

200906002A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岸田 晶夫

平成22年(2010)年 5月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岸田 晶夫

平成22年（2010）年 5月

目次

I. 総括研究報告	
脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用	1
岸田 晶夫	
II. 分担研究報告	
1. 循環器系再生型組織の作製	11
藤里 俊哉	
2. 循環器系再生型組織のin vitro評価	17
山岡 哲二	
3. 再生型組織の臨床応用への倫理面の検討	23
北村 惣一郎	
4. 循環器系再生型組織のin vivo評価	29
湊谷 謙司	
5. 脱細胞化生体組織の滅菌	37
白藪 昭雄	
6. 再生型角膜の物性・in vitro評価	41
小林 尚俊	
7. 再生型角膜のin vivo評価	49
佐々木 秀次	
8. 再生型角膜の作製	59
木村 剛	
III. 研究成果の観光に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物・印刷	73

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
総括研究報告書

脱細胞化生体組織による再生医療技術の臨床応用

研究代表者 岸田 晶夫
東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授

研究要旨 再生医療技術のうち、足場材料のみを用いて生体内再生を行う技術は、早期の臨床応用が可能である。本研究では、循環器系組織および角膜組織を対象を絞り、有効性・安全性の評価とともに製品化のための基礎研究を含めた検討を行った。循環器系組織については、石灰化抑制のための脱細胞化プロトコルを確立し、動物実験においても本手法の有効性が確認できた。角膜については、上皮欠損モデル実験にて、早期の上皮再生と術後6ヶ月における正常角膜類似組織を再生が示され、本材料が角膜実質再生足場材料として非常に有用であり、臨床応用の可能性が高いものであることが示された。

分担研究者

藤里俊哉
大阪工業大学工学部教授
山岡哲二
国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部長
北村惣一郎
国立循環器病センター生体工学部
湊谷謙司
国立循環器病センター心臓血管外科
白数昭雄
ニプロ株式会社総合研究所部長代理
小林尚俊
物質・材料研究機構生体センターバイオポリマーグループリーダー
佐々木秀次
都立広尾病院眼科長
木村剛
東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教

A. 研究目的

再生医療の要素技術の一つであるスキャフォールドに関する研究は、従来、材料工学的にはスポンジ状あるいは繊維集合体に加工した生体吸収性材料の開発が進められている。また、組織移植医療の側面からのスキャフォールドの開発研究も進められている。その背景として組織移植医療

では、慢性的な移植組織の不足から、解剖学的にヒト組織に類似するブタ組織を移植組織とする研究が行われてきた。異種移植の超急性拒絶反応を回避するためグルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いてエピトープを固定化し移植されているが、組織の硬化や長期埋入での石灰化が大きな問題となっている。そこで、新たな拒絶反応回避策として、免疫源となる細胞を除去し、残存するマトリクス（ECM）からなる組織（脱細胞化組織：バイオスキャフォールド）を移植組織として用いる方法が提案されている。本手法は、人工材料では再現が困難な生体組織特有の複雑な三次元構造を有する点を特徴とし、生体由来であることから、細胞の浸潤を許容することで成長可能な組織として期待されている。脱細胞化組織の調製法としては、酵素や界面活性剤を用いる化学的処理法が主流であるが、残存物質による細胞毒性、ECM変性、力学特性への影響が懸念されている。このことから我々は、新規脱細胞化法として圧力印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压処理法を考案し、脱細胞化組織の調製を検討している。対象としては、早期の臨床応用を目的とし、循環器系組織である心臓弁、血管と角膜に絞って検討している。これまで、循環器系組織については、本手法により調製した脱細胞化血管を用いた同種移植試験では、早期の内皮化および内膜肥厚抑制が示された。しかしながら、石灰化が問題となっており、本年度は、石灰化抑

制のための石灰化要素の検討と脱細胞化プロトコールの検討を行った。一方の角膜については、昨年度までに角膜の脱細胞化プロトコールを確定し、異種移植実験による脱細胞化角膜の長期の生体適合性および角膜再生について検討を行っており、今年度も引き続き検討した。

B. 研究方法

B-1. 循環器系組織

脱細胞化処理

血管（皮下埋入用）：ブタの大動脈血管を細切して、施圧液と共に袋に入れて密封し、980 MPaの圧力を30℃温度下で10分間印加した。次に、圧力処理により破壊された細胞を除去するため、DNase Iを0、4、40、400 unit/mLの濃度で添加した洗浄液で3、7、14日間洗浄した。洗浄後、リン脂質除去を目的として80%エタノール中での振盪と、エタノール除去のための生理食塩水への置換を行ったのち、保存液に置換して実験に供した。各溶液を用いて作製した脱細胞化血管のHE染色により、脱細胞化の有無や組織の構造変化を比較した。さらに、溶存タンパク質の定量のために、タンパク質の抽出後SDS-PAGE分析を行った。

血管（同種移植用）：等方静水圧印加処理を利用したブタ脱細胞化血管の作製では、およそ30 kgのクラウン系ブタ心臓（ジャパンファーム、鹿児島）を利用した。摘出した血管をPBS(-)を満たしたビニールパックに入れて、密閉した。これを超高圧印加装置（Dr. Chef 神戸製鋼、兵庫）の圧力印加チャンパー内に入れて、980 MPaの圧力を10分間加えた。このとき、急激な圧力印加によるチャンパー内の温度上昇を防ぐため、チャンパー全体を10℃に維持した。圧力印加後、組織をビニールパックから取り出し、2週間、所定の洗浄液に浸して振盪し、破壊された細胞の破片を除去した。さらに、細胞膜に多く含まれるリン脂質が石灰化の原因であるともいわれることから、このリン脂質を除去するために、80%エタノールに浸漬して3日間洗浄した。エタノールは、移植後にレシピエント動物の体液となじみにくいため、最後にPBS(-)による3日間の洗浄を経て、移植用組織片とした。

血管（脱エラスチン血管）：胸部大動脈を24時間凍結乾燥させた後、120℃真空中で熱架橋した。熱架橋後、エラスターゼ処理溶液（pH8 0.01M Tris buffer, 0.15 mg/ml Elastase, 10 mM CaCl₂, 0.02 % NaN₃）を用い、回転型シェーカー上で72時間処

理しエラスチン繊維を分解した。エラスターゼ処理後に、エラスポール100mgに生理食塩水を10ml加えて粉末をよく溶かした後、2.5mlをpH8 0.01M Tris-buffer 50mlに加えて作製したエラスポール溶液に、胸部大動脈を4℃下で72時間浸してエラスターゼの活性を失活化させた。その後、80%エタノール内に72時間浸すことでリン脂質を除去した。

細胞播種

あらかじめ脱エラスチン血管をI型コラーゲンゲル（新田ゼラチン）でコーティング処理した後、市販のブタ大動脈内皮細胞を播種した。脱細胞化血管をアクリルモジュール容器内に入れた後、内皮細胞懸濁液を容器内に満たし、回転播種した。その後、ローラーポンプを用いた循環培養を行った。

動物移植実験

小動物皮下への埋入実験：脱細胞化処理に用いた各溶液が組織の石灰化に及ぼす影響を調べるため、ラット背部への皮下移植を行い、移植後1ヶ月目と3ヶ月目にX線CTでの撮像から骨塩量を測定した。さらに、3ヶ月目には組織を摘出し、原子吸光度計を用いて、組織内の含有カルシウム量を定量した。

同種移植実験：脱細胞化血管のクラウン系ミニブタを用いた同種移植を行い、作製した移植組織による血管の再生の可能性を評価した。移植実験では、ドナー動物と同程度の体重のレシピエント動物を用い、人工呼吸下で開胸し、下行大動脈部位の置換移植を行った。各々の移植が成功した場合には、3ヵ月後以降12ヵ月までの間に摘出して、組織学的評価を行なった。

移植片の評価

脱細胞化血管は、摘出後、ヘマトキシリン-エオジン染色、von Kossa 染色、Elastica van Gieson 染色、免疫染色（von Willebrand Factor、alpha-smooth muscle actin、vimentin）により評価した。脱エラスチン血管移植実験では、脱エラスチンによる石灰化抑制効果を調べるため、小動物用CTスキャン装置にて、摘出した移植片全体の石灰化の分布を調べた。

