

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15513

研究課題名(和文) Biotube 成長への挑戦 ～若齢ビーグル犬モデルの作製から実証へ～

研究課題名(英文) Challenging Biotube growth ~From fabrication to verification of a juvenile beagle model~

研究代表者

古越 真耶 (Furukoshi, Maya)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：20739247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は体内で作製可能な再生型人工血管Biotubeにおける成長性について追求した。得たい形状の組織体を型どる鑄型を生体皮下に2ヶ月程度埋め込み、その後に摘出すると鑄型の計上に沿った自己結合組織のみから形成される移植用組織体を得られる再生医療技術である生体内組織形成術(IBTA)を用いた研究である。

この技術を用いて作製した人工血管Biotubeは生体血管に移植するとその領域で生着し、組織再構築が起こり血管様構造へと再生する。これを若齢ビーグル犬頸動脈に移植すると移植後に生体血管の成長に追従して口径および長さが拡大し、Biotube自体が生体血管とともに成長することが本研究でわかった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that growth ability of “Biotube” vascular grafts which can be made in a living body. Biotubes are made by in body tissue architecture technology (IBTA), which is one of regenerative medical technology. Only by embedding a mold into subcutaneous pouches of a living body for 2 months, an autologous implantable tissue with desired shape and size can be obtained.

When a Biotube implanted into native arteries, it can engraft to native tissues and then regenerate to three-layered vascular construction within few months. In this study, we confirmed that after implantation of Biotubes into common carotid arteries of juvenile beagles, their diameter and length increased according to the growth of native arteries. This results suggested that Biotubes have growth potential in a living body.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：成長性 再生医療 Biotube 人工血管 小児血管外科

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は新生児の約 1%と決して少ない確率ではなく、重症度によっては早期に外科治療を行う必要がある。しかし、小児心臓外科、血管外科治療において小児のサイズに適した人工血管や人工弁は少なく、また人工物を小児に移植すると、その後成長を迎える患者に対して人工物がサイズミスマッチを生じる。その結果、成長を見越して治療時期を設定する必要や、繰り返しの外科治療が必要となるなど、患者およびその家族に対し身体的・経済的負担が大きい。

2. 研究の目的

我々が提唱している生体内組織形成術 (IBTA) を用いて作製する管状自己結合組織体 Biotube は、口径を所望のサイズに調整することが可能な人工血管である。再生医療技術であるが、細胞培養などの生体外の操作の必要はなく、所望の形状を模した鋳型を生体皮下に 1~2 ヶ月程度埋め込むだけで、鋳型の形状に刺った組織体を作製可能である。Biotube は移植後数ヶ月内に生体血管に生着し、自己血管様組織へと再生される。血管の一部となった Biotube は、成長期を迎える体内では生体血管と同様に成長性を有する可能性が期待できる。そこで、本研究では動物モデルを作製して Biotube の成長性について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小口径 Biotube の開発：従来の Biotube は壁厚が非常に薄く、操作性に難点があった。そこで、本研究ではまず壁厚を増した Biotube の開発を行った。鋳型設計を行なったのち、得られた Biotube の物性評価および組織学的評価を実施した。また、従来の Biotube との比較も行なった。

(2) 成犬ビーグル大腿動脈への Biotube 移植：(1)で開発した Biotube を成犬ビーグルの大腿動脈に移植し、末梢血管での開存性評価及び、移植時の操作性について評価した。また、移植は作製した Biotube を違う個体に移植し、同種移植の可能性についても評価した。

(3) 若齢ビーグル犬を用いた成長モデルの作製：Biotube を予め成犬ビーグルで作製し、生後 11 週齢のビーグル犬頸動脈に同種移植したのち、生体の成長とともに経時的に血管造影を実施し、生体血管と移植 Biotube の口径を計測した。ビーグル犬の成長期は約 1 年とヒトと比較すると非常に短期間のうちに完了するため、本研究では Biotube 作製期間を省く目的で予め別の個体で作製した Biotube を同種移植し、可能な限り成長期間を観察期間として確保するというモデル態勢を確立した。移植後 1 年までは 3 ヶ月ごとに血管造影を実施し、得られた画像から Biotube および生

