

令和元年5月10日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04940

研究課題名(和文)次世代型自家組織由来心臓弁グラフト(バイオバルブ)の開発研究

研究課題名(英文)Development of next-generation type autologous heart valve (biovalve)

研究代表者

武輪 能明 (Takewa, Yoshiaki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：20332405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内組織形成術により作製した組織工学心臓弁(バイオバルブ)を大動物(成ヤギ)に移植し、年単位に渉り組織構造変化と性能を評価した。大動脈根部置換用、経カテーテル的弁移植術用を作製し成ヤギの大動脈や肺動脈に移植し性能を評価した。通常の臨床手技により移植可能であった。術後、機能は良好で、顕著な狭窄や逆流もなく最長で3年8ヶ月を超えても良好に経過した。終了後、血栓形成や石灰化もほとんど無く4週目以降のバイオバルブの結合組織内に細胞侵入が見られ、自己心臓弁に近い組織構造に変化した。生きたグラフトとして生着し成人や小児の弁置換に対して機能的にも耐久性でも有望な人工弁となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた学術的な意義としては、簡便でしかも安価な方法で自己組織からなる人工心臓弁を作製可能であり、しかも良好な機能と抗血栓性を年単位で維持することを、大動物試験で示したことである。さらに、幹細胞を使用しなくても自己弁組織に近い構造に変化し、成長の可能性も期待できることを示したことは、小児の心臓弁置換術に使用する可能性も示したことで社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We are developing a novel tissue-engineered heart valve (biovalve) with a unique in-body tissue engineering. In this study, the feasibility and time-course histological change after implantation were investigated in large animal experiments. Two types of biovalves (a full-root type and a stent valve for transcatheter implantation) were developed. The biovalve consists of completely autologous connective tissues and fibroblasts. The full-root type was implanted in the pulmonary artery, and the stent-valve type was implanted with transcatheter technique into in situ the aorta or the pulmonary artery. Successfully implanted biovalves reached to maximum 43 months. Histological examination showed the autologous cells covering the laminar surface of the valve leaflets and also repopulating into the connective tissues. The biovalves can adapt their histological structure to the environment, and have a potential to be used for viable bioprosthesis.

研究分野：人工臓器

キーワード：心臓弁膜症 人工弁 自家組織 組織工学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

重度の弁膜症に対する弁置換術に用いられる人工弁には機械弁、異種生体弁があるが、機械弁における抗凝固療法の必要性や生体弁の低い耐久性といった問題や、小児においては成長の問題があるため、機械弁、生体弁以外の弁として、以前より自己細胞から成る弁を組織工学的に作成する方法が注目され、最近では生分解性ポリマーに自家細胞播種を組み合わせたハイブリッド型の心臓代用弁が開発され、特に小児の右心系などの低圧系で臨床応用が始められている。しかし、左心系などの高圧系での応用は破裂や瘤化のため困難とされ、高度耐圧性を有した自家組織由来心臓弁の開発が強く望まれている。

これまでの自家組織由来心臓弁は、生体外で組織を作る生体外組織工学(*in vitro* tissue engineering)に基づいている一方、我々は生体に本来備わる治癒能力に着目し、もう一つの再生医療への取り組みとして、生体が有する治癒能力を最大限に引き出して利用する、生体内組織工学(*in vivo* tissue engineering)による生体内組織形成技術(*in body* tissue architecture technology)を提唱した。それは生体外での細胞操作を一切必要とせず、患者自身の体内で自己の組織のみから自分自身のグラフトを短期間に作製できる自己完結型の医療技術であり、これを用いてバイオバルブと名付けた独創的な代用弁を開発するに至った。本研究では、このバイオバルブの性能を評価することを目的とする。

我々はこの技術によりこれまでに、血管系のバイオチューブと心臓弁のバイオバルブを開発した。我々のバイオグラフトは、グラフト自体が自己組織で出来ているだけでなく、移植後組織内に自己の細胞が埋入することが確認されている。

<引用文献>

Takewa Y, Yamanami M, Kishimoto Y, Arakawa M, Kanda K, Matsui Y, Oie T, Ishibashi-Ueda H, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Taenaka Y, Tatsumi E, Nakayama Y. In vivo evaluation of an in-body, tissue-engineered, completely autologous valved conduit (biovalve type VI) as an aortic valve in a goat model. *J Artif Organs*. 2013 Jun;16(2):176-84.

