

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08647

研究課題名（和文）ゼラチンマイクロスフェアを用いた増殖因子投与による人工管腔臓器作製法の開発

研究課題名（英文）Development of an Artificial Cylindrical Organ Fabrication Method Using Gelatin Microspheres with Growth Factor Administration

研究代表者

内田 史武（Uchida, Fumitake）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・研究協力員

研究者番号：00866270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は幹細胞に成長因子を用いて軟骨に分化させることで、一定の軟骨の品質を得ることを目標にした。バイオ3Dプリンターを用いて、環状軟骨構造体、馬蹄形軟骨構造体、馬蹄形軟骨構造体に平滑筋を組み合わせた構造体（mimic気管）を作製した。mimic気管においては、前面を馬蹄形軟骨で、後面を平滑筋で構成されたより実際の解剖構造に近い構造体の作製に成功した。この構造体のラットへの移植にも成功した。また成長因子をより高効率に投与するため、TGF- β 1をゼラチンマイクロスフェア（GM）に付加し、構造体内で徐放させる方法についても実験を進め、hMSCを用いた管状軟骨構造体の作製にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、バイオ3Dプリンターを用いて、様々な種類の細胞のを組み合わせ、自由な形状の人工臓器を作製している。この品質を確保するため成長因子の投与を検討していた。しかし、三次元臓器培養液内で行うと大量の増殖因子を必要とし、コスト面、品質面でも理想的ではない。ゼラチンマイクロスフェアは、成長因子を内包させ、構造体内で成長因子を徐放することが可能である。これにより、三次元構造体へ増殖因子を効率よく投与することで、幹細胞を様々な細胞に分化させ、より強固で、安価な三次元臓器を安定的に作製したいと考えており、この有用性が確立されれば人工臓器の臨床応用への大きな足がかりになる。

研究成果の概要（英文）：Our goal was to obtain a certain cartilage quality by differentiating stem cells into cartilage using growth factors. Using a bio 3D printer, we fabricated an annular cartilage structure, a horseshoe-shaped cartilage structure, and a horseshoe-shaped cartilage structure combined with smooth muscle (mimic trachea). mimic trachea was successfully fabricated with horseshoe-shaped cartilage on the anterior surface and smooth muscle on the posterior surface, which was more similar to actual anatomic structures. We also succeeded in transplanting this structure into rats. In order to administer growth factors more efficiently, we have also experimented with a method of adding TGF- β 1 to gelatin microspheres (GM) for sustained release within the structure, and succeeded in fabricating a tubular cartilage structure using hMSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞 軟骨分化 バイオ3Dプリンター 細胞凝集 人工気管 成長因子 ゼラチンマイクロスフェア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

気道および食道再生領域において、人工気管、人工食道は未だに臨床応用されていない。研究成果の報告は多いが、殆どの場合スキャフォールドと呼ばれる足場を使用している。スキャフォールドの使用は、感染や生体適合性の低下、経時的な劣化変性などの問題を有する (Kelm JM, 2010)。このため、スキャフォールドを用いない、細胞からなる人工臓器の作製は理想的と言える。我々は、バイオ3Dプリンター”Regenova™”を用いて、自己細胞および幹細胞を用いて、人工気管、食道、小腸、尿管を作製してきた。この技術は、スフェロイドを用いて、様々な種類の細胞の組み合わせ、コンピュータデザインによる自由な形状の人工臓器を作製することが可能である (Taniguchi, ITCVS 2018. Machino, Adv Healthc Mater, 2019. Takeoka, PlosOne, 2019.)

しかしながら、これらの人工臓器の臨床応用にむけた課題は、作製時における品質の不安定さである。とくに人工臓器の基礎となる軟骨組織および平滑筋組織は重要である。これらの人工臓器には、骨髄幹細胞を一部用いているが、その多くが成熟細胞 (肋軟骨細胞、食道平滑筋など) である。これらは、細胞の状態 (継代数、個体による差など) により、三次元構造体内では大きくその品質を変えていく。そのため、一定の品質をもつ細胞が必要であり、最も適した細胞は、幹細胞 (間葉系幹細胞、脂肪幹細胞、iPS 細胞など) から分化したばかりの細胞である。理想的には構造体内での分化が最もよいと考えられる。しかし、三次元臓器培養液内で行うと大量の増殖因子を必要とし、コスト面、品質面でも理想的ではない。ここに三次元臓器作製における大きな問題が存在する。

