

骨髓細胞を使用するティッシュエ ンジニアリングによる再生血管・ 弁の臨床応用と評価

(課題番号 17390387)

平成17, 18, 19年度科学研究費補助金
(基盤研究B)
研究成果報告書



平成20年 4月

研究代表者 山本 昇

(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教)



骨髄細胞を使用するティッシュエ
ンジニアリングによる再生血管・
弁の臨床応用と評価
(課題番号 17390387)

平成17, 18, 19年度科学研究費補助金
(基盤研究B)
研究成果報告書

平成20年 4月

研究代表者 山本 昇
(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 山本 昇

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。

それらを解明し、より有用なものを開発していくためには、組織形成段階における成長因子の動態を把握することが重要と考え、本研究を立案した。

これまで、我々は生分解性素材と自己細胞による血管組織の再生と

いうテーマで、基礎的な研究のみならず、臨床応用を世界に先駆け成功し良好な結果を得てきた。しかしながら、本法は未だ開発段階にあるためにさらなる改良を要するものであり、そのための基礎実験は継続していくべきものである。本研究もその一旦を担うものである。

また、臨床例の組織形態・質的状态を推測するためにも本研究は必須の実験項目であり、再生血管分野のさらなる発展の一役を担えると考えている。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費

【研究課題名】

骨髄細胞を使用するティッシュエンジニアリングによる再生血管・
弁の臨床応用と評価
(課題番号 17390387)

【研究組織】

研究代表者：

山本 昇 (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教)
(代表者変更：平成 19 年度より)

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)

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)

長津正芳 (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 講師)

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)

石山雅邦 (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教)

小坂由道 (東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教)

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)

【研究経費】

平成 17 年度 4,800 千円

平成 18 年度 4,500 千円

平成 19 年度 5,850 千円

(直接経費：4,500 千円, 間接経費：1,350 千円)

計 15,150 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、齋藤聡、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 骨髓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。進みつづ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、6 名の患者にこの方法による肺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、再生医療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。我々は既にこの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。さらには現在まで骨髄幹細胞を使用する方法での再生血管移植は 45 症例に行われた。具体的には、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 が肺または静脈系血行を担うことになる。

本研究の目的はこの成果をさらに発展させ、骨髄細胞を自己細胞として用いて補填材料・人工血管を作成し、既存の素材との比較検討よりこのグラフトを評価し、さらにヒトにおける至適ポリマー、

至適培養法、至適細胞数を明らかにすることである。骨髓細胞を用いたこの分野での研究は過去になく、また骨髓間質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骨髓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。骨髓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、である。自己細胞として骨髓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) 組織幹細胞であるので、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) 骨髓幹細胞を自己細胞として用いる場合に比較して、幹細胞を採取する際に患者の苦痛がより少ないこと（血管を穿刺するのみ）、がある。

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。同様の方法による人工硬膜の作成、臨床治験が京都大学において終了している心臓血管領域での組織工学は今後本邦においても急速に普及していくものと考えられる。

過去の関連研究費

種別 科学研究費 基盤研究（B）

研究代表者 新岡俊治

題名 自己骨髄間質細胞を使用する再生医工学による再生心臓弁、
再生血管の開発、応用

期間 平成 14-平成 16 年

研究経費 平成 14 年度分として 3,600 千円、平成 15 年度分として 3,400 千円，平成 16 年度分として 3,400 千円

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

I. 心臓弁に関しては平成 17 年度は基礎的研究を主に施行し、平成 18, 19 年度に臨床応用をめざしている。再生血管はすでに 45 臨床例で移植が完了しており、カテーテル、CT、MRI 等での評価を継続する。再手術、または死亡した症例では病理学的検索を行う。

①研究代表者、 研究分担者の相互関係

研究代表者 新岡俊治は研究の総括、臨床使用を担当する。分担者 黒澤博身は臨床使用を担当する。 分担者 長津正芳は細胞培養、動物実験を担当し、分担者 石山雅邦は分子生物学的研究を担当する。小坂由道、山本 昇、松村剛毅はそれぞれ臨床使用の際の細胞単離、培養、播種を担当する。すでに設備品は購入されており、経費としては消耗品、動物代のみである。海外共同研究者は存在せず、本邦だけの独自のプロジェクトです。

②主要設備との関連

動物実験には現有の細胞培養用クリーンベンチ及びインキュベーターを用いるが、臨床使用のためのヒト細胞専用の細胞培養用装置は現有のものを手術室に設置し使用する。

1. 基礎的研究

<in vivo 実験>動物実験による至適骨髓細胞数，至適脱細胞化の探究及び選定を行う。使用する細胞として、静脈血管細胞、骨髓細胞（単核球成分）、骨髓液実質、末梢血幹細胞を使用し、至適な細胞起源、細胞数を探索する。実験動物として子犬を用い、骨髓細胞の採取は通常 of 骨髓穿刺針を用いて行う。末梢血幹細胞のマーカーとして CD34⁺細胞を用いる。採取血液中の白血球数と採取血液の重量の積を、血液比重の 1.05 で除して、総採取細胞数を求める。この総採取細胞数に CD34⁺細胞陽性率を乗したものが採取できた CD34⁺細胞数である。体重 1kg 当たりの CD34⁺細胞数が 2×10^6 を超えていれば十分

