

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10223

研究課題名(和文) 脱細胞心臓・血管マトリックスへの分化細胞生着による移植グラフトの作成

研究課題名(英文) Tissue engineering using decellularized whole heart

研究代表者

北原 大翔 (Kitahara, Hiroto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70594729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脱細胞化技術を用いて死体心から新たな移植用心臓を作成することである。我々はブタ心臓の最適な脱細胞化・再細胞化のプロトコルを確立・定型化させた。また、得られた脱細胞化心臓を組織学的に解析し、三次元構造を保つ細胞外骨格が十分に残存し、細胞成分が効果的に除去されていることを証明した。又、脱細胞化心臓の他ブタへの異所性移植を行い、吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれていることを証明するとともに、血管内造影検査にて冠動脈および心腔内の血流を確認した。ラットの脱細胞心臓から脱細胞化パッチを作成し、他ラットへ移植する手技を確立し、脱細胞化パッチに対する生体組織からの細胞遊走を観察した。

研究成果の概要(英文)：Our goal is to create a whole beating heart fabricated on an organ scaffold for human heart transplantation. We successfully performed the first heterotopic transplantation of a decellularized whole porcine heart with mesenchymal stem cells. The porcine heart was harvested following cardiac arrest induced by a high-potassium solution and stored at -80 °C for 24 hours. The porcine heart was completely decellularized and sterilized with gamma irradiation. Cultured mesenchymal stem cells were collected and either infused into the ascending aorta or injected directly into the left ventricular wall. Finally, recellularized whole-heart scaffolds were transplanted into pigs under systemic anti-coagulation treatment with heparin. Coronary artery angiography of the transplanted heart graft was performed. The scaffolds endured surgical procedures, and we detected short-term coronary artery perfusion in the transplanted scaffolds by angiography.

研究分野：心臓移植

キーワード：脱細胞化 心臓 再細胞化 心筋再生 心臓移植 補助人工心臓

### 1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する現時点での最終的な治療法は心臓移植である。しかしながら、本邦では著しいドナー不足が続いており、移植待ち患者数は年々増加し、移植待機期間は2年にまで及んでいるのが現状である。移植待機患者の9割は補助人工心臓による治療、いわゆる bridge to transplantation が行われている。近年補助人工心臓を重症心不全の最終的な治療法とする Destination therapy が欧米で開始され、今後国内でも広く適応されることが予想されるが、塞栓症や感染などの術後合併症が多く現時点では完全な治療法とは言えない。また、心臓の心筋細胞移植治療に対する期待は年々高まってはいるものの未だ実用化にはほど遠いのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体組織の脱細胞化技術を応用し、重症心不全の新たな治療法を確立することである。脱細胞化の特徴は細胞を全て除去しながらも本来の三次元構造が十分に保持され、細胞成熟に必須な微細血管構造を保つ点である。生体組織の脱細胞化技術を用いて作成した死体心の3次元スキャフォールドに、ヒト胎児付属物由来の間葉系細胞を生着させ、心筋分化誘導分子により高率な心筋分化を促すことで、補助人工心臓、および移植心を作成し、脳死ドナーに頼らない重症心不全治療の実現化を最終的なゴールとして研究を遂行している。ヒト胎児付属物由来間葉系細胞と心筋分化誘導分子を用いることで、心筋への分化誘導効率の向上が得られ、ポンプ機能に優れた臓器が得られる。心臓移植において深刻かつ最大の問題である移植心不足の解消への切り札として移植心の創造をゴールとする。

### 3. 研究の方法

これまでに我々は Ott らの Rat 心臓を用いた脱細胞化によるマトリックスの保持・臓器の作製法に習い (Ott HC, Nat Med, 2008) プタ心臓の脱細胞化にすでに成功している。また、脱細胞化に適した温度、流速、圧などの調整を行える独自の効率的な脱細胞化システムを開発し、これを用いてチャンバー内での心臓の脱細胞化を定型化した (図1)。又、得られた脱細胞化心臓を他のブタへ異所性移植し (図2) 脱細胞化臓器の中に吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれている

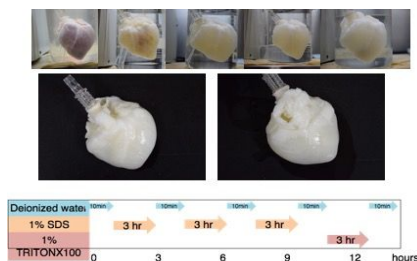


図1 心臓の脱細胞化過程

ことを証明するとともに、血管内造影検査にて冠動脈および心腔内の血流を観察した (図3)。

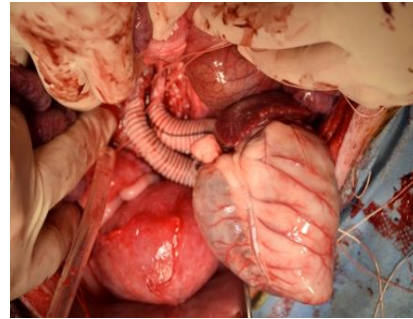


図2 脱細胞化心臓の異所性移植

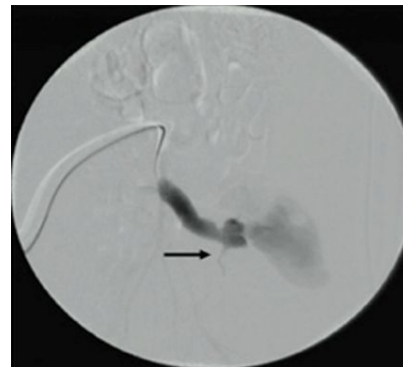


図3 脱細胞化心臓の冠動脈造影

生体組織内への移植後に起こる脱細胞化組織内への細胞遊走に関する詳細な分析を行うため、Rat の肝臓、腎臓で既の実現されている脱細胞化マトリックスへの生体細胞の遊走現象 (Y. L. Yu, Biomaterials, 2014) に関して、心臓で同様の実験を行い血管内皮細胞などの遊走現象を認めた。

全脱細胞化心臓の研究と同時に、部分脱細胞化心臓の組織補填材料としての使用の有用性についても研究を遂行した。脱細胞化心臓の生体組織に対する生着性、細胞遊走の誘導型としての可能性を探るため、脱細胞化心臓の左室を切離し、他ブタの左室側壁への部分移植を行った。3ヶ月後、移植された脱細胞骨格を摘出し病理学的に観察し、HE染色、免疫染色にて心筋細胞の遊走を示唆する所見を認めた。また、脱細胞化した心臓から僧帽弁複合体を取り出し、他心臓に移植し弁が正常に機能するかなどを確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) ブタ全心臓脱細胞化

脱細胞化心臓の病理組織学的評価により、三次元構造を保つ細胞外骨格が十分に残存し、細胞成分が効果的に除去されていることが示された。又、脱細胞化心臓を他のブタの腹部大動脈、下大静脈にそれぞれ吻合し異所性移植を行い、吻合可能な強度を持つ血管構

造が保たれていることを証明するとともに、血管内造影検査にて冠動脈および心腔内の血流を確認した(図3)。脱細胞化骨格と人工血管、あるいは生体組織との吻合は問題なく施行可能であり、血液のリークなどは認めなかった。しかしながら、再還流直後に認められた冠動脈の血流は、5日後に移植脱細胞心臓を採取した際には完全に血栓により途絶してしまっていた。現在血栓予防として血管内皮細胞などの脱細胞化心臓への移植実験を進めている。

脱細胞化心臓の再細胞化に関しては、清潔環境下での培養液の還流ルートを経冠動脈的に構築し、ブタ心臓細胞骨格に段階的、あるいは直接間葉系幹細胞を注入するシステムを構築した。再細胞化後の病理学的評価から生着率の検討を行った。得られた再細胞化心臓を他ブタの腹部大動脈・下大静脈間に異所性移植して、血管の疎通性について再度検討を行った。移植後、同様に冠動脈に血栓閉鎖を認めた。脱細胞化臓器、再細胞化臓器の血栓予防が次なる課題であると考えられた。