ゼラチンマイクロスフェアは、ミネラルコートされたもので、DNA や増殖因子を把持し、徐々に deliver できる drug delivery system(DDS)の一つである (Khalil 2017, Sci Rep.)。これまで、Plasmid DNA の他、BMP-2, TGF-B, FGF-2, VEGF を用いた報告がある (Yu, Adv Funct Mater, 2014. Herberg, Nanotheranostis, 2018)。これは細胞と接したゼラチンマイクロスフェアから直接増殖因子を提供するため、細胞への確実な増殖因子の影響を与え、培養液全体に混入するよりも効率的かつ効果的である。

このゼラチンマイクロスフェアを用いて、三次元構造体へ増殖因子を効率よく投与することで、幹細胞を様々な細胞に分化させ、より強固で、安価な三次元臓器を安定的に作製することができれば理想的である。この有用性が確立されれば非常に重要なツールとなり、人工臓器の臨床応用への大きな足がかりになる。

2. 研究の目的

目的; バイオ3Dプリンターを用いた自己細胞および幹細胞からなる人工臓器作製における、ゼラチンマイクロスフェアによる増殖因子投与の有効性の評価と機械的、機能的に品質の高い、安価な生産方法確立を目的とする。

独自性;

ミネラルコートされた吸収性のゼラチンマイクロスフェアを用いる。

独自のバイオ3Dプリンターで、スキャフォールドなどの異物がなく、抗免疫性、抗感染性、異物除去能を有する再生臓器を作製する点。

大口径組織でも評価し、より実臨床へ向けた研究を行う点。

創造性;

様々な細胞への分化を行う点。つまり、血管内皮細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などの機能、動態解析を行う点。

より安価な方法を用いることにより、成熟した軟骨組織、平滑筋組織を作製し、臨床応用へと導きやすい、現実的な作製方法を開発する点。

3. 研究の方法

ゼラチンマイクロスフェアを用いた実験に先立ち、成長因子単純投与による実験を行った。

軟骨誘導のために、細胞ペレットを3次元培養に供した。ヒト骨髄間葉系幹細胞(hBM-MS C)を軟骨分化培地(chondrogenic medium; CM)で培養し、成長因子を添加した(TGF- β 3、BMP-2)。単離後、細胞を遠心分離して細胞凝集塊を得、95%の空気と5%のCO₂を含む加湿雰囲気下、37°Cで培養した。培地は3-4日ごとに交換し、14日間または28日間培養した。軟骨誘導に最適な増殖因子の組み合わせを決定するため、MSCBM中のFGF-2の有無によってペレットを2つのグループに分け、さらに10ng/mLのTGF- β 3を添加したグループと、10ng/mLのTGF- β 3と100ng/mLのBMP-2を添加したグループに分けた。

グリコサミノグリカンアッセイ

4週間培養したペレット中の総グリコサミノグリカン(GAG)レベルを測定した。

多細胞スフェロイドの調製

軟骨スフェロイド

hBM-MS Cからなる混合細胞懸濁液を、軟骨分化培地および増殖因子(TGF- β 3)を含む超低付着性丸底96-Uウェルプレートにプレーティングした。アッセイ条件は、予備実験に基づいて経験的に選んだ。48時間後、細胞はその接着性から球状の凝集体(スフェロイド)を自然に形成した。このスフェロイドをバイオ3Dプリンティング材料とした。

平滑筋スフェロイド

ヒト平滑筋細胞(hMSC)からなる混合細胞懸濁液(1.0×10^4 個/スフェロイド)を上記のようにプレーティングし、平滑筋増殖基底培地と上皮基底培地で1:1の割合で培養した。

バイオ3Dプリンティングによる管状人工気管の作製

バイオ3Dプリンターを用いて、足場のない管状の人工気管内に多細胞スフェロイドを組み立てた。3Dデザインに従って、プリンターはスフェロイドを9×9の針アレイ(一辺の長さ3.2mm、針外径0.17mm、針間距離0.4mm)に配置した。スフェロイドは、96ウェルプレートからロボット制御の25ゲージノズルを使って吸引し、コンピューター制御の下、複数の医療用ステンレス針でできた剣山に挿入した。

