

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22667

研究課題名（和文）高圧処理自家皮膚組織の“自己体内再生型”血管補填材料としての応用

研究課題名（英文）Application of High-Pressure Treated Autologous Dermal Tissue as a 'Self-Regenerating' Vascular Implant Material

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：移植後の生体適合性や成長の可能性を有するような理想的な血管補填物の開発が望まれている。本研究では自己の皮膚組織を採取し高圧処理を行った後に血管に移植するという、これまでに無い斬新な発想での血管移植片開発を行った。ビーグル犬の下腹部皮膚を一部採取し、高圧処理を行った後に同じビーグル犬の頸動脈へパッチ移植した。移植後、移植片の瘤化は認めず、明らかな感染兆候も認めなかった。移植後3ヶ月目に移植片を摘出したところ、内腔面は極めて平滑で血栓形成を認めなかった。組織学的評価においても移植片の壁内に細胞浸潤がみられ、エラスチンの層状形成が認められるなど、移植後早期に自己組織化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビーグル犬を用いた実験により、高圧処理を行った皮膚組織は静脈移植片と少なくとも同等以上の強度・耐久性を備えた血管移植片となりうることがわかった。高圧処理皮膚組織は強度と柔軟性を兼ね備え、通常の血管移植と同様に血管パッチ移植することができるなど、取り扱いが容易であった。また、移植後、壁内に細胞浸潤がみられたり、エラスチンや α -SMA陽性細胞の層状の形成、内腔面への内皮細胞を示唆する細胞層の形成がみられたりするなど、移植後早期に自己組織化していることが期待できる結果であった。高圧処理皮膚組織は理想的な血管移植片になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The development of an ideal vascular graft material that exhibits post-transplant biocompatibility and growth potential is highly sought after. In this study, we conducted groundbreaking research in vascular graft development by employing a novel approach involving the procurement of autologous skin tissue, subsequent high-pressure processing, and subsequent transplantation onto blood vessels. A segment of the lower abdominal skin was obtained from a Beagle dog, underwent high-pressure processing, and was then patch-transplanted onto the carotid artery of the same Beagle dog. Following transplantation, no aneurysm formation or apparent signs of infection were observed. Upon extraction of the graft after three months, the luminal surface appeared remarkably smooth with no evidence of thrombus formation. Histological examination demonstrated cellular infiltration within the graft wall and the formation of layered elastin, suggesting early self-organization of the transplanted tissue.

研究分野：組織工学

キーワード：血管移植片 人工血管 組織工学 皮膚組織 結合組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体適合性を有し、抗血栓性に優れ、さらに成長の可能性が期待できるような理想的な血管補填物の開発が望まれている。近年では組織工学的なアプローチが広く行われており、我々はこれまで生体内組織工学技術(in vivo tissue engineering)による血管移植片の開発を行ってきた。本技術は皮下などの体内にシリコンやチタンなどの医療材料(異物)を埋入した際に起こる生体の防御反応としてのカプセル化現象を利用し、基材周囲に形成されたコラーゲンや線維芽細胞を主成分とする自己結合組織膜を、代用血管や血管壁パッチなどの循環系移植片に応用するという技術である。

これまで本技術により形成された管状組織体を各種実験動物の動脈に移植すると、管状組織体のマトリックス成分を足場として宿主の血管壁構成細胞が浸潤し移植後早期に血管壁の再構築が起こることを報告してきた。さらに本技術は2歳児に対する肺動脈拡大形成術の際の血管壁パッチとして世界で初めて臨床応用され、術後7年以上経った現在も経過は順調である。

しかし、本技術による代用血管の作製には2ヵ月程度の期間を要するため緊急手術には対応困難である。また未熟乳幼児・高齢者・糖尿病・透析患者など組織再生能力が低下したハイリスク症例においては良好な結合組織膜が形成されない可能性が危惧される。

