

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390339

研究課題名(和文)細胞を要さない再生血管用医材の開発とその適応拡大、および臨床応用

研究課題名(英文)Development of Novel Biodegradable Scaffold for Non-Cell-Seeding In-vivo Tissue-Engineering Vasculature for Clinical Applications

研究代表者

松村 剛毅(Matsumura, Goki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20297469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：生分解性素材のみを体内に移植することで再生血管を作成するという研究を行ってきた。動物実験において、素材の最適化と最適化により、径8～10mm、長さ2～6cmまでの再生血管(静脈および肺動脈)の作製に成功した。3年にわたる長期経過観察により、細胞を用いない再生血管の良好な開存性と機能、組織像、再生の過程を研究した。同時に素材の最適化、製造工程の見直し、最適条件の確立を目指すことで、臨床応用可能な素材の安定供給を目指し研究を行ってきた。将来的には、先天性心疾患の代用補填物(医材)として提供できるよう、研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new biodegradable scaffold that does not require any cell preparation steps before its implantation to create an in-situ tissue-engineering vasculature (iTEV). Animal experiments were conducted to test its characteristics and long-term efficacy in a venous and a pulmonary positions. Eight to 10-millimeter tubular-shaped biodegradable scaffolds which consist of polyglycolide knitted fiber and L-lactide and -caprolactone copolymer sponge with outer glycolide and e-caprolactone copolymer monofilament reinforcement were implanted into canine inferior vena cava (IVC) and left pulmonary artery. All canines were well alive until each experiment, and the utility of the iTEV was evaluated from 1 to 24 months according to the studies. Histological studies and angiographies revealed well formed iTEV without marked stenosis/thrombosis or calcifications. These results provide direct evidence that this new scaffold can be useful for cell free tissue-engineering of vasculature.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：再生医療 生分解性素材 橋渡し研究

1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科，特に小児心臓血管外科領域における理想的な補填材料は、未だ認めず、人工血管も安定した成績を残してはいるものの移植後長期にわたる生体適合性、成長能、移植後の再手術回避という点においては未だ疑問を呈しており、生体適合性を有する代用補填物の開発は必要不可欠な分野である。

そこで、我々は既に実験犬において、組織工学的手法を用いて自己静脈壁混合細胞、自己骨髄単核球細胞からなる Tissue Engineered Vascular Autograft の in vivo での作成に成功しており、2000 年 5 月以降、東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得たのちに 47 名におよぶ臨床研究を行うまでに至った。

しかし、培養細胞を得るためには異種動物の血清の使用、必要備品・設備にかかる費用の問題、細胞の管理・安全性の点において GCP 基準準拠の設備などを要し、再生医療を行うにあたって、それを大きく世の中に普及させるためには大きなハードルであるのが現状である。

そこで、生体内の自己修復能を最大限に利用し、組織形成のメカニズムを解明しながら、素材（生体吸収性素材）のみによる再生血管治療の可能性を模索するというストラテジーを着想するに至った。

2. 研究の目的

小児心臓血管外科領域における理想的な補填材料(医材)の開発を行いつつ、細胞を用いることなく素材のみの再生医療の確立を行ってきた。In vivo において、完全自己組織化する再生血管用生体吸収性素材を開発し、それを直接大型実験動物に埋植した結果、特に静脈位では良好な遠隔成績と有用性を示すことができた。自己再生血管は長

期にわたる生体適合性、成長能、移植後の再手術回避の点においては理想的ではあるが、埋植後の確実性と臨床応用時での安全性の点、素材の安定供給のための製造工程の検証などが問題であった。本研究の目的として、臨床応用にあたり、適応部位の拡大を動物実験において図ること、障壁となる素材の最適化と規格化、医師主導型治験の準備が目的である。

3. 研究の方法

(1) 生体吸収性素材による再生血管の作成

新たな素材の開発

狭窄を回避するための至適条件の模索を試みた。従来のポリグリコール酸を補強剤とし、ポリカプロラクトンとポリ乳酸の共重合体の P(GA/CL) のハイブリッドポリマーを基本ベースとし、これに吸収期間が PGA とほぼ同等の乳酸とグリコール酸の共重合体 (P(GA/CL)) の繊維を新に開発し、それを補養材としてチューブ状のハイブリッドポリマーの外周にスパイラル状に巻き付けた。繊維の太さ、巻くときのピッチを調整し、移植後急性期に求められる素材の力学的強度として至適な条件の確立を目指した。

