

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: 令和2年4月1日～令和3年3月31日

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

和文:

本プロジェクトでは内径2-3mmの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年度および2020年度上期までの期間には、非臨床POCの確立のために、①可能な限りファーストインヒューマン(FIH)試験に類似した状況のミニブタ等大動物実験への移植系を用いた開存率や生体反応の評価、②PMDA対面助言に向けた製品仕様の確定と各安全性試験の完遂、③効率の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。COVID-19禍の影響により、特に2021年度上半期は動物実験施設が閉鎖され執刀医師を含めるオペチームの移動制限があり研究進捗に深刻な影響があった。さらに、各研究会が中止あるいは延期となり臨床医等からの対面による情報収集も困難であったが、そのような状況でも計画は着実に進んでいる。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以下に記載する。

【国立循環器病研究センター概要】ミニブタ大腿動脈-大腿動脈交差バイパスとして移植した長さ30cmの血管内腔は1日程度で全長にわたって末梢血循環細胞に覆われ、数日かけて内膜様の細胞層に変化することで、高い抗血栓性と開存性が得られた。しかしながら、非解剖学的な血行の再建であり、また、ミニブタという体動を制御できない状況では、キンク等による閉塞が認められた。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 (FIH) 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 2 mm 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 FIH 試験を選択することとした。臨床の状況を完全に再現できる大動物実験移植系が存在しないことは言うまでもないが、少しでも類似性の高い全臨床試験を選択することが重要である。ミニブタ大腿動脈-大腿動脈交差バイパス術 (血管長 30cm 程度)、左腋窩動脈/左大腿動脈バイパスモデル (血管長 45-55cm 程度)、内胸動脈置換術、左 (あるいは右) 大腿動脈から右 (あるいは左) 大腿動脈への端々吻合バイパス術、頸動脈置換術について検討した。いずれも、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かった。そこで、FIH 試験を担当する予定の医師らを移植グループに迎えてミニブタ移植において以下の要求事項を満たす新たな評価系を検討した結果、(A) 内膜再生誘導の検証にはミニブタ大腿動脈-大腿動脈交差バイパス術、(B) 吻合部を中心とした開存性の検証には、内径ミスマッチが小さく、同所的血行再建であり、両側端々吻合である系である、ミニブタ大腿動脈置換術と決定した。これまでの大腿動脈置換術においては抗凝固処置や安静確保の処置無しに 3-4 ヶ月での有望な開存率が得られたが、さらなる開存率の向上に対する期待が高いことも事実である。新たに導入した大動物用 CT 装置により造影 CT が可能となったことから、ミニブタを犠牲死させることなく、移植後経時的に血管の走行や狭窄を詳細に追跡することが可能となった。このことにより閉塞理の原因を検討しその解決法を模索できることが可能となり、さらなる開存率の向上が期待できる。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。得られた成果は、13 件の論文等として公開した。

[(1)M.C.Munisso et al., 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 et al., Evolution of phage display approaches to select highly specific hemocompatible peptides, Tissue Eng Part C Methods, 25(5), 288-295 (2019), (3) A.Mahara et al., 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 et al., Circulating Endothelial Progenitor Cells in Small-diameter Artificial Blood Vessel, (Review), J of Artif Organs, 23(1), 6-13(2019), (5) H.Yamanaka et al., Decellularization of submillimeter-diameter vascular scaffolds using peracetic acid, J Artif Organs (2020), (6) A. Mahara et al., Arg-Glu-Asp-Val peptide immobilized on an acellular graft surface inhibits platelet adhesion and fibrin clot deposition in a peptide density-dependent manner, ACS Biomaterials Science & Engineering, 6 (4), 2050-2061 (2020), (7) A. Mahara et al., Modification of decellularized vascular xenografts with 8-arm polyethylene glycol suppresses macrophage infiltration but maintains graft degradability, J Biomed Mater Res A, 108 (10), 2005-2014 (2020), (8) Y. Liu et al., Anti-platelet adhesion and in situ capture of circulating endothelial progenitor cells on ePTFE surface modified with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) and hemocompatible peptide 1 (HCP-1), Colloids Surf B Biointerfaces, 193, 111113 (2020), (9) A. Mahara et al., A small-diameter synthetic vascular graft immobilized with the REDV peptide reduces early-stage fibrin clot deposition and results in graft patency in rats, Biomacromolecules 21(8), 3092-3101 (2020), (10) Y. Liu et al., Endothelial cell adhesion and blood response to hemocompatible peptide 1 (HCP-1), REDV, and RGD peptide sequences with free N-terminal amino groups immobilized on a biomedical expanded polytetrafluoroethylene surface, Biomater Sci, 9, 1034-1043 (2020), (11) Y. -I Hsu et al.,

