

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659641

研究課題名(和文)新発想再生医療技術による完全自己組織大動脈弁の開発研究

研究課題名(英文)Development of completely autologous aortic valves by a novel concept of regenerative medicine

研究代表者

高見沢 計一 (TAKAMIZAWA, Keiichi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：10163312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁用のバルサルバ洞を有する三葉弁形状を作製するために、生体心臓弁の形状を忠実に再現できる3Dプリンターを用いて型を作った。型を2ヵ月間皮下に埋入することで、コラーゲンと線維芽細胞からなる完全に自家結合組織によるバイオバルブが得られた。拍動流循環回路を用いた生体外実験において、少なくとも10日間の優れた弁機能の耐久性が得られた。バイオバルブをヤギに心尖-大動脈バイパス法で移植した。僅かな逆流で弁葉の動きはスムーズであった。1月後弁葉は滑らかで白く血栓形成は無かった。機能的で臨床応用の可能性を有する3次元形状心臓弁が設計した型を体内に埋入することで形成できた。

研究成果の概要(英文)：A 3D printer, which can easily reproduce the 3D-shape and size of native heart valves, was used to produce the molds for a tri-leaflet, valved conduit with a sinus of Valsalva. Biovalves were obtained from completely autologous connective tissue, containing collagen and fibroblasts, within 2 months following the subcutaneous embedding of the molds. In vitro evaluation, using a pulsatile circulation circuit, showed excellent valvular function with a durability of at least 10 days. The Biovalves were implanted in goats through an apicoaortic bypass procedure. Smooth movement of the leaflets with minimal regurgitation were observed. After 1 month of implantation, smooth white leaflets were observed with minimal thrombus formation. Functional, autologous, 3D-shaped heart valves with clinical application potential were formed following in-body embedding of specially designed molds.

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：心臓弁 再生医療 組織工学 移植 大動脈弁 自己組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓弁膜症の外科治療の現状

心臓弁がなんらかの原因によって働きの損なわれた状態が弁膜症である。心臓弁膜症の推定患者数は約 200 万人と意外に多く、年間約 1 万人の患者さんが手術を受けている。手術には、機械弁や生体弁と呼ばれる人工弁がほぼ全ての場合に用いられている。カーボンなどで作られた機械弁は耐久性が高いものの生涯に渡って抗凝固薬を飲み続ける必要がある。一方、ウシやブタの組織から作られた異種生体弁は耐久性が 10~15 年と短く、双方とも課題が残されている。そのため、現在の医療では満足できる人工弁は存在せず、それらに代わる再生医療による代用弁が臨床現場から切望されている。

(2) 煩雑な細胞操作が必須である再生医療の現状

近年、自分自身の細胞を使って、失われた臓器や組織を修復・再生する再生医療が新たな治療の可能性を広げるものとして注目されている。従来の再生医療によって移植用の組織体を作製するには、右図の「従来型の再生医療」に示す通り、特別な大学病院など高度専門医療機関の特殊滅菌施設内において、膨大な手間と費用と時間(数ヶ月)をかけて行われている。

2. 研究の目的

患者の体内において移植用組織体を作製できる「生体内組織形成術による新発想の再生医療」を用いて、本研究のシーズとなる肺動脈弁組織体を開発した。肺動脈弁置換は小児科領域において、先天性疾患の治療には極めて有効であると考えられる。しかし、心臓弁置換術全体を見渡すと、大動脈系の弁の損傷は全身状態に大きく影響を及ぼすために手術が必要となる場合が多く、大動脈系の弁置換術は全手術件数の 9 割以上に達している。従って、肺動脈弁に比べて大動脈弁の需要は圧倒的に多く、開発により急を要している。

しかしながら、これまでの再生医療技術によって大動脈弁が開発された例はほとんどなく、力学的に最もハードルが高い組織体の一つである。そこで本研究では、「大動脈弁」を開発するというチャレンジングな目的の達成を目指した。

肺動脈弁と大動脈弁は基本構造がほぼ同様であるため、肺動脈弁の開発で培った豊富な経験と技術は、本研究の円滑なる推進に大いに役立つと考えられた。

3. 研究の方法

(1) 「生体内組織形成術」で作製する大動脈弁様組織体の生体外力学的評価

1 大動脈弁様組織体の作製用鋳型の作製(LED 内蔵型)

3D CAD ソフトを用いて設計し、3D 加工機または 3D プリンタを用いて製作した。鋳型内には LED 照射装置と電池を内蔵させ、体内において光照射できるようにした。

