

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15477

研究課題名(和文)異種チューブ・マトリックスを足場に患者体内で再生する動脈グラフトの開発

研究課題名(英文)Development of arterial grafts regenerated from the xenogeneic scaffolds

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己の皮下組織内で形成される自家結合組織代用血管に化学的に様々な処理を加えることにより、異種への応用を目指した。当初抗原性処理のために広く用いられているグルタルアルデヒドを用いて、異種由来のグラフトでも良好に機能することを確認した。しかし無処理の自家組織に比較して組織治癒過程はやや遅れる傾向が明らかとなったため、後半の期間では脱細胞化処理を行った。これにより十分な抗原性の除去と強度を同時に実現できたため、異種・同種動物移植実験を行った。結果として自家組織に遜色のない治癒過程が明らかとなり、今後の臨床応用につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We applied various chemical treatments to the autologous connective tissue substitute blood vessel formed in the subcutaneous tissue of recipients and aimed at application to xenogeneic grafts. It was confirmed that glutaraldehyde, which was widely used for antigenic treatment, functioned well even with grafts of xenogeneic origin. However, since the tissue healing process tended to be slightly delayed compared to untreated autologous tissue, decellularization treatment was performed in the latter period. As a result, we were able to realize sufficient removal of antigenicity and enough strength at the same time, so we carried out xenogeneic / allogeneic animal transplant experiments. As a result, a healing process comparable to autologous tissue was revealed, suggesting the possibility of future clinical application.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：生体内組織工学 同種移植 異種移植 代用血管 脱細胞処理

1. 研究開発当初の背景

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療の必要性

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、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。

個体差の克服と『Shelf Ready Graft』としての異種由来組織活用の試み

しかし形成される組織には個体差があり、使用に耐えうる組織を“確実に作製する事は困難”である。特にヒトへの臨床応用時には、患者(=宿主)は極めて組織治療力が低下した状態の高齢者・糖尿病患者・透析患者である事が想定されるため、個体差の克服は大きな課題となる。

そこで自家移植だけでは無く、保存異種移植グラフトの開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では異種移植を前提としたグラフトの開発を行い、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している。

まず Shelf Ready Graft として保存可能な“異種チューブマトリックス”作製を行い、形成された組織の力学的評価による機能改善を行う。更に動物実験モデル作成を行い、組織治療過程などヒトへの臨床応用の基礎となるデータ収集を行う。

3. 研究の方法

A. *in vitro* におけるチューブの物理的評価・機能改善

植え込み前のバイオチューブは非常に薄く脆弱な組織である。得られた組織の力学的特性評価を行い。組織の形成方法・処理方法にフィードバックし、機能改善をおこなう。

B. Shelf Ready Graft としての処理方法・保存方法の開発。

小動物体内で作製したチューブマトリックスを Shelf Ready Graft として保存し、蓄積する。マトリックスの処理方法・保存方法を最適化する。

C. 実際の異種移植実験モデルの作成

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異種チューブマトリックスをヒトに植え込む事であるので、今回の研究でも異種移植モデルとして、作製したチューブを異種動物の動脈に移植する。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。

4. 研究成果

A. *in vitro* におけるチューブの物理的評価・機能改善

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力学的に比較検討したが、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。

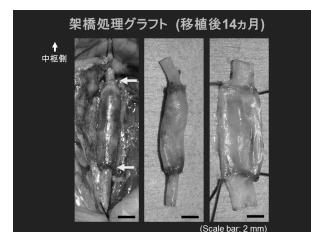
そのため臨床応用についてのプロトコル作りでは基材として医療用シリコン製ドレーンを用いる事を前提に研究計画を作成することとした。

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。

B・C. 異種組織応用及び保存技術の開発および、実際の異種移植実験モデルの作成

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植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。

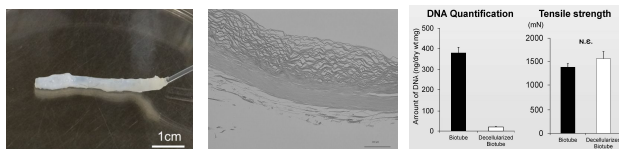


異種組織の抗原性処理のために、複数の種類と濃度・処理時間を比較検討したが、既に広く応用されているグルタルアルデヒド処理を今回は用いた。ビーグル犬由来のバイオチューブを 0.5%グルタルアルデヒド溶液で 20 分間処理した後、生理食塩水で十分に洗浄し凍結保存した。これを解凍してラットの腹部大動脈に異種移植した。結果として 1 年以上の開存が得られ、内皮化も良好に行われた。

