

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893303

研究課題名(和文) LED体内照射による組織形成促進化技術の確立：ステント付バイオバルブへの応用

研究課題名(英文) Promotion of in vivo autologous tissue formation by light emitting diode:  
Application to development of Stent Biovalve

研究代表者

船山 麻理菜 (Funayama, Marina)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究開発基盤センター・研究員

研究者番号：30713599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は任意の形状の移植組織体を患者体内で作る手法「生体内組織形成術」にて、自己組織由来心臓代用弁(バイオバルブ)と自己拡張性ステントを一体化させたステント付バイオバルブを開発してきた。しかし、生体の能動的な細胞遊走に依存する従来法では、弁葉作製の確実性が障害となっていた。本研究では、体内からの光照射により組織形成の活性化を図ると共に、弁葉形成過程を非侵襲的かつ経時的に観察する技術を確立した。これらの評価を基に、鑄型構造を抜本的に改良し、要となる弁葉形状を任意に調整可能な新たなステント付バイオバルブを開発し生体内移植評価にて肺動脈弁としての有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Surgical valve replacement is an efficacious treatment for patients with cardiovascular disease, however the artificial heart valves have limitations regarding their durability. The in-body tissue architecture (IBTA) technology is a novel technique based on the tissue encapsulation phenomenon. Using this technology, autologous self-expanding valved stent, named Stent Biovalve, could be made simple and safe. However, the limited leaflet formation through the tissue migration was a serious problem. To solve this limitation, we have firstly established an effect on IBTA of the light radiation. Secondly, we evaluated directly and non-invasively the formation process of the leaflet tissues inside the mold. Moreover, we designed novel molds to activate leaflet formation. Finally, Stent Biovalve showed favorable hemodynamic results in pulmonary valve in beagles. Taken together, the novel method may improve a development of the functional Stent Biovalve.

研究分野：獣医学

キーワード：心臓代替弁 肺動脈弁 心血管疾患

## 1. 研究開始当初の背景

心臓弁膜症は、心臓の血液の流れを制御する心臓弁が様々な原因でうまく機能しなくなることで、血液の流れが妨げられ心臓の活動に支障をきたす疾患である。推定患者数は約 200 万人と多く、変性した弁を内科的に修復することできないため、年間 2 万人以上の患者が外科手術を受けている。既存の心臓代用弁は機械弁と生体弁があるが、耐久性に優れた機械弁は血栓性が高く、生涯抗凝固剤投与が必要である。一方、生体弁は石灰化など耐久性の限界のため若年者の使用に問題がある。近年では、自身の心臓弁を自己組織によって再生させる「弁再生」をめざし、組織工学的な手法を用いた心臓代用弁の開発が活性化している。しかし、これらの心臓代用弁の作製は特殊な専門医療機関において自己の血管前駆細胞などを含む組織を採取したあとに、生体外の高度な滅菌環境下での細胞分離、増殖、鋳型への播種、生着、培養などの長期間の煩雑な細胞操作が不可欠である。また移植後の破裂や瘤化のため、耐久性の点で問題があり、臨床応用には至っていない。従って、完成度の高い有効な心臓代用弁の開発は未だなされていない。

これまで、従来の再生医療 / 組織工学技術とは異なるアプローチで任意の形状の移植組織体を患者体内で作る手法「生体内組織形成術」を提唱してきた(Nakayama Y et al. J Bio Med Part B 2009)。本手法により体内を培養場として、鋳型基材を生体内に留置するだけで人工物を全く含まず完全に自己組織からなる心臓代用弁(バイオバルブ)の作製が可能となり、力学的・構造的に極めて近いバイオバルブは、動物実験にて有用性が示された(Yamanami M et al. Circulation 2011)。高価で煩雑な組織培養技術が不要でありながら、免疫拒絶反応や感染のリスクが無く、内皮化し恒久的な心臓弁として機能することが期待できる。また、自己修復能と成長適応性を併せ持つため小児分野での需要が期待される。さらに、自己拡張性ステントとバイオバルブを一体形成させたステント付バイオバルブは経カテーテル移植が可能であり、高齢でハイリスクな患者へも適応可能となる。ステント付バイオバルブは構造的かつ機能的にも大きな利点をもつが、複雑な形状の基材を使用して作製するため、作製期間が長く効率が悪い。臨床応用に向けた次のステップとして、十分な強度をもつステント付バイオバルブが短期間で安定して作製できることが求められる。

## 2. 研究の目的

コラーゲンによるカプセル化現象を応用した「生体内組織形成術」により、心臓弁(バイオバルブ)の開発に成功し、動物実験で有用性を示してきた。組織の成長が期待でき移植後の内皮化が得られるため、安全で再移植手術が不要かつ医療コストが削減可能な、理

