

自己細胞と生分解性ポリマーによる再生血管の作成と遠隔期における機能および質的評価

(課題番号 18591563)

平成18, 19年度科学研究費補助金(基盤研究C)
研究成果報告書



平成20年4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 助教)



自己細胞と生分解性ポリマーによる再生血管の作成と遠隔期における機能および質的評価

(課題番号 18591563)

平成18, 19年度科学研究費補助金(基盤研究C)
研究成果報告書

平成20年4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 助教)

目次

はしがき	-----	2
1. 研究課題名・研究組織・研究経費	-----	6
2. 研究発表	-----	7
3. 研究成果		
1. TEVAs の組織学的および生化学的評価	-----	31
2. TEVAs の中期遠隔成績(臨床)	-----	40
3. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	-----	46
4. 下大静脈の Tissue Engineering Vascular Autografts (TEVAs) (犬)	-----	51
5. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	-----	62
6. 骨髄細胞と生分解性素材による再生血管の作成とその有効性の 証明	-----	68
7. TEVAs に対する骨髄細胞播種の有効性	-----	74
8. TEVAs のフォンタン手術への応用	-----	81
9. TEVAs の臨床応用(中間報告)	-----	89
4. 参考文献		
1. 心臓血管外科の再生治療の基礎	-----	102
2. 心血管系のティッシュエンジニアリング	-----	108
3. 培養人工血管	-----	112
4. 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例	-----	119
5. バイオ人工血管の臨床応用	-----	124
6. 骨髄細胞を用いた再生血管の臨床応用 と中期成績(臨床)	-----	131

はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科 松村剛毅

心臓血管外科領域における血管の修復は、加齢に伴う動脈硬化性病変の置換や先天性心疾患患者における先天的に欠落した構造物の補填・修復などと多岐にわたり、その術式・医材の補填に関して外科医は可能な限り自己血管組織を温存することを治療戦略として考える。しかし、現実としては異物である人工血管に頼らざるを得ないケースがほとんどである。人工血管の開発・改良と臨床応用は、心臓血管外科手術を必用とする多くの患者の命を救ってきたのもまた事実である。では、その異物である人工血管の問題点とは何か。材質的には安定しており、耐圧性に優れているものの、生体適合性という点ではまだ開発の余地が残っていると思われる。人工血管の自己組織化は、血管内腔の血栓形成や狭窄の過程や遠隔期における材質の劣化・石灰化を回避する点に於いて、重要な研究テーマの一つでもある。しかし、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、未だ理想的な代用補填物（人工血管）の開発には達していない。

近年、「再生医療」「再生医工学」という言葉が紙面でも取り上げられるようになった。多くの科で、これまで不可能であった治療への挑戦に再生医療が応用され、またこの分野の研究は今まさに日進月歩である。そもそも、再生医療は1993年に米国のLangerらが提唱したTissue Engineeringという概念に基づきものである。吸収速度の制御が可能な生分解性ポリマーを足場とし、そこに自己の細胞を播種し、目的の組織を作製するという当時としては画期的な研究分

野であった。Tissue Engineering により得られた再生組織の最大の利点は、自己の細胞を用いることによる免疫応答の回避、播種した細胞の増殖・成長に伴いその組織構造を担っていたポリマーが完全に分解・吸収され、移植後長期的に異物が残存しないこと、自己組織に置換されるため長期にわたる耐久性・石灰化などの回避や移植した組織の成長の可能性などである。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。また、この Tissue Engineering は生体の本来備わっている自己組織の修復気転を利用したものであるが故、生体適合性、患者本人に対する侵襲度を低下させ、安全性と長期に渡る耐久性を可能とする。そればかりか、再手術を減少させることができれば患者にとってもリスク回避となり、また医療経済への貢献も期待されている。

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なされているが、その多くが未だ研究段階である。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。40 例を超える臨床応用や数多くの大動物実験・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、本研究もその一旦を担うものである。

また、動物実験における長期遠隔成績も観察することのできない臨床例の組織形態・質的状态を推測するためにも必須の実験項目であり、本研究の主要テーマとした。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く所存である。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費

【研究課題名】

自己細胞と生分解性ポリマーによる再生血管の作成と遠隔期における機能および質的評価

(課題番号 18591563)

