

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293314

研究課題名(和文) 光造形と体内造形の融合による自家組織バイオバルブ心臓弁の開発とTAVIへの展開

研究課題名(英文) Development of autologous heart valves "biovalves" and their application to TAVI by combination of photomolding and in-body tissue architecture

研究代表者

中山 泰秀 (Nakayama, Yasuhide)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：50250262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：3Dプリンターを用いて鋳型を作製することができ、それを埋め込むことで皮下を組織構築の場にしてバイオバルブ心臓弁を作製することができた。得られたバイオバルブをビーグル犬やヤギに移植することで、高圧系及び低圧系の両方で自己弁に近い性能を持って機能し得ることを示すことができた。生きたグラフトとして生着できる可能性が高く、成人に加えて小児の大動脈弁置換や肺動脈弁置換などに対して有望な人工弁となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：The Biovalve preparation molds could be produced rapidly by using a 3D printing machine. Upon 2-month goat subcutaneous embedding aortic or pulmonary valve-shaped Biovalves were obtained from completely autologous connective tissue with collagen and fibroblasts. The three leaflet tissues were seamlessly connected with the surrounding conduit tissue, and showed homogeneous wall thickness and excellent mechanical strength that was equivalent to or more than that of the human pericardium, with individual or regional differences. As an aortic valve, in vitro evaluation of Biovalve showed excellent valvular functions. In a goat model, postoperative echocardiography after surgical replacement of the biovalves with stents showed smooth movement of the leaflets with little regurgitation under systemic circulation. In all implantation studies, the luminal surface after implantation was very smooth and fully covered with thin neointima, including endothelial cells without thrombus formation.

研究分野：再生医療工学、医療機器開発

キーワード：バイオバルブ 心臓弁 再生医療 生体内組織形成術

1. 研究開始当初の背景

心臓弁がなんらかの原因によって働かなくなつ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 2 万人以上の患者さんが手術を受けている。様々な人工機械弁や異種生体弁、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制限付きではあるが完成度の高いものである。しかし、耐久性に優れた機械弁は血栓性が高く、生涯抗凝固剤ワーファリンを投与する必要がある。また、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。また、双方で代用弁座に度々形成される過剰肉芽形成により弁機能不全に陥る危険性がある。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用にも限界がある。加えて感染症心内膜炎などの患者に良好な感染抵抗力のあるホモグラフトは圧倒的なドナー不足である。特に小児用に関しては商品が全く存在せず臨床現場から切望されている。

一方、最近血管拡張デバイスとして開発されている金属製ステントの内側に、先の生体弁と同じ素材が縫合された弁付ステントが開発され、経皮的動脈弁移植術（TAVI）が行われている。

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、特別な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をかけて行われている。欧州では高分子スキャホールドに自家細胞を培養したハイブリッド型の心臓代用弁が開発され、特に小児において右心系などの低圧系で臨床が行われた。しかし高い血圧のかかる大動脈弁への応用は破裂や瘤化のため困難とされる。

2. 研究の目的

申請者は、患者自身の組織のみで自己の移植用組織体を作製できる、全くこれまでの概念を覆す新しい再生医療技術として、「生体内組織形成術」の開発を 10 年以上前から世界に先駆けて行っている。従来の常識であった培養操作や滅菌施設を一切必要とせず、単に鋳型を皮下に入れておくだけで、ほぼ自動的に自家移植用組織体が得られる。ある種魔法の様な医療が実現可能となっている。

生体内組織形成術は、生体内に異物が侵入した際に異物周囲をコラーゲンのカプセルが覆う生体反応を利用している。ペースメーカーの電池交換などで外科医が日常的に触れているごく平凡な現象である。しかし、そのカプセル自体が有益なものとして注目されたことはほとんどない。一般に形成されるカプセル膜の厚さは数百ミクロン以下で、自立性が無いほど脆弱である。そのため、移植

片として単独で使用に耐え得るとは想像さえできなかったと考えられる。しかし、形成される組織体は、耐圧性が生体動脈の約半分の約 1000 mmHg と十分高く、また生理的な拍動負荷に追従する力学的な整合性を有していた。マウスからヤギまでの背部皮下に鋳型の埋入を行ったが、いずれでも約 4 週間には組織体を形成した。結合組織体の細胞成分は主に線維芽細胞であり、炎症性細胞はほとんど認めない。本技術を応用して、バイオチューブ人工血管、バイオバルブ心臓弁、バイオカバードステントグラフトなど主に循環器系組織体の開発を行ってきた。

