

**骨髓幹細胞と生分解性材料を用いた  
再生血管の作成と臨床応用**  
(課題番号 16591415)

平成 16、17 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)  
研究成果報告書



平成 18 年度 12 月

研究代表者 松村剛毅  
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)



**骨髓幹細胞と生分解性材料を用いた  
再生血管の作成と臨床応用**  
(課題番号 16591415)

平成 16、17 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)  
研究成果報告書

平成 18 年度 12 月

研究代表者 松村剛毅  
(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手)

## 目次

はしがき	2
1. 研究課題名・研究組織・研究経費	4
2. 研究発表	5
3. 研究成果	
1. 研究計画と成果の概要	19
2. 肺動脈弁の Tissue Engineering (羊)	28
3. 肺動脈の Tissue Engineering (羊)	32
4. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	43
5. 下大静脈の Tissue Engineering Vascular Autografts (TEVAs) (犬)	48
6. 血管の Tissue Engineering	59
7. TEVAs に対する骨髄細胞播種の有効性	65
8. 播種される骨髄細胞の培養の必要性	71
9. TEVAs の臨床応用	78
10. TEVAs のフォンタン手術への応用	80
11. TEVAs の臨床応用(中間報告)	82
12. TEVAs の中期遠隔成績(臨床)	88
13. TEVAs の組織学的小および生化学的評価	101
4. 参考文献	
1. 心臓血管外科の再生治療の基礎	110
2. 心血管系のティッシュエンジニアリング	116
3. 培養人工血管	120
4. 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例	127
5. バイオ人工血管	132
6. バイオ人工血管の臨床応用	139
7. 再生人工血管の臨床応用	146
8. 骨髄細胞を用いた再生血管と臨床応用	153
9. 先天性心疾患領域における再生医療	157
10. 組織工学による心臓弁、再生血管	163

はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科 松村剛毅

心臓血管外科領域だけにかかわらず、外科系の多くの科が手術の際に血管の処置・修復に携わっている。動脈硬化により瘤化・狭窄した血管、癌細胞の浸潤を受けた血管、小児患者において先天的に欠損していた血管などが治療の対象となる。これらに関して我々外科医は、できる限り自己血管組織を温存し修復する治療戦略を立てるが、その多くが未遂に終わり、結果として異物である人工血管による置換を選択せざるを得ないケースに直面する。人工血管の問題点とは何か。最も注目されてきたのはその生体適合性であると思われる。人工血管という異物に対する生体内の拒絶反応を最小限にとどめ、自己組織化できるかという問題点は、血管内腔の血栓形成や狭窄の過程に密接に関連し、さらには劣化・石灰化として示される人工血管の耐久性へと結びつく。このような問題点を解決すべく、約50年に渡り世界中で理想的な人工血管の研究が進められてきたものの、未だ理想的な補填物の開発には達していなかった。

近年、「再生医療」という言葉が紙面で多く取り上げられている。実際の医療現場においても各科で盛んに応用され、この分野の研究は今まさに日進月歩である。自己の持つ修復機能を利用したこれらの新しい医療は、患者本人に対する侵襲、安全性だけでなく、この行き詰った医療経済へのブレイクスルーとしても注目されている。

1993年、Langerらが提唱した組織工学 (Tissue Engineering) という概念は、吸収速度の制御が可能な生分解性ポリマーを足場とし、そこに生着した細胞から目的組織を作製するという研究分野で

ある。Tissue Engineering により得られた再生組織の最大の利点は、播種した細胞の成長に伴い、その組織構造を担っていたポリマーは完全に分解吸収され、移植後長期的には異物が残存しない自己組織に置き換わるところにある。つまり、生体適合性という重要な因子を兼ね備えた理想的な生体材料が得られる可能性が秘められており、それを目指す多大な研究者の熱意により、本邦でもこの分野はここ10年で急速に発展した。現在は、Tissue Engineering の技術を用いて得られた再生組織の質を高める研究が進められている。形態的だけでなく、機能的にも自己組織に類似した血管が、より早く、より低侵襲で作成できることが求められる。内皮や血管平滑筋の成長をより強く促せるようなポリマーの開発、組織成長段階のメカニズムの解明など多くの報告がされている。

