

平成22年6月5日現在

研究種目： 基盤研究 (A)
 研究期間： 2006～2009
 課題番号： 18209042
 研究課題名 (和文) 循環器系人工組織のプレインプランテーションによる体内自己組織化
 研究課題名 (英文) In vivo pretreatment of bio-derived and synthetic for cardiovascular tissue regeneration.

研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI TAKESHI)
 国立循環器病センター・臓器移植部・部長
 研究者番号： 60155752

研究成果の概要 (和文)： 合成材料のナノファイバーからなる再生型人工血管のプレインプランテーションにおいて、周囲組織の浸潤による生体内高強度化と、周囲組織の血管内腔への浸潤による肥厚化を、独立に制御することが可能となった。さらに、従来型の生体組織由来の脱細胞化法は小口径血管への応用が難しく、プレインプランテーションによる新たな生体由来成分による脱細胞化法により効率よい脱細胞化血管を作成できることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)： In pre-implantation of the synthetic biodegradable scaffolds (templates) the induced ingrowth of the surrounding tissue into the scaffolds and the suppressed hyperplasia based on the excess of tissue ingrowth could be controlled by regulating the structure and chemical features of the nanofiber matrices for the scaffolds. In addition, in vivo acellularization of the small-diameter blood vessel based on the complement system has been found to be very effective to maintain the structure and mechanical property of the blood vessel walls.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	17,400,000	5,220,000	22,620,000
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

研究分野：臓器移植

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学

キーワード： スキャホールド・脱細胞・ポリ乳酸・組織移植・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

臓器不全末期患者の治療として臓器移植が行われているが、我が国では移植可能臓器の不足が深刻であり、臓器移植希望患者数13,600人に対して年間1,070例の移植が行わ

れているにすぎない。これは米国における UNOS(United Network for Organs Sharing)に登録された移植希望患者 76,100人に対する年間 22,800 例の移植に比べ圧倒的に少ない。また、脳死臓器移植は高度先進

医療として位置付けられており、今後とも必要性は高い反面、その高額医療化も問題となっている。

特に、循環器領域では、海外での進歩には到底追従できない状況が続いている。我が国では、年間約2万件の冠動脈バイパス術、約1万件の心臓弁置換術が施行されている。また、閉塞性血栓血管炎等によって、約5千人が下肢切断を余儀なくされており、1万件弱の末梢血管再建術が施行されている。不全あるいは傷害をうけた血管組織を置換するためには、自己組織や凍結保存同種組織の使用が好まれ、米国では年間数千件もの同種組織が使用されている。しかし我が国では、同種組織の提供は年間数十件程度に留まっており、圧倒的に不足している。一方、先天性疾患を抱える小児患者では、特有の早期石灰化に加えて移植組織の成長性欠如のため、同種組織でも複数回の移植が避けられない。

2. 研究の目的

上述した問題を解決するため、移植後におけるホストの細胞浸潤による自己組織の再構築を期待し、異種脱細胞化組織（血管および弁）や生体吸収性材料製人工血管などの再生型組織を用いた再生型心臓弁・血管の臨床応用が始まりつつある。例えば、米国CryoLife社は1992年から米国政府の補助を受け、動物組織から細胞を除去した異種組織移植法の研究開発に取り組み、SynerGraftと称する脱細胞化血管・心臓弁を製品化している(O'Brien et al. *The SynerGraft valve. Semin Thrac Cardiovasc Surg* 1999; 11: 194-200)。一方、細胞生物学の観点からは、幹細胞やES細胞から種々の機能細胞への様々な分化因子が同定されつつあるも、生体外で完全な組織構築を行うことは容易ではない。また、移植後の自己組織化に効果的な細胞種や数、組込位置等についてはほとんど情報が得られていない。これに対し、移植後の生体内では未知の因子に加え、周囲環境等によっても細胞の分化・誘導が惹起されると考えられる。

