

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer : Strategic Promotion of Innovative Research and Development
- 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 of small-diameter acellular blood vessels based on 3D cell arrangements
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター研究所
生体医工学部 部長 山岡 哲二
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Department of Biomedical Engineering, Director, Tetsuji Yamaoka
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 小口径脱細胞血管等組織再生材料の創成
開発課題名： (英語) Development of small-diameter acellular blood vessels
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター研究所
生体医工学部 研究員 馬原 淳
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
Department of Biomedical Engineering, Researcher, Atsushi Mahara
- 分担研究 (日本語) 脱細胞人工血管の安全性評価
開発課題名： (英語) Evaluation of safety of the decellularized blood vessel
- 研究開発分担者 (日本語) 株式会社ジェイ・エム・エス 中央研究所 第4研究室
室長 山本 敬史
- 所属 役職 氏名： (英語) JMS CO., LTD., Manager, Research Section 4, Central Research Laboratory

分担研究 (日本語) 細胞の階層構造を誘導するペプチドと合成高分子材料を用いた再生人工血管の構築

開発課題名: (英語) Development of regenerative artificial blood vessels using synthetic polymers and peptides which induce hierarchical cellular structures

研究開発分担者 (日本語) 関西大学化学生命工学部 教授 大矢裕一・平野義明

所属 役職 氏名: (英語) Kansai University, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Professor Yuichi Ohya, Professor Yoshiaki Hirano

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 国立循環器病研究センターでは小口径脱細胞人工血管の開存化を検討している。体重 40・50 kg のミニブタの大腿動脈大腿動脈バイパス術により、内径 2 mm 長さ 30 cm の世界初の小口径血管の開存を達成したが、臨床化を目指す血管置換術とは大きく異なる状況である。そこで、本年度、シバヤギへの同所的血管移植術を検討し、前肢正中動脈置換と頸動脈置換術を選択した。最長 11 ヶ月の開存例も確認されたが、手技的な問題も多く、ミニブタ移植モデルと併せてさらなる中長期の検討を進める。
- ・ 4 か月開存したヤギ血管移植のケースでは血管が力学的強度を保持していたこと、一方で、4 か月以内に閉塞したケースでは血管壁が脆弱化していたことから、移植血管が分解して崩壊することで閉塞したのではなく、閉塞した血管が速やかに脆弱化するものと考えられた。
- ・ 血管壁内腔に何らかの原因で微小な欠損が生じると血栓生成につながり、炎症が誘発されさらには塞栓につながっている可能性がある。長い血管で開存率が低下するのは、このような現象にもとづくものと考えられる。正常血管でも起こる現象であるが、その後の経過を改善するために中外膜の再生が重要であろう。
- ・ 異種組織移植であることから従来型の化学架橋を検討したが開存率は低下した。そこで、分解性を保持し、かつ炎症性を抑制できる親水性の架橋剤を開発し、その効果を *in vivo* にて確認した。
- ・ 合成高分子製の小口径人工血管を作成するためには、従来の内膜誘導性ペプチドでは十分ではなく、さらに強力な内膜誘導活性に加えて、血小板粘着の抑制、さらに、血栓生成の抑制を達成する必要がある。ポジティブセレクションとネガティブセレクションを組み込んだフェージディスプレイ法、および、細胞選択性を示すセレクトィブインデックス (SI) の指標を導入することで、血管内皮細胞および血管内皮前駆細胞に高い親和性を有し、さらに、血小板粘着を協力的に抑制する配列を見いだすことができ、特許申請を完了した。
- ・ 株式会社ジェイエムエスにおいては、開発している脱細胞人工血管の安全性試験を遂行し、また臨床研究を開始するための要求されるデータセットの確定とデータ収集を進めた。特に、滅菌が力学特性に与える影響、血液の浸透と漏洩、耐キック性についてのデ

ータを取得した。さらに、最終製品のパッケージの設計と試作を完了した。

- ・ 関西大学大矢らと国立循環器病研究センターは共同で、生体吸収性の合成人工血管の開発を進めている。ポリ乳酸表面に、内皮結合性ペプチド配列を固定化することで、*in vitro*において血管内皮細胞の接着効率が大きく向上し、この接着が配列特異的であることを示した。
- ・ 関西大学平野らは、組織浸潤や血管新生活性を有するスキャホールドゲルの開発を行っている。細胞接着機能と自己組織的ゲル化能を有するペプチドゲル中へ血管内皮細胞の誘導を確認された。