【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 助教）

研究分担者：

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 准教授）

内藤祐次（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教）

【研究経費】

平成 18 年度 1,800 千円

平成 19 年度 2,210 千円

（直接経費：1,700 千円，間接経費：510 千円）

計 4,100 千円

2. 研究発表

【学会誌など】

1. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、斎藤聡、坂本貴彦、市原有起、保々恭子、宮本真嘉、黒澤博身、自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーにより作製した再生血管による臨床研究 44 症例とその経過. 日心外会誌 36 巻 6 号: 309-314、2007
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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.
6. 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
7. Shin'oka T Clinical results of tissue engineered vascular autografts Yonsei Medical Journal 2004; 45: 73-74
8. 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
9. 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
10. 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
 11. 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
 12. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience Biomaterials 24: 2303-2308, 2003
 13. 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 Circulation 108: 1729-1734, 2003
 14. 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
 15. Matsumura G, Shin'oka Successful Application of Tissue Engineered Vascular Autografts; Clinical Experience. Biomaterials 2003 ; 24:2303-2308
 16. Shin'oka T Tissue Engineered Heart Valves: Autologous Cell Seeding on Biodegradable Polymer Scaffold Artificial Organ 2002; 26:522-6
 17. 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
 18. 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
 19. 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
20. 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
 21. 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
 22. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*. 2001;344:532-533.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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. 松村剛毅他：自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーにて作成した再生血管による臨床研究 44 症例の経過、第 37 回日本心臓血管外科学会総会、東京、2007 年 2 月
2. 松村剛毅他、生体吸収性素材と自己細胞による再生血管治療。第 43 回日本小児循環器学会総会・学術集会、東京、2007 年 7 月
3. 吉岡朋子、宮川一富田幸子、松村剛毅、黒澤博身。鶏胚心臓流出路形態形成におけるアポトーシスの検討、第 43 回日本小児循環器学会総会・学術集会、東京、2007 年 7 月
4. Naotaka Nitta, Takashi Yamane, Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka. Ultrasound-Based Evaluation Technique of Tissue-Engineered Vascular Wall Elasticity, 1 st Asian Biomaterial Congress (December 7, 2007)
5. 松村剛毅他、当科における TCPC 型手術の術式別中期成績、第 42 回日本小児循環器学会総会・学術集会、名古屋、2006 年 7 月
6. 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)
7. 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)
8. 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
9. Watanabe M, Shin'oka, Imai Y Tissue Engineered Vascular Autograft - Inferior Vena Cava Replacement Study in a Dog Model ISACB 8th (International Society for Applied Cardiovascular Biology) St. Gallen, Switzerland 2002
10. 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
11. 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

12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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）
21. 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）
22. 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.)
23. 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）
24. 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、松村剛毅。進みつつける細胞移植治療の実際－再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解。遺伝子MOOK別冊、第5章 2007年
2. 新岡俊治 先天性心臓病 最新版 家庭医学大全科 1008-1012, 2004
3. 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

4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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 メジカルビュー社 2002
9. 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
10. 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
11. 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
12. 松村剛毅、新岡俊治. 弁の再生医療 : 現代医療、36, 1, p23, 2004
13. 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
14. 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. 市原有起、松村剛毅、新岡俊治、目でみる新生児・乳児期心臓血管外科 先天性心疾患領域における再生医療・Tissue engineeringの展望。小児外科 38号、239、2006
2. 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
3. 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
4. 松村剛毅、新岡俊治 弁の再生医療 現代医療 36:23-27, 2004
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
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. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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に進められている。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や自己骨髄細胞を用い、フォンタン型手術における心外導管として、また肺動脈形成術におけるパッチとして再生血管による臨床例を経験した。具体的には、自己細胞（末梢静脈壁細胞または骨髄細胞を播種した生分解性ポリマーを用いて自己血管を in vitro で作成、体内への移植後は、自己細胞が分裂・増殖し、その過程において生分解性吸収性ポリマーが加水分解にて完全に分解・吸収される。完成された組織は、自己血管（壁）として正着し、その機能を担うこととなる。臨床研究の初期の段階では、自己の末梢静脈壁細胞を全身麻酔下に採取し、それを体外にて培養していた。培養に伴う操作には手間と時間を要するばかりか培養が不成功の場合は、細胞採取のための再手術を余儀なくされ、患者にとっては負担（リスク）の多いことが欠点としてあった。その後、基礎研究の進歩によって細胞源を骨髄細胞に変更し、細胞培養手技を省略した新手法を確立。臨床応用可能となった。これまで、基礎実験では動物モデルの制約

