

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22390269

研究課題名（和文） D.I.Y. Medicine：患者体内で作る自家移植用心臓代用弁の開発

研究課題名（英文） D.I.Y. Medicine：Development of autologous tissue heart valves constructed in the body of the patient.

研究代表者

神田 圭一 (KEIICHI KANDA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60295649

研究成果の概要（和文）：

我々は患者自身の体内で、自らの移植治療のために自家結合組織のみからなる心臓代用弁を形成する D.I.Y 治療技術『生体内組織形成技術』を開発中である。

体内に埋入した人工物周囲に、生体防衛機構の働きによって繊維芽細胞とそれが産出するコラーゲン線維によって構成されるカプセル状組織体を心臓代用弁に応用する試みである。組織形成に体外の特殊施設を必要としないため、幅広い施設で応用可能であり、安全性も高いと考えられる。

シリコンやポリウレタンからなる鋳型をウサギ・ビーグル犬・山羊などの大動物の皮下に約 4 週間留置すると鋳型に沿った組織形成が行われた。鋳型を取り除くことにより心臓弁形状の組織体が得られ、フローサーキットで良好な開閉動作が確認された。形成される弁形状を徐々に改良し、物理特性を向上させる一方で実際の動物移植に備えて、導管に一体化されたもの、Valsalva 洞形態を備える物などを開発した。短期のパイロットスターディーとして、人工心肺下にビーグル犬肺動脈弁位への移植に成功した。移植後の弁機能も良好に保たれていた。更に最近ではステント一体型の血管内治療用のバリエーションの開発を行い、山羊を用いた実験で経カテーテル試験的留置が可能となりつつある。

ローコストであり不足しているホモグラフト代用弁に取って代わる可能性のある生体弁として期待される。自家組織のみから構成されるため、個体差にかかわらず安定して形成される技術が開発できれば臨床応用へのハードルは低いと考えられ、これまで人工弁の適応の難しかった小児や感染症患者への応用も可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We have developed the autologous tissue heart valves (Biovalves) constructed by the simple, safe and economical in vivo tissue engineering without any use of specially clean facilities nor complicated procedures. A specially designed mold embedded in the subcutaneous space of rabbits, beagle dogs and goats were covered by autologous tissues for 4 weeks.

After removal of the mold, tri-leaflet valvular shaped autologous tissues were formed. They were also built in the tube grafts for implantation to circulation systems. In the flow circuit, smooth valvular movements of the Biovalves (5 mm in diameter) constructed in the rabbits were observed. Their flow volume pattern was very close to that of native rabbit aortic valves. Biovalves (10-15 mm in diameter) were successfully implanted to the pulmonary valves in the allogeneic beagle model as a pilot experiment. Recently, they were composed to metallic stents for catheter intervention. In vivo tissue engineered "Biovalves" could be idealistic autologous heart valve prostheses with potentiality replacing the short-coming Homografts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	147,000,000	44,100,000	191,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：自家組織、心臓生体弁、再生医療、組織工学、in vivo

1. 研究開始当初の背景

(1)新しい心臓代用弁に求められる事

心臓弁膜症に対する外科治療は古くから行われており、様々な人工機械弁・異種生体弁・同種凍結生体弁（ホモグラフト）などが臨床応用されている。現在用いられている代用弁はそれぞれ長所・短所を持ち、制限付きではあるが完成度の高いものである。

耐久性に優れた機械弁は血栓性が高いため、生涯抗凝固剤であるワーファリンを投与する必要がある（出産に対する制限）。異種生体弁は耐久性の限界や石灰化があり、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応にも限界がある。加えて感染性心内膜炎などの疾患に良好な感染抵抗力のあるホモグラフトはドナー不足である。

(2)再生医療技術を用いた自家組織からなる代用臓器。その応用としての自家組織生体代用弁

自家組織（細胞・細胞外マトリックス）からなる代用臓器を安全かつ簡便に作成することが出来れば臓器移植治療にならぶ治療法が実現することになる。心臓弁についても『生きている（高い Viability を持つ）』自家組織生体弁は、①内皮形成が良好であるため抗凝固剤が不要であり、自己再生能があるため②強い耐久性があり、石灰化も生じにくく③感染に強い。さらに④成長の可能性が期待でき、小児への適応が広がる・・・などの様々な長所を合わせ持つ理想的なものとなりうる。