Small-diameter vascular grafts of smaller than 4 mm are still unavailable because of the acute thrombosis. We are investigating acellular xenogeneic small-diameter blood vessels using carotid arteries of ostriches. Ostrich carotid arteries were decellularized by our original ultrahigh-hydrostatic pressure treatment and the luminal surface was modified with neointima-inducing peptides. These acellular blood vessels were proved to be patent in porcine femoral-femoral cross over bypass models, but this model is very different from the clinical situation. In this year, we tried to establish goat operations and selected overarm median artery replacement model and carotid artery replacement model in goats. Their diameters do not fully match to the acellular blood vessels we have been carrying out, but they were promising because their patency can be checked in a non-invasive manner using ultrasound imaging. We successfully achieved patent models as long as 11 months, but the patency was not high enough especially for the longer grafts. According to its possible mechanism we found, a new immunosuppressive crosslinking system, improved acellular method, and different operation technique were being studied and their evaluations are on going.

In addition to the acellular nerve system, small-diameter synthetic grafts were investigated in cooperation with Knasai University and achieving good results *in vitro*. To this end, more effective peptide signals that capture EPCs more strongly and also suppress the platelet adhesion may be of prime importance. We have developed three different bio-panning methods to identify peptides able to bind specifically to EPC. The ligand validation results allowed the selection of peptides that have specificity for EPCs more than 2 times higher respect HEPG2. These selected sequences were used for the *in vitro* and *in vivo* cell affinity evaluation using endothelial cells, EPCs, and platelets. The medical grade polymers were modified with these peptides and their cell affinity was compared with conventional REDV-functionalized material and unmodified control material. As a results, we surprisingly found a sequence with twice as high EPC affinity as control that suppressed platelet adhesion very strongly. A patent about these results was submitted.

III. 成果の外部への発表

1. A. Mahara, K. L. Kiick, and T. Yamaoka

In vivo guided vascular regeneration with a non-porous elastin-like polypeptide hydrogel tubular scaffold, *Journal of Biomaterials Research: Part A*, online version before issuing, 山岡哲二, 人工血管と再生型血管, 人工臓器, 2016, 45(1), 62-66.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Mechanistic Analysis of in vivo Rapid Endothelialization of Biofunctionalized Small-Diameter Acellular Graft ,口頭, A. Mahara, M. Kitai, A. Otaka, M. Munisso, Y. Ohya, and T. Yamaoka, 10th World Biomaterials Congress, 2016/5/22, 国外.
2. 生体/材料界面活性化ハイブリッド分子の設計と評価～異種脱細胞小口径人工血管非臨床 POC 取得を目指して～,招待講演, 山岡哲二, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/25, 国内.
3. オリゴ乳酸-REDV ペプチドヘテロ結合体によるポリ乳酸スキャホールドへの特異的細胞接着性の付与, 口頭, 飯田啓太, 徐于懿, 北井麻里奈, 神戸裕介, 大矢裕一, 山岡哲二, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/25, 国内.
4. レーザーアブレーションによる多孔化脱細胞組織の作製, 口頭, 馬原淳, 山本将巳, 山岡哲二, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/25, 国内.
5. 分岐型ポリエチレングリコールによる小口径脱細胞化血管の組織反応抑制, 口頭, 馬原淳, 北井麻里奈, 大矢裕一, 山岡哲二, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/25, 国内.
6. EPC 細胞捕捉を目指したポリ乳酸表面の REDV ペプチド修飾, 口頭, 飯田啓太, 徐于懿, 北井麻里奈, 神戸裕介, 大矢裕一, 山岡哲二, 第 62 回高分子研究発表会, 2016/7/15, 国内.
7. EPC capturing technology for improving patency of small-diameter(2mm ID) and long(30cm length) acellular blood vessels, 招待講演, T. Yamaoka, 3rd International Symposium on Advances in Sustainable Polymers, 2016/8/4, 国内.
8. Novel blood compatible surfaces for cardiovascular biomaterials, 招待講演,T. Yamaoka, 2nd Bone and Biomaterials workshop, 2016/8/8, 国外.
9. Great patency of the tissue engineered acellular blood vessels with the diameter of 2 mm and length of 30 cm, 基調講演,T. Yamaoka, APA International Conference on Advanced Polymers, Biomaterials, Bioengineering & Nano Drug Delivery (APA2016), 2016/9/6, 国外.
10. Inflammatory regulation with branched PEG for tissue-engineered vascular graft, 口頭, A. Mahara, A. Otaka, M. C. Munisso, and T. Yamaoka, TERMIS-AP 2016, 2016/9/6, 国外.
11. High pressure engineering for acellular blood vessel preparation and cancer therapy, 招待講演, T. Yamaoka, 2016 ADATE: Crossing Boundaries to Propel Tissue Engineering into the Clinic, 2016/9/14, 国外.
12. 組織再生型人工血管への応用を目指した血管内皮細胞誘導ペプチドを組み込んだ生分解性階層化チューブ構造体の作製, 口頭, 西村和紀, 葛谷明紀, 馬原淳, 山岡哲二, 大矢裕一, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/15, 国内.
13. "In vivo circulating-cell capture for making long long small-diameter acellular blood vessels patent, 招待講演, T. Yamaoka, IWAMSN2016, 国外.
14. 血管再生用足場としての内皮化促進ペプチドを組み込んだ階層化チューブ構造体の作製 ポスター, 西村和紀, 葛谷明紀, 馬原淳, 山岡哲二, 大矢裕一, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/21, 国内.
15. 脱細胞血管に対する組織応答の抑制, 口頭, 馬原淳, 山岡哲二, 第 54 回日本人工臓器学会大会, 2016/11/25, 国内.
16. Regulation of macrophage response to tissue-engineered vascular graft with branched PEG