2. 研究の目的

本研究では、心臓血管外科領域の、弁膜疾患および小児先天性心疾患などで、心臓弁および付随する血管壁などの置換手術に使用する人工弁グラフトを、自己組織を用いて作製し、現行の人工弁で生じている血栓症や耐久性などの問題を克服する心臓弁を開発することを目的とする。我々は人工物を体内に留置した際に起こる結合組織によるカプセル化反応を組織工学に応用し、皮下などの体内を組織構築の場(バイオリアクター)にして自己組織からなるグラフトを作製するという新しい生体内組織形成技術(*In body* tissue architecture technology)を開発している。本研究ではこの技術を用いて作製した人工弁(バイオバルブ)が臨床使用に耐えうる性能を有するのか大動物実験を用いて評価すると共に、生きたグラフトとして体内に生着し、ひいては成長する作用まで持つかどうか調査することを目的とする。

3. 研究の方法

計画全体としては、われわれが開発した自己組織由来心血管グラフト(バイオバルブ)の中で、通常の開心術用人工弁、大動脈根部全置換術に使用可能な Full root type、それに経カテーテル的挿入術に使用可能なステント付き人工弁(バイオバルブステント)について、基本性能(人工弁の耐久性、抗血栓性、流体力学的性能)および長期性能の検討を行った。また、小児へのバイオバルブ及びバイオチューブの応用を想定した、成長性の検討も並行して行った。平成27年度から28年度にかけて、(1)バイオバルブステントの大動物を用いた、長期性能評価(2)通常の開心術用人工弁の大動物を用いた、急性実験による基本性能および長期性能評価、(3)ヤギ成長モデルを用いたバイオチューブの成長性の検討を行った。平成29年度から30年度にかけて(1)(2)(3)をさらに進展させると共に、(4) Full root type の大動物を用いた、急性実験による基本性能評価および長期性能評価、さらに(5)ヤギ成長モデルを用いたバイオバルブの成長性の検討を行った。

4. 研究成果

われわれが開発した自己組織由来心血管グラフト(バイオバルブ)の中で、通常の開心術用人工弁、大動脈根部全置換術に使用可能な Full root type、それに経カテーテル的挿入術に使用可能なステント付き人工弁(バイオバルブステント)について、基本性能(人工弁の耐久性、抗血栓性、流体力学的性能)および長期性能の検討を行った。その結果急性実験にて、いずれのタイプのバイオバルブも生体元々の弁に比べて同等以上の耐久性、流体力学的性能を示した。また、慢性実験による長期性能評価でも、良好な抗血栓性と耐久性を示した。また、小児へのバイオバルブ及びバイオチューブの応用を想定した、成長性の検討もヤギ成長モデルを用いて行った。その結果、体幹の成長に応じてバイオチューブも成長する傾向が見られ、バイタルグラフトとして機能する可能性が示された。

(1) バイオバルブステントの大動物を用いた長期性能評価

成ヤギを麻酔下、手術的にバイオバルブ作製用鋳型に金属ステントを組み込んだもの複数個皮下に埋入した。1-2ヶ月後に周囲に形成された皮下組織体と共に作製用基材を取り出し、鋳