現在の再生医療技術は自家培養細胞をもとに様々な代用臓器を *in vitro* で作成することを可能にしてきたが、心臓弁についても例外では無く、Tissue Engineered Valve としてこれまで様々な試みが行われた。しかし作成には膨大な時間と費用を要する上に安全性確保のための特殊な施設が必須であるため、一般の臨床現場への普及は困難である。そこで現在我々は全く簡便な方法を用いて自家結

合組織体を形成する技術に注目している。

(3)皮下で形成される“バイオカプセル”と循環系人工臓器への応用

体内に異物を埋入すると、生体防衛機構の働きによってカプセル状の組織体で被膜化されることは古くから知られている。この古典的技術を最新の材料工学技術を用いることにより新たな見直しを行い、組織形成課程を制御した“生体内組織形成技術“—D.I.Y 治療技術—により、自家結合組織体“バイオカプセル”の循環系代用臓器への応用を開始した。管状結合組織小口径代用血管“Biotube”を開発し、実験動物での自家動脈への移植で良好な結果を得た。

2. 研究の目的

本研究では、自家細胞とマトリックス成分を用いて自己の体内において自らの移植臓器を自在に設計・誘導・再生するという、再生医療工学的に全く新しい着想に基づく移植医療技術の開発・応用を行う。これは人工臓器、移植臓器、*in vitro* 組織工学的臓器に続く次世代型臓器として位置づけることができる。体内に埋入された人工物の周囲に線維芽細胞とそれが産出するコラーゲン線維によって構成されるバイオカプセルを利用した上記の管状組織体“Biotube”に続き、患者の体内で作成し左心系にも応用可能な世界初の自家生体心臓代用弁“Biovalve”を開発する。不足している自家移植組織（オートグラフト）・同種移植組織（ホモグラフト）に取って代わり、成長期の小児にも適用できる可能性のある自家組織体を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)自家結合組織心臓弁（Biovalve）プロトタイプモデルの開発

これまでの予備的検討において、兔皮下にアクリル棒を埋入させると数ヶ月で主に自家線維芽細胞とコラーゲンからなる厚さ数

百ミクロン程度のカプセル化組織体が形成され、生体動脈と類似の力学的性質を有することが示された。また用いる鑄型の材質や形状によって形成されるカプセルの力学的性質や形状が変化することを明らかとし、用途に応じた力学的性質や形状を設計した。まず多孔性ポリウレタンとシリコン棒を組み合わせた特殊な鑄型を作成し、日本白色ウサギの皮下に植え込むことにより三つの弁葉構造を持つ心臓弁様構造を持つ組織体“Biovalve”を形成させた。

(2)Conduit モデルの開発

循環器系への移植を前提として人工血管内腔面にBiovalveをコンポジットグラフトとして作成する技術を開発した。人工血管を想定した多孔性ポリウレタンスポンジチューブの内腔に特殊形状の凹凸の鑄型を挿入し、鑄型間でバイオカプセルを形成させることにより、チューブ内腔にBiovalveを形成することが試みを行なった。

(3)拍動型循環回路を用いた in vitro における Biovalve の機能評価

当初作成したのBiovalveはφ5mmの小口径である。初期動物実験をウサギに設定しているためこの大きさで作成したが、これまでこのような小口径バルブの機能評価を行うための拍動流回路は開発されていなかった。ローラー・ポンプと2つのコンプライアンスチャンバーを用いて1回拍出量2mL、拍動数240回/分を実現した。またフローサーキット内ではバイオバルブの形態変化を経時的に流量波形とシンクロして高速度ビデオカメラを用いて撮影することにより評価することが可能となった。

(4)動物移植実験モデルの開発

これまで開発が試みられたいわゆるTissue Engineered Valveでは動物植え込み前には良好な弁尖形態の構造物が形成されていても移植後これらは徐々に退縮し、いずれは消失してしまうことが示されている。今回のBiovalveについてもこの現象の有無についての検証は不可欠である。そこでまずin vitroにおける力学的特性の評価、拍動培養回路における機能的・物理的変化の検証を行なった後、動物実験に備え、十分な評価後人工心肺を用いたビーグル犬の肺動脈弁位への自家移植実験モデルの開発を行った。

