

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19919

研究課題名(和文) 永久生着を目指した成長ポテンシャルを有する人工心臓弁の開発

研究課題名(英文) The development of the artificial heart valve having a growth potential with the aim of permanent engraftment

研究代表者

小澤 秀登(Ozawa, Hideto)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：50747699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新鮮脱細胞化心臓弁移植後の再細胞化に関し、大動物実験にて検討した。方法：脳死心臓移植時に摘出されたrecipientの肺動脈弁を0.5%デオキシコール酸及び0.5%硫酸ドデシルにて脱細胞化した。この弁をミニブタの肺動脈弁位に移植し、移植後6ヶ月で組織学的検査を行った。結果：移植片に対してCD31、Vimentin陽性細胞の遊走を認め、また脱細胞組織内でVEGF、SDF-1等のサイトカインの産生する細胞の存在、およびmyoblastの形態を呈し新たな細胞外マトリックスの産生を示唆する細胞の存在が確認され、脱細胞化心臓弁内での新たな細胞の生着を示唆する所見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We examined the recellularization process after fresh decellularized heart valve transplantation, in large animal experiments. METHODS: Pulmonary artery valves of heart transplant recipients removed during brain death heart transplantation were decellularized with 0.5% deoxycholic acid and 0.5% dodecyl sulfate. This valve was transplanted to the pulmonary valve position of the mini pig, and histological examination was carried out 6 months after transplantation. RESULTS: Migration of CD31, Vimentin-positive cells to the graft was observed, and the presence of cells produced cytokines such as VEGF, SDF-1 were observed and we also revealed the presence of the cells which were formed of myoblast. These findings suggest that new engraftment of decellularized heart valve was obtained.

研究分野：小児心臓血管外科学

キーワード：先天性心疾患 組織工学 再生医療 心臓血管外科学

1. 研究開始当初の背景

修復困難な心臓弁疾患に対する最も一般的な治療は人工弁による心臓弁置換であり、一般的に使用されている人工弁は機械弁あるいは生体弁である。その臨床成績は良好であることが知られている一方、血栓形成や感染など人工弁に関連した合併症、人工弁の耐用性、特に発育途上の小児においては弁のサイズミスマッチが問題となり、再弁置換手術を余儀なくされることが臨床上的大きな問題点となっている。近年、Tissue-Engineering の手法を用いた心臓弁脱細胞化の技術が進み、Scaffold を維持したままで免疫学的な拒絶反応を抑えることができ、移植後も耐久性および抗血栓性にすぐれた状態が維持されることが報告された。一方で、小児に対する移植手術を考慮すると、子供の成長、循環に適応し弁も成長することが重要である。これには、ECM を産生する自己の細胞が再播種されることが必要である。臨床的に弁の成長認めるとの報告も認めるが、細胞の再播種あるいは生着に関する検討は少ない。

2. 研究の目的

脱細胞化同種肺動脈弁移植の長期安全性と弁機能及び、同種弁が生着するメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 倫理性

大阪大学医学部倫理委員会にて承認された上で、本研究を遂行された。

(2) 脱細胞化肺動脈弁グラフトの作成

肺動脈基部（肺動脈弁および弁が付着している右心室および肺動脈組織）を清潔下に、心移植レシピエント心より採取した。このグラフトを 0.5% sodium deoxycholate、0.5% sodium dodecylsulfate 存在下の生理食塩水にて 36 時間

振盪することで脱細胞化した。その後摂氏 4 度の生理食塩水にて保存し、グラフト移植手術を施行した。

(3) 脱細胞化肺動脈弁グラフトの移植

ミニブタを全身麻酔下に胸骨正中切開し、大動脈送血、右房脱血にて人工心肺を確立した。まず、右室流出路、肺動脈弁の中枢側および末梢側を切離、同部位に脱細胞化した肺動脈（右室流出路）を移植した。中枢側および末梢側は非吸収性のモノフィラメントの糸を用いて吻合した。吻合終了後、人工心肺より離脱し、胸骨を閉鎖し手術を終了した。術後は適量の鎮痛剤を用いて、温度の管理された飼育室にて回復させた。いずれも免疫抑制剤の投与をしなかった。以降 6 ヶ月飼育し、計画的に全身麻酔下にカリウムを全身投与することにより犠牲死させた。

(4) 心臓超音波および心臓 MRI 検査

全身麻酔下に経胸壁心臓超音波検査を行い、肺動脈弁の圧較差・逆流の程度を測定した。同様に全身麻酔下に心臓 MRI 検査を行い、肺動脈弁の逆流の程度を評価した。

(5) 心臓弁の組織学的検討

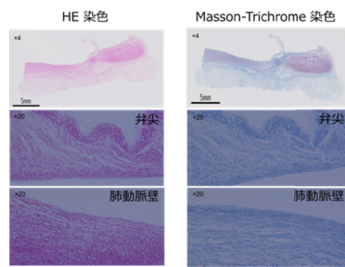
摘出した心臓弁をホルマリンにて固定しパラフィン切片を作成した。脱細胞化組織および移植後の形態に関して。HE 染色、Masson-trichrome 染色、及び抗ヒト Collagen I, Elastin, Laminin 2 および電子顕微鏡にて検討した。また、細胞の再播種および生着（細胞の活動）に関して、CD31, Vimentin, SMA, Ki67, VEGF, SDF-1 抗体を用いた免疫組織染色を行った。また、再播種した細胞に関して電子顕微鏡を用いて観察し、その形態を評価した。

4. 研究成果

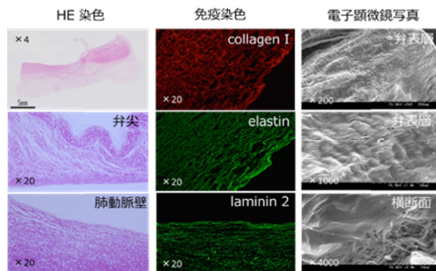
(1)