例えばバイオチューブを移植すると、移植約 2 週で血管内皮化され、約 12 週で壁内は血管平滑筋細胞に置き換わり、生体血管と肉眼的に見分けがつかない程に成熟した。バイオチューブは、作製時が完成ではなく、移植によって徐々に血管組織へと置き換わる。最長 6 年の経過観察では瘤化や狭窄、石灰化は認められておらず、移植期間が長くなる程自己化され、完成度が高まる。最近では究極の目標である冠動脈バイパスへの応用をめざしてブタを使った動物実験の挑戦も始めている。自己組織であるが故の驚異的な再生能力を認識でき、「生体内組織再生術」のポテンシャルの高さに確信を持つことができた。

バイオバルブ開発は、2005 年に僅か直径 5mm の三葉弁形状の第一世代から開始した。当初は市販のシリコン部材や切削加工したアクリル部材を組み合わせ、苦労しながらバイオバルブ作製用鋳型を作製していた。その後完全自己組織型やバルサルバ洞型などへ世代を進化させたものの設計の自由度の低さから形状に大きな制限を受け、年間 1 世代のバージョンアップがせいぜいであった。そこで、医療研究機関の先駆けとして、2010 年に 3D プリンターを導入、飛躍的に開発速度が増し、2011 年にはヤギで大動脈弁移植が可能なるまでに技術レベルが向上し、6 か月の長期移植にも成功している。

本研究では、1) 小児用バイオバルブ、ならびに 2) 大動脈弁用バイオバルブと血管内治療器具のステントを組み合わせた自己組織 TAVI デバイスを併行して開発することを目的とする。小児用としてバイオバルブの生着後の成長が期待される。TAVI では、ステントの設計製造は医療機器メーカーの株式会社グッドマンと共同でデリバリーシステムを含めて研究期間内に試作する。3D プリンターを用いて研究室が半工場的な製造設備を手に入れたことによる、研究開発の試行錯誤の回転促進化（光造形）と体内で思いのままに自己組織体を形状形成できる「生体内組織形成術」（体内造形）との融合によって、本研究目標達成の可能性は非常に高く、予備的検討で一部は実現している。本研究は実用化に最短距離にあると判断され、再生医療に革新的なブレイクスルーをもたらす。

3. 研究の方法

(1)3D プリンターを用いた鋳型設計

鋳型の設計は臨床データを元に、3D-CAD ソフトを用いて行う。3D プリンターは現有の加工精度に優れる ProJet と材料選択肢の広い Objet を使用し、光造形で鋳型を製造した。小児用では実形状を重視するが、TAVI ではステント形状との組み合わせを十分に考慮した。

(2)TAVI 用ステント、デリバリーカテーテルの開発

TAVI 用ステントの素材は CoCr 合金とし、レーザーカット、電解研磨で仕上げる。加工方法、レーザー条件、曲率半径、加工精度を導出しながらヒト使用を模擬した 25mm 径を開発対象とした。大動脈弁位の解剖学的検討を行い、冠動脈の入口を阻害しない形状で、かつ鋳型とのマッチングを設計指針に組み込んだ。

(3)小児用バイオバルブと TAVI デバイスの試作

上記で作製した鋳型をビーグル犬やヤギの背部皮下に埋入して1ヶ月で目的のバイオバルブを作製した。小児用は完全自己組織体、TAVI デバイスではステントと一体化した自己組織弁様組織体化させた。また、体内での作製過程は鋳型内部に埋入したカプセル内視鏡を用いて、非侵襲で外部から観察を行った。完成度の評価は非破壊的に OCT 検査にてカラーゲン密度・厚さ・欠損計測により行った。

(4)ヒトバイオ組織体の物性・機能評価

ヒト組織での評価に関しては、既に倫理委員会の承認を得た。これまで動物にてバイオバルブの形成は確認してきたが、ヒト体内において生体内組織形成術が機能するか調べた。鋳型基材と同じシリコン製の透析チューブ周囲に形成された組織管を腹膜透析患者から提供を受け、物性（弾性率、破断強度等）を調べ、生体弁組織と比較した。また、ビーグル犬の頸動脈に異種移植を行い、免疫拒絶反応を考慮して短期間での生体内機能評価を行った。

(5)鋳型基材の生物安全性評価

臨床評価に備えて生物学的安全性を外部評価機関に委託し、細胞毒性や慢性毒性試験を行い、動物実験レベルにおいても安全性の確保に努めた。

(6)試作品の生体外機能・耐久性試験

ステント付バイオバルブに関しては大動脈弁として機能させるため特に耐圧・耐久性が要求された。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、耐圧性を調べた。耐久性は補助人工心臓機能評価用の拍動流試験回路を用いて行った。

一方、ステントフレームについては、シミュレーションで歪み試験を繰り返して設計に反映させた。

(7)TAVI バイオバルブのヤギ大動脈弁移植機

能評価

体重約 60kg のヤギを用いて、先ずは大動脈弁として機能できるのかを確かめる目的で、心臓心尖部から下降大動脈へと人工血管で接続する Apico-Aortic Bypass モデルを作製し、その間にバイオバルブを留置して生体内機能評価を行った。

