

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390244
 研究課題名（和文）血管新生制御マテリアルを用いた再生臓器に対する栄養血管付与技術の開発
 研究課題名（英文） Construction of vascular network in regenerative tissue by using angiogenic materials.
 研究代表者
 小山 宏之（KOYAMA HIROYUKI）
 東京大学・医学部附属病院・特任准教授
 研究者番号：10241994

研究成果の概要（和文）：

大型で高機能な再生臓器の創製には、再生臓器に対する栄養血管網の付与が必須である。本研究では、まず微小再生組織ユニットであるスフェロイドと血管新生誘導ゲルを複合化することによって、in vivo におけるスフェロイドへの栄養血管誘導技術を確立した。次に、スフェロイドの三次元集積配置をも可能とする新規血管新生誘導ゲルを開発した。この新規ゲルを用いて、スフェロイドの大型三次元集積体に対する in vivo での栄養血管付与を試みたが、栄養血管誘導速度の限界による中心部組織の viability 低下が生じた。そのため、これを解決する技術として「ゲル内灌流システム」を開発し、培養液を用いた灌流実験でその有効性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Three-dimensional (3-D) regenerative tissue with a certain bulk cannot maintain whole viability in vivo without sufficient blood perfusion. In the present study, we first established a technology to construct neovascular network around small tissue elements (spheroids) by combining with “angiogenic gel”. Angiogenic gel has a unique function to rapidly induce neovascular growth from recipient bed into the inside of the material. Subsequently, we created a new-type angiogenic gel which could also function as a scaffold to support 3-D accumulation of spheroids. A bulky regenerative tissue consisting of accumulated spheroids and the new-type gel was transplanted in vivo to attempt a construction of vascular network covering whole part of the tissue, though viability of spheroids declined in the central part of the tissue. To preserve the viability of all spheroids in the regenerative tissue, we developed an in-gel perfusion system, and a perfusion trial using culture medium showed effectiveness of the system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工臓器学・再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 大型で高機能な再生臓器創製の鍵は栄養血管の付与

大型再生臓器を作る際の最大の問題点は、いかに臓器を構成する細胞に酸素や栄養を補給し老廃物を除去するかということであ

る。細胞が viability を保ち機能するためには、これらを司るライフラインが不可欠である。従来の浮遊細胞や細胞シートによる再生組織ならば、周囲からの受動拡散によりこれを賄うことができるが、三次元化・大型化された再生臓器には専用ライフラインである栄養血管網が必要だ。

(2) 再生臓器に栄養血管を付与するためのストラテジー

再生臓器に対する栄養血管付与法には大きく二つのアプローチがある。一つは in vitro において血管網を作成しそれを再生臓器の中に組み込んでいくという組織工学的なアプローチであり、もう一つは、再生臓器をホストに移植した後にホストの移植母床から血管新生を誘導して再生臓器内へ血管網を引き込むというアプローチである。研究担当者は、かねてより後者のアプローチによる栄養血管付与技術の開発に取り組んできた。このアプローチの問題点は、血管新生を強力に誘導しても血管網を完成させるには一定の時間を要する事だ。仮に大型再生臓器を in vitro で作成できても、移植後、移植母床からホストの血管網が入り込んでくる前に再生臓器は中心壊死に陥る可能性がある。これを解決するために着目したのが、微小再生組織ユニットとしてのスフェロイドである。スフェロイドとは、直径数百マイクロン程度の細胞の集合体である。このサイズであると栄養血管がなくても周囲からの受動拡散のみで中心壊死をおこすことがないため、移植後も組織液などを介してしばらくは viability を保つことができる。研究担当者は、この時間的猶予を利用してスフェロイド周囲に移植母床からの新生血管を誘導することができれば、微小ではあるが栄養血管を伴った再生臓器を作成することができると考えた。そしてこのようなスフェロイドに対する栄養血管付与を多数のスフェロイドを用いて実施し、且つ三次元化・積層化することによって、トータルとして栄養血管を伴った大型再生臓器を創製するというストラテジーを立案した。

(3) 研究担当者の研究開始当初における準備状況

このストラテジーを実現するための第一歩として、研究担当者は、移植されたスフェロイドの周囲に移植母床から新生血管を誘導する技術の開発に取り組んできた。そもそも血管が成長・発達していくためには血管組織を支える足場が必須であり、生体内では結合組織である細胞外マトリックスを足場として血管が存在している。しかし、移植されたスフェロイドの周囲には細胞外マトリックスは存在しないため、栄養血管が発達する

