

令和 6 年 6 月 2 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：21K08888  
研究課題名（和文）カーボンナノチューブを用いた自己細胞からなる人工管腔臓器の新たな作製技術の確立  
  
研究課題名（英文）Establishment of a new fabrication technique for artificial luminal organs composed of autologous cells using carbon nanotubes  
  
研究代表者  
町野 隆介（Machino, Ryusuke）  
  
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：90728081  
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）：間葉系幹細胞MSCsにTGF およびBMP-2を加えることで軟骨細胞に誘導されることが、我々の先行研究でも証明されている。特にBMP-2は高価であり、CNTsの添加によりBMP-2の使用を抑えることが出来れば品質を落とさず、製造コスト削減につながる可能性がある。低濃度のCNTsを添加したMSCsのspheroidは問題なく軟骨様組織に分化し、CNTsの毒性による明らかな細胞死も見られなかったが、CNTsの添加濃度を上げると、TGF、BMP-2使用下においても軟骨に分化せずCNTsの細胞毒性による細胞死が予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
他施設からも細胞培養の足場材料にCNTsを加えることで、骨形成が促進されることが報告されているが、細胞と共培養を行うことでの効果を検討した報告はみられていない。小サイズの人工臓器の作成にも大量のspheroidと、それに伴う培地を必要とする3Dバイオプリンターにおいて、高価な培地の添加因子を加えることなく、加えた場合と同等の品質のspheroidを作成することは、その先の実際の臨床応用を考えた際の製造コストの削減効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies have demonstrated that the addition of TGF and BMP-2 to mesenchymal stem cell (MSCs) induces them to become chondrocytes. BMP-2 is particularly expensive, and if the use of BMP-2 can be reduced by adding CNTs, quality will not be compromised and production costs may be reduced. MSCs spheroid with low concentration of CNTs differentiated into cartilage-like tissue without any problem, and no obvious cell death due to CNTs toxicity was observed. However, when the concentration of CNTs was increased, even with TGF and BMP-2, MSCs did not differentiate into cartilage, and cell death due to CNTs toxicity was expected.

研究分野：気管再生学

キーワード：3Dバイオプリンター 気管再生 人工臓器 スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

バイオ3Dプリンターによる自己細胞および幹細胞からなる人工管腔臓器は、

理想的な管腔臓器再生ツールと考えられる。我々はこれまでに、人工気管、食道、小腸、尿管を作製、小動物へ移植、生存に成功した。しかし、これらの人工臓器の臨床応用にむけた課題は、軟骨組織、平滑筋組織を始めとした人工臓器の基本となる構造体の品質、特に人工臓器の強度、幹細胞の人工臓器内での分化、人工臓器内の血管形成などの不安定さである。この解決方法として、細胞接着に関与でき、細胞に直接増殖因子を提供できる drug delivery system(DDS)としてカーボンナノチューブ(CNTs)を用いた研究を行う。CNTsは、現在癌細胞などに対する抗がん剤のDDSや幹細胞培養における分化調整可能な足場(scaffold)素材として注目されている。このCNTsを用いて、増殖因子を直接人工臓器内へ埋め込むことで、幹細胞を様々な細胞に分化させ、さらにCNTsによる細胞接着、機械的刺激による分化能

維持や分化誘導を行うことで、組織の強度を上昇、安価な人工臓器を短時間で作製する新たな作製、製造方法の確立を目指す。管腔臓器の再生は未だ臨床領域には達しておらず、研究レベルで行われているものについてもその多くが、管腔を模した大型のScaffoldを使用している。Scaffoldの使用は、感染や経時的な劣化変性などの問題も有する(Kelm JM, 2010)。このような問題の解消のため、細胞と細胞外基質のみからなる三次元構造体で、異物を使用しない人工臓器の研究が盛んになった(Dikina AD, 2015, Fennema E, 2013)。我々は、バイオ3Dプリンター”Regenova™”による研究を行ってきた。この技術は、細胞凝集塊であるSpheroidを用いて、大型のScaffoldを使用せず任意の形の三次元構造体の作製を可能とし、かつ様々な種類の細胞の組み合わせることができる(Taniguchi, 2018, ITCVS, Machino, 2019, Adv Healthc Mater, Takeoka, 2019, PlosOne)。

