

令和 3 年 8 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08565

研究課題名(和文) バイオシートを用いた完全自己組織からなるヒト心筋組織の構築

研究課題名(英文) Construction of human myocardial tissue using biosheet consisting of completely self-tissue

研究代表者

和田 有子 (Wada, Yuko)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：30419410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は生体内組織形成術(in body tissue architecture, IBTA)を用いて作られたバイオシートが機能不全心筋に対する新たな補填材となりうることを示すことを目的とし実施した。移植心の左室内圧負荷型の新たな異所性心移植モデルを確立したうえで、このモデルを用いたバイオシートによる左室壁置換術により、バイオシートが、吻合に耐えうる強度と柔軟性および左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持つことを示すことができた。残念ながら心筋細胞の浸潤までは至らず、ホスト心筋との電気的結合も今後の課題となるが、次の検討項目へつなげる成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回実施したバイオシート左室壁置換モデルでは、バイオシートが吻合に耐えうる強度と柔軟性および左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持つこと、かつバイオシート内への血管侵入も確認することができた。心筋細胞は成人においては分裂・再生がほとんどなされず、心筋壁(特に左室壁)の壊死や菲薄化、欠損はそのまま心臓の機能不全につながる。現在、多能性幹細胞由来心筋細胞による細胞シートを用いた心筋再生の試みもなされているが、左室充満圧に打ち勝つほどの十分な強度をもったシートの作成には到達しておらず、本成果はIBTA技術によって作られたバイオシートが新たな心筋補填材料としての可能性を示すことに繋がった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to show that biosheets made using in-body-tissue-architecture (IBTA) can be a new filling material for dysfunctional myocardium. First, a new left ventricular pressure-loaded ectopic heart transplant model was established, and then left ventricular wall replacement with a biosheets was performed using this model. It was shown that this biosheets has sufficient strength and flexibility to withstand anastomosis and sufficient thickness and strength to withstand left ventricular filling pressure. Cardiomyocyte infiltration was not occurred and electrical coupling with the host myocardium became the next issue, but we were able to obtain results that will lead to the future.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：バイオシート IBTA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓は、個体における代替のない唯一無二の臓器であり、その機能不全を代替する最終的な手立ては現在、他人からの心臓移植のみである。近年重症心不全に対する治療は飛躍的な進歩を遂げているが、一方で心移植待機患者もまた増加の一途を辿っている。心筋梗塞後合併症である心室中隔穿孔や心室瘤の手術においては、梗塞部位の exclusion が行われるが、その際に用いられる心臓修復材料は ePTFE やウシ心膜シートであり、いずれも収縮性のない薄いシート状人工物である。当然切除された心筋の補填材とはなり得ず、補填材であるシートに機能を求めることはない。また、iPS 細胞由来心筋細胞や自己筋芽細胞を用いた細胞シートによる心筋再生の試みもなされているが、左室充満圧に打ち勝つほどの収縮力をもった十分な厚さのシートは未だ成功例がなく、心筋壁の補填材としては全く不十分であるのが現状である。

本研究で使用するバイオシートは、体内に異物が埋め込まれた際にその表面をコラーゲンで覆うことによりカプセル化し隔離しようとする、生体内組織形成術 (in body tissue architecture, IBTA) によって作られ、新規心筋補填材料としての可能性をもつ。IBTA 技術は人工血管の分野ですでにその有用性や安全性を示す基礎データがそろっており、特に「移植先の環境に適応した細胞によって再構築されるバイオマテリアル」という画期的な特徴は、成人において分化・再生がなされにくい心筋への応用にふさわしい利点である。

2. 研究の目的

本研究では、IBTA 技術によって作成されたバイオシートで左室壁を置換し、このバイオシートが、吻合に耐えうる強度と柔軟性および左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持つことを示すことを主たる目的とし、併せて移植後の浸潤細胞の有無などの組織学的解析を目標とし研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) バイオシートの作製

SD ラットに対し、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール) による全身麻酔のもと、背部皮下に円筒状鑄型を埋入する。1~2ヶ月後に鑄型を摘出、外側のステンレス製円筒と内部シリコン円筒との隙間に形成された管状結合組織体を採取し、それを展開することでバイオシートを作製する。移植時までには70%エタノールで保存する。

(2) 健常心臓に対するバイオシート移植

SD ラットに対し、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール) による全身麻酔のもと、気管内挿管を行い人工呼吸器管理とする。左肋間開胸後に心膜を剥離、左室前壁へバイオシート (5 mm x 5 mm) を添付し、7-0ナイロン糸で縫合したうえで閉胸する。