から、直径 8～12 mm、長さ 20～50 mmの再生血管を用いて、血管形成の機序を研究してきた。

自己骨髄細胞と生分解性ポリマーを用いた再生血管の研究において、現段階では、自己骨髄細胞はポリマー中において分裂・増殖し、内皮細胞や平滑筋細胞に分化すること、長さ 2 cmの再生血管では 1 ヶ月で完全に内皮化されること (Matsumura et al. Circulation, 2003)、またその内皮はアセチルコリンにより反応し、NO、eNOS の産生 (免疫組織学および RT-PCR にて) していること、遠隔期において (静脈) 血管様組織に remodeling する可能性が示唆されていること、などである。内皮化に関しては現在の方法により問題なく作成 (再生) できると考えられ、組織学的にも機能的にも問題ないと思われるが、長径グラフトでの内皮化がどれ位で完成するかは今現在検討中である (5 cmのグラフトを移植した際、約 6 ヶ月で内皮化されることが確認されたが、さらなる検証を重ねているところである)。これらの検討により再生血管を作成した場合の内皮化の状況を推測でき、抗凝固剤の長期使用を回避することが可能となりつつある。

再生血管の作成において生分解性ポリマーを使用するその利点は異物が長期にわたり再生血管内に残存しないことであり、それによりしばし心臓血管外科手術に使用される人工物と違い遠隔期において石灰化を来さないことである。このポリマーの存在期間、その吸収速度、分解に伴う再生血管組織の強度とその経時的変化、周囲組織、炎症細胞に与える影響、壁厚の変化 (remodeling する可能性)、ポリマーの至適 (初期) 強度につき、さらに検討する必要がある。本研究の目的は、臨床応用を広く本格的に展開するにあたり、さらなる評価を行うことである。犬の下大静脈に再生血管を置換する本モデルにおいて、長期遠隔の実験犬も得られるようになったことより、急性期のみならず慢性期での再生血管の強度の検討 (これに関しては報告がないと思われる)、急性期の炎症性変化とその影響、経時的組織変化 (壁厚の変化、石灰化の有無) を分析し、さらにポリマーの至適強度を追求、質の高い再生血管を臨床の場に提供することができるようにすることである。

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

再生血管の遠隔期における強度の経時的変化に関する研究は過去に見られなかったが、慢性期まで生存している実験動物が得られるようになったため、より臨床の場で必要とされるデータが正確に蓄積され、さらなる再生血管の改良につながるものと考えられる。さらに急性期より慢性期に至る組織形成の過程において、炎症反応の鎮静化とその組織学的検討もポリマーの設計において重要なデータとなると思われる。

ポリマーという異物が残存する間は、ポリマーに対して炎症細胞の浸潤が組織中に起こると思われる。ポリマーの加水分解が進むにつれ、炎症細胞の浸潤は消退すると思われるが、組織形成において炎症は何らかの好影響を与える可能性もあり、しばらく続くものと思われる。

ポリマーとしては、現在ポリグリコール酸を補強剤としたスポンジ状のポリカプロラクトンとポリ乳酸の共重合体 (PGA+P(LA/CL)) をベースに使用しているが、その初期強度を変えることにより組織形成に与える影響を検討する。同じ材質であれば、その質量が変わらない限り分解・吸収期間はさほど変わらないはずであり、しかし組織の完成度が上がるまでの補強剤としての役割を担う可能性があり、拡張、狭窄に対しより強いものが出来ると思われる。

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の臨床応用に必要な基礎データを収集し、再生血管の質の向上を図ることである。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、臨床応用を前提とした、中～大口径、長径の再生血管の開発研究、それらの遠隔期での機能評価、質的評価は世界的にも皆無である。

心臓ないし血管の手術を人工物（導管）にて行った場合の遠隔期における石灰化、導管機能不全、それに伴う心機能への悪影響により再手術を余儀なくされる現状、また再手術に伴うリスクを再生医療により少しでも回避することが可能であれば、患者様に対するのみならず、医療費削減においても社会に貢献することができると考