のは不可能である。このため研究担当者は、スフェロイドへの栄養血管の発達を促すためには、スフェロイド周囲に新生血管の足場となるマテリアルを配置する必要があると考え血管新生誘導ゲルを開発した (Biomaterials, 30, 3580, 2009)。このマテリアルは、in vivo においてマテリアル内部に向かって強力に血管新生を誘導する作用を有する。本研究は、この血管新生誘導ゲルを基盤とし、更なる技術開発を加えることにより、大型再生臓器創製にむけた前記ストラテジー実現の糸口を見出すことを目指して計画された。

2. 研究の目的

(1) スフェロイドへの栄養血管誘導技術の確立

血管新生誘導ゲルをスフェロイド周囲に配置してラット筋膜下に移植し、スフェロイドへの栄養血管誘導を解析する。様々な条件のもとデータを蓄積し、栄養血管誘導技術を確立する。

(2) 栄養血管誘導技術を応用した新しい膵島移植システムの開発

膵島は直径が 200-500 μm 程度であるため、スフェロイドに見立てることが可能である。前項 (1) で開発した栄養血管誘導技術を膵島に応用すれば、膵島を体内の様々な部位に低侵襲に生着させることが可能と考えた。そのモデルケースとして筋膜下への膵島移植を実施する。

(3) スフェロイドの三次元配置を可能とする新しい血管新生誘導マテリアルの開発

栄養血管を伴った大型再生臓器を作るためには、栄養血管付与を多数のスフェロイドに実施しながら、三次元化・積層化させていく必要がある。そのためには、スフェロイドを三次元配置させながら血管新生誘導するような新規マテリアルを開発する。

(4) 大型再生臓器に対する栄養血管付与技術の開発

スフェロイドに対して栄養血管を誘導しつつ三次元化・積層化することにより、大型再生臓器への栄養血管付与技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) スフェロイドへの栄養血管誘導技術の確立

研究担当者がすでに開発していた血管新生誘導ゲルは、アテロコラーゲンをイオン結合によりマトリックス構造としたハイドロゲルであり、ラット筋膜下にインプラントし

た場合、その5日後においてマテリアル内部への強い血管新生誘導を惹起することが示されている。

① ゲルとともに移植したスフェロイドの経時的な viability の検討

マーカー遺伝子を導入したスフェロイドを血管新生誘導ゲルとともにラット筋膜下に移植し、その viability を経時的にモニターすることにより、スフェロイドへの栄養血管誘導（移植母床への生着と同義）の程度を検討した。まずプライマリー細胞として取り扱いが容易なマウス胎児線維芽細胞に、レトロウイルス・ベクターを用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入した。そしてスフェロイド作成用培養プレート（住友ベークライト社製）を用いて遺伝子導入した細胞200個から1粒のスフェロイドを作成した。このスフェロイド400粒と血管新生誘導ゲル20 μ Lを混和し、カラー状コンテナ（内径3mmのePTFE人工血管を幅2mmに輪切りにしたもの）に入れ、ヌードラットの腹直筋筋膜下に移植した。移植後のルシフェラーゼ活性は、経時的にIVIS測定機を用いて体外から計測した。

② ゲルとともに移植したスフェロイドの再生臓器としての機能の検討

スフェロイドに対する栄養血管が誘導されて移植母床に生着しても、再生臓器として機能しなければ、その意義は低い。そのため、細胞としての機能を測定しやすい肝細胞によりスフェロイドを作成し、血管新生誘導ゲルとともに移植して経時的に細胞機能を検討した。具体的には、GFPラットから肝細胞を採取し、前記と同様の方法で肝細胞スフェロイドを作成した。これを同様の方法で血管新生誘導ゲルとともにヌードラット筋膜下に移植した。標本の回収は移植後7、14、120日目に実施した。回収前日に β -naphthoflavone 50mg/Kgを経口投与し、翌日に殺処分として回収後、組織標本作製して酵素誘導を抗CYP450 (2E1)抗体を用いた免疫染色により確認した。同標本を用いて抗GFP抗体及び抗 α W因子抗体を用いた免疫染色を実施し、スフェロイドの生着と血管誘導を評価した。

