

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02101

研究課題名(和文) 生体内組織合成法を用いた異種移植可能な心臓弁膜用バイオシートの開発

研究課題名(英文) Development of biovalves created by in-body tissue architecture for xenotransplantation

研究代表者

首藤 敬史 (Shuto, Takashi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：60649763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：移植医療に限界が見えてきた医学において再生医療はその次を担うべきある意味究極の医療となる存在である。だが現在の再生医療で作成できる組織は機能こそは再現できるものの強度という点では循環器系代用臓器として不十分である。今回生体内組織合成で作成したシートが異種動物の体内で長期にわたって破損せず機能したということは今後異種動物でこの手法で作成したシートが人心膜の代用臓器として使用できる可能性を示したことになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成熟した異種組織を完全に脱細胞することは困難であり、異種移植はいまだに臨床応用されていない。今回生体内組織形成術によって異種動物で作られた弁用シート(biosheet)が脱細胞処理を行うことで拒絶反応が抑えられるだけでなく、強度を保ったまま弁機能を長期にわたって維持したことは画期的なことである。これによって自己体内で自己の代用臓器を作るという狭い領域だけではなく、動物で代用臓器を作り人間の体内に用いるという生体内組織合成術の汎用性が高まった。今後、より人間に適応しやすい動物種を探索し、生体内組織合成により代用臓器を作り脱細胞して移植することで障害臓器特に心血管系へ用いる可能性が生まれた。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine should play the next role in the medical field where transplantation medicine has reached its limit. However, the tissue that can be created by current regenerative medicine is not sufficient as a circulatory system substitute organ in terms of strength although its function can be reproduced. The fact that the sheet made by in-body tissue architecture functioned without being damaged in the body of different animals for a long period of time showed that the sheet made by this method in different animals could be used as a substitute organ for human valves in the future.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 弁膜症 異種移植 代用臓器

1. 研究開始当初の背景

心臓弁膜症の推定患者数は約 200 万人で年間 2 万人以上の患者さんが手術を受けている。現在用いられている代用弁は耐久性に優れた機械弁は血栓性が高く、生涯抗凝固剤ワーファリンを投与する必要がある(出産の制限)。また、異種生体弁は豚弁もしくは牛心膜から精製され、脱細胞の不完全さから耐久性の限界や石灰化があり、早期に弁破壊が起こる若年者への使用には問題が残る。更に近年増加している成長期にある小児弁膜症手術への適用にも限界がある。加えて感染症心内膜炎などの患者に良好な感染抵抗力のあるホモグラフトは圧倒的なドナー不足である。特に小児用に関しては商品が全く存在せず臨床現場から切望されている。東邦大学の尾崎教授が編み出した自己心膜を用いた大動脈弁再建術(AVRec)はその問題を解決する日本発の方法として期待され、すでに 8 年を経過し再手術回避率 97%とその耐用性、有効性が証明されつつある。(Ozaki S, Kawase I, Yamashita H et.al Midterm outcomes after aortic valve neocuspidization with glutaraldehyde-treated autologous pericardium J Thorac Cardiovasc Surg 2018;155:2379-87)近年評価が高まり国内外で広く行なわれるようになった。しかし、すでに自己心膜は過去多くの心臓手術に用いられており、心嚢膜として分化し固定された自己心膜は成長の可能性はなく、またいずれ石灰化を来すことは証明されている。

我々は患者自身の組織のみで自己の移植用組織体を作製できるという全くこれまでの概念を覆す新しい再生医療技術として、「生体内組織形成術」の開発を 10 年以上前から世界に先駆けて行っている。従来の常識であった培養操作や滅菌施設を一切必要とせず、単に鋳型を皮下に入れておくだけで、ほぼ自動的に自家移植用組織体を得られる。ある種魔法の様な医療が実現可能となっている。生体内組織形成術は、生体内に異物が侵入した際に異物周囲をコラーゲンのカプセルが覆う生体反応を利用している。本技術を応用して、バイオチューブ人工血管、バイオバルブ心臓弁、バイオカバードステントグラフトなど主に循環器系組織体の開発を行ってきた。この生体内組織形成術で作成した自己バイオシートを用いてヤギで AVRec を行うと 12 カ月経過して弁機能に異常なく、上皮は内皮で覆われ自己心膜化を始めていたが自己心膜で AFVRec を行うと自己心膜化は起こらないことをすでに確認している。ただ自己組織バイオシートは自己組織であるので拒絶反応がないという最大の利点を有するが皮下(腹部)に基材を植込み、1-2 カ月待って取り出し、その後使用(植え込む)という複数回の患者介入を必要とし、最終手術まで長い期間が必要である。何度も処置を受ける精神的なストレスは強く、またその期間を待てない病態の患者は適応とすることができないという欠点がある。

