

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：33304

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17569

研究課題名（和文）乾燥保存臓器の再細胞化と移植に関する研究：小口径人工血管の開発

研究課題名（英文）Research on recellularization and transplantation of dried preserved organs:
Development of small-diameter blood vessels

研究代表者

石野 直明（Ishino, Naoaki）

北陸大学・医療保健学部・准教授

研究者番号：80585133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、長期乾燥保存可能な脱細胞化小口径人工血管の開発を目指した。研究期間全体を通じて、臓器の長期乾燥保存と脱細胞化臓器の再細胞化を主題に研究を進め、ブタやラットの口径1 mm から5 mmの小口径血管を用いた実験において、乾燥保存した血管は、処理後も生体由来の力学特性と微細構造が温存されていた。ラット腎臓を用いた腎臓の乾燥保存と脱細胞化についても検討を進め、吸水後の乾燥保存腎臓は、腎小体の微細構造が温存され、模擬血液を腎臓内へ灌流させたところ、糸球体のろ過機能が温存されることを確認した。本研究の成果は、今後の再生医療の発展に貢献するものであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小口径人工血管開発例は数多く報告されている。生体由来材料を用いた開発例では、口径2 mm以下の人工血管をブタに移植し、長期開存したとの報告もある。しかし、多くの研究報告では、実用化に向けた保存法に言及していない。本研究は、長期保存可能な実用性の高い小口径人工血管開発の試みである。また、生体適合性に優れた人工臓器開発は古くからの課題である。iPS細胞などの幹細胞研究は一定の成果を上げているが、実用的な人工臓器開発の用途は立っていない。本研究成果を含め、多様な研究成果が積み上げられることで、将来的に細胞培養による臓器構築が可能になる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop decellularized small-diameter artificial vessels that can be dried and stored for extended periods. Throughout the study period, research focused on the long-term dry storage of organs and the recellularization of decellularized organs. Experiments using porcine and rat small-diameter blood vessels, ranging from 1 mm to 5 mm in diameter, showed that the dry-stored vessels preserved their biogenic mechanical properties and microstructure after treatment. Additionally, the dry preservation and decellularization of rat kidneys were also studied. The microstructure of the renal corpuscles was preserved in the dry-preserved kidneys after water absorption. When simulated blood was perfused into the kidneys, the filtration function of the glomeruli was maintained. The results of this study are expected to contribute to the future development of regenerative medicine.

研究分野：人工臓器

キーワード：再生医療 臓器移植 人工臓器 脱細胞化 臓器保存

1. 研究開始当初の背景

小口径血管が必要になる手術の1つに冠動脈バイパス術(CABG)がある。CABGは、国内では、年間約20,000件の手術が実施されている。CABGにおいて、グラフト吻合部位の冠動脈内腔径は1.0 mmから2.0 mm程度であり、既存の合成高分子製の人工血管では早期閉塞のリスクが高く使用できない。そのため、患者自身の内胸動脈、撓骨動脈、大伏在静脈などを冠動脈に吻合し、冠動脈末梢への血流を補う手法がとられる。患者自身の血管を使用する場合、血液適合性は当然高く、長期開存が期待できる。しかし、術中に血管を剥離するために時間を要すること、術中の出血量が多くなること、切開痕からの感染リスクが増すことなどのデメリットがある。撓骨動脈や大伏在静脈を摘出した場合には、美容上の問題も患者にとって負担になる。

合成高分子材料表面にMPCポリマーなどの生体親和性材料をコーティングすることで、生体適合性を向上させた人工血管も開発されているが、基材に高分子材料を用いると自己組織化が期待できないため、成長過程の小児患者への使用には向かない。一方、ヒトや動物から摘出した血管からドナー細胞を除去「脱細胞化」して作製した人工血管は、レシピエント細胞の浸潤性が高く、自己組織化が期待できる。脱細胞化技術は、小口径人工血管開発に有用な技術として知られている。しかし、生体組織を利用する脱細胞化人工血管は、長期保存することが困難である点や、既存の滅菌法では滅菌できないといった問題が解決されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体由来材料を用いて、滅菌保存可能な小口径人工血管を作製することであり、生体組織の「乾燥保存」、「脱細胞化技術」、「細胞培養技術」を併用することで、実用的な人工血管開発を目指すことである。生体組織を脱細胞化するためには、化学的(界面活性剤やエタノールなど)、生物学的(酵素や血清など)、物理学的(超高静水圧やマイクロ波など)に組織を処理する必要があるが、何れの方法で脱細胞化した場合にも、細胞外マトリックス(ECM)の変性は避けられない。また、使用する薬品や酵素の種類・濃度によっては、移植後の再細胞化が阻害されてしまい、生体由来材料を使用するメリットが薄れてしまう本研究では、既存の脱細胞化処理法の処理効率を向上させる手法として、乾燥工程を含む脱細胞化処理法について検討した。