4. 研究成果

(1)自家結合組織心臓弁 (Biovalve) プロトタイプモデルの開発

上述の方法で三つの弁葉構造を持つ心臓弁様構造を持つ組織体“Biovalve”を形成させることに成功した。循環回路内での弁の開閉は良好であり、閉鎖時の逆流もほとんど無かった。弁尖部の機械的特性も極めて良好であり、弁機能として充分実用性があることが

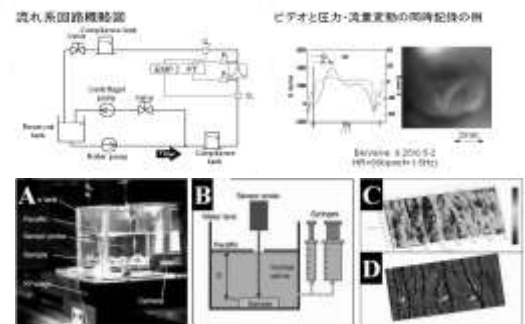
確認された。

(2)Conduit モデルの開発

ポリウレタンの有孔性や厚みが組織形成に大きく影響し、条件の最適化に時間を要した。最終的にはレーザー加工で新たに加工を加えることにより、組織侵入が良好となり、安定した組織形成が実現できた。Conduitモデルにおいても口径5mmが達成できた。これまでこのような超小口径の代用弁は全く実現できなかった。動物実験は勿論、将来的には非常に体重の小さな乳幼児への応用の可能性も期待できる。

(3)拍動型循環回路を用いた in vitro における Biovalve の機能評価

バイオバルブの拍動流下における良好な開閉がビデオ画像で確認された。更に基材形状を改良することにより、ほぼ同径のウサギ大動脈弁と極めて類似した流量・圧カーブを得ることが出来るようになった。



更に最近では組織剛性・弾性の非侵襲的の評価法として、Scanning Haptic Microscope (SHM) (図A・B)を開発中だが、解析パターン(図C)は弾性繊維染色の組織像(図D)に一致した(J Artif Organs (2010) 13:121-125)。本システムで、BioStentValveを生体心臓弁と比較した。

(4)動物移植実験モデルの開発

上述のごとく、人工心肺を用いたビーグル犬の肺動脈弁位への移植モデルの開発を開始し予備的植え込み実験に成功した。現在では人工物を全く含まない完全自己組織化させたBiovalveや、バルサルバ洞構造を導入したBiovalveの改良を開始しており、より現実的な応用を実現するための体制を整えつつある。



(5)動物心臓への移植を前提とした急性期抗血栓性付与の取り組み

Biotubeの移植実験から、心臓への移植後早期にBioStentValveは血管内皮細胞に覆われ天然の抗血栓性を強力に発揮すると予想されるが、内皮化までの急性期には一時的な抗血栓性の付与が望ましい。現在は水溶性アルガトロバンを用いて検証を繰り返し、成果をあげつつある(J Biomed Mater Res Part B 2011 Nov;99(2):420-30.)。

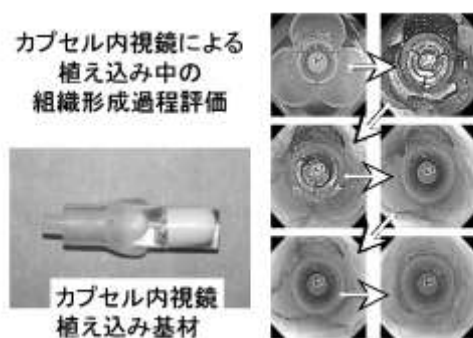
(6) 3Dプリンターによる細かな設計変更

CADによる鋳型設計後、これまではコンピューター制御のスクレイパーでアクリル樹脂を削り取り更にシリコン鋳型を作成する過程をとっていたが、3Dプリンターを導入し設計変更を鋳型形成に迅速に反映出来る様になってきた(複雑な鋳型の試作例)



