

令和元年6月24日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05406

研究課題名(和文)臨床応用を想定した"自己体内再生型"結合組織代用血管バイオチューブの多角的展開

研究課題名(英文) Diversified deployment of "self-regenerating" connective tissue vascular grafts "Biotubes" for clinical applications.

研究代表者

神田 圭一 (Kanda, Keiichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60295649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内組織工学を用いることにより、安全・簡便・ローコストに作成できる自家結合組織代用血管"バイオチューブ"に対して、研究期間の前半において自家移植動物実験を継続する一方で、適応拡大のために研究期間の2年目より異種・同種組織応用技術の開発を開始した。まずは架橋・脱水などの化学処理を用いて、組織の物理特性をコントロールできる事を確認した。また脱細胞処理も導入し、処理後組織のDNA定量・物理特性は良好であった。引き続き実際に異種・同種動物移植実験を開始した。パイロットスタディの結果は良好で、短期における自家由来バイオチューブ同様に急速かつ良好な組織化と体循環環境下での強度保持が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家結合組織代用血管が安定して機能することが再確認された。またハイリスク患者における代用血管の物理特性を化学処理で制御できる可能性が示唆された。また、脱細胞化処理により、健康な個体で作成された良好な組織を今後同種・異種へ移植できる可能性が示された。臨床応用の際に適応されると想定される、ハイリスク患者・高齢者・未熟児など組織再生能力が低下した患者への応用への選択肢の一つとして、健康な個体由来の他家バイオチューブの応用も、より実現性の高い選択肢として可能であると示唆された。今後研究を継続し、まずは同種移植の臨床応用に向けて、免疫学的な検討・長期における安全性の評価を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In the first half of the research period, we continued autologous animal implantation experiment of in vivo tissue-engineered vascular graft "Biotube" that can be created safely, easily and at low cost. For expanding the indication, development of xenogeneic / allogeneic tissue application was started in the second year of research period. First, we confirmed that physical properties of the graft can be controlled using chemical treatments such as crosslinking and dehydration. In addition, decellularization treatment was also introduced without problems in terms of DNA quantification and physical characteristics of the tissue after treatment. Subsequently, xenogeneic and allogeneic animal transplantation experiments were actually started. The results were good in the pilot study, and as in the case of autologous biotubes, rapid and good organization and strength retention in the systemic circulation environment could be confirmed in short-term.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：生体内組織工学 自家移植 同種移植 異種移植 脱細胞処理 心臓血管代用組織

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

①高齢化による血管外科再手術の増加と長期透析患者の増加

高齢化と長期透析患者の増加に伴い再手術が増加している。様々な代用血管が開発されてきたが、冠動脈バイパス術や膝以下の下肢遠位バイパス術に使用できる代用血管は依然自家動静脈のみである。自家動静脈は既に透析シャントや他の部位のバイパスにも使用されている事があり反復手術時にはグラフトが不足する。動静脈シャント作製の為の自家血管も不足しておりこちらは人工血管も用いられているが免疫能が低下している為に易感染性など問題も多い。そこで小口径動脈バイパスや透析シャントへの使用に耐えうる代用血管の開発が急務となった。

②自家組織による迅速な治癒の必要性

人工材料開発や人工的な表面加工技術では、長期に渡る抗血栓性の獲得が困難であるばかりでなく、吻合部内膜肥厚・パルス形成などを回避出来ず、吻合部狭窄が晚期閉塞の主たる原因となる。自家血管壁細胞による迅速かつ良好な組織化がこれらを回避する為の唯一の手段である。

③宿主の皮下組織内で自動的に形成される自家結合組織代用血管『バイオチューブ』

体内に異物を埋入すると、生体防衛機構によってカプセル状の組織体で被膜化される事は古くから知られている。この現象を最新の材料工学技術で制御した D. I. Y. 再生医療—生体内組織工学により、管状結合組織小口径代用血管“バイオチューブ”を開発し、動物自家動脈への移植実験で、

- ・高い耐久性・開存性
- ・迅速な内皮化
- ・階層状の動脈様構造の再構築

が体内で誘導される事を確認した。患者自身の体内で安全・安価に作成出来、特殊な製造施設を必要としない自家組織代用血管の可能性が明らかとなってきた。

④肺動脈形成術に対する臨床応用

これまで着実に動物実験を継続し、結合組織代用血管が5年以上の長期にわたって良好に機能することを確認した上で、2015年に小児心臓領域で初めて肺動脈形成術に臨床応用した。現在術後4年となるが順調に経過している。臨床応用においても、4年間の経過で周囲肺動脈の成長を妨げることなく、自己心膜に匹敵する血管再建用組織としての可能性が示唆された。これについては下記業績の雑誌論文2に示した様に本研究期間内に論文報告を行った。

