

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
戦略的イノベーション創出推進プログラム (S-イノベ)
中間評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 細胞の三次元配置技術に基づいた小口径脱細胞血管等組織再生材料の創成
(英 語) Development and in vivo evaluation of small-diameter acellular blood vessels
by controlling three-dimensional cell arrangement

研究開発実施期間：平成31年4月1日～令和3年3月31日(予定)

研究開発代表者 氏名：(日本語) 山岡 哲二
(英 語) Tetsuji Yamaoka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 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・部長
(英 語) Director, Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center
Research Institute

II 研究開発の概要

本プロジェクトではダチョウ頸動脈由来脱細胞化小口径血管の臨床化を目指している。2019年度は、非臨床POCの確立のために、①ミニブタ等大動物実験への移植による開存率や生体反応の評価、②PMDA対面助言に向けた製品使用の確定と各安全性試験の完遂、③効率的かつ適切な臨床試験デザインのため小口径血管臨床家研究会を通しての臨床家からの意見聴取と臨床デザインの確定、を進めた。以下に、各サイトにおける本年度研究開発の概要および代表的な具体的研究成果を記載する。

【国立循環器病研究センター概要】ダチョウ由来小口径血管のミニブタ大腿動脈置換術では、血管径のミスマッチが課題であったが、抗凝固処置や安静確保の処置無しに3-4ヶ月での高い開存率が得られた。また、脱細胞化血管に対する炎症による中膜の吸収等を検討したところ、1年移植後の血管壁厚の減少は22%にとどまることも明らかとなった。本年、小口径血管実用化研究会を重ねて多くの臨床家からの意見を聴取した結果、糖尿病性下肢救済を実現する前段階のファーストインヒューマン試験の対象疾患として、腓骨皮弁等の形成術後等の動脈再建術を実施することが妥当との判断に至った。世界初の直径2mm小口径血管のファーストインヒューマン試験がハイリスク治療であることは明らかであり、優れた治療成績が得られる症例を慎重に選ぶことが望ましいと考えたためである。これに伴って、臨床試験を担当する医師らによるミニブタ移植において、サイズミスマッチがなく両側を端々吻合とする移植系を立ち上げ、抗凝固薬投与スケジュールや術後の安静確保など詳細な移植手技の確認を進め、内腔表面の優れた抗血栓性が再確認された。また、包装シール機を導入して製品の包装設計

を進めた。エンドトキシン、残存 DNA 量、力学試験等を完了し、いずれも問題が無いことを確認した。さらに、生物学的安全性試験の一つである細胞毒性試験を詳細に検討したところ上市されている生物由来材料と同程度でありその安全性が確認され、臨床試験に向けて順調に準備が進んでいる。得られた成果は、17 件の学会発表並びに 7 件の論文等として公開した [(1)M.C.Munisso and T.Yamaoka, Peptide with endothelial cell affinity and antiplatelet adhesion property to improve hemocompatibility of blood-contacting biomaterials, *Peptide Sciences*, 11(5), e24114 (2019), (2) M.C.Munisso and T.Yamaoka, Evolution of phage display approaches to select highly specific hemocompatible peptides, *Tissue Eng Part C Methods*, 25(5), 288-295 (2019), (3) A.Mahara, T.Sakuma, N.Mihashi, T.Moritan, and T.Yamaoka, Accelerated endothelialization and suppressed thrombus formation of acellular vascular grafts by modifying with neointima-inducing peptide: A time-dependent analysis of graft patency in rat-abdominal transplantation model, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 181, 806-813(2019), (4)M.C.Munisso and T. Yamaoka, Circulating Endothelial Progenitor Cells in Small-diameter Artificial Blood Vessel, (Review), *J of Artif Organs*, 23(1), 6-13(2019), (5)H.Yamanaka, N.Morimoto, and T.Yamaoka, Decellularization of submillimeter-diameter vascular scaffolds using peracetic acid, *J Artif Organs* (2020), (6)山岡哲二、山中浩気、馬原淳、山本敬史, 「脱細胞化小口径血管への挑戦」 In 脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用 (岸田晶夫、山岡哲二、干場隆志 監修) CMC 出版, (7) A. Mahara and T. Yamaoka “Small-diameter Acellular Vascular Grafts: From Basic Research to Clinical Application” in *Decellularized Extracellular Matrix: Characterization, Fabrication and Applications*, Royal Society of Chemistry (RSC), Chapter 11 pp.199-218 (2019)]