B-2. 角膜組織

脱細胞化処理

超高圧印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する超高圧処理法を用いて角膜の脱細胞化を行った。具体的には、10℃、10000気圧、10分間の超高静水圧を

施した後、浸透圧調整のためにデキストランを含有した生理的食塩水中で 72 時間の浸透洗浄を行った。

ウサギ角膜細胞の採取

日本白色家兎より角膜細胞の採取を試みた。角膜上皮細胞についてはウサギ眼球を採取後、角膜輪部を切離し、3mg/ml の濃度になるようにコラゲナーゼ (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) を Dulbecco's modified eagles medium (DMEM, Sigma Aldrich, St. Louis, USA.) に溶解した溶液に 5 分浸漬した。その後、セルストレーナーを用いて、組織を除去した後に得られた溶液を 250×g にて遠心分離した。遠心分離後、コラゲナーゼ溶液をアスピレートし、10% fetal bovine serum (FBS, JRH bioscience, Inc., Kansas, USA.) および 2% penicillin/streptomycin (pc/sc Invitrogen) を含む DMEM 溶液に再懸濁した。採取した細胞を含む懸濁溶液を細胞培養ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下にて培養した (図 1)。採取した細胞は形態が上皮様の細胞と実質用の細胞が混在していた。角膜上皮様細胞の回収はトリプシンの処理時間の差により行い、経代を経て実験に使用した。

角膜実質細胞の採取法は、ウサギ眼球を採取後、角膜表面を 70% エタノールで洗浄し、角膜実質部をサージカルナイフで単離し、得られた組織片を 3mg/ml のコラゲナーゼ・DMEM 溶液に浸漬し、消化した組織片を細胞培養ディッシュに移した。細胞培養ディッシュに移した組織を覆うように 10% FBS および 2% PC/SC を含む DMEM 培地を滴下し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下にて 5 日間、培養した (図 2)。組織片を除去し、十分量の培地を再度滴下し、細胞がコンフルエントに達するまで同条件下で培養を継続した。上記のようにして得られた細胞を経代した後、実験に使用した。

細胞接着試験

超高压印加処理により作成した脱細胞化角膜上に、上記の方法で採取した角膜上皮細胞および角膜実質細胞をそれぞれ 1.0×10^5 個/の細胞を播種し、角膜上皮細胞はウサギ角膜上皮細胞基礎培地 (RCBM 培地、クラボウ、日本) に増殖添加剤キットを添加した培地 (RCGM キット、クラボウ、日本) を用い、角膜実質細胞は DMEM 培地を用いて培養し、播種後 4 日後および 3 週間後の接着細胞を蛍光染色および凍結切片を作成して評価した。培養終了後の組織は、DAPI 染色、F-actin 染色 (F-actin visualization biochem kit, Cytoskeleton, USA) および凍結切片を作成し評価した。

角膜細胞共培養試験

高静水圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜を用いて、体外で疑似角膜組織構造の再構築をし得るか試験するために、カルチャーコンテナシステム (IEDATRADING Corp., 日本) を用いて角膜上皮細胞および角膜実質細胞培養の共培養を試みた。

2 枚の脱細胞化角膜上にそれぞれ 1.0×10^5 個の角膜上皮細胞および 5.0×10^4 個の角膜実質細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 雰囲気下にて 24 時間培養後、角膜実質細胞を培養した材料上に角膜上皮細胞を培養した材料を重ね、ミノシート (IEDATRADING Corp., 日本) に固定し、カルチャーコンテナシステムにセットした。角膜上皮細胞側には RCBM 培地、角膜実質細胞側には DMEM 培地が供給されるように、流速 25μl/min に設定し、3 週間培養した。

培養終了後の脱細胞化角膜は 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定し、脱水、透徹後、パラフィンに包埋した。5μm の厚みのパラフィン切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。

動物移植実験 (マウス皮下埋入実験): 移植実験には 6 週齢の C57BL/6J マウス (雄) を用いた。ネンブタール原液を生理食塩水で 10 倍希釈し、10% ネンブタール溶液を調製した。10% ネンブタール溶液 0.3ml を腹腔内注射して麻酔し、背側頸部に長さ 1 cm 程度の切開線を入れた。その後尾側に向かって皮下組織を長さ 3cm ほど剥離して進み、そこへ移植片を 1 匹につき 1 個留置し、切開線を 2 針縫合した。

動物移植実験 (ウサギ角膜移植実験)

日本白色家兎 (生後 25 週齢、体重 2.5~3.0Kg) の角膜内に上記の方法で作成した脱細胞化角膜を移植した。手術手順は以下のような方法で行った。ウサギには 38.9mg/Kg のペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬株式会社、東京) を耳静脈注射し、全身麻酔をかけた。全身麻酔に加え、術前および術中に適宜、眼科用表面麻酔剤 (ベノキシール点眼液、参天製薬、大阪) を点眼した。点眼麻酔を含む全身麻酔下にて、角膜上皮から実質層に眼科用メスにて切開を入れ、クレセントナイフを用いて角膜実質部に直径 8mm のポケットを作成した。ポケット中央部に、直径 4mm の生検トレパンを用いて上皮欠損部を作成した。その後、ポケット内部に脱細胞化角膜を埋植し、埋植したサンプルの周囲を 12 から 16 針、非吸収性の縫合糸 (Ethicon, Johnson and

Johnson, USA) で縫合した。さらに、切開した部分にも同様に3針縫合した。縫合糸は検体の状態に合わせて、術後1から2週間で抜糸した。手術後の炎症反応を軽減する目的として1日2回、リンデロンA(塩野義製薬、大阪)を手術眼に術後4週間にわたり点眼した。手術後は定期的に眼科用顕微鏡を用いて手術眼の観察を行うとともに、埋植したサンプル上への上皮の再生を観察するためにフローレス試験紙(昭和薬品化工株式会社、東京)を用いた観察も行った(1週間、2週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月)。

移植片の組織学的評価

術後6ヶ月における手術眼の組織状態を調査した。尚、観察期間中、顕著な炎症反応を呈し、継続観察が困難と判断した検体については、随時屠殺して組織評価を行った。各検体は屠殺後、手術眼を切離し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定し、上昇アルコール系列にて脱水、レモゾールにて透徹後、パラフィンに包埋した。5 μ mの組織切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソントリクローム(MT)染色および抗ケラチン抗体(Millipore, USA)、抗 α 平滑筋アクチン(α SMA)抗体および抗増殖細胞関連因子(PCNA)抗体(DAKO, 京都)を用いた免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は以下のように行った。組織切片を親水後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて5分間、3回洗浄を行った。必要に応じて、トリプシン溶液(ニチレイ、東京)およびトリス緩衝液に切片を浸しての加温処理を抗原賦活化処理として行った。抗原賦活化処理を行った切片については処理後PBSを用いて5分間、3回洗浄した。その後、内因性ペルオキシダーゼの除去のために0.3%過酸化水素加メタノールで15分間処理し、処理後にPBSで5分間、3回洗浄した。次に、抗体の非特異吸着を防ぐ目的でProtein blocking solution(DAKO、京都)を切片に滴下し、室温で20分間浸漬した。それぞれの一次抗体を染色に適した濃度に希釈後、切片上に滴下し、4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。抗体液をPBSにて洗い流し、5分間、3回PBSにて洗浄後、シンプルステインラットMAX-PO(M)(ニチレイ、東京)を2次抗体として滴下し、室温30分間浸漬した。PBSにて5分間、3回洗浄した後、ジアミノベンチジン(DAKO、京都)で6分間発色させ、反応終了後水洗した。対比染色としてマイヤーのヘマトキシリンにて20秒間染色した後、15分間水道水にて色出しをした。上記の染色が終了した切片を脱水、透徹および封入後、

光学顕微鏡にて観察した。

B-3. 倫理面への配慮

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の保護及び管理に関する法律」(平成17年6月22日公布)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和18年4月28日環境省告示)、「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」(平成18年6月1日日本学術会議)、「厚生労働省の所管する実施機関動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日厚生労働省施行)等に基づき、各研究者所属施設の実験動物委員会等で承認された方法で行った。具体的には、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け、必要最低限の頭数で目的を達成するように努めた。