(3) 異所性心移植モデルの作製

【初期モデル】

移植用心臓の摘出とバイオシートによる左室壁置換

ドナー側のラットは、全身麻酔下に胸骨縦切開にて開胸、SVC・IVC を確保し遮断する。心筋保護液を IVC からサーフローで注入し心停止を得る。奇静脈結紮離断、左肺動静脈を末梢まで剥離して離断する。左肺を切除、右肺は肺門部で肺動静脈と気管をまとめて結紮し離断する。上行大動脈、腕頭動脈抹消まで剥離して離断。食道および気管を外して心臓を摘出する。心摘出後に心形成を実施。上行大動脈に半周切開を加えて左肺静脈と10 0ナイロンを用いて連続で端側吻合し、左肺静脈はクランプする。摘出心の左室壁はデルマパンチ (3 mm 径) を用いて貫壁性に切除、同様にくり抜いたバイオシートを9-0ナイロン糸で連続縫合することで、バイオシートによる左室壁置換を実施する (図1)。

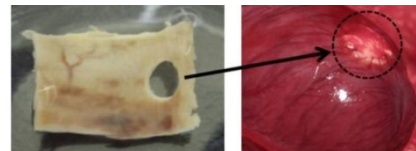


図1 バイオシートによる左室壁置換

異所性心移植

レシピエント側のラットは全身麻酔下に腹部正中切開にて開腹、後腹膜を切開し、腹部大動脈・静脈を剥離して確保する。腹部大動脈を遮断、血管を縦切開して移植心の腕頭動脈と10 0ナイロンを用いて連続で端側吻合する。次いで腹部大静脈を遮断し血管を縦切開し、移植心の左肺動脈と10 0 ナイロンを用いて連続で端側吻合する。遮断を解除して移植心への血流を再開、止血を確認して閉腹する。

【改変型モデル】

心摘出後、上記大動脈-肺静脈吻合は行わず左室壁置換を実施。その後、異所性心移植を実施。続く心拍の再開が安定したことを確認後、最後に移植心左肺静脈を先程吻合した左肺動脈の末

梢側に10<sup>6</sup>ナイロンを用いて連続で端側吻合する。これにより心筋虚血時間が大幅に短縮し、また自己拍出安定後に心室充満圧をかけることになり、心拍出が安定した。

#### (4) 組織学的評価

処置後1・3・10ヶ月に心臓を摘出し、パラフィン包埋する。HE染色・PSR (picosirius red) 染色・EVG (Elastica von Gieson) 染色を行い、CD31、 $\alpha$ SMA、cTnT に対する免疫染色を実施する。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオシート作製用鑄型の検討

左室心筋置換用バイオシート作製のための鑄型について検討した。

今回用いたものは、シリコン円柱の外側に隙間を設けステンレス製円筒で覆ったもので、この鑄型を皮下に埋入することにより、シリコン円柱とステンレス製円筒との間に細胞が入り込み、円筒状組織が形成される。当初作成したものは図左の如くできあがったシートの厚みは不均一であった。間隙のサイズを変更することによりシートの厚みを調整し、さらに外側の円筒に設けられた細胞侵入用の孔のサイズを小さくしたことで、より滑らかで均一なバイオシートが得られた(図2)。

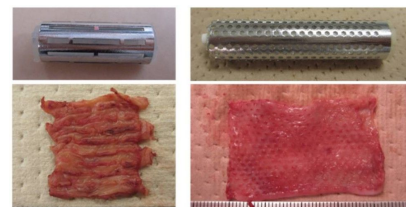


図2 初期の鑄型(左)と改良型(右)  
下: 鑄型内部に形成された円筒状組織を展開したものを

#### (2) 健常心へのバイオシート移植

作製したバイオシートをラット健常心臓へ移植した。移植後3ヶ月の組織摘出時の肉眼所見では、周囲組織との癒着はなく、また拒絶・脱落することなくホスト心筋と一体化していた(図3、4)。

PSR染色ではシートとの接触部位に炎症細胞浸潤や線維化はみられず、シートとの接触によってホストに異常な炎症反応の発現は見られないことがしめされた。

バイオシート内部では、経時的に徐々に組織が粗になり、その間に線維芽細胞がみられるようになり(図5)、10カ月後にはバイオシート内部に血管形成が確認できた(図6、7)。

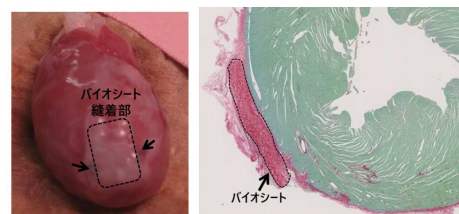


図3 バイオシート移植後3ヶ月  
(矢印: 縫合箇所)

