

## 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)

### 平成 27 年度成果報告書 (公開)

プロジェクトマネージャー (研究リーダー)	国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部 山岡 哲二
開発リーダー (企業責任者)	株式会社ジェイ・エム・エス 中央研究所 山本 敬史
参加機関	関西大学
研究開発課題	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

#### 1. 研究開発の目的

本研究の目的は、スキャホールド基材表面に細胞特異性を付与し、細胞と基材との特異的相互作用を人工的に構築することにより、正常な組織・臓器の三次元構造に細胞群を配置することである。特に、生体内に存在する高機能の体細胞、前駆細胞、幹細胞を標的とし、これらをスキャホールドの位置特異的に集積させる技術を開発して三次元組織を再構築する工学技術を開発する。

最終目標は、未だ実用化できない小口径血管の開発である。ベースとなる材料は、サイズおよび形状的に極めて有利なダチョウ頸動脈から作成した脱細胞血管組織を第一選択とし、内膜再生を誘導するペプチドによって内腔を修飾することで長期開存を図る。血管は、内膜、中膜、外膜、と比較的単純な構成であるにもかかわらず人工的に再構築することは容易でなく、臨床利用可能な小口径人工血管は無い。世界に類を見ない高齢化社会を迎えている我が国では、主要な死亡原因のひとつが循環器疾患であり、生活習慣病に基づく血管系疾患も増加傾向である。新たな高額医療、あるいは、長期にわたる入院や通院による治療ではなく、根治的な治療法としての再生型人工血管を開発する。確立された内膜誘導修飾技術を生体吸収性合成材料に搭載した合成系血管の開発にもチャレンジする。

#### 2. 研究開発の概要

開発を進める小口径血管の適応は、冠動脈バイパスおよび下肢ディスタールバイパスであり、内径は2mm程度で長さが10~30cm、あるいはそれ以上の小口径人工血管が必要となる。我々は、脱細胞中口径血管のミニブタ血管移植において良好な成績を収めていたが、同手法で作成した脱細胞小口径血管の開存性は、内腔表面に露出しているコラーゲンの血液凝固誘導能のために十分な開存性が得られなかった。一方、生体血管とほぼ同様のコンプライアンスを有し、自己組織と置き換わる可能性がある脱細胞組織は、やはり魅力的である。そこで、小口径人工血管の開存性を向上させる新たな戦略として、脱細胞化血管内腔面の内皮化形成の生物学的促進技術を開発した。具体的には、末梢血中を循環する血管内皮系細胞を特異的に補足するペプチドリガンドを、脱細胞化血管内腔に配列化させることにより、小口径人工血管の高い開存性を達成する戦略である。本プロジェクトでは、異種組織からの細胞成分除去法(脱細胞手法)の最適化、残存したマトリックスの変成などの検討、臨床利用可能なサイズの脱細胞血管の調整と大動物移植による非臨床実験を進めた。大動物としては、ミニブタおよびヤギを選択し、初期~中長期に

わたる開存性の評価、また、炎症／免疫反応、内膜再生挙動、中外膜再生挙動、分解挙動と自己組織との置換の有無などを検討した。さらに、製品化のための最終製品設計から生物学的安全性試験を実施した。

### 3. 研究開発の成果（平成 27 年度）

#### （1）ミニブタ大腿動脈置換術（国循）

前年度まで、内腔修飾脱細胞小口径血管のミニブタ F-F バイパス術により短期での高い開存性を実証してきた。また、移植数日後に内腔のほぼ全面が内皮様組織で覆われることによるものであることも証明してきた。しかしながら、F-F バイパス術は中長期の評価には適しておらず、本年度はミニブタ大腿動脈に対する移植を進めた。分岐などの状況から 1~3 cm という長さのみの移植であったが、最も懸念される吻合部での狭窄および閉塞の有無を検証できる有効な移植系と考えている。結果、超音波エコーならびにアンギオグラフィーにて移植 3 ヶ月後での高い開存率を確認した。血管壁中への  $\alpha$ SMA 陽性細胞の浸潤も認められたが、組織置換が起こるにはさらに時間がかかるようである。また、第二ステージ目標であった移植 6 ヶ月開存例も確認できた。

#### （2）ヤギ頸動脈および正中動脈への移植（国循）

ミニブタモデルでは十分な長さの移植が困難であったことから、ヤギ上肢正中動脈（3~6cm）および頸動脈（~12cm）への、血管置換を開始した。常法に従ってヤギを硫酸アトロピン、塩酸キシラジン、ケタミンにより麻酔下とし、イソフルランで維持しながら、ミニブタに対する血管移植術と同様の処置ならびに手技により人工血管移植した。移植後の経皮的エコー検査で開存が認めら得ているが、中長期の所見を得るために平成 28 年度に順次摘出と評価を行う。

#### （3）血管壁に対する炎症反応と自己組織化反応の解析（国循）

十分な脱細胞処理を施しているが、残存組織は異種 ECM であることから、炎症反応、分解反応、自己組織化反応を検討する必要がある。ミニブタあるいはラット皮下移植により、マクロファージ浸潤、炎症反応、石灰化反応について検討した。初期炎症反応は同種脱細胞組織より強いものであったが、速やかに終息した。また、炎症反応を減弱する新しい組織架橋剤の開発に成功して特許申請を完了した。

#### （4）脱細胞血管の製品化に向けた前臨床試験項目の設定と評価（株式会社ジェイ・エム・エス）

異種小口径脱細胞血管を製品化するために、製品仕様（形状、物性、原料、製造方法、滅菌方法、包材）の確立を進めた。透水性、物理的強度、圧力負荷状態での外径変化、キック抵抗性などの特性を数値化した。また、拍動流の循環刺激による影響を評価するために、動的環境における血管物性の変化の評価を開始した。さらに  $\gamma$ 線滅菌と電子線滅菌が物性に与える影響を検討して有効性を確認した。また、生物由来原料を使用するために、ウイルスに対する安全性の確保が必要となる。本年度はウイルス安全性に関する各種ガイドラインに基づいて①原材料について人畜共通感染ウイルスの存在否定、②製造工程のウイルス除去不活処理を検討して次年度以降に必要な検討項目を確定した。

#### （5）ポリ乳酸製マトリックスへの REDV 配列搭載と評価（関西大学・国循）

ポリ乳酸マトリックスに REDV ペプチドを固定するために、反応性側鎖を有するポリ乳酸誘導体およびポリ乳酸にペプチドを複合化させるためのオリゴ乳酸-ペプチド結合体を合成した。REDV 配列で修飾したポリ乳酸マトリックスに対するヒト血管内皮細胞特異的結合性を *in vitro* において確認し、今後、*in vivo*に近い条件での有効性の検証を進める。