型を除去してバイオバルブステントを得た。それを用いて経カテーテル的方法 (Apical approach) により、大動物 (成ヤギ) の大動脈 (TAVI) および肺動脈 (TPVI) に移植した。その後慢性実験に移行し、動脈圧負荷状態で性能を 1-6 ヶ月間継続的に評価した。作製したバイオバルブステントは TAVI および TPVI により留置可能であった。また、弁の機能は良好に経過し、6 ヶ月以上安定して機能することが示された。組織学的には血栓や切開の所見もほとんど無く、自家細胞が、血液接触面を内皮細胞様に被覆し、内部にも徐々に侵入する所見が捉えられた。

(2) 開心術用人工弁の、大動物を用いた急性実験による基本性能評価

成ヤギを麻酔下、手術的にバイオバルブ作製用鋳型を複数個皮下に埋入し、1-2 ヶ月後摘出しバイオバルブ (補強リング付き) を得た。開胸、心停止体外循環下に大動脈弁置換術を行った。作製した開心術用バイオバルブは手術的に大動脈弁位に留置可能であった。実験中血行動態は安定し、弁は良好に機能した。

(3) ヤギ成長モデルを用いた、バイオチューブの成長性の検討

生後約 2 ヶ月、体重 15 kg 前後の仔ヤギの頸部皮下に、バイオチューブ作製用鋳型を複数個埋入した。1 ヶ月後に皮下組織体と共に作製用鋳型を取り出しトリミングしバイオチューブを得て、頸動脈を血流遮断後切断し、断端部にバイオチューブの両端を端端吻合して移植した。その後頸動脈エコーや血管造影で、バイオチューブのサイズおよび血流量をモニターしたところ、血流は良好で、血管径が経時的に増大する傾向が捉えられた。最終的にバイオチューブ移植後 21 ヶ月後まで観察した。この間ヤギの体重が 28 kg から 70 kg に増加する間にバイオチューブの血管内径は造影検査で 4.4 mm から 7.0 mm まで増大 (約 1.6 倍) した。

(4) Full root type の大動物を用いた、急性実験による基本性能評価および長期性能評価

成ヤギにバイオバルブ作製用鋳型を複数個皮下に埋入し、1-2 ヶ月後摘出しバイオバルブ (Full root type) を得た。開胸、心停止体外循環下に大動脈弁置換術を行った。灌流状態を経胸壁エコー、動脈圧等で経時的に観察した。動脈圧の負荷がかかる状態でバイオバルブの性能を 1-6 ヶ月間継続的に評価した後犠死せしめ、バイオバルブを取り出し、組織学的に評価した。また、さらに長期の性能評価のため 6 ヶ月以上の観察も行った。最終的に最長観察期間は 43 ヶ月に達した。終了後摘出したバイオバルブは、血栓形成や石灰化もほとんど無く弁葉構造はよく保たれていた。組織学的には 4 週目以降にバイオバルブの結合組織内に細胞侵入が見られ、新生血管の構築も見られた。血液接触面は内皮様の細胞で覆われていた。これらの組織は、時を経て正常弁組織に近づくような構造の変遷が見られ、結合組織一層の状態から、弾性線維な豊富な層、結合組織がさらに豊富な層ができ、自己心臓弁に近い三層構造に変化することが示された。

(5) ヤギ成長モデルを用いたバイオバルブの成長性の検討

生後約 1 ヶ月、体重 10 kg 前後の仔ヤギ (ザーネン種) の背腹部皮下に、バイオバルブ作製用鋳型を埋入し、1 ヶ月後 (体重 20 kg 前後) 取り出し、同時に左肋間開胸心膜切開後、主肺動脈を露出し、体外循環下血流遮断後切断し、断端部にバイオバルブの両端を端端吻合して移植した。その後経バイオバルブのサイズおよび血流量をモニターし、6 ヶ月以上 (体重 40-60 kg を目安) で犠死し、バイオバルブを摘出しサイズを測定して成長の程度を評価した。最終的にバイオバルブ移植後 14 ヶ月後まで観察した。この間バイオバルブの導管内径は造影検査で顕著な変化は見られなかったが、ヤギの体重は 26 kg から 60 kg に増加し、バイオバルブ移植により仔ヤギの成長を妨げることはなかった。以上より、バイオバルブは生きたグラフトとして生着し成人や小児の弁置換に対して機能的にも耐久性でも有望な人工弁となることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Takewa Y, Sumikura H, Kishimoto S, Naito N, Iizuka K, Akiyama D, Iwai R, Tatsumi E, Nakayama Y. Implanted In-Body Tissue-Engineered Heart Valve Can Adapt the Histological Structure to the Environment. *ASAIO J.* 2018 May/Jun;64(3):395-405. doi: 10.1097/MAT.0000000000000769.