これらの人工臓器の臨床応用における課題は、培養期間が長期に及ぶこと、および人工臓器の強度、幹細胞の人工臓器内での分化、人工臓器内の血管形成などの不安定さである。これらの人工臓器の作製には、その多くが成熟細胞を使用しており、細胞の状態(継代数、個体による差など)により、作製した三次元構造体の品質が大きく変わってしまう。品質の安定に最も適した細胞は、幹細胞(間葉系幹細胞、脂肪幹細胞、iPS細胞など)から分化したての細胞である。しかし、この幹細胞の分化を培養液内で行うには大量の増殖因子、長期間の培養期間を要し、コスト面、品質面でも臨床応用には適さない。また我々が作製した管腔臓器は小動物での移植手術には耐えうる強度を有し、人工気管では、移植後半年以上の長期生存も可能であったが、長期生存させるには内部にステント等を留置する必要がある、細胞だけで作製した人工臓器の強度上昇にはまだ多くの課題が残る。

CNTsは、ナノスケールの寸法の中空グラファイトシリンダーで、伝導性があり、科学的及び熱的に安定しており、感染に強く、剛性も高い。またカーボン素材そのものは現在でもすでに心臓人工弁等で広く使用されており、CNTsにおいても長さ100nm以下、あるいは直径数nm程度では毒性が低く、またサイズが小さく適切な化学修飾があれば生体外に排出されることが知られている。

現在、CNTsは主に抗がん剤のDDSとして注目されている(Son 2016, Sanginario 2017)が、CNTsが増殖因子をdeliveryすることができれば、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コスト低減が可能である。加えて、骨

図1. バイオ3Dプリンターと人工臓器作製テクノロジー



再生の研究において CNTs は、細胞接着の促進だけでなく、細胞の形態を制御し、幹細胞の分化を促進する効果があるとされている (Pei 2019)。

このように、CNTs による増殖因子の効率的な各細胞への投与、および CNTs そのものが scaffold として移植組織の強度上昇に貢献することとなれば、三次元臓器において非常に重要なツールとなり得、この使用方法が確立されれば、人工臓器の臨床応用へ大きな足がかりになる。

## 2. 研究の目的

バイオ 3D プリンターを用いた管腔臓器作製時に CNTs を添加することによる増殖因子投与および直接的な組織強度の上昇による、機械的、機能的に品質の高い、安価な人工臓器作製への有効性の評価と臨床応用へ向けた使用法、応用法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 増殖因子を添加したCNTsによる間葉系幹細胞、脂肪幹細胞の軟骨細胞、平滑筋細胞等への分化への有効性と細胞毒性の確認と評価

in vitroでの軟骨作製における比較検討

幹細胞 ± CNTs-TGF の比較により、軟骨組織の作製における品質評価を行う。臨床応用を目指し、より軟骨組織の品質が高い組み合わせを検討する。

(2) CNTs-増殖因子を用いたspheroidによる管腔臓器の作製と評価

人工気管において、上記組織を用いて作製し、評価する。

人工気管作製における評価とラット気管との比較

幹細胞、CNTs、TGF のベストな組み合わせの spheroid で、ラット気管サイズの軟骨組織作製を行う。これと線維芽細胞の層を交互に置き、人工気管を作製 (図 2)。それぞれの組織に HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を加える。作製した人工気管とラット気管の強度を比較する。

図 2.



## 4. 研究成果

CNTs を spheroid に添加する際に、CNTs がお互いに接着してしまい濃度が一定にならないことがわかった (図 3)。この問題は超音波洗浄機を用いることで CNTs が細かく分散され対応可能となった (図 4)。間葉系幹細胞 MSCs に TGFβ および BMP-2 を加えることで軟骨細胞に誘導されることが、我々の先行研究でも証明されている。特に BMP-2 は高価であり、CNTs の添加により BMP-2 の使用を抑えることが出来れば品質を落とさず、製造コスト削減につながる可能性がある。低濃度の CNTs を添加した MSCs の spheroid は問題なく軟骨様組織に分化し、CNTs の毒性による明らかな細胞死も見られなかった (図 5)。

図 3.

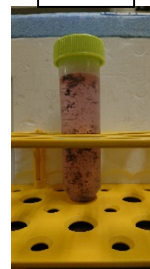


図 4.

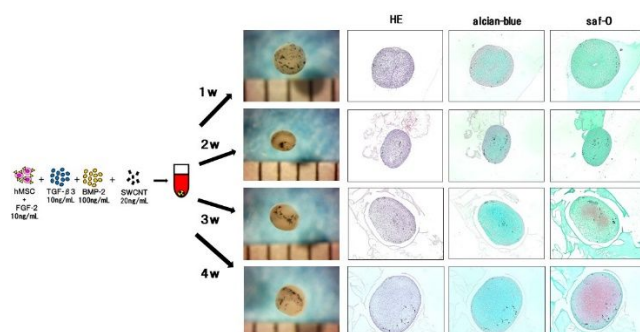
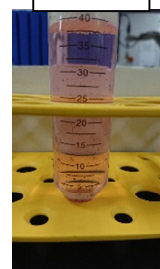