我々は2000年5月、中口径再生血管の臨床応用を世界に先駆け成功し良好な結果を得たが、臨床応用や基礎実験によって得られたこれらの多くの経験を発信・報告していく義務があると思われる。再生血管分野のさらなる発展の一役を担えるよう今後も努力していきたい。

## 1. 研究課題名・研究組織・研究経費

### 【研究課題名】

骨髄幹細胞と生分解性材料を用いた再生血管の作成と臨床応用

(課題番号 16591415)

### 【研究組織】

研究代表者：

松村剛毅（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手）

研究分担者：

日比野成俊（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手）

黒澤博身（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 教授）

新岡俊治（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教授）

### 【研究経費】

平成 16 年度 1,800 千円

平成 17 年度 1,700 千円

計 3,500 千円

## 2. 研究発表

### 【学会誌など】

1. Goki Matsumura, Yoko Ishihara, Sachiko-Miyagawa Tomita, Yoshito Ikada, Shojiro Matsuda, Hiromi Kurosawa, Toshiharu Shin'oka. Evaluation of Tissue-Engineered Vascular Autografts: Tissue Engineering. 12, 11, 2006
2. Shin'oka, T.、Matsumura, G.、Hibino, N.、Naito, Y.、Watanabe, M.、Konuma, T.、Sakamoto, T.、Nagatsu, M.、Kurosawa, H. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells : J Thorac Cardiovasc Surg、129, 6, 1330, 2005
3. Hibino, N.、Shin'oka, T.、Matsumura, G.、Ikada, Y.、Kurosawa, H. The tissue-engineered vascular graft using bone marrow without culture : J Thorac Cardiovasc Surg、129, 5, 1064, 2005
4. Shin'oka T、 [Clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells] Nippon Geka Gakkai Zasshi. 2004 Aug;105(8):459-63. Japanese.
5. Isomatsu Y, Shin'oka T, Aoki M, Terada M, Takeuchi T, Hoshino S, Takanashi Y, Imai Y, Kurosawa H Establishing Right Ventricle - Pulmonary Artery Continuity by Autologous Tissue: An Alternative Approach for Prosthetic Conduit Repair Ann Thorac Surg 2004; 78: 178-180
6. Shin'oka T Clinical results of tissue engineered vascular autografts Yonsei Medical Journal 2004; 45: 73-74

7. Sakamoto T, Kurosawa H, Shin`oka T, Aoki M, Isomatsu Y The influence of pH strategy on cerebral and collateral circulation during hypothermic cardiopulmonary bypass in cyanotic patients with heart disease: Results of a randomized trial and real-time monitoring J Thorac Cardiovasc Surgery 2004; 127:12-19
8. 新岡俊治、黒澤博身 「ラット肺に対する経肺動脈 HGF 遺伝子導入による新生血管の検討」小野論文に対する comment 心臓 2004
9. 松村剛毅、新岡俊治 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例 炎症と免疫 12:154-158, 2004
10. Hibino N, Shin`oka T, Kurosawa H Long-Term Histologic Findings in Pulmonary Arteries Reconstructed with Autologous Pericardium The New England Journal of Medicine 348:865-867, 2003
11. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin`oka T Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience Biomaterials24: 2303-2308, 2003
12. Matsumura G, Sachiko Miyagawa-Tomita, Shin`oka T, Ikada Y, Kurosawa H First Evidence That Bone Marrow Cells Contribute to the Construction of Tissue-Engineered Vascular Autografts In Vivo Circulation108: 1729-1734, 2003
13. Isomatsu, Y, Shin`oka T, Matsumura G, Hibino N, Konuma T, Nagatsu M, Kurosawa H, Extracardiac total cavopulmonary connection using a tissue-engineered graft J Thorac Cardiovasc Surg 126:1958-1962, 2003

