

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10438

研究課題名(和文) 異種動物体内で自在に作製でき緊急手術にも対応可能な自己再生型小口径代用血管の開発

研究課題名(英文) Development of xenogeneic decellularized biotubes for off-the-shelf applications

研究代表者

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：30438204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：未だ実用化が困難な小口径人工血管開発への組織学的なアプローチとして生体皮下で作製される結合組織管を移植片として用いる研究を進めている。緊急手術に求められる、『必要なときにいつでも使える移植片』に対応するため、本研究では異種由来の結合組織管をあらかじめ作製し、抗原性を除去した上で長期保存可能な自己再生型小口径人工血管の開発を目的とした。ビニール由来の結合組織管を界面活性剤で脱細胞処理し、一定期間保存した後にラット腹部大動脈へ異種移植したところ、良好な開存が得られ、移植後の組織評価でも移植片壁内への良好な細胞浸潤が見られた。『いつでも使える移植片』として有用であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術により異種動物体内で各種サイズの代用血管を大量に作製し保存しておくことができ、緊急手術も要求される心臓血管外科領域で『必要なときにいつでも使える自己再生型小口径代用血管』としての需要が見込まれる。

抗原性を除去した結合組織管は血管再生における足場材料として有用であることが期待され、移植後早期に自家組織による血管壁再構築が見られ、生体の治癒力を最大限に引き出し、早期治癒・迅速な内皮化による強力な抗血栓性を獲得するなど小口径代用血管を高い再現性で形成する技術として、現在の循環器系人工臓器の様々な問題点を克服するためのブレイクスルーになることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed in vivo tissue-engineered, autologous, small-caliber vascular grafts, called "biotubes". However, biotubes preparation takes 4 weeks, therefore, biotubes cannot be applied in emergency situations. The aim of this study was to develop xenogeneic decellularized biotubes.

Silicone rod molds placed in subcutaneous pouches of a beagle dog for 4 weeks were harvested with their surrounding connective tissues. Tubular connective tissues were obtained after pulling out the molds. They were decellularized with detergents. The decellularized grafts were xenogeneically transplanted to the abdominal aortas of rats. Echocardiography confirmed the patency of the grafts at 1 month after implantation. Histological evaluation revealed that the grafts formed neointima on the luminal surface, and that the graft walls had cell infiltration. This technology enables the easy fabrication of grafts from xenogeneic animals in advance, satisfying the conditions for off-the-shelf grafts.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：組織工学 脱細胞 結合組織 血管移植片 小口径人工血管 異種移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで冠動脈や膝以下の末梢動脈への遠位バイパスなどに適応できる小口径(径 5mm 以下)の人工血管はグラフト閉塞の壁を打ち破ることができず、未だ実用化されたものは無い。人工材料開発や人工的な表面加工技術による抗血栓処理では人工血管内腔面での血栓形成を一定期間予防できても、長期に渡る抗血栓性の獲得は困難であり、さらに吻合部内膜肥厚やパンヌス形成などを回避することができず、吻合部狭窄が晚期グラフト閉塞の主な原因となっている。

このため最近では移植後にグラフトが自家血管組織により良好に組織化することが、長期の抗血栓性を獲得し吻合部狭窄を回避するための唯一の手段と考えられており、組織工学的なアプローチによる小口径代用血管開発が進められている。我々は組織工学的なアプローチとして自己の結合組織から作製される自家移植用小口径代用血管の開発を進めてきた。本法で作製される結合組織管は自家移植後数ヶ月で自己組織化し血管壁再構築が認められたが、体内で移植片を作製するのに少なくとも 4 週間を要するため、心臓血管外科領域で求められることが多い緊急手術には対応できないという問題がある。また、冠動脈バイパス術や下肢遠位動脈バイパス術などの手術に柔軟に対応するためには、あらかじめ各種口径サイズ、長さのグラフトが用意されていることが望ましい。このため異種動物で各種口径サイズ、長さの結合組織管をあらかじめ作製・保存しておき『使いたいときにいつでも使える』自己再生型小口径代用血管の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では結合組織管の作製過程を異種動物で行うことで、あらかじめ各種サイズ、長さの異種由来結合組織管を作製し、抗原性を除去した上で、長期保存可能で緊急手術にも対応可能な『使いたいときにいつでも使える』組織工学的な小口径人工血管の開発を達成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 結合組織管の作製

