

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11533

研究課題名(和文) スーパーマイクロ手術とバイオ3Dプリンティングによる、ハイブリッドリンパ浮腫治療

研究課題名(英文) Treatment of lymphedema with super microsurgery and bio-3D printing technique

研究代表者

高木 克典 (TAKAGI, Katsunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：90635856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまで生細胞のみのスキャフォールドフリーの構造体でリンパ管、尿管作成をした報告はない。われわれはバイオ3Dプリンティング技術を用い、リンパ管、尿管の再生を試みた。尿管の場合、蠕動運動はリンパ管よりも強く、再生困難と考えられたが、構造体の強度を上げることで、水腎の発生を減少させることができた。細胞のみの構造体で作成した人工尿管でも尿管の再生は可能と考えられたが、依然として蠕動能は不十分でさらに構造体を改良する必要がある。バイオ3Dプリンターでさらに細径で強度の強い管腔構造体を作成できれば、尿管のみならず、リンパ管の再生も可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ管のみならず、尿管やその他の蠕動する管腔臓器の再生は蠕動に耐える構造体の強度が求められる。リンパ浮腫に対するリンパ管再生とともに、先天性水腎症や外傷性、医原性の尿管損傷などもあり、尿管再生は重要な研究分野である。今まで、尿管再生は生体分解性化合物が主であったが、今回バイオ3Dプリンティングによる生細胞のみ尿管再生を試み、可能であることが示唆された。将来iPS細胞等の自己細胞による尿管再生を期待させる結果である。

研究成果の概要(英文)：We developed a scaffold-free artificial ureter structure using a bio-three-dimensional (3D) printing technique and assessed its characteristics in vivo after transplantation into rat ureters.

Of the transplantation sites, 50% revealed slight contraction of the artificial ureter structure. Differences in diameter between the proximal and distal ureter boundary of the artificial ureter revealed that the proximal ureter were wider but varied in degree. Hydronephrosis was seen in 83% of rats with 50% of the rats showing grade I and 17% showing grade 0. This is a novel report about ureter regeneration using a living cell structure. Artificial ureter structures created using bio-3D printing could be used for ureter regeneration but further study is required to develop high-functioning artificial ureters that will not develop hydronephrosis.

研究分野：外科学

キーワード：尿管 リンパ管 再生医療 バイオ3Dプリンティング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫は難治性疾患であったが、近年、リンパ管吻合術をはじめとする手術等の新しい治療法で改善を見る症例も少なくなってきた。しかし、依然として、改善が困難な症例もあり、さらなる治療法の開発が急がれる。

2. 研究の目的

近年、細胞の塊であるスフェロイドを剣山メソッドで積層し、構造体を作成する、バイオ 3D プリンティングの技術が開発され、種々の臓器、組織の再生が試みられている。我々は、バイオ 3D プリンティングの技術を用い、リンパ管を始めする、蠕動する組織の再生を行った。

3. 研究の方法

(1) 最近の研究で、線維芽細胞の管腔構造物で血管を置換した場合、移植先の血管内皮細胞が、構造体内部に進出し、構造体裏打ちすることが証明されているため、まず、線維芽細胞主体の極小口径管腔構造体を作成することとした。スフェロイドは 400 μ 前後と 600 μ 前後のサイズを作成し、比較検討したが、400 μ m のスフェロイドでは癒合が不完全で、スーパーマイクロサージャリーでの吻合に適した強度を要する管腔構造体は 600 μ m のスフェロイドが適当であった。細胞株はヒト線維芽細胞(NHDF)、ヒト間葉系幹細胞(MSC)、ヒト平滑筋細胞(SMC)、ヒト臍帯血細胞(HUVEC)を用い、単一細胞培養と共培養で比較検討した結果、単一細胞培養ではスーパーマイクロ吻合に適した強度を得にくく、NHDF、HUVEC を混合したスフェロイドが最適と判断された。