2 耐圧性の評価実験

シリンジポンプと連動させた特注の水圧連続負荷内圧測定装置を用いて、破裂時の内圧値を計測した。

3 弾性率の評価実験

市販の引っ張り試験機(RE2-33005B)を用いて、連続計測する歪みと応力の関係から算出した。

また、局所的な弾性率は、開発中の走査型触覚顕微鏡を用いて細胞外マトリックスレベルの微細領域での計測も併行して行った。

4 耐久性の評価実験

国立循環器病研究センターが開発した補助人工心臓機能評価用の拍動流試験回路を用いて、加速試験を行った。37 の恒温槽内で、生理食塩水を作動流体として用いた。拍動数は通常の 3 倍の 180 回/分に設定した。また、ハイスピードカメラにて弁の開閉状態の観察を併せて行った。

4. 研究成果

(1) 大動脈弁葉組織体の開発

3D CAD ソフト(Rhinoceros)を用いて設計し、3D プリンタ(Projet HD3000)を用いて大動脈弁様組織体の作製用鋳型を作製した。鋳型内には LED 照射装置と電池を内蔵させ、体内において光照射できるようにできた。鋳型を用いてヤギ皮下で大動脈弁様組織体を作製できた。

(2) 大動脈弁葉組織体の物性

シリンジポンプと連動させた特注の水圧連続負荷内圧測定装置を用いて、破裂時の内圧値を計測し、生体動脈と同等の耐圧性を有することが分かった。

市販の引っ張り試験機(RE2-33005B)を用いて、連続計測する歪みと応力の関係から弾性率を求め、生体動脈以上の強度を有することが分かった。

(3) 大動脈弁葉組織体の生体外機能評価

国立循環器病研究センターが開発した補助人工心臓機能評価用の拍動流試験回路を用いて、加速試験を行い、37 の恒温槽内で、生理食塩水を作動流体として用いると、10 日間の機能維持を認め、耐久性に優れていることが分かった。

(4) 大動脈弁葉組織体の血液適合性評価

血液凝固実験にはビーグル犬の新鮮血中に大動脈弁様組織体を浸漬させ、37 に保つと、表面で血液凝固が起こったが、開発した水溶性アルガトロバンのコーティングによ

って、血液凝固を完全に押さえることができた。

(5) 大動脈弁葉組織体の大動物移植実験

約 60kg の体重のヤギを用いると、成人とほぼ同程度の心臓生理状態が得られるため、モデル動物としてヤギを選択した。移植実験系として心臓から下降大動脈へと人工血管でつなぐ、心尖-大動脈バイパス術を用いることを第一選択として行った。本バイパス術は、既に人工心臓の移植実験で確立された方法であり、バイパス途中で作製した心臓弁組織体を挿入して移植を行った。

一方、冠動脈再建が可能と判断されれば、大動脈弁置換の検討も考えたが、バイオバルブ作製基材の設計の変更を必要としたため、本研究では、バイパスモデルに絞って移植実験を行った。

(6) 移植後の弁機能の評価

移植直後の弁の動きは血管造影によって可視化して観察し、超音波、ならびに電磁流量計によって血流量を計測し、弁機能を経時的に調べた。また、所定期間毎に超音波エコーによって弁の動きを観察した。移植期間は研究期間内で最長3ヵ月と設定した。移植時に得られた結果は鋳型の設計などにフィードバックさせ、完成度の向上につなげた。

(7) 移植後の再生の評価

移植後に試験物を摘出し、組織切片を作製し、病理学的評価によって、再生率を調べた。免疫染色によって細胞成分を同定し、心臓弁の構成細胞の存在比率、ならびに存在範囲を求めた。また、引っぱり試験などによって移植前後での力学的な性質の変化も併せて調べることができた。

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9件)

1 Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohnuma K, Kanda K, Tatsumi E. In body tissue engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 査読有, 2014, in press. DOI: 10.1002/jbm.b.33186

2 Mizuno T, Takewa Y, Sumikura H, Ohnuma K, Moriwaki T, Yamanami M, Oie T, Tatsumi E, Uechi M, Nakayama Y. Preparation of an autologous heart valve with a stent (stent-biovalve) using the stent eversion method. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有, 2014;102:1038-1045. DOI: 10.1002/jbm.b.33086

3 Nakayama Y, Tsujinaka T. Acceleration of robust "biotube" vascular graft fabrication by in-body tissue architecture technology using a novel eosin Y-releasing mold. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 査読有, 2014;102:231-238. DOI: 10.1002/jbm.b.32999

4 Takamizawa K, Nakayama Y. Non-euclidean stress-free configuration of arteries accounting for curl of axial strips sectioned from vessels. J Biomechanical Engineering, 査読有 2013;135:114505-1-5. DOI: 10.1115/1.4025328

5 Takamizawa K, Nakayama Y. Stress distribution in a bilayer elastic model of a coronary artery. J Applied Mechanics, 査読有, 2013;16:59-65. DOI: 10.1115/1.4007863

6 Takewa Y, Yamanami M, Kishimoto Y, Arakawa M, Kanda K, Matsui Y, Oie T, Ishibashi-Ueda H, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Taenaka Y, Tatsumi E, Nakayama Y. 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, 査読有, 2013;16:176-184. DOI: 10.1007/s10047-012-0679-8.