3. 研究の方法

生体組織を長期保存するためには、ホモグラフトのようにDimethyl sulfoxide(DMSO)を浸透させて凍結保存することもできるが、DMSOの細胞毒性によって、移植後の自己組織化遅延が危惧される。本研究では、乾燥耐性を呈することが知られているトレハロース($C_{12}H_{22}O_{11}$)を用いて、生体組織を乾燥保存する。トレハロースには、凍結時の氷結晶の成長を抑制する効果があり、凍結融解処理によるECM構造の破壊を低減させることができる。また、トレハロースはヒトへの毒性も認められておらず、移植片作製のための処理液に適している。ここで、ヒトや動物の細胞膜にはトレハロースのトランスポーターは存在しない。そのため、組織にトレハロースを浸透させて乾燥させると、レシピエント細胞の足場となる細胞外マトリックスは保護される。一方で、拒絶反応の原因となるドナー由来細胞は乾燥のストレスによって破壊される。破壊された細胞については、組織の力学特性に影響を与えない低濃度sodium dodecyl sulfate(SDS)溶液を用いて短時間に洗い流すことができる。ドナー由来細胞が除去されることで、生体適合性が向上し、レシピエント細胞の浸潤が促進される。

トレハロースをブタ頸動脈もしくはラット大動脈に浸透させ、常温乾燥処理した。乾燥処理した各動脈にトレハロース溶液を吸水させた後、SDS処理法によって脱細胞化血管を作成した。乾燥吸水後の力学特性の変化を残留応力試験や内圧負荷試験によって評価した。微細構造の変化を組織学的に評価した。脱細胞化の達成をDNA定量および各種免疫染色によって評価した。

4. 研究成果

脱細胞化効率を向上させることによって、低濃度処理液で短時間に脱細胞化を達成することができるため、ECMの変性を最小限に抑えることができる。乾燥工程によるストレスからECMを保護するために、乾燥耐性を呈するトレハロースを用いる。トレハロースは、ヒト細胞内へは容易に取り込まれないため、トレハロースを浸透させた組織を乾燥させると、除去すべき細胞にのみストレスをかけることができ、脱細胞化効率が向上する。トレハロースを浸透させたブタ頸動脈やラット腎臓は、乾燥保存後も在来の力学的特性や構造を温存した。また、界面活性剤で脱細胞化処理したところ、より低濃度・短時間で脱細胞化を達成した。ブタ頸動脈を乾燥処理し、0.1%SDSにて5時間脱細胞化処理したものは、1%SDSにて24時間処理(既存法)したものと比較して、同等以上に脱細胞化が達成されていた。低濃度の界面活性剤による処理は、移植後の細胞毒性を低減し、短期間での処理は、臓器の微細構造温存につながる。

トレハロースを浸透させたラット腎臓を乾燥・吸水させ、腎小体の構造が温存されることを確認している。更に、吸水後の腎臓に赤血球を含むPBSを灌流させたところ、乾燥保存後も腎臓の濾過機能が温存されていた。

乾燥工程を脱細胞化処理に含むことは、生体組織を利用する上で大きな利点となる。貴重な生

体材料を長期間保存できる他、EOG 滅菌を行うことで移植片としての安全性を確保することもできる。トレハロースのガラス転位温度は 60°C 以上であるため、EOG 滅菌を行っても組織の保存効果は失われないものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石野直明
2. 発表標題 乾燥保存臓器の可能性～脱細胞化小口径血管への応用～
3. 学会等名 第60回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------