14. Matsumura G, Shin'oka Successful Application of Tissue Engineered Vascular Autografts; Clinical Experience. *Biomaterials* 2003 ; 24:2303-2308
15. Shin'oka T Tissue Engineered Heart Valves: Autologous Cell Seeding on Biodegradable Polymer Scaffold Artificial Organ2002; 26:522-6
16. Naito Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Kashiwagi, Konuma T, Murata A, Miyake T, Kurosawa H. A Successful Clinical Application of Tissue Engineered Graft for Extracardiac Fontan Operation *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2002; 125, 419-420
17. T. Hiramatsu, Y. Imai, H. Kurosawa, Y. Takanashi, M. Aoki, T. Shin'oka, M. Nakazawa Effects of dilutional and modified ultrafiltration in plasma endothelin-1 and pulmonary vascular resistance after the fontan procedure *Ann Thorac Surg*2002; 73:862-5
18. T. Hiramatsu, Y. Imai, H. Kurosawa, Y. Takanashi, M. Aoki, T. Shin'oka, T. Sakamoto Midterm results of surgical treatment of systemic ventricular outflow obstruction in Fontan patients *Ann Thorac Surg*2002; 73: 855-861
19. Hiramatsu T, Okamura T, Imai Y, Kurosawa H, Aoki M, Shin'oka T, Takanashi Y Effects of Autologous Platelet Concentrate Reinfusion After Open Heart Surgery in Patients With Congenital Heart Disease *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1282-5

20. Kashiwagi J, Imai Y, Aoki M, Shin'oka T, Hagino I, Nakazawa M An arterial switch operation for a concordant crisscross heart with the complete transposition of the great arteries *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2002; 124:176-8
21. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*. 2001;344:532-533.
22. Ishida T, Imai Y, Hoshino S, Hiramatsu T, Seo K, Aoki M, Shin'oka S. [Case report of CABG for progressive coronary artery stenosis after 22-year history of Kawasaki disease]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2001;54:859-862.
23. Nemoto S, Aoki M, Dehua C, Imai Y. Effects of carnitine on cardiac function after cardioplegic ischemia in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71:254-259.
24. Sakamoto T, Aoki M, Imai Y, Nemoto S. Carnitine affects fatty acid metabolism after cardioplegic arrest in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71:648-653.
25. Isomatsu Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Sato K. Coarctation of the aorta and ventricular septal defect: should we perform a single-stage repair? [see comments.]. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2001;122:524-528.
26. Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, Kosaka Y, Ishida T, Imai Y, Yamakawa M, Ikada Y,

- Morita S. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Engineering*. 2001;7:429-439.
27. Isomatsu Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Iwata Y. Surgical intervention for anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery: the Tokyo experience. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2001;121:792-797.
28. Momma K, Takao A, Matsuoka R, Imai Y, Muto A, Osawa M, Takayama M. Tetralogy of Fallot associated with chromosome 22q11.2 deletion in adolescents and young adults. *Genetics in Medicine*. 2001;3:56-60.
29. Fujimaki W, Iwashima M, Yagi J, Zhang H, Yagi H, Seo K, Imai Y, Imanishi K, Uchiyama T. Functional uncoupling of T-cell receptor engagement and Lck activation in anergic human thymic CD4+ T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:17455-17460.
30. Hibino N, Shin'oka T, Matsumura G, Watanabe M, Toyama S, Imai Y. [Cryopreservation of vascular mixed cell for tissue engineering in cardiovascular surgery]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2001;54:479-484.
31. Shinoka T, Imai Y, Matsumura G. [Current status of tissue engineering for therapeutic use]. *Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*. 2001;59:1389-1399.
32. Hibino N, Imai Y, Aoki M, Shin'oka T, Hiramatsu T. Double

switch operation for superior-inferior ventricles. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;72:2119-2121.

33. Imai Y, Seo K, Aoki M, Shin'oka T, Hiramatsu K, Ohta A. Double-Switch operation for congenitally corrected transposition. *Seminars in Thoracic & Cardiovascular Surgery. Pediatric Cardiac Surgery Annual*. 2001;4:16-33.