研究に使用されるヒト組織は、厚生労働省の指針に沿って、臨床応用に適さない場合の研究目的の使用に関して「屍体からのヒト組織採取・保存・利用に関する取扱基準」に従い、組織提供の差異の説明(インフォームドコンセント)により文書での同意を得ることで、各研究者所属施設の倫理委員会等の承認を得た。さらに、提供時に「医学的問題で移植に使用することが出来ない組織は、組織移植医療推進のための教育・研究に用いられることを併せて承認します」とされている組織について、日本組織移植学会の「ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン」(平成18年7月29日改訂)に沿って、倫理委員会の承認を得て、使用した。

C. 研究結果

C-1. 循環器系組織

脱細胞化血管(ラット皮下埋入実験(細胞浸潤検討)): 脱細胞化大動脈では、細胞はECM線維間への浸潤は少なく、組織周囲に多くの細胞が集積していた。また、大動脈特有の線維組織の層構造が各所で分断され、このことよりECM線維の破壊が生じていると考えられ、破壊された部位から細胞が内部に浸潤していた。血管新生は組織の周囲に多く生じ、組織内部ではあまり観察されなかった。 α -SMA、ビメンチン、CD68で移植組織を免疫染色し、移植組織内の平滑筋細胞、繊維芽細胞、マクロファージの観察を行った。ECM内に存在している細胞はほとんどが線維芽細胞であった。ほぼ同じ分布でマクロファージも観察された。

平滑筋細胞は血管新生部位にのみ存在していた。

脱細胞化血管 (ラット皮下埋入実験 (石灰化検討)) : 移植実験で石灰化形成を評価した結果、移植 1 ヶ月後において、培地群では、洗浄 14 日/DNase 0~4unit/mL で石灰化が確認されたが、Saline では石灰化は確認されなかった。

さらに詳細に検討するために、移植 3 ヶ月後のサンプルを取り出し、それら自身の CT 像を高解像条件下で測定しさらに骨円量も定量した。その結果、培地群では、DNase の濃度に関係なく、激しい石灰化が確認された。生理食塩群では、洗浄 14 日/DNase 40~400unit/mL で若干の石灰化が確認されたものの、石灰化は大きく抑制されることが明らかとなった。

Ca 沈着の評価を Von Kossa 染色を用いて行ったところ培地群では全体的に、Ca が沈着しており、生理食塩水群では、洗浄 7 日 DNase 400unit/mL、洗浄 14 日/DNase 400unit/mL で Ca の沈着していることが確認された。

さらに、培地群において洗浄期間が長くなるにつれて石灰化が亢進する傾向が明らかである。現在の所、詳細なメカニズムは明らかでないが、培地中に含まれるカルシウムイオンやリン酸イオンが時間とともに脱細胞組織に吸着 (あるいは結晶化し)、それが核になって、その後の *in vivo* での石灰化を誘発しているのではないかと考えている。

脱細胞化血管 (ミニブタ下行大動脈置換実験) : 6 か月後にグラフトを取り出し、その石灰化の様子を観察した。グラフトは周囲組織と癒着しており注意深く取り出して CT 撮像した。第 1 例では、石灰化は全く認められずその柔軟性も極めて高いものであった。全骨塩量は 0.37mg とほぼ正常組織レベルであった。近位部において内膜肥厚が確認されているが血流は良好であった。第 2 例では内膜肥厚は全く認められていない。一部の箇所では石灰化が認められたので詳細に検討した結果、縫合糸周囲に石灰化が認められた。縫合部での石灰化は頻繁に認められ、吸収性縫合糸の使用が有効かも知れない。

脱エラスチン血管 : 予備的検討として、コーラゲンコーティングを行わずに脱細胞化血管への内皮細胞の播種を検討したが、良好な細胞接着性を示すことがなかった。このため、脱細胞化血管へのコーラゲンコーティングを行った。本研究で用いた脱細胞化血管は、エラスチン線維を除去しているため、弾性特性が低下し、管状構造を維持で

きずに拉げてしまう。そのため、コーラゲンコーティング時および細胞播種時には、脱細胞化血管内に自製のステンレス製スプリング状ステントを挿入することで、管状構造を維持した。

細胞播種するためのアクリルモジュール容器を用いた。脱細胞化血管への回転播種時においては、20 分毎に 90 度回転させることを 2 時間行うことで、細胞を均一に播種することができた。長時間の循環培養は、ガス交換が必要なため、インキュベータ内に回路を設置した。培養液の循環にはローラーポンプを使用し、流量 15ml/min の定常流、全培地量は 300ml とした。循環培養 7 日後の脱細胞化血管内腔面の SEM 像では、内皮細胞が均一に播種されていた。

動物実験に際して、細胞組み込み型の *in vitro* 再生型血管では、あらかじめレシピエントから排除されない細胞を組み込む必要がある。自己細胞の使用が適当であるが、細胞ソースの確保が問題である。血管内皮細胞では、いずれかの部位の血管を摘出して内皮細胞を採取する必要があるが、血管の再生が必要な患者から血管を摘出することは極めて非合理的である。幹細胞の利用が合理的であり、いずれは i P S 細胞の利用が想定されるが、本研究では血管前駆細胞 (E P C 細胞) の利用を試みた。E P C 細胞は、末梢血から低侵襲で採取可能である。残念ながら本年度内では、脱細胞化血管に E P C 細胞を播種し、動物に移植する段階にまでは到達しなかった。

C-2. 角膜組織

細胞接着試験 : 細胞接着試験からは角膜上皮細胞及び角膜実質細胞の良好な初期接着が観察された。その接着は材料表面部に限定されており、両細胞とも材料内への侵潤は認められなかった。角膜上皮細胞については培養後、良好な接着性を示していたが、培養後 3 週間では、材料表面上の接着細胞が若干減少していた。また、接着細胞は材料表面にのみ局在しており材料内部への侵潤は認めなかった。角膜実質細胞は播種後、早期より材料に接着し 3 週間培養後も接着細胞数の減少は認められなかった。接着部位は、角膜上皮細胞と同様に細胞は材料表面にのみ局在しており、材料内部への侵潤は認められなかった。共培養の実験結果は、培養後 24 時間では接着していた角膜上皮細胞および角膜実質細胞がカルチャーコンテナシステムによる環流培養を 3 週間行った結果、材料に生着細胞の存在を確認できなかった。

動物移植実験 (マウス皮下埋入実験) : 超高压脱

細胞化ブタ角膜のマウス皮下への異種異所性移植後 7,14 日の HE 染色結果では、炎症性細胞のリンパ球・好酸球・マクロファージ、非炎症性細胞の線維芽細胞を観察した。移植片周辺へ遊走・浸潤する炎症性細胞は未処理組織では多く、脱細胞化組織では非炎症性細胞が早期から多く見られた。リンパ節サイズの比較では、未処理角膜、脱細胞化角膜の移植後のリンパ節腫は増大していたが、未処理角膜に比べ脱細胞化角膜にてその程度は低いものであった。脱細胞化角膜および未処理角膜を用いて作製した角膜懸濁液を尾静脈注射し、14 日後にそれぞれの脾臓を取り出し、2 次免疫後の脾細胞のチミジン取り込み量を、コントロール脾細胞による取り込み量で除した値を用いて比較した。脱細胞化組織で 2 次免疫をした場合にて、未処理組織によって 2 次免疫した場合に比べて脾細胞の増殖活性が有意に抑えられていた。2 次免疫時の細胞観察では、脱細胞化組織で免疫した脾細胞ではアグリゲーション像は視野あたり 1 群程度であったが、未処理組織で免疫した脾細胞では視野あたりに 2~5 群程度と多く、また 1 群あたりのサイズも大きかった。培養脾細胞中のサイトカイン mRNA 発現量では、未感作脾細胞をコントロールとし、脱細胞化角膜、未処理角膜それぞれにて免疫した脾細胞から抽出されたサイトカイン mRNA 発現量を比較した。両者ともコントロールに比べて発現量が増加し、免疫応答が生じていることがわかったが、脱細胞化組織と未処理組織の有意な差異は認められなかった。

