

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861114

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の凝集体導入によるバイオチューブ代用血管移植後の血管壁再構築化促進

研究課題名(英文) Rapid in vivo maturation of Biotube vascular grafts by giant drops patching of adipose-derived stromal cells

研究代表者

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

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)：生体内組織工学的手法で作製したバイオチューブに間葉系幹細胞を導入することで移植後バイオチューブの早期血管組織への再構築化を達成することを目的とした。GFP組替Lewisラットの皮下脂肪から分離した脂肪由来間葉系幹細胞(ADSCs)の凝集体を作製した。次にGFP陰性ラットの皮下で作製したバイオチューブを腹部大動脈に自家移植し、移植直後にバイオチューブ外表面にADSCs凝集体を貼付けた。移植後3週間でADSCs凝集体由来の細胞がバイオチューブ内腔面に到達し、血管内皮マーカー陽性細胞にて内腔面が完全に覆われていた。従来のバイオチューブの血管内皮化にかかる期間が大幅に短縮された。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stromal cells (ADSCs) is considered to be one of the most promising cell sources for use in vascular tissue regeneration because of their angiogenic potential. In this study, giant drops of ADSC aggregates were used for the application to enhancement of in vivo maturation of BIOTUBES, in-body tissue engineered autologous vascular grafts. ADSCs from subcutaneous fat of GFP transgenic rats could self-aggregate single spheroid. BIOTUBES, which were prepared by in-vivo tissue engineering, were auto-implanted to abdominal aortas with outer surface patching of the ADSC drops. After 3 weeks implantation, the GFP expressing cells, reached its luminal surface, were converted to endothelial cell marker positive cells and completely lining the surface, whereas it took 3 months to achieve endothelialization in traditional BIOTUBE without patching. Rapid maturation with endothelialization of BIOTUBE grafts was achieved by patching of giant drops of ADSCs spheroids.

研究分野：血管外科学

キーワード：小口径代用血管 生体内組織工学 脂肪由来間葉系幹細胞 バイオチューブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 自家組織よりなる代用血管開発への取り組み

これまで冠状動脈や膝以下の末梢動脈への遠位バイパスなどに適応できる小口径(径5mm以下)の人工血管のほとんどがグラフト閉塞の壁を打ち破ることなく断念され、未だ実用化されたものは無い。人工材料開発や人工的な表面加工技術による抗血栓処理では人工血管内腔面での血栓形成は一定期間予防できても、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・パルス形成などを回避することができず、吻合部狭窄が晚期グラフト閉塞の主たる原因となっている。

このため最近では自家血管壁細胞による迅速かつ良好な組織化が長期の抗血栓性を獲得し吻合部狭窄を回避するための唯一の手段であると考えられている。

(2) レシピエント皮下でレシピエント自身が作り出す代用血管『バイオチューブ』の開発

体内に異物を埋入するとカプセル状の組織体で被膜化されることは古くから知られている。この生体の防御反応としての現象を最新の材料工学技術で制御することを『生体内組織形成術』といい、この技術を用いて体内で作成したカプセル状の組織を代用血管『バイオチューブ』として用いる試みを開始している。

バイオチューブは厚さ数百 μm 程度と薄いものの、1500mmHgもの内圧に耐えうる高い耐圧性を持つことが明らかにされた。

我々はこれまでにラット腹部大動脈(内径1.5mm)、ウサギ頸動脈(内径2.0mm)、ビーグル犬頸動脈(内径5.0mm)へのバイオチューブ自家移植を行い良好な開存を得ており、すでにラットで1年、ウサギで2年、ビーグル犬では5年を超える長期において高い耐圧性と耐久性を示している。

バイオチューブは、これまでにない極めて有用な小口径代用血管となり得ることが期待される。

(3) 管状組織体(バイオチューブ)移植後の組織学的変化

バイオチューブは移植前には厚さが約100 μm 程度であったが、移植後3ヵ月で壁厚は生体動脈と同等にまで増加しており、平滑筋細胞やエラスチンが層状に形成され動脈中膜と酷似した組織が再生された。さらに内腔は血管内皮細胞で完全に覆われていた。

