

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08767

研究課題名(和文) 胸腺組織を活用する圧力印加組織工学による小児心臓弁の開発

研究課題名(英文) Tissue-Engineered Heart Valve from Three-Dimensional Multilayers of the Cellular Component Created by Periodic Exposure to Hydrostatic Pressure

研究代表者

内藤 祐次 (YUJI, NAITO)

東京医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60328466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：先天性心疾患根治術において抗凝固療法不要、成長能を有する理想の小児心臓弁の開発は長年の課題である。新しい手法である圧力印加組織工学、および術中廃棄される胸腺から間葉系幹細胞を分離し、心臓弁パッチの作成を試みた。細胞源を胸腺由来間葉系幹細胞から、ヒト臍帯動脈平滑筋細胞へ変更し、細胞の積層、および圧力印加による心臓弁パッチの作成に成功した。作製したパッチをヌードラットの腹部大動脈に移植し、3週、3ヶ月、5ヶ月後に形態評価、組織学的評価を行った。移植術を行った17例中、16例は全例生存し、移植部の大動脈は開存し狭窄、瘤形成を認めなかった。組織学的に内腔側は内皮で覆われ、弾性線維の新生を認めていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性心疾患は100人の出生に1人という割合で生じ、その治療成績の改善に伴い遠隔期に再手術を必要とされる症例が増加している。その主たる原因が、幼少期に使用された人工補填物の血栓形成、石灰化、変性、狭小化に伴う血行動態の悪化である。理想的な人工補填物は、生体組織に適合し、血行動態に悪影響を及ぼさないようにリモデルするよう設計されなければならない。本研究において作成されたパッチ素材は、組織工学にて従来使用されていた人工の異物である鋳型を含まず、完全な生体組織のみで作成されており、生体適合性において他の素材を凌駕するものと考えられる。先天性心疾患における革新的な治療につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：A biological tissue-engineered heart valve (TEHV), which has growth potential and does not require anticoagulation, has considerable potential to improve the outcome for children with congenital heart disease. Patch material used in TEHV was fabricated from a previously reported method in which three-dimensional multilayers of the cellular component were created by periodic exposure to hydrostatic pressure with repeated cell seeding. Initially, mesenchymal stem cells from the thymus were planned for repeated cell seeding, however, it was changed to human umbilical cord cells because of technical issues. Patch material was implanted in the abdominal aortas of nude rats (n=17). Sixteen rats survived, and implanted patch material withstood arterial pressure for more than 5 months duration with no aneurysmal formation.

研究分野：再生医療

キーワード：圧力印加 先天性心疾患

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患は出生約 1%の確率で生じ、その根治手術には人工補填物(バイオマテリアル)を必要とする。ファロー四徴症根治術、Rastelli 手術、Ross 手術等で使用される右室流出路再建用のマテリアルとして、ePTFE、自己心膜、同種組織(ホモグラフト)、異種組織(ウマ心膜パッチ、ウシ静脈弁、異種脱細胞化組織等が汎用されているが、血栓形成、感染源、患児の成長に伴う狭小化・劣化・石灰化といった問題から再手術が必要となり、患児の QOL を著しく低下させている。

抗凝固療法を必要とせず、成長能を有する理想の小児心臓弁の開発は、組織工学分野の長年の課題であり、さまざまな手法が試されてきたが、臨床応用に至っていない状況が続いている。生分解性ポリマーを鋳型(Scaffold)とした手法において、ポリマー消失に伴う組織形成は、炎症反応を誘起して生じる線維形成のため、ポリマー移植を受けた宿主の免疫応答に規定され、組織強度・弾性(機械的特性)の制御が困難である。また、脱細胞化組織を鋳型(Scaffold)とした手法では、異種組織を脱細胞化しており、その抗原性から遠隔期に弁の劣化をきたすことが報告されている¹⁾。さらに、同種組織であっても抗原性を完全に取り除くことは困難で、またその供給には限界がある。