まず、軟骨スフェロイドのみを用いて円柱状の軟骨構造を作製した。合計192個のスフェロイドを用いて3D管状構造を作製した。バイオ3Dプリント後、CMを入れた滅菌試験管内で人工気管を成熟させた。次に、馬蹄形の軟骨構造を作製した。8列176個のスフェロイドを用いて3D管状構造を作製した。筒状構造とは異なり、スフェロイドは2列欠落して配置された。バイオ3Dプリント後、CMを入れた滅菌試験管内で人工気管を成熟させた。

よりリアルな解剖学的構造を持つ人工気管を作製するため、軟骨と平滑筋の両方のスフェロイドを入れた。人工気管には、前面、側面、下面の大部分を覆う16列にわたって368個の軟骨スフェロイドがあり、軟骨は馬蹄形であった。16個の平滑筋スフェロイドが後面に列をなして配置されていた。全体として384個のスフェロイドを用いて、移植実験に用いた3D管状構造を作製した。また、in vitro実験用に、8列の細胞スフェロイドを用いてハーフスケールの構造体も作製した。

バイオ3Dプリント後、プリントした人工気管は、15mLのCMを入れた滅菌済み試験管内で、37°C、5%CO₂の加湿細胞培養インキュベーター内で成熟させた。プリンティングから7日後、剣山を除去し、構造体を14ゲージのプラスチック製カテーテル(テルモ、東京、日本)に移した。予備実験に基づき、臨床応用に最も適切で最も長い許容期間を考慮して、培養期間は21日間とした。

外科的移植と経過観察

雄(10-12週齢)のF344免疫不全ラット(体重200-250g)を気管レシピエントとして用いた。ラットはイソフルラン(4%)で麻酔され、麻酔はイソフルラン(2%)で維持された。手術中は自然換気を維持した。頸部切開により頸部気管を露出させた。3リングの気管軟骨セグメントを切除し、シリコン製ステント(内径1.5mm)に支持された軟骨

と平滑筋からなる人工気管に置換した。顕微鏡下で、縫合糸を用いて近位端と遠位端の吻合を行った。呼吸が安定した後、頸部切開を閉じた。術後、すべてのレシピエントラットを1~2時間観察した後、ケージに戻した。標準的な飼料と水を与えた。免疫抑制療法は行わなかった。経過観察期間は術後28日間であった。

組織学的および免疫組織化学的検査

ペレットを固定する前に、サンプルをゲルに包埋した。すべてのサンプルを10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、4 μ m厚の切片に切り出した。マウントした組織切片は、分析前に脱パラフィンし、再水和した。ペレット分布の形態学的分析は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色した切片を用い、光学顕微鏡を用いて行った。アルシアンブルーおよびファストグリーン/サフラニン-O染色は、GAGが軟骨組織の主成分であるかどうかを評価するために行った。

その他のサンプルについては、bio-3Dプリンターを用いて構造を作製し、手術後の標本を10%中性緩衝ホルマリンで直接固定した。その後、上記と同様の方法で処理した。免疫組織化学は以下の一次抗体を用いて行った：抗コラーゲンII、抗コラーゲンI、抗 α -平滑筋アクチン(α -SMA)および抗平滑筋ミオシン重鎖11(SMMHC)を使用した。コラーゲンIIとIは、それぞれヒアルロン酸軟骨組織形成と線維化を評価するために選択した。 α -SMAとSMMHCはSMCマーカーとして用いた。

4. 研究成果

効果的な軟骨分化のための最適成長因子の選択

FGF-2で培養し、TGF- β 3とBMP-2を添加したhBMSCsから得られたペレットは、培養2週間と4週間のいずれにおいても、サイズが大きく、顕著な軟骨分化を示した。これは、アルシアンブルー染色とサフラニン-O染色を用い、細胞外マトリックス(ECM)がサンプル全体に豊富に存在することから、GAGアッセイで高い値を示したことで確認された。次に顕著な軟骨分化が観察されたのは、FGF-2を添加し、TGF- β 3のみを補充して培養したhBMSCから得られたペレット、次いでFGF-2を添加せず、TGF- β 3とBMP-2を補充して培養したhBMSCから得られたペレットであった。軟骨分化が最も不良であったのは、FGF-2を添加せず、TGF- β 3のみを添加して培養したhBMSCから得られたペレットであった。このことから、FGF-2を添加してhBMSCを培養すると、ペレット化時にhBMCから軟骨細胞への分化が促進されることが示唆された。また、BMP-2を添加するとペレットサイズが大きくなる傾向があった。そこで、構造体を大量生産するコストを考慮し、TGF- β 3を添加したFGF-2でhBMSCペレットを培養することにした。BMP-2を加えなければ、コストは41%削減できた。