⑤ハイリスク患者への応用を想定した場合の課題

しかし一方で、本技術は組織形成を宿主の組織再生能力に大きく依存するために、臨床応用が想定される、未熟児・高齢者・糖尿病患者・透析患者などでは、再生能力の不足により、形成された組織の信頼性を向上する試みが必要である。

加えて、健康な同種・異種で良好に形成された組織を他科移植へ応用する技術開発も将来的には必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、本代用血管の臨床応用の可能性を拡大するために、現在行っている自家移植を継続して、自家移植の安定性を検定する。

合わせて、後述する様に自家組織に様々な化学的就職を行い、より信頼性の高い組織を作成する技術の開発をおこなう。

さらに同種・異種組織を用いた他科移植の為の技術開発を行う。

化学処理としては、エタノール、グルタル・アルデヒドなどによる処理・脱細胞処理などについて試み、組織の力学的評価による機能改善を行う。

更に Shelf Ready Graft として保存可能な同種および異種由来バイオチューブを作製する技術開発を行い、実際に動物移植実験を行い、組織治癒過程などヒトへの臨床応用の基礎となるデータ収集を開始する。

3. 研究の方法

A. 様々な臨床応用を想定した、動物移植実験モデル開発

バイオチューブが応用されると想定される様々な移植部位に応じた実験モデルを開発した。

B. 同種・異種への応用を目指したバイオチューブの処理方法の開発と物理特性試験

これまで生体材料の物理特性の改善や生体適合性の改善のために様々な化学処理が行われている。

1. エタノールおよびグルタル・アルデヒド処理を行ったバイオチューブの作成

まず臨床で使用されている条件を用いて化学処理を行い、物理特性を評価した。

更に動物移植実験としては既に広く応用されているグルタル・アルデヒド処理を用いた。

また化学架橋処理ではなく、近年組織工学的にもひろく導入されつつある脱細胞化についても応用を拓げる試みを開始した。

2. 脱細胞化技術の最適化

バイオチューブでは含まれる細胞成分は非常に少ないと考えられていたが、パイロットスタディーにおける、残存 DNA の計測によると相当量の細胞核成分が含まれており、脱細胞代用組織に必要な基準をクリアしていなかった。そこで同種および異種移植では、脱細胞法を用いる

ことが原則と考えている。そこで脱細胞処理実験を行った。

脱細胞処理条件によっては物理特性が変化する可能性があるため、処理後の物理特性評価も行った。

C. Shelf Ready Graft としての保存技術の開発

予め様々な口径・長さのチューブを作成して、保存することが可能となれば、通常の人工血管の様に Shelf Ready Graft としての使用が可能となり、緊急手術にも対応出来るようになる。グラフトの保存方法の開発を行った。

D. 脱細胞処理グラフトの他科移植実験（異種・同種）

ラット腹部大動脈、ウサギ総頸動脈、ビーグル総頸動脈などを用いた自家動脈移植実験を継続しつつ、Shelf Ready Graft としての異種・同種組織の応用技術・保存技術の開発を進めた。研究の後半期間では、動物移植実験として異種移植・同種移植についての試みも開始した。

4. 研究成果

A. 様々な臨床応用を想定した、動物移植実験モデル開発

1. 長距離バイパスモデルとしてのミニブタ冠動脈バイパスモデル。
2. 小児肺動脈形成術を想定したビーグル犬頸動脈を用いた血管パッチ移植モデル
3. ビーグル犬頸動脈を用いた動静脈シャントモデル

の3種の動物実験モデルを開発し、当施設の動物実験室で移植実験を行える環境を整備した。

加速耐久性試験としても応用可能な高流量の動静脈シャントモデルとしては、ビーグル犬およびミニブタを用いて、総頸動脈-外頸静脈間にバイオチューブを端側吻合した。実験モデルとしては問題なく機能したが、バイオチューブと静脈との吻合部付近に吻合部内膜肥厚と狭窄が観察された。高シャント流量に誘導される過度のずり応力が原因と考えられたが、シャントグラフトとしてバイオチューブを応用する上で新たな課題と考えられた。

B. 同種・異種への応用を目指したバイオチューブの処理方法の開発と物理特性試験

1. エタノールおよびグルタル・アルデヒド処理を行ったバイオチューブについての物理特性を評価した。

評価項目としては、国際 ISO 基準に基づいて①破裂圧②糸引かけ強度③Ultimate tensile stress④ヤング率⑤Ultimate Strain について測定した。

