

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
戦略的イノベーション創出推進プログラム(S-イノベ)
研究開発テーマ「革新的医療を実現するためのバイオ機能材料の創製」
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 細胞の三次元配置技術に基づいた小口径脱細胞血管等組織再生材料の創成
(英語) Development and in vivo evaluation of small-diameter acellular blood vessels
研究開発実施期間: 平成24年11月20日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山岡 哲二
(英語) Tetsuji Yamaoka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人国立循環器病研究センター・生体医工学部・部長
(英語) Director, Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center
Research Institute

II 研究開発の概要

本プロジェクトでは内径2-3mmのダチョウ頸動脈由来脱細胞化小口径血管の臨床化を目指してきた。平成31年4月から令和4年3月までの第Ⅲステージでは、ファーストインヒューマン(FIH)試験スタートが可能となる非臨床POCを確立した。第Ⅱステージまで非臨床研究グループにより進めてきた小口径血管の有効性(開存率)にもとづいて、第Ⅲステージでは、①可能な限りファーストインヒューマン(FIH)試験に類似した状況のミニブタ等大動物実験への移植系を用いて臨床医により実施し、臨床で想定されるイベントや可能性がある対応策を検討し、②株式会社ジェイエムエスと協力してPMDA対面助言に向けた製品仕様の確定と各安全性試験を完了し、③効率的かつ適切な臨床試験デザインのため小口径血管臨床家研究会を通しての臨床家からの意見聴取と臨床デザインの確定を進めた。COVID-19禍の影響により、全期間の半分程度で、術者の移動に関するなんらかの制限がかかる状況であったが、令和3年度には50例以上の移植実験が可能となり有用な知見が多く得られた。各サイトにおける本年度研究開発の概要および代表的な具体的研究成果を以下に記載する。

【国立循環器病研究センター概要】本プロジェクト第Ⅰおよび第Ⅱステージにおいて、脱細胞化小口径血管の大動物への移植を多く実施してその有効性を実証してきた。臨床ターゲットとしている下肢救済に類似した大動物実験系は存在しないなかで、様々な移植実験によってその有効性を証明することが出来た。まず、抗血栓性に関して、内腔修飾に用いたペプチドリガンド分子が抗血栓性を発揮して分～時間のオーダーの超初期に優れた抗血栓性を発揮した。さらに、このペプチドリガンドは末梢血循環細胞を捕捉し、ミニブタ大腿動脈-大腿動脈交差バイパスとして移植した長さ30cmの血管内腔が1日程度で全長にわたって細胞に覆われて数日で

内膜様の組織再生を誘導することで初期における高い開存性を発揮することを実証した。その後、中長期（移植後3～4ヶ月）の開存率を検証した結果、術中以外は抗凝固処置をすることなく、ヤギ正中動脈置換（N=4）において75%、ミニブタ大腿動脈置換（N=20）において64%とFIH試験に向けた有効性の目標値を達成することができた。第Ⅲステージでは、FIH試験を担当する予定の医師らへ移植グループに迎えて、移植手技の確認と臨床の場で想定される事象の洗い出しと考えられる対応策の可能性を検証した。後に述べる動脈再建に類似する大動物移植モデルにおいて以下の要求事項を念頭に評価系の探索を続けた。①ミニブタ等の大動物で実施すること、②血管内径が一致する（あるいは近い）こと、③5cm以上の血管が評価できること、④皮弁形成術後の動脈再建術、あるいは、下肢救済術を想定して、近位・遠位側の端々吻合あるいは端側吻合を検討できること、⑤皮弁形成術後の動脈再建術、あるいは、下肢救済術を想定して、皮下などの非解剖学的な血行再建、あるいは、動脈置換術などの同所的な血行再建が評価できることである。新たな選択肢として、第一に左腋窩動脈／左大腿動脈バイパスモデル（血管長は45-55cm）を、第二に内胸動脈置換術、第三に左（あるいは右）大腿動脈から右（あるいは左）大腿動脈への端々吻合バイパス術、第四に頸動脈置換術について検討した。残念ながら、ミニブタにおいて上記の条件を満たす移植部位を見つけるには至らなかった。しかしながら、これらの検討を継続するなかで、令和2年に研究所に大動物実験用CT装置が導入され、CTアンギオグラフィー（CTA）で移植血管の血流断面積の詳細な様子を非侵襲で確認できる環境が整った。その結果、中長期の開存性に最も影響があるのは吻合部狭窄であり、大腿動脈置換では3-6週で血流面積が最も減少し、その後は血流面積が正常域近くに回復して半年以上の経過観察でも異常を認めないことが示された。すなわち、この時期の血流面積の減少を改善させることで、先に示した64%開存率を大幅に向上させられる可能性があることが示された。そこで、血管外組織からのメディケーションの可能性を複数検証し、臨床の場でも利用可能な有用なメディケーションの可能性を見いだすことができ、非臨床試験の開存率の目標値を大きく上回れる可能性が示唆された。これは、FIHを担当する移植グループにとっても非常に大きな所見となった。また、脱細胞化血管に対する炎症による中膜の吸収等を検討したところ、1年移植後の血管壁厚の減少は22%にとどまることも明らかとなり長期化依存性にも期待がもてるものであった。

