日の前に設備中に7～10日間入れ、そしてNPOで12時間維持し、その後外科手術した。外科手術に先だって、動物をアセプロマジン（0.15 mg/kg IM）およびケタミン（15.0 mg/kg、IM）の組み合わせで麻酔し、挿管し、そしてイソフルラン（酸素中1～3%）を用いて麻酔の外科手術相で維持した。いったんそれぞれの動物を毛刈りしそして手術のために準備した後、外科用スーツ内に移動し、陽圧換気条件におき、そしてモニタリング装置（ECG）を備えた。脈拍酸素測定および血圧を外科手術の間ずっとモニタリングした。麻酔の誘導の後、無菌外科手術を行った。

【0170】

片側性頸部切開を行い、総頸動脈動脈を曝露した。次いで、動物をヘパリン化し（300 UI/Kg）、そして無傷血管鉗子を使用して動脈の近位および遠位を鉗子で止めた。鉗子間のセグメントを切り出した（約6 cm）。それぞれのブタは、それぞれの移植片ドナーとして機能した。新たな片側性IJVの採取を、上述したように、ブタに対して行った。次いで、採取されたIJVをスピニングするか（上述し、そしてStankus et al. [47]において記載されたように）、またはシャム対照として指定した。次いで、静脈セグメントを、断続7-0プロレン縫合を使用して（端-端）、片側性頸動脈挿置移植片として移植した。

【0171】

手術後に、動物を回復させ、そして集中治療装置中で飼育した。外科手術後そして吸入麻酔の終了後、飲み込み反射および防御的咳反射が機能していることが示された場合に、動物から抜管した。動物を24時間継続的にモニタリングし、そして以下のパラメータを毎時間毎に記録した：心拍数、脈拍数の強さ、毛細血管再充満時間、呼吸数、尿量、そして排便。体温を調べ、そして2時間毎に記録した。動物を温かく乾燥した状態で維持し、低

体温症を防止した。ブプレノルフィン塩酸塩 (0.005 ~ 0.01 mg/kg、IM、q12h) を痛みどめのために一定の間隔で4日間投与し、そして疼痛の兆候が示された場合には疼痛管理のために投与し続けられた。動物における急性の疼痛は、防御、発声、損傷、情動不安、通常ではない長い時間の横臥、抑鬱 (動きたがらないことまたは起きあがるのが困難なこと)、または異常外観 (頭位低下、腹部の丸め込み、猫背) により表現される。皮膚のホチキス/縫合は、手術後10日後に除去された。全ての動物は、獣医師、登録獣医テクニシャン、および動物ケア職員の訓練を受けたスタッフにより、毎日モニタリングされた。

【0172】

抗-凝固処方を使用して、血栓形成を通じた急性AVG機能不全に対応した。アスピリン (325 mg/日) およびプラビックス (75 mg/日) の経口投与を両方とも、手術の3日前から開始した。アスピリンを手術後30日間の期間にわたりずっと毎日投与し、そしてプラビックスを手術後14日間のみ毎日投与した。

10

【0173】

30日間の生存期間の後 (または不可逆的な合併症が観察された際)、動物を安楽死させた。ブタを0.15 mg/kg IMのアセプロマジン、および30.0 mg/kg IMのケタミンの組合せにより深く麻酔し、そして次いで静脈内に塩化カリウムの過剰量を注射して心臓停止を誘導することにより、動物を安楽死させた。生命兆候を確認のためにモニタリングした。

【0174】

蛍光透視血管造影

安楽死の後そして移植片外植の直前、蛍光透視血管造影を行って、移植片開存性を評価した。隣接する移植片吻合物の上流およそ3 cmで頸動脈動脈を鉗子で止め、そして造影剤を鉗子のすぐ遠位側の頸動脈中に注入した。血管造影図を記録して (Model OEC 9800 Plus, General Electric Inc.)、移植片セグメント全体を通じた流れを確認した。流れが移植片を通じて確立されていない (すなわち閉塞のため) 場合、血管造影を行わなかった。

20

【0175】

外植後組織プロセッシング

移植片を取り出しそして半分の組織を4%パラホルムアルデヒド中ですぐに固定し、そして以下に記載するように組織学的に解析した。もう半分の組織を、この節で上述したようにSEM解析用に超高純度2.5%グルタルアルデヒド中で固定した。

【0176】

IHの組織学的測定

外植移植片の中央部領域に由来する切片について、形態学的解析を行った。標準的なMovatペンタクロム染色技術を使用して、血管内膜厚および中膜厚を測定した。中膜厚対血管内膜厚比を、これらの測定値から算出した。測定を4つの視野について行い、そして平均化して各AVG切片について1つの値を得た。

30

【0177】

走査型電子顕微鏡

上述した手順と同一の手順を使用して、in vivo実験に由来する外植AVGを処理し、そして画像化した。

【0178】

統計

非対応スチューデントのt-テストを中膜厚対血管内膜厚比のデータに対して行った。P < 0.05は、統計的に有意であるとみなされた。特に記載しない限り、データは平均 ± 平均の標準誤差として示される。

40

【0179】

結果

外膜ポリマーラッピングは、動脈圧の下で、天然の静脈に対するものと一致した直径でのAVGの維持のすぐにわかる作用を有していた (図27の中央欄と右欄とを比較)。さらに、ラッピングされたAVGは、天然の頸動脈動脈と類似する拍動性の放射状偏位 (radial excursions) (すなわち、コンプライアンス) が示され、一方ラップをはずされたAVGは、