軟骨スフェロイドからなる円柱状軟骨構造のバイオ3Dプリンティング

hBMSCsから作製された完全な円柱状の軟骨構造は、バイオ3Dプリンティング後、21日間の全成熟後に評価された。この構造体は黄白色をしており、外科用鉗子を用いて容易に取り扱うことができた。HE染色による組織学的および免疫化学的検査では、軟骨組織と同様の間質を有する組織が形成され、アルシアンブルー染色およびサフラニン-O染色を用いて検出されたように、かなりの量のGAGが産生されていることが示された。これらの構造はまた、線維軟骨マーカーであるI型コラーゲンの弱い発現を示した。このことから、hBMSCsはヒアルロン酸軟骨に分化し、II型コラーゲンを発現することが示唆された。

軟骨スフェロイドからなる馬蹄形軟骨構造のバイオ3Dプリンティング

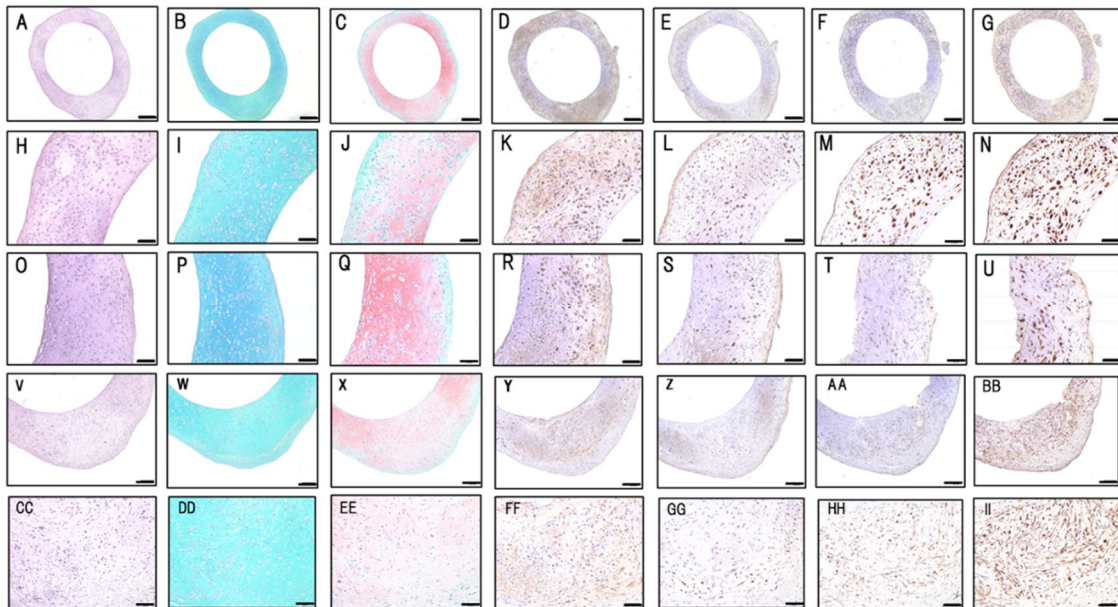
hBMSCsのみを用いて作製した馬蹄形軟骨構造体を、印刷後21日間の全成熟後に評価した。馬蹄形軟骨構造体は、ニードルアレイを外した後、プラスチックカテーテルに移すことができなかったため、100mm培養皿で培養した。馬蹄形軟骨構造体は、以前に作製した円筒形構造体と比較すると、わずかに拡大した形をしていた。物理学および組織学的結果は、上述の完全な円柱状構造体の結果と同等であった。馬蹄形の構造体は、II型コラーゲンよりもI型コラーゲンの方が強い染色性を示した。

軟骨と平滑筋スフェロイドで作った人工気管

hBMSCsとhSMCsを用いて作製した人工気管も、印刷後21日間の全成熟後に評価した。作製された人工気管は白っぽい黄色で、hSMCsからなる部分がわずかに目立っていた。この構造物は、外科用鉗子を用いて容易に取り扱うことができた。組織学的および