想的な心臓代用弁となり得る。生体内組織形成術によりバイオバルブと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は、自己拡張能を有し、移植操作性の高い利点がある。しかし、従来の鋳型内部の隙間に弁葉を形成させる方法では、弁葉作製の確実性に難点を有していた。そこで本研究では、ステント付バイオバルブの安定供給を可能とするため、自己細胞を活性化させる光刺激を応用しステント付バイオバルブを短期間で作製する技術を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 光照射基材の仕様設定

光の放射照度、至適照射時間、光波長および光照射基材内での照射域の仕様を決定することを目的に、LED (wavelength 472 nm) を組み込んだ光照射用シリコン製鋳型を作製し、ラットの皮下へ埋入した。一定期間埋入後に鋳型表面に形成された組織について、組織膜厚、最大弾性率、接触荷重等を測定した。

### (2) 弁葉形成過程可視化技術の確立

生体内で形成される弁葉組織は、生体の治癒過程として能動的な組織遊走によって形成される。しかし、鋳型内部の弁形成孔への組織遊走は、皮下組織に直接接合した導管部と比較して緩徐である。そこで、ステント付バイオバルブ用光照射鋳型の作製にむけ、基材の形状、照射域を設定するために、ワイヤレス・カプセル内視鏡を利用して、弁形成過程を直接かつ非侵襲的に観察できる鋳型を開発するとともに、鋳型内部の弁組織の形成完了時期について評価した。

### (3) ステント付バイオバルブ鋳型の作製

弁葉形成の可視化が可能となったことで、鋳型内部に弁葉が形成される従来のステント付バイオバルブでは生体内の自己組織の遊走に依存するため作製効率の安定性が低いことが判明した。そこで弁葉が鋳型内部に形成される従来の鋳型構造から、発想を転換し、個体差に影響なく確実に弁葉面積の確保が可能な新しい鋳型を作製した。

### (4) 生体内機能評価

ビーグル体内で作製したステント付バイオバルブを、体外循環下にて肺動脈弁位へ移植した。移植後は心臓超音波検査にて、肺動脈流速および肺動脈狭窄等の血行動態を評価し、移植期間終了後に組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

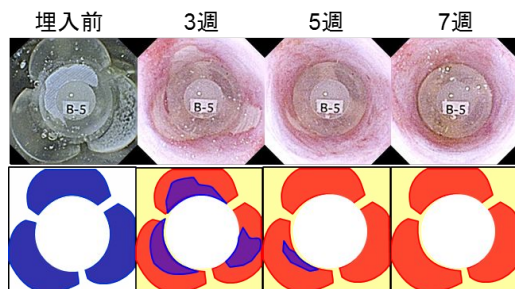
### (1) 光照射により形成された移植体評価

光照射基材は、直径 20 mm、高さ 10 mm の半円形状シリコン型に 7 つの LED を放射形状に組み込む設計とした。一定の照射条件 (current 10 mA、irradiance 15 mW/cm<sup>2</sup>) にて、光照射を実施した 2 群 (埋入 13 日目照射群および埋入 25 日目照射群) および非照

射群について最大弾性率、伸び、接触荷重および組織膜厚を測定した。それぞれ最大弾性率(2137 ± 686 kPa, 1513 ± 572 kPa, 1188 ± 277 kPa)、伸び(2066 ± 164 μm, 1542 ± 230 μm, 2616 ± 405 μm)、接触荷重(326 ± 147 g, 197 ± 92 g, 190 ± 69 g)、組織膜厚(229 ± 310 μm, 125 ± 51 μm, 398 ± 91 μm)となり、最大弾性率、伸び、接触荷重ともに、埋入後 13 日目に光照射を実施した群については力学的性質が強い傾向があった。

### (2) 弁葉形成過程の可視化

ワイヤレス・カプセル内視鏡を凸型基部に包埋した鋳型を介して、皮下埋入後の弁葉形成過程を非侵襲的かつ継続的に評価した。観察時は、カプセル内視鏡の光源により鋳型内部の弁形成孔への組織遊走が確認でき、毛細血管の発達に付随し、弁尖端から形成されることを経時的に評価できた(図1)。埋入後 63.1 ± 17.1 日で弁形成孔は完全に自己結合組織に置換され、弁組織となった。一方、組織が遊走する進入孔として、スリット溝を設計した鋳型では弁形成期間は 37.0 ± 2.8 日となり弁葉形成が促進した。本技術により、これまで鋳型を生体外に取り出さずには把握できなかった弁形成の成否判断が非侵襲的に可能となるとともに、弁葉形成部分と皮下組織が直接接触する面積の増加により弁葉形成が早く、安定性を得られることが判明した。図1. 鋳型内部の弁葉形成過程(上段:写真、下段:模式図)