Identification of circulating cells interacted with integrin $\alpha 4 \beta 1$ ligand peptides REDV or HGGVRLY, Peptides, in press, (2021) in press, (12)山岡哲二ら, 「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, (13) T. Yamaoka and T. Hoshiba eds. Decellularized Extracellular Matrix: Characterization, Fabrication and Applications, Royal Society of Chemistry (RSC) (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（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）を進めた。包装シール機を導入して製品の包装設計も完了した。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、生物学的安全性評価として、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、各毒性試験を完了した。また、国立循環器病研究センターで実施されている大型動物を用いた POC 取得の実験の結果も併せて、製造方法と製品仕様を確定し、PMDA 対面助言を受け、指摘に対する追加実験等を実施している。

【株式会社ハイレックスコーポレーション概要】 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予定である。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、28 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、京都大学形成外科学森本教授を中心と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。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、国立循環器病研究センターでの大動物移植実験をスタートした。

【まとめ】 以上に示したように、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が完了し、FIH 試験としての動脈再建に向けた臨床医チームを確定し、彼らを移植チームに加えてミニブタへの移植実験を継続している。

英文：

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. Firstly, physical and chemical properties of the blood vessels were evaluated. Basic properties of the acellular blood vessel prepared by high pressure treatment are almost same with those of native arteries, and also no endotoxin was detected in all of the lots of decellularized artificial blood vessels. In addition, all of the biological safety tests were conducted, indicating their very safe properties. According to the PMDA suggestions, some additional tests are now on going.

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. Rapid regeneration of neointima within a few days after transplantation were successfully proved, even with the 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.

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 Kyoto 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 are trying to establish a new protocol of non-clinical transplantation of small diameter long bypass to the minipigs. The requirements are (1) the inner diameters of the blood vessels fit to the native vessels, (2) the blood vessels of 5 cm or longer can be transplanted, (3) end-to-end or end-to-side anastomosis at the proximal/distal sides similar to FIH test system, (4) vessels were transplanted to the right site of the native vasculature, and (5) blood flow can be monitored non-invasively by echo and CT angiography. Based on these requirements, we are now increasing the number of cases.

III 評価総合所見

- 1) 日本で開発された動物由来の材料を用いた埋め込み型メディカルデバイスとしては初めての例となり、これに先鞭をつけることは後に続く同様の開発にとって非常に意義が大きい。
- 2) PMDA 対面助言の結果により、生物学的安全性について、当局にて概ねプロジェクトチームの考え方が了承され、安全性評価の方向性が定まったことについては評価できる。これにより、本邦における細胞外マトリックス (ECM) 製品の安全性試験基準が明確になる可能性がある。次年度は PMDA の助言に従い、溶血試験と亜急性全身毒性試験の追加実施と併せて、細胞毒性と遺伝毒性が陽性となった原因究明と考察が必要である。
- 3) 非臨床 POC 取得の為に、多くの大型動物(ミニブタ)を使い、n 数を増やして種々の術式を検討した姿勢は評価されるが、未だに最適な術式モデルの確立に至っていない状況が懸念される。今後は非臨床 POC 取得に向けて、今後予定している大腿動脈置換術での術式確立が必要である。
- 4) この新型コロナ禍の状況においても、プロジェクトマネージャーを中心にして、臨床家や企業間の連携を強め、明確な役割分担の下に、予期せぬ結果が出ても出口に向けて改善点を見つめながら進む姿勢は評価される。残された一年の間に、安全性評価の追加と非臨床 POC 確立を含めて、FIH 実施に向けた倫理委員会申請の準備を着実に進める必要がある。