

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20305

研究課題名(和文)小児医療をめざす小口径心臓弁の開発：皮下でつくる心臓弁の組織制御に関する研究

研究課題名(英文)Development of an autologous valved conduit (Biovalve) with small diameter for children: Enhancement of tissue formation for subcutaneously-implanted molds

研究代表者

船山 麻理菜 (Funayama, Marina)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員

研究者番号：30713599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：体内を培養場として任意の形状の移植用組織体をつくる「生体内組織形成術(IBTA)」にて、生体と同等の機能性を有する自己組織由来の心臓弁様組織体(バイオバルブ)を開発してきた。新たな医療デバイスとして、生まれつき心臓弁がなく早急に心臓代用弁が必要となる小児の肺動脈疾患に着目した。生体内の治癒プロセスに基づいたカプセル化反応を利用するIBTAでは、皮下に埋入した基材表面で形成される組織の厚さは小型になるほど薄くなり組織強度が低下する問題をもっていたが、本研究では小口径バイオバルブについて、容易かつ十分な強度を付与できる組織形成制御を可能とし、生体弁に類似した機能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Pediatric patients with congenital heart disease would benefit from replacement heart valves, particularly pulmonic valves. We developed an autologous valved conduit (Biovalve), formed by in-body tissue architecture technology (IBTA) using subcutaneously embedded plastic molds. Excellent hemodynamic performance and beneficial leaflet movement after implantation were observed in experimental models. However, in particular Bivalves with small diameter had thin conduit wall thickness, requiring careful handling. We aimed at development of Biovalves with robust and thick conduits wall. The paling structure facilitated the formation of approximately 1-mm thick conduit wall and leaflets through a small aperture inside the inner portion. The paling mold was highly effective in constructing a robust, completely autologous Biovalves with adequate valve function.

研究分野：獣医学

キーワード：小児外科学

1. 研究開始当初の背景

生体内組織形成術による心臓代替弁作製

従来の再生医療とは異なる新しいアプローチで、任意の形状の移植用組織体を患者体内で作る手法「生体内組織形成術」を提案してきた。体内を培養場として、生体内に鋳型基材を埋入するだけで、通常的生活を送りながら、コストをかけずに、自然と移植用組織体ができあがる生体内組織形成術による移植用組織体形成は、生体外の高度滅菌環境下での長期間の煩雑な細胞操作が不要であり、基材の構造を工夫することで複雑な構造の組織体も作製可能である点で、安全で確実な再生医療の早期実現が可能な方法と考えられる。

完全自己組織由来心臓代替弁(バイオバルブ)は、自己の細胞やマトリックスのみから構成され、理想的な移植用組織体である。免疫拒絶反応が生じないばかりでなく、生体適合性を有し、血栓症という問題を克服する上で臨床的意義深い。これまで、移植時の操作性に優れ、移植に耐え得る強度をもつ大口径バイオバルブを開発し、大動物の心臓弁へ移植評価を行ってきた。結果、血行動態を確認し、良好な移植操作性および中期生存に成功するとともに、バイオバルブ内部に毛細血管網の構築、生体血管に類似した三層構造の出現、短期移植でコラーゲンを中心とした細胞外マトリックスの産生および血管構成細胞であるエラスチンの産生を明らかにした。また、本技術の要となる鋳型基材は、3Dプリンターにより、生体組織を模写した複雑形状を寸分変わらず作製できる為、任意の形状を自由に形成できる本技術の特長を活かし、自己拡張性ステントを一体形成させた「ステント付バイオバルブ」の開発および移植にも成功し、高齢でハイリスクな患者への経カテーテル心臓弁移植の適応を視野に入れたデバイス開発を進めている。

小口径バイオバルブの組織形成制御

先天性心疾患は新生児の約1%に発症し、生まれつきの異常としては頻度の高い疾患である。特に多いのが肺動脈弁に関する疾患であり、生まれつき心臓弁が無い場合も多く、早急に心臓代替弁が必要となるが、市販されている小児用の心臓代替弁は存在しない。そのため小児外科医が既存の医療機器を組み合わせ、対応せざるを得ない。しかし、乳幼児期に移植した心臓代替弁は成長する体格とはズレを生じるため、患者の成長に合わせて大きなサイズの心臓代替弁との置換手術が必要となり再手術を繰り返すため、患者のQOLは著しく低下する。そのため臨床現場から、サイズが小さく、成長の可能性を有する小児用の心臓代替弁の開発が切望されてきた。