Sumikura H, Nakayama Y, Ohnuma K, Takewa Y, Tatsumi E. Development of a stent-biovalve with round-shaped leaflets: in vitro hydrodynamic evaluation for transcatheter pulmonary valve implantation (TPVI). *J Artif Organs.* 2016 Dec;19(4):357-363. Epub 2016 May 26.

Nakayama Y, Kaneko Y, Takewa Y, Okumura N. Mechanical properties of human autologous tubular connective tissues (human biotubes) obtained from patients undergoing peritoneal dialysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016 Oct;104(7):1431-7. doi: 10.1002/jbm.b.33495. Epub 2015 Jul 31.

Sumikura H, Nakayama Y, Ohnuma K, Kishimoto S, Takewa Y, Tatsumi E. In vitro hydrodynamic evaluation of a biovalve with stent (tubular leaflet type) for transcatheter pulmonary valve implantation. *J Artif Organs.* 2015 Dec;18(4):307-14. doi: 10.1007/s10047-015-0851-z. Epub 2015 Jul 4.

Funayama M, Sumikura H, Takewa Y, Tatsumi E, Nakayama Y. Development of self-expanding valved stents with autologous tubular leaflet tissues for transcatheter valve

implantation. J Artif Organs. 2015 Sep;18(3):228-35. doi: 10.1007/s10047-015-0820-6. Epub 2015 Feb 12.

Kishimoto S, **Takewa Y**, Nakayama Y, Date K, Sumikura H, Moriwaki T, Nishimura M, Tatsumi E. Sutureless aortic valve replacement using a novel autologous tissue heart valve with stent (stent biovalve): proof of concept. J Artif Organs. 2015 Jun;18(2):185-90. doi: 10.1007/s10047-015-0817-1. Epub 2015 Jan 21.

[学会発表](計 42 件)