7 Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yamamoto A, Iida H, Watanabe T, Kanda K, Yaku H, Nakayama Y. Implantation study of small-caliber "biotube" vascular grafts in a rat model. J Artif Organs, 査読有, 2013;16:59-65. DOI: 10.1007/s10047-012-0676-y

8 Moriwaki T, Oie T, Takamizawa K, Murayama Y, Fukuda T, Omata S, Nakayama Y. Observation of local elastic distribution in aortic tissues under static strain condition by use of a scanning haptic microscope. J Artif Organs, 査読有, 2013;16:91-97. DOI: 10.1007/s10047-012-0674-0

9 Nakayama Y, Hyperbranched polymeric "star vectors" for effective DNA or siRNA delivery. Acc Chem Res, 査読有, 2012;45:994-1004. DOI: 10.1021/ar200220t

[学会発表](計9件)

1 中山泰秀, 武輪能明, 上地正実, 神田計一, 川尻英長, 水野壮司, 船山麻理菜, 森

脇健司, 逢坂真吾, 田地川勉, 大家智憲, 田中孝晴, 杉浦寿史, 巽 英介. 3D プリンターによるバイオバルブ開発の可能性拡大. 第 13 回日本再生医療学会. 2014 年 3 月 4 日～6 日 (京都国際会館)

2 武輪能明, 中山泰秀, 山南将志, 熱田祐一, 岸本 諭, 伊達数馬, 住倉博仁, 大沼健太郎, 水野壮司, 神田圭一, 田地川勉, 田中孝晴, 妙中義之, 巽 英介. 人工弁の現状と今後の方向性: 自己組織からなる心臓人工弁 Biovalve の開発. 第 51 回日本人工臓器学会. 2013 年 9 月 26 日～29 日 (パシフィコ横浜)

3 中山泰秀, 武輪能明, 上地正実, 神田圭一, 大家智憲, 大野正順. 人工弁の今後の方向性: 3D プリンターの医療分野での応用: バイオバルブ開発の 3D 的発展. 第 51 回日本人工臓器学会. 2013 年 9 月 26 日～29 日 (パシフィコ横浜)

4 Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Ohmuma K, Kanda K, Tatsumi E. Systemic application of a completely autologous aortic valved conduit (BIOVALVE type VII) prepared by in body tissue architecture technology in a goat model. The Society for Heart Valve Disease, 7 th Bienarial Congress. 2013 年 6 月 22 日～25 日 (イタリア、ベニス)

5 中山泰秀, 体内バイオプロセスを用いた移植用自己組織体の自動合成. 有機合成のニュートレンド 2013. (招待講演) 2013 年 2 月 4 日～5 日 (大阪)

6 Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Matsui Y, Yamanami M, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohmuma K, Tajikawa T, Kansa K, Taenaka Y, Tatsumi E. In Vivo-Tissue Engineered Autologous Aortic Valved Conduits (BIOVALVES type VII): Preparation and Evaluation. European Society for Artificial Organs. 2012 年 9 月 26 日～29 日 (ドイツ、ロストック)

7 Nakayama Y, Tsujinaka T. Completely autologous biotube vascular grafts: eosin Y significantly promoted in vivo formation of functional biotubes in a short term. European Society for Cardiology 2012. 2012 年 8 月 25 日～29 日 (ドイツ、ミュンヘン)

8 中山泰秀, 神田圭一, 武輪能明, 上地正実, 渡辺太治, 山南将志, 生体内組織形成術: 自分の移植物を自分の体内で作れる新技術. 第 11 回日本再生医療学会 (招待講演) 2012 年 6 月 12 日～14 日 (横浜)

9 Nakayama Y, Development of cardiovascular tissues by in body tissue architecture technology. 第 11 回日本再生医療学会 (招待講演) 2012 年 6 月 12 日～14 日 (横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 3 件)

1 名称: スtent 及びスtent 付き人工弁
発明者: 中山泰秀
権利者: 国立循環器病研究センター
種類: 特許
番号: 特願 2013-010954
出願年月日: 2013 年 1 月 24 日
国内外の別: 国内

2 名称: 細胞構造体の製造方法、及び該方法により製造された細胞構造体
発明者: 中山泰秀
権利者: 国立循環器病研究センター
種類: 特許
番号: 特願 2012-149993
出願年月日: 2012 年 7 月 3 日
国内外の別: 国内

3 名称: 移植用人工組織体製造のための鋳型基材
発明者: 中山泰秀
権利者: 国立循環器病研究センター
種類: 特許
番号: 特願 2012-116780
出願年月日: 2012 年 5 月 22 日
国内外の別: 国内

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

高見沢 計一 (TAKAMIZAWA, Keiichi)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員
研究者番号: 10163312

(2) 研究分担者

中山泰秀 (NAKAYAMA, Yasuhide)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号: 50250262