我々は、脱細胞化異種組織（心臓弁や血管）および生体吸収性材料からできた人工血管の移植実験を進めており、いずれの素材でも移植後の血管内皮細胞や平滑筋細胞、線維芽細胞の浸潤を確認しているが、埋入初期段階における免疫反応、異物反応、およびシーリングの問題などが確認されている。循環器系材料の場合、内膜肥厚による塞栓や、石灰化、あるいは血液漏洩などは、患者生命に直結する問題であり、何としても回避しなくてはならない。また、移植組織が完全に自己化されるまでには6ヶ月以上の期間を有することも明らかとなってきた。

本研究では、これらの生体組織由来人工血

管および合成材料製人工血管を「テンプレート」とし、レシピエントの皮下や腹腔にプレインプラント（前埋入）することで、*in vivo* 自己組織化を促す。この*in vivo* 自己化組織を、適応部位に本移植するというストラテジーによって、確実かつ早期で、危険性の少ない再生型移植組織を開発し、次世代再生治療に応用することを目的とする。また、テンプレートに対して、レシピエント間葉系幹細胞などの自己細胞を播種することで、作製した自己細胞担持テンプレートのプレインプラントについても検討し、再生型人工組織の2段階移植の有用性を実証する。

3. 研究の方法

(1) 2種類のテンプレートの作成

脱細胞生体由来テンプレートと合成素材テンプレートの作製は以下の様にして行う。まず、生体由来脱細胞テンプレートは、我々のセンターで開発した超高静水圧印加と、続く各種洗浄法による細胞除去技術により作成した。他のグループで研究されている界面活性剤やタンパク分解酵素等による処理では、血管壁組織深部の細胞核十分に除去することができない。また、処理後に硬化する現象や、細胞毒性を示す界面活性剤の使用も大きな問題である。そこで、液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高压印加処理法を開発した。酵母や芽胞をもたない細菌は500MPaの処理で細胞膜が破壊されて殺菌され、また、HIV等のエンベロープを持つウイルスは600MPaの処理でほぼ完全に不活化される。我々は、980MPa (10,000気圧)の超高压印加処理を10分間行い細胞の破壊と殺菌を同時に行った。圧処理後、組織内に残存した細胞残渣の除去方法を詳細に検討する必要がある。これまでに、マイクロ波などによる高効率の洗浄が確立され、ブタ内在性レトロウイルスも全く検出されなかったが、組織移植後の若干の石灰化など、未だ微量残留物の影響の疑いもある。そこで、微量分析を行うとともに、以下に示す「プレインプランテーション法」により、生体内に備わる免疫応答を含む生体内環境による微量成分除去を進めた。血管部位へ移植後の急性免疫応答は、組織の破壊や血栓の形成などを引き起こし、生命に係わる危険要因であるが、皮下などへのプレインプランテーションステージで起こる微弱な免疫応答は、生体への影響も少なく、逆に組織の自己化を推進するものと期待される。

次に、合成素材テンプレートはポリ乳酸を主体とする生体吸収性材料から作成した。血管用の中空構造を有する多孔質スキャフォールドは対象となるポリ乳酸誘導体の所定濃度ジオキサン溶液を鋳型に流し込んだ後

に所定の温度と減圧度にて凍結乾燥することで作製する。この時、濃度、温度、減圧度のパラメーターにより孔径と空孔率が変化することをSEMにて確認した。これらの性質が、後述するプレインプランテーション操作における、周囲組織の浸潤と自己組織化に大きく影響を与えると考えられる。さらに、外側面への組織浸潤を遅延させる目的で、ポリ乳酸製超微細メッシュ構造を、電界防止法により構築した。このことにより、インプランテーション実験に於いては、側面と内腔面が自己組織化され、続く移植実験における、自己組織化と自己血管組織との接着に寄与すると考えられる。また、上記の生体由来テンプレートと同様に、循環条件下での間葉系幹細胞を播種した自己細胞担持テンプレートも作製した。この自己細胞播種効率には合成素材テンプレートの微細構造と表面性状が大きく影響を与えるため、水銀圧入細孔径分布測定およびESCA表面解析装置を用いて、その特性を正確かつ定量的に評価した。