上皮欠損モデル移植:手術を行った 3 検体のうち、術後 6 ヶ月までの肉眼検査で著しい炎症反応を呈さなかった検体は 1 検体のみであった。その検体では、術後 1 週の段階で手術時に切開した部位に強膜部より被移植者の角膜組織 (ホスト角膜) に血管が侵入していったが、術後 3 週の段階では侵入していた血管が消退した。移植を行った眼球では術後 1 週間の段階にて、広域な上皮欠損が認められたが、術後 13 週までには作成した 4mm の上皮欠損部も含め、眼球全域に上皮組織が形成された。また、移植体自体の透明度も、血管の消退および上皮の再生に合わせて回復し、術後 19 週の段階ではほぼ透明化した。組織学的検査からは、上皮のダウングロスまたは α SMA 抗体陽性を示す筋線維芽細胞様細胞や炎症性細胞浸潤などは認められなかった。また、再生した上皮細胞は抗ケラチン抗体に陽性を示し、きわめて正常角膜に近い構造が再生されていた。ただ、外科手術で作成した上皮欠損部上の上皮組織は上皮細胞が

過形成を呈していた。しかしながら、抗 PCNA 抗体を用いた染色から過形成部の上皮組織でも正常上皮組織の増殖像と同じように基底膜に近い部分での細胞のみ増殖している像が認められた。

術後 6 カ月までの肉眼検査において著しい炎症反応が認められた 2 検体のうち 1 検体では術後 1 週の段階より強膜部より侵入してきた血管が移植体内にも侵入し、移植体内に肉芽組織を形成した。形成された肉芽組織は術後 6 カ月を経過しても移植体内に残存していた。こちらの検体でも術後 1 週において広域な上皮欠損が認められたが、術後 11 から 12 週で肉芽組織部分を含め、完全に上皮形成がなされた。肉芽組織の周囲は 12 から 13 週程度で透明化した。肉芽組織が形成された部位は透明化することはなかった。組織学的検査から、移植体内へ血管が進入し、肉芽組織を形成していた部位には抗 α SMA 抗体に陽性反応を示す筋線維芽細胞様細胞や炎症性細胞が浸潤するとともに、著しい移植物の構造の乱れが観察された。しかしながら、移植物の構造が乱れた部位上にも抗ケラチン抗体陽性反応を示す上皮細胞が再生されていた。

残りの 1 検体は、術後の血管の侵入などの外観的に明らかな炎症反応は示さなかった。しかしながら他の検体同様、術後に広域な上皮欠損が確認されるとともに、経時的に移植物の著しい溶解像が観察された。上皮は経時的に再生されたが、屠殺時の術後 8 週までに外科手術で作成された上皮欠損部が上皮細胞で覆われることは無かった。組織学的な検査からは、抗 α SMA 陽性反応を示す筋線維芽細胞様細胞が浸潤し、著しい移植物の構造破壊が生じていた。しかしながら、抗ケラチン抗体陽性反応を示す細胞が外科手術で作成した上皮欠損部に浸潤し手いる部位も認められた。さらに、その細胞たちは抗 PCNA 抗体にも陽性反応を呈し、活発に欠損部上での増殖を行っていた。

D. 考察

米国では凍結保存した同種組織移植が商業化されており、例えば代表的企業であるクライオリフ社 (ジョージア州) では、1 年間に心臓弁を 2,800 個、血管を 3,200 本も出荷している (2003 年度、同社年次報告)。しかしながら、それでも提供数は不足している状態にある。これらの解決のために、異種組織を用いた組織再生に研究が行われている。再生型心臓弁移植では、組織内の細胞成分を界面活性剤にて除去したブタ脱細胞化

肺動脈弁の臨床応用例が、ドイツ・フンボルト大学のグループにて、既に 100 例以上報告されている。しかし、動脈組織での成功例は未だ報告されていない。

我々は、特に動脈組織を対象として脱細胞化循環器系組織の開発を行ってきた。これまでの超高静水圧処理にて脱細胞化処理した心臓弁や血管のミニブタ同種移植実験の結果から、肺動脈組織では優れた成績を認めたものの、大動脈組織では移植後の石灰化を認めた。この原因については未だ詳細には不明であるが、その原因候補の一つとして脱細胞時の処理溶液が挙げられ、その影響について比較的石灰化の起こり易いラット皮下への移植にて検討した。溶液に含まれるカルシウムイオンやリン酸イオンが時間とともに脱細胞組織に吸着（あるいは結晶化し）、それが核になって、その後の *in vivo* での石灰化を誘発していることが示唆された。また、石灰化抑制に有効な処理溶液を見出し、それを元に作成したグラフトは同種ブタ下行大動脈置換実験でも優れた結果を与えた。今後、例数を増加させて、新たな脱細胞血管の有用性を確実なものとしていきたい。

角膜組織については、角膜上皮組織を外科的に欠損させたモデル動物を作成し、上皮組織欠損部直下に脱細胞化角膜を移植し、経時的な組織変化を調査した。高圧印加処理により作成した脱細胞化角膜を移植した家兎では、手術後の経過が検体により大きく異なっていたが、術後 6 か月において正常角膜組織類似構造を再生しえた検体が認められた。

術後、ホスト角膜内への血管侵入は 3 検体中 2 検体で認められ、そのうちの 1 検体では侵入した血管がすぐに消退し、正常角膜類似構造の再生をなしえたが、もう一方の検体においては血管が移植材料にまで達し、材料内に肉芽組織が形成され、6 ヶ月経過しても肉芽組織が本来の角膜組織に回復することは無かった。また、ホスト角膜内への血管侵入を認めなかった 1 検体では著しい材料の破壊が生じ術後 8 週以上の継続観察が困難であった。今回の実験ではステロイド剤点眼を用いて、術後早期の段階での炎症反応の低減を図ったが、炎症反応に起因すると考えられるホスト角膜内への血管侵入を完全には防げなかった。しかしながら、上記の結果から推察するに、ホスト角膜内への炎症反応を完全に防ぐことが術後の回復と必ずしも一致せず、むしろ材料内へ血管が侵入しない軽度の炎症反応は生じたほうが、炎症反応に呼応するサイトカインなどが分泌され、結果とし

て周辺組織や上皮組織の再生が促進された可能性が考えられた。

すべての検体において、術後、手術部位よりも広範囲な上皮組織の欠損が認められたが、外科手術により上皮欠損を作成した部位以外は術後 3 週までには上皮組織が再生した。また、術後 6 ヶ月まで経時的な観察を行った 2 検体では外科手術により作成した上皮欠損部に完全に上皮が再生するまでに 12 から 13 週を要した。上皮組織が手術部位よりも広範囲に欠損した理由としては、今回の手術モデルは手術侵襲が激しく、あわせて、ステロイド剤の点眼による上皮細胞の再生を遅らせてしまった可能性が考えられる。しかしながら、ステロイド剤の点眼を続けていたにも関わらず、術後 12 から 13 週までには抗ケラチン抗体に陽性反応を呈する上皮細胞が完全に再生するとともに、材料の透明性も向上したことから、生体内環境における本材料上での良好な上皮組織再生や角膜実質材料として有用性は示された。

術後にステロイド剤を用いての炎症反応制御を試みたが、実験個体の感受性や手術手技の画一性などの問題も作用し、安定した結果を得ることが困難であった。炎症反応も、完全に押さえ込むよりもいかにして材料部への血管侵入を防ぐかが重要課題であることが明らかになった。今後は、より低侵襲な手術手技での検討や炎症反応の制御についてより検討を重ねる必要があるが、どの検体でも材料上への上皮組織の再生がなされ、且つ 1 検体では正常角膜組織類似構造の再生をなしえた事実は本材料が角膜実質再生材料として非常に有用であることを示している。

E. まとめ

超高圧印加を基盤とした処理方法で脱細胞化した循環器系組織ならびに角膜にて、完全な脱細胞化が達成された。また、動物移植実験からは、炎症を抑え速やかな自己組織化を示した。循環器系においては石灰化抑制が可能な改良型の脱細胞化プロトコールを作成でき、動物実験における改良型脱細胞化循環器系組織の石灰化抑制が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). 岸田晶夫、第 2 章 細胞周辺環境のための材料加工・利用技術 1.材料表面修飾(化学的・