生体の治癒プロセスのカプセル化反応を利用する生体内組織形成術では、皮下に埋入した基材表面で形成される組織の厚さは、小

型になるほど組織強度が低下する問題をもつ。小児用の心臓代替弁が開発されていない現状を踏まえると、小口径バイオバルブに適応できる鋳型基材の構築が必須であった。

2. 研究の目的

生体内組織形成術を基盤とし、患者の体内で自分の体の成分のみからなる小児用のバイオバルブの開発を最終目的とした。本研究では、動脈系に長期間移植可能な力学的な信頼性を有する直径6mm~の小口径バイオバルブについて、容易かつ十分な強度を付与できる組織形成制御能の基盤技術確立を目指し、鋳型基材のデザイン工学的制御による強度付加、弁組織形成過程の観察技術を応用した弁葉形成の確実化、流体力学的弁機能評価を実施した。

3. 研究の方法

弁葉形成組織制御能の確立

体内に埋入し移植用組織体を作製する「鋳型」の寸法を敢えて大きくするデザイン工学的組織形成制御能の技術開発を行った。3Dプリンターにて形成した凸型および凹型アクリル基材を組み合わせ、それらの重複部にてできる隙間で弁葉を形成させる従来の型の基本構造を保ちながら、凹部基材の弁葉形成位に複数のスリット(約1mm)を追加した。作製した鋳型をビーグル皮下に2ヵ月間埋入すると全体が結合組織膜で覆われ、内部の型を抜去することで、小口径のバイオバルブを作製した。

導管形成組織制御能の確立

上記研究結果にて得られたスリットを有する鋳型基材周囲に、さらに導管組織形成のブースターとなる柵状構造で全周を囲ったカゴ化鋳型を形成し、ビーグルの皮下に埋入し、厚い導管組織を有する小口径バイオバルブを作製し、組織学的評価を実施した。

小口径バイオバルブの機能性評価

形成されたバイオバルブについて、生体外回路(ラボハート)を用いて、弁開口率、逆流率等の物理的特性を評価した。

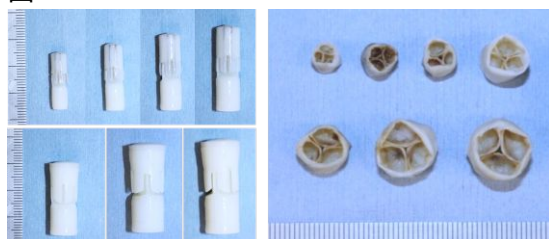
4. 研究成果

スリット基材による弁葉形成

凸型および凹型アクリル基材を組み合わせ、それらの重複部にてできる隙間で弁葉を形成させる従来の型の基本構造を保ちながら、凹部基材の弁葉形成位に複数のスリット(約1mm)を追加した。型の外径は6~15mmとした。型をビーグル皮下に約2ヵ月間埋入すると全体が結合組織膜で覆われ、内部の型を除くと、外周に形成された導管組織の内部に、スリットで接合された膜状組織が設計通りの大きさに形成されていた。スリットを切断することで型の大きさに関わらず三葉弁バイオバルブが得られた。従来弁葉形成部の周

囲のみであった皮下組織の侵入経路にスリットを加えることで、完全な面積の弁葉を確実に得られた。スリット部での導管部と弁葉部の接合を離断する必要があるが、サイズに関わらず小口径バイオバルブの弁葉を安定して作製可能となった(図1)

図1



カゴ化基材による導管組織形成

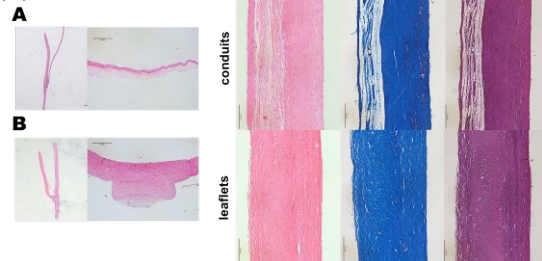
従来の凸凹基材の組み合わせからなるバイオバルブ作製用基材(直径14mm)を覆う様に、1mmの隙間を開けて幅2mmの柵を間隔1mmで全周を囲ったカゴ化鋳型を作製した(全長20mm)。ピーグル皮下に2ヵ月埋入した後摘出し、全ての基材を取り除くと(図2A)内部の基材と外周の柵との隙間を皮下結合組織が完全に埋め、内径14mmの導管を形成していた。その内部には従来通りのバイオバルブの3枚の弁葉組織が形成され、導管とシームレスに一体化していた(図2B)