(2) プレインプランテーションと *in vivo* 自己化組織の評価

本研究の中心的ステップであるプレインプランテーションでは、埋入部位と埋入期間が最も重要なファクターであるが、埋入方法も大きな影響を有すると考えられる。テンプレートや自己細胞担持テンプレートを、そのまま皮下あるいは腹腔内に埋入する系のみではなく、細胞性免疫のみを隔離する半透膜あるいは部分免疫隔離膜で作製したシールドに封入して埋入する系、および組織との接着のみを抑制して血球や体液成分とは自由に接触できるようにメッシュケージに封入する系について検討を進める。

In vivo 自己化組織の性能を定量的に評価する系の構築が必要である。上述の如く開発した超高静水圧印加法による細胞除去技術にて作製された生体組織テンプレートの場合には、プレインプラントした後の細胞残渣成分の微量ディテクションが必須である。このために、EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) 組み込み動物の組織を用いる。すなわち、EGFP組換動物実験から摘出した組織を脱細胞処理した後に、EGFP(-)動物に所定期間プレインキュベーションした後に摘出し、その組織内に残存するEGFP陽性成分の分析を進める。細胞により組織学的に検討する。一方、合成素材製人工血管の場合には、柔軟性の獲得と力学強度の向上に関しては取り出し後に測定し、自己組織化の程度は従来どおりの組織切片観察を行う。また、作製したコンストラクトを、そのままプレインプランテーションするのみではなく、半透膜およびハイドロゲル膜に包含する系も検討する。ウイルスの残存、ドナー

由来の細胞、移植幹細胞の解析はリアルタイムPCR法にて測定する。また、ドナー由来の細胞、および、移植した幹細胞に関しても、上述のEGFP組換動物由来の細胞を用いることで、レシピエント由来の細胞と区別して検討を進める。

(3) 合成二層性テンプレートのプレインプランテーションと移植実験

作製した口径4mmの合成テンプレートをハイブリッド種の♂の体重約20kgのイヌ(5匹)の頸部皮下に1週間プレインプランテーションした図2(B)のような状態で埋入した。1週間後に、皮下から取り出し、頸動脈へ置換した。気管挿管後、静脈ラインをとり、常法に従って実施した。近位、遠位ともに縫合終了後に血流の再開を超音波にて確認した。

(4) *In vivo* 自己化組織の移植

本申請システムと従来システムの比較実験を行うために、実験系として以下の3系を遂行する。(1)生体由来テンプレートおよび合成素材テンプレートをブタ大静脈あるいは大動脈へ移植する。移植は、全身麻酔下に肺動脈置換では体外循環下、常温心拍動下に主肺動脈を切除、置換する。下大静脈置換では単純遮断下に置換する。(2)採取した骨髄細胞をフィルトレーションし、直接、灌流型細胞播種システムによりテンプレート上に播種する。その後同様に移植に供する。

4. 研究成果

(1) 高強度合成高分子と抗血栓性合成高分子

再生型合成人工血管の作成にあたっては、内腔面の素材となる抗血栓性材料と生体内で早期に組織化して力学的強度を向上させる吸収性素材が必要である。前者としては我々が独自に開発したポリ乳酸とポリエチレングリコールからなるマルチブロック共重合体を用いた。高い親水性と含水性のためにタンパク・細胞・血小板・血栓の付着を大きく抑制する共重合体である。この高い抗血栓性は、*in vitro* では全血試験およびPRP試験、および *in vivo* においても確認することができた。

当初、ポリ乳酸系材料の所定濃度ジオキサン溶液を鋳型に流し込んだ後に所定の温度と減圧度にて凍結乾燥することで作製する予定であったが、十分な血漿化度の向上を達成することができず、動脈計に耐えられる強度のものを得るのは困難であった。そこで、最終的には、電界紡糸法により作成したナノファイバー製再生型人工血管に変更して研究を遂行した。ナノファイバー製の人工血管は従来の凍結乾燥型に比較して格段に高い力学強度を有したが、プレインプランテーシ