新たな生分解性素材の移植実験

8~11kg のビーグル犬に新たな素材を全身麻酔下、ヘパリン投与下に移植した。径 8~10mm、長さ 2~6cm のポリマーを実験犬の下大静脈、肺動脈、下大静脈 - 奇静脈に移植した。3 年超までの経過観察を行う。

移植後の経過観察

1、3、6、12、24 ヶ月において造影検査ならびに Elastography を行い血管の形態学的変化、生力学的変化(血管組織の弾性率)を測定。再生血管の経時的変化を測定するための一評価方法を確立。さらなるデータにより信頼性と信憑性を得るためのデータの蓄積と解析を行う。

素材の影響の検討

1、3、6、12、24 ヶ月において実験動物を犠牲死せしめ、組織学的評価を行う。また、約 2 ヶ月で吸収される P(GA/CL)の吸収の確認を 1、2.5、6 の組織切片にて確認した。また、全経過において石灰化の有無を Kossa 法変法にて確認した。

移植後 2 年での組織学的評価

正常血管との比較において、生分解性素材が完全に吸収された 2 年において取り出した再生血管の組織学的検討を行った。また、免疫組織学的評価も行い、血管の各種構成成分を評価した。

移植後 2 年での血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の蛋白解析

得られた組織の血管内皮細胞および平滑筋細胞のタンパク量を Western Blotting 法にて半定量を行った。抗体としては、内皮細胞の評価に CD146 を、血管平滑筋の評価としては α -smooth muscle actin, MHC, Calponin などを用い、正常静脈のそれと比較検討、また経時的变化を追跡する。

移植後 2 年での生化学的評価

コラーゲン、エラスチン、カルシウム含量を測定し、正常血管のそれと比較、また経時的变化を比較する。

(2) 再生血管の評価方法の確立

血管内超音波および圧カテーテルによるエラストグラフィを 1、3、6、12、24 ヶ月において行った。正常血管との弾性率差により生力学的再生度をスコア化し評価する方法を確立した。

血管内音波による再生血管内腔の評価
移植後の再生血管の内腔面を評価した。これまでの実験と同様、急性期は生分解性素材の内腔面の変化を観察した。

4 . 研究成果

生体吸収性素材による再生血管の作成

新たな素材の開発

移植後の再生血管の内腔面の狭小化と線維化が増生するのは、8mm の血管において移植後約 3 週から 5 週とわかっている。そこで、内腔方向に退縮する力に抗する素材、則ち P(GA/CL)の補強により、再生血管の狭窄を回避できることがわかっている。規格化にあたり、製造工程の見直しを図り、製品化するための条件の模索を行った。製造時の素材の加工方法の確立、素材の配合比と条件の設定、素材の径と必要な力学的強度の至適条件を追跡中である。

生分解性の移植実験生分解性素材の移植実験では、8~11kg のビーグル犬において、静脈位において径 8~10mm、2~6cm の再生血管は作成することができる。素材が完全に分解される 3 年という長期経過観察において、良好な組織形成を再確認した。さらに肺動脈部位における組織形成と開存性、有効性を示すことができた。

移植後の経過観察

1、3、6、12、24 ヶ月において造影検査ならびに Elastography を行い血管の形態学的変化、生力学的変化(血管組織の弾性率)を測定したところ、その経時的变化を評価することができた。

移植後 2 年までの組織学的経時的評価
移植後 2 年の再生血管は正常血管と比較して遜色のないものであった。免疫組織学的評価においても、血管の構成成分である内皮細胞、血管平滑筋細胞を認め、一般染色においても良好なエラスチンやコラーゲンの形成を認めた。

移植後 2 年での血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の蛋白解析

そこで、遠隔期に至るまでの組織形成の経時的变化を評価した。それにより、本素材に於いて作製した再生血管の成熟度は約 2 年に於いて得られることが判明した。

移植後 2 年での生化学的評価

コラーゲン、エラスチン、カルシウム含量を測定したところ、正常血管のそれと遜色のない結果であった。

臨床応用のための準備

本素材を用いた臨床治験を行うための準備にあたり、治験前相談を含め PMDA と協議し、信頼性試験の追加とその準備、や治験プロトコールの作製等を行った。

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 5 件)