- 生物的)、遺伝子医学MOOK別冊 ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術、90-96、2009
- 2). 岸田晶夫、第12章 再生医療デバイス、バイオテクノロジーシリーズ ヘルスケアとバイオ医療のための先端デバイス機器、131-143、2009
 - 3). S. Sasaki, S. Funamoto, Y. Hashimoto, T. Kimura, T. Honda, S. Hattori, H. Kobayashi, A. Kishida, M. Mochizuki, In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas, *Molecular Vision*, 15, 2022-2028, 2009.
 - 4). K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, Preparation of a collagen/polymer hybrid gel designed for tissue membranes. Part I: Controlling the polymer-collagen cross-linking process using an ethanol/water co-solvent, *Acta Biomaterialia*, 6, 403-408, 2010.
 - 5). K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels, *Acta Biomaterialia*, 6, 409-417, 2010.
 - 6). S. Funamoto, K. Nam, T. Kimura, A. Murakoshi, Y. Hashimoto, K. Niwaya, S. Kitamura, T. Fujisato, A. Kishida, The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials*, 31, 3590-3595, 2010.
 - 7). Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki, T. Honda, S. Hattori, K. Nam, T. Kimura, M. Mochizuki, T. Fujisato, H. Kobayashi, A. Kishida, Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering, *Biomaterials*, 31, 3941-3948, 2010.
 - 8). A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components, *Journal of Artificial Organs*, 12, 111-117 (2009)
 - 9). D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata, In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers, *Biomacromolecules*, 10(2), 237-242 (2009)
 - 10). S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka, Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates, *The Japanese Peptide Society*, 449-450 (2009)
 - 11). S. Kakinoki and T. Yamaoka, Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence, *Acta Biomater*, 6, 1925-1930, 2010
 - 12). A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins, *Tissue Engineering*, in press (2010)
 - 13). T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, T. Moritan, and T. Yamaoka, Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve, *J. Biomater. Sci. Pol. Ed.*, in press (2010)
 - 14). K. Minatoya, H. Ogino, H. Matsuda, H. Sasaki, H. Tanaka, J. Kobayashi, T. Yagihara, S. Kitamura, Is conventional aortic arch surgery justifiable in octogenarians? *J Thor Cardiovasc Sur* 139 (3), 641-645 (2010)
 - 15). H. Matsuda, T. Fukuda, O. Iritani, T. Nakazawa, H. Tanaka, H. Sasaki, K. Minatoya, H. Ogino, Spinal Cord Injury is Not Negligible after TEVAR for Lower Descending Aorta, *Eur. J Vasc Endovasc Sur*, 39 (2), 179-186 (2010)
 - 16). H. Morisaki, K. Akutsu, H. Ogino, N. Kondo, I. Yamanaka, Y. Tsutsumi, T. Yoshimuta, T. Morisaki, Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD)., *Hum mutat*, 30 (10), 1406-1411 (2009)
 - 17). H. Tanaka, H. Ogino, H. Matsuda, K. Minatoya, N. Sasaki, Long-term outcome of aortic valve sparing procedures in connective tissue disorders, *Jap J Thor Sur*, 62 (11), 978-981 (2009)
 - 18). Y. Kataoka, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, M. Higashi, I. Morii, A. Kawamura, H. Ishibashi-Ueda, Y. Otsuka, Oppression of left main trunk due to pseudoaneurysm with graft detachment in patients with behcet disease previously treated by bentall procedure, *Circulation* 119 (21), 2858-2859 (2009)
 - 19). M. Tochii, H. Ogino, H. Matsuda, K. Minatoya,

- H. Sasaki, S. Kitamura, Is prompt surgical treatment of an abdominal aortic aneurysm justified for someone in their eighties?, *Ann Thor Cardiovasc Sur*, 15 (1), 23-30 (2009).
- 20). 藤里俊哉. Tissue Engineeringによる心臓弁. *Circulation Up-to-Date*. 2009; 4(4): 470-8.
 - 21). 藤里俊哉. バイオメカニクス. *人工臓器*. 2009; 38 (3): 162-4.
2. 学会発表
- 1). Shuji Sasaki, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Takako Honda, Shinya Hattori, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, Manabu Mochizuki, Novel Scaffold for Artificial Cornea Prepared by Decellularization of Cornea Using Ultra-high Hydrostatical Pressurization Treatment, ARVO 2009 Annual Meeting, 2009
 - 2). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, Construction of a Collagen Matrix Designed for Regeneration of Physical and Biological Property of Native ECM, 8th international Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers-FBPS2009 Program and Abstract Book, O40, 2009
 - 3). Tomo EHASHI, Tetsuji YAMAOKA, Different Host Responses To Hydrophobic or Hydrophilic Scaffolds For Tissue Engineering, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S51, 2009
 - 4). Jun Negishi, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Tetsuya Higami, Akio Kishida, Preparation and Evaluation of Acellular Small-diameter Vessel from Porcine Carotid Decellularized by Ultra High Pressure Method, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S100, 2009
 - 5). Yusuke Ago, Seiichi Funamoto, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Akio Kishida, Capillary Network Tissue Engineering Using Decellularized Rat Liver Bioscaffold, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S100, 2009
 - 6). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida, Engineering Collagen Matrix to Regenerate Similar Physical and Biological Property of Native ECM, TERMIS 2nd World Congress Abstract, S277, 2009
 - 7). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and Characterization of Collagen/Phospholipid Polymer Hybrid Gel Designed for Artificial Cornea, 22nd European Conference on Biomaterials (ESB) The annual conference of the European Society for Biomaterials Abstract CD, P1, 2009
 - 8). Tomo EHASHI, Tetsuji YAMAOKA, Analysis of Host Response against Different Surface Materials for Tissue Regeneration, 国際シンポジウム "Immune Regulation: Present and Future", 87, 2009
 - 9). Sachiro Kakinoki, Sho Uchida, Tomo Ehashi, Akira Murakami and Tetsuji Yamaoka, Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat, 第46回ペプチド討論会, 158, 2009
 - 10). 江橋 具、西垣戸麻美、森反俊幸、藤里俊哉、山岡哲二, 脱細胞化神経を用いた損傷神経の再生, *生体医工学*, 47(Supp 1), 126, 2009
 - 11). 江橋 具、佐合 満、森反俊幸、湊谷健司、岸田晶夫、藤里俊哉、山岡哲二、北村惣一郎, 石灰化軽減を目指した脱細胞化血管作製法の改良, *生体医工学*, 47(Supp 1), 261, 2009
 - 12). 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 藤里俊哉, 樋上哲哉, 岸田晶夫, 脱細胞化技術を用いた小口径血管グラフトの模索, 第48回日本生体医工学会大会, *生体医工学*, 47(Supp 1), 262, 2009
 - 13). 近藤英雄, 寺田堂彦, 山崎健一、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を利用した動脈組織の脱細胞度推定の試み *生体医工学*, 47(Supp 1), 289, 2009
 - 14). 南広祐, 木村剛, 船本誠一, 岸田晶夫, 生体組織類似構造を有するコラーゲン構造体の作製と物理的及び生物学的特性検討, 第38回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 57-58, 2009
 - 15). 服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村剛, 佐々木秀次, 望月学, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊, 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の有用性, 第38回医用高分子シンポジウム講演要旨集, 59-60, 2009
 - 16). 服部晋也, 船本誠一, 橋本良秀, 木村剛, 佐々木秀次, 望月肇, 本田貴子, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 小林尚俊, 高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の臨床応用に向けた試み, *Polymer Preprints, Japan*, 58(2), 4866, 2009
 - 17). 木村剛, 橋本良秀, 船本誠一, 南広祐, 藤里