オンによる組織反応によるさらなる強度向上が起こるかを、皮下埋入実験により検討した。

マルチブロックは柔軟性も高い一報で力学強度的にはポリ乳酸に劣る。そこで、外層には結晶性高分子であるポリ-L-乳酸性のナ

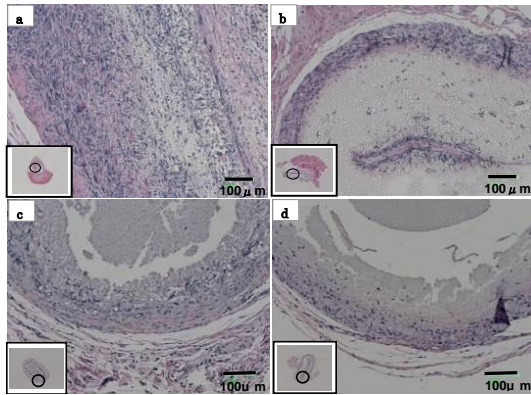


図1 ナノファイバーマトリックスに対する組織浸潤。(A) 大繊維径ポリ乳酸、(B) 小繊維径ポリ乳酸、(C) 大繊維径マルチブロック、(D) 小繊維径マルチブロック

ノファイバー層を用いて二重構造体を作成した。

いずれの高分子材料も、クロロフォルムから電界防止することで繊維径の大きなナノファイバーが、また、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) から電界紡糸することで繊維径の小さなナノファイバーを作成することに成功した(図1)。これらの、ナノファイバースキャホールドに対する生体応答をラット皮下埋入により検討した結果、ポリ乳酸ナノファイバーには速やかに周囲組織が浸潤し力学強度と柔軟性の向上に寄与した。一方、特に繊維径の小さなマルチブロックナノファイバーに対しては組織浸潤が起こらずバルクとしてもバイオイナートな性質を呈した。

(2) 合成テンプレートの移植

電界紡糸法により作製したテンプレートのプレインプラントにより、ナノファイバー構造特有の活発な組織浸潤と自己組織化が確認され、血管壁強度が飛躍的に向上した(図2)。当初、この組織浸潤性が強すぎるために、移植組織外部からの組織浸潤が内腔の肥厚化につながり狭窄する減少があったが、上述したように、小繊維径のマルチブロック共重合体層を内層にすることで、外部からの組織浸潤が効率よく抑制されることを見出した。すなわち、早期の自己組織化達成と内膜肥厚抑制という2つの機能を有する二重構造体を作成するに至った。

(3) ブタ脱細胞動脈の下行大動脈置換実験

国立循環器病センター研究所にて超高

圧法にて作成した脱細胞ブタ胸部下行大動脈の移植実験を常法に従って行った。まず、2か月間埋入後に犠牲死させ、グラフトの様子を検討した結果。良好な改善、軽微な肥厚化、内皮化の完了、等優れた成績を確認した。一方、血管壁内部への細胞浸潤は未だ不十分であり、若干の肥厚化を認めた。そこで、長期間の実験を進めた。3か月観察を3頭、6か月観察を3頭、そして、12か月観察を4頭実施した。いずれの場合にも、その開存性は良好であり、ラプチャー等、血管壁の脆弱性を示すような所見は一切認められなかった。