## (2) 脱細胞化心臓パッチ

左室心筋組織の補填材料として脱細胞化心臓骨格の可能性について検討するため、脱細胞化心臓をパッチ化し、ブタ心臓への貼り付けを行った(図4)。

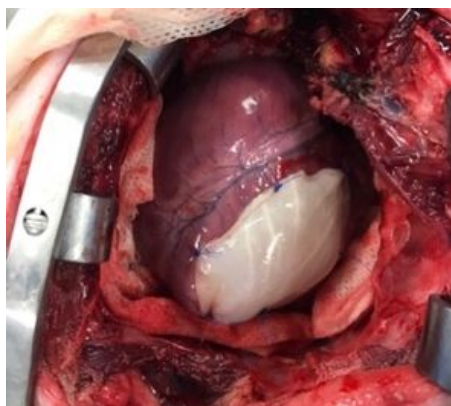


図4 脱細胞化心臓パッチの貼り付け

準備実験の段階であるため、ブタ正常心筋上に脱細胞化された心筋骨格を単純に貼り付け、長期生存可能性、貼り付け後の組織の病理学的評価を行った。貼り付け後3ヶ月で再開胸し心臓を観察した。心臓パッチは心表面に接着し、感染兆候、壊死は認めなかった。心停止後、心臓を採取し、パッチ部位を病理学的に観察した。HE染色にてパッチ内への細胞の遊走を認め、免疫染色を行ったところトロポニンTやActininに染色される部位を認め(図5、6)、パッチ内への心筋細胞の遊走を示唆する所見を認めた。

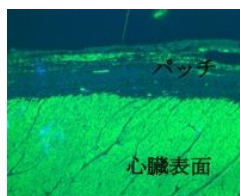


図5 Tnt 染色

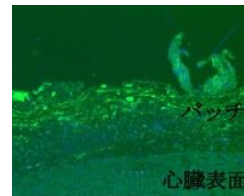


図6 Actinin 染色

## (3) 脱細胞化僧帽弁複合体

脱細胞化技術を用いた僧帽弁複合体(乳頭筋、腱索、弁尖、弁輪)人工弁の開発についても研究を試験的に行った。脱細胞化僧帽弁複合体(図7)の死体ブタ心臓への移植を行い、正常の弁の機能を果たす可能性を確認した(図8)。今後はヒトの僧帽弁手術と同じ方法で、人工心肺、心停止下で脱細胞化ブタ僧帽弁複合体の生体内への移植を行い、移植後の弁の強度や性能などについて評価を行う予定である。

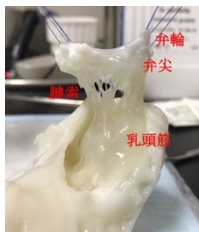


図7 僧帽弁複合体



図8 植え込み後

## 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18件)

### 1. 北原大翔, 他4

Morbid obesity does not increase morbidity or mortality in robotic cardiac surgery. *Innovations (Phila)*. 2017; 12(6): 434-439. 査読有  
doi: 10.1097/IMI.0000000000000435

### 2. 北原大翔, 他1

Extracorporeal membrane oxygenation therapy for postcardiotomy cardiogenic shock. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017 Aug; 154(2): 478-479. 査読有  
doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.03.065.

### 3. 北原大翔, 他1

Left ventricular assist device explant versus decommission for myocardial recovery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017

Jul; 154(1): 171-172. PMID: 28438328

查読有

doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.03.123.

4. 北原大翔、他 6

Cerebral circulation estimated by laser speckle flowgraphy in retrograde femoral arterial perfusion during minimally invasive cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017 July; 25(1): 25-29.

查読有

doi: 10.1093/icvts/ivx046.

5. 北原大翔、他 3

Bow Hunter syndrome elicited by vertebral arterial occlusion after total arch replacement. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017 May; 24(5): 806-808.