50

堅いチューブのようであり、検出可能な拍動は見られなかった。すなわち、対照移植片を通じた流れを確立する際、天然の頸動脈動脈およびスピニングされた静脈とは異なり、シヤム対照静脈は、拍動性の圧力に対して直径が変化しなかったことを観察した。

【0180】

行われた8回のin vivo実験のうち、わずか1回の実験が完全に成功した。すなわち、スピニングされたブタおよびシヤムブタの両方に由来するAVGが、30日後に100%開存していた。これらのAVG血管造影は、図28中に見出すことができる。実験の残りは、3つの理由のために失敗したとみなされた：1) IHまたは血栓形成による、スピニングされたAVGおよびシヤムAVGの一方または両方の部分的な閉塞；2) スピニング群の動物1頭の死亡を引き起こす手術後合併症；そして3) 手術後1週間後にスピニング群における1頭の動物を安楽死させる必要を生じる感染。しかしながら、2例の開存したAVGおよび部分的にのみ閉塞したAVGにより（シヤム、N=6；スピニング、N=4）、本発明者らは、形態学的測定を行い、2群間での比較のため、IH発生を評価した。形態解析において使用されたMovatのペンタクロム染色の代表的な像を図29中に示し、それはサンプル測定も示す。定量化された結果を、図30において示すことができる。スピニング群vs.シヤム対照群での中膜厚対血管内膜厚比のあいだに、統計的に有意な傾向のみが存在しているようである。

10

【0181】

AVGのSEM像を、完全に成功した1例の実験（図31Aおよび図31B）ならびにAVGが完全には閉塞しなかった別の実験（図31Cおよび図31D）から、採取した。静脈移植片と動脈との吻合接合部分は、縫合線により示されるが、それぞれの像において見出すことができる。

20

【0182】

検討

本発明者らは、スピニング群とシヤム群との間の中膜厚対血管内膜厚比における統計的に有意な差異の傾向のみを観察したが、実験数が増加すれば、この差異は統計的に有意になると考えられる。定量化された形態学的結果ならびに定性的なSEMの結果から、エレクトロスピニングされた生分解性ポリマーラッピングは、AVGに対して実際に好ましい作用を提供することが示唆される。しかしながら、これらの作用が実際に一貫して有益であるかどうかを調べるためにはさらなる研究が必要である。機械病理学的データに関連する固有の可変性に加えて、様々な経験を有する3人の外科医が手術を行ったことによっても、本発明社らの結果に可変性が導入された。正常な1層のAVG（シヤム群）の代わりに、2層にされたAVG（スピニング群）を使用して吻合部を作製したことにに関して、“学習曲線”が存在することも確かである。何らかの新しい手術方法でも同様に、外科手術を行う外科医の安心度が増加するにつれて、手術の成功率は結果的に上昇する。

30

【0183】

外部鞘を使用してAVG IHを減少させることを試みた以前の研究（上述）は、様々な動物モデルにおけるAVGに対して、機械的支持（この文献において上述した）そして生化学的支持を送達することに焦点を当てた。これらの以前のアプローチの臨床解釈は、2つの主要な限定により行われなかった。具体的には、彼らは全て、緩い/生分解性の鞘または緩い/生物耐久性鞘のいずれかを使用した。本研究においては、本発明者らは、きつく適合しそして生分解性のポリマーにより、AVGを安全に“ラップ”するための手段を開発することにより、これらの限定に対して対処することを望んだ。

40

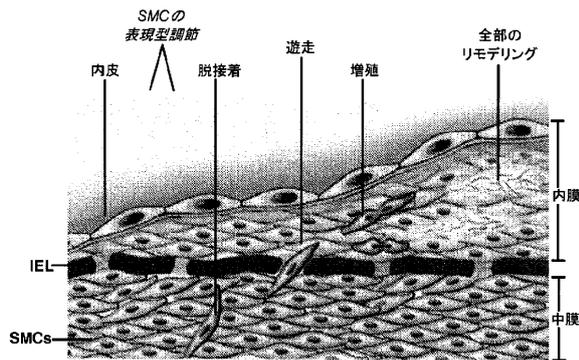
【0184】

ここで手時する研究に対する限定が存在する。シヤム対照がスピニングされたAVGと対応していない（すなわち、同一のブタに由来する）という事実により、本研究における統計的な強力さが低下する。しかしながら、使用された対応していない実験デザインは、動物における手術後合併症を回避するために、必要であるとみなされた。本発明者らは、脳からの静脈血液の戻りが過度に変化しないため、両側性ではなく片側性手術を行うことがより安全であると考えた。別の限定は、手術を行った外科医の経験の差異に由来する。AVGの開存性率が増加する場合に、結果は、より統計的に有意であると考えられる。手術が全て最も経験豊富な外科医により行われた場合、エレクトロスピニングした生分解性ポリ

50

マーラッピングは、シャム対照と比較して、AVGにおけるIHを有意に減少することができる。3つめの限定は30日の移植期間が短すぎたという点である。おそらくは6ヶ月程度の長さのより長い期間の実験が、本発明社のアプローチのAVG IHの減少における有効性が経過のあいだ維持されるかどうかを決定するために、必要とされる。