【学会・研究会発表等】

1. 日比野成俊、今井康晴、新岡俊治、瀬尾和宏、青木 満、渡辺 学、小坂由道、松村剛毅、山川光徳、森田真一郎 ティッシュエンジニアリング技術を用いた末梢肺動脈再建術 第31回日本心臓血管外科学会(平成13年2月)
2. 新岡俊治 培養自己細胞を使用したティッシュエンジニアリングによる再生血管移植 第6回関東甲信越セロトニン研究会 学術集会(招請講演)(平成13年2月)
3. Naito Y, Shin'oka, Imai Y The Expansion of Human Bone Marrow Derived Cells with Combinations of Growth Factor ISACB 8th(International Society for Applied Cardiovascular Biology) Biennial meeting, St. Gallen, Switzerland 2002
4. Watanabe M, Shin'oka, Imai Y Tissue Engineered Vascular Autograft - Inferior Vena Cava Replacement Study in a Dog Model ISACB 8<sup>th</sup> (International Society for Applied Cardiovascular Biology) St. Gallen, Switzerland 2002
5. 日比野成俊、黒澤博身、青木 満、新岡俊治、磯松幸尚、森島重弘、坂本貴彦、石山雅邦、岩田祐輔、山本 昇、松村剛毅 大血管転位症に対する Jatene 術後遠隔期に生じた AR に対して free style valve による弁置換を行った2例 日本循環器学会関東甲信越地方会 第184回学術集会, 2002
6. Hibino N. Shin'oka T, Watanabe M, Matsumura G, Konuma T, Kurosawa H Tissue Engineered vascular graft: Effects of the Cell Source on the Creation of the Tissue Engineered vessel

5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society international , 2002

7. 新岡俊治、黒澤博身、齋藤聡、松村剛毅、小坂由道、筏 義人、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、自己細胞を用いた中～大口径再生血管の再生治療。第43回日本人工臓器学会、2005年、東京
8. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤聡、坂本貴彦、小坂由道、市原有起、宮本真嘉、保々恭子、黒澤博身、筏 義人。骨髓細胞と生分解性ポリマーを用いた再生血管の経時的変化・遠隔評価。第36回日本心臓血管外科学会総会、2006年4月、盛岡
9. Goki Matsumura, Toshiharu Shin' oka, Narutoshi Hibino, Yoshimichi Kosaka, Hiromi Kurosawa. Tissue Engineering Vascular Autograft Utilizing Bone Marrow Cells in a Dog Model. 4th World Congress of Pediatric Cardiology and Pediatric Cardiovascular Surgery. 2005.9. Argentina
10. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤 聡、小坂由道、小沼武司、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、黒澤博身、筏 義人。自己細胞を用いた中～大口径再生血管の作成：心筋・血管新生療法研究会、2005年7月、東京
11. 松村剛毅、新岡俊治、小坂由道、日比野成俊、黒澤博身。再生血管の内皮細胞の評価：日本胸部外科学会総会、2004年10月、札幌
12. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤聡、小坂由道、小沼武司、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、黒澤博身、筏義人。自己細胞を用いた

再生血管治療と臨床経過：第4回再生心臓血管外科治療研究会、  
2005年、浜松

13. 松村剛毅.”再生医療技術を用いた循環器疾患に対する組織移植および血管新生に関する研究”ハイブリッド心臓弁、血管サブグループ。再生血管の臨床応用：循環器病研究委託費 13公-1、2004年2月、大阪
14. 松村剛毅. 生分解性ポリマーによる血管の再生：循環器病研究委託費「医工学的再生治療技術に関する分野横断的研究」、第1回 班会議、2006年12月、大阪
15. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *虚血肢に対する細胞移植と細胞シート移植による血管再生療法の比較検討* 第5回再生医療学会（平成17年3月）
16. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *虚血肢に対する細胞シート移植による血管再生療法の検討* 第5回再生心臓血管外科治療研究会（平成18年4月）
17. Kyoko Hobo, Tatsuya Shimizu, Hidekazu Sekine, Hiromi Kurosawa, Satoshi Saito, Yoshimichi Kosaka, Goki Matsumura, Shinka Miyamoto, Yuki Ichihara, Teruo Okano, Toshiharu Shin'oka *Smooth muscle cell sheet transplantation enhances angiogenesis and improves of hindlimb ischemia* The1st World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2006.4.)

18. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 ラット 虚血肢モデルにおける細胞シート移植による血管再生 第9回日本組織工学会（平成18年9月）
19. Kyoko Hobo, Tatsuya Shimizu, Hidekazu Sekine, Hiromi Kurosawa, Satoshi Saito, Yoshimichi Kosaka, Goki Matsumura, Shinka Miyamoto, Yuki Ichihara, Teruo Okano, Toshiharu Shin'oka *Smooth muscle cell sheet transplantation induced revascularization and preserve blood perfusion in ischemic hind limb* The5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine-EU meeting (2006.11.)

## 【著書】

1. 新岡俊治 先天性心臓病 最新版 家庭医学大全科 1008-1012, 2004
2. 新岡俊治 1. Tissue Engineering 第 11 章 医療材料、治療機器の進歩 先端医療シリーズ 12: 心臓病「心臓病-その最新医療と 21 世紀への展望」 357-363 先端医療技術研究所 2001
3. 新岡俊治 心臓弁、血管の再生「化学フロンティア③」再生医療工学 筏 義人編、化学同人、2001
4. 新岡俊治 第 II 部再生組織 第 5 章 胸・腹部 5. 血管「再生医療工学の最先端」 153-158 シーエムシー出版、2002
5. 新岡俊治 心臓血管外科における再生医療 「Annual Review 循環器」 271-277 2002 中外医学社 2002
6. 新岡俊治 バイオ医人工血管 現代化学増刊「再生医学・再生医療」 201-206 東京化学同人 2002
7. 新岡俊治 ティッシュエンジニアリング 目で見える循環器病フロンティア ベーシック&クリニカルサイエンス 128-137 メジカルレビュー社 2002
8. 新岡俊治 再生弁 「生活習慣と遺伝子疾患」 267-273 メディカルレビュー刊 2002
9. Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka. Clinical Application of Tissue-Engineered Blood Vessels : Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches、105,2005, Springer-Verlag Tokyo, H. Mori, H. Matsuda edition
10. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 心臓血管外科の再生治療の基礎:

Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p64, 2004

11. 松村剛毅、新岡俊治. 弁の再生医療：現代医療、36, 1, p23, 2004
12. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、黒澤博身、松田晶二郎、高橋文丈、筏義人. 骨髄細胞を用いた再生血管治療と臨床応用：第3回再生心臓血管外科治療研究会、2004年2月、福岡
13. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、内藤祐次、村田明、東隆、黒澤博身. 骨髄細胞による Tissue Engineered Vascular Autograft：第2回再生心臓血管外科治療研究会、2003年5月、札幌

## 【総説】

1. 小坂由道、松村剛毅、新岡俊治 血管再生医学の臨床応用 Medical View Point 25:4, 2004
2. 小坂由道、新岡俊治 自己骨髄細胞を用いた再生血管移植 医学のあゆみ 210: 215-216
3. 松村剛毅、新岡俊治 弁の再生医療 現代医療 36:23-27, 2004
4. 日比野成俊、新岡俊治 バイオ人工血管 バイオマテリアル 2004
5. 市原有起、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身 生体弁の tissue engineering Cardiovascular Med-Surg 7: 317-320, 2004
6. 新岡俊治 骨髄細胞を使用する再生血管移植の臨床 外科学会雑誌 105: 459-463, 2004
7. 内藤祐次、新岡俊治、松村剛毅 生体吸収性ポリマーを使用する再生血管の臨床応用 高分子 53:153-155, 2004
8. 松村剛毅、新岡俊治 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例 炎症と免疫 12:154-158, 2004
9. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、日比野成俊 再生血管移植の基礎 整形・災害外科 44:161-167, 2001
10. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、日比野成俊、村田 明 再生血管の臨床応用 外科 63: 304-310, 2001
11. 新岡俊治、今井康晴 心臓血管外科の再生医工学 分子心血管病 2:17-24, 2001
12. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. バイオ人工血管の臨床応用 : Vascular Biology & Medicine、5, 6, p59, 2004

13. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治. バイオ人工血管：医療用マテリアルと機能膜、119、2005
  14. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 心臓血管外科の再生治療の基礎：Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p64, 2004
  15. 新岡俊治、黒澤博身、長津正芳、松村剛毅、小坂由道、小沼武司、日比野成俊. 心臓血管外科の再生治療の臨床：Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p70, 2004
16. 保々恭子、新岡俊治 培養人工血管(*Tissue Engineering Graft*)  
分子新血管病学 2006; 7:5:761-68

### 3. 研究成果

#### 1. 研究計画と成果の概要

##### はじめに

ここでは本研究全体の理解を深めるため、まず研究計画および成果の概要を解説する。Tissue Engineering の研究背景およびその歴史的推移、社会的な意義や位置づけについて説明し、この分野の現状と研究目的を明確にする。

##### 研究の背景

組織工学(Tissue Engineering)は、工学(Engineering Science)と生物学(Biological Science)を伴に応用した学際的な新しい概念で、吸収速度の制御が可能な生体吸収性ポリマーを足場として培養細胞から目的組織を作成しようという新しい学際的研究分野である。歴史的には 1980 年代後半に臓器移植医療における臓器提供者不足が深刻化している米国で提唱された。その最大の利点としては播種。生着した細胞が細胞外間質を完成させた時点で足場としてのポリマーが完全に生分解され、移植後長期的な異物の残存を認めないという点にある。既に皮下細胞を用いた Tissue Engineered Skin Graft は実用段階にあり、臨床において数百例の移植が施行されている。心臓血管外科、特に小児心臓血管外科領域における理想的な補填材料・人工血管は未だ発展途上にあり、移植後長期にわたる生体適合性、成長能を有し、移植後の再手術が不要である生きた補填物の開発が模索されている。我々は既に 1) 雑種犬において、組織工学的手

法を用いて自己の静脈壁細胞からなる Tissue Engineered Vascular Autograft の in vivo での作成に成功しており、2)2000年5月以降、東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得た後、40名以上の患者にこの方法による血行再建を行っている。

### 研究の目的

これまでに心臓血管外科領域においては、生体適合性および成長する可能性を有する素材として、自己心膜や凍結保存同種組織が多くの施設で臨床使用されてきた。しかしながら前者は採取量に限界があること、後者は臓器提供者不足による慢性的な供給不足が問題となっている。さらには、これらの素材が遠隔期において成長したことを示す明確なエビデンスはない。そのため、組織工学的手法を用いた生体補填材料の開発が現在国内外で急ピッチで進められている。我々は既に組織工学的手法を用いて自己細胞として末梢静脈壁細胞を用いた Tissue Engineered Vascular Autograft による肺血行再建の臨床例を経験した。具体的には、自己細胞（末梢静脈壁細胞）を播種した生体吸収性ポリマーを用いて自己血管を in vitro で作成し、体内への移植後は、生体吸収性ポリマーが完全に分解・吸収された時点で自己細胞、間質のみから構成される Tissue Engineered Vascular Autograft が血行を担うことになる。しかし、自己の末梢静脈壁細胞は全身麻酔下に採取せねばならず、また細胞培養にも非常な手間がかかり、場合によっては細胞増殖が不十分なため、細胞採取のための再手術を余儀なくされることがある。

本研究の目的はこの成果をさらに発展させ、より採取が容易で、血管細胞への分化能をもった骨髄幹細胞を自己細胞として用いて臨床応用可能な補填材料・人工血管を作成し、既存の手法の問題点を解決することである。骨髄幹細胞を用いたこの分野での研究は過去になく、また骨髄幹細胞の生分解性ポリマーへの接着、ポリマー上での分裂増殖能の研究は不可欠と思われる。

### この研究の学術的特色，独創的な点及び予想される結果と意義

組織工学では体内で徐々に分解吸収される素材を細胞の足場として用い、細胞が細胞間質蛋白質を産生した段階で吸収消失するため、組織が完成した段階においては組織内に異物は残存しない。生分解性ポリマーのシートに末梢血幹細胞を播種する事により同細胞の生分解性ポリマーへの浸潤を誘導する。骨髄幹細胞は種々の細胞への分化能を有するために、血流を担う部位に移植された同細胞は血管組織の再生を起こすと予想される。