查読有

doi: 10.1093/icvts/iw445

6. 北原大翔、他 6

Implantation of a Left Ventricular Assist Device for Danon Cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg.* 2017. Jan; 103(1): e39-41.

查読有

PMID: 28007270

7. 北原大翔、他 6

A delayed splenic rupture after transcatheter arterial embolization required total splenectomy in a patient with an implantable left ventricular assist device. *J Artif Organs.* 2016;19.: 392-395.

查読有

PMID: 27430944

8. 北原大翔、他 5

Modified transiliac artery approach for transcatheter aortic valve implantation. *Cardiovasc Interv Ther.* 2017 Apr; 32(2): 196-198. Epub 2016 Apr 22.

查読有

PMID: 27106920

9. 北原大翔、他 3

Palliative Mitral Valve Repair During Infancy for Neonatal Marfan Syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2016 May; 101(5): 1987-8.

查読有

PMID: 27106438

10. 北原大翔、他 1 1

Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2016 May; 22(5): 571-9.

查読有

PMID: 26902852

11. 北原大翔、他 9

Preservation of mobility of the posterior mitral leaflet after mitral valve repair with neochordae using loop technique. *Circ J.* 2016 Jan 20; 80(3): 663-667.

查読有

PMID: 26794152

12. 北原大翔、他 5

Kinked Graft and Anastomotic Stenosis-induced Hemolytic Anemia Requiring Reoperation. *Ann Vasc Surg.* 2016 Jan; 30: 308. e1-4. Epub 2015 Oct 31.

查読有

PMID: 26524134

13. 北原大翔、他 8

Hybrid endovascular repair for intercostal patch aneurysm after thoracoabdominal aortic replacement. *Ann Vasc Dis.* 2015; 8(4): 340-342.

查読有

PMID: 26730265

14. 北原大翔、他 8

Alternative peripheral perfusion strategies for safe cardiopulmonary bypass in atrial septal defect closure via a right minithoracotomy approach. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2016; 64(3): 131-7. Epub 2015 Dec 8.

查読有

PMID: 26645378

15. 北原大翔、他 9

Successful management of severe unilateral re-expansion pulmonary edema after mitral valve repair with mini-thoracotomy using extracorporeal membrane oxygenation. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2017 Mar; 65(3): 164-66. Epub 2015 May 25.

查読有

PMID: 26411573

16. 北原大翔、他 3

Emergency Endovascular graft repair of computed tomography-detected disruption of bilateral aorto-bi-iliac graft legs. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015; 21(3): 391-2.

查読有

PMID: 26069340

17. 北原大翔、他 7

Management of Aortic Replacement-Induced Chylothorax by Lipiodol Lymphography. *Ann Vasc Dis.* 2015; 8(2): 110-2.

査読有

PMID: 26131032

18. 北原大翔、他 5

Management of Right Atrial Hemangioma in a Patient with Antithrombin Deficiency. Ann Thorac Surg. 2015; 99(3): e53-5.

査読有

PMID: 25742857

〔学会発表〕(計6件)

1. 北原大翔、大動脈モデルにおける全心臓脱細胞化法の確立、第20回冠動脈外科学会学術大会、2015年
2. 北原大翔、Decellularized whole porcine heart for transplantation. The XLII Congress of the European Society for Artificial Organs、2015年
3. 北原大翔、全脱細胞化ブタ心臓の同種異所性移植法の検討、第63回日本心臓病学会学術集会、2015年
4. 北原大翔、脱細胞化・再細胞化ブタ心臓の異所性移植、第51回日本移植学会総会、2015年
5. 北原大翔、Heterotopic transplantation of decellularized heart in a large animal model、The 29th EACTS Annual Meeting. Amsterdam、2015年
6. 北原大翔、脱細胞化技術を用いた移植心臓の作成に向けて。-ブタ脱細胞心臓の異所性移植-、第53回日本人工臓器学会大会、2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

北原 大翔 (KITAHARA, HIROTO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70594729

(2)研究分担者

岡本 一真 (OKAMOTO, KAZUMA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10338064