Noriko Isayama, Goki Matsumura, Hideki Sato, Shojiro Matsuda, Kenji Yamazaki, Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature, *Biomaterials*, 35(1), 2014, 3589-3595
Goki Matsumura, Noriko Isayama, Shojiro Matsuda, Kensuke Taki, Yuki Sakamoto, Yoshito Ikada, Kenji Yamazaki, Long-term results of cell-free biodegradable scaffolds for in situ tissue engineering of pulmonary artery in a canine model, *Biomaterials*, 34, 2013, 6422-6428
Noriko Isayama, Goki Matsumura and Kenji Yamazaki, Comparison of vascular smooth muscle cells in canine great vessels, *BMC Veterinary Research*, 9, 2013, 1-8
Matsumura, G., Nitta, N., Matsuda, S., Sakamoto, Y., Isayama, N., Yamazaki, K., Ikada, Y.; Long-term results of cell-free biodegradable scaffolds for in situ tissue-engineering vasculature: in a canine inferior vena cava model.,

PLoS One; 7, 4, e35760, 2012

松村剛毅, 特集「再生医療-幹細胞操作と工学技術からのアプローチ-」 細胞を用いずに自己の血管を再生させる人工血管 (*i*-TEV), *人工臓器*, 40, 3, 236-239, 2011

[学会発表](計 9 件)

Goki Matsumura, Tissue Engineered valves and vessels: Where do we stand today? The 5th Congress of Asia Pacific Pediatric Cardiac Society; APPCS, 2014/03/06~2014/03/09, New Delhi, India, Plenary Session (招請/教育講演)

松村剛毅, 諫山紀子, 山崎健二, 臨床応用を目指した細胞を用いない生体吸収性素材のみによる再生血管, 再生心臓血管外科治療研究会, 熊本, 2014/2/19
松村剛毅, 生体吸収性素材による再生血管療法, 第 19 回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム, 東京, 2013.12.5

Matsumura, G., et al., Symposium Heart7 Regenerative medicine for artificial organs, Development of in-situ Tissue-Engineered Vasculature (*i*TEV), JSAO / IFAO 2013.9.27 Yokohama_

Goki Matsumura, MD, PhD, Shojiro Matsuda, PhD, Yuki Sakamoto, MEng, Noriko Isayama, DVM, Yoshito Ikada, PhD and Kenji Yamazaki, MD, PhD, Long-Term Results of Cell-Free Biodegradable Scaffolds for *In Situ* Tissue-Engineering Pulmonary Artery in a Canine Model, AHA2012, Los Angeles

松村剛毅, 諫山紀子, 山崎健二, 細胞

を用いない生体吸収性素材のみによる再生血管の作成と肺動脈部位への適応
拡大第 42 回日本心臓血管外科学会総会、2012/4/18、秋田（優秀演題）

Goki Matsumura; Tissue Engineering Vasculature using Biodegradable Scaffold:Single Center Experience of In-Vitro and In-Vivo Studies, International Symposium on Regenerative Medicine KIST-Wake Forest-KNUH Joint Symposium, 2011.07.15, Seoul, Korea

松村剛毅,平松健司,小沼武司,大倉正寛,立石 実,小嶋 愛,腰山 宏,久米悠太,池田ちひろ,鈴木健二,山崎健二、自己細胞と生体吸収性ポリマーを用いた心外導管型 TCPC 25 例の臨床研究の遠隔成績と今後のストラテジー、第 47 回日本小児循環器学会総会・学術集会、2011.07.07、福岡

松村剛毅,松田晶二郎,坂元悠紀,新田尚隆,山崎健二、細胞を用いない生体吸収性素材のみによる再生血管の作成とその遠隔成績、第 47 回日本小児循環器学会総会・学術集会、福岡、2011.07

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松村 剛毅 (MATSUMURA GOKI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：20297469

(2)研究分担者

山崎 健二 (YAMAZAKI KENJI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：30241087

(3)連携研究者

()

研究者番号：