体血管の口径を計測した。また、移植 1 年時には全例肉眼的に観察し、Biotube の長さを直接計測した。移植 1 年時に Biotube を摘出し、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1)小口径 Biotube の開発：壁厚をただ増すのではなく、厚みを所望の厚みに調節可能な鋳型の設計を目指した。シリコンの心棒に筒状のカバーを被せた円筒状の形状にし、カバーと心棒の間は 1mm の隙間が存在するように設計した。また、カバーの側面にはスリット孔を数カ所あけ、外界と連絡できるようにした。この鋳型をビーグル犬皮下に 2 ヶ月程度埋め込み、その後取り出すと鋳型の外周が結合組織で完全に追われていたため、この周囲結合組織と鋳型のカバーを取り外すと、心棒を軸として 1mm の厚みを持った管状結合組織体が形成されていた(下図 1)。

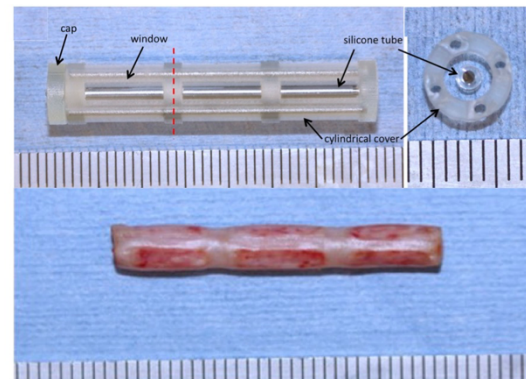


図1 筒状の鋳型 (上段) とこの鋳型を用いて作製した Biotube (下段)

これが新型の Biotube であり、口径はシリコン心棒の直径で、壁厚は鋳型内部の隙間の距離によりサイズが調節可能であることがわかった。新型の Biotube と従来型の Biotube を物性ならびに組織学的に評価し、比較すると新型 Biotube の耐圧性が従来のものより約 2 倍程度増していた。また、組織学的には従来の Biotube と同様に内腔面は非常に平滑であり、構成成分はコラーゲン主体であるが内腔側により緻密なコラーゲン層が形成されていた。

(2)成犬ビーグル大腿動脈への Biotube 移植：前述の新型 Biotube (口径 2mm, 長さ 10mm, 壁厚 1mm) をビーグル犬大腿動脈 (内径約 2mm) に移植し、また比較として従来型 Biotube も同様に移植して両者の操作性および開存率について比較した。従来型の Biotube は壁厚が薄いため、移植時に管腔構造が保たず操作が容易ではないのに対し、壁厚が増した Biotube は管腔構造が保持可能であるため、操作性が非常に良く、生体血管との吻合が非常にスムーズに実施可能であった。また、1 ヶ月間の開存率を比較すると従来型は 33%(n=6)と低いが、新型 Biotube は 100% (n=5) と全例開存を維持した。また、

移植は別の個体で作製した Biotube を用いて同種移植を行なったが、自家 Biotube の移植と差はなく、生体血管に生着していた。

(3)若齢ビーグル犬を用いた成長モデルの作製：若齢ビーグルへの Biotube 同種移植を行ったのち、血管造影を移植 1 年まで 3 ヶ月ごとに実施して Biotube および生体血管の口径を測定した。すると、生体血管は移植直後から口径拡大が顕著に認められたが、Biotube は移植 3 ヶ月までは変化に乏しかった。しかし、その後は生体血管の成長に追従するように Biotube が後追いの形ではあるが口径拡大をしていることがわかった。移植 1 年時には Biotube と生体血管の口径差はほぼなくなっていた。また、この時点で肉眼的に観察すると、Biotube の長さが最大 1.3 倍に伸長していることがわかった。よって、Biotube は成長期の生体内では口径に加えて長さのサイズ拡大が起こる、つまり成長するということが本研究の結果から示された（下図 2）。

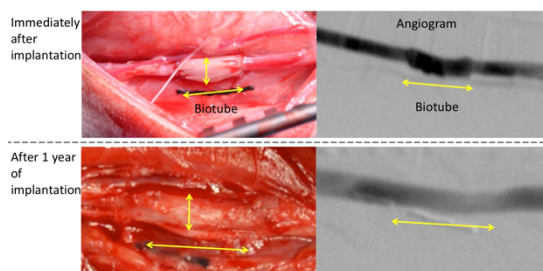


図2 Biotubeの口径および長さのサイズ変化

また、組織学的には移植前はほぼコラーゲン線維のみからなる組織構造であったのに対し、1年時の構造は内腔側に平滑筋層、エラスチン層を備えその表面を一層の内皮細胞層を認めたことから、血管様構造へと組織再構築されていた。また、若齢個体で懸念される石灰化は認められなかった。