【図1】



【図3】

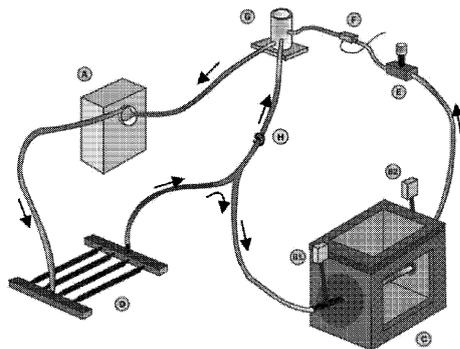
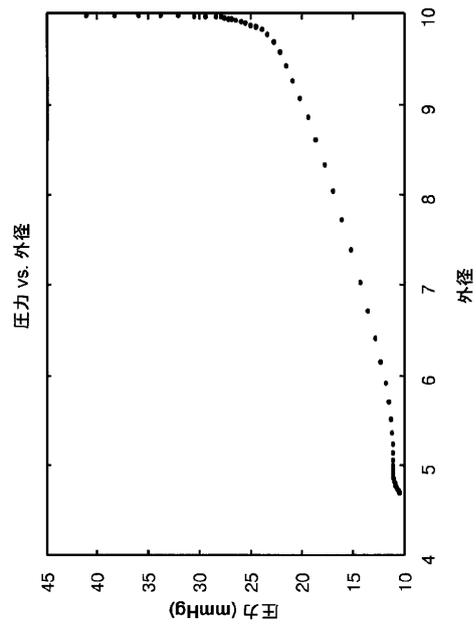


Fig. 3

【図4】



【 図 5 】

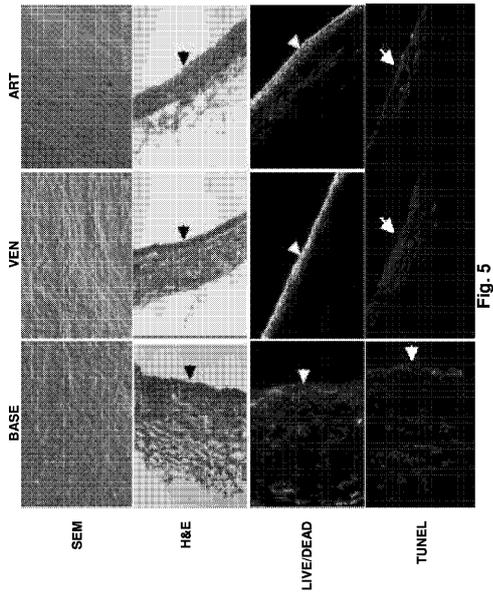
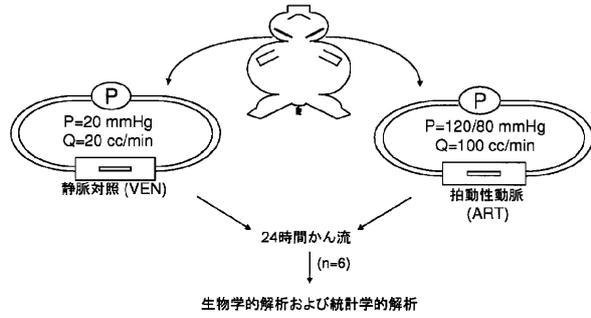
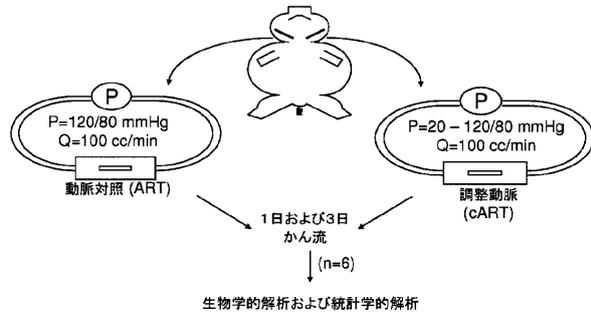


Fig. 5

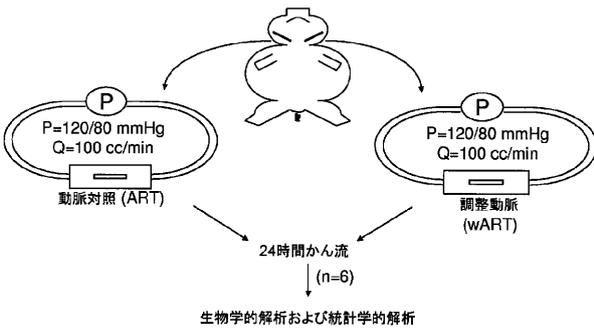
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