脱細胞化処理後の肺動脈グラフトの構造

脱細胞化処理したヒト肺動脈基部の構造を HE 染色、Masson-trichrome 染色、免疫染色、電子顕微鏡にて評価した。



肺動脈基部の肉眼的形態は維持されていたが、弁尖・肺動脈壁ともに Haematoxylin にて濃染される核は認められなかった（右上図）。また、



CollagenI, Elastin, Laminin 2 はいずれも形態上維持されており、電子顕微鏡的にもこれら細胞外基質の構造は維持されていた（上図）。

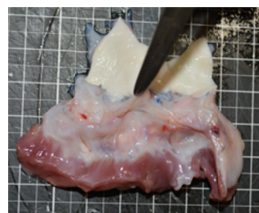
(2) 移植後 6 ヶ月の肺動脈弁機能

肺動脈弁グラフト移植後、定期的に全身麻酔を施し心臓超音波及び心臓 MRI 検査により肺動脈弁機能を定性的・定量的に評価した。

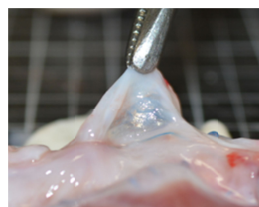
弁の圧較差はいずれも 8 mmHg 未満であり、逆流の程度はいずれも軽度あるいはそれ以下であった。また、弁逆流に関しても、中程度を超える逆流は認めず、また観察中に増悪するものは認めなかった。

(3) 移植後の肺動脈弁の構造

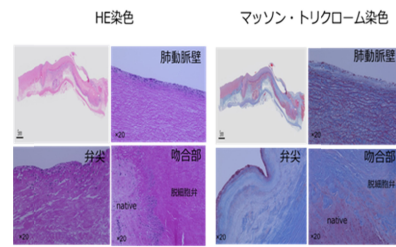
肺動脈弁グラフト移植後にミニブタを計画的に犠牲死させ、グラフトを摘出し肉眼的・組織学的に評価した。



グラフトの縫合部は中枢側・末梢側ともに癒合しており、組織が一体化されて



いた。肺動脈弁尖は肥厚・硬化なく、正常肺動脈弁と肉眼上近似していた（右図）。

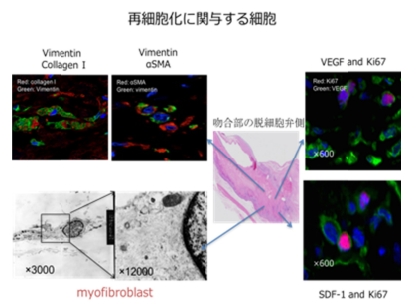


HE 染色では、弁尖内および吻合部において、移植片内に濃染される核を有する細胞を多数認めた（右上図）。

また、免疫組織染色上、CD31 陽性細胞が弁尖表面に集積しており、Vimentin 陽性細胞が弁尖内部に存在していた（下図）。

再播種したと考えられる細胞に関して、その

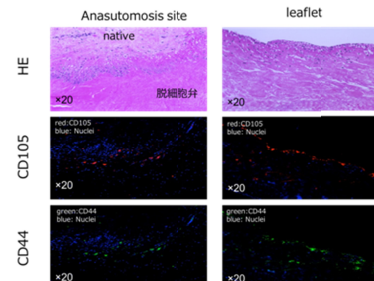
性質、生着および細胞の由来に関して検討するために、各種免疫染色および電子顕微鏡により検討を行なった。その結果、再播種した細胞内には Vimentin および CollagenI 陽性、あるいは Vimentin および SMA 陽性の細胞を認め、これらの細胞を電子顕



鏡で観察するに細胞内にマイクロ

フラメントを有した細胞であり、myoblast の形態を呈していた。また、再播種した細胞においては、Ki67 陽性細胞を認め、また VEGF あるいは SDF-1 といったサイトカインに対する免疫

染色にて陽性とな



る細胞を認めた。播種した細胞の分裂あるいは生着の可能性をしめすことができた(上図)。また、播種細胞の由来を評価するために肺動脈弁および吻合部においてCD105あるいはCD44といった骨髄由来細胞マーカーにて免疫染色を行なったところ、播種した細胞において共に陽性の細胞を確認できた(右上図)。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

1: 発表標題: 新鮮脱細胞化心臓弁を用いた新しい右室流出路再建法の検討
発表者: 小澤 秀登
学会名: 第 115 回日本外科学会学術集会
2015/4/16-18 名古屋国際会議場 名古屋

2: 発表演題: 新鮮脱細胞化心臓弁に対する宿主幹細胞による再細胞化の検討
発表者: 小澤 秀登
学会名: 第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2015/7/16-18 ホテル日航東京 東京

3: 発表演題: 自己組織化を目指した新鮮脱細胞化ヒト肺動脈弁の臨床への応用
発表者: 小澤 秀登
学会名: 第 53 回日本人工臓器学会大会
2015/11/19-21 東京ドームホテル 東京

4: 発表演題: 自己組織化を目指した新鮮脱細胞化ヒト肺動脈弁の臨床への応用
発表者: 小澤 秀登
学会名: 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会 2016/9/28-10/1 岡山コンベンションセンター 岡山

5: 発表演題: 心臓移植レシピエント心臓弁を用いた再生型新鮮脱細胞化心臓弁の臨床応用
発表者: 小澤 秀登
学会名: 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会 2017/2/27-3/1 グランドニッコー東京 台場 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 秀登(OZAWA, Hideto)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号: 50747699