異種組織の抗原性処理のために、複数の種類と濃度・処理時間を比較検討したが、動物移植実験には既に広く応用されているグルタル・アルデヒド処理を用いた。ビーグル犬由来のバイオチューブを 0.5%グルタル・アルデヒド溶液で 20 分間処理した後、生理食塩水で十分に洗浄し凍結保存した。これを解凍してラットの腹部大動脈に異種移植した。結果として 1 年以上の開存が得られ、内皮化も良好に行われた。



但し組織化は自家組織由来のバイオチューブよりはかなり遅れる傾向にあった。

内皮化が完成するまでの抗凝固処理の導入や、動静脈シャントなどの高流量システムへの移植により、早期の開存性を確保する事が出来れば、自家組織由来のバイオチューブに近い結果が得られる可能性が示唆された。

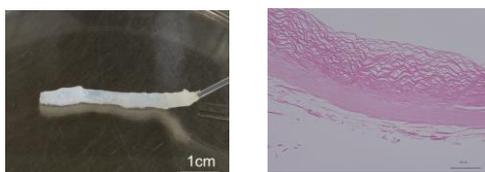
しかし異種・同種グラフトの処理方法として現在ひろく用いているグルタル・アルデヒドは、細胞毒性も有し、長期移植例での石灰化などの報告も行われている為、新たな処理方法を検討する必要があると考えられた。

そこで化学架橋処理では無く、近年組織工

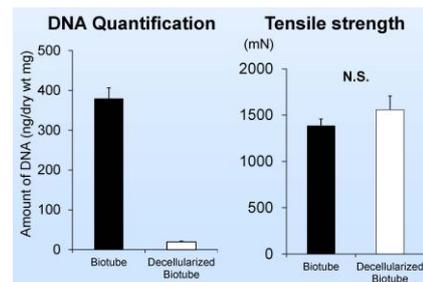
学的にもひろく導入されつつある脱細胞化についても応用を拓げる試みを開始した。

2. 脱細胞化技術の最適化

バイオチューブの同種および異種移植を想定して、脱細胞法を試みた。

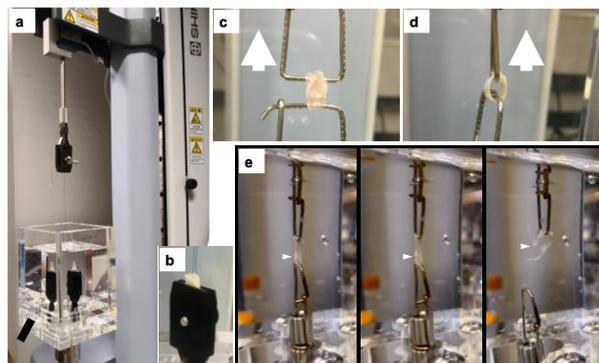


(右図) 脱細胞後の DNA 定量と物性試験



(上図) 脱細胞化バイオチューブの肉眼所見および組織

物理計測についても、本研究期間内に ISO 基準に準じて上述の様々なパラメーターについて安定して計測が行える様になった。資料が乾燥すると物理特性が著しく変化すると報告もあることから、システム構築については独自の実験用水槽を開発し、湿潤環境で計測が行える様に留意した(右図)。



今回の予備の実験では、物理的計測でも、上述の脱細胞組織で、脱細胞前と比較して、強度が低下することなく、理想的な特性を保持できることが確認できた。

更にエタノール、グルタルアルデヒド処理を行うことにより、破裂耐圧が高まる傾向があり、化学処理を組み合わせることにより、物理特性を制御し、より理想的な組織を作成できる可能性が示唆された(論文準備中)。

C. Shelf Ready Graft としての保存技術の開発

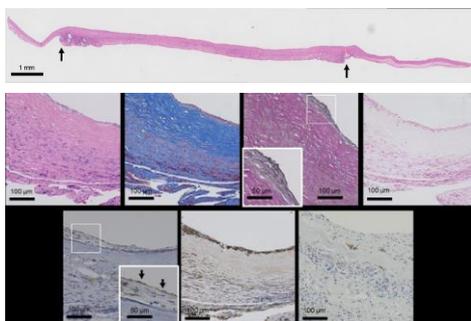
他家移植を目的とした脱細胞化グラフトを保存するために、凍結保存を試みた。

保存後の組織については移植実験を行い、移植後急性期に形態学的評価を行った。

上記の様々な処理方法に対して実際に動脈系に移植を行った際の外科的ハンドリング評価・耐久性試験を行うことにより、十分な脱細胞ができておりかつ良好な物理特性も維持できる最適な処理方法を開発できると考えられた。

