

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293299

研究課題名(和文)DIY再生医療を用いて『患者体内で作る』CABG用バイオチューブ代用血管の開発

研究課題名(英文)Development of Autologous Bitubes for CABG Constructed in the Patients

研究代表者

神田 圭一 (Kanda, Keiichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60295649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己の皮下組織内で形成されるバイオチューブについて、冠動脈バイパス(CABG)に適した鋳型設計・抗血栓処理方法の開発を行い、ブタを用いた自家移植実験モデルを完成させ、実際にCABGに使用できることを確認し、研究期間内での観察では良好な結果が得られた。実際に臨床応用を行う場合には、対象は高齢者・糖尿病患者・透析患者・幼児・未熟児など組織形成能が非常に低い患者となるため、将来的な適応拡大には健常な成人から患者への同種移植なども想定して、今後の技術開発を継続する必要性が高いと考えられた。ブタを用いたパイロットスタディーを開始した。

研究成果の概要(英文)：In vivo tissue engineered vascular graft "Biotube" was optimized for the application to CABG in terms of physiological property and antithrombogenicity. They were applied to the CABG using swine model. Surgical handling and short to mid-term performance were excellent. Biotubes are expected to be applied to the high risk patients with very low regenerative potential such as elderly patients, diabetes patients, hemodialysis patients and premature infants. Therefore for further application to such patients, allogeneic Biotube transplantation derived from healthy adults is the next need. The pilot study has been started.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：生体内組織工学 小口径代用血管 冠動脈バイパス術 自家移植 同種移植 異種移植

1. 研究開始当初の背景

高齢化による血管外科再手術の増加と長期透析患者の増加

高齢化と長期透析患者の増加に伴い再手術が増加している。様々な代用血管が開発されてきたが、冠動脈バイパス術や膝以下の下肢遠位バイパス術に使用できる代用血管は依然自家動静脈のみである。自家動静脈は既に透析シャントや他の部位のバイパスにも使用されている事があり反復手術時にはグラフトが不足する。動静脈シャント作製の為の自家血管も不足しておりこちらは人工血管も用いられているが免疫能が低下している為に易感染性など問題も多い。そこで小口径動脈バイパスや透析シャントへの使用に耐えうる代用血管の開発が急務となった。

自家組織による迅速な治癒の必要性

人工材料開発や人工的な表面加工技術では、長期に渡る抗血栓性の獲得が困難であるばかりでなく、吻合部内膜肥厚・パンヌス形成などを回避出来ず、吻合部狭窄が晩期閉塞の主たる原因となる。自家血管壁細胞による迅速かつ良好な組織化がこれらを回避する為の唯一の手段である。

宿主の皮下組織内で自動的に形成される

自家結合組織代用血管『バイオチューブ』

体内に異物を埋入すると、生体防衛機構によってカプセル状の組織体で被膜化される事は古くから知られている。この現象を最新の材料工学技術で制御した D.I.Y. 再生医療 - 生体内組織工学により、管状結合組織小口径代用血管“バイオチューブ”を開発し、動物自家動脈への移植実験で、

高い耐久性・開存性

迅速な内皮化

階層状の動脈様構造の再構築

が体内で誘導される事を確認した。患者自身の体内で安全・安価に作成出来、特殊な製造施設を必要としない自家組織代用血管実用化の可能性が明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究では

CABG に適した形状と特性を持つバイオチューブ作成技術の開発と共に、大動物心臓・下肢 10~20cm 以上のロングバイパスとしての移植モデルの開発を行う。更に、移植後の経時的観察を行い、移植前後のバイオチューブの組織学的評価と共に、後述の支援技術により物理的特性を測定、本研究期間終了後近い将来に予定する臨床治験に向けてのデータ集積を行う

さらに応用の可能性を拡大するために、後述する同種・異種移植を前提とした移

植技術を開発し、動物への移植実験の段階にまで引き上げる事を到達目標とする。組織治癒過程などヒトへの臨床応用の基礎となるデータ収集を開始する。

3. 研究の方法

A. 急性期抗血栓性付与の取り組み

動物の心臓への移植後早期にバイオチューブは血管内皮細胞に覆われ天然の抗血栓性を強力に発揮すると予想されるがそれまでの約 2~4 週間は高い抗血栓性付与が望ましい。アルガトロバンを用いた抗血栓性付与技術開発を行う。

B. 力学的刺激の重要性と *in vitro* におけるバイオチューブの物理的評価・機能改善

当初の移植実験は端々吻合によるグラフト置換から開始した。バイオチューブは植え込み前は非常に薄く脆弱な組織である為、先端部にスポンジ状の吻合用カフを用いて補強していた。このため吻合部のコンプライアンスミスマッチが懸念される。