図4 健常心へのバイオシート移植  
3ヶ月後(PSR染色)

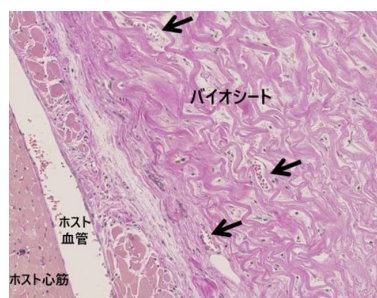


図6 バイオシート内部に血管形成

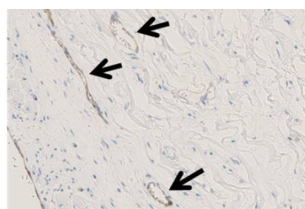


図7 CD31免疫染色

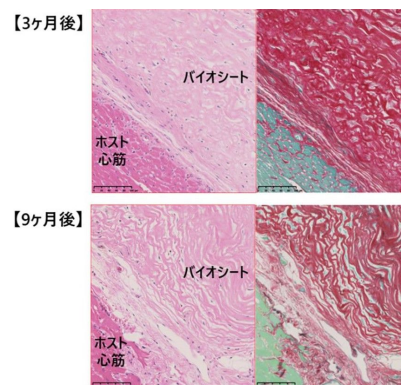


図5 バイオシート移植後の組織所見  
(左:HE染色, 右:PSR染色)

#### (3) 異所性心移植モデルの検討

実施期間の大部分を費やしたのが左室圧負荷型の異所性心移植モデルの検討であった。今回の最大の目的は、「バイオシートが吻合に耐えうる強度と柔軟性および左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持つこと」を示すことである。

従来の異所性心移植モデルでは宿主の腹部大動脈から流入する血液はドナーの冠動脈のみ灌流するため、左室に充満圧はかからない。本研究では当初ドナーの上行大動脈にドナーの肺静脈を吻合することで左室に順行性の動脈血が流入するモデルの作成を目指した。

大動脈の吻合口の大きさや de-clump の順序などの様々な検討を行ったが、本法では心筋虚血時間が長く心機能回復に時間がかかること、また心機能回復が不十分な左室に急激な充満圧がかかることによる左室の過伸展などの理由により、心拍維持が困難であった。

そこで異所性移植前の大動脈-肺静脈吻合をやめ、通常の異所性移植を行ったのち、より末梢の宿主腹部大動脈にドナーの肺静脈を吻合する方法に変更し、心筋虚血時間の大幅な縮小を達成した。またこの方法では十分に左室機能が回復した後に左室への血液の流入を始めることができるため、上述の左室の過伸展の問題が解決した。



また当初は心臓のサイズが大きく心形成がしやすいことからモルモットを用いたモデル作成を試みたものの、レシピエント側の腹部血管と移植心の血管径の不適合や術中術後における生存率などから移植後長期観察が可能なモデルにはならなかったため、対象動物をラットへ変更し、最終モデルを確立した(図8)。

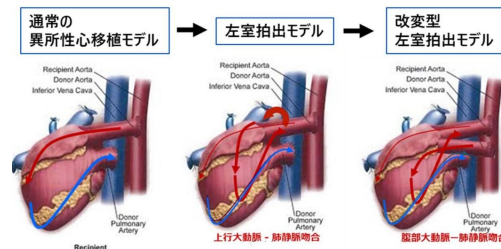


図8 異所性心移植モデルの改変



図9 移植心左室に動脈血が流入

移植後のエコーでは、移植心内への順行性血流と大動脈弁の開放が確認され、摘出時まで心拍が維持されるようになった。(図9:最終モデル、肉眼的に左室に十分な充満圧がかかっている)

#### (4) バイオシートによる左室壁置換

上記モデルを用いてバイオシートによる左室壁置換を行い、移植後のバイオシートの経時的变化について観察した。

改良型の鋳型を用いて作成されたバイオシートは吻合に問題ない柔軟性と強度をもっており、顕微鏡的に均一な厚さであった。術後の針穴からの出血等の問題点もなかった。

移植後1ヶ月時点で、肉眼的にはホスト心筋と一体化しており、出血や破綻、瘤化、周囲との癒着も見られなかった(図10)。

移植後3ヶ月、10カ月時点での肉眼所見も同様に、バイオシート置換部位の瘤化はみられず、本シートが左室の充満圧に充分耐えうる強度を持つと考えられた。組織学的にも心内外膜の両側から厚い線維性自己組織による補填が見られ、周囲心筋と同程度の壁厚になっていることが観察された(図11)。一方で組織学的にバイオシート内部の分解が経時的に進むことが観察された(図12)。