図2



導管部は管腔構造を維持できる丈夫さを有し、取扱いが格段に向上した。また、従来鋳型(図3A)では鋳型外周で導管部が形成されていたため慎重に取出しを行っていたが、本鋳型はカゴで守られているため、損傷を気にせず取り出しが可能となった(図3B)。導管部および弁葉部は主に層状のコラーゲンから構成され、炎症細胞の浸潤はほとんど認めなかった(図3C)

図3



鋳型の周囲にカゴを取り付けることで、簡単に皮下取出しが可能で、厚く丈夫な導管を有するバイオバルブが得られた。操作性の向上は安心した移植を可能とし、臨床応用への要求事項の一つの解決策となった。

小口径バイオバルブの機能性評価

拍動流模擬回路(LaboHeart NCVC)を用いて、平均動脈圧100mmHg、心拍数100~140bpmの条件下において、カゴ化基材により作製したバイオバルブの機能評価を行い、3枚の弁葉の良好な開閉運動が観察され、平均逆流率は5.7~10.2%と低く、弁葉の損傷はなく良好な弁機能が得られた。

鋳型基材周囲に組織形成のブラスターとなる柵状構造で全周を囲ったカゴ化鋳型は、内部の基材と外周の柵との隙間を皮下結合組織が完全に埋めて、導管を形成した。その内部には従来通りのバイオバルブの3枚の弁葉組織が形成され、導管とシームレスに一体化していた。この技術はサイズに関わらずバイオバルブを安定して供給でき、小児用の小型サイズにも対応できる可能性を十分に有すると考えている。さらに、組織遊走を促進する技術として、従来弁葉形成部の周囲のみであった皮下組織の侵入経路にスリット溝を加えることで、完全な面積の弁葉を確実に得ることができた。カゴ化鋳型とスリット溝は小口径バイオバルブでの弁葉形成促進および高強度化を可能とする技術であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計7件)

- 1) Funayama M, Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y. Development of an autologous valved conduit (type IX biovalve) using a caged mold. ESAO 2015 XLII annual ESAO conference (Leuven, Belgium) 2015年9月2~5日
- 2) Funayama M, Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y. Slit structure enabled the preparation of in vivo autologous valved conduits with large leaflet area. ESAO 2015 XLII annual ESAO conference (Leuven, Belgium) 2015年9月2~5日
- 3) Funayama M, Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y. In vivo tissue-engineered, autologous, valved conduits "Biovalves" with robust wall tissues. ESC Congress 2015 (London, United Kingdom) 2015年8月29日~9月2日
- 4) 中山泰秀, 大家智恵, 森脇健司, 西邑隆徳, 三谷朋弘, 古越真耶, 船山麻理菜. 生体内組織形成術(IBTA)の新たなステージ:「型」の内部を作業場とする新発想の生体修復材料作り. 第53回日本人工臓器学会(東京)2015年11月19~21日
- 5) 船山麻理菜, 古越真耶, 住倉博仁, 森脇健司, 巽英介, 中山泰秀. 厚い導管壁を有する自己組織心臓代替弁(バイオバルブ Type SC)の開発. 第102回日本獣医循環器学会(大宮)2015年6月19~21日
- 6) 船山麻理菜, 古越真耶, 森脇健司, 中山泰

秀 .小型から大型までバイオバルブ作製の
確実化 .第 14 回日本再生医療学会(横浜)
2015 年 3 月 19 ~ 21 日

- 7) 船山麻理菜、古越真耶、森脇健司、中山泰
秀 .カゴ化鋳型の開発と、丈夫な導管を有
するバイオバルブの作製と、安心した移植 .
第 14 回再生医療学会(横浜)2015 年 3 月
19 ~ 21 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

船山 麻理菜 (FUNAYAMA MARINA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員

研究員

研究者番号 : 30713599