【株式会社ジェイエムエス概要】 国立循環器病研究センターで開発されたダチョウ頸動脈を原材料とする小口径脱細胞血管を製品化するために、製造工程（原材料、脱細胞工程、ペプチドコーティング工程、包装滅菌工程）の標準化と製品仕様（形状、寸法、物性、不純物など）を進めた。包装シール機を導入して製品の包装設計も完了した。エンドトキシン、残存DNA量、力学試験等を完了した。さらに、生物学的安全性評価として、細胞毒性、感作性、皮内反応、急性全身毒性、慢性全身毒性、遺伝毒性（変異原性、染色体異常）、発熱性、埋植試験、血液適合性（溶血、血栓形成）が必要であり、各毒性試験を完了した。また、現在、大型動物を用いたPOC取得の実験が実施されており、この結果を踏まえて製造方法と製品仕様を確定した。特に、原料となるダチョウ頸動脈の採取・洗浄・トリミング、さらには、脱細胞化処理でのサンプル形状、また、組織の特性に影響しない滅菌法の設定など完了し、これらをもとにPMDA対面助言へ進むこととした。

【株式会社ハイレックスコーポレーション概要】 開発血管の臨床化に向けて、小口径血管実用化研究会を設立した。糖尿病性下肢救済手術のファーストインマン実施の可能性がある施設の調査を行い、協力を得ている3拠点に加えてさらに3拠点程度を集め小口径実用化研究会を設立して、年に2回の研究会を実施する予定である。ステージⅡまでの前臨床研究成果を提示し、各施設での、臨床研究の可能性について討議した。本研究会の活動として、臨床化施設の絞り込みと情報集約を中心に進めた。各施設から、臨床研究（あるいは治験）開始のための非臨床POCデータに関する提案を収集して集約し、それらの取得が可能か、あるいは、統計学的意味を有するかを国立循環器病研究センター循環器病統合情報センター統計解析室の協力のもと解明し、必要であれば、前臨床研究デザインに追加すべく、国立循環器病研究センターおよび株式会社ジェイ・エム・エスに提言した。以上のことを実施するため、24名の臨床家との面談を行い、研究会に賛同していただくこと、ならびに臨床化に向けての、対照疾患のアイデアなどについて情報を集約した。その結果、小口径人工血

管の臨床化に関して臨床医の考えは2つに大別できた。第一は、現在の伏在静脈移植あるいはバルーン治療よりも優れた成績（開存率や非感染率）を期待する立場であり、第二は、現在処置が存在しないアンメットニーズへの適応を考える立場である。これらの臨床医からの意見などを集約して、対照疾患の現実性とリスク、臨床的頻度などを総合的に考えて、京都大学形成外科グループで外傷や腫瘍除去後の前腕皮弁術あるいは腓骨皮弁術後の、ドナーサイトの再建を第一選択すると判断するに至った。

【まとめ】 以上に示したように、小口径血管の有効性（開存性）および、力学強度試験、製品仕様、さらに、GLP 準拠での生物学的安全性試験の非臨床 POC データセットの取得が完了した。FIH 試験としての動脈再建に向けた臨床医チームを確定し、臨床医主導のもとで京都大学の支援のもと臨床プロトコル（一次案）の作製を完了した。上述のメディケーションの有用性を最終検証した後にプロトコル最終案としてプロトコル相談に臨む。

This project aims at the development of decellularized small-diameter blood vessels derived from the ostrich carotid artery. In the 3rd stage of this project, we tried to establish non-clinical POC for utilizing them to the limb salvage with surgeons who are going to be in charge of the first in human trials; (1) evaluation of 3-4 months patency and biological reaction in large animal experiments using miniature pigs, (2) good laboratory practice (GLP) for biological safety for discussing with PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency), (3) Fixing the efficient and appropriate clinical test design.