このため、患者皮下に基材を埋入して周囲に結合組織膜を形成させるという本技術とは別の手段により血管移植片を作成する技術の開発が必要である。

2. 研究の目的

形成外科領域において先天性巨大色素性母斑に対する皮膚再生治療の臨床試験が行われている。この臨床試験は採取した母斑部位の皮膚組織を採取し手術室内で短時間の高圧処理(2000気圧、10分)を行うことで母斑細胞を含めた細胞成分を死滅させた後、元の場所に再度移植し、培養細胞と組み合わせることで皮膚を再生させるという治療である。

本研究では、この皮膚高圧処理技術に注目し、患者自身の皮膚組織を採取し高圧処理を行い、組織から細胞を取り除くことで優秀なマトリックス成分を取り出し、かつ滅菌性も担保した上で、自家移植用血管壁パッチとして用いるという、血管移植片の種々の問題を克服するために、これまでにない全く新しい発想での血管壁移植片の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビーグル犬より皮膚組織採取及び高圧処理

ビーグル犬(メス、1歳、約10kg)の下腹部より約直径10cmの全層皮膚を採取。採取後の創部は縫合処置を行った。採取した皮膚組織を国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部にて開発された高圧処理装置で高圧処理を行った(2,000気圧、10分間)。

(2) 自家移植実験

高圧処理後の皮膚組織を同じビーグル犬の頸動脈へパッチ移植した(自家移植)。左頸動脈前壁を長径約15mm、短径約8mmの紡錘状に切除した後に皮膚組織を血管縫合糸(7-0プロリーン)の連続縫合にて縫着した。また、コントロールとしてビーグル犬の右頸静脈壁を一部採取し、右頸動脈前壁に同様にパッチ移植を行った。術後のビーグル犬には通常通りの水分・食事を与え、抗血小板薬や抗凝固薬は投与しなかった。

(3) 超音波検査による移植片評価

術後1週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後に超音波検査、ドップラー超音波検査を行い、皮膚パッチ移植片および静脈壁パッチ移植片の評価を行った。

(4) 組織学的評価

術後3ヶ月目の超音波検査による移植片評価後に移植片を摘出した。摘出後の移植片を10%ホルマリン溶液にて固定し切片を作成した。hematoxylin-eosin (H&E)染色、Masson's trichrome染色、Elastica van Gieson染色、von Koss染色を行った。また免疫染色として α -smooth muscle actin (α -SMA)染色、von Willebrand factor染色を行い評価した。

4. 研究成果

(1) 皮膚組織高圧処理

高圧処理後の皮膚は肉眼的に白色に変化していた。皮膚組織の柔軟性は保たれており、表面をガーゼなどで軽くこすることで毛髪は容易に除去することができた。

(2) 自家移植実験

高圧処理後皮膚組織は通常の血管移植と同様の手技でビーグル頸動脈へパッチ移植が可能であった。皮膚パッチは表皮側を血管の外側に、皮下組織側を血管内腔面にする形で移植した。パッチ移植後に血管遮断を解除し血流を再開しても縫合部からの出血はわずかであり、圧迫にて容易に止血できた。術後も出血や感染の兆候なく経過は良好であった。

(3) 超音波検査による移植片評価

術後1週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後に超音波検査、ドップラー超音波検査を行った。皮膚パッチ移植片は経過中に明らかな血栓形成は認めず、移植片の瘤化も認めなかった。コントロールの静脈パッチは血栓形成を認めなかったものの、術後1ヶ月目に移植片の嚢状の瘤化を認めた。その後嚢状瘤のさらなる拡大はなく3ヶ月目まで同じ形態であった。ドップラー超音波検査では皮膚パッチ、静脈壁パッチを移植した血管はともに、すべての経過中において良好な動脈血流を認めた。

(4) 組織学的評価

術後3ヶ月目に移植片を摘出した。皮膚パッチ移植片の内腔面は平滑であり、明らかな血栓形成は認めず、縫合部の内膜肥厚も認めなかった。静脈パッチ移植片は一部嚢状瘤となっていたものの、内腔面は平滑で血栓形成を認めず、縫合部の内膜肥厚も認めなかった。