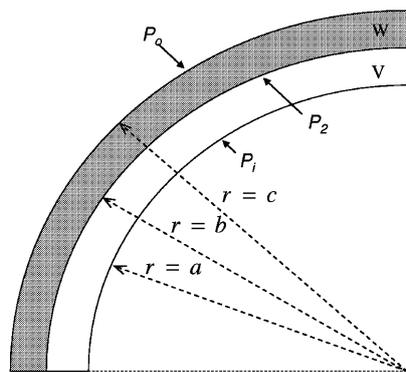
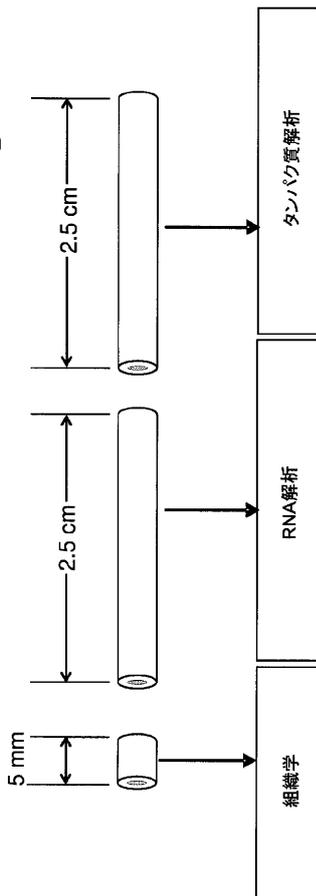
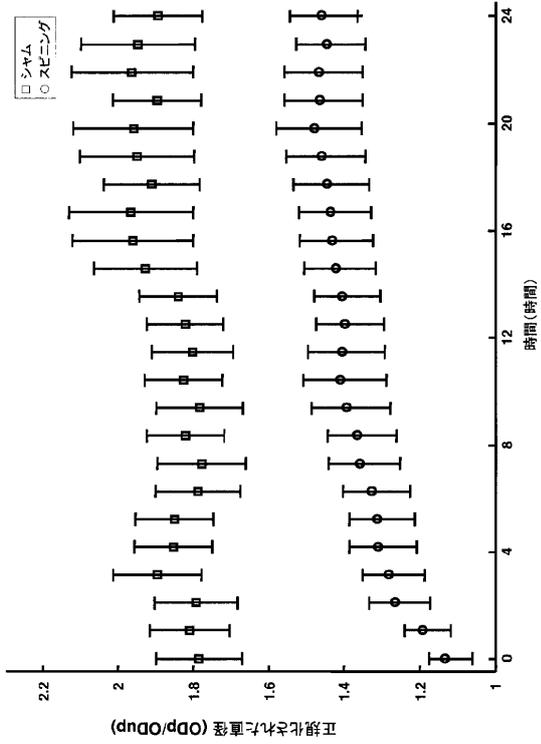


