

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591878

研究課題名(和文) 自己組織で内皮化された人工血管、再生小口径動脈の臨床応用

研究課題名(英文) Development of Endothelialized artificial small caliber graft

研究代表者

齋藤 聡 (SAITO, SATOSHI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60246551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小口径の人工血管は、血栓閉塞などにより長期の開存性が難しいと言われております。そこで、再生医療技術を応用し、従来の人工血管の内腔面に内皮細胞のような血栓形成を防ぐ自己組織が形成されやすいような新たな素材の開発を行った。血管吻合部からの自己の細胞が生着しやすいように人工血管の内腔面に生体吸収性素材を組み合わせることで、細胞の生着を促す環境を構築できないかと考えました。そのために薄くかつ細胞が入りやすい素材を開発する必要があり、そのための研究を行いました。生体吸収性の不織布での組織形成の度合いを検証し、より早い組織形成を認めましたが、依然小口径の内腔面に適した条件が定まらず、さらなる検証が必要です。

研究成果の概要(英文)： This study was planned to develop a novel small caliber artificial graft without late-term thrombo-embolic complication using tissue engineering techniques. The final goal was to combine the biodegradable scaffold into the internal surface of the artificial graft, which has the potential to induce the autologous tissue such as endothelial cells. To accomplish the purpose of the study, we first developed approximately three mm-small caliber bioabsorbable conduit created with non-woven fabric sheet for cell engraftment, and a film for avoiding blood leakage. The patency of the graft and tissue generation was examined in the carotid artery of the experimental animal. However, as excess clot formation was observed in the conduit, we decided to explore the better biodegradable materials to generate biological surface. The study is now in progress.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 生体吸収性素材

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。そこで、高圧にも耐えられる生体適合性のある人工血管を開発するに当たり、本研究においては生体吸収性素材に従来の人工血管を組合せ、内腔面は自己の組織化を図り、外周は安定した耐圧を得られるハイブリッド化にも着手した。

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

人工血管と生体吸収性素材のハイブリッド化に先立ち、内腔面の抗血栓性と内皮化、さらなる早期の組織化を目的としてポリグリコール酸の不織布を組織の増殖の場とし、血液の漏出防止と耐圧を兼ねた LCL フィルムによる補強を行った内径約 3mm の小口径人工血管を作成した。この基礎実験により素材の力学的強度の追究と素材の組成の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。内頸動脈への端端吻合を行い、開存性をまず調査した。

移植後の経過観察

早期の血栓化が予測できたために 1 ヶ月の短期実験を行った。造影検査ならび超音波検査を行った。

素材の影響の検討

1 ヶ月において実験動物を犠牲死せしめ、組織学的評価を行ったが、血栓化により開存性を得られるまでには至らなかった。そこで、素材の影響を明確化するために、導管からパッチ状の素材へと変更し、それを肺

動脈に埋植することで中等度の高圧化での組織化、血栓の形成の度合いを検証し、その後導管化、小口径化とする方針とした。

移植後 6 ヶ月での組織学的評価

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る 6 ヶ月の時点での組織形成を組織学的検討および生化学的に検証した。

移植後 6 ヶ月での血管内皮細胞、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、正常肺動脈との比較を行った。

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、正常血管のそれと比較、また経時的变化を比較する。

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

LCL フィルム素材と PGA 不織布の化学的結合、熱プレスによる物理的結合等を行ったところ、解離等の合併を起こさないためには素材の化学的結合が優位と考えられた。

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、6 ヶ月で再生肺動脈は作成することができる。良好な組織形成は、特に血管平滑筋細胞に於いてさらなる時間を要することを再確認した。がしかし、過去の研究において使用したハイブリッドポリマーよりも若干ではあるが組織形成の優位性はあり、不織布の間隙が細胞の埋入において優位と考察された。ただし、組織形成初期のコラーゲンを含めた線維芽細胞の増生が素材の退縮

に寄与するために退縮という現象が起こる点に於いては、小口径化した際に狭窄等の不利な点を来すことが推測され、素材のさらなる改良が求められる。

移植後の経過観察

6 ヶ月において造影検査ならびに超音波検査を行い血管の形態学的変化を測定したところ、その経時的变化を評価することができた。

移植後 6 ヶ月までの組織学的経時的評価

正常血管と比較した場合、依然未熟な組織像であることは否めなかった。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エラスチンやコラーゲンの形成を認めたが、成熟にはさらなる経過観察が必要である。

移植後 6 ヶ月での血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の蛋白解析

本素材に於いて作製した再生血管の成熟度は約 6 ヶ月に於いて従来のもよりも良い組織像が得られることが判明した。小口径かにおいてはさらなる早期の組織化が必要であり、さらなる検証を要すると判断した。

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 3 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
査読あり

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
査読あり

Noriko Isayama, Goki Matsumura
and Kenji Yamazaki, Comparison of
vascular smooth muscle cells in
canine great vessels, BMC
Veterinary Research, 9,2013,1-8 査
読あり

[学会発表](計 4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, ホテル日航熊本
(熊本県・熊本市)、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, 2013.12.5、東
京女子医科大学・早稲田大学連携先端
生命医科学研究教育施設、(東京都・新
宿区)

Matsumura, G., et al., Symposium
Heart7 Regenerative medicine for
artificial organs, Development of
in-situ Tissue-Engineered
Vasculature (iTEV), JSAO / IFAO
2013.9.27, Pacifico Yokohama
(Yokohama・Kanagawa)

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 聡 (SAITO SATOSHI)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号 60246551

(2)研究分担者

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

梅原 伸大 (UMEHARA NOBUHIRO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 90349746