(7) QC (クオリティーコントロール) としての形成過程評価

生体内組織形成技術では動物種差・個体差などにより、組織形成の速度・成熟度が一定



しない可能性ある。このため基材の摘出前に組織形成が順調に行われている事が解ればQCの面でもより完成度の高いシステムとなる。現在カプセル内視鏡を応用した組織形成評価システムに取り組み始めている。

(7) 経カテーテル的移植用デバイスの開発

更に経皮的アプローチを目標とした金属ステント一体化自家組織生体心臓弁のプロトタイプモデルの制作にも既に取り組みはじめた。特殊な形状の鋳型を金属製ステント内に挿入することにより径5mmの自家結合組織からなる生体弁が一体形成された。現時点ではステントを含めた全体の形状や弁尖組織の形成は不完全であるが、設計により改善が期待できる。再生医療技術と血管内治療(IVR)技術を融合させることにより、自己由来組織の永続的な治療効果と低侵襲性を併せ持つ理想的な治療を出来る可能性がある。

以上列挙した様にこの3年間、研究開始当初の予想以上に研究は発展しつつある。鋳型基材の製作には、産学連携の体制を整え将来的な基材の工業生産についての企業への技術移転を目指している。

本研究は体内における臓器再生技術とも言うべき、再生医療の新しい概念と位置づけられる。患者自身が自らの体内で自家移植用臓器を作成する本法の最も重要なアドバンテージは、複雑な培養技術や特別なクリーン施設を必要とすることなく作成できる事である。

単純明快な本法は、移植臓器や人工臓器、さらに様々な遺伝子的手法を用いた他の再生医療技術に比べ圧倒的に安全且つ経済的であるため、実用化する点で最短距離に有ると判断され、革新的なブレイクスルーをもたらすことが期待される。

近年、心臓血管外科的治療は多くの医療材料を用いて極めて複雑となりつつあるが、これを単純・容易にして、治療コストそのものを著しく削減できる事が見込まれるため、高齢化社会に向けて医療経済的にも有利な治療法を解決出来る可能性がある。

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 11 件)

- ① Takewa Y, Kanda K, Tajikawa T, Ohba K, Nakayama Y. 他 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 2012 Dec 20. [Epub ahead of print]
- ② Moriwaki T, Kanda K, Nakayama Y. 他 Variations in local elastic modulus along the length of the aorta as observed by use of a scanning haptic microscope(SHM). J Artif Organs 14(4) 2011 276-83
- ③ Nakayama Y, Uechi M, Takamizawa K, Kanda K. 他 Water-soluble argatroban for antithrombogenic surface coating of tissue-engineered cardiovascular tissues. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 99(2) 2011 420-30
- ④ Nakayama Y, Tajikawa T, Ohba K, Kanda K. 他 A completely autologous valved conduit prepared in the open form of trileaflets(type VI biovalve):mold design and valve function in vitro. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 99(1) 2011 135-41
- ⑤ Yamanami M, Uechi M, Kanda K, Tajikawa T, Ohba K, Nakayama Y. 他. Development of a completely autologous valved-conduit with the sinus of valsalva (BIOVALVE) using in-body tissue architecture technology: a pilot study in pulmonary valve replacement in a beagle model.
- ⑥ Yamanami M, Tajikawa T, Ohba K, Kanda K, Nakayama Y. 他 Preparation of in-vivo tissue-engineered valved conduit with the sinus of Valsalva (type IV biovalve). J Artif Organs (2010): 13 2010 106-112

- ⑦ Oie T, **Kanda K**, Takmizawa K, Nakayama Y 他. Surface elasticity imaging of vascular tissues in a liquid environment by a scanning haptic microscope. J Artif Organs (2010): 13 2010 121-125.

