

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09541

研究課題名(和文) スキャフォールドフリーの3次元構造体による機能を有する人工尿管の作成

研究課題名(英文) Regeneration of the ureter with a scaffold-free living cell structure

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞と臍帯静脈内皮細胞を使用し、スフェロイドを作成し、バイオ3Dプリンター-Regenovaで人工尿管を作成した。人工尿管をラット尿管に移植し、2-12週間後に評価した。尿管上皮は完全に再生され、一部筋層の再生も見られた。尿管蠕動運動は正常よりも弱かったが、全例にみとめられ、水腎症はないか、あっても軽度であった。

移植構造体を経時的に観察、追跡するため、ICGによるラベリング実験を行った。細胞培養時、人工尿管の還流培養時、いずれもラベリングに成功し、皮下に埋没させた構造体を赤外線カメラで非接触で長期間にわたって観察可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、尿管の再生は、高分子化合物や自家組織によるものが大半を占め、細胞のみでできた構造体で再生した報告は皆無であった。本研究はspheroidを積層し作成した管状構造体で尿管を再生した初めての報告である。本研究は短距離の尿管再生であるが、細胞種の変更等の工夫を凝らすと、将来的には、長距離の尿管再生が可能となる可能性があり、その礎となる研究である。

また、ICGでラベリングすることで、赤外線カメラを用いて、非接触で長期間、構造体を観察することに成功した。臨床応用時のグラフトの追跡、グラフト不全の予測に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Spheroids created with fibroblasts and umbilical vein endothelial cells were used to make an artificial ureter. Artificial ureter was created with a bio 3D printer, Regenova.

Artificial ureters were implanted into rat ureters and evaluated after 2-12 weeks. The ureteral epithelium was completely regenerated, and partial regeneration of the muscle layer was also observed. Ureteral peristalsis was weaker than normal, but was present in all cases. Almost no or mild hydronephrosis was observed.

In order to observe and track the transplanted structures over time, ICG labeling experiments were performed with the cell culture and the perfusion culture of the artificial ureter. As a result, labeling was successful, and the subcutaneously implanted structure could be observed for a long period of time without contact with an infrared camera.

研究分野：再生医療

キーワード：尿管 医療 インドシアニングリーンラベリング スフェロイド バイオ3Dプリンティング リンパ管 再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性の尿管狭窄や尿管損傷、尿管癌術後の尿管の通過障害に対して尿路再建は必須である。尿管の欠損距離が長いほど手術による再建は複雑かつ難易度の高い手術となり、合併症も増加する。以前より当該分野では、高分子化合物による再建の研究がさかんに行われているが、満足する成果を得られたものはなく、臨床応用もされていないのが現状である。そこで、我々は、バイオ 3D プリンティング技術を応用し、生細胞のみで構成された人工尿管を再生することを試みた。

また、人工尿管は一旦移植されると、肉眼的観察が不能となり、CT 等を使用しなければ、非侵襲的にグラフトの経時的追跡、グラフト不全の予測は不可能である。そこで、人体で豊富な使用実績があり、安全性の確立されている、安価な ICG (インドシアニングリーン) で人工尿管を染色し、赤外線カメラで発色させ、経時的に追跡できるか検討することとした。

2. 研究の目的

(1) 各種の生細胞をバイオ 3D プリンター Regenova で積層し、管状人工尿管を作成する。同人工尿管をラット人工尿管に移植し、肉眼的、機能的評価をするとともに、経時的变化を病理組織学的に解析する。生細胞のみで機能する人工尿管が作成可能か検討する。

(2) 線維芽細胞 (NHDFs) を細胞レベルで ICG を用いて染色し、バイオ 3D プリンター Regenova で積層、管状人工構造体を作成し、ラットに移植し、赤外線カメラで経時的追跡をする。

また、線維芽細胞で構成された、人工構造体を 3D プリンターで作成後、還流培養時に ICG で染色し、ラットに移植し、赤外線カメラで経時的追跡をする。人工尿管を ICG で染色し、赤外線カメラで観察することで、非侵襲的に、非接触で経時的に追跡可能か検討する。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞 (NHDFs) と臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を使用し、スフェロイド (90% NHDFs and 10% HUVECs; 3.5×10^4 cells/mL; 500-700 μ m) を作成し、バイオ 3D プリンター Regenova で 9×9 の剣山に 3×3 の範囲で、12 層に積層する。積層後、リザーバーに移し、7 週以上還流培養し、人工尿管を成熟させた。

F344 ラット 13 匹を使用し、10 匹に前述の人工尿管移植を移植、3 匹はシリコンステントのみで尿管を再生した。ラットは、以下の 5 群にランダムに割り付けた。