び免疫化学的検査から、アルシアンブルー染色とサフラニン-O 染色で示されたように、構造体の軟骨部分は GAG を含む豊富な ECM を産生していた。さらに、軟骨部分は II 型コラーゲンを発現していた。平滑筋細胞は紡錘形の外観を示し、細胞内スペースは比較的狭く、ECM は最小限であった。平滑筋部分は -SMA と SMMHC を発現していたが、アルシアンブルー、サフラニン-O、II 型コラーゲン染色でもわずかに陽性であった (図 1)。

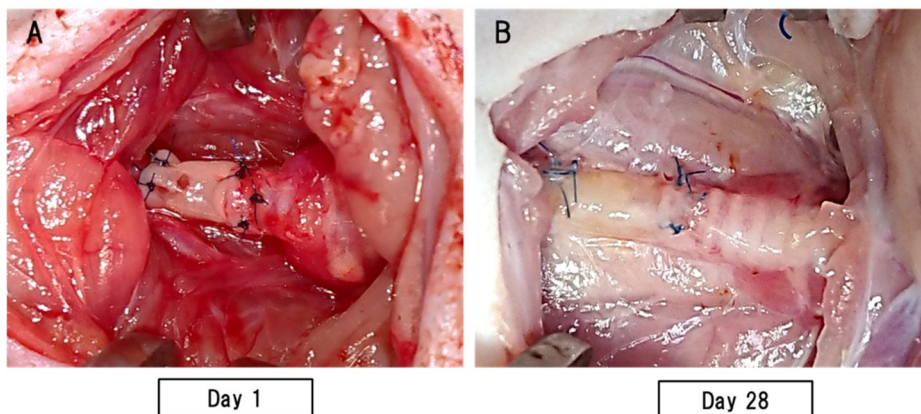
(図 1)



移植用グラフトとしての人工気管

気管移植は合併症なく行われた。移植は 3 匹のラットに行った。1 匹は手術の翌日に痰による気管閉塞で死亡した。残りの 2 匹は 28 日間生存した。ラットを安楽死させ、移植した気管を切除した。気管移植片はその形と硬さを保っていた。気管移植片を取り囲む微小血管のある結合組織も観察された。術後の合併症として、気管分泌物の貯留により 1 頭が死亡した。組織学的検査では、軟骨部分はアルシアンブルーとサフラニン-O で弱く染色され、コラーゲン II は強く染色されたが、コラーゲン I は染色されなかった。平滑筋を含む部分は、免疫組織化学的染色によって決定されたように、-SMA と SMMHC を発現していた (図 2)。

(図 2)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田史武, 松本 桂太郎, 町野 隆介, 小山 正三朗, 森山 正章, 原 亮介, 大石 海道, 松本 理宗, 西牟田 雅人, 土肥 良一郎, 朝重 耕一, 宮崎 拓郎, 土谷 智史, 中山 功一, 永安 武
2. 発表標題 間葉系幹細胞から分化させた軟骨を, バイオ3Dプリンターで積層して気管軟骨を作製する試み
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本理宗, 内田史武, 松本 桂太郎, 町野 隆介, 原 亮介, 大石 海道, 西牟田 雅人, 土肥 良一郎, 朝重 耕一, 宮崎 拓郎, 土谷 智史, 中山 功一, 永安 武
2. 発表標題 バイオ3Dプリンターで間葉系幹細胞から分化誘導した軟骨を積層し、気管軟骨を作製する試み
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田史武
2. 発表標題 ゼラチンマイクロスフェアを用いた成長因子投与による, 気管軟骨作成の試み
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田史武
2. 発表標題 間葉系幹細胞から分化させた軟骨を, バイオ3Dプリンターで積層して気管軟骨を作製する試み
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
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	松本 桂太郎 (Matsumoto Keitaro) (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
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	町野 隆介 (Machino Ryusuke) (90728081)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	朝重 耕一 (Tomoshige Koicih) (70457547)	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	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	土肥 良一郎 (Doi Ryoichiro) (00817786)	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	高木 克典 (Takagi Katsunori) (90635856)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (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	野中 隆 (Nonaka Takeshi) (30606463)	長崎大学・病院（医学系）・准教授 (17301)	
研究分担者	岩竹 真弓 (Iwatak Mayumi) (40624614)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員 (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