【株式会社ジェイエムエス概要】 国立循環器病研究センターで開発されたダチョウ頸動脈を原材料とする小口径脱細胞血管を製品化するために、製造工程と製品仕様の設定と安全性評価を担当している。安全性は前年に着手した生物学的安全性試験を進めた。人工血管のリスク評価には細胞毒性、感作性、皮内反応、急性全身毒性、慢性全身毒性、遺伝毒性（変異原性、染色体異常）、発熱性、埋植試験、血液適合性（溶血、血栓形成）が必要であり、各毒性試験を実施した。製造工程（原材料、脱細胞工程、ペプチドコーティング工程、包装滅菌工程）の標準化と製品仕様（形状、寸法、物性、不純物など）は共同研究機関の協力のもと、設定の準備を進めた。現在、大型動物を用いた POC 取得の実験が実施されており、この結果を踏まえて製造方法と製品仕様を確定することが可能となった。

【株式会社ハイレックスコーポレーション概要】 まず、開発血管の臨床化に向けて、小口径血管実用化研究会を設立した。糖尿病性下肢救済手術のファーストインマン実施の可能性がある施設の調査を行い、協力を得ている 3 拠点に加えてさらに 3 拠点程度を集め小口径実用化研究会を設立して、年に 2 回の研究会を実施する。ステージⅡまでの前臨床研究成果を提示し、各施設での、臨床研究の可能性について討議した。本研究会の活動として、臨床化施設の絞り込みと情報集約を中心に進めた。各施設から、臨床研究（あるいは治験）開始のための非臨床 POC データに関する提案を収集して集約し、それらの取得が可能か、あるいは、統計学的意味を有するかを国立循環器病研究センター循環器病統合情報センター統計解析室の協力のもと解明し、必要であれば、前臨床研究デザインに追加すべく、国立循環器病研究センターおよび株式会社ジェイ・エム・エスに提言した。以上のことを実施するため、23 名の臨床家との面談を行い、研究会に賛同していただくこと、ならびに臨床化に向けての、対照疾患のアイデアなどについて情報を集約した。その結果、小口径人工血管の臨床化に関して臨床医の考えは 2 つに大別できた。第一は、現在の伏在静脈移植あるいはバルーン治療よりも優れた成績（開存率や非感染率）を期待する立場であり、第二は、現在処置が存在しないアンメットニーズへの適応を考える立場である。これらの臨床医からの意見などを集約して、対照疾患の現実性とリスク、臨床的頻度などを総合的に考えて、京都大学形成外科森本教授を中心にした研究グループで外傷や腫瘍除去後の前腕皮弁術あるいは腓骨皮弁術後の、ドナーサイトの再建を第一選択するという判断に導けた。

【新たなミニブタ移植モデルの構築】 ファーストインヒューマン試験として、皮弁術後の、ドナーサイトの再建を選択したことから、その術式に近いミニブタ移植モデルを構築して進める必要があった。さらに、実際に臨床試験に携わる医師によって前臨床移植実験を実施することが望ましい。そこで、京都大学形成外科学教室

森本教授（研究協力者）により 2 名の臨床医が選定され、5cm 以上の長さの血管移植実験系の模索を開始した。要求事項としては、①血管の内径が一致（あるいは近い）こと、②5 cm以上の血管の移植が可能なこと、③両側が端々吻合であること（血流が確保できる）、④同所的血行再建が可能なこと、⑤エコーにより非侵襲的に血流がモニターできること、を設定した。これまで実施してきた 30cm の血管のミニブタ FF バイパス術では、近位が端側吻合になるために、グラフト側の血流が減少すると本流へと流れ血管が閉塞しやすくなると考えられた。さらに、非解剖的な血管走行であるためにキンクが起りやすいことも問題であった。ミニブタ大腿動脈置換術では血管系が細く、3cm 以上の血管の移植は困難であった。そこで、選択肢として、第一に動脈／左大腿動脈バイパスモデルを、第二に左大腿動脈から右大腿動脈への端々吻合バイパスおよび右大腿動脈から左大腿動脈への端々吻合バイパスを同時に行う移植術を検討することとした。今年度は前者について 4 例検討した。腋窩動脈-大腿動脈ロングバイパスでは血管長は 45-55cm となった。上述の要求事項のうち、多くを満足できるが、非解剖学的な血行再建となること、および、非常に長いバイパスとなることが懸念事項であった。移植により、非常に長いバイパスであっても、抗血栓性内膜の再生は極めて良好であった。術者からは、グラフトの操作性はヒトの同口径動脈のそれに近く針刺入や縫合には全く問題がないとの評価を得た。また、脱細胞化血管の分枝部分の結紮方法が内腔での血栓形成に影響することが明らかとなり、今後の製品化に有用な情報が得られた。一方で、FF バイパスよりも体動が少ないと考えた体側皮下部であったが、血管の蛇行とキンクが激しく長期の観察をすることはできなかった。次年度には、引き続き、5cm 以上の血管移植系を模索し、移植 3 ヶ月のデータの取得をすすめることとなった。