そこで手技的な工夫を行い補強カフを用いずに吻合可能とし、実際の臨床使用時に必要とされる端側吻合を実現し、CABG への応用を目指す。

C. 3Dプリンターを用いた複雑な微細構造の実現

3D プリンターによりラボにおいても細かな設計変更を鋳型形成に迅速に反映する。

D. 形成促進技術の開発および 保存用代用血管としての応用技術開発

バイオチューブ形成には現時点では約 1 ヶ月間を要するため、組織形成促進技術の開発を行なう。光刺激や化学的刺激因子の導入により組織化促進を試み、より短時間で吻合に十分な強度を持つバイオチューブ作成を目指す。

またこれと平行して、保存グラフトとしての応用の可能性を求め、自家凍結保存グラフト、同種移植用凍結グラフト、更に 架橋剤固定を行った他種保存グラフトにも取り組む。各種処理を施した異種・同種保存グラフトを用いて、縫合のハンドリング・サイズ・強度などの評価を行い、移植後急性期に形態学的評価を行う。

E. 動物移植実験モデルの設計と前臨床試験

自家移植実験モデルを完成させ研究期間内に、大動物の冠動脈または下肢の long バイパス術を開始する。

また加速耐久性試験として高流量の動静脈シャントモデルにも取り組む。

これらの動物移植実験を着実に継続し、前臨床実験としてのデータ収集を行い、協力施

設間でそれらの結果に基づき、厳格な適応決定の下臨床応用を目指す。

4. 研究成果

A. 急性期抗血栓性付与の取り組み

水溶性アルガトロバンを用いた抗血栓性付与技術開発を行なったところ良好な結果が得られた。アルガトロバンを用いる事により、ウサギ総頸動脈への移植実験では開存率が有意に改善した。現在の動物移植モデルではルーチンに使用している。

ただし実際に臨床に用いるには検証が必要である。一方で現在臨床にて静脈内投与にひろく用いられているアルガトロバンはアルコールにしか溶解しないため、これまでの自家バイオチューブの場合には実臨床応用時に課題を残した。しかし現在の臨床応用ではハンドリング向上のためにアルコール脱水処理を併用を検討しているため医用アルガトロバンの応用も可能と考えられた。

B. 力学的刺激の重要性と *in vitro* におけるバイオチューブの物理的評価・機能改善

CABG 用に特化したバイオチューブを作成するためにシリコン・テフロンなどの様々な合成基材を用いて周囲に形成された組織を比較検討したが、顕著な差は認められず医療用として広く使用され、安全性の高いシリコン基材を用いた基材作製を基盤に置く事になった。臨床応用の際には現在臨床に用いられている医療用シリコン製ドレーンなどの活用が現実的であり、最も近道であると考えられた。

今後の展開としては医療用シリコンを提供している会社で既に安全性を確認済みの材料を用いて、応用部位に応じた形状に特別注文で試作するのが現実的であると考えた。

E. 動物移植実験モデルの設計と前臨床試験

60 - 70 kg のミニブタを使用し、全身麻酔下に胸骨正中切開で心臓内に到達した。径 3 mm のバイオチューブ中枢側吻合は腕頭動脈に置いた。末梢側は心拍動下にスタビライザーを用いて左前下行枝 (LAD) と 8-0 Prolene 系にて端側吻合。その後 LAD を吻合部中枢で結紮した。

技術的にバイオチューブが CABG 用グラフトとして移植可能である事を確認出来た。

加速耐久性試験として高流量の動静脈シャントモデルとしては、ビーグル犬およびミニブタを用いて、総頸動脈 - 外頸静脈間にバイオチューブを端側吻合した。実験モデルとしては問題なく機能したが、バイオチューブと静脈との吻合部付近に吻合部内膜肥厚と狭窄が観察された。高シャント流量に誘導される過度のずり応力が原因と考えられたが、シャントグラフトとしてバイオチューブを応用する上で新たな課題となった。

C. 3Dプリンターを用いた複雑な微細構造の実現

3D プリンターによる微細加工を試みた。将来的には精密器具加工製造企業との協体制を整え産学連携の体制を整え将来的な基材の工業生産についての企業への技術移転を目指す。