2 週評価群 (n=3)、4 週群 (n=3)、8 週群 (n=3)、12 週群 (n=1)、およびシリコンステントのみ群 (n=3) とした。

それぞれの群で、経時的に人工尿管の肉眼的変化、水腎症のグレード、尿の通過性、蠕動の有無、病理組織学的変化 (HE、anti-pan-cytokeratin、anti-VEGFA、anti-uropilin、anti-alpha-smooth muscle actin、anti-cytokeratin 14、Masson's trichrome) の評価を行った。

(2) ICG を含んだ培養液で培養した線維芽細胞 (NHDFs) をバイオ 3D プリンターで積層し、管状人工構造体を作成、ラット皮下に移植し、赤外線カメラで経時的追跡をした (n=2)。

また、通常培地で作成した線維芽細胞の人工構造体を、ICG を含んだ培養液で還流培養し、同構造体をラット皮下に移植し、赤外線カメラで経時的追跡をした (n=2)。

F344 ラット 4 匹を使用し、細胞染色群 (n=2)、人工構造体染色群 (n=2) にランダムにわけ、2 週、4 週に赤外線カメラで観察した。

4. 研究成果

(1) 人工尿管は経時的に体積が縮小した。尿管蠕動運動は正常よりも弱かったが、全例にみとめられた。人工尿管移植群の 70% で尿の良好な通過が見られた。

ステントのみで再建した群 (n=3) では、すべて G3-4 の水腎症を発症した。対照的に、人工尿管移植群では、70%が G0-1 程度の軽度の水腎症であった。人工尿管構造群の水腎症グレードは 1.00 ± 2.66 、ステントのみの群は 3.33 ± 0.33 と有意に人工尿管群で水腎症のグレードが軽度であった。

尿管上皮は経時的にラット尿管側から人工尿管内部に向け再生され、完全再生がみられた。筋層も尿管側から人工尿管側に再生し、経時的に延長していったが、12 週の観察期間内に完全再生は見られなかった。人工尿管の VEGF 染色細胞は、移植前の構造体レベルでは全体的に染色されたが、移植後は凝縮し、濃いスポットとして観察された。CK14 も、構造体レベルでは全体的に染色されたが、移植後は凝集していた。線維化の指標となる Masson's trichrome 染色は、経時的に濃く染色され、人工尿管の線維化が経時的に進行することが示唆された。
(本研究は 2022 年 Acta biomaterialia に掲載された。)

これまで、尿管の再生は、高分子化合物によるものが大半を占め、細胞のみでできた構造体で再生した報告は皆無であった。本研究はバイオ 3D プリンティング技術を用い、スフェロイドを積層して作成した管状構造体で尿管を再生した初めての報告である。本研究は短距離の尿管再生であるが、細胞種の変更等の工夫を凝らすと、将来的には、長距離の尿管再生が可能となる可能性もあり、その礎となる研究である。

(2) 細胞レベルでの ICG 染色では、培地の ICG 濃度 0.625-25mg/ml では細胞の増殖能に問題はなかったが、50 mg/ml 以上では、細胞の viability が低下していった。また、ICG 濃度が高くなるにつれ、細胞同士の癒合が阻害される傾向にあった。一方で、人工尿管作成後、還流培養時に染色した群では、細胞レベルでの染色群よりいずれの ICG 濃度でも形態が保たれていた。皮下移植後の赤外線カメラ観察では、いずれも 4 週以上観察が可能であった。また、パラフィン包埋切片でも構造体は十分に観察できる程度に発色していた。

人工構造体を ICG でラベリングすることで、赤外線カメラを用いて、非接触で長期間、構造体を観察することに成功した。これまで、移植された構造体を FDA が人体使用を認可した薬剤で、非侵襲的、非接触的に簡便に観察する方法はなく、本研究が初めての報告である。将来、種々の再生臓器の臨床応用時の経時的追跡、グラフト不全の予測に役立つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takagi K, Matsumoto K, Taniguchi D, Machino R, Uchida F, Hara R, Oishi K, Yamane Y, Iwatake M, Eguchi M, Mochizuki Y, Nakayama K, Nagayasu T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Regeneration of the ureter using a scaffold-free live-cell structure created with the bio-three-dimensional printing technique.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 S1742-7061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2022.10.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木克典, 松本 桂太郎, 溝口 聡, 内田史武, 原 亮介, 大石海道, 岩竹真弓, 江口正倫, 中山 功一, 永安 武
2. 発表標題 ICG（インドシアニングリーン）で標識した3次元構造体を用いた、移植構造体の経時的追跡
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022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	望月 保志 (mochizuki yasushi) (40404256)	長崎大学・病院（医学系）・准教授 (17301)	
研究分担者	中山 功一 (nakayama koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	江口 正倫 (eguchi masamichi) (70585405)	長崎大学・病院（医学系）・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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	松本 桂太郎 (matsumoto keitaro) (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	町野 隆介 (machino ryusuke) (90728081)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	谷口 大輔 (taniguchi daisuke) (20773758)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	山根 裕介 (yamane yusuke) (90457549)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	

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