我々が現在まで自己細胞として末梢静脈を使用した理由は、1) 血管組織は主として内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞で構成されていること、2) 末梢血管壁はこれらの細胞を含むこと、3) 末梢静脈は採取する際に患者の負担を少なくできることの3つである。

自己細胞として骨髄幹細胞を用いることの利点は、1) 従来の組織工学の手法における約 10 日間の *in vitro* での細胞培養の課程を省略可能で、より簡便、より安価に施行可能であること、2) 幹細胞であるので血管のみならず、心筋・心臓弁あるいは骨・軟骨・腱・靭帯などの組織への再生が可能で応用範囲が広いこと、3) 末梢血幹細胞

を自己細胞として用いる場合に比較して、細胞増殖能が強く、血管形成が良好であると考えられる。

### 本研究の位置づけ

本研究の当面の目的は静脈系における生体適合性、成長能を有する自己血管組織の再生と、臓器提供に頼らない凍結保存同種組織の開発である。生体吸収性ポリマーを応用した組織工学による人工血管作成の試みは国内外で行われているが、自己細胞として骨髄幹細胞からなる人工血管の開発研究は国内では皆無である。我々は種々の細胞に分化可能な骨髄幹細胞を用いて、**Tissue Engineered Vascular Autograft** の作成が可能であると考えている。さらに、この技術の応用によって、臓器提供者不足が問題となっている凍結保存同種組織の開発が、将来的には虚血性心疾患に対するバイパス手術用の小口径人工血管の開発も期待される。

## 過去の関連研究費

種別	科学研究費 基盤研究 (B) (2)
研究代表者	今井康晴
題名	自己細胞と吸収性ポリマーを用いた組織工学による 心血管用補填材料の開発、応用
期間	平成 10 年～11 年
研究経費	平成 10 年度分として 7,700 千円 平成 11 年度分として 1,900 千円
研究成果	新岡俊治、今井康晴、高梨吉則：組織工学による自 己肺動脈作成：第 51 回日本胸部外科学会 優秀演題 受賞、東京、平成 10 年 10 月 3 日
種別	科学研究費 基盤研究 (C)
研究代表者	渡辺 学
題名	組織工学的手法を応用した、自己組織の再生と凍結 保存同種組織の開発
期間	平成 12 年～13 年
研究経費	平成 12 年度分として 1,100 千円 平成 13 年度分として 1,200 千円
研究成果	渡辺 学、新岡俊治、遠山悟史、日比野成俊 今井康晴、山川光徳、筏 義人、森田真一郎：Tissue engineered vascular autograft の経時的遠隔期価： 第 53 回 日本胸部外科学会 優秀演題受賞、大分、 平成 12 年 10 月 27 日

## その他の研究成果

2000年5月以降、東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得た後、47名の患者に自己静脈細胞を使用したティッシュエンジニアリングによる肺および静脈血行再建を行っている。本方法による血管移植の第一例目は世界でも初の臨床応用例であった。2001年のNew England Journal of Medicineの論文が掲載された。

また、骨髄細胞が再生血管の形成に関与することの証明にてCirculationに、そしてこれらの臨床応用に関してBiomaterialsに論文が掲載された。

## 準備状況

骨髄幹細胞と生分解性ポリマーによる血管組織の形成が可能であることが証明されたため、次に再生血管を作成するにあたり、より簡便な方法を追求し、同一の結果が得られることを証明する。具体的には、培養液、異種動物の血清を使わないこと、成長因子を使用しない等である。作製方法を簡便にすることは、感染の危険性、誤操作、コスト面を考慮した場合、臨床的にも重要であり、また将来本法による再生血管作成が普及した場合にも重要となる。さらに、理想的な生分解性ポリマーの作成、および安全性を検討しすることである。現在、ポリグリコール酸による生分解性ポリマーを移植し、2年以上の生存犬も得られ、組織形成も問題なく行われた。今後はさらに移植後の他臓器への影響等を実験的に検討する予定である。