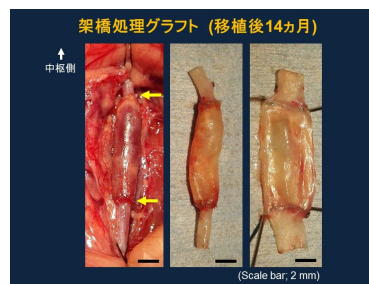
D. 形成促進技術の開発および 保存用代用血管としての応用技術開発

上述の形成促進技術は一定の成果を上げることができたが、実際の臨床応用の際には手技が煩雑となるため、今後は基材の物理的表面加工技術などの応用を検討している。

また27年度よりラット腹部大動脈、ウサギ総頸動脈、ビーグル総頸動脈などを用いた自家動脈移実験モデルを作成しつつ、Shelf Ready Graft としての異種・同種組織の応用技術・保存技術の開発を進めた。

臨床応用における最終目的はブタなどの動物で作製したバイオチューブをヒトに植え込む事であるので、今回のモデルでも異種移植モデルとして、ビーグル犬で作製したチューブをラットに異種移植する実験を開始した。

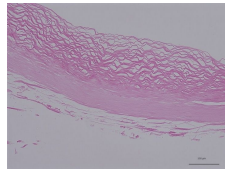
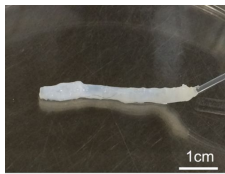
異種組織の抗原性処理のために、複数の種類と濃度・処理時間を比較検討したが、既に広く応用されているグルタルアルデヒド処理を今回は用いた。ビーグル犬由来のバイオチューブを 0.5%グルタルアルデヒド溶液で 20 分間処理した後、生理食塩水で十分に洗浄し凍結保存した。これを解凍してラットの腹部大動脈に異種移植した。結果として1年以上の開存が得られ、内皮化も良好に行われた。



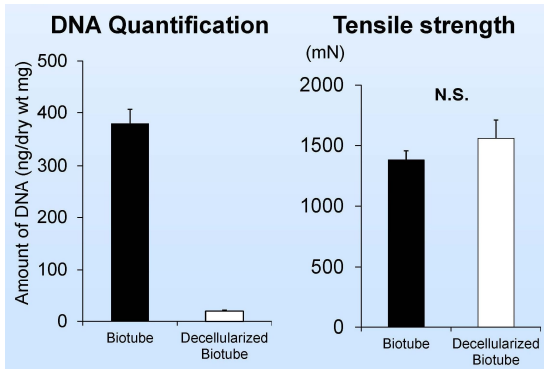
但し組織化は自家組織由来のバイオチューブよりは遅れる傾向にあった。内皮化が完成するまでの抗凝固処理の導入や、動静脈シャントなどの高流量システムへの移植により、早期の開存性を確保する事が出来れば、自家組織由来のバイオチューブに近い結果が得られる可能性が示唆された。

異種・同種グラフトの処理方法としても、現在用いているグルタルアルデヒドは、細胞毒性も有し、長期移植例での石灰化などの報告も行われているため、新たな処理方法を検討する必要があると考えられた。

そこで化学架橋処理では無く、組織工学的にもひろく導入されつつある脱細胞化についても応用を拡げる試みも開始した。



(上図)脱細胞化バイオチューブの肉眼所見および組織所見



(上図)脱細胞後のDNA定量と物性試験

臨床応用を想定した場合、組織形成能の低下している乳幼児や高齢者におけるバイオチューブ形成は困難であると考えられるため、今後は自家移植だけではなく、上述の保存異種移植グラフトの開発を含めた基礎研究を推進しつつ、想定される疾患に応じた臨床応用プロトコールの作成を行って、臨床応用を進める予定である。

本法は、*in vitro* 細胞培養技術や遺伝子学的手法を用いた通常の再生医療技術に比較すると簡便且つ経済的であるため、高額になり続ける医療コスト節減の意味からも革新的なブレイクスルーをもたらすことが期待される。

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 7 件)

1. First Successful Clinical Application of the In Vivo Tissue-Engineered Autologous Vascular Graft. Kato N, Yamagishi M, Kanda K, Miyazaki T, Maeda Y, Yamanami M, Watanabe T, Yaku H. Ann Thorac Surg. 2016 Oct;102(4):1387-90. doi:10.1016/j.athoracsur.2016.06.095. PMID: 27645948 (査読有)
2. Development of in vivo tissue-engineered microvascular grafts with an ultra small diameter of 0.6 mm (MicroBiotubes): acute phase evaluation by optical coherence tomography and magnetic resonance

angiography. Ishii D, Enmi J, Moriwaki T, Ishibashi-Ueda H, Kobayashi M, Iwana S, Iida H, Satow T, Takahashi JC, Kurisu K, Nakayama Y. J Artif Organs. 2016 Sep;19(3):262-9. doi: 10.1007/s10047-016-0894-9. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27003431 (査読有)