Fig. 9

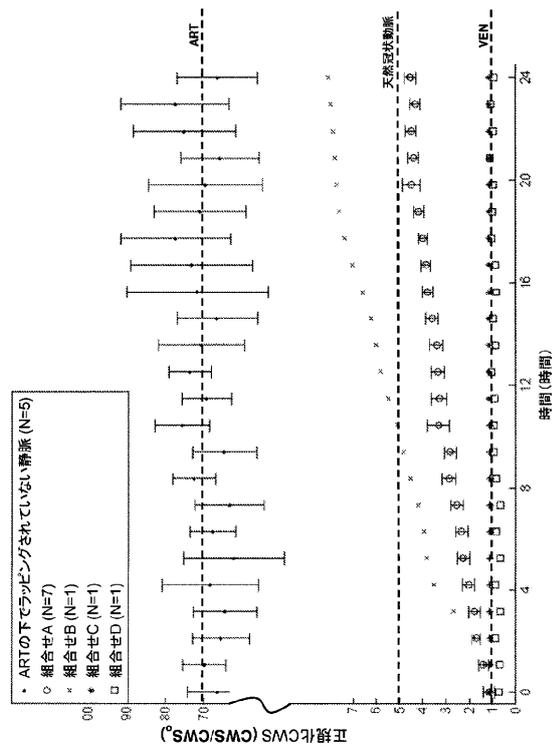
【 図 10 】



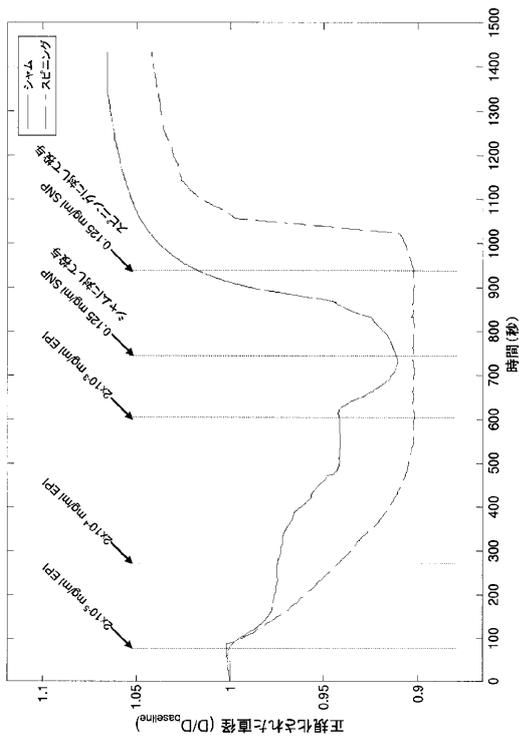
【図 1 1】



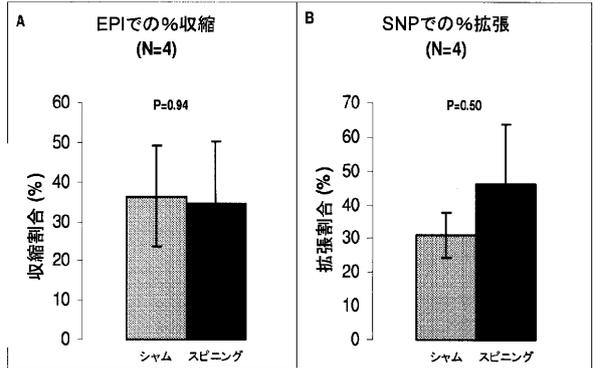
【図 1 2】



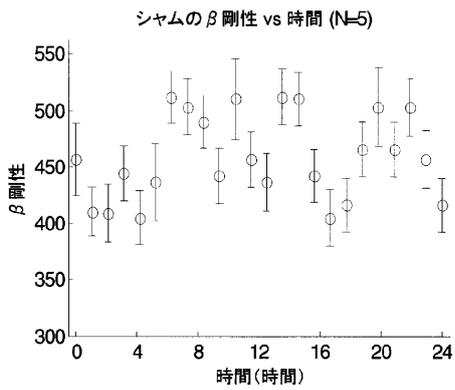
【図 1 3】



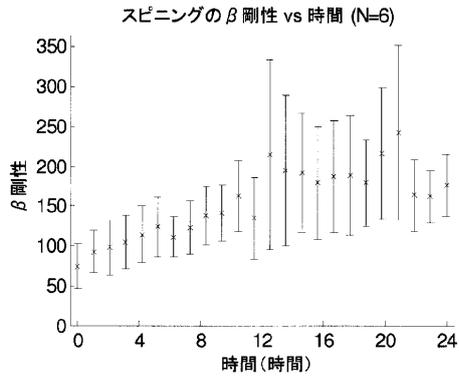
【図 1 4】



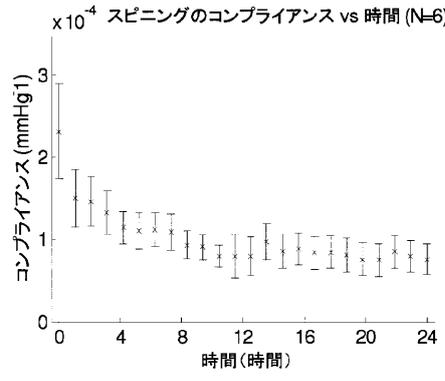
【図 1 5 A】



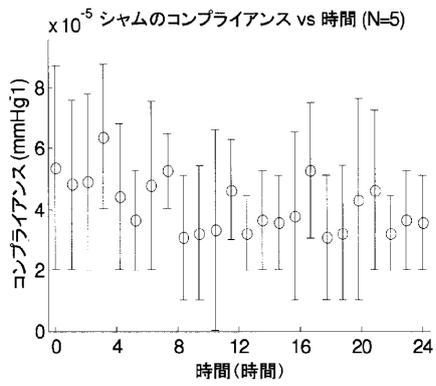
【 図 1 5 B 】