直径 2mm、長さ 7cm のシリコーン円柱基材(3-2316-01, AS ONE, Osaka, Japan)をビーグル犬(メス、1 歳、体重約 10kg)の背部皮下に 4 週間埋入し、基材周囲に形成された結合組織カプセルごと、基材を摘出。基材を抜去することで結合組織管が得られた。

(2) 脱細胞化処理、DNA 定量

得られた結合組織管を灌流装置(TP-10SA; AS ONE)にセットし、1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)にて 12 時間、脱イオン蒸留水にて 15 分間、1% Triton X-100 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)にて 30 分間、500U/mL DNase (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA)含有 Phosphate-Buffered Saline (PBS; Takara Bio Inc., Shiga, Japan)にて 24 時間灌流し脱細胞処理を施行した。脱細胞処理後は - 20 °C にて冷凍保存した。

脱細胞処理後の結合組織管は QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)、Quant-iT PicoGreen DNA assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を用いて DNA 定量を行った。

(3) 引張強度テスト

脱細胞処理前、脱細胞処理後の結合組織管を 5mm 幅に切り分け、円周方向の引張強度を Tissue Puller 560TP (Tissue Puller 560TP; Danish Myo Technology, Aarhus N, Denmark)を用いて測定した。

(4) 異種移植実験

1 週間冷凍保存したビーグル犬由来の脱細胞処理後結合組織管を自然解凍し、10mm の長さに切離し移植片として用いた。移植片への抗血栓処理として内腔を抗血栓薬のアルガトロバン (1 mg/graft; Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan)にてコーティングした。

オスの Wistar ラット (12 ヶ月齢、体重約 830g)の腹部大動脈を遮断後に一部切除し、ビーグル犬由来脱細胞処理後結合組織管を端々吻合にて移植した(n = 3)。移植後、抗血小板薬や抗凝固薬、免疫抑制薬は投与しなかった。移植 1 ヶ月後、超音波診断装置(S6V; SonoScape Medical

Corp., Shenzhen, China)にて移植片の形態を評価した後に犠牲死させ移植片を摘出した。

(5) 組織学的評価

摘出した移植片を 10%ホルマリン液で固定し、切片を作製。hematoxylin-eosin (H&E)染色、Masson's trichrome 染色、Elastica van Gieson 染色、von Kossa 染色を行った。また免疫染色として -smooth muscle actin (-SMA)染色 (M0851; Dako Japan, Kyoto, Japan; 1:100 dilution)、CD31 染色 (E11114; Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA; 1:200 dilution)、CD68 染色 (ab31630; Abcam, Cambridge, UK; 1:500 dilution)を行い評価した。

4. 研究成果

(1) 脱細胞処理後結合組織管

合計 37 時間のプロトコールにて脱細胞処理された結合組織管は肉眼的に白色に変化した。脱細胞処理前の結合組織管は H&E 染色にて主にコラーゲンと線維芽細胞で構成されていたが、脱細胞処理後には細胞成分は認められなかった。

脱細胞化処理後の組織中の残存 DNA 量が、組織乾燥重量あたり 50 ng/mg 未満であることが脱細胞化の一つの基準とされているが、脱細胞処理後の結合組織管の残存 DNA 量は組織乾燥重量あたり 19.6 ng/mg と確実に脱細胞処理されているという結果であった。

(2) 脱細胞処理後結合組織管の異種移植

移植片の移植はマイクロサージャリーにて行ったが、通常の血管吻合手技で移植することができた。移植後のラットは観察期間中特に問題なく生存した。移植後 1 ヶ月に血管エコーにて移植片は瘤化や狭窄、血栓形成は認めず、カラドップラーエコーにおいても良好な動脈血流を認めた。摘出した移植片の内腔面は平滑で肉眼的にも血栓形成を認めなかった。