生体組織から細胞成分を除去した脱細胞化組織は移植用及び再生医療用の足場材料として注目されている。体内で自己細胞が脱細胞化組織に入ることがわかっており、細胞が組織を作るため体内で自己組織化ができるという、これまでにない画期的な特徴を有する。心臓弁、血管に関しても右室流出路再建術、大動脈弁置換、僧帽弁置換術、冠動脈バイパス術に用いるそれぞれの脱細胞化弁、脱細胞化血管の開発がすすめられている。これらはすべて置換組織に対応する分化した同種もしくは異種組織を脱細胞化するものである。しかし成熟した組織ほど脱細胞は難しく、未熟な組織であるほど完全脱細胞化し易いため、いまだ完全な脱細胞化が得られておらず、そのことが遠隔期のグラフト不全につながる。

そこでブタ、ウシ等の異種動物で生体内組織合成を用いて作成したバイオシートは脱細胞化し易くそれによる長い耐久性が得られるのではないかと、また自己バイオシートと異なり患者に対する複数回の処置を必要とせず、安定供給できる医療材料として off the shelf で用いることができ随時治療が可能となり緊急も含めいかなる症例も適応とすることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

生体内組織形成によって得られたバイオシートを脱細胞する最適な脱細胞方法を確立する。最適とは細胞外マトリックスの障害を最小限にとどめ、かつ効率よく脱細胞化する技術をいう。また生体内組織形成によって得られたバイオシートは心膜より脱細胞化に適することを証明する(in vitro ではなく、植え込み後の弁の変性、機能の in vivo での評価)。さらに生体内組織形成によって得られたバイオシートは脱細胞化により異種移植に耐えうる材料となることを証明する。最終的に弁に特化した生体内組織形成法によって得られたシート(リーフレット)は脱細胞化により異種移植に耐え、ハンドリング、植え込み後の耐久性に優れることを証明する。

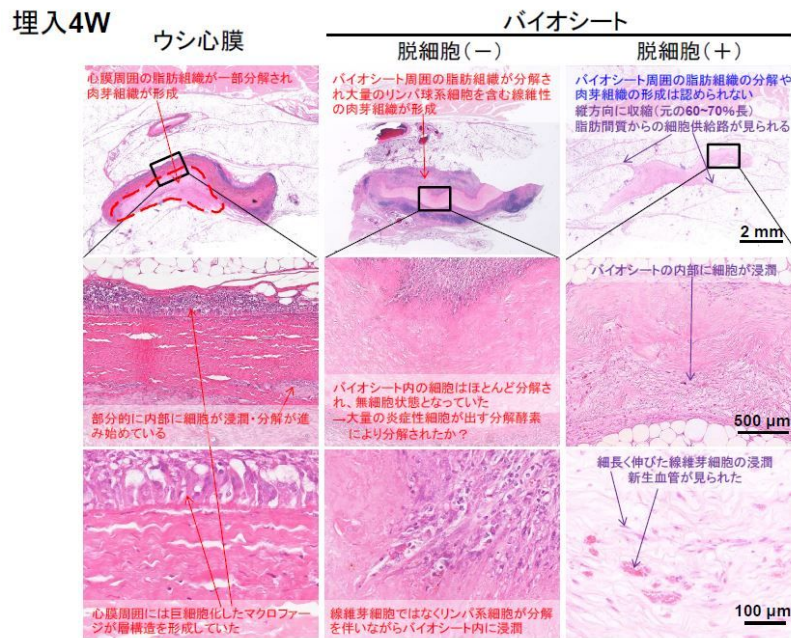
3. 研究の方法

ウシの皮下に基材を植え込み生体内組織形成によりバイオシートを作成する(北海道大学)。脱細胞法を確立するため、得られたバイオシートを異なる条件(方法)で脱細胞し(岡山理科大学)そのシートをヤギの皮下に植え込み(大分大学)拒絶反応の強さを比較する実験を行う。次に確立した脱細胞法で処理したウシバイオシートを尾崎法でヤギの大動脈弁再建を行い急性、慢性拒絶の有無を形態、機能的に観察する。またバイオシートの優位性を示すためウシの心膜を脱細胞しヤギの大動脈再建に用いるモデルも作成し結果を比較する。最終的には現在我々が開発中