えられ、心臓血管領域での組織工学の発展は急務であると考えられる。

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 今井康晴他

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

種別 科学研究費 基盤研究（C）

研究代表者 渡辺 学他

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

種別 科学研究費 基盤研究（C）

研究代表者 松村剛毅他

題名 自己細胞を用いたティッシュエンジニアリングによる肺内肺動脈の作成、臨床応用

期間 平成12-平成13年

研究経費 平成12年度分として1,600千円、

平成 13 年度分として 1,800 千円

種別 科学研究費 基盤研究 (C)
研究代表者 松村剛毅他
題名 ティッシュエンジニアリングによる心臓弁の開発、応用
期間 平成 14-平成 15 年
研究経費 平成 14 年度分として 1,700 千円,
平成 15 年度分として 1,800 千円

種別 科学研究費 基盤研究 (C)
研究代表者 松村剛毅他
題名 骨髄幹細胞と生分解性素材を用いた再生血管の作成と臨床応用
期間 平成 16-平成 17 年
研究経費 平成 16 年度分として 1,800 千円,
平成 17 年度分として 1,700 千円

種別 科学研究費 基盤研究 (C)
研究代表者 松村剛毅他
題名 自己細胞と生分解性ポリマーによる再生血管の作成と遠隔期における機能および質的評価
期間 平成 18-平成 19 年
研究経費 平成 18 年度分として 1,800 千円,
平成 19 年度分として 1,700 千円

研究成果 (発表)

松村剛毅他： 再生血管の内皮細胞の評価、
第 57 回日本胸部外科学会総会 札幌、平成 16 年 10 月 22～23 日

松村剛毅他：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、浜松、平成 17 年 2 月 23 日

松村剛毅他：自己細胞を用いた中～大口径再生血管の作成
第 9 回心筋・血管新生療法研究会、東京、平成 17 年 7 月 22 日

松村剛毅他：当科における TCPC 型手術の中期遠隔成績

第 42 回日本小児循環器学会総会 名古屋 平成 18 年 7 月

松村剛毅他：自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーにて作成した再生血管による臨床研究 44 症例の経過、第 37 回日本心臓血管外科学会総会 東京 平成 19 年 2 月

松村剛毅他：生体吸収性素材と自己細胞による再生血管治療
第 43 回日本小児循環器学会総会 東京 平成 19 年 7 月など多数

研究成果（論文・受賞歴など）

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、合計 47 名の患者に自己細胞と生分解性素材による再生血管療法による臨床研究を行った。本方法による血管移植は世界初の臨床応用であり、2001 年に New England Journal of Medicine に報告した。その後、自己骨髄単核球細胞による再生血管の作成を Circulation に、臨床応用例に関しては Biomaterials に論文が掲載された。また Circulation に掲載された論文については、平成 16 年度東京女子医大医師会賞および日本小児循環器病学会 Y I A 賞を受賞した。2006 年には、大動物にて作成した初期～中期遠隔期の再生血管の内皮機能、生力学的評価を行い、それらの結果を Tissue Engineering 誌に報告、論文が掲載された。また、臨床研究の中期遠隔成績を 37 回日本心臓血管外科学会学術総会（2007 年 2 月、東京）にて報告したが、同演題が最優秀演題に選出されプレナリーセッションに於いて発表した。

準備状況

これまで、再生血管の研究については、東京女子医大においてビーグル犬を用いて行われてきた。現在最長 2 年までの慢性実験を継続しており、また同時に、分子学的手法を用いた血管の詳細な評価、研究を行っている。

本年より、従来と同サイズのグラフトでより強度を上げたものを同体重のビーグル犬に移植し、評価する予定である。病理組織学的、生化学的、分子生物学的な評価手法については、より一層質の高い

研究が可能となる条件がそろっている。

I. 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ことを受け、再生血管を作成するにあたり、より簡便な方法、より良い材質の開発を追求し、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することである。現在、PGA+P(CL/LA)による生分解性ポリマーを移植し、半年以上の生存犬も得られ、また組織形成も問題なく行われた。今後は、同一の材質で初期の強度を変えたポリマーを作成し、それらを順次移植する。従来の方法と比較検討するために移植後の血管の強度試験を急性期のみならず慢性期（1年前後）の組織においても検討し、ポリマーごとに経時的に評価する予定である。さらに長期における石灰化の有無、炎症細胞の組織学的検討、分子生物学的な評価も同時に行っていく。