- 俊哉, 小林尚俊, 岸田晶夫, 種々の超高压脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析, *Polymer Preprints, Japan*, 58(2), 4874, 2009
- 18). 南広祐, 船本誠一, 木村剛, 岸田晶夫, 生体組織の特性を有するコラーゲンマトリクスの創製, *Polymer Preprints, Japan*, 58(2), 5062-5063, 2009
 - 19). 小林尚俊, 服部晋也, 本田貴子, 船本誠一, 佐々木秀次, 橋本良秀, 藤里俊哉, 寺田堂彦, 木村剛, 望月豊, 岸田晶夫, 高分子ナノファイバーを基盤とした角膜実質再生用足場材料, *Polymer Preprints, Japan*, 58(2), 5088-8089, 2009
 - 20). 岸田晶夫, 脱細胞化組織等の生態由来人工臓器の基礎と現状について, *人工臓器*, 38(2), S-59, 2009
 - 21). 湊谷謙司, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 山岡哲二. 界面活性剤フリーの脱細胞弁・血管の臨床化に向けて, *人工臓器*, 38(2), S-59, 2009
 - 22). 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 藤里俊哉, 樋上哲哉, 岸田晶夫, 脱細胞化口径人工血管の調製, *人工臓器*, 38(2), S-95, 2009
 - 23). 江橋 具, 白井 航, 多嶋佑介, 神村共住, 山岡哲二, パターン化された有孔材料に対する生体応答の解析, *人工臓器*, 38(2), S-106, 2009
 - 24). 橋本良秀, 船本誠一, 佐々木秀次, 望月学, 南広祐, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫, 脱細胞化角膜実質を用いた再生型人工角膜の開発と機能評価, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 263, 2009
 - 25). 江橋 具, 竹村太郎, 箕輪貴司, 花方信孝, 小林尚俊, 山岡哲二, スキャフォールド材料に対する生体応答の遺伝子網羅的解析, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 274, 2009
 - 26). 田中聖也, 柿木佐知朗, 藤里俊哉, 山岡哲二. β -シート形成性インジェクタブルハイドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 325, 2009
 - 27). 山口晴加, 鈴木彩香, 佐合 満, 朝本康太, 江橋 具, 森反俊幸, 藤里俊哉, 山岡哲二. 脱細胞大動脈に対する石灰化反応の経時的低侵襲評価, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 374, 2009
 - 28). 鈴木彩香, 山口春加, 江橋 具, 森反俊幸, 岸田晶夫, 藤里俊哉, 山岡哲二. 血管組織の脱細胞操作における不要タンパク成分の除去, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 377, 2009
 - 29). 根岸淳, 木村剛, 南広祐, 藤里俊哉, 岸田晶夫, ヘパリン含有 PVA 人工血管の創製, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 381, 2009
 - 30). 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 樋上哲哉, 岸田晶夫, 小口径脱細胞化血管の作製と *in vitro/vivo* 評価, *再生医療*, 9(Suppl), 175, 2010
 - 31). 山岡哲二, 湊谷謙司, 田中裕史, 山口晴加, 黒川理世, 森反俊幸, 中谷武嗣, 藤里俊哉. 脱細胞化血管に対する石灰化評価とその抑制法, *再生医療*, 9(Suppl), 175, 2010
 - 32). 橋本良秀, 佐々木秀次, 船本誠一, 望月学, 本田貴子, 南広祐, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫, 脱細胞化角膜実質移植による角膜再生の試み, *再生医療*, 9(Suppl), 242, 2010
 - 33). 黒川理世, 寺田堂彦, 山岡哲二, 藤里俊哉. 脱細胞血管の *in vitro* での内皮化, *再生医療*, 9(Suppl), 311, 2010
 - 34). 船本誠一, 西岡 宏, 吉田謙一, 菊池正博, 小林泰彦, 藤里俊哉, 山岡哲二, 岸田晶夫. γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理と移植評価, 第 13 回日本異種移植研究会プログラム・抄録集, 12, 2010
 - 35). 藤里俊哉, クラウン系ミニブタを用いた血管・心臓弁再生の試み, 鹿児島大学発 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト抄録集, 15, 2010
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

循環器系再生型組織の作製

分担研究者 藤里俊哉
大阪工業大学工学部教授

研究要旨 昨年度まで、超高压処理による脱細胞化と酵素処理によるエラスチン線維除去を組み合わせることによって作製した再生型脱細胞化血管の長期大動物移植実験を行ってきたが、ブタ下行大動脈を用いた同所性移植結果では、無視できない石灰化を経験した。世界的にはスキヤフォールドに細胞を組み込んだin vivo再生型の研究例が多いことから、本年度は、脱細胞化血管への細胞組込について検討した。

A. 研究目的

我が国では年間約1万件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁として、パイロライトカーボンを用いた機械弁あるいはブタ由来の生体弁が使用される。機械弁は抗凝固が必要であり、生体弁はグルタルアルデヒドで細胞および細胞間マトリックスを架橋処理することによって抗原性を減弱しているものの、残存している細胞片や異種抗原が石灰化を誘発すると考えられている。機械弁はもとより、生体弁も前述の架橋処理によってレシピエントの生体反応による分解を阻止しているため、いずれも”非生体”であり、レシピエントの組織に置換されることはない。一方、我が国では極めて数少ないものの、世界的には凍結保存同種弁（ホモグラフト）も数多く使用されている。ホモグラフトは他家組織であるが架橋等の化学処理は行われておらず、部分的にはレシピエント組織の浸潤が期待される。しかし、抗原性や凍結保存時の組織損傷による劣化や石灰化が指摘されており、長期的な成績では生体弁より少し良い程度ではないかと思われる。これらに対し、再生型心臓弁では、レシピエント細胞の浸潤によるリモデリングと再生を経て、いずれ組織全体が完全に自己化されることを目論んでいる。

組織工学による再生医療では、“細胞”、“増殖因子”、“足場”が三要素とされるが、心臓弁や大動脈などではコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスが力学的特性を担ってお

り、特に足場が重要である。再生型弁の足場としては、脱細胞化組織あるいは生体吸収性材料が使用される。脱細胞化組織は、同種あるいは異種心臓弁から細胞成分を除去するものであり、形状を作成する必要がなく、力学特性も比較的保存されるという優位点がある。また、脱細胞化組織では架橋処理を行わず、ドナー細胞成分を除去することによって抗原性を除去するとともにドナー組織の分解性を保持するため、レシピエントによる完全な自己化を達成することができる。多くの場合、細胞成分の除去は、界面活性剤や酵素、低張液を組み合わせることで行われる。界面活性剤にはSDS（sodium dodecylsulfate）やTriton X-100、デオキシコール酸ナトリウムなどが、酵素にはトリプシンやDNase、RNaseなどが用いられる。どの処理剤が最適かについては様々な報告があるが、様々なグループが個々のレシピを使用しているのが現状である。界面活性剤は細胞毒性を有するので、その除去は重要である。

我々は、界面活性剤を用いない脱細胞化処理法について検討を重ね、超高压印加法と酵素による脱エラスチン線維法を開発している。昨年度までに、これらの処理法を組み合わせ、ミニブタ下行大動脈に同所性に移植した結果を報告した。しかしながら、無視できない石灰化を認め、明確な原因は不明であった。本年度は、石灰化の低減を図るため、他のグループが検討しているような、細

胞を播種した再生型組織の作成を行った。

B. 研究方法

脱細胞化処理：食用ブタ（東京芝浦臓器）の胸部大動脈を使用した。脱細胞化方法は、昨年度行ったエラスターゼ消化法を用いた。胸部大動脈を24時間凍結乾燥させた後、120℃真空中で熱架橋した。熱架橋後、エラスターゼ処理溶液（pH8 0.01M Tris buffer, 0.15 mg/ml Elastase, 10 mM CaCl₂, 0.02 % NaN₃）を用い、回転型シェーカー上で72時間処理しエラスチン繊維を分解した。エラスターゼ処理後に、エラスポール100mgに生理食塩水を10ml加えて粉末をよく溶かした後、2.5mlをpH8 0.01M Tris-buffer 50mlに加えて作製したエラスポール溶液に、胸部大動脈を4℃下で72時間浸してエラスターゼの活性を失活化させた。その後、80%エタノール内に72時間浸すことでリン脂質を除去した。

細胞播種：あらかじめ脱細胞化血管をI型コラーゲンゲル（新田ゼラチン）でコーティング処理した後、市販のブタ大動脈内皮細胞を播種した。脱細胞化血管をアクリルモジュール容器内に入れた後、内皮細胞懸濁液を容器内に満たし、回転播種した。その後、ローラーポンプを用いた循環培養を行った。