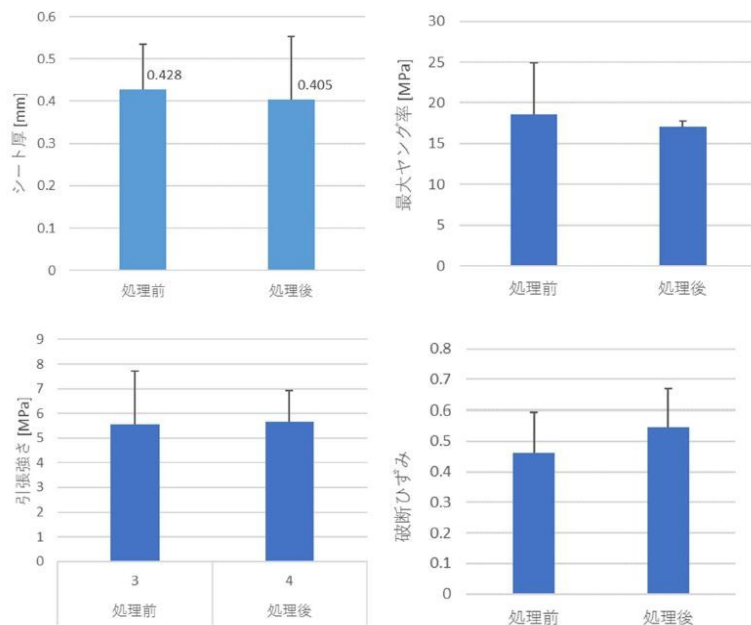
の尾崎法に用いる弁に特化した基材を用いて作成したバイオリールレットを脱細胞化し、同様に組織面、機能面から評価を行う。

4. 研究成果

ウシ皮下に基材を植込、2ヶ月後基材を取り出しバイオシートを得て、脱細胞後にDNA定量し、その脱細胞したウシバイオシートを用いての生体親和性試験（皮下埋植試験）を行った。脱細胞によりDNAはほとんど検出されなくなった。一方皮下に植えられた脱細胞シートは炎症細胞の浸潤が見られず線維芽細胞の浸潤、血管新生が見られたのに対し、非脱細胞シートは周囲を肉芽組織に覆われシート内へのリンパ系細胞浸潤とそれにより細胞が分解され無細胞状態となっていた。（右上図）また引っ張り）さ、最大ヤング率、破断ひずみ等脱細胞前後でウシバイオシートの強度物性に変化はなかった。（右図）更にウシバイオチューブを脱細胞化してヤギの頸動脈に移植する実験を行うとウシバイオチューブは移植後1週間でやや拡大するものもその後瘤化することなく若干元の大きさに戻る傾向を示し、組織学的に4週でバイオチューブ全長を内皮細胞が被覆した。弾

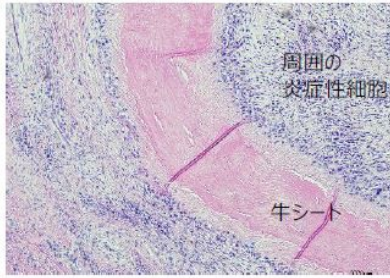


<シート厚及び物性は脱細胞条件にて変化しない>

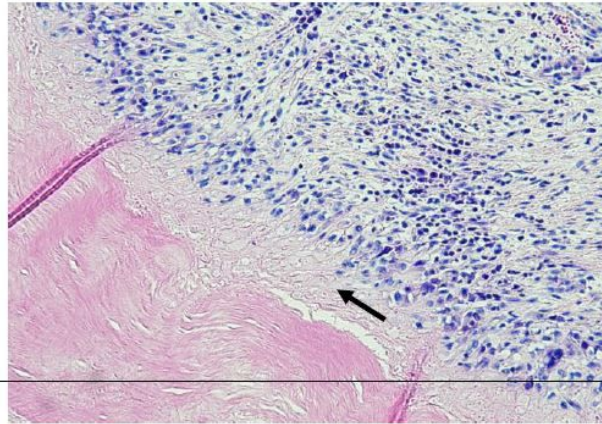


性線維産生を伴う血管平滑筋細胞層は Native からの細胞遊走により生じ、4週で全長の約2/3を、12週で全体を被覆した。バイオチューブ自体は平滑筋細胞の構築に伴い吻合部から分解されており、4週では吻合部から2mm程度、12週ではバイオチューブ全体と周囲組織の明確な見分けがつかないほどほぼ分解(再構成)されていた。脱細胞化した牛バイオシートを尾崎法にて大動脈弁再建に用いると6カ月間弁機能は維持されていた。摘出標本では弁の表面はなめらかで光沢があり、自己弁に近い肉眼所見であった。ただし一部交連部近くの弁に裂傷が見られた。顕微鏡的には牛バイオシートの周囲に慢性炎症がみられたもののシートそのものの破壊は見られなかった。顕微鏡的にはシート表面には内皮細胞の被覆が見られたが、自己バイオシートに見られた自己細胞の弁内部への浸潤による自己弁化はほとんどみられていなかった。ただしどの部分においても石灰化はみられなかった。(下図)自己心膜による大動脈再建モデルでは自己心膜化が起こらないだけでなく肉眼的にも組織学的にも弁輪、弁腹部に石灰化が見られた。まとめると今回行った脱細胞方法では拒絶反応はほぼ抑えられたと考えられるが脱細胞処理により線維組織構造に何らかの変化をきたし自己細胞浸潤に支障をきたしたのではないかと考えられた。今後は脱細胞後のシートの形態学的分析を行ったうえで脱細胞方法を変える(工夫をする)方向と、動物間で違いがないかを確認する方向の二方向で研究を進める。