量の末梢血幹細胞が採取できたと考えられる。十分な細胞数が得られれば、弁付き生体吸収性素材に播種する。2-3 時間後に細胞を採取した同一動物を全身麻酔下に左開胸し、人工心肺を装着したうえで、心拍動下にパッチ移植手術を行う。右心室から肺動脈までの間に、このティッシュエンジニアリングで作成したパッチを補填する。コントロール実験として細胞を播種しない生体吸収性素材の足場のみ移植も行う。移植 3-12 ヶ月後に作成された組織に対して、心エコー検査、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。同種動物の細胞を使用した場合拒絶反応の因子を排除できないため、細胞は全て自己 (autologous) 細胞を用いる。

2. 臨床応用<自己細胞を用いたティッシュエンジニアリングの方法>根治手術時、全身麻酔下に骨髄穿刺を行い、体重あたり 2cc の骨髄液を採取する。上記の血液成分分離装置により完全清潔下に操作を施行する。直ちに生分解性ポリマーの足場に播種した後、組織培養液中に浸漬し、手術室内の細胞培養室にて細胞の viability を維持しつつ保存する。細胞培養液は使用せず、自己血清を細胞浮遊液とする。自己血清に浸漬する目的は、骨髄細胞ができるだけ多くポリマー繊維に接着するように誘導することである。播種前にポリ

マーをファイブロネクチンで処理することにより細胞とポリマーの接着性は向上する。播種細胞数は 10^6 個/cm² とし、細胞播種後、約 2-3 時間のインキュベーションで移植手術を行う。このティッシュエンジニアリングで作成した導管を移植する際には、助手は導管を培養液に浸漬させながら移植を行う。術後約 1 ヶ月後に、心臓カテーテル、造影検査、心臓超音波検査を行いフォローアップは 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を施行する。再手術時に肺動脈移植部の組織片を客観的に評価した後、小組織を採取し、人工肺動脈組織と自己心肺動脈織を生化学的、生力学的、免疫組織学的に比較検討する。

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。

再生血管の薬理学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やを検討する。さらに、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。

研究計画・方法（平成 18 年度以降）

18 年度は、17 年度に引き続き動物実験、および基礎データの集積を行う予定である。6 ヶ月の経過観察を行うために、基礎研究は 18 年度にも及ぶと考えられる。

また、骨髓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実験を行う予定である。組織学的検討は、17 年度と同様に行い、さらに電子顕微鏡により表面の内皮細胞の形成などを比較検討を行う予定である。

臨床応用に関して

<自己細胞を用いたティッシュエンジニアリングの方法>

根治手術時、約 2-6ml/kg の骨髓を完全清潔下に採取する。滅菌濾過フィルターにて骨片や脂肪組織を除去した後に静かに密度勾配液上に重層する。遠心後、骨髓単核球を分離しさらに生理食塩水と混合し、2 回遠心を繰り返し洗浄を行う。得られたペレットを直

ちに生分解性ポリマーの導管に播種し、組織培養液中に浸漬し、手術室内の細胞培養室にて細胞の viability を維持しつつ保存する。これら一連の操作は、すべて operating room 内にて行う。播種細胞数は 10^3 個/cm² とし、細胞播種後、約 1-3 時間で移植手術を行う。

手術術後は、定期的に血液、生化学的検査を行い、術後約 1 ヶ月後に造影 CT 検査、心臓超音波検査を行いフォローアップします。必要に応じて、心臓カテーテル検査を行う。3、6 ヶ月毎に心臓超音波検査や造影 CT 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を施行する。

臨床応用については、学内の倫理委員会の承認は得られているが、家族、本人からのインフォームドコンセントを十分に得られた症例のみに施行する。遺伝子操作、人クローンを扱うことはなく、骨髓由来の細胞に期待して組織作りを行うため、in vitro での細胞培養が全く不要となる。異種動物である牛胎児血清などの使用も避けることが可能となり、より安全な治療を行い得る。

研究成果のサマリー

2001 年 9 月より 2004 年 12 月の間に自己骨髓細胞と生分解性素材による再生血管を用いて外科手術を行ったのは、44 症例である。ポリ乳酸 (24 例) またはポリグリコール酸 (20 例) を補強材とし、内外側に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を塗布したハイブリッドポリマーをパッチまたは導管として使用した。術当日に Ficoll 法にて骨髓単核球細胞を分離し、ポリマー上に播種、移植した。再生血管を用いて、肺動脈形成または右室流出路形成術を 16 例に、フォンタン型手

術を 28 例に行った。対象は、男性（児）19 例、女性（児）25 例で、手術時平均年齢は約 7.5 才、術後在院平均日数は 40 日強であった。再手術時に再生血管を使用した例は 18 例で、うち 14 例が先行手術時に自己心膜やウシ心嚢膜パッチにて肺動脈形成術が行われており、4 例が APC フォンタン術、Björk、Septation からの転換例であった。病院死亡は認められなかった。再生血管に関連しない心不全死を遠隔期に 3 例、脳出血死を 1 例認めた。再生血管に関連する再手術例は 2 例であった。再生血管に関連しない再手術が 1 例、グラフトの閉塞 1 例、グラフトの狭窄などに対する PTA 介入例を 9 例認めた。生分解性ポリマーと自己細胞による再生血管は、再手術時などに使用できる有用な代用生物（生体適合性）補填物である。内皮化など組織学的にも既存の人工物よりも有利であり、ワーファリンの回避や血栓の防止などに寄与すると考えられる。しかし、狭窄などに対する対策を今後も検討しなくてはならず、さらなる基礎研究と開発を行っていく所存である。

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。