3. Kawajiri H, Mizuno T, Moriwaki T, Iwai R, Ishibashi-Ueda H, Yamanami M, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Implantation study of a tissue-engineered self-expanding aortic stent graft (bio stent graft) in a beagle model. J Artif Organs. 2015 Mar;18(1):48-54. (査読有)
4. Kawajiri H, Mizuno T, Moriwaki T, Ishibashi-Ueda H, Yamanami M, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Development of tissue-engineered self-expandable aortic stent grafts (Bio stent grafts) using in-body tissue architecture technology in beagles. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015 Feb;103(2):381-6. (査読有)
5. Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohmura K, Tajikawa T, Kanda K, Tatsumi E. In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015 Jan;103(1):1-11. (査読有)
6. Takewa Y, Yamanami M, Kanda K, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Taenaka Y, Tatsumi E, Nakayama Y. In vivo evaluation of an in-body, tissue-engineered, completely autologous valved conduit (biovalve type VI) as an aortic valve in a goat model. J Artif Organs, 2013, 16, 176-184. (査読有)
7. Yamanami M, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Implantation study of small-caliber "biotube" vascular grafts in a rat model. J Artif Organs, 2013, 16, 59-65. (査読有)

[学会発表](計 25 件)

1. Masashi Yamanami, Takanori Kawasaki, Daisuke Kami, Taiji Watanabe, Keiichi Kanda, Satoshi Gojo, Hitoshi Yaku. The Development Of Xenogeneic, Self-Organizing Small-Diameter Vascular Graft Using Biotube Matrix. ESAO 2016. 2016 Sep 14-17; Warsaw. Poland
2. 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 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

- 第16回 再生医療学会 3/7 - 9 仙台
3. 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 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 人工臓器学会 第54回日本人工臓器学会. 2016年11月23日-25日; 鳥取.
 4. 『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 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 第44回日本血管外科学会学術総会. 2016年5月25日 - 27日; 東京.
 5. Watanabe T, Kanda K, Yamanami M, Yaku H. In Vivo Tissue Engineered Small Diameter Vascular Graft; Application To Off-pump CABG In The Porcine Model. American Heart Association Annual Meeting 2015, Orland, USA. 2015/11/7-11
 6. Takewa Y, Kanda K, Nakayama Y, Tatsumi E. Development of a novel autologous bioprosthesis for a tailor made valve surgery. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2015. Leuven, Belgium. 2015/9/2-5
 7. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Development of shelf-ready xenogeneic vascular grafts; xenobiotubes. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2015. Leuven, Belgium. 2015/9/2-5
 8. Y. Takewa, Y. Nakayama, H. Sumikura, N. Naito, K. Kanda, T. Tajikawa, T. Tanaka, E. Tatsumi. A tailor made valve surgery with a novel autologous bioprosthesis. European Society of Cardiology Annual Meeting. London, UK. 2015/8/29-9/2
 9. R. Iwai, M. Yamanami, Y. Namoto, Y. Nakayama. Rapid in vivo maturation of BIOTUBE vascular grafts by giant drops patching of adipose-derived stromal cells (ADSCs). European Society of Cardiology Annual Meeting. London, UK. 2015/8/29-9/2
 10. Kawajiri H, Kanda K, Watanabe T, Yaku H, Nakayama Y. Development and Implantation of Tissue Engineered Self-expandable Aortic Stent Grafts. American Heart Association Annual Meeting 2014, Chicago, USA. 2014/11/15-19
 11. Watanabe T, Yamanami M, Kanda K Yaku H. Autologous Connective Tissue Membrane (Bio-Sheet) as a Substitute for Self-Pericardium. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2014. Roma, Italy. 2014/9/17-20
 12. Kawajiri, Yamanami M, Kanda K Yaku H. Development and Implantation of Tissue Engineered Selfexpandable Aortic Stent Grafts (Bio Stent Grafts) using in-body Tissue Architecture Technology in Beagles. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2014. Roma, Italy. 2014/9/17-20
 13. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Long-term Auto-implantation of autologous tissue small caliber vascular grafts (Bio-tubes). European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2014. Roma, Italy. 2014/9/17-20
 14. Y. Takewa, Y. Nakayama, H. Sumikura, N. Naito, K. Kanda, T. Tajikawa, T. Tanaka, E. Tatsumi. A tailor made valve surgery with a novel autologous bioprosthesis. European Society of Cardiology Annual Meeting. Barcelona, Spain. 2014/8/30-9/3
 15. M. Yamanami, H. Kawajiri, T. Mizuno, R. Iwai, J. Enmi, H. Iida, T. Watanabe, K. Kanda, H. Yaku, Y. Nakayama. Long-term performance of autologous tissue ultra-small-caliber vascular grafts (biotubes) in a rat abdominal aorta replacement model. European Society of Cardiology Annual Meeting. Barcelona, Spain. 2014/8/30-9/3
 16. Y. Takewa, Y. Nakayama, H. Sumikura, S. Kishimoto, K. Date, R. Wieloch, K. Kanda, T. Tajikawa, T. Tanaka, E. Tatsumi. Key factors to develop histogenesis in a novel autologous heart valve implantation. European Society of Cardiology Annual Meeting. Barcelona, Spain. 2014/8/30-9/3
 17. H. Kawajiri, T. Mizuno, T. Moriwaki, M. Yamanami, K. Kanda, H. Yaku, Y. Nakayama. Development and implantation of tissue engineered self-expandable aortic stent grafts (bio stent grafts) using in-body tissue architecture technology in beagles. European Society of Cardiology Annual Meeting. Barcelona, Spain. 2014/8/30-9/3
 18. K. Kanda, T. Watanabe, M. Yamanami, H. Kawajiri, O. Sakai, H. Yaku, T. Tajikawa, T. Oie, N. Takewa, T. Mizuno, M. Uechi, Y. Nakayama. Development of in vivo tissue-engineered cardiovascular prostheses. International Congress of the European Society for Cardiovascular and