牛シートの構造は維持されつつも、周囲に慢性炎症あり

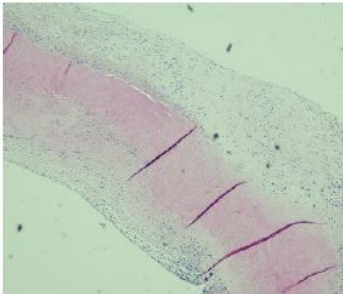


牛シートの周囲に組織球・リンパ球の集簇があり、慢性炎症や異物反応の所見である。シートと炎症の境界領域 (→) は(もしかすると炎症による自己化ないしは吸収かも?)自己組織化を見ている?



さらに長期的にみていくとシート内部までさらに変化がある? ⇒自己組織に置換?? (ただし個体差の可能性は否定できない)

特殊染色 (無冠尖)



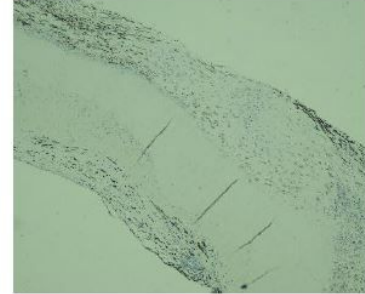
HE染色

牛シートの層とそれをとりまく炎症細胞浸潤



コッサ染色

弁輪部～弁尖にかけての石灰化なし。



αSMA免疫染色

弁尖の表面にαSMA陽性細胞の増殖・進展があり、弁輪から弁尖に向かって連続性に見られる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshi Terazawa, Takayuki Kawashima, Tadashi Umeno, Tomoyuki Wada, Shigeyuki Ozaki, Shinji Miyamoto, Yasuhide Nakayama	4. 巻 99
2. 論文標題 Mechanical characterization of an in-body tissue-engineered autologous collagenous sheet for application as an aortic valve reconstruction material.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of biomechanics	6. 最初と最後の頁 109528-109528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2019.109528	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasushi SATO, Ryosuke IWAI, Takanori NISHIMURA, Osamu ICHII, Shinji MIYAMOTO, Hideo AKIYOSHI, Yasuhide NAKAYAMA	4. 巻 48
2. 論文標題 動物iBTA組織のoff-the-shelfバイオマテリアルとしての可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 人工臓器	6. 最初と最後の頁 219-222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.11392/jsao.48.219	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 羽鳥恭平、河島毅之、岩井良輔、梅野惟史、首藤敬史、中山泰秀、巽 英介、西村隆徳、宮本伸二
2. 発表標題 生体内組織形成術（IBTA）を応用した異種移植可能なバイオシートの開発
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河島毅之、梅野惟史、和田朋之、首藤敬史、寺澤 武、中山泰秀、穴井博文、宮本伸二
2. 発表標題 iBTAを用いた大動脈弁再建術の山羊1年成績
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Kawashima , Tadashi Umeno , Takeshi Terazawa , Keitaro Okamoto , Kyohei Hatori , Tomoyuki Wada , Takashi Shuto , Hirofumi Anai , Eisuke Tatsumi , Yasuhide Nakayama , and Shinji Miyamoto
2. 発表標題 Development of a New Aortic Valve Reconstruction Material Using In-body Tissue Architecture.
3. 学会等名 American Heart Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keitaro Okamoto, Takayuki Kawashima, Kyouhei Hatori, Tomoyuki Wada, Takeshi Terazawa, Tadashi Umeno, Takashi Shuto, Hirofumi Anai, Yasuhide Nakayama, Shinji Miyamoto
2. 発表標題 :Valve Science & Tissue Engineering : " One year Results of Aortic Valve Reconstruction Using an in body Tissue Architecture Goat Model "
3. 学会等名 The Heart Valve Society 2019 Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔 図書 〕 計0件

〔 産業財産権 〕

〔 その他 〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西邑 隆徳 (nishimura takanori) (10237729)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	穴井 博文 (anai hirofumi) (20291544)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	河島 毅之 (kawashima takayuki) (20791049)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中山 泰秀 (nakayama yasuhide) (50250262)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	和田 朋之 (wada tomoyuki) (60325701)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	岩井 良輔 (iwai ryosuke) (60611481)	岡山理科大学・付置研究所・講師 (35302)	
研究分担者	宮本 伸二 (miyamoto shinji) (70253797)	大分大学・医学部・教授 (17501)	