培養細胞に圧力負荷を与えて組織形成を試みる方法は、新しい組織工学的手法で、生理的な三次元組織形成を遂行できる。われわれのグループは、この手法を用いて、動脈圧に耐えうる血管組織の再生に成功している²⁾。組織学的に Collagen, Elastin の形成は正常組織と同等であり、弁組織への応用は潜在的に可能なものと考えられる。

胸腺組織は、小児心臓手術時に解剖学的な理由から部分切除され、廃棄されているため、分離される間葉系幹細胞を細胞源として用いる方法を考案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗凝固療法を必要としない、成長能を有する心臓弁の開発を通して先天性心疾患患児の遠隔期 QOL を改善することにある。

3. 研究の方法

3-1. ラット胸腺組織から間葉系幹細胞の分離精製：ラットの胸腺組織を採取、重量の計測を行い、組織処理、細胞培養を行った。

3-2. 分離精製された間葉系幹細胞、ヒト臍帯動脈平滑筋細胞に圧力印加による細胞刺激を行い弁組織として応用可能なパッチを作製した。(細胞源の変更が必要となり、細胞源をヒト臍帯動脈平滑筋細胞へ変更。)ヒト臍帯動脈から平滑筋細胞を分離、培養し、フィブロネクチンでコーティングしたアテロコラーゲン膜上に細胞を播種した。24 時間インキュベータ内で静置させた後に加圧装置内に移し、低酸素で周期加圧を 24 時間加えた(110-180 kPa, 0.002 Hz, O₂=1%)。この工程を 10 回繰り返して細胞を積層し、多層細胞シートからなる弁組織パッチを作製した。

3-3. 弁組織パッチの組織学的、分子生物学的、および生体力学的解析：作製された弁組織パッチより組織切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色、マツソントリクローム染色、エラスチカ染色、免疫染色を行った。機械的特性の計測は Yokoyama ら²⁾の方法に従い行った。

3-4. ノードラットを使用した移植実験：ノードラットの腹部大動脈に作成した細胞シートを移植し、移植後 3 週間、3 ヶ月、5 ヶ月で超音波検査による形態、開存性の確認、組織学的評価(ヘマトキシリンエオジン染色、マツソントリクローム染色、エラスチカ染色、免疫染色)を行った。

4. 研究成果

研究計画にて細胞源として使用を計画していた胸腺組織からの間葉系幹細胞は、細胞の増殖が十分に得られず、継代は困難であった。そのため、細胞源の変更を行い、ヒト臍帯動脈平滑筋細胞を使用する方針へ変更した。ヒト臍帯動脈平滑筋細胞を用いて、細胞の積層、および圧力印加による細胞シートの作成に成功した。作製した細胞シートの破断応力は 2132mmHg ± 227mmHg で、体血圧を超える大きさであった。作製した細胞シートをノードラットの腹部大動脈に移植し、3 週間、3 ヶ月、5 ヶ月に組織学的評価を行った。移植術を行った 17 例中、1 例は移植後 2 日目に縫合不全による出血で死亡したが、16 例(3 週間: n=6, 3 ヶ月: n=6, 5 ヶ月: n=4)は全例生存し、超音波検査にて移植部の大動脈は開存し狭窄所見を認めなかった。移植部の内腔側は内皮で覆われ、弾性線維の新生を認めていた。

参考文献

1. Padalino MA, Castaldi B, Fedrigo M, et al. Porcine Intestinal Submucosa (CorMatrix) for Semilunar Valve Repair in Children: A Word of Caution After Midterm Results. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2016; 28 : 436-445

2. Yokoyama U, Tonooka Y, Koretake R, et al. Arterial graft with elastic layer structure grown from cells. *Sci Rep* 2017; 7: 140

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shota Tanifuji, Yuji Naito, Tomoyuki Kojima, Takuya Naruto, Michiya Matsusaki, and Utako Yokoyama
2. 発表標題 Three-dimensional multilayers of smooth muscle cells acquire arterial physiology
3. 学会等名 NIPS International Workshop 2020
4. 発表年 2020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	横山 詩子 (Yokoyama Utako) (70404994)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------