他

[学会発表] (計 98 件)

- ① Yamanami M, Uechi M, Tajikawa T, Ohba K, **Kanda K**, Nakayama Y 他 Successful Replacement of Beagle Pulmonary Valves by in Vivo Tissue-engineered Valved-Conduits with the Sinus of Valsalva “Biovalves” 61th European society for Cardiovascular and Endovascular Surgery (ESCVS) 2012 May 20-22 クロアチア
- ② Takewa Y, Nakayama Y, **Kanda K**, et al. Successful Implantation of a Completely Autologous Aortic Valve with aStent (Biovalve Stent) by Transcatheter Aortic Valve Implanatation (TAVI). American Heart Association Scientific Sessions 2012. 2012 Nov 12-16 Los Angeles,USA.
- ③ Nakayama Y, **Kanda K** 他. In vitro and in vivo Performance of a Completely Autologous Aortic Valved Conduit (BIOVALVE Type VII) Prepared by in Body Tissue Architecture Technology Using a Novel Separatable Mold. American Heart Association Scientific Sessions 2012. 2012 Nov 12-16 Los Angeles,USA.
- ④ **神田圭一**、中山泰秀他 シンポジウム『外科領域における先端技術・治療の開発』指定演題『自家結合組織のみからなり宿主生体内で簡便に形成される、小口径代用血管バイオチューブの開発』日本外科学会 2012 年 4 月 12 日 幕張
- ⑤ **神田圭一**、**田地川 努**、**大場謙吉**、**上地正美**、中山泰秀他. シンポジウム『体内誘導型再生治療～組織修復のメカニズムは再生医療に貢献するか? ～』招請講演『患者の体内で自家移植用臓器を作製し、移植後急速な再生組織構築を誘導する『生体内組織形成技術』の開発』。日本再生医療学会 2012 年 6 月 12 日 横浜
- ⑥ 中山泰秀, **神田圭一**, **田地川 勉**, **大場謙吉** 他 バイオバルブ心臓弁の生体内形成過程のカプセル内視鏡観察. 日本再生医療学会 2012 年 6 月 12 日 横浜
- ⑦ 武輪能明, **神田圭一**, 中山泰秀他 自己組織からなる TAVI 用 Stent 付き心臓弁 (Biovalve Stent) の開発: 動物実験評価 第 50 回日本人工臓器学会大会 2012

年 11 月 22-24 日 福岡

- ⑧ 中山 泰秀, **田地川 勉**, **神田 圭一** 他 バイオバルブ大動脈弁 (Type VII) の開発 第 50 回日本人工臓器学会大会 2012 年 11 月 22-24 日 福岡
- ⑨ **神田 圭一** 他 生体内組織形成技術を用いたバイオチューブ代用血管の開発 日本再生医療学会 2013 年 3 月 21-23 日 横浜
- ⑩ Yamanami M, Uechi M, Tajikawa T, Ohba K, **Kanda K**, Nakayama Y 他 Successful Replacement of Beagle Pulmonary Valves by in Vivo Tissue-engineered Valved-Conduits with the Sinus of Valsalva “Biovalves” 60th European society for Cardiovascular and Endovascular Surgery (ESCVS) 2011 May 20-22 Moscow, Russia
- ⑪ Yamanami M, Uechi M, **Kanda K**, Tajikawa T, Ohba K, Nakayama Y. Development of Completely Autologous Tissue Valved-Conduits BIOVALVES; Mold design and Transplantation Study in Beagle Model. The Society for Heart Valve Disease 6th Biennial Meeting. 2011 June 25-28 Barcelona, Spain.
- ⑫ Yamanami M, Uechi M, **Kanda K**, Tajikawa T, Ohba K, Nakayama Y. Development of a completely autologous valved conduit with the sinus of valsalva using in-body tissue architecture technology. 16th World Congress on Heart Disease Annual Schientific Sessions 2011. 2011 July 23-26 Vancouver, Canada
- ⑬ Yamanami M, Uechi M, **Kanda K**, Tajikawa T, Ohba K, Nakayama Y. 他 Successful replacement of beagle pulmonary valves by in vivo tissue-engineered valved-conduits with the Sinus of valsalva (BIOVALVES). ESC congress 2011. (European Society of Cardiology) 2011 AUG 27-31 Paris France
- ⑭ Yamanami M, **Kanda K**, Tajikawa T, Ohba K, Nakayama Y. 他 Feasibility study of in-body tissue-engineered, completely autologous valved conduits (BIOVALVES type IV) as an aortic valve in a goat model.. ESC congress 2011. (European Society of Cardiology) 2011 AUG 27-31 Paris France
- ⑮ Yamanami M, Yahata Y, Uechi M, Takekawa Y, Shimakawa Y, Matsui T,

