

Tissue-engineering による再生型人工弁の開発

大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科

小澤 秀登, 澤 芳樹

Hideto OZAWA, Yoshiki SAWA



1. はじめに

世界保健機関 (WHO) による報告では、心血管疾患による年間死亡数は約1,750万人以上とされ、これは世界全体の死亡原因の30%にのぼる¹⁾。中でも心臓弁疾患を伴う心血管疾患は主要因の1つである¹⁾。修復困難な心臓弁疾患に対する最も一般的な治療は人工弁による心臓弁置換であり、一般的に使用されている人工弁は機械弁あるいは生体弁である。これらの人工弁の使用は心臓弁疾患による生存率の改善および生活の質 (QOL) の改善を認め、有用な治療法である。人工弁置換を必要とする患者数は2003年で29万人以上とされ、2050年には85万人以上となると考えられており²⁾、今後も人工弁を必要とする患者数は増加していくことが予想されている。しかしながら、これらの人工弁は成長するものではなく、また、感染のリスク、機械弁における抗凝固療法の必要性、生体弁における人工弁の劣化等の問題を抱えている。また、特に小児の患者にとっては、小さな体格に適したサイズの人工弁がなく、また使用可能なサイズであっても、将来的な再手術が必須な状況である。

このような背景の中で、再手術の必要がなく、簡便な手技で移植可能であり、完全な血行動態を維持することができ、劣化することもなく、抗凝固療法を必要とせず、成長等の生体活性を有する人工弁の開発は非常に望まれている。

Tissue-engineeringの手法を用いて作製した心臓弁 (tissue-engineering heart valve, TEHV) は、抗凝固性、感染

に対する抵抗性、そして成長の可能性を認める再生型の人工弁と考えられている。このTEHV開発の基本的な概念は、心臓弁の構造および機能を tissue-engineering の手法を用いて再生することで、レシピエントの心臓弁として機能し得る人工弁を開発することである。心臓弁の構造を維持するための鋳型 (scaffold) の作製、機能を再生するための新たな細胞の scaffold への導入という大きな2つの部分から構成され、この scaffold と新たに導入された細胞の相互作用により、移植された人工弁の自己組織化を目指すことを目的としている。このTEHVは、理論的には様々なサイズの人工弁の作製が可能であり、また成長の可能性からも、小児の患者にとっても非常に有用な人工弁であると考えられることができる。

2. Scaffoldの作製

Scaffoldの作製に関しては、生体材料 (生体弁) を用いる方法と、人工的に作製する方法の2種類がある。生体弁を使用する方法は、生体弁を界面活性剤等の薬剤を用いて脱細胞処理することで、フィブリンおよびコラーゲンを基礎とした scaffold を作製するものである³⁾。理想的な脱細胞処理とは、組織より細胞外マトリックスの構造を維持しながら完全に細胞成分を除去することである。細胞成分の除去には種々の界面活性剤の使用が報告されている。界面活性剤は細胞のDNAを傷害するが、細胞外マトリックスに対しても影響を与えることが考えられ、細胞外マトリックスへの傷害は新しい細胞の再播種に影響を及ぼすことが考えられる。現在までに様々な研究がなされており、界面活性剤の種類あるいは濃度によっては細胞外マトリックスへの影響も少なく、細胞成分の除去が可能であると報告され、Meyerらは、低濃度の界面活性剤の使用は大きな影響を来さないとしているが⁴⁾、臨床レベルでの評価はさらなる検

■ 著者連絡先

大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科

(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

E-mail. sawa-p@surg1.med.osaka-u.ac.jp

討が必要である。

人工的に scaffold を作製する方法として考えられているのが、生物吸収性のあるポリマーを使用し作製した scaffold である。この scaffold は次第に生体に吸収され、そのスペースに新たな組織が構築されることで心臓弁が作られる⁵⁾。この scaffold は、当初、皮膚の graft として開発され、その厚さから心臓弁への応用が困難と考えられていた。近年、ナノテクノロジーを用いた新たなポリマーの開発により、動物における肺動脈弁位に対する *in vivo* の検討で有用性が報告されている⁶⁾。

3. 再細胞化

Scaffold の作製と同様に、scaffold に対し再播種する細胞に関する検討も進んでいる。TEHV が最終的に移植されたレシピエントの心臓弁として働くためには、この再播種された細胞が新しい scaffold の環境内で生存し、かつ活動することが重要である。この細胞の再播種に関しても現在のところ、大きく2つの方法が考えられている。1つは採取し培養された細胞を使用する方法。もう1つは scaffold のみを移植し、その後血液中に存在する前駆細胞を使用する方法である。現在のところ、これらの細胞が再播種後に、scaffold 内で活動していることは知られているが、再播種のメカニズムや scaffold 内での細胞の働き等に関しては、現在も検討が進んでいる。