- Endovascular Surgery.
2014/4/24-27.Nice, France.
19. M. Yamanami, H. Kawajiri, T. Mizuno and R. Iwai, T. Watanabe, K. Kanda, H. Yaku, Y. Nakayama. Long-term results of autologous tissue extremely small-caliber vascular grafts (biotubes) in a rat abdominal aorta replacement model. International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery. 2014/4/24-27.Nice, France.
 20. Kanda K, Watanabe T, Yamanami M, Yaku H. IN VIVO TISSUE-ENGINEERED SMALL DIAMETER “BIOTUBE”. Int. European Association of Cardiothoracic Surgery Annual Meeting 2013. Vienna, Austria.2013/10/5-9.
 21. 渡辺太治、山南将志、水野壮司、神田圭二、夜久均、中山泰秀 .2013年9月27-29日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) 第51回日本人工臓器学会大会/第5回国際人工臓器学術大会 Presidential Poster Award 受賞 『バイオチューブ人工血管移植後6年目の超音波による開存性、形態的变化の評価』
 22. Y. Takewa, K. Kanda, Y. Nakayama, H. Taenaka, T. Tajikawa, E. Tatsumi. EVALUATION OF NOVEL AUTOLOGOUS HEART VALVE (BIOVALVE STENT) FOR TRANSCATHETER AORTIC VALVE IMPLANTATION. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2013. Glasgow, UK. 2013/9/11-13
 23. Y. Nakayama, Y. Takewa, T. Kaneko, M. Yamanami, T. Mizuno, H. Kawajiri, N. Okumura, S. Hanada, K. Kanda, E. Tatsumi. CAN HUMAN BIOTUBES BE USED AS ARTIFICIAL VASCULAR GRAFTS? European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2013. Glasgow, UK. 2013/9/11-13
 24. T. Watanabe, K. Kanda, T. Mizuno, M. Yamanami Y. Nakayama, H. Yaku. FOLLOW-UP REPORT ON THE BIOTUBE OF 5-YEAR IMPLANTATION ANGIOGRAPHIC AND SONOGRAPHIC EVALUATIONS. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2013. Glasgow, UK. 2013/9/11-13
 25. K. Kanda, T. Watanabe, M. Yamanami, O. Sakai, H. Yaku, Y. Nakayama. DEVELOPMENT OF IN VIVO TISSUE ENGINEERED SMALL DIAMETER GRAFTS “BIOTUBES”. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2013. Glasgow, UK. 2013/9/11-13

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 圭一 (Kanda Keiichi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号: 60295649

(2) 研究分担者

坂井 修 (Sakai Osamu)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 10298432

渡辺 太治 (Watanabe Taiji)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 20448723

山南 将志 (Yamanami Masashi)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
研究者番号: 30438204

中山 泰秀 (Nakayama Yasuhide)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・生体医工学部・室長
研究者番号: 50250262

田地川 勉 (Tajikawa Tsutomu)
関西大学・工学部・准教授
研究者番号: 80351500

夜久 均 (Yaku Hitoshi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 50295648

上地 正美 (Uechi Masami)
麻生大学・客員教授
研究者番号: 90296426

(3) 連携研究者

大場 謙吉 (Oba Kenkichi)
関西大学・名誉教授
研究者番号: 30029186

〔図書〕(計 0 件)