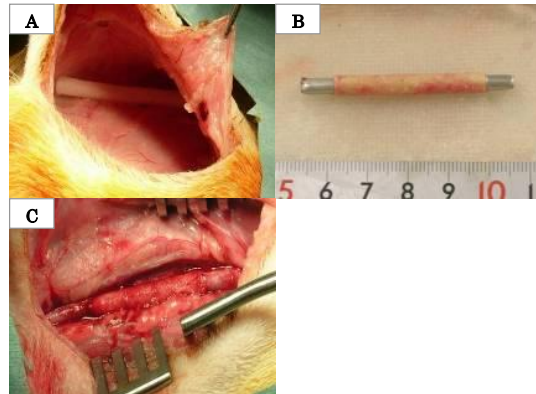


図2 プレインプランテーションした再生型合成テンプレート (A)、プレインプランテーション後、および、イヌ頸動脈への移植

一方、小口径(2mm以下)の血管に関して同手法により脱細胞処理を施した場合、予想通り血管壁の脆弱化が顕著であった。超高圧処理法の条件検討を進めると同時に、脱細胞化血管のプレインプランテーション実験を進める中で、ネイティブ血管の生体内埋入により効率よく脱細胞が進行し、さらに、血管壁強度もほとんど低下しないことが明らかとなった。

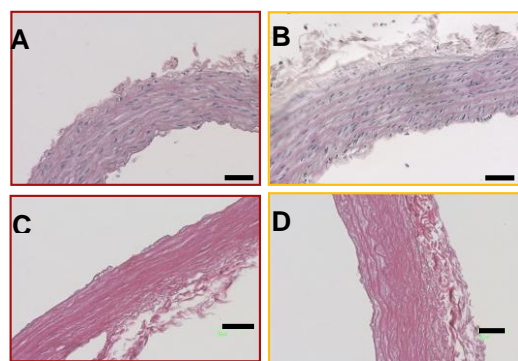


図3 プレインプランテーションによる優れた脱細胞効率 (A) 未処理血管 (B) 超高圧脱細胞 (C) プレインプランテーション法 (D) 超高圧およびプレインプランテーション処理

さらに詳細な検討の結果、これらの脱細胞効果のメカニズムとして補体成分の関与が明らかとなったことから、in vitro においても再現できることが確認された。新たな、生体組織ブレインプランテーション法、および、生体成分由来脱細胞法は、血管壁の構造・特性を高次に保存出来る優れた手法である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Nakatani T.: Heart Transplantation. *Circ J*: 73(Suppl A):A-55-A-60, 2009、有
- 2) Mano A et al. (12 人中 11 番目): Body mass index is a useful predictor of prognosis after left ventricular assist system implantation. *J Heart Lung Transplant* 28:428-433, 2009、有
- 3) Mano A et al. (16 人中 2 番目): Which factors predict the recovery of natural heart function after insertion of a left ventricular assist system? *Journal of Heart and Lung Transplantation* 27:869-874, 2008、有
- 4) Saito S, Nakatani T, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Miyazaki S, Yagihara T, Kitamura S. : Is extracorporeal life support contraindicated in elderly patients? *Ann Thorac Surg* 83:140-145, 2007、有
- 5) Tatsumi K et al. (8 人中 2 番目): Domestic and foreign trends in the prevalence of heart failure and the necessity of next-generation artificial hearts: a survey by the working group on establishment of assessment guidelines for next-generation artificial heart systems. *J Artif Organs* 10:187-194, 2007、有
- 6) Saito S et al. (12 人中 2 番目): Initial experiences with the HeartMate vented electric left ventricular assist system in Japan. *J Artif Organs* 10:118-121, 2007、有
- 7) Wada K et al. (7 人中 7 番目): Pharmacokinetic study and limited sampling strategy of cyclosporine in Japanese heart transplant recipients. *Circ J* , 70(10):1307-1311, 2006、有
- 8) Komamura K et al. (15 人中 11 番目): Heart-type fatty acid binding protein is a novel prognostic marker in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy. *Heart* , 92:615-618, 2006、有
- 9) Hamamoto M et al. (8 人中 7 番目): Suppressive effect of phosphodiesterase type 4 inhibition on systemic inflammatory responses after cardiopulmonary bypass. *J Artif Organs* , 9:144-148, 2006、有
- 10) K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, and S. Kitamura, T. Fujisato, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(6), 943-949, 2008、有