### (3) 組織膜を折返すステント付バイオペルブ

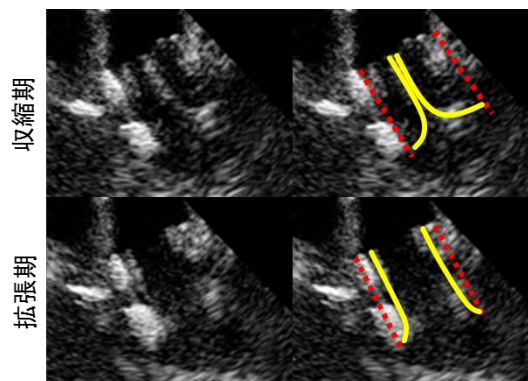
弁葉形成過程の観察結果より、弁葉形成部と皮下組織が直接接触する面積を増加するため、弁組織が鋳型内部に形成される従来のステント付バイオペルブの設計を抜本的に見直し、鋳型の外側に弁葉を形成するステント骨格を新たに設計した。このステント骨格を円柱の基材にマウントすることで、外側に形成された弁組織をステント内腔へと折り返す新しいチューブ形状の折返し型ステント付バイオペルブの鋳型とした。鋳型をビーズに埋入すると、形成された自己組織によってステントは完全に包埋され、形成された弁組織とともにステントを導管内部へ折り返すことで折返し型ステント付バイオペルブを得た。

### (4) 肺動脈弁移植による生体内評価

ステント付バイオペルブ(直径 15 mm、弁尖長 15 mm)は、デリバリーシースに内挿させ、体外循環下でビーグル犬の肺動脈弁位へ

移植した。挿入位でステントが展開したことを確認後、移植を完了した。移植直後の弁は、三枚の弁葉が素早い開閉運動を示した(図2)。移植 1 週目(2.9 ± 0.9 m/s)と比較して移植 3 カ月目(2.8 ± 0.5 m/s)まで肺動脈流速に有意差は認められず、肺動脈狭窄は確認されなかった。

図2. 移植直後の弁葉像(左:心臓超音波像、右:弁葉部を黄色ラインにて示した)



移植 3 カ月後に摘出すると、弁葉表面を内皮細胞が被覆すると共に、弁交連部とステントを取り巻くように自己組織が完全に被覆した。体内で弁葉部と導管部を一体成形させることで、移植 3 カ月後まで全例で弁機能の維持が認められ、導管部を含めた組織再生に優れていた。本研究では、個体差に関わらず、生体の治癒プロセスにより安定したステント付バイオペルブが形成できる可能性が示された。

### 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3件)

全て査読有。

1. 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*. DOI 10.1007/s10047-015-0820-6
2. Funayama M, Takewa Y, Oie T, Matsui Y, Tatsumi E, Nakayama Y. In situ observation and enhancement of leaflet tissue formation in bioprosthetic "biovalve". *J Artif Organs*. 18(1):40-47, 2015.
3. Funayama M, Matsui Y, Tajikawa T, Yamanami M, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y, Uechi M. Successful implantation of autologous valved conduits with self-expanding stents (Stent Biovalves) in pulmonary valve in beagle dogs. *J Vet Cardiol*. 17(1):54-61, 2015.

[学会発表](計8件)

1. Funayama M. Slit structure enabled the preparation of in vivo autologous valved

conduits with large leaflet area. ESAO 2015 XLII annual ESAO conference 2015 年 9 月 2 ~ 5 日 ( Leuven, Belgium )

2. Funayama M. Development of an autologous valved conduit (type IX biovalve) using a caged mold. ESAO 2015 XLII annual ESAO conference 2015 年 9 月 2 ~ 5 日 ( Leuven, Belgium )

3. Funayama M. In vivo tissue-engineered, autologous, valved conduits “biovalves” with robust wall tissues. ESC Congress 2015 2015 年 8 月 29 日 ~ 9 月 2 日 ( London, United Kingdom )

4. 船山麻理菜、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 2015 年 6 月 19 ~ 21 日 ( 埼玉県大宮市 )

5. 船山麻理菜、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 2015 年 3 月 19 ~ 21 日 ( 神奈川県横浜市 )

6. 船山麻理菜、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 回日本再生医療学会 2015 年 3 月 19 ~ 21 日 ( 神奈川県横浜市 )

7. 船山麻理菜、2 種類のチューブ型ステント付バイオバルブの肺動脈移植による生体内機能評価、第 52 回日本人工臓器学会、2014 年 10 月 17 ~ 19 日、京王プラザホテル札幌 ( 北海道札幌市 )

8. 船山麻理菜、自己組織からなる弁葉反転型ステント付バイオバルブの肺動脈移植、第 100 回日本獣医循環器学会、2014 年 6 月 14 ~ 15 日、大宮ソニックシティ ( 埼玉県大宮市 )

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

船山 麻理菜 ( FUNAYAMA MARINA )

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究開発基盤センター・研究員

研究者番号 : 30713599