摘出した移植片の組織学的評価では、皮膚パッチ・静脈壁パッチともに移植片壁内への細胞浸潤を認めたが、明らかな炎症細胞の集積は認めなかった。皮膚パッチ・静脈壁パッチともに内腔面にエラスチンの層状の形成を認め、さらに α -SMA 陽性細胞も移植片壁内に層状に認められた。Von Kossa 染色にて石灰化の所見はなく、von Willebrand factor 染色にて内腔面に褐色に染まる層状の細胞が認められ、血管内皮の形成が示唆された。

(5) まとめ

ビーグル犬を用いた実験により、高圧処理を行った皮膚組織は静脈移植片と少なくとも同等以上の強度・耐久性を備えた血管移植片となりうることがわかった。高圧処理皮膚組織は強度と柔軟性を兼ね備え、通常の血管移植と同様に血管パッチ移植することができるなど、取り扱いが容易であった。

また、移植後、壁内に細胞浸潤がみられたり、エラスチンや α -SMA 陽性細胞の層状の形成、内腔面への内皮細胞を示唆する細胞層の形成がみられたりするなど、移植後早期に自己組織化していることが期待できる結果であった。高圧処理皮膚組織は理想的な血管移植片になることが期待される。

本研究では高圧処理後の皮膚組織が滅菌できているかについての評価が行えていないため、今後は高圧処理後の組織を培養するなどして、細菌の有無を確認する必要がある。また本研究で高圧処理後の皮膚組織は静脈壁と同等もしくはそれ以上の耐圧性・耐久性があることが示されたが、*in vitro* での評価として引張強度試験などの物性評価が行えていない。今後、引張強度試験や糸引掛試験、破裂圧測定などの物性評価も行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kami Daisuke, Suzuki Yosuke, Yamanami Masashi, Tsukimura Takahiro, Togawa Tadayasu, Sakuraba Hitoshi, Gojo Satoshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Genetically Modified Cell Transplantation Through Macroencapsulated Spheroids with Scaffolds to Treat Fabry Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09636897211060269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamanami Masashi, Kanda Keiichi, Morimoto Kazuki, Inoue Tomoya, Watanabe Taiji, Sakai Osamu, Kami Daisuke, Gojo Satoshi, Yaku Hitoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 A tissue engineered, decellularized, connective tissue membrane for allogeneic arterial patch implantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 633~642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aor.14102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue T, Kanda K, Yamanami M, Kami D, Gojo S, Yaku H.	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Modifications of the mechanical properties of in vivo tissue-engineered vascular grafts by chemical treatments for a short duration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0248346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kami D, Yamanami M, Tsukimura T, Maeda H, Togawa T, Sakuraba H, Gojo S.	4. 巻 29
2. 論文標題 Cell Transplantation Combined with Recombinant Collagen Peptides for the Treatment of Fabry Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Transplant	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689720976362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue T, Kanda K, Yamanami M, Kami D, Gojo S, Yaku H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Short-Duration Ethanol Dehydration on Mechanical Properties of Porcine Pericardium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5761/atcs.oa.20-00133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 0件/うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Yoshinobu Maeda, Masaaki Yamagishi, Satoshi Asada, Hisayuki Hongu, Eijiro Yamashita, Hiroki Nakatsuji, Takashi Nagase, Rie Nakai, Keiichi Kanda, Tomoya Inoue, Masashi Yamanami, Hitoshi Yaku
2. 発表標題 Stenotic Pulmonary Artery Reconstruction Using in vivo Tissue Engineered Vascular Grafts
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山南将志、神田圭一、井上知也、川尻英長、渡辺太治、上大介、五條理志、夜久均
2. 発表標題 同種由来生体内組織工学血管移植片に対する脱細胞処理の最適化
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujita S, Yamagishi M, Kanda K, Maeda Y, Yamanami M, Watanabe T, Yaku H.
2. 発表標題 4-YEAR FOLLOW-UP OF THE FIRST CLINICAL APPLICATION OF THE IN VIVO TISSUE ENGINEERED VASCULAR GRAFT TO CONGENITAL HEART DISEASE: POTENTIAL FOR ADAPTABILITY TO PATIENT