- 2019年3月21日 日本再生医療学会 第18回日本再生医療学会大会 **武輪能明** 組織工学による自己組織心臓弁の大動物長期性能試験
- 2019年3月29日 日本循環器学会 第83回日本日本循環器学会学術集会 **武輪能明** Tissue-engineered autologous heart valve for cardiac regeneration therapy
- 2019年3月2日 iBTA再生医療研究会 第1回 iBTA再生医療研究会学術集会 **武輪能明** バイオバルブの開発と他の組織工学心臓弁との比較
- 2019年2月2日 第14回奈良 Cardiovascular Conference 特別講演 循環器系治療機器の開発と製品化 補助循環装置と自家組織生体弁
- 2018年11月 日本人工臓器学会 第55回日本人工臓器学会大会 **武輪能明** 組織工学的に作製した人工弁の生体内での構造変化
- 2018年10月 Annual Conference of the Asia-Pacific Society for Artificial Organs. **Takewa Y**. Development of a Novel Tissue-engineered Heart Valve.
- 2018年9月 ESAO (欧州人工臓器学会) 第44回欧州人工臓器学会大会 **Takewa Y**. Do tissue-engineered heart valves need stem cells?
- 2018年9月 ISACB 2018 meeting **Takewa Y**. Histological Transition of a Novel Tissue-engineered Heart Valve.
- 2018年7月) The Scientific Sessions of the International Academy of Cardiology, 23rd World Congress on Heart Disease **Takewa Y**. DEVELOPMENT OF A NOVEL AUTOLOGOUS HEART VALVE
- 2018年7月 The Scientific Sessions of the International Academy of Cardiology, 23rd World Congress on Heart Disease **Takewa Y**. A NOVEL AUTOLOGOUS TISSUE-ENGINEERED HEART VALVE FOR TRANSCATHETER IMPLANTATION
- 2018年4月 International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery (67). **Takewa Y**. Development of a novel autologous tissue-engineered heart valve for transcatheter implantation.
- 2018年3月 日本再生医療学会 第17回日本再生医療学会大会 **武輪能明** 皮下で作成した自家組織からなる心臓弁の長期慢性動物試験ならびにその組織学的検討
- 2018年2月 日本心臓血管外科学会 第48回日本心臓血管外科学会学術総会 **武輪能明** 自己組織由来心臓弁移植後の組織学的適応変化の可能性
- 2017年9月 日本胸部外科学会 第70回日本胸部外科学会定期学術集会 **武輪能明** 組織工学的に作製した心臓血管外科手術用グラフトの植え込み後の組織学的変化
- 2017年9月 日本アクセス研究会 第21回日本アクセス研究会学術集会 特別講演 **武輪能明** 自己組織からなる新しいグラフトを用いた人工弁、人工血管治療の最前線 バイオバルブを用いた心臓弁治療法の開発
- 2017年9月 日本人工臓器学会 第55回日本人工臓器学会大会 **武輪能明** 生体内組織形成術によるバイオバルブ心臓弁の開発
- 2017年8月 European Society of Cardiology Congress 2017 **Takewa Y**. Post-implanted histological adaptation of a novel tissue-engineered heart valve.
- 2017年6月 ASAIQ (米国人工内臓学会) 第63回米国人工内臓学会 **Takewa Y**. Implanted Novel Autologous Bioprosthetic Valve Can Adapt The Histological Character To The Environment.
- 2017年3月 The Heart Valve Society Annual Meeting. **Takewa Y**. Longterm Evaluation of a Novel Autologous Tissue Heart Valve.
- 2017年3月 日本再生医療学会 第16回日本再生医療学会大会 **武輪能明** 生体内組織形成術で作製した心臓弁の長期移植評価と生きたグラフトとしての可能性の検討
- ②1 2017年3月 日本再生医療学会 第16回日本再生医療学会大会 **武輪能明** 自家組織からなる心臓弁の長期移植評価と組織学的検討
- ②2 2017年2月 日本心臓血管外科学会 第47回日本心臓血管外科学会学術総会 **武輪能明** 成長に対応可能な心臓血管外科手術用グラフトの開発
- ②3 2016年11月 AHA (米国心臓病学会) 2016年米国心臓病学会大会 **Takewa Y**. Long-term evaluation of a novel autologous bioprosthetic valve as a vital graft.
- ②4 2016年11月 日本人工臓器学会 第54回日本人工臓器学会大会 **武輪能明** バイオバルブ心臓弁の長期移植評価と生きたグラフとしての可能性の検討
- ②5 2016年11月 日本人工臓器学会 第54回日本人工臓器学会大会 **武輪能明** 皮下に埋植して作製した生体人工弁は次世代の代替心臓弁になり得るか?