先天性心疾患は新生児の約 1%に認められ、その程度によっては外科手術が必要となる。成人の心臓血管医療では、生体の血管や心臓弁のサイズに合わせた人工血管や人工弁が存在するため、移植または置換術は必要に応じて適宜実施されるのに対し、小児医療では患者に適したサイズの人工血管や人工弁の存在が少ないこと、患者が成長する点が成人と異なる。また、人工物を成長期前の体内に移植すると成長後にサイズミスマッチを生じるため、成長に合わせて繰り返しの手術が必要となる場合がある。これは患者およびその家族にとって身体的にも経済的にも負担が大きい。このため、人工物製人工血管や人工弁に代わる再生医療技術を用いたバイオマテリアルの開発は国内外問わず数多くの研究グループが着手している。我々の提唱する生体内組織形成術は再生医療技術の 1 種ではあるものの、多くの場合は細胞培養など

の生体外での過程を一切必要とせずに生体内で自己組織から形成される移植用組織体を作製する技術である。よって特殊な設備や装置を必要としないという点は他のバイオマテリアルの作製過程に類をみない。また、鑄型の設計次第で患者に適したサイズの移植体を作製できる点は身体の小さい小児患者に対して画期的である。

本研究で示した Biotube の成長性は、血管移植が必要な小児患者に対して高い有用性が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Maya Furukoshi, Takeshi Moriwaki, Yasuhide Nakayama Development of an in vivo tissue-engineered vascular graft with designed wall thickness (biotube type C) based on a novel caged mold, Journal of Artificial Organs, 2016, 19(3):262-269 DOI: 10.1007/s10047-015-0859-4

中山泰秀, 古越真耶

小児先天性疾患に対する外科治療での貢献をめざす生体内組織形成術 (IBTA) : 成長性を有する再生型自己組織体の開発、日本小児循環器学会雑誌、査読有、32 巻 3 号、199-207、2016, DOI: <https://doi.org/10.9794/jspccs> . 32. 199

[学会発表] (計 7 件)

古越真耶, 森脇健司, 中山泰秀
バイオチューブは体内で成長した：犬モデルでの検証

第 53 回日本人工臓器学会大会, 2015

古越真耶, 岩井良輔, 森脇健司, 中山泰秀
バイオチューブは成長できる代用血管か？：実験モデルの開発

第 14 回日本再生医療学会総会, 2015

Maya Furukoshi, Yasuhide Nakayama
Evidence of dimensional adaptation of in vivo tissue-engineered allogenic “Biotube” vascular grafts in a growing canine model
American Heart Association Scientific Sessions, 2016

古越真耶, 中山泰秀

移植後に体内で成長する人口血管；バイオチューブ 若齢動物および小児心臓血管外

科への可能性
第106回日本獣医循環器学会, 2017

Maya Furukoshi, EisukeTatsumi,
Yasuhide Nakayama
Self-expandable in-vivo tissue-engineered
“Biotube” vascular grafts: Proof of concept
in a growing beagle model
TERMIS-AMERICASANNUAL
CONFERENCE and EXHIBITION, 2017

古越真耶, 巽英介, 中山泰秀
バイオチューブはバルーン拡張できる
第55回日本人工臓器学会大会, 2018

古越真耶, 巽英介, 中山泰秀
バイオチューブ人工血管開発の最前線
第17回日本再生医療学会総会, 2018

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古越 真耶 (FURUKOSHI, Maya)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター
一・研究所・非常勤研究員
研究者番号 : 20739247

(2) 研究分担者

該当者なし
研究者番号 :

(3) 連携研究者

該当者なし
研究者番号 :

(4) 研究協力者

中山 泰秀 (NAKAYAMA, Yasuhide)
高見沢 計一 (TAKAMIZAWA, Keiichi)
岩井 良輔 (IWAI, Ryouyusuke)
森脇 健司 (MORIWAKI, Takeshi)