II. 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おります（東京女子医科大学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おります。再生血管の生力学的検査（張力・強度）を行うための張力試験器も完備している。分子生物学的検索（(RT-)PCR, Western Blotting, Elisa etc）を行うための機器も取りそろえている。病理形態診断と血管造影のための普通顕微鏡、蛍光顕微鏡、倒立蛍光顕微鏡及び画像記録解析装置、CCDカメラ、画像

解析装置、X線透視装置、超音波診断装置が完備、充実している。

研究計画

平成17年度は基礎研究を行い、そこで得られた成果を臨床へフィードバックし、平成18年度には改良型の再生血管の臨床応用をめざす方針である。

基礎研究

1：骨髄細胞の採取と、ポリマーへの播種

体重10kg前後のビーグル犬より骨髄液20-30mlを採取し、密度勾配法によって、単核球成分を分離する。細胞数をカウントし、これまでの研究で再生血管の作成に必要であるとされた 1.0×10^6 個/mlの骨髄短核球細胞からなる細胞懸濁液を5ml作成する。臨床で使用するサイズに近い、直径16mm、長さ40mmの生体分解性の高分子ポリマーからなるグラフトに、作成した細胞懸濁液を播種する。

2：至適グラフトの選定

細胞の足場となるグラフトは、播種された細胞が接着しやすいようにlow porosityであるため、本研究で使用するグラフトのようにサイズが大きくなると血液との接触面積が大きくなり、in vivoに植え込んだ際に、グラフトからのoozingによる出血が大きな問題となる。こうした出血の防止のため、現在臨床応用ではフィブリン糊をあらかじめgraft表面に塗っている。本研究では、植え込み時の出血を予防できるようにするために、グラフト表面をフィブリン糊に代わってcoatingするのに最適な物質を検討する。グラフトはPGAとPCLを50:50の割合で配合されたポリマーをPGA sheetで補強したものを使用する。Coatingに使用する物質は以下の3種類について検討する。

1. フィブリン糊でのcoating
2. ゼラチンでのcoating

3. PLLA sheetでのcoating

それぞれのグラフトについて同数の細胞数を播種して、細胞の接着数をカウントする。

各群について、植え込み後一ヶ月でグラフトを摘出しそれぞれの組織と、自己の下大静脈組織を比較して、検討する。生化学的、生力学的、免疫組織学的検討を行う。生化学検査として、組織中コラーゲン、エラスチン、カルシウム濃度の測定を行い、インスト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自己の同じ部位の組織や、異なった種類のポリマーの組織と比較検討する。組織学的には免疫染色の手法を用いて内皮細胞の指標である第8因子を染色すると共に細胞間隙の間質蛋白質を染色し自己組織と比較検討する。

3：血管組織構築のメカニズムの検討

In vivo において、骨髄中の幹細胞から分化した内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞がポリマー上でどのように血管組織を構築していくのかを調べるために、植え込み後、2、4、6週でグラフトを摘出し、これをトリプシン処理して、ポリマーに接着していた細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて細胞の評価を行う。また同時に摘出されたグラフト組織を FLK, VEGF, Angiopoieton 等によって免疫染色し、幹細胞の分泌する growth factor の分布、密度を画像解析し、それらの分布と血管組織構築の関連を検討し、血管組織構築のメカニズムの解明に必要な所見を得る

4：遠隔期の組織検討

以上の実験から得られた結果を基にして、至適なグラフトのcoating剤を選定する。これらを用いて、生体内で形成される再生血管の遠隔期の組織について検討する。将来の臨床応用を考えると、これらの遠隔期のデータは非常に貴重なものとなると考えられる。

これまでの実験と同様に子犬を用いて、全身麻酔下に左開胸し、下大静脈を、細胞を播種していない生体分解性ポリマーよりなる導

管で置換する。グラフトを植え込み後、半年、1年、2年、5年でグラフトを摘出し、グラフト組織に対して生化学的、生力学的、免疫組織学的検討を行う。生化学検査として、組織中コラーゲン、エラスチン、カルシウム濃度の測定を行い、遠隔期における組織のfibrosisの程度を、自己の血管組織と比較検討する。また、インストロン張力検査機を用いて、組織の最大張力を測定し自己の同じ部位の組織と比較する。遠隔期における組織の強度は重要な評価項目である。また、組織学的検討によって、生体内で加水分解されずに残存しているポリマーの割合を評価する。また、免疫染色の手法を用いて内皮細胞の指標である第8因子を染色すると共に細胞間隙の間質蛋白質を染色し自己組織と比較検討する。