血管前駆細胞単離：クラウン系ミニブタ（ジャパンファーム、体重70Kg）から血液150mlを採取した。Ficollを用いた密度勾配遠沈法にて35分間遠沈し、中間の白色層を回収した。洗浄精製後、フィブロネクチンをコートした培養ディッシュで培養し、接着細胞を回収した。

（倫理面への配慮）

動物実験における動物愛護上の配慮は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成17年6月22日公布）及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示）、実験動物の適正な実施に向けたガイドライン（平成18年6月1日日本学術会議）等に基づき、当施設の実験動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、上記法律及び基準に則った国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成す

るように努めた。

C. 研究結果

予備的検討として、コラーゲンコーティングを行わずに脱細胞化血管への内皮細胞の播種を検討したが、良好な細胞接着性を示すことがなかった。このため、脱細胞化血管へのコラーゲンコーティングを行った。本研究で用いた脱細胞化血管は、エラスチン繊維を除去しているため、弾性特性が低下し、管状構造を維持できずに拉げてしまう。そのため、コラーゲンコーティング時および細胞播種時には、脱細胞化血管内に自製のステンレス製スプリング状ステントを挿入することで、管状構造を維持した。図1に、脱細胞化血管へのコラーゲンコート時の様子を示した。

図2に、細胞播種するためのアクリルモジュール容器と循環培養のための回路を示した。脱細胞化血管への回転播種時には、20分毎に90度回転させることを2時間行うことで、細胞を均一に播種することができた。長時間の循環培養は、ガス交換が必要なため、インキュベータ内に回路を設置した。培養液の循環にはローラーポンプを使用し、流量15ml/minの定常流、全培地量は300mlとした。図3に、循環培養7日後の脱細胞化血管内腔面のSEM像を示した。内皮細胞が均一に播種されていた。

動物実験に際して、細胞組み込み型のin vitro 再生型血管では、あらかじめレシピエントから排除されない細胞を組み込む必要がある。自己細胞の使用が適当であるが、細胞ソースの確保が問題である。血管内皮細胞では、いずれかの部位の血管を摘出して内皮細胞を採取する必要があるが、血管の再生が必要な患者から血管を摘出することは極めて非合理的である。幹細胞の利用が合理的であり、いずれはiPS細胞の利用が想定されるが、本研究では血管前駆細胞（EPC細胞）の利用を試みた。EPC細胞は、末梢血から低侵襲で採取可能である。図4に、採取したEPC細胞を示した。残念ながら本年度内では、脱細胞化血管にEPC細胞を播種し、動物に移植する段階にまでは到達しなかった。

D. 考察

昨年、米国CryoLife社は、ヒト組織を脱細胞化した再生型肺動脈弁であるCryoValve SGについ

て、FDAの認可を得た。脱細胞化には低張液と酵素の組み合わせを使用している。成人ロス手術での肺動脈弁移植23例における4年間のフォローアップでは、徐々に圧較差が上昇したもののホモグラフトと比較して有意差はなかったと報告されている。一方、独ベルリン医大のKonertzらは、脱細胞化したブタあるいはヒト肺動脈弁に、前もって伏在静脈から採取した自己内皮細胞を播種し、ロス手術での肺動脈弁移植に用いている。脱細胞化には界面活性剤を使用している。2000年から行われた23例の5年間の中期成績では、再手術1例、死亡1例を除く21例について、正常な弁機能を報告している。また、移植後6年の患者から血管壁の一部を採取し、内腔面が内皮細胞層に覆われていることと血管壁深部までの自己細胞化を報告している。

報告を見る限りでは、移植前に患者細胞を播種する必要があるのかないのかは明確な結論が得られていないが、細胞を播種しているグループの方が多くに思われる。広く扱われる製品とするためには細胞を播種しないin vivo再生型の方が適していると考えられるが、長期成績を左右するのであれば、in vitro再生型もやむを得ないと考える。昨年度までの動物実験における石灰化などの問題点を解決するためには、脱細胞化方法のさらなる改良と、in vitro再生型の検討が考えられた。本報告では、in vitro再生型について検討したが、残念ながら動物移植実験でその効果を検証するまでには至らなかった。

E. 結論

循環器系脱細胞化組織における移植後の石灰化の抑制を目的として、細胞を組み込んだin vitro再生型の検討を行った。脱細胞化血管にコラーゲンゲルをコーティングし、循環培養することで、血管内皮細胞を均一に播種することが可能であった。幹細胞を利用することで、低侵襲に細胞を採取し、in vitro再生型組織移植が可能となることが示唆された。

研究協力者

湊谷謙司 国立循環器病センター
心臓血管外科医長

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 藤里俊哉. Tissue Engineeringによる心臓弁. Circulation Up-to-Date. 2009; 4(4): 470-8.
 - 2) 藤里俊哉. バイオメカニクス. 人工臓器. 2009; 38 (3): 162-4.
 - 3) Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. Biomaterials. 2010; 31: 3590-5.
2. 学会発表
 - 1) 江橋 具、佐合 満、森反俊幸、湊谷健司、岸田晶夫、藤里俊哉、山岡哲二、北村惣一郎. 石灰化軽減を目指した脱細胞化血管作製法の改良. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23~25日
 - 2) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫. 脱細胞化技術を用いた小口径血管グラフトの模索. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23~25日
 - 3) 近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を利用した動脈組織の脱細胞度推定の試み. 第48回日本生体医工学会、東京、2009年4月23~25日
 - 4) Negishi J, Funamoto S, Kimura T, Fujisato T, Higami T, Kishida A. Preparation and Evaluation of Acellular Small-Diameter Vessel from Porcine Carotid Decellularized by Ultra High Pressure Method. 2nd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Seoul, Republic of Korea, Aug 31-Sep 3, 2009
 - 5) 木村 剛、橋本良秀、船本誠一、南広祐、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫. 種々の超高压脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析. 第58回高分子討論会、熊本、2009年9月16~18日
 - 6) 湊谷謙司、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二. 界面活性剤フリーの脱細胞弁・血管の臨床化に向けて. 第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月12~14日
 - 7) 根岸 淳、船本誠一、木村 剛、藤里俊哉、樋上哲哉、岸田晶夫. 脱細胞化口径人工血管の調製. 第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月12~14日
 - 8) 田中聖也、柿木佐知朗、藤里俊哉、山岡哲二. β -シート形成性インジェクタブルハイドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動. 第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16~17日
 - 9) 鈴木彩香、山口春加、江橋 具、森反俊幸、

- 10) 山口晴加、鈴木彩香、佐合 満、朝本康太、江橋 具、森反俊幸、藤里俊哉、山岡哲二. 脱細胞大動脈に対する石灰化反応の経時的低侵襲評価. 第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16～17日
- 11) 藤里俊哉. クラウン系ミニブタを用いた血管・心臓弁再生の試み. 鹿児島大学発 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト 第1回公開シンポジウム、鹿児島、2010年2月23日
- 12) 山岡哲二、湊谷謙司、田中裕史、山口晴加、黒川理世、森反俊幸、中谷武嗣、藤里俊哉. 脱細胞化血管に対する石灰化評価とその抑制法. 第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
- 13) 黒川理世、寺田堂彦、山岡哲二、藤里俊哉. 脱細胞血管のin vitroでの内皮化. 第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月18～19日
- 14) 船本誠一、西岡 宏、吉田謙一、菊池正博、小林泰彦、藤里俊哉、山岡哲二、岸田晶夫. γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理と移植評価. 第13回日本異種移植研究会、東京、2010年3月14日