次いで、開発するデリバリーと組み合わせで TAVI としての移植実験を行った。移植直後の弁の動きは血管造影によって観察し、弁前後の血圧を連続的に計測し、弁機能の経時変化を調べた。所定期間毎に超音波エコー検査を行って弁機能を調べた。移植期間は最長半年と設定した。移植後の組織変化は病理学的に行い、再生度を調べた。移植前後での力学的変化についても併せて調べた。

4. 研究成果

(1)臨床データを元に 3D-CAD ソフトを用いて鋳型の設計を行い、3D プリンターを使用して光造形で鋳型を製造した。

(2)CoCr 合金を素材として、レーザーカットと電解研磨によって TAVI 用ステント骨格を作製した。大動脈弁位の解剖学的検討を行い、冠動脈の入口を阻害しない形状で、かつ鋳型とのマッチングを設計指針に組み込んだ。

(3)作製した鋳型をビーグル犬やヤギの背部皮下に約2ヶ月埋め込むことで目的のバイオバルブを作製できた。完全自己組織体に加えて、ステントと自己組織弁様組織と一体化させた TAVI 用の2種を得た。体内での組織の形成過程は鋳型内部に埋め込んだカプセル内視鏡を用いて、非侵襲で外部から観察を行った。

(4)鋳型と同じシリコン製の透析チューブ周囲に形成された組織管を腹膜透析患者から提供を受け、物性を調べ、人体内においても丈夫な組織が形成できることを確かめた。

(5)鋳型基材として使用しているシリコン樹脂と 3D プリンター造形物のアクリル樹脂に関して、細胞レベルでの毒性試験を行い、問題が無いことを確かめた。また、ビーグル犬を用いた動物皮下への埋め込み試験において、炎症などが無いことを確かめた。臨床応用に向けた生物学的安全性を有していると判断できた。

(6)ステント付バイオバルブに関して、生体外模擬回路を用いて拍動流下での機能試験を実施し、心臓弁として良好な機能を有していることを確認した。

(7)ヤギの皮下で作製したバイオバルブを心停止下でヤギの肺動脈弁を置換することに成功し、1年半以上の生存を良好な弁機能を維持しながら継続できた。

(8)摘出したバイオバルブを組織学的に観察すると、血栓形成や石灰化は無く、弁様自体の構造が良く保たれていた。外表面は完全に内皮細胞で覆われ、内部にはエラスチン層と平滑筋細胞層が形成されていた。

以上本研究によって、皮下を組織構築の場にして作製したバイオバルブ自家組織心臓弁が、高圧系及び低圧系の両方で自己弁に近い性能を持って機能し得ることを示すことができた。生きたグラフトとして生着できる可能性が高く、成人に加えて小児の大動脈弁置換や肺動脈弁置換などに対して有望な人工弁となることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Sumikura H, Nakayama Y, Ohnuma K, Takewa Y, Tatsumi E.
Development of a stent-biovalve with round-shaped leaflets: in vitro hydrodynamic evaluation for transcatheter pulmonary valve implantation (TPVI). 査読有
J Artif Organs.2016;19(4):357-363.
doi:10.1007/s10047-016-0909-6.
- 2) Funayama M, Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y.
Development of an in vivo tissue-engineered valved conduit (type S biovalve) using a slitted mold. 査読有
J Artif Organs.2015;18(4):382-6.
doi:10.1007/s10047-015-0856-7.
- 3) Nakayama Y, Kaneko Y, Takewa Y, Okumura N.
Mechanical properties of human autologous tubular connective tissues (human biotubes) obtained from patients undergoing peritoneal dialysis. 査読有
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2016;104(7):1431-7.
doi:10.1002/jbm.b.33495.
- 4) Sumikura H, Nakayama Y, Ohnuma K, Kishimoto S, Takewa Y, Tatsumi E.
In vitro hydrodynamic evaluation of a biovalve with stent (tubular leaflet type) for transcatheter pulmonary valve implantation. 査読有
J Artif Organs.2015;18(4):307-14.
doi:10.1007/s10047-015-0851-z.
- 5) Funayama M, Matsui Y, Tajikawa T, Sasagawa T, Saito Y, Sagishima S, Mizuno T, Mizuno M, Harada K, Uchida S, Shinoda A, Iwai R, Nakayama Y, Uechi M.
Successful implantation of autologous valved conduits with self-expanding stent (stent-biovalve) within the pulmonary artery in beagle dogs. 査読有
J Vet Cardiol.2015;17(1):54-61.
doi:10.1016/j.jvc.2014.12.003.
- 6) 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. 査読有

J Artif Organs.2015;18(3):228-35.
doi:10.1007/s10047-015-0820-6.