再播種に使用する細胞としては、ヒト由来あるいは動物由来の細胞を使用するとの報告もあるが、感染のリスクおよび免疫拒絶のリスクに関しては、逃れることができない。このことから、最も適切なものと考えられるものは、患者自身の細胞を用いることである。自己の細胞であれば、拒絶反応を心配する必要がない。しかしながら、再播種を念頭においた場合、比較的多くの細胞を必要とするが、心臓弁移植を必要とする患者では、患者自身の細胞を十分に採取することが難しい等の問題がある。最近の報告では、幹細胞 (stem cell) が注目されており、特に骨髄由来幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) に関する研究が報告されている⁷⁾。MSC を使用する最も大きな利点は低侵襲での採取が可能であり、かつ自己の細胞であり拒絶反応を心配する必要がないことである。この MSC に関しては、人工的に作製した吸収性 scaffold に接触することで刺激を受け、生体弁に似た構造を構築することが報告されている。また、MSC 以外にも線維芽細胞および筋線維芽細胞を使用した TEHV においても動物実験において良い成績が示されている⁷⁾。

一方で、循環血液中に存在している血管内皮前駆細胞

(circulating endothelial progenitor cell, cEPC) も、再播種に有用な細胞種として注目されている。この cEPC は、間質性細胞および内皮細胞の両方の性質をもっていることから、cEPC を単独で使用することで、心臓弁の構築が可能ではないかと考えられている⁸⁾。また、cEPC は scaffold 内で、線維芽細胞あるいは筋線維芽細胞へ性質転換をすることの報告もあり、新しい scaffold 内で、心臓弁組織として機能している可能性が示唆されている。

4. 臨床応用

以上のように、これまでの様々な研究を踏まえて、欧米にて臨床応用が進んでいる。現在のところ、TEHV は、左心系ではなく右心系、特に右室流出路に対して使用されている。右室流出路でまず使用されている理由は、右心系は低圧系であることから、弁にかかるストレスが大動脈弁位と比較すると小さいためであると考えられる。一方で、左心系に対しても臨床研究が始まっており、脱細胞化し、内皮細胞にて再細胞化した TEHV を大動脈弁位に移植し、拒絶反応もなく、弁の劣化を認めなかったとの報告があり、また従来の凍結保存した homograft と比較して、石灰化の低度が低かったとの報告もある⁹⁾。現在、市販されている TEHV は SynerGraft[®] (Cryo life 社)、および Matrix P (Auto Tissue 社, Berlin) である。SynerGraft[®] は、脱細胞化処理をされ、凍結保存された allograft であり、Gerson らはスタンダードな allograft に比べて、intervention の割合、狭窄の進行の程度は低い等と報告している¹⁰⁾。Elkins らは Ross 手術の際、32 例の患者に、そして4例の肺動脈の allograft からの再置換に SynerGraft[®] を使用し、その有用性を報告している¹¹⁾。しかしその一方では、小児移植例において弁の機能不全、組織破壊、変性が報告されている。全体的には、SynerGraft[®] は既存の allograft に比較して、安全であり、有用な選択肢と考えられる。しかしながら、臨床上的正確な適応に関しては、まだ決まっていないといえる。その他の市場レベルで使用可能な TEHV としては、ヨーロッパにて使用可能な Matrix-P があり、これは脱細胞化処理したブタ肺動脈弁である¹²⁾。しかし、2006年から2010年までの93人を対象とした臨床研究では、弁機能不全回避率は2年で60.2%、狭窄を伴うものは61%、仮性動脈瘤形成が9%、また conduit の拡大が6%と報告されている¹³⁾。この他にも同様の報告があり、免疫反応が惹起されることで弁機能が低下している可能性が考えられ、広く広まっていないのが現状である。