A large animal transplantation system for evaluating small-diameter long bypass with an inner diameter of about 2 mm similar to the limb salvage in diabetes has not been established so far, which is the final target of our project. We succeeded in rapid regeneration of neointima within a few days after transplantation, even with bypass longer than 25 cm. The detailed regeneration mechanism has been successfully clarified in this stage, indicating that the luminal surface captures not only the targeted blood circulating vascular endothelial progenitor cells but also the other blood cell groups, which allow the very rapid neointima formation.

Manuals for harvesting, washing, trimming, packing (for sterilization), and sterilizing of the ostrich carotid arteries were finalized. Mechanical properties of the blood vessels were totally acceptable as blood vessels, and no endotoxin was detected. In addition, all items in biological safety test were conducted in GLP manner, and 2 items which was suggested by PMDA as additional evaluation were also completed. We conducted a survey of hospitals that may conduct first-in-human trial of our decellularized small-diameter blood vessel in diabetic lower limb rescue surgery. According to the discussion in the Small Diameter Vascular Grafts R/D Group, proposals for non-clinical POC for starting clinical trials should be ensuring the safety and avoiding any risks. Based on this concept, FIH trial group in Department of Plastic and Reconstructive Surgery of Kyoto University has decided reconstruction of the donor site after surgery or peroneal flap surgery to be the first choice for the first-in-human study of the acellular blood vessel. Two clinicians were joined to our group and started to establish a new protocol of non-clinical transplantation of small diameter long bypass to the minipigs. The requirements are (1) the inner diameters of the blood vessels fits to the native vessels, (2) the blood vessels of 5 cm or longer can be transplanted, (3) end-to-end or end-to-side anastomosis at the proximal/distal sides similar to FIH test system, (4) vessels were transplanted to the right site of the native vasculature, and (5) blood flow can be monitored non-invasively by echo and CT angiography. Based on these requirements, (A) axillary-femoral

artery bypass, (B) internal thoracic artery replacement, and (C) carotid artery replacement in miniature pigs or goat were set up in addition to the femorofemoral crossover bypass or femoral artery replacement. Unfortunately, we could not find good transplantation position longer than 5cm.

During this research, CT device for large animal experiments was introduced in our laboratory, and the CT angiography (CTA) confirmed the detailed change of blood flow after graft transplantation non-invasively, which shows that the anastomotic stenosis is the greatest determinant factor for long-term patency. Surprisingly, the blood flow area decreased the most in 3-6 weeks after femoral artery replacement, and it recovers thereafter as time to almost normal range. In other words, it is strongly suggested that the patency of decellularized blood vessels may significantly improve by solving this temporary stenosis during this period. We then evaluated several sorts of medication to suppress it and found an effective method.

In summary, the patency of small-diameter vessels and the acquisition of non-clinical POC datasets in mechanical properties, product specifications, and biosafety testing have been completed. A clinical protocol for FIH was completed with clinicians of Kyoto University.

III 事後評価総合所見

脱細胞ダチョウ血管を用いた生体材料小口径人工血管の開発に、様々な動物モデルを用い、多くの試験を積み上げた結果、医師主導治験の開始が展望できる段階まで進んだことは評価に値する。

一方、今後の実用化にむけて、製品の滅菌条件、ペプチド固定量の規格設定などの製品パラメータの確立が必要と思われる。

現状では、ようやく FIH への入り口に近づいた段階であり、実用化にはまだまだ時間がかかる。再生医療をはじめとする他の技術との競合も考慮し、製品の市場優位性を明確にすることも必要である。

今後は、共同開発企業との連携を強化し、世界初の小口径人工血管の製品化を目指し、それを待ち望む患者へ一日でも早い福音を届けて頂きたい。