3. 学会等名 the Combined International Symposium for Applied Cardiovascular Biology and Vascular Tissue Engineering (ISACB+ISVTE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T, Kanda K, Yamanami M, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 EFFECTS OF SHORT PERIOD OF CHEMICAL TREATMENT ON PORCINE PERICARDIUM
3. 学会等名 the Combined International Symposium for Applied Cardiovascular Biology and Vascular Tissue Engineering (ISACB+ISVTE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanami M, Kanda K, Morimoto K, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF DECELLULARIZED IN VIVO TISSUE ENGINEERED VASCULAR GRAFTS FOR XENOGENEIC OR ALLOGENEIC IMPLANTATION
3. 学会等名 the Combined International Symposium for Applied Cardiovascular Biology and Vascular Tissue Engineering (ISACB+ISVTE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T, Kanda K, Yamanami M, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 MODIFICATIONS OF MECHANICAL PROPERTIES OF IN VIVO TISSUE ENGINEERED VASCULAR TISSUES BY SHORT PERIOD OF CHEMICAL TREATMENTS
3. 学会等名 the XLVI ESAO (the European Society for Artificial Organs) 2019 Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanami M, Kanda K, Morimoto K, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 APPLICATION OF IN VIVO TISSUE ENGINEERED DECELLULARIZED CONNECTIVE TISSUE FOR CARDIOVASCULAR GRAFTS
3. 学会等名 the XLVI ESAO (the European Society for Artificial Organs) 2019 Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanda K, Yamanami M, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 IN VIVO TISSUE ENGINEERED VASCULAR GRAFTS ADAPTABLE TO AV SHUNTS
3. 学会等名 the XLVI ESAO (the European Society for Artificial Organs) 2019 Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanami M, Kanda K, Morimoto K, Inoue T, Watanabe T, Sakai O, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 Development of in vivo tissue engineered decellularized connective tissue for tubular vascular grafts and vascular patches
3. 学会等名 the 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T, Kanda K, Yamanami M, Kami D, Gojo S, Yaku H.
2. 発表標題 Effects of ethanol and glutaraldehyde treatments on mechanical properties of porcine pericardium
3. 学会等名 the 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田圭一、山南将志、井上知也、坂井修、上大介、五條理志、夜久均
2. 発表標題 生体内組織工学による代用血管開発への取り組みとよろず相談所での面談
3. 学会等名 第57回 日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田圭一、山南将志、井上知也、坂井修、上大介、五條理志、夜久均
2. 発表標題 患者体内で作成する自家結合組織代用血管臨床開始後の応用拡大に向けた取り組みについて
3. 学会等名 第57回 日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujita S, Yamagishi M, Kanda K, Maeda Y, Inoue T, Yamanami M, Watanabe T, Konishi E, Takeda N, Yaku H.
2. 発表標題 Clinical Application of an In-Vivo Tissue-Engineered Vascular Graft in a Patient with MAPCA: Evaluation of the Mechanical Properties and Histology
3. 学会等名 the Society of Thoracic Surgeons 56th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	山岡 哲二 (Yamaoka Tetsuji) (50243126)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	
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	井上 知也 (Inoue Tomoya) (50405289)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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)	
研究分担者	田中 秀央 (Tanaka Hideo) (60236619)	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	田地川 勉 (Tajikawa Tsutomu) (80351500)	関西大学・システム理工学部・准教授 (34416)	
研究分担者	井田 夕紀子 (Ida Yukiko) (00459504)	東京医科大学・医学部・兼任講師 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------