【 図 1 5 D 】



【 図 1 5 C 】



【 図 1 7 】

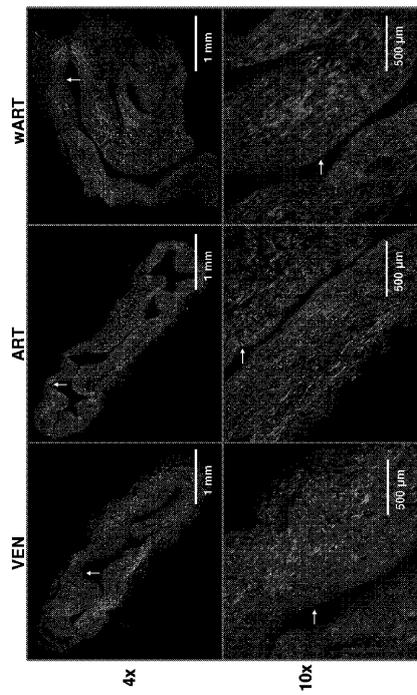


Fig. 17

【 図 1 8 】

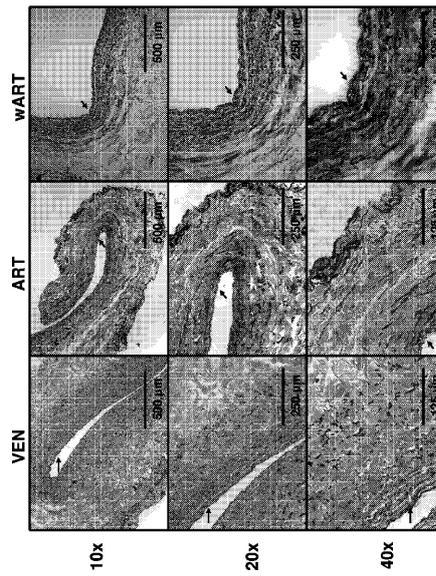


Fig. 18

【 図 19 】

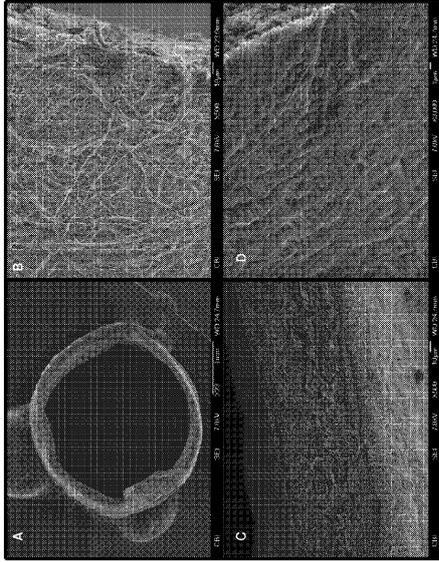
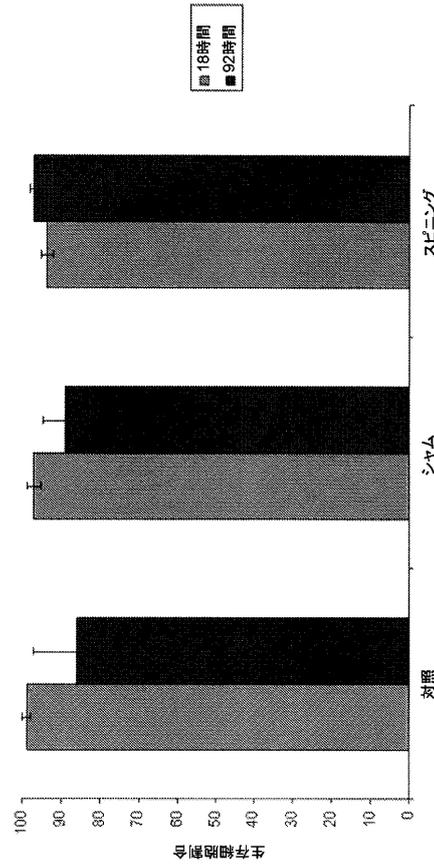


Fig. 19

【 図 20 】

Live/Dead™染色を用いた組織生存率 (N=1)



【 図 21 】

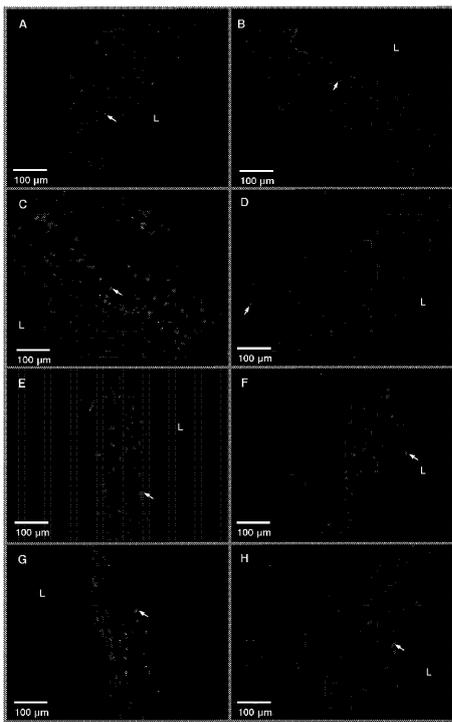
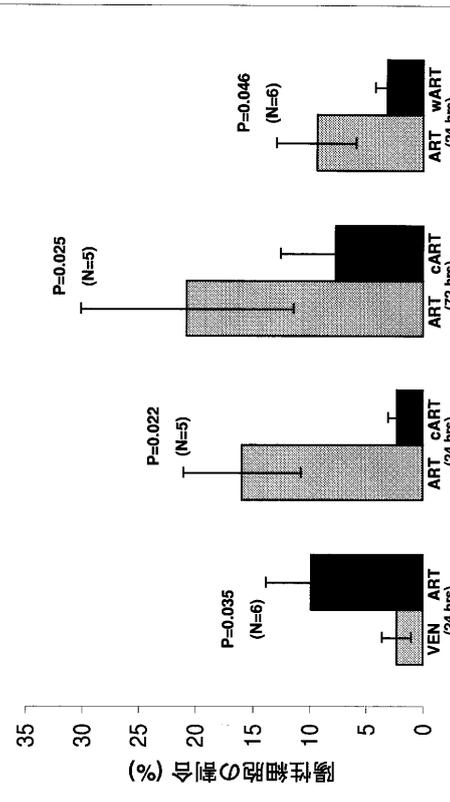