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。



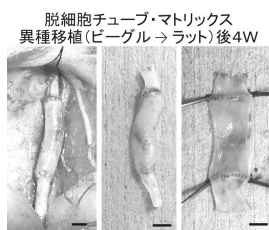
(上図) 脱細胞化バイオチューブの肉眼所見・組織所見・DNA 定量および物性試験

パイロットスタディとして、実際にビーグル犬由来のバイオチューブに脱細胞処理を加え、異種グラフトとしてビーグル犬に移植し、自家組織と同様に良好に機能することが確認できた。

更にブタ・ビーグル犬などで脱細胞処理同種グラフト移植を開始し、4 週以内の短期であっても既に良好な組織治癒過程が確認出来た (論文執筆中のためデータ非公開)。

また、最終年度では力学的特性評価についても力を入れた。これまでのバイオチューブ壁についての評価を行いつつ関西大学工学部の指導の下、京都府立医大施設内に組織に高耐圧評価設備をカスタムメイドで作成、様々な化学処理を施した組織についての強度測定を行った。また最近の研究では組織が乾燥すると強度が変化することも明らかとなったため、生理食塩水を満たした水槽内の環境下で、引っ張り強度を測定できるシステムも設置して、得られた組織を測定した。

化学処理により組織強度が向上し、グラフトの信頼性を高めることが出来る可能性が示唆された (論文執筆中のためデータ非公開)。



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、上述の保存異種移植グラフトの開発についての基礎研究を更に推進しつつ、想定される疾患に応じた臨床応用プロトコルの作成を行って、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 8 件)

1. One year Rat Study of iBTA-induced "Microbiotube" Microvascular Grafts With an Ultra-Small Diameter of 0.6 mm. Ishii D, Enmi JI, Iwai R, Kurisu K, Tatsumi E, Nakayama Y. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2018 Jun;55(6):882-887. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.03.011. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29661648 (査読有)
2. Wall thickness control in biotubes prepared using type-C mold. Terazawa T, Nishimura T, Mitani T, Ichii O, Ikeda T, Kosenda K, Tatsumi E, Nakayama Y. J Artif Organs. 2018 Mar 30. doi: 10.1007/s10047-018-1035-4. [Epub ahead of print] PMID: 29603026 (査読有)
3. Implanted In-Body Tissue-Engineered Heart Valve Can Adapt the Histological Structure to the Environment. Takewa Y, Sumikura H, Kishimoto S, Naito N, Iizuka K, Akiyama D, Iwai R, Tatsumi E, Nakayama Y. ASAIO J. 2018 May/Jun;64(3):395-405. doi: 10.1097/MAT.0000000000000769. PMID: 29517511 (査読有)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
 7. 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)
 8. 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)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 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. 脱細胞化生体由来結合組織膜の動脈パッチ移植への応用 第 17 回 日本再生医療学会総会. 2018 年 3 月 21 日-23 日; 横浜.
2. 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. 脱細胞化結合組織膜の動脈パッチ移植実験 第 17 回 日本心臓血管外科再生治療研究会 2018 年 2 月 19 日; 三重県.
3. M Yamanami, T Kawasaki, D Kami, T Watanabe, K Kanda, S Gojo, H Yaku. Application of the xenogeneic decellularized tube matrix produced by in vivo tissue engineering to the 'off-the-shelf' small-caliber vascular graft. ESAO 2017. 2017 Sep 6-9; Vienna, Austria.
4. Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H. The Development of Xenogeneic, Self-Organizing Small-Caliber Vascular Grafts. TERMIS European Chapter Meeting 2017. 2017 Jun 26-30; Switzerland.
5. Shuhei Fujita, Masaaki Yamagishi, Takako Miyazaki, Yoshinobu Meda, Satoshi Taniguchi, Hisayuki Hongu, Masashi Yamanami, Keiichi Kanda, Hitoshi Yaku. First Clinical Application Of The Human Bio tube To The Congenital Heart disease. Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering. 2017 Jun 4-8; Ohio, USA.
6. Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H. Development Of In Vivo Tissue Engineered Xenogeneic Vascular Graft. Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering. 2017 Jun 4-8; Ohio, USA.
7. 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. 異種由来自己再生型小口径代用血管の開発血管の開発. 第 16 回日本心臓血管外科再生治療研究会. 2017 年 2 月 27 日; 東京.
8. 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. 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. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017 年 3 月 7 日 3 月 9 日; 仙台
9. 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
10. 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.
11. 『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.
12. 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

13. 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
14. 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
15. 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
16. 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

〔図書〕(計 0 件)

〔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)・特任助教
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・システム理工学部・准教授
研究者番号: 80351500

(3) 研究協力者

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