(2) 栄養血管誘導技術を応用した新しい膵島移植システムの開発

ヌードラットにストレプトゾトシン(40-60mg/Kg)を腹腔内投与して糖尿病モデルを作成した。ドナーラットの膵臓から総胆管内へのコラーゲナーゼ注入法により膵島を分離した(1匹につき約200粒採取可能)。膵島1000粒(5匹分)を血管新生誘導ゲルとともに前記と同様の方法で糖尿病ヌードラットの筋膜下に移植した。翌日より経時的に随時血糖をチェックするとともに、ELISA法により血中インスリン濃度を測定した。ま

た、一部の移植ラットは殺処分にし、回収移植物の組織標本でHE染色に加えて、インスリンに対する免疫染色を実施した。

(3) スフェロイドの三次元配置を可能とする新しい血管新生誘導マテリアルの開発

スフェロイドを三次元配置させながら血管新生誘導するような新規マテリアルを開発した。研究開始当初は、スフェロイドと血管新生誘導ゲルの混和物を内部に収納しつつ三次元的に配置できる「籠」のような役割をはたすマテリアルを想定し、化学修飾ゼラチンによるナノ・ファーバー不織布を試作していた。しかし、並行して実施していた血管新生誘導ゲルの改良研究により、スフェロイドを三次元配置するためのスカフォールドとしても機能するような安定性と強度を有した新規血管新生誘導ゲルの開発に成功した。次項(4)においても、この新規血管新生誘導ゲルを用いて検討したため、以下にこの新規ゲルについて述べる。

新規血管新生誘導ゲルは、糖酸化物を架橋剤としてアテロコラーゲンを化学架橋して作成した。この糖酸化物は、糖を過ヨウ素酸ナトリウムにより部分酸化したもので、同一分子内に複数のアルデヒド基を含んでいるため、タンパク質のアミノ基と共有結合して架橋するというコンセプトだ。グルコース、フルクトース、マルトース、スクロース、ラフィノースを、それぞれ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、アセチルアセトンによる発色反応により酸化物中に含まれるアルデヒド量を計測した。フラグメンテーションを防ぐため、糖ユニットと過ヨウ素酸ナトリウムは、等モル比で反応させた。また、それぞれの糖酸化物を0.7%アテロコラーゲン溶液に添加してゲル形成を経時的に観察し、どの糖酸化物が架橋剤として適切かを評価した。

ラフィノース酸化物によって作成されたアテロコラーゲンゲルを、使用目的に合致するように最適化した後、ゲル内に血管内皮細胞、心筋細胞スフェロイドを包埋して三次元培養することにより、三次元配置用スカフォールドとして適切に機能するかを評価した。培養期間は14日間とし、その間に包埋した細胞やスフェロイドの三次元配置が保たれるか、足場として機能するかについて顕微鏡下で観察した。また、同ゲルをラット腹直筋筋膜下にインプラントし、5日後に回収して組織標本を観察することにより、血管新生誘導効果を評価した。

(4) 大型再生臓器に対する栄養血管付与技術の開発

① 三次元配置用マテリアルによる再生臓器の大型化実験

前項(3)で開発した三次元配置用スカフ

ールドとしても機能する新規血管新生誘導ゲルを用いて大型再生臓器に対する栄養血管付与を検討した。細胞種は、再生臓器として大型化による意義が最も大きいと考えられる肝細胞を用いた。肝細胞スフェロイドを作成し、新規血管新生誘導ゲルとともに前項(1)で用いたコンテナの10倍の容積をもつ大型カラー状コンテナ(内径6mmのePTFE人工血管を幅5mmに輪切りにしたもの)に入れ、ヌードラット筋膜下に移植した。移植後5日目に移植物を回収し、マテリアルに収納されたスフェロイドへの血管新生発達の程度やスフェロイドのviabilityなどを検討した。

② 細胞や組織のviability低下防止を目的としたゲル内灌流システムの開発

前項(4)①での検討の結果、再生組織の大型化に伴って、やはり栄養血管網が誘導されるまでの数日間にゲル内に配置した細胞や組織のviabilityが低下する可能性が示された。これに対処するため、ゲル内に灌流用中空糸を留置し、そこから培養液を持続供給する「ゲル内灌流システム」のプロトタイプを作成を試みた。大型カラー状コンテナの中心部に側孔を開けたPE-50チューブ配置した単純な構造の灌流システムを作成し、そこに新規血管新生誘導ゲルとともにスフェロイドや細胞を入れた。灌流用チューブより培養液を持続注入し、ゲル内灌流システムが機能する条件を検討するとともに、灌流培養液のみでゲル内のスフェロイドや細胞の三次元培養が可能かを検証した。