このようにバイオチューブは移植後自家血管壁細胞による血管壁の再構築が見られ、長期の抗血栓性や耐久性が期待できるが、血管組織への再構築化に数ヵ月間を要する。移植前のバイオチューブは主としてコラーゲンと線維芽細胞から形成され、血液と接する内腔面に内皮細胞層が存在しないため、移植

後血管組織への再構築までの数ヵ月間は血栓閉塞の恐れがある。

このためより迅速な血管壁再構築を誘導する技術の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、従来の生体内組織形成術の単純な生体内バイオプロセスに加えて、細胞工学的なアプローチにより内皮や平滑筋細胞の前駆細胞を含む細胞群である間葉系幹細胞をバイオチューブ移植時に導入することで、より早期に移植後バイオチューブの血管組織への再構築化を達成することを目的とした。

間葉系幹細胞は骨髄や脂肪細胞、臍帯血、胎盤、羊膜などの組織に存在し、血管内皮や平滑筋細胞への分化能に加え、強い血管新生誘導能を有することから血管再生治療への利用が期待されている。本研究では間葉系幹細胞の供給源として、採取が容易で安全性が高く、一度に大量に採取可能な脂肪組織に注目し、脂肪由来間質系幹細胞(Adipose-derived stromal cells; ADSCs)を用いることにした。

また、これら間葉系幹細胞を懸濁液の状態でも人工血管に播種しても大部分が周辺組織に拡散しほとんど生着しない。そこで、バイオチューブへの細胞の新たな移植形態として、細胞の凝集体を作製しこれをバイオチューブに貼り付ける方法を考案した。

実験動物へのバイオチューブ自家移植直後のグラフト外表面にADSCs凝集体を貼り付ける実験を行い、移植後の組織学的変化を観察することでバイオチューブの血管組織への再構築期間が短縮されるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) ADSCs凝集体の作製

カチオン性高分子として Poly(dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) を、アニオン性高分子としてプラスミドDNAを用い、それらの混合比によって電荷比(+/-)を変化させたポリイオン錯体を作製し、その水溶液をポリスチレン製培養皿に添加し、加温(37 $^{\circ}\text{C}$)により吸着させることで表面電荷量の異なる培養皿を作製した。この培養皿でADSCsを培養した結果、電荷比が低い(2以下)表面では通常の細胞培養と同様に単層で増殖したが、電荷比を高く(4以上)すると、組織体の形状に変化を生じ、さらに細胞播種密度を高くするとひとつの巨大な細胞凝集体が得られた。

また、細胞凝集体は播種密度を 1.5×10^5 cells/cm²以上に保った状態で単に培養面積を増加させるだけで0.1~1mm以上まで容易にサイズ制御が可能であった。

以上より、この電荷比の高い培養皿を用いることでADSCsの凝集体を単に細胞播種密度をコントロールするだけで形成させることが可能となった。

本技術を用いて緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein; GFP)組み替え Lewis ラットの皮下脂肪から分離した ADSCs を播種することで ADSCs 凝集体を作製した。

(2) バイオチューブの自家移植及び ADSCs 凝集体の貼付け

GFP 陰性 Lewis ラットの背部皮下にシリコン円柱鋳型(径 1.5mm、長さ 20mm)を 4 週間埋入し、周囲に形成されたカプセル化組織を摘出。鋳型を抜去することで、線維芽細胞とコラーゲンからなるバイオチューブが得られた。得られたバイオチューブをラット腹部大動脈へ自家移植を行い、移植直後のバイオチューブ外表面に GFP 組み替えラットから得られた ADSCs 凝集体を貼付け閉腹した。またコントロールとしてバイオチューブ移植時に ADSCs 凝集体の貼付けを行わないモデルも作製した。

(3) バイオチューブ移植後の組織学的変化の検討

バイオチューブ移植後 3 週、12 週で摘出するモデルを作成し移植後の組織学的評価を行い、ADSCs 凝集体貼付けを行ったバイオチューブがコントロールモデルと比較して早期に血管壁再構築がおこっているかを評価した。

4. 研究成果

(1) ADSCs 凝集体の作製

緑色蛍光蛋白質(GFP)組み換え Lewis ラットの皮下脂肪から分離した ADSCs を電化比の高い培養皿に播種することで数 mm 大の大きな ADSCs の凝集体を作製することができた。