5：成長性の評価

生体内で再生血管が形成された後、遠隔期に血管が拡張するのか、成長するのかについての検討を行う。

生後数ヶ月（5 kg）の子犬を用いて、下大静脈を生体分解性ポリマーで置換し、3年後、5年後にグラフトを摘出して、そのグラフト径を自己の下大静脈径と比較することで、その変化を検討する。また、組織中のMMP等の間質蛋白や、テロメアの遺伝子解析により、グラフトの拡張度、agingの程度を検討する。

臨床応用

根治手術時、これまで使用されていたグラフトに、以上の基礎実験から得られたデータをもとに、coatingされた生分解性ポリマーの導管に、骨髄細胞を播種したものを植え込む。術後急性期はグラフトの開存性を維持するため、抗凝固を行う。抗凝固の期間は、動物を用いた予備実験において、約1ヶ月でグラフト内面が完全に内皮化されることが確認されているので、術後約3ヶ月間行うものとする。

顆粒コロニー刺激因子によって動員された内皮前駆細胞をはじめとする幹細胞数の測定は、血中の顆粒級数や、幹細胞のマーカート

して CD34 を用いて血液中の CD34 陽性細胞の割合をフローサイトメーターを用いてカウントする。

フォローアップは術後約 1 ヶ月後に、心臓カテーテル、造影検査、心臓超音波検査、CT, MRI を行い、その後 6 ヶ月毎に心臓超音波検査を用いて形態学的検索及び組織過形成の有無等を経過観察する。術後遠隔期にも心臓超音波検査、CT, MRI を施行する。

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 α 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出来ます。

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 にて染色いたします。これにより、生体内にて播種した単核球細胞が分裂し、増殖した際細胞質に CFDA, SE を持っているために他の細胞と識別さらに追跡することが出来ます。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おります。

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います。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) を測定します。

研究成果のサマリー

本研究における重要所見の要約を最後に記す。

① 再生血管長期埋植後の所見

長期埋植時 (1 年以上) における再生血管は、組織学的には巨視

的にも顕微鏡下にてても極めて正常下大静脈に近い組織形態を示す。懸念された石灰化も組織化が順調に進んだものに関しては、生分解性素材の吸収により異物の残存を認めずまた西山法による組織学的評価においても石灰化は認められなかった。炎症の変化としては、免疫組織学的検索に於いて CD4、MCP-1 の陽性細胞は経時的に減少し、CD4 の mRNA においてもその傾向が認められた。

② 再生血管の生力学的特性

再生血管の最大強力に関しては経時的に強度を増し、約 1 年を経過した段階で正常静脈組織と統計上ほぼ同等となる。しかし、膠原線維の含有量の違いのためか、組織内で起こった炎症性変化の結果の線維化が原因か、剛性においては経時的に上昇していく傾向があった。

③ 再生血管における壁厚の変化

再生血管の壁厚は生分解性素材の吸収のほとんど認められない移植後 1 ヶ月に於いて最も厚い組織となるが（約 2.5mm；生分解性素材の厚みが約 0.75mm）、組織形成の順調に進んだものに関しては壁厚の減少を認め、移植後約 6 ヶ月で正常組織とほぼ同等の壁厚となる。そのメカニズムとしては、生分解性素材の分解・吸収によるところが大きいですが、組織内における組織構築の進展、炎症性変化の減弱も壁厚が薄くなっていく原因と考えられる。

④ 今後の展望

生分解性素材と自己の細胞による静脈組織の再生を約 10 年にわたり行ってきた。それにより、本方法における初期のみならず遠隔期での特徴を知り得ることができた。しかしながら、自己の修復能に頼らざるを得ないが故に体内における十分な組織形成の行われず、狭窄や閉塞を来すものもあるのも事実である。これらの事象のメカニズムの解明と原因究明とこれらを克服するための条件を模索し始めたところである。

また、自己の細胞を用いることが治験のハードルを高くし、臨床レベルに到達するまでの足かせになることも否定し得ない。このような医材の開発は実際に臨床の現場で使用されなければ全く意味をなさないわけであり、これを打破すべく細胞を用いず、生分解性素材のみでも同様の効果あるいはそれ以上の結果をもたらす素材・条件を模索し始めたところである。

以下に、上記に関連する研究成果として主に研究論文を、参考文献として著書等を添付する。