

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20390373
 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 and It' s 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

研究成果の概要（和文）：細胞の播種をすることなく生分解性素材のみにて再生血管を作成するための素材の探究と最適化を行った。分解速度、物理強度、形状の異なる素材を組み合わせ2年にわたる長期埋植実験を行い、良好な開存性と機能、組織像を有する再生血管の作成に成功した。それは、生力学的にも正常血管とほぼ同等な弾性率を有する血管であった。本研究により素材のみでも良好な再生血管が *in vivo* にて作成できることが証明された。

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 (*i*TEV). Animal experiments were conducted to test its characteristics and long-term efficacy. Eight-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). All canines were well alive until each experiment, and the utility of the *i*TEV was evaluated from 1 to 24 months according to the studies. The elastic modulus of *i*TEV determined by intravascular ultrasound and pressure studies reached and kept about 90% of native IVC after 1 month. Angiography of 2-years *i*TEV showed well-formed and regenerated vasculature without marked stenosis or thrombosis with the low mean pressure gradient. The length of 2-years *i*TEV extended when compared to the length of the original implanted scaffold. Histological studies revealed well-formed vessel-like vasculature without calcification. Biochemical studies showed no significant difference in hydroxyproline, elastin, and calcium content when compared to native IVC. These results provide direct evidence that this new scaffold can be useful for cell free tissue-engineering of vasculature. The long-term results revealed that the *i*TEV was of good quality and adapted its shape to the needs of the living body. Therefore, this scaffold would be applicable for pediatric cardiovascular surgery involving biocompatible materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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

組織工学 (Tissue Engineering) は、工学 (Engineering Science) と生物学 (Biological Science) を伴って応用した学際的な新しい概念で、吸収速度の制御が可能な生体吸収性ポリマーを足場とし、それに目的とする培養細胞などを播種し、生体内にて目的組織を作成しようという新しい学際的研究分野である。歴史的には 1980 年代後半に臓器移植医療における臓器提供者不足が深刻化している米国で 1990 年代に提唱された。その最大の利点としては播種、あるいは生分解性素材に生着した細胞が組織、細胞外基質を完成させつつ、足場としてのポリマーは加水分解により徐々に吸収されるが故に、移植後長期では異物が残存しない点にある。Tissue Engineered Skin Graft は本邦においても承認されるに至った。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。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

本課題の最大の目標は、細胞を用いなくても体内に移植するだけで再生血管が作成できる生分解性素材を開発し、心臓血管外科領域における再生医療を確立することである。これまでの臨床研究の経過より、狭窄を来してしまう患者がいた。この現象は、動物実験

においても同様に再現される。材質・素材に対する個々の過度の炎症性反応によるもの (個体差) とも考えられるが、本研究においては狭窄のメカニズムを究明することにより、組織形成時における過度の繊維性組織の形成、過度の炎症、さらに個体差を凌駕する新たな素材を開発することで、細胞の播種を術前にすることなく生体に優しい、狭窄などの術後の事象が起こさない再生血管用の新たな素材を開発することである。その究極の目標は、治験申請が可能なデータを本研究にて出すことが最終目標となる。これまで蓄積してきたデータをもとに、新たなストラテジーにて作成された再生血管の組織学的検査、画像診断、生力学的検査、炎症の評価、壁厚の変化、ポリマーの強度につき検討し、長期埋植実験を行うことでその長期にわたる有用性を証明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 生体吸収性素材による再生血管の作成

① 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 β - γ 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を確立した。

② 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8mm、長さ2~3cmのポリマーを実験犬の下大静脈に移植した。9頭については2年までの経過観察を行った。

③ 移植後の経過観察

1、2.5、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。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した。

④ 素材の影響の検討

1、2.5、6、12、24ヶ月において実験動物を犠牲死せしめ、組織学的評価を行った。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。

⑤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。

⑥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を用い、正常静脈のそれと比較検討した。

⑦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した。

(2) 再生血管の評価方法の確立

①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、2.5、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。

②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。

3. 研究成果

(1) 生体吸収性素材による再生血管の作成

① 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た。これにより導管としての形態を維持するのみならず、血液の乱流やそれに基づく血栓の形成を予防し、周辺組織から移入する組織形成を妨害することなく血管組織が再生されていくことが示唆された。これにより、細胞を播種することなく、素材のみによる再生血管の作成が可能であることが判明した。素材の径が変わるとP(GA/CL)の耐内腔への狭小化の効果が変わってしまう。よって、素材の径と必要な力学的強度の至適条件を明らかにしたい。

② たな生分解性素材の移植実験

8~11kgのビーグル犬において、2~3cm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2年という長期経過観察において、

良好な組織形成を認めた。より長尺での再生血管の成績はまだ安定しておらず、新たな移植部位ないしモデルを考えなくてはならない。よって、今後は長尺、より径の大きい素材での良好な再生血管の開存性と組織形成を証明したい。また、静脈系のみならず、肺動脈系においても応用していきたい。

③移植後の経過観察

1、2.5、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、その経時的変化を評価することができた。よって、今後は素材の分解期間と組織の再生度により動物実験としていつまでフォローすることが妥当かを明らかにしたい。

④素材の影響の検討

1、2.5、6、12、24ヶ月において実験動物を犠牲死せしめ、組織学的評価を行ったところ、P(GA/CL)のファイバーは、約2ヶ月において石灰化を起こすことなく吸収されることがわかった。よって、再生血管用の生分解性素材を補強する役目としては十分機能を発揮していることが明らかになった。

⑤移植後2年での組織学的評価

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。遠隔期においては問題がないことはこれまでの多くの組織切片より判明しており、よって今後は径のより大きいもの、長尺グラフトでの短期での組織形成の違いを明らかにしたい。

⑥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2年の再生血管のタンパク量を内皮細胞、血管平滑筋細胞につき検討した。2年においては、正常血管のそれと比較しても差は認められなかった。今後は、経時的なタンパク量の変化を解析し、再生組織がどれくらいの期間で完成するのかをタンパクの解析にて類推したい。

⑦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。

(2) 再生血管の評価方法の確立

①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、2.5、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たところ、生分解性素材が残る移植後6ヶ月までは未熟

な組織と分解されつつある生分解性素材の協調により、正常血管に対し約85～96%の再生度を示した。これにより、生分解性素材の組織形成時における有用性のみならず、構造体の力学的補助を行いつつ血管の弾性率を維持しているものと考えられる。また、素材の加水分解された後もほぼ96～100%の再生度を示し、良好な血管のリモデリングが行われていることが示された。今後は、さらなるデータの収集を行い、測定値の信憑性を高めたい。また、この測定技術の解析の精度を高めたい。

③ 管内超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は、1から2.5ヶ月にかけて、犠牲内膜を形成し血管の内腔面が狭小化する。しかし、6ヶ月になるに従い生分解性素材の分解にともない血管壁厚は正常のそれに近づいていく。6ヶ月以降においては、ほぼ正常血管と同様な壁厚と脈圧に応じた血管の壁運動を認めた。これにより、再生血管の経時的な組織学的変化と動的な変化を観察することが可能であった。今後は、再生肺動脈も作成していく予定でもあり、肺動脈においても応用できるか検討したい。

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)

- ① Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, Ichihara Y, Naito Y, Breuer C, Shinoka T. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(2):431-436, 436 e431-432. 、査読有
- ② Matsumura, G., Shin'oka, T. Ikada, Y., Sakamoto, T., Kurosawa, H. 、 Novel anti-adhesive pericardial substitute for multistage cardiac surgery, *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 16, 309-312, 2008, 査読有
- ③ Nitta N, Yamane T, Matsumura G, Shiina T. Ultrasonic measurement of vascular scaffold elasticity using catheter system. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2008;2008:5298-5301. 、査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 松村剛毅他、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41回日本心臓血管外科学会学術総会、2011.2.23、千葉
- ② 松村剛毅他、生体吸収性素材のみによる再生血管の作成、第10回心臓血管外科再生治療研究会、2011.2.21、千葉
- ③ 松村剛毅他、生体吸収性素材による再生血管の作成とその変遷、第46回日本人工臓器学会大会、2008.11.28、東京
- ④ N. Nitta, Takashi Yamane, G. Matsumura, Tsuyoshi Shiina 、 Ultrasonic Measurement of Vascular Scaffold Elasticity Using Catheter System, 30th Annual International IEEE EMBS Conference, 2008.8.20-24, Vancouver, Canada
- ⑤ 松村剛毅他、超音波イメージングによる再生血管評価方法の開発、第44回日本小児循環器学会総会・学術集会、2008.7.3、福島

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称：血管再生基材

発明者：松村 剛毅、筏 義人、松田 晶二郎、坂元 悠紀

権利者：グンゼ株式会社

種類：特許

番号：【国際出願番号】PCT/JP2009/063438

出願年月日：【国際出願日】平成21年7月28日 (2009.7.28)

国内外の別：国際出願

②名称：血管再生基材

発明者：松村 剛毅、筏 義人、松田 晶二郎、坂元 悠紀 権利者：グンゼ株式会社

種類：特許

番号：【優先権主張番号】特願2008-195409 (P2008-195409)

出願年月日：【国内出願日】平成20年7月29日 (2008.7.29)

国内外の別：国際出願

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

小沼 武 (KONUMA TAKESHI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：40307559

富田 幸子 (TOMITA SACHIKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：40231451