Fig. 21

【 図 22 】

TUNEL解析の結果



【 図 2 3 】

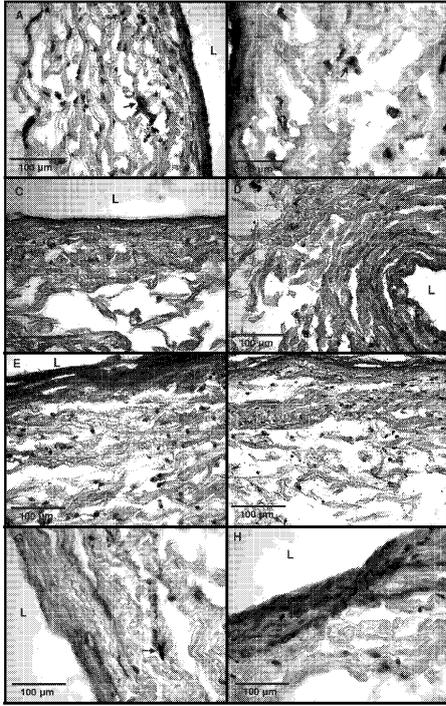


Fig. 23

【 図 2 5 】

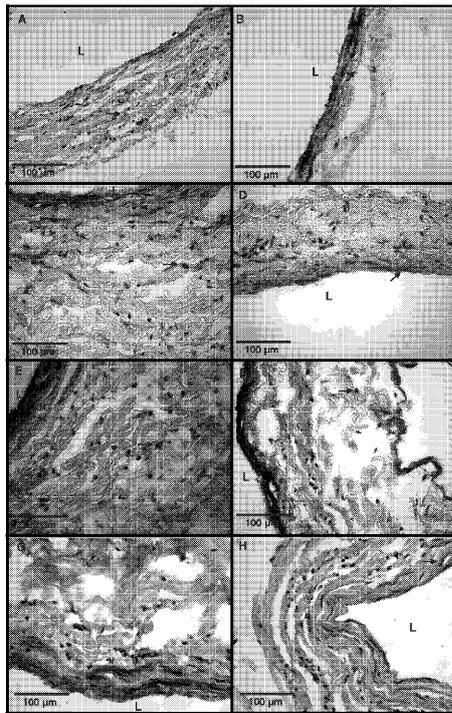
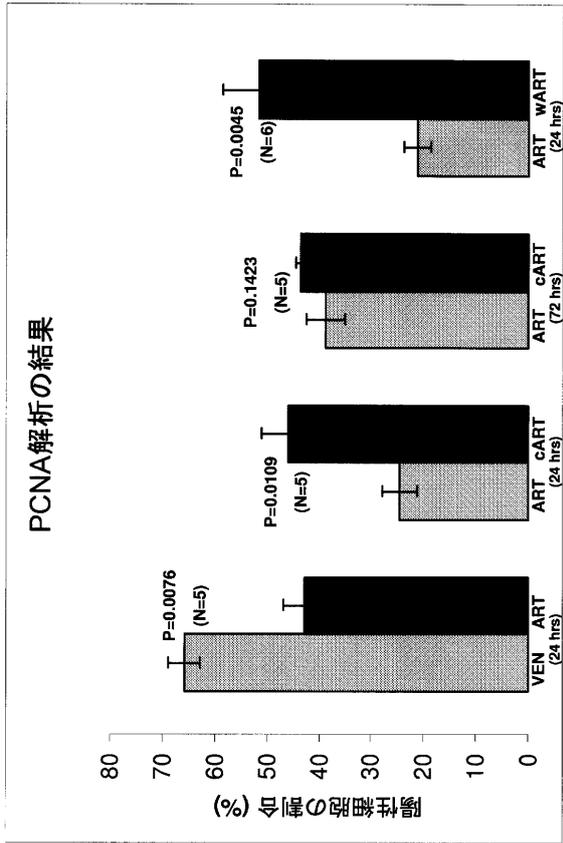
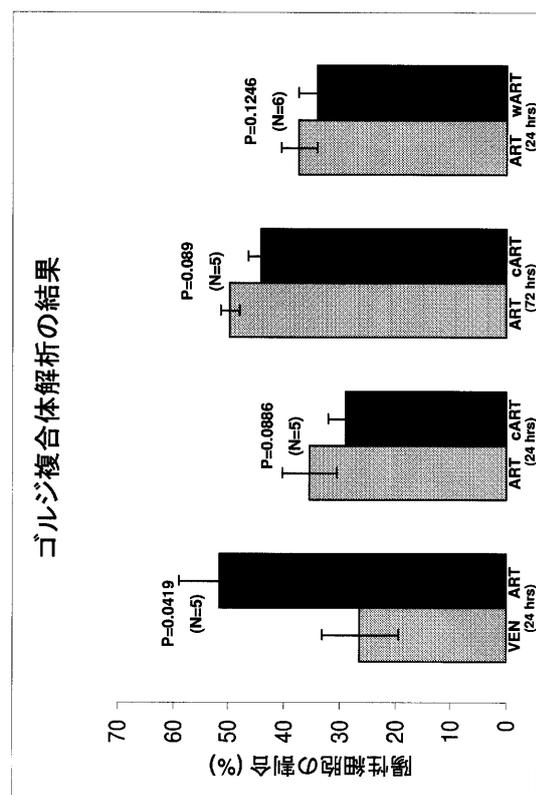