- ②6 2016年9月 ESAO(欧州人工臓器学会) 第42回欧州人工臓器学会大会 Takewa Y. Development of various autologous bioprosthetic grafts with a unique in-body tissue engineering.
- ②7 2016年9月 ESAO(欧州人工臓器学会) 第42回欧州人工臓器学会大会 Takewa Y. Long term evaluation of a novel versatile bioprosthetic valve made by autologous tissues.
- ②8 2016年9月 ESAO(欧州人工臓器学会) 第42回欧州人工臓器学会大会 Takewa Y. Development of biotube and biovalve made of autologous tissues.
- ②9 2016年8月 European Society of Cardiology Congress 2016 Takewa Y. A novel autologous heart valve with growth potential.
- ③0 2016年8月 Annual Conference of the Asia-Pacific Society for Artificial Organs. Takewa Y. A novel autologous heart valve with in-body tissue engineering.
- ③1 2016年6月 ASAIO(米国人工内臓学会) 第62回米国人工内臓学会 Takewa Y. A feasibility study of a novel autologous heart valve.
- ③2 2016年4月 International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery (65). Takewa Y. Development of a novel autologous bioprosthesis
- ③3 2016年3月 The Heart Valve Society Annual Meeting. Takewa Y. A Novel Autologous Heart Valve with Growth Potential.
- ③4 2016年2月 日本心臓血管外科学会 第46回日本心臓血管外科学会学術総会 武輪能明 成長性の可能性がある自己組織からなる心臓弁組織の開発
- ③5 2016年2月 岐阜ハートセンター講演会 武輪能明 自己組織からなる心臓弁および血管グラフトの開発
- ③6 2015年12月 European International Society for Applied Cardiovascular biology Meeting Takewa Y. Development of a novel autologous heart valve(biovalve) with in-body tissue engineering method.
- ③7 2015年11月 日本人工臓器学会 第53回日本人工臓器学会大会 武輪能明 将来有望な自己組織からなる生体弁の開発研究
- ③8 2015年11月 AHA(米国心臓病学会) 2015年米国心臓病学会大会 Takewa Y. A novel versatile bioprosthetic valve made by autologous tissues maintaining growth potential.
- ③9 2015年9月 ESAO(欧州人工臓器学会) 第42回欧州人工臓器学会大会 Takewa Y. Improvement and evaluation of biovalve with stent for transcatheter pulmonary valve implantation.
- ④0 2015年8月 European Society of Cardiology Congress 2015 Takewa Y. A tailor made valve surgery with a novel autologous bioprosthesis.
- ④1 2015年5月 The Heart Valve Society Annual Meeting. Takewa Y. Long term evaluation of a novel autologous tissue engineered valve substitute(biovalve).
- ④2 2015年5月 ASAIO(米国人工内臓学会) 第61回米国人工内臓学会 Takewa Y. In-body tissue engineered heart valve (biovalve) can be engrafted as vital tissues.

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：巽 英介

ローマ字氏名：(TATSUMI, eisuke)

研究協力者氏名：中山 泰秀

ローマ字氏名：(NAKAYAMA, yasuhide)

研究協力者氏名：住倉 博仁

ローマ字氏名：(SUMIKURA, hirohito)

研究協力者氏名：岸本 諭

ローマ字氏名：(KISHIMOTO, satoru)

研究協力者氏名：内藤 敬嗣

ローマ字氏名：(NAITO, noritsugu)

研究協力者氏名：飯塚 慶

ローマ字氏名：(IIZUKA, kei)

研究協力者氏名：秋山 大地

ローマ字氏名：(AKIYAMA, daichi)

研究協力者氏名：岩井 良輔
ローマ字氏名：(IWAI, ryosuke)

研究協力者氏名：船山 麻理菜
ローマ字氏名：(FUNAYAMA, marina)

研究協力者氏名：片桐 伸将
ローマ字氏名：(KATAGIRI, nobumasa)

研究協力者氏名：竹下 大輔
ローマ字氏名：(TAKESHITA, daisuke)

研究協力者氏名：大沼 健太郎
ローマ字氏名：(OHNUMA, kentaro)

研究協力者氏名：藤井 豊
ローマ字氏名：(FUJII, yutaka)

研究協力者氏名：東郷 好美
ローマ字氏名：(TOGO, konomi)

研究協力者氏名：水野 敏秀
ローマ字氏名：(MIZUNO, toshihide)

研究協力者氏名：築谷 朋典
ローマ字氏名：(TSUKIYA, tomonori)

研究協力者氏名：角田 幸秀
ローマ字氏名：(KAKUTA, yukihide)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。