D. 脱細胞処理グラフトの他科移植実験(異種・同種)

平成29年度より Shelf Ready Graft としての異種・同種組織の応用技術・保存技術の開発を進めた。



臨床応用における最終目的は牛やブタなどの動物で作製したバイオチューブをヒトに植え込む事であるので、今回のモデルでも異種移植モデルとして、ビーグル犬で作製したチューブをラットに異種移植する実験を開始した(左図)。

ビーグル犬皮下で作成した内径 2 mm のバイオチューブに脱細胞化処理を行い、 -20°C で 1 週間凍結保存した。これを解凍しラット腹部大動脈に異種移植を行い、4 週間後に評価した。3 例の全例で開存が確認され、自家バイオチューブに劣らない良好な組織治癒が確認された。この成果については、雑誌論文 1 による論文発表を行った。

更に研究の後半期間では、同種移植についての試みも開始した。

ビーグル犬皮下で作成した内径 5 mm のバイオチューブを同様に脱細胞化処理し、別のビーグル犬総頸動脈に同種パッチ移植した。移植後 1 週間・2 週間・4 週間後に評価を行ったところ、急性期には内腔が薄い血栓で覆われていたものの、2 週目以降には内皮形成が始まり 4 週目には内皮化が完成、壁内へも平滑筋細胞などの血管壁細胞が急速に進入し、組織化が良好に行われていることが確認できた(論文準備中)。今後は組織学的評価・物理学的評価を行う為の短~中期移植を行う予定である。

今後はこれらの動物移植実験を着実に継続し、前臨床実験としてのデータ収集を行う。京都府立医科大学附属病院でそれらの結果に基づき、厳格な適応決定の下プロトコル作成を行い、IRB の承認を得たのちに臨床応用を目指す。

臨床応用を想定した場合、組織形成能の低下している乳幼児や高齢者におけるバイオチューブ形成は困難であると考えられるため、今後は自家移植だけではなく、上述の保存異種移植グラフトの開発を含めた基礎研究を推進しつつ、想定される疾患に応じた臨床応用プロトコルの作成を行って、臨床応用を進める予定である。

本法は、*in vitro* 細胞培養技術や遺伝子学的手法を用いた通常の再生医療技術に比較すると簡便且つ経済的であるため、高額になり続ける医療コスト削減の意味からも革新的なブレイクスルーをもたらすことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) (全て査読有)

1. Development of xenogeneic decellularized biotubes for off-the-shelf applications. Yamanami M, Kanda K, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Gojo S, Yaku H. *Artificial Organs*, Jan 30 2019, 2019, 10.1111/aor.13432.
2. First Successful Clinical Application of the In Vivo Tissue-Engineered Autologous Vascular Graft. Kato N, Yamagishi M, Kanda K, Miyazaki T, Maeda Y, Yamanami M, Watanabe T, Yaku H. *Ann Thorac Surg*. 2016 Oct;102(4):1387-90. doi:10.1016/j.athoracsur.2016.06.095. PMID: 27645948

[学会発表] (計 22 件)