- 11) S. Kakinoki and T. Yamaoka, Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence, *Acta Biomater.*, in press, 2009, 有
- 12) T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, Y. Moritan, and T. Yamaoka, Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve, *J. Biomater. Sci. Pol. Ed.*, in press, 2010, 有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Nakatani T: Heart transplantation and mechanical support in Japan. シンポジウム、17th Asian Pacific Congress of Cardiology, 2009.5.20-23, Kyoto, Japan.
- 2) Nakatani T: Heart transplantation in Asia-pacific region -its status and tasks-. ジョイントシンポジウム(コメンテーター), 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22
- 3) Wada K et al. (8 人中 8 番目): Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetile dose by twelve-hour-area under the curve to avoid acute rejection in heart transplant recipients. *International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions*. 2007.4.25-28, San Francisco, CA, U.S.A.
- 4) Nakatani T et al. (12 人中 1 番目): Over one year support by using extracorporeal left ventricular assist system. Panel discussion, *American Society for Artificial Internal Organs 52nd Annual Conference*, 2006.6.8-10, Chicago, U.S.A.
- 5) Nakatani T, Kitamura S: Clinical experience of ventricular assist systems and heart transplantation in Japan. ジョイントシンポジウム、第 10 回日本日本心不全学会学術集会、東京、2006.10.13-15
- 6) T. Yamaoka: Surface Modification of Poly(lactic acid)-based Scaffolds with Oligo(lactic acid)-Oligopeptide Amphiphilic Conjugates, 1st Asia Biomaterial Congress (1st ABMC), 2007.12.6-8, Tsukuba
- 7) T. Yamaoka: Novel biomaterials for cell transplantation, *TERMIS-AP 2008*, 2008. 11.6-8, Taipei

[図書] (計 12 件)

- 1) 中谷武嗣: 心筋疾患 心臓移植。「最新循環器診療マニュアル」[総編集 友池仁暢](中山書店、東京):239-243, 2009
- 2) 中谷武嗣、築瀬正伸、戸田宏一: 人工心臓。「重症心不全の予防と治療」[編著 北風政史](中外医学社、東京)2009: 293-298
- 3) 中谷武嗣: 心臓移植医療。ビジュアル版「3 大疾病の教科書 がん・心臓病・脳卒中をストップ!」[国立がんセンター・国立循環器病センター編] (三省堂、東京):118-119, 2008
- 4) 中谷武嗣: 人工心臓。ビジュアル版「3 大疾

- 病の教科書 がん・心臓病・脳卒中をストップ！][国立がんセンター・国立循環器病センター編] (三省堂、東京):120-121, 2008
- 5) 中谷武嗣:補助循環・人工心臓。「内科学第九版」(朝倉書店、東京):205-208, 2007
 - 6) 中谷武嗣:心臓移植。「新 目でみる循環器病シリーズ 15 心筋症」(メジカルビュー社、東京) 89-94, 2007
 - 7) 山岡哲二、木村良晴、藤里俊哉, 医療用バイオベースマテリアル, In バイオベースマテリアルの新展開, シーエムシー出版, 第3編 応用編, 第1章, 187-197, 2007
 - 8) 山岡哲二, バイオプラ最前線「ポリ乳酸をベースにした再生医療用バイオマテリアル」, バイオプラジャーナル, No.26, 20-25, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 武嗣 (NAKATANI TAKESHI)
国立循環器病センター・臓器移植部・部長
研究者番号: 6 0 1 5 5 7 5 2

(2) 研究分担者

山岡 哲二 (TETSUJI YAMAOKA)
国立循環器病センター研究所・生体工学部・部長
研究者番号: 5 0 2 4 3 1 2 6

(3) 研究分担者(2006-2008 年度)

藤里 俊哉 (FUJISATO TOSHIYA)
(2006) 国立循環器病センター研究所・再生医療部・室長
(2007-2008) 大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号: 6 0 2 7 0 7 3 2

(4) 連携研究者(2009 年度)

藤里 俊哉 (FUJISATO TOSHIYA)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号: 6 0 2 7 0 7 3 2