施設設備面では、吸引した細胞を処理するためのクリーンベンチ、

骨髄幹細胞を播種した生分解性ポリマーを一時的に保管するためのインキュベータ、外科的に再生血管を移植するための動物実験室、生存犬を管理する実験動物舎があり、またそれに携わる技師が配置されている（東京女子医科大学内、旧日本心臓血圧研究所研究部）。また、免疫組織学的検討を行う病理部門も併設している。再生血管の生力学的検査（張力）を行うための張力試験器、さらに薬物負荷に対する力学的検査を行うためのセンサー、トランスデューサーを完備している。

## 研究計画

### 1) in vivo 実験

動物実験による骨髄幹細胞の播種方法、処理条件の確立および至適ポリマーの探究を行う。実験動物としてをイヌを用い、骨髄幹細胞を採取する(2-4ml/kg)。Ficoll 法により、骨髄単核球細胞を採取し、それをスポンジ状のポリカプロラクトンとポリ乳酸からなる共重合体ポリマーを補強材であるポリグリコール酸に塗布したハイブリッドポリマー（8×10mm）に得られた骨髄単核球細胞を播種する。これをインキュベータ内にて保存液中に浸した状態で1〜2時間培養する。その後、右開胸下にイヌの下大静脈に骨髄幹細胞を播種した再生血管を移植する。今回は、1、3、6ヶ月抗凝固剤を使用せず経過観察する予定である。

従来の研究にて、骨髄細胞と生分解性ポリマーにより血管（8mm）が作成できることを証明したが、その際、補強材として吸収期間の長いポリ乳酸を使用している。今回は吸収期間の短いポリグリコール酸

での検討を行うこと、そして、骨髄単核球細胞のみでの組織形成が従来のものと変わらないことをまず第一に確認する。吸収期間の短い生分解性ポリマーを使用することにより、体内にてポリマー（異物）の残存期間を短くすること、そして自己細胞による組織形成を早くすることが大きな目的である。骨髄単核球細胞を使用するのは、必要とされる血管前駆細胞を簡便により選択的に採取するためである。

2) 再生組織の組織学的検討および骨髄単核球細胞の追跡、同定  
組織学的検討においては、一般染色（HE、マッソン染色、ビクトリアブルー染色）を行い、さらに内皮細胞を同定するための factorVIII 染色、CD146 染色、acetyl-LDL による染色などを行う。また、血管平滑筋細胞を同定するための  $\alpha$ アクチン、分化した血管平滑筋細胞(myosin heavy chain)を同定するために SM1 および SM2 を、さらに未分化な血管平滑筋細胞を同定するために SMemb の各抗体により染色をおこなう。これにより組織内での分化を検討することが可能となる。

播種する骨髄単核球細胞を生体内にて追跡するためには、播種前に CFDA、SE にて染色する。これにより生体内にて播種した単核球細胞が分裂・増殖した際、細胞質に CFDA、SE を持っているため他の細胞と識別さらに追跡することができる。また、可能であれば単核球細胞に GFP を導入し、生体内にて追跡することも検討している。

### 3) 生化学的、分子生物学的、生力学的検討

再生血管の組織中のコラーゲン、エラスチン、カルシウム濃度の測定を行う。また、経時的(1, 3, 6ヶ月毎)に再生血管中のポリマーの残存量(分子量)を測定する。張力試験に関しては、インスロン張力検査機を用いて作成された組織の最大張力を測定し、作成された再生血管の経時的検討を行う。自己の同じ部位の組織(下大静脈)と比較検討し、生分解性ポリマーが完全に吸収されないとき(1ヶ月)および吸収された時点(3、6ヶ月)での組織の強度を比較検討する。再生血管の薬理的検討を行うために、再生血管をアセチルコリンにて刺激し、NOの産生能の有無を検討する。アイソトニック変位計に固定した正常血管壁(内皮細胞(-))を用い、その血管をノルアドレナリンにて収縮させ、その後、別のチャンバーにて再生血管をアセチルコリンにて刺激し、正常血管が弛緩するかを検討する。さらに再生血管自身が同様の方法にて薬物刺激により収縮、さらに弛緩するか否かを検討する。またeNOSの産生をmRNAレベルにて検討するためにAgilent 2100 bioanalyzerを用いてRT-PCRを行い検討する。

さらには、骨髄単核球細胞を播種した場合と播種せず生分解性ポリマーのみを移植した場合の比較実験を行う予定である。