(3) 移植後組織学的変化

摘出した移植片の組織学的評価では移植片の壁内に細胞浸潤が見られた。移植前に脱細胞処理を施行しているため、認められた細胞はすべて宿主(ラット)由来と言える。CD31 染色では移植片内腔面に CD31 陽性細胞が層状に認められ、血管内皮の形成が示唆された。また内腔面にはエラスチンの層状の形成も認められた。さらに -SMA 陽性細胞も移植片壁内に層状に認められるなど、移植後の血管壁再構築が行われていることが示唆された。

また、von Kossa 染色にて石灰化の所見はなく、CD68 染色においても炎症を示唆する所見は認めなかった。

(4) まとめ

本研究にて異種由来結合組織管は脱細胞処理を行うことで抗原性が除去され、また『必要なときにいつでも使える移植片』として必要な、あらかじめ作製しておき保存可能な移植片であることがわかった。脱細胞処理後の移植片はこれまでの自家結合組織管と同様に、血管移植後早期に自己組織化するなど、理想的な血管移植片となりうることが期待される。

今後は脱細胞処理方法の最適化や保存方法についての検討も必要になると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanami Masashi, Kanda Keiichi, Kawasaki Takanori, Kami Daisuke, Watanabe Taiji, Gojo Satoshi, Yaku Hitoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Development of xenogeneic decellularized biotubes for off the shelf applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 773 ~ 779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aor.13432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Yamanami Masashi, Kanda Keiichi, Morimoto Kazuki, Inoue Tomoya, Watanabe Taiji, Sakai Osamu, Kami Daisuke, Gojo Satoshi, Yaku Hitoshi
2. 発表標題 Development of tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation
3. 学会等名 The 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress (TERMIS-WC 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanami Masashi, Kanda Keiichi, Morimoto Kazuki, Inoue Tomoya, Watanabe Taiji, Sakai Osamu, Kami Daisuke, Gojo Satoshi, Yaku Hitoshi
2. 発表標題 Application of tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation
3. 学会等名 The 45th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue Tomoya, Kanda Keiichi, Yamanami Masashi, Watanabe Taiji, Sakai Osamu, Yaku Hitoshi
2. 発表標題 Improvement of the durability and reliability of in vivo tissue engineered vascular tissues by chemical modification
3. 学会等名 The 45th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanami Masashi , Kanda Keiichi , Morimoto Kazuki , Inoue Tomoya , Watanabe Taiji , Sakai Osamu , Kami Daisuke , Gojo Satoshi , Yaku Hitoshi
2. 発表標題 Development of in vivo tissue engineered decellularized connective tissue membrane for allogeneic cardiovascular grafts
3. 学会等名 The 16th International Society for Applied Cardiovascular Biology Meeting (ISACB 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 脱細胞化同種結合組織膜の血管移植片への応用
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 知也, 神田 圭一, 山南 将志, 渡辺 太治, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均
2. 発表標題 化学処理による自家結合組織代用血管の物性変化
3. 学会等名 第18回日本心臓血管外科再生治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 圭一, 山南 将志, 井上 知也, 上 大介, 五條 理志, 夜久 均, 渡辺 太治
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF IN VIVO TISSUE ENGINEERED XENOGENEIC VASCULAR GRAFTS
3. 学会等名 The Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H
2. 発表標題 The Development of Xenogenic, Self-Organizing Small-Caliber Vascular Grafts
3. 学会等名 European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2017 (TERMIS-EU 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H
2. 発表標題 Application of the xenogenic decellularized tube matrix produced by in vivo tissue engineering to the 'off-the-shelf' small-caliber vascular graft
3. 学会等名 44th Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (ESA0 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第48回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 『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
3. 学会等名 第44回日本血管外科学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H
2. 発表標題 The Development of Xenogenic, Self-Organizing Small-Diameter Vascular Graft Using "Biotube Matrix"
3. 学会等名 XLIII Annual Congress of the European Society for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第54回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂井 修 (Sakai Osamu) (10298432)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303)	
研究分担者	渡辺 太治 (Watanabe Taiji) (20448723)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303)	
研究分担者	神田 圭一 (Kanda Keiichi) (60295649)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	夜久 均 (Yaku Hitoshi) (50295648)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	上 大介 (Kami Daisuke) (80415588)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	五條 理志 (Gojo Satoshi) (90316745)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	