- Tajikawa T, Ohba K, **Kanda K**, Yaku H, Tatsumi E, Nakayama Y. Preparation of a completely autologous valved conduit with the open form of trileaflets (Type VI Biovalve). 4th Joint ESAO-IFAO Congress 2011. 2011 OCT 9-12 Porto, Portugal
- ⑩ Nakayama Y, Tajikawa T, Ohba K, **Kanda K**, 他. Architecture design of a novel separable mold to obtain autologous tissue heart valves "Biovalves" non-invasively. 4th Joint ESAO-IFAO Congress 2011. 2011 OCT 9-12 Porto, Portugal
- ⑪ Takewa Y, Nakayama Y, **Kanda K**, Tajikawa T, Ohba K 他. Successful Aortic Valve Implantation Using an In-Body Tissue-Engineered, Completely Autologous Valve Conduit (BIOVALVE) in a Goat Model. American Heart Association Scientific Sessions 2011. 2011 Nov 12-16 Orlando, USA.
- ⑫ Uechi M, Tajikawa T, Ohba K, **Kanda K**, Nakayama Y. 他 Transcatheter Implantation of Autologous in vivo Tissue-Engineered, Valved Stents (BIOVALVED STENTS) in the Pulmonary Position in a Beagle Model. American Heart Association Scientific Sessions 2011. 2011 Nov 12-16 Orlando, USA.
- ⑬ 中山康秀、神田圭一他 折り紙から組木細工へセルフリー再生医療デバイスの設計 第48回 日本人工臓器学会総会 2010年11月18-20日 仙台
- ⑭ 山南将志、神田圭一、中山康秀他 生体内組織形成技術を用いた結合組織のみからなる BIOVALVE 心臓代用弁のビーグル肺動脈弁自家移植と移植後の組織変化 第48回 日本胸部外科学会総会 2010年10月24-27日 大阪
- 21 山南将志、神田圭一、夜久均、中山康秀他 生体内組織形成技術による自家組織のみからなる BIOVALVE 心臓代用弁の開発：ビーグル肺動脈弁自家移植後の組織変化 第110回日本外科学会定期学術集会 2010年4月8-10日名古屋
- 22 K. Kanda, H Yaku, Y Nakayama. In Vivo Tissue Engineered Heart Valves ISHR (International Society of Heart Reserch) World Congress 2010 2010年5月13-16日 京都
- 23 T. Oie M. Uechi, **K. Kanda**, Y. Nakayama 他 EVALUATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF IN

VIVO TISSUE- ENGINEERED PROSTHETIC HEART VALVES, "BIOVALVES" European Society for Artificial Organs: Annual Meeting 2010 2010年9月8-11日スコピエ(マケドニア)

- 24 M. Yamanami, K. Kanda, Y Nakayama, 他 Successful Replacement of Beagle Pulmonary Valves by In Vivo Tissue-Engineered Valved-Conduits with the Sinus of Valsalva: Completely Autologous Tissue "BIOVALVES". 5th Word Congress of Preventive & Regenerative Medicine. 2010年10月5-7 ハノーファー(ドイツ)
- 25 M Yamanami, K Kanda, Y 他 Completely Autologous Valved-Conduit With the Sinus of Valsalva (BIOVALVES) Constructed by in vivo-Tissue Engineering: Successful Pulmonary Valve Replacement in Beagle Model. American Heart Association: Annual Meeting 2010年11月15-8日 シカゴ(アメリカ)

他

[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

神田 圭一 (KEIICHI KANDA)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：60295649

(2) 研究分担者

高見沢 計一 (KEIICHI TAKAMIZAWA)
国立循環器病センター研究所・生体工学部・室員
研究者番号：10163312

大場 謙吉 (KEIKICHI OHBA)
関西大学・工学部・教授
研究者番号：30029186

田地川 勉 (TSUTOMU TAJIKAWA)
関西大学・工学部・講師
研究者番号：80351500

上地 正実 (UECHI MASAMI)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：90296426

(3) 連携研究者