- 7) Kishimoto S, Takewa Y, Nakayama Y, Date K, Sumikura H, Moriwaki T, Nishimura M, Tatsumi E.
Sutureless aortic valve replacement using a novel autologous tissue heart valve with stent (stent biovalve): proof of concept. 査読有
J Artif Organs.2015;18(2):185-90.
doi:10.1007/s10047-015-0817-1.
- 8) Funayama M, Takewa Y, Oie T, Matsui Y, Tatsumi E, Nakayama Y.
In situ observation and enhancement of leaflet tissue formation in bioprosthetic "biovalve". 査読有
J Artif Organs.2015;18(1):40-7.
doi: 10.1007/s10047-014-0793-x.
- 9) Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Yamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohnuma K, Tajikawa T, 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. 2015;103(1):1-11.
doi:10.1002/jbm.b.33186.
- 10) Sumikura H, Nakayama Y, Ohnuma K, Takewa Y, Tatsumi E.
In vitro evaluation of a novel autologous aortic valve (biovalve) with a pulsatile circulation circuit. 査読有
Artif Organs.2014;38(4):282-9.
doi:10.1111/aor.12173.

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) Nakayama Y, Mizuno T, Takewa Y, Sumikura H, Ohnuma K, Moriwaki T, Yamanami M, Oie T, Tatsumi E, Kanda K.
Preparation of an autologous heart valve with a stent (stent-biovalve) using the stent eversion method.
International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery, Nice, 2014.4.27.
- 2) Nakayama Y, Takewa Y, Uechi M, Kanda K, Moriwaki T, Oie T, Tanaka T, Sugiura H.
3D printer-based molding for the preparation of biovalve family in in-body tissue architecture technology.
Heart Valve Society of America, New York, 2014.5.8-10.
- 3) Takewa Y, Nakayama Y, Sumikura H,

- Kishimoto S, Date K, Wieloch R, Kanda K, Tajikawa T, Tanaka T, Tatsumi E. Key factors to develop histogenesis in a novel autologous heart valve implantation, European Society for Cardiology Congress, Barcelona, 2014.8.30-9.3.
- 4) Takewa Y, Nakayama Y, Kishimoto S, Date K, Sumikura H, Kanda K, Tanaka T, Tatsumi E. Development of a novel autologous heart valve (biovalve stent) for transcatheter implantation. XLI Annual ESAO Congress, Roma, 2014.9.17-20.
- 5) Funayama M, Furukoshi M, Moriwaki T, Nakayama Y. In vitro tissue-engineered autologous, valved conduit Biovalve with robust wall tissues. European Society for Cardiology, London, 2015.8.29-9.2.
- 6) Takewa Y, Nakayama Y, Sumikura H, Naito N, Kanda K, Tajikawa T, Tanaka T, Tatsumi E. A tailor made valve surgery with a novel autologous bioprosthesis. European Society for Cardiology, London, 2015.8.29-9.2.
- 7) Nakayama Y, Takewa Y, Moriwaki T, Sumikura H, Funayama M, Furukoshi M, Tatsumi E, Miyamoto S, Okamoto K. Development of in vivo, tissue-engineered autologous, 3D heart valvular tissue, type SC biovalve with excellent mechanical properties, valvular functions and in vivo performance. American Heart Association Scientific Session 2015. 2015.11.7-11.
- 8) Takewa Y, Nakayama Y, Sumikura H, Naito N, Iizuka K, Kanda K, Tatsumi E. A novel autologous heart valve with growth potential. European Society for Cardiology, Roma, 2016.8.27-31.
- 9) Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Tatsumi E. Type SC biovalve aortic valve based on in-body tissue architecture (IBTA): design, in vivo fabrication and animal implantation. 7th Biennial Heart Valve Biology and Tissue Engineering Meeting. Hilton Head Island, 2016.10.12-14.
- 10) Nakayama Y. In body tissue engineering approach for autologous 3D tissue fabrication and their clinical application. Biofabrication 2016, Winston-Salem, 2016.10.29-31.
- 11) 武輪能明、中山泰秀、住倉博仁、飯塚慶、秋山大地、片桐伸将、竹下大輔、小崎智史、妙中義之、巽英介。バイオバルブ心臓弁の長期移植評価と生きたグラフトとしての可能性の検討。第54回日本人工臓器学会大会, 米子, 2016.11.23-25.
- 12) Nakayama Y. Longterm follow-up results after allogenic implantation of in-body tissue engineered heart valves (Biovalves) as a pulmonary valve in a goat model. Heart Valve Society Scientific Meeting Monaco, 2016, 2017.3.2-4.
- 13) 中山泰秀 生体内組織形成術(IBTA)によるバイオバルブ開発 2017. 第16回日本再生医療学会総会, 仙台 2107.3.7-9.

〔その他〕

<http://www.ncvc.go.jp/about/excellence/07.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山泰秀 (YASUhide NAKAYAMA)

国立研究開発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