図10 移植後1ヶ月の摘出心

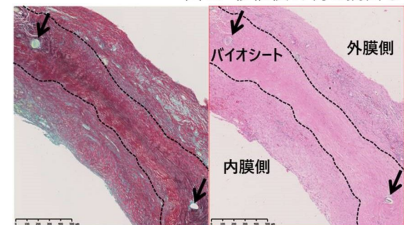


図11 バイオシート移植1ヶ月後の組織所見 (左:PSR染色, 右:HE染色, 矢印:縫合糸)

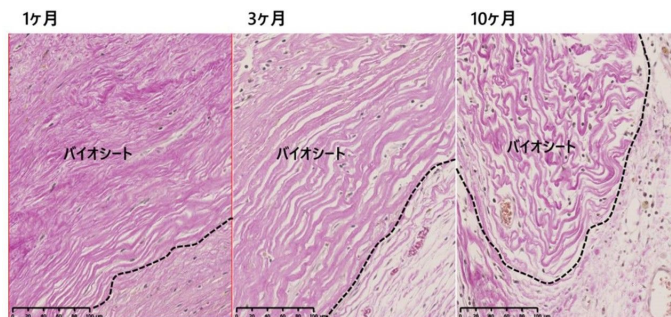


図12 移植後バイオシートの経時的变化



図13 バイオシート内の筋繊維芽細胞 (αSMA染色)

密な膠原線維が次第に粗になり、3ヶ月後には間隙に筋線維芽細胞の浸潤を認めた(図13)。移植1ヶ月後の時点では見られなかった内腔側の内皮化は、移植後3ヶ月より見られるようになった(図14)。移植後10カ月ではバイオシート内に血管形成(図15)を認めた。しかし cTnT 染色では内部への心筋細胞の浸潤は認められなかった(図16)。

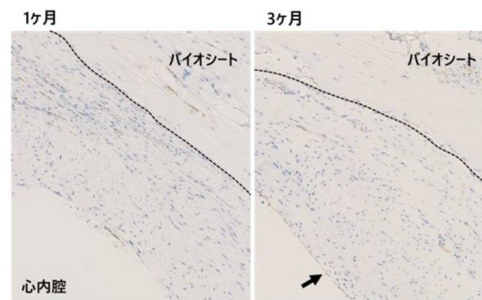


図14 バイオシート内腔側の変化 (矢印: CD31染色による内皮化を確認)

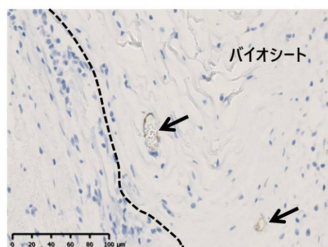


図15 バイオシート内の血管形成 (CD31染色)

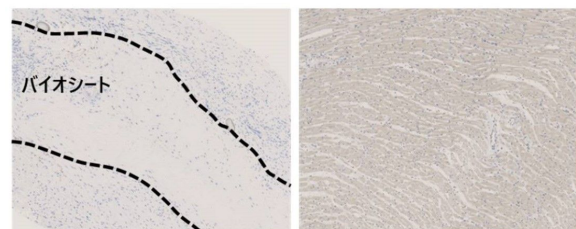


図16 cTnT染色 (左: バイオシート, 右: 近位ホスト心筋)

本研究の最終目標は左室欠損部を補填することのできる収縮機能を持った人工パッチの作成である。ある程度の厚みをもった組織の人工構築には、組織を栄養するための**栄養血管**が必須であり、また任意の3次元構造の構築には足場となる**スキャフォールド**が必要である。これまでの人工臓器臨床応用の試みは多くの場合、**栄養血管構築**と**スキャフォールドの異物性**という二つの壁の克服に難渋してきた。

体内に異物が埋め込まれた場合、生体はその表面をコラーゲンで覆うことによりカプセル化し隔離しようとする。**生体内組織形成術 (in body tissue architecture, IBTA)**はこの反応を利用した組織形成術で、in vitro で細胞を積み上げる従来の方法と比較し、より安価で短時間に安全な生体材料を自己組織によって作成できるというメリットがある。IBTA によって作成されたコラーゲン材料を生体に移植すると**時間経過で自己細胞が侵入**し最終的には**移植先の環境に応じた新たな臓器として構築されていく**ことが示されている。