(2) 積層のしやすさ、強度の観点から、スフェロイドサイズは 500-600 μ m に統一した。バイオ 3D プリンターレジェノバを用いて、前述の構造体を作成し、移植に適した強度が得られるまでの 30-60 日間、リザーバー内で循環培養し、ラットの腹腔内リンパ管へ移植した。正常リンパ管の口径は 0.3-0.5mm 程度で、非常に細く、壁の厚さも薄く、吻合自体は可能であったが、集合リンパ管の蠕動運動もあり、構造体周辺のリンパうっ滞と漏出がみられた。

(3) そこで、比較的径が太く、壁の厚い、蠕動する尿管に構造体を移植し、構造体の有用性と親和性を検討することとした。蠕動能を有する集合リンパ管を再生するため、移植可能なサイズで、蠕動能を持つ、尿管の管腔構造体を作成、移植の上、構造体の有用性、親和性や蠕動能を観察した。

(4) 尿管移植に適した構造体、壁厚 500-600 μ m、内腔 600 μ m、長径 5mm の構造体を作成した。バイオ 3D プリンターレジェノバを用いて、前述の人工管腔構造体を作成し、移植に適した強度が得られるまでの 30-60 日間、リザーバー内で循環培養し、ラット尿管へ間置し、顕微鏡下に吻合した。移植ラットには翌日より免疫抑制を施し、14-28 日目に犠牲死させ、正常尿管ごと構造体を摘出し、肉眼的、病理学的に検討を行った。全例で、肉眼的に蠕動は消失していたものの、水腎症 2 度以下の構造体の内腔には尿管上皮(移行上皮)の再生が見られた。水腎症 3 度以上の個体は構造体の逸脱が認められ、組織球浸潤が強いこ

とが判明した。

(5) 構造体の強度不足が(4)の実験の問題点の一つであると考えられるため、構造体の循環培養期間を延長し、60日以上とし、さらに強固な構造体を作成、移植実験を行った(n=6)。結果、移植後、移植時のサイズより大きい瘤状の形態を示したものが50%、移植時のサイズ以下へ縮小していたものは50%であった。移植時のサイズより大きい粒状の形態をしめしたものは、破綻による尿の流出や免疫反応による炎症細胞の集積が問題であると考えられた。構造体口側尿管は程度に差はあるがすべての尿管で構造体末梢側尿管より拡張がみられた。水腎症のグレード1度が50%と最も多く、0度だったものは17%であった。蠕動運動は観察されたが、構造体移植側尿管は、健常側尿管よりも収縮力が弱かった。

4. 研究成果

これまで、細胞のみのスキャフォールドフリーの構造体でリンパ管、尿管作成をした報告はない。尿管の場合、蠕動運動はリンパ管よりも強く、再生困難と考えられたが、構造体の強度を上げることで、水腎の発生を減少させることができた。細胞のみの構造体で作成した人工尿管でも尿管の再生は可能と考えられたが、依然として蠕動能は不十分でさらに構造体を改良する必要がある。構造体の強度を上げることと、免疫反応の抑制が鍵であると考えている。バイオ3Dプリンターでさらに細径で強度の強い管腔構造体を作成できれば、尿管のみならず、リンパ管の再生も可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高木克典
2. 発表標題 3Dプリンティング技術を用いた蠕動能を有する管腔構造物(ラット尿管)の再生
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木克典
2. 発表標題 ヒト細胞のみで作成した3次元構造体による尿管の再生
3. 学会等名 第120回日本外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katsunori Takagi
2. 発表標題 Regeneration of the ureter using a scaffold-free human cell structure created using a bio-three-dimensional printing technique in a rat model.
3. 学会等名 2020 Annual Meeting European Pediatric Surgeon's Association (国際学会)
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	山下 修二 (YAMASHITA Shuji) (30457220)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永安 武 (NAGAYASU Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授 (17301)	
研究分担者	吉田 周平 (YOSHIDA Shuhei) (80380921)	広島大学・病院国際リンパ浮腫治療センター・准教授 (15401)	
研究分担者	松本 桂太郎 (MATSUMOTO Keitaro) (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・講師 (17301)	
研究分担者	中山 功一 (NAKAYAMA Koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	