その他にも様々な臨床研究が報告されている。Dohmen らは、レシピエントの前腕から採取した静脈細胞を培養し、



図1 新鮮脱細胞化心臓弁

それを脱細胞化したallograftに再播種し、Ross手術の右室流出路に用いた¹⁴⁾。また、Cebotariらは、ヒト肺動脈弁を2種類の界面活性剤を使用して脱細胞化してscaffoldを作製し、凍結保存をせず、また*in vitro*での細胞の再播種をせずに一定の期間内に移植する方法を開発した¹⁵⁾(図1)。Sarikouchらの報告では、ドイツ・ハノーファー医科大学にて、現在までに131例の患者の肺動脈弁位に対し、このTEHVを用いた移植手術を行っており、既存のhomograft等の人工弁と比較し、耐久性および再手術回避率が高いとの報告を行っている¹⁶⁾。すでにドイツにて移植組織として承認されており、また2013年からはヨーロッパにて多施設研究が開始され、近々その成績が報告される予定である。日本においては、大阪大学病院にて2014年10月にファロー四徴術後の肺動脈弁閉鎖不全の患者に対し、ハノーファー医科大学との共同研究により、国内初のTEHVの移植を行い、短期の良好な成績が報告されている¹⁷⁾(図2)。また、国立循環器病研究センターでは、3Dプリンター(ProJet[®])を使用することで正確な心臓弁の鋳型を作製し、それを動物の皮下に植え込むことで、自己の組織(コラーゲン線維)によるscaffoldの作製を行い、このscaffoldを動物の肺動脈弁位に移植する研究が進められている¹⁸⁾。東京女子医科大学では、生体分解性ポリマーを使用したscaffoldの作製と、骨髄細胞を自己細胞として用いて臨床応用を行っている¹⁹⁾。

5. まとめ

Tissue-engineeringの手法を用いた再生型心臓弁の開発には目覚ましいものがある。Scaffoldの作製や、再播種に使用する細胞に関して、様々な実験的研究が進んでおり、臨床応用に関しても、様々な報告を認め始めている。理想的な再生型人工心臓弁とは、再手術の必要がない、簡便な手技で移植可能であり、完全な血行動態を維持することができ、劣化することもなく、抗凝固療法を必要とせず、成長等の生体活性を有する、いわゆる自己組織化した人工弁である。TEHVはこの理想的な再生型心臓弁となる可能性



図2 術後6ヶ月の時点での心臓MRI検査⁸⁾

肺動脈血流速度：1.73 m/s, 肺動脈順行性血流量：78 ml/beat, 肺動脈逆行性血流量：0 ml/beat.

を十分に認めるものであると考えられ、今後もさらなる発展が望まれる。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Angele P, Yoo JU, Smith C, et al: Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* **21**: 451-7, 2003
- 2) Barili F, Dainese L, Topkara VK, et al: The future of human valve allografts: bioengineering and stem cells. *Artif Organs* **29**: 923, 2005
- 3) Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, et al: Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs* **34**: 206-10, 2010
- 4) Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, et al: Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg* **130**: 469-76, 2005
- 5) Gandaglia A, Bagno A, Naso F, et al: Cells, scaffolds and bioreactors for tissue-engineered heart valves: a journey from basic concepts to contemporary developmental innovations. *Eur J Cardiothorac Surg* **39**: 523-31, 2011
- 6) Hong H, Dong N, Shi J, et al: Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: an in vitro study. *Artif Organs* **33**: 554-8, 2009
- 7) Migneco F, Hollister SJ, Birla RK: Tissue-engineered heart valve prostheses: 'state of the heart'. *Regen Med* **3**: 399-419, 2008
- 8) Kobayashi N, Yasu T, Ueba H, et al: Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp Hematol* **32**: 1238-45, 2004
- 9) Neidert MR, Tranquillo RT: Tissue-engineered valves with commissural alignment. *Tissue Eng* **12**: 891-903, 2006
- 10) Gerson CJ, Elkins RC, Goldstein S, et al: Structural integrity of collagen and elastin in SynerGraft[®] decellularized-

- cryopreserved human heart valves. *Cryobiology* **64**: 33-42, 2012
- 11) Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, et al: Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg* **71**: S428-S32, 2001
 - 12) Brown JW, Ruzmetov M, Eltayeb O, et al: Performance of SynerGraft decellularized pulmonary homograft in patients undergoing a Ross procedure. *Ann Thorac Surg* **91**: 416-22, 2011
 - 13) Perri G, Polito A, Esposito C, et al: Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg* **41**, 1320-5, 2012
 - 14) Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, et al: Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg* **84**: 729-36, 2007
 - 15) Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A: Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults, early report. *Circulation* **124**(11 suppl): S115-23, 2011
 - 16) Sarikouch S, Horke A, Todorache I, et al: Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: a decade of clinical experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016 [Epub ahead of print]
 - 17) Ueno T, Ozawa H, Taira M, et al: Pulmonary Valve Replacement With Fresh Decellularized Pulmonary Allograft for Pulmonary Regurgitation After Tetralogy of Fallot Repair - First Case Report in Japan. *Circ J* **80**: 1041-3, 2016
 - 18) Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, et al: In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **103**: 1-11, 2015
 - 19) 松村 剛毅, 新岡 俊治, 日比野 成俊, 他 : 自己骨髓細胞と生体吸収性ポリマーにより作製した再生血管による臨床研究 44 症例とその経過. *日心外会誌* **36**: 309-14, 2007