Fig. 25

【 図 2 4 】



【 図 2 6 】

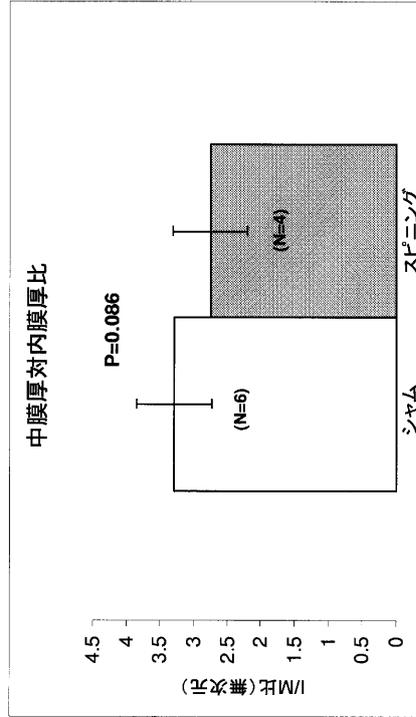


【 図 27 】

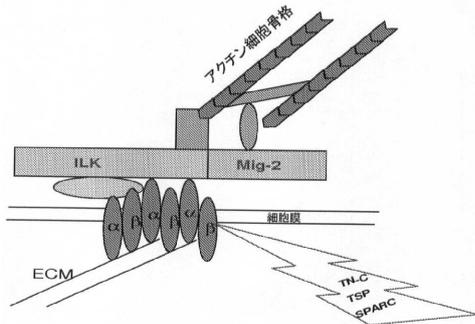


Fig. 27

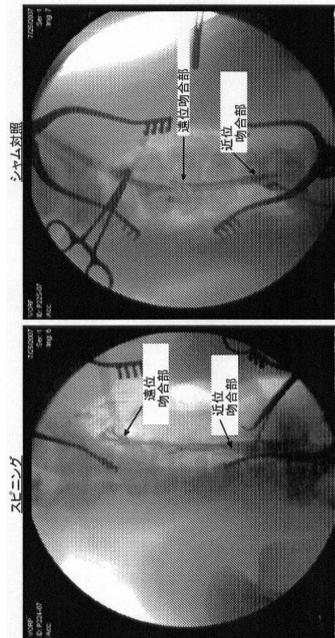
【 図 30 】



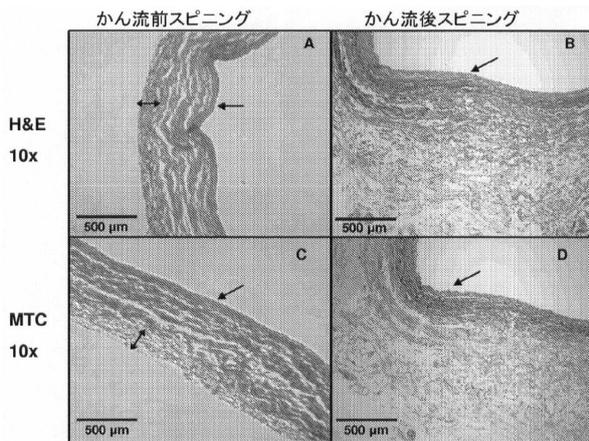
【 図 2 】



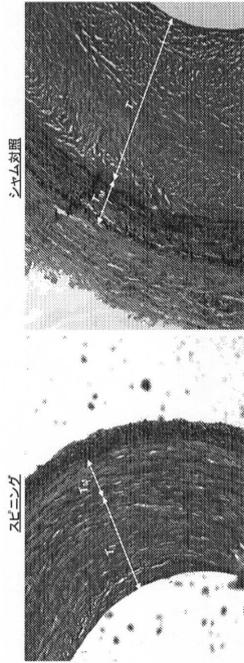
【 図 28 】



【 図 16 】

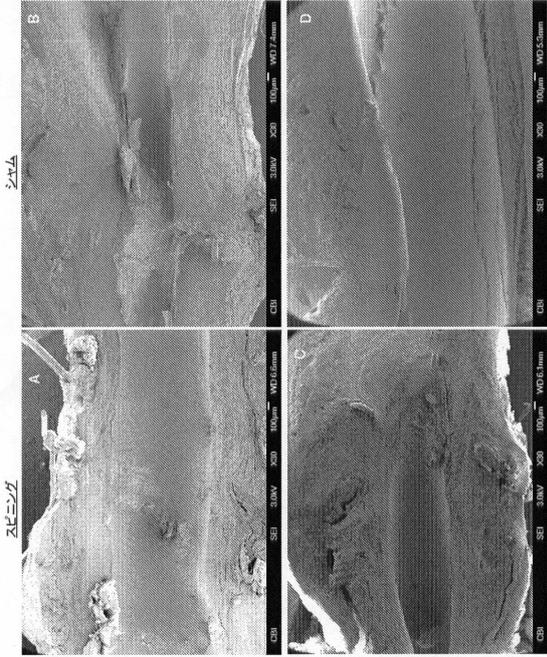


【 図 29 】



$$T_{I:M} = \frac{T_I}{T_M}$$

【 図 31 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100118902
弁理士 山本 修
- (74)代理人 100117813
弁理士 深澤 憲広
- (72)発明者 エル・クルディ, モハメッド
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15203, ピッツバーグ, ミッション・ストリート 3113
- (72)発明者 ホン, イ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15213, ピッツバーグ, マリポー・ストリート 4733,
サードフロアー
- (72)発明者 ソレッティ, ロレンツォ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15221, ピッツバーグ, トレントン・アベニュー 823,
アパートメント 3
- (72)発明者 スタンクス, ジョン・ジェイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州95008, カンベル, サニーオークス・アベニュー 820
- (72)発明者 ヴォーブ, デヴィッド・エイ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15237, ピッツバーグ, アレンベリー・ドライブ 437
- (72)発明者 ワグナー, ウィリアム・アール
アメリカ合衆国ペンシルバニア州15090, ウェクスフォード, サドベリー・ドライブ 101
93

合議体

- 審判長 新居田 知生
審判官 小久保 勝伊
審判官 小川 慶子

- (56)参考文献 特表2006-515186(JP, A)
特表2004-525272(JP, A)
国際公開第2006/044904(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

- A61L15/00-33/00
A61F2/00-4/00