modifier, ポスター, A. Mahara, and T. Yamaoka, ICBS 2016, 2016/11/28, 国内.

17. "内皮細胞親和性 REDV ペプチドによるポリ乳酸マトリックス表面の修飾, 口頭, 飯田啓太, 徐于懿, 神戸裕介, 大矢裕一, 山岡哲二, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/8, 国内.
18. 組織再生誘導型小口径脱細胞血管の開発 1 ～ 内膜の再生誘導を狙ったリガンドペプチドの役割, 口頭, 馬原淳, maria chiar munisso, 大高晋之, 山岡哲二, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/8, 国内.
19. 組織再生誘導型小口径脱細胞血管の開発 2 ～ 中膜・外膜の再生を誘導する多孔化脱細胞組織の構築, 口頭, 古島健太郎, 馬原淳, 平野義明, 山岡哲二, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/8, 国内.
20. 高圧処理を利用した脱細胞化/殺細胞化スキャホールドの開発と in vivo 評価, 口頭, 山岡哲二, 馬原淳, 森本尚樹, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 異種脱細胞化組織と自己殺細胞化組織, 山岡哲二, 医歯工連携による医療イノベーション創出事業シンポジウム, 2016/5/10, 国内.
2. 生体/材料界面活性化ハイブリッド分子の設計と評価～異種脱細胞小口径人工血管非臨床 POC 取得を目指して～, 山岡哲二, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/5, 国内.
3. EPC capturing technology for improving patency of small-diameter(2mm ID) and long(30cm length) acellular blood vessels, T. Yamaoka, 3rd International Symposium on Advances in Sustainable Polymers, 2016/8/4, 国内.
4. Novel blood compatible surfaces for cardiovascular biomaterials , T. Yamaoka, 2nd Bone and Biomaterials workshop, 2016/8/8, 国外.
5. Great patency of the tissue engineered acellular blood vessels with the diameter of 2 mm and length of 30 cm, T. Yamaoka, APA International Conference on Advanced Polymers, Biomaterials, Bioengineering & Nano Drug Delivery (APA2016), 2016/9/6, 国外.
6. High pressure engineering for acellular blood vessel preparation and cancer therapy , T. Yamaoka, 2016 ADATE Tissue Engineering Symposium: Crossing Boundaries to Propel Tissue Engineering into the Clinic, 2016/9/14, 国外.

(4) 特許出願

なし