人工心肺装置を使用した手術が困難な動物（特に小動物）のモデル系では、左室壁の置換実験そのものが困難であり、心筋再生研究において最も重要な「高圧系」における新材料の耐久性試験は難しい。特に移植先の環境に応じて作成される人工臓器という本マテリアルの利点を十分に示すためには、左室環境への移植が必須である。そこで本研究では**異所性心移植モデルを改変した心拍出モデル**を用いることにより「動脈圧のかかった拍動する左室」における新材料の有効性を示したいと考えた。通常行われている異所性心移植モデルでは動脈圧はドナーの上行大動脈と冠動脈のみにかかり、左室には血液の流入がなく前負荷は殆どかからない。そこで本研究では異所性心移植モデルを改良し左室に動脈血が流入するモデルの作成から開始した。左室に血液が流入するモデルとしては肺とともに移植するモデルがあるが、このモデルでは呼吸していない肺を通過した血液が左室に流入することとなる。また大動脈弁を破壊し大動脈弁閉鎖不全を作成するモデルでは左室に流入する血液量がコントロールできず左室心筋の過伸展が引き起こされてしまう。そこで我々は移植前に大動脈と肺静脈を繋ぐ処理をドナー心臓に加える初期モデルを試みた。この方法だと肺静脈を縫縮することにより流入する血液量をコントロールできるメリットがある。しかし移植前の処理が煩雑であり、心停止時間が長くなりすぎてしまいドナー心臓の心拍が再開されない、あるいは再開されても左室にかかる前負荷に耐えられず心拍が維持できない個体が多く、この方法は断念した。次に心停止時間を短縮するためまず通常の異所性心移植をおこないドナー心臓への還流を開始した後、移植部位よりも末梢のレシピエント腹部大動脈にあらかじめドナー肺静脈を吻合する改変型モデルを作成した。これにより心停止時間は著しく短縮しドナーの心拍再開が容易になった他、十分に心機能が回復した後に左室に前負荷がかかることになり、遠隔期の心拍維持が容易なモデルを作成することができた。

またバイオシートの作成に用いる鋳型も改良を加えた。当初の鋳型は細胞の入り込む孔が大きく、またシリコン内筒との間隙が大きかったため、凹凸の大きな厚いパッチが得られていた。鋳型の改良により凹凸のない薄いパッチが得られた。

パッチは10 0ナイロン結節吻合にて左室に縫い付けられたが、吻合の際のカットングや針穴からの出血もなく、取り扱いや左室へのフィッティングもスムーズであった。

パッチはまず正常左室の外側に縫い付けられた。移植後3ヶ月、9ヶ月で摘出したが、シートの外側は線維性の皮膜で覆われ周囲組織との癒着は見られなかった。また組織学的にホスト心筋に炎症細胞浸潤や線維化といった変化はみられず、このパッチが、接触している周囲組織に炎症性変化を引き起こさないことが示された。パッチは経時的に膠原線維が粗になり間隙に筋線維芽細胞浸潤や新生血管の侵入が見られた。

次いで左室置換術を施行した。縫着のみのときと同様手術操作には難渋せず、移植直後からパッチからの出血はコントロール容易であった。摘出時の周囲組織との癒着も同様に認めず異物としての反応はほぼないと考えられた。10ヶ月時点でも瘤化や破裂は見られず左室圧に対する十分な強度があると考えられた。また石灰化も見られなかった。

組織学的には、外側側・内腔側ともに厚みをもった線維性組織に覆われており、摘出時の組織学的な厚みは左室壁とほぼ同等になっていた。

1ヶ月目の内腔表面は線維組織がむき出しであったが、3ヶ月経過すると内腔は CD31陽性の内皮細胞に覆われていた。10ヶ月後には新生血管の侵入がみられた。このことはこのパッチが抗血栓性を有するようになること、および今後このパッチ内に心筋細胞を移植した場合に栄養血管となりうる可能性を示唆している。

以上のことから IBTA 技術によって作成されたこのバイオパッチは、人工臓器作成におけるふたつの大きなハードルである「異物性」と「栄養血管機能」の両者を克服する可能性を持っていることが示された。

「収縮力を持ち、移植環境に適応し、個体の成長とともに成長する人工心筋シート」は我々心臓外科医にとっては夢の人工材料である。我々はこれまでの研究で、バイオシートが 吻合に耐えうる強度と柔軟性 および 左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持ち、左環境に移植された場合 心腔面の完全な内皮化と栄養血管の侵入がみられることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	岡田 健次  (Okada Kenji)  (90284356)	信州大学・医学部・特任教授   (13601)	
研究分担者	中山 泰秀  (Nakayama Yasuhide)  (50250262)	大分大学・医学部・客員研究員   (17501)	
研究分担者	小松 正樹  (Komatsu Masaki)  (70816131)	信州大学・医学部附属病院・医員   (13601)	

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