4. 研究成果

(1) スフェロイドへの栄養血管誘導技術の確立

①ゲルとともに移植したスフェロイドの経時的なviabilityの検討

ルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス胎児線維芽細胞でスフェロイドを作成し、血管新生誘導ゲルとともにヌードラット筋膜下に移植後、12日目までIVIS測定機を用いて経時的にルシフェラーゼ発現を測定した所、移植直後から全経過を通じて有意な発現の低下を認めなかった。対照としては、同数のスフェロイドを血管新生誘導ゲルを用いずに筋膜下移植した実験群を作成したが、ルシフェラーゼ発現は移植後3日目には検出不可能なレベルにまで低下し、以後、発現の回復は認められなかった。これらより血管新生誘導ゲルの併用によりスフェロイド周囲に血管網が誘導され、良好な生着を促した事が示唆された。

③ ゲルとともに移植したスフェロイドの再生臓器としての機能の検討

GFPラットより採取した肝細胞でスフェロイドを作成し、血管新生誘導ゲルとともにヌ

ードラットに移植し、移植後7、14、120日目に標本を回収した。組織標本の抗GFP染色と抗vW染色では、肝スフェロイドの良好な生着とその周囲に分布する豊富な血管を認めた。対照として、血管新生誘導ゲルを用いずスフェロイドのみを筋膜下移植した実験群を作成したが、極めて少量の肝スフェロイドの生着と乏しい血管分布を認めるに留まった。また抗CYP450染色では、血管新生誘導ゲルとともに移植し生着した肝スフェロイドのほとんどがCYP450陽性であり、肝細胞としての酵素誘導機能が示された。これらの所見より、血管新生誘導ゲルの併用により生着が促進された再生組織は機能的にも保たれる可能性が示された。

(2) 栄養血管誘導技術を応用した新しい膵島移植システムの開発

ストレプトゾトシン投与で作成した糖尿病ヌードラットに対して、同系ラットの膵島1000粒を血管新生誘導ゲルとともに移植した。10匹のモデルに対して移植を実施したが、組織標本で膵島の生着と細胞内におけるインスリンの生成は確認されたものの、糖尿病の治癒に至ったものは1匹のみであった。移植した膵島の数が少なかったか、あるいは移植膵島の生着率が少なかったかのどちらかが原因と思われたが、当初期待していたような結果を得ることはできなかった。

(3) スフェロイドの三次元配置を可能とする新しい血管新生誘導マテリアルの開発

血管新生誘導ゲルの改良研究により、スフェロイドを三次元配置するためのスカフォールドとしても機能するような安定性と強度を有した新規血管新生誘導ゲルの開発に成功した。

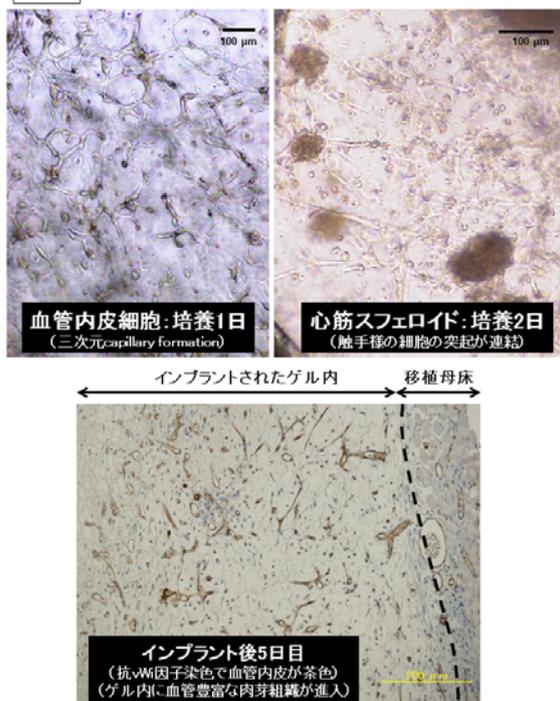
グルコース、フルクトース、マルトース、スクロース、ラフィノースの過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化物を精製し、これに含まれるアルデヒドの量を計測したところ、最も多くのアルデヒドを含んでいたのはラフィノース酸化物であり、次に多く含んでいたのはスクロース酸化物であった。グルコース、フルクトース、マルトースの酸化物は、精製前の測定では多くのアルデヒドを含むものの、精製後の測定では低値であった。これは、過剰な酸化によるフラグメンテーションのため