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

なし

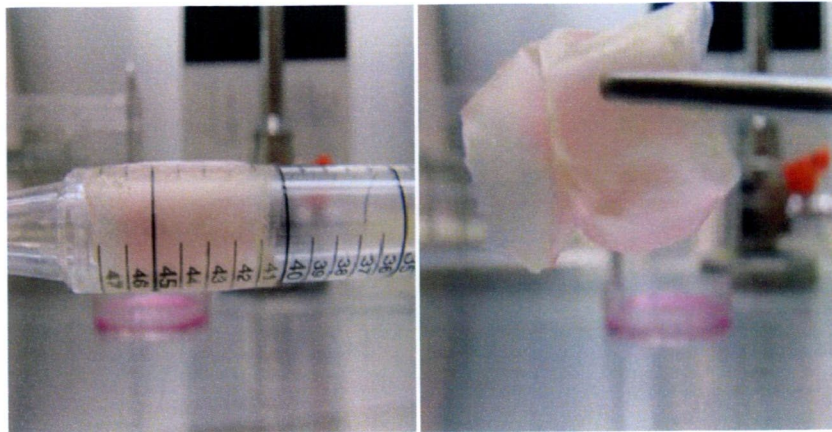


図1. 脱細胞化血管へのコラーゲンコーティング

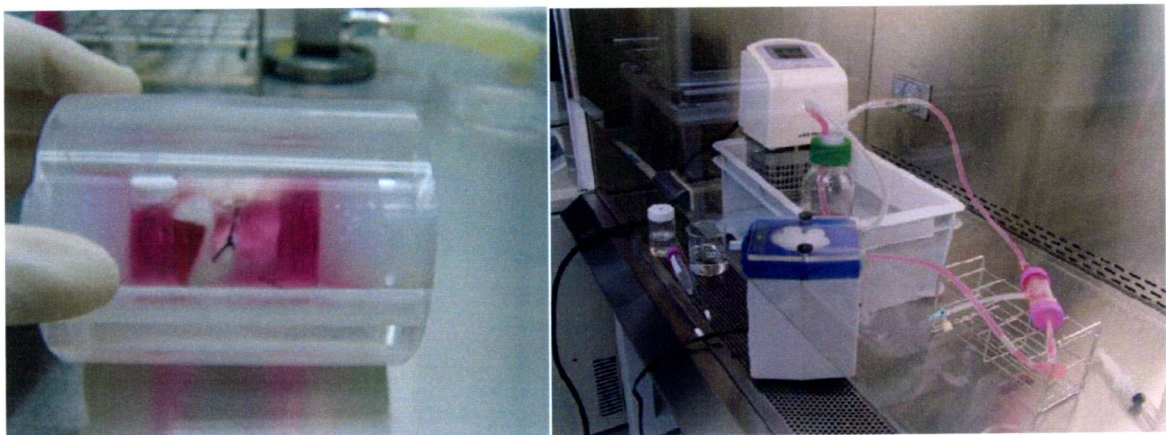


図2. 脱細胞化血管への細胞播種 (左: 回転播種用アクリルモジュール、右: 循環培養)

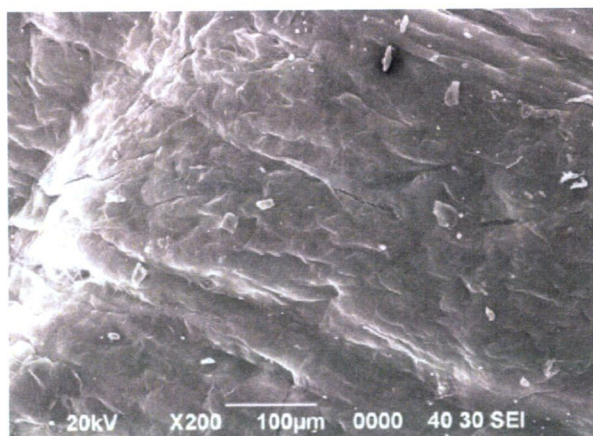


図3. 播種された内皮細胞

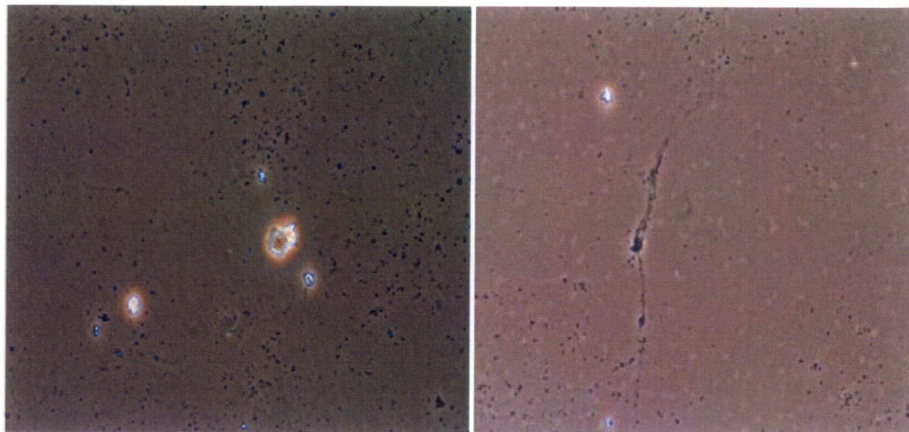


図4. 採取したミニブタ血管前駆細胞

循環器系再生型組織の in vitro 評価に関する研究

分担研究者 山岡 哲二

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部長

研究要旨 脱細胞化循環器系組織への機能分子の複合化を目的に、超高压印加法にて調製したヘパリン含有 PVA ゲルの人工血管としての応用可能性に関して検討した。超高压印加法を用いることで、ヘパリンが均一に分散したヘパリン含有 PVA ゲルが得られた。また、人工血管として用いるため、ダクロン繊維で補強することで生体組織に類似した力学強度を示した。ヘパリン含有 PVA ゲル人工血管から溶出したヘパリンの活性維持が確認され、これにより動物への移植実験ける良好な成績が得られた。ヘパリン含有 PVA ゲルの人工血管としての可能性と脱細胞化循環器系組織への機能分子の複合化の可能性が示唆された。

A. 研究目的

循環器系疾患の代表的な治療法に血管修復術があり、冠動脈バイパス術は年間約 2 万件実施されている（米国では 50 万件）。現在血管修復術に用いられている代替血管には、異所性の自家血管、同種血管および合成人工血管である。

最も一般的に行われているのは自家血管の代替である。自家血管は、免疫系を活性化せずに高い開存性を示す特徴をもち、現在、自家内胸動脈、自家静脈が多く用いられている。しかし、自家血管にはサイズ、数の適用制限がある。同種血管は比較的感染に耐性があり、血栓塞栓性合併症が最小限に抑えられ、抗凝固処理を必要としない。同種血管としては、同種静脈グラフト、ヒト臍帯静脈がよく使用され、自家細胞を静脈に播種する方法も検討されている。しかし、石灰化、動脈瘤膨張、耐久性、提供不足が問題である。免疫抑制剤を用いた炎症反応と血栓形成の抑制により、開存性を保つことが問題として残っている。

合成高分子人工血管は、1952 年にボーヒースらが VinylonN を用いて初めて臨床での人工血管移植を行って以来、種々の合成高分子人工血管が開発されている。現在では、ePTFE の布製人工血管が用いられ、大中小口径血管の開存性、耐久性に関しては、臨床レベルでほぼ満足できる状況にある。しかし、小口径においては、自家血管を越える人工血管は開発に至っておらず、また、内膜肥厚、長期埋入による石灰化、劣化、再狭窄の発症、長

期耐久性不足、および小口径部位での早期の塞栓形成等がいずれの口径においても大きな問題として残っている。

これらの問題に対して、近年では、再生医療技術による人工血管の開発が検討されている。上述の既製の合成高分子人工血管を用いる非分解性人工血管によるアプローチと、分解性材料を細胞足場（スキヤホールド）として細胞浸潤により血管を再構築する再生型人工血管によるアプローチに大別できる。前者は、人工血管への自家細胞の播種や体内への埋入による偽内膜形成化人工血管が検討されるが、現在の研究開発の主流は、後者の再生型人工血管である。使用される分解性材料では、ポリグリコール酸（PGA）、ポリジオキサン、ポリラクチドが生体吸収性材料として FDA（Food and Drug Administration）に認可されている。PGA は最も一般的に使用されている生分解性ポリマーであり、高い空隙率を持つために栄養の拡散、血管新生を容易にし、さまざまな形状に操作することが可能だという長所がある。PGA の欠点は 6~8 週間の早さで生体に吸収されてしまうことと組織の圧力に耐えられないことが挙げられる。これらの欠点克服を目的としてポリヒドロキシアルカノエート（PHA）、ポリ-4-ヒドロキシ酪酸塩（P4HB）、ポリ-L-乳酸（PLLA）、ポリエチレングリコール（PEG）などが共重合体として用いられている。生分解性材料を用いた人工血管の最初の臨床応用は Shin'oka らによって 2001 年