図 5



しかし CNTs の添加濃度を上げると、TGFβ、BMP-2 使用下においても軟骨に分化することではなく、同じ細胞数でも spheroid は小径で CNTs の細胞毒性による細胞死が予想された。BMP-2 を除いて作製した spheroid でも同様の結果であった（図 6）。

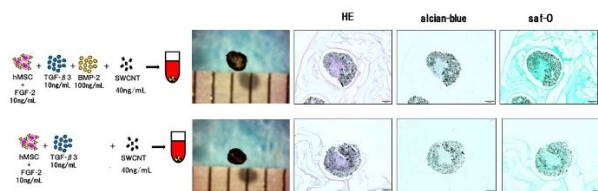


図 6

細胞死を起こさない程度の低濃度の CNTs を添加し、培地に BMP-2 を添加しない状態で細胞を  $2.5 \times 10^5$  個用いた spheroid を作製、4 週間の培養で軟骨様組織に分化誘導した場合、一つの spheroid を作製するのにかかる培地価格は、同様の spheroid を BMP-2 を添加して行った場合にかかる培地価格の約 0.57 倍で済む。我々がこれまでの先行研究でラットに移植しているバイオ 3D プリンターで作製した長さ 4-5mm、厚さ 1.5-2mm 程度の円筒型の人工気管を作製する場合、細胞を  $1.0 \times 10^4$  個で作製した spheroid を 384 個使用することとなる。人工気管として使用できるまでの培養期間を考えると、実際の臨床応用を考えた際には人工気管のサイズもさらに大きなものを作製する必要があり、BMP-2 を添加しないことでの製造コストの削減効果は大きいと考えられる。

他施設からも細胞培養の足場材料に CNTs を加えることで、骨形成が促進されることが報告されているが、細胞と共培養を行うことでの効果を検討した報告はみられていない。

3D バイオプリンターを用いて人工気管を作製し、TGFβ および BMP-2 を添加した CNTs を添加していない人工気管との品質の差を検討している。また CNTs を添加した人工気管のラットへの移植実験を施行し、作成された人工気管の組織内での細胞毒性から、移植後のラット生体内での組織毒性の評価も検討しているが、一つの人工気管を作製するのにかかるコストがかかってしまうため実現まで至らなかった。

#### 参考文献

Kelm JM et al. A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks. *J Biotechnol.* 2010 1;148(1):46-55.

Dkina AD et al. Engineered cartilaginous tubes for tracheal tissue replacement via self-assembly and fusion of human mesenchymal stem cell constructs. *Biomaterials.* 2015 52:452-62.

Fennema E et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 2013 31(2):108-15.

Taniguchi D et al. Scaffold-free trachea regeneration by tissue engineering with bio-3D printing. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2018 1;26(5):745-752.

Machino R et al. Share

Replacement of Rat Tracheas by Layered, Trachea-Like, Scaffold-Free Structures of Human

Cells Using a Bio-3D Printing System. *Adv Healthc Mater.* 2019 8(7):e1800983.

Takeoka Y et al. Regeneration of esophagus using a scaffold-free biomimetic structure created with bio-three-dimensional printing. *PLoS One.* 2019 8;14(3):e0211339.

Son KH et al. Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators. *Int J Nanomedicine.* 2016 7;11:5163-5185.

Sanginario A et al. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors (Basel).* 2017 15;7(1):9.

Pei B et al. Applications of Carbon Nanotubes in Bone Tissue Regeneration and Engineering: Superiority, Concerns, Current Advancements, and Prospects. *Nanomaterials (Basel).* 2019 22;9(10):1501.

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	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	藤澤 一範  (Fujisawa Kazunori)  (00724634)	信州大学・先鋭領域融合研究群先鋭材料研究所・准教授(特定雇用)   (13601)	
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	中山 功一  (Nakayama Koichi)  (50420609)	佐賀大学・医学部・教授   (17201)	
研究分担者	野中 隆  (Nonaka Takashi)  (30606463)	長崎大学・病院(医学系)・准教授   (17301)	
研究分担者	朝重 耕一  (Tomoshige Koichi)  (70457547)	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	富永 哲郎  (Tominaga Tetsuro)  (60457546)	長崎大学・病院（医学系）・助教    (17301)	
研究分担者	森山 正章  (Moriyama Masaaki)  (90815953)	長崎大学・病院（医学系）・医員    (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	小山 正三郎  (Oyama Shosaburo)  (20815972)	長崎大学・病院（医学系）・助教    (17301)	
研究分担者	内田 史武  (Uchida Fumitake)  (00866270)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・研究協力員    (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