(2) バイオチューブの自家移植及び ADSCs 凝集体の貼付け

GFP 陰性 Lewis ラットの背部皮下に埋入したシリコン基材周囲には結合組織からなるカプセルが埋入後 4 週間で確実に形成された。カプセル毎基材を摘出し、カプセルから基材を抜去することで設計通り内径 1.5mm のバイオチューブを得た。得られたバイオチューブをラット腹部大動脈へ端々吻合による自家移植を行った。吻合操作は通常のマイクロサージャリーによる血管吻合と同様に行え、ハンドリングも良好であった。移植したバイオチューブ外表面に ADSCs 凝集体を貼付けた。コントロールとして ADSCs 凝集体を貼付け無いモデルも作製した。移植後はすべてのラットは生存し、グラフトの閉塞を認めなかった。移植後 3 週、12 週でグラフトの摘出を行い、組織学的評価を行った。

(3) バイオチューブ移植後の組織学的変化

ADSCs 凝集体を貼付けたグラフトでは 3 週の時点で ADSCs 由来の GFP 陽性細胞がバイオチューブの全周を被覆するとともに壁内部にも浸潤、内腔面まで到達していた。血管内

皮を染める CD31 免疫染色においてグラフト内腔面は内皮細胞で裏打ちされていることが分かった。また、血管平滑筋細胞のマーカーである α -SMA 染色では α -SMA 陽性細胞がグラフト壁に層状に形成されていることがわかり、移植後 3 週でグラフトの内皮化を含む血管壁再構築が起こっていることがわかった。ADSCs 凝集体由来の細胞が直接的にバイオチューブの内皮化に寄与していることが示唆され、ADSCs 凝集体貼付け群はコントロール群に比べて組織再構築の期間が短縮されていることがわかった。

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 4 件)

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;18(1):48-54. (査読有)

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;103(2):381-386. (査読有)

Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohnuma 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;103(1):1-11. (査読有)

Mizuno T, Takewa Y, Sumikura H, Ohnuma K, Moriwaki T, Yamanami M, Oie T, Tatsumi E, Uechi M, Nakayama Y. Preparation of an autologous heart valve with a stent (stent-biovalve) using the stent eversion method. J Biomed Mater Res Appl Biomater 2014;102(5):1038-1045. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

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. 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. 第 54 回日本人工臓器学会大会、2016 年 11 月 24-25 日、米子コンベンションセンター、鳥取県米子市.

Yamanami M, Kawasaki T, Kami D, Watanabe T, Kanda K, Gojo S, Yaku H. The Development of Xenogenic, Self-Organizing Small-Diameter Vascular Graft Using “Biotube Matrix” XLIII Annual Congress of the European Society for Artificial Organs, 2016年9月14-17日、ワルシャワ(ポーランド)。

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。『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。第44回日本血管外科学会学術集会、2016年5月26-27日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京都港区。

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。自由に設計でき、Shelf Ready Graft として利用可能な再生型小口径代用血管の開発。第15回日本再生医療学会総会、2016年3月17-19日、大阪国際会議場、大阪府大阪市。

山南将志、渡辺太治、森本和樹、川尻英長、坂井修、神田圭一、夜久均。Shelf Ready Graft としての使用を目指した異種バイオチューブ小口径代用血管(XenoBiotube)の開発。第53回日本人工臓器学会大会、2015年11月19-21日、東京ドームホテル、東京都文京区。

山南将志、渡辺太治、川尻英長、坂井修、神田圭一、夜久均。Shelf Ready Graft としての使用を目指した小口径代用血管の開発：異種バイオチューブ(XenoBiotube)動物移植実験。第68回日本胸部外科学会定期学術集会、2015年10月17-20日、ポートピアホテル、兵庫県神戸市。

Yamanami M, Watanabe T, Kawajiri H, Kanda K, Nakayama Y, Yaku H. Development of Shelf-ready Xenogeneic Vascular Grafts; XenoBiotubes. XLII Annual Congress of the European Society for Artificial Organs, 2015年9月2-5日、ルーヴェン(ベルギー)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山南 将志 (YAMANAMI, Masashi)

京都府立医科大学付属病院・心臓血管外科・専攻医

研究者番号：30438204