1. 井上 知也, 神田 圭一, 山南 将志, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, エタノール・グルタルアルデヒド処理による生体内組織工学代用血管の物理特性変化, 第 49 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2019
2. 山南 将志, 神田 圭一, 井上 知也, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, In vivo tissue engineering により作製した異種・同種結合組織膜の血管移植片への応用, 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019
3. 井上 知也, 神田 圭一, 山南 将志, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, エタノールおよびグルタルアルデヒド処理が生体内組織工学代用血管の物理特性に及ぼす影響, 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019
4. 神田 圭一, 山南 将志, 井上 知也, 渡辺 太治, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, 生体内組織工学による結合組織管の臨床応用拡大に向けての取り組み, 第 18 回日本再生医療学会総会, 2019
5. 井上 知也, 神田 圭一, 山南 将志, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, 化学処理による自家結合組織代用血管の物性変化, 第 18 回日本心臓血管外科再生治療研究会, 2019
6. 山南 将志, 神田 圭一, 森本 和樹, 井上 知也, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, 脱細胞化同種結合組織膜の血管移植片への応用, 第 56 回日本人工臓器学会大会, 2018
7. 井上 知也, 神田 圭一, 山南 将志, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, 化学処理による結合組織管 (バイオチューブ) の物理特性変化に対する検討, 第 56 回日本人工臓器学会大会, 2018
8. Yamanami M, Kanda K, Morimoto K, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H. Development of in vivo tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic cardiovascular grafts, The 16th International Society for Applied Cardiovascular Biology Meeting (ISACB 2018), 2018
9. Yamanami M, Kanda K, Morimoto K, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H. Application of tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation. The 45th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2018), 2018
10. Inoue T, Kanda K, Yamanami M, Watanabe T, Sakai O, Yaku H. Improvement of the durability and reliability of in vivo tissue engineered vascular tissues by chemical modification, The 45th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2018).
11. Yamanami M, Kanda K, Morimoto K, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H. Development of tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation, The 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (TERMIS-WC2018), 2018
12. 神田 圭一, シンポジウム 2 <再生医療> 生体内組織工学を用いた自家・他家移植用代用血管壁の開発, 第 17 回日本組織移植学会総会・学術集会, 2018
13. 山南 将志, 神田 圭一, 森本 和樹, 井上 知也, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均. 脱細胞化生体由来結合組織膜の動脈パッチ移植への応用, 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018
14. 山南 将志, 神田 圭一, 森本 和樹, 井上 知也, 渡辺 太治, 坂井 修, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, 組織工学的手法で作製した脱細胞化結合組織膜の動脈パッチ移植への応用, 第 48 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2018
15. Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H. Application of the xenogeneic decellularized tube matrix produced by in vivo tissue engineering to the 'off-the-shelf' small-caliber vascular graft, 44th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2017), 2017
16. Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H. The Development of Xenogeneic, Self-Organizing Small-Caliber Vascular Grafts", European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society

- 2017 (TERMIS-EU 2017), 2017
17. Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H. DEVELOPMENT OF IN VIVO TISSUE ENGINEERED XENOGENEIC VASCULAR GRAFTS, The Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering, 2017
 18. Fujita S, Yamagishi M, Yamanami M, Watanabe T, Kandan K, Yaku H, First clinical application of the human Biotube to the congenital heart disease, The Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering, 2017
 19. 異種由来自己再生型小口径代用血管『バイオチューブ・マトリックス』の開発 山南 将志, 河崎 貴宣, 上 大介, 渡辺 太治, 神田 圭一, 五條 理志, 夜久 均 第 16 回 再生医療学会 3/7-9 仙台 2017
 20. いつでも使用可能な異種由来自己再生型小口径代用血管『バイオチューブ・マトリックス』の開発 山南 将志, 河崎 貴宣, 上 大介, 渡辺 太治, 神田 圭一, 五條 理志, 夜久 均 の開発 山南 将志, 河崎 貴宣, 上 大介, 渡辺 太治, 神田 圭一, 五條 理志, 夜久 均 人工臓器学会 第 54 回 日本人工臓器学会. 2016 年 11 月 23 日-25 日; 鳥取.
 21. Masashi Yamanami, Takanori Kawasaki, Daisuke Kami, Taiji Watanabe, Keiichi Kanda, Satoshi Gojo, Hitoshi Yaku.
The Development Of Xenogeneic, Self-Organizing Small-Diameter Vascular Graft Using Biotube Matrix.
ESAO 2016. 2016 Sep 14-17; Warsaw. Poland
 22. 『バイオチューブ・マトリックス』を活用した異種由来自己再生型小口径代用血管の開発 山南 将志, 河崎 貴宣, 上 大介, 渡辺 太治, 神田 圭一, 五條 理志, 夜久 均 第 44 回 日本血管外科学会学術総会. 2016 年 5 月 25 日-27 日; 東京.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

坂井 修 (Sakai Osamu) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教
研究者番号: 1 0 2 9 8 4 3 2

渡辺 太治 (Watanabe Taiji) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・特任助教
研究者番号: 2 0 4 4 8 7 2 3

井上 知也 (Inoue Tomoya) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教
研究者番号: 5 0 4 0 5 2 8 9

山南 将志 (Yamanami Masashi) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・特任助教
研究者番号: 3 0 4 3 8 2 0 4

五條 理志 (Gojo Satoshi) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授
研究者番号: 9 0 3 1 6 7 4 5

上 大介 (Kami Daisuke) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師
研究者番号: 8 0 4 1 5 5 8 8

田地川 勉 (Tajikawa Tsutomu) 関西大学・システム理工学部・准教授
研究者番号: 8 0 3 5 1 5 0 0

夜久 均 (Yaku Hitoshi) 京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授
研究者番号: 5 0 2 9 5 6 4 8