【まとめ】 以上に示したように、本年度は、主に生物学的安全性試験の詳細解析と非臨床 POC データセットの取得、および、ファーストインヒューマン試験としての動脈再建に向けた臨床医チームの確定を完了した。次年度以降、遺伝毒性の詳細解析をすることで非臨床 POC データセットの取得を完了し、PMDA 対面助言を実施するとともに、臨床医参画のもと、ミニブタ移植実験による中期症例データを取得する。

This project aims at the development of decellularized small-diameter blood vessels derived from the ostrich carotid artery. In this year, we tried to establish non-clinical POC for utilizing them to the limb salvage; (1) evaluation of patency and biological reaction in large animal experiments using miniature pigs, (2) biological safety tests for discussing with PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency), (3) Fixing the efficient and appropriate clinical test design. In addition, we founded the Small Diameter Vascular Grafts R/D Group.

A large animal experimental system for evaluating small-diameter long bypass with an inner diameter of about 2 mm similar to the limb salvage in diabetes has not been established so far, which is the final target of our project. We succeeded in rapid regeneration of neointima within a few days after transplantation, even with bypass longer than 25 cm. The detailed regeneration mechanism was successfully clarified in this year, indicating that the luminal surface captures not only the targeted blood circulating vascular endothelial progenitor cells but also the other blood cell groups, which allow the very rapid neointima formation.

Physical and chemical properties of the blood vessels were evaluated, and no endotoxin was detected in the all of the lots of decellularized artificial blood vessels. In addition, all of the evaluations of biological safety tests were conducted but some of them were not completed and to be continued in 2021.

We conducted a survey of hospitals that may conduct first-in-human trial of our decellularized small-diameter blood vessel in diabetic lower limb rescue surgery. According to the discussion in the Small Diameter Vascular Grafts R/D Group, proposals for non-clinical POC for starting clinical

trials should be ensuring the safety and avoiding any risks. Based on this concept, plastic surgery group of Koto University decided reconstruction of the donor site after surgery or peroneal flap surgery to be the first choice for the first-in-human study of the acellular blood vessel. Two clinicians were joined to our group and started to establish a new protocol of non-clinical transplantation of small diameter longy bypass to the minipigs. The requirements are (1) the inner diameters of the blood vessels fits to the native vessels, (2) the blood vessels of 5 cm or longer can be transplanted, (3) both of proximal/distal sides are anastomosed (blood flow can be stable), (4) vessels were transplanted to the right site of the native vasculature, and (5) blood flow can be monitored non-invasively by echo.

III 評価総合所見

- 1) 現在世界的に見ても市販されていない内径 2 mm 以下の長尺の血管を開発するというイノベティブな開発目標に対して、未だ十分ではないが臨床経験のある医師によるミニブタによる前臨床モデル実験で期待が持てる開存率が得られていることは評価できる。
- 2) 臨床医メンバーの実用化研究会を発足させ、さらに、多くの臨床医からのヒアリングを行い開発品の医療現場でのニーズを調査していること、また、FIH へ向けた準備を進めていることも評価できる。
- 3) 生物学的安全性試験において、細胞毒性、遺伝毒性、溶血の各試験項目について、再実験あるいは追加実験が必要と考えられる。そのために、複数の有識者からの意見を聴取する、またそれを参考に追加実験を計画する等により、打開に向けて努力していることは評価できる。PMDA との対面助言に向けて生物学的安全性を満たすための評価結果の取得が急がれる。
- 3) これらの状況を考慮した結果、条件付きの基に本課題の 2020 年度の研究開発の継続を認める。