

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670559

研究課題名(和文) 異種動物バイオチューブマトリックスを用いた二段階生体内組織形成技術の開発

研究課題名(英文) Development of Two-Stage in vivo tissue engineering for xenogeneic implantation of cardiovascular tissues.

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：異種組織の応用技術の開発を進めた。異種組織の抗原性処理のために、複数の架橋剤で濃度・処理時間を比較検討したが、広く臨床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。1年以上の開存が得られ内皮化も良好に行われた。組織化は自家組織バイオチューブよりは遅れる傾向にあった。抗凝固処理や、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。

研究成果の概要(英文)：Several kinds of animal implantation models were developed. Tissue treatment was also optimized. We compared several kinds of concentration of glutaraldehyde and formaldehyde. We finally selected the 20 min treatment with 0.5% glutaraldehyde PBS solution. Biotube constructed in the beagle dogs were treated and stored at -20 degree celsius for several weeks. Stored biotube was xenogeneically implanted to the abdominal aorta of the rats. Xeno-biotube exhibited excellent performance as small diameter vascular graft over 1 year. They are expected as shelf-ready small diameter vascular grafts.

研究分野：血管外科学

キーワード：生体内組織形成 自家移植 同種移植 異種移植 小口径代用血管 動静脈シャント

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 - 『生体内組織形成技術』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 (J Biomed Mater Res B Appl Biomater 92(1):236-242,2010, J Artif Organs 10(1):10-5, 2007, Cell Trans 13: 439-449, 2004.)。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

本研究では後述する異種移植を前提とした“二段階移植生体内組織形成技術”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“異種バイオ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。

更に作製された異種バイオチューブマトリックスを元に宿主体内で自家移植用動脈

グラフトを形成。形成された動脈様管状組織体を実際に自家の動脈再建に用いる“本移植”を行い、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予定である。

3. 研究の方法

A. 基材・形状設計による組織形成促進への試み

バイオチューブマトリックス作成には治癒能力の高い小動物を用いる予定であるが、更にマトリックス形成の確実性を高めるために、鋳型基材の材質の違いが与える組織形成への影響を調べる。表面の分子レベルでの加工修飾及びマクロ形状設計や血管新生誘導因子の導入により、組織化を促進できるかを検証する。

B. 複雑な基材加工技術の確保

これまでは CAD による鋳型設計後、コンピューター制御のスクレイパーでアクリル樹脂を削り取り更にシリコン鋳型を作成する過程をとっていたが、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事が可能となった。更に鋳型基材製作に精密器具加工製造業を営む新幹工業株式会社に全面的な協力体制を得たため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。

C. 動物への移植を前提とした急性期抗血栓性付与

移植後早期にバイオチューブマトリックスは宿主の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、内皮化までの急性期には異種バイオチューブマトリックス自体に一時的な抗血栓性の付与が望ましい。この技術開発を行う。

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

鋳型の最適化の後、小動物体内で作製したバイオ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。

E. 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バイオ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。

4. 研究成果

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。

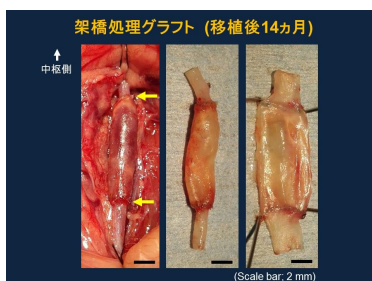
動物への移植を前提とした急性期抗血栓性付与方法としては、水溶性アルガトロパンを用いて検証で良好な結果を得たが、特殊な薬品であるため、実際に臨床に用いるには検証が必要である。

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パ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す。しかし、本研究で作成する『バイオチューブマトリックス』では、バイオチューブをグルタルアルデヒドなどで、架橋済みであるため、架橋剤の洗浄後にアルコールを用いる事が可能となる。今後の研究ではこの方法に対する検証も進めていく予定である。

また初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 としての異種組織の応用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マトリックス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より開始した。

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。

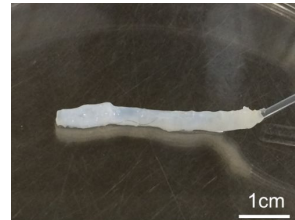


但し組織化は自家組織由来のバイオチューブよりは遅れる傾向にあった。内皮化が完成するまでの抗凝固処理や、動静脈シャントなどの高流量システムへの移植により、早期の開存性を確保する事が出来れば、自家組織由来のバイオチューブに近い結果が得られる可能性が示唆された。

以上の研究結果を再検討すると、研究計画当初考えていた二段階移植については必ずしも必要ない可能性も示唆された。

異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、新たな処理方法を今後検討する必要がある。

現在、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(下図)。



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、自家移植だけでは無く、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ルの作成を行って、臨床応用を進める予定である。

臨床応用に関しては、冠動脈バイパスや下肢遠位バイパス、透析用の動静脈シャントなどの小口径動脈バイパスの他、基材の工夫次第では下大静脈再建・右室流出路再建などの低圧系(系統)グラフトやリンパ管再建にも用いることが出来る可能性がある。

本法は、*in vitro* 細胞培養技術や遺伝子学的手法を用いた他の再生医療技術に比較すると圧倒的に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 5 件)

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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 21 件)

1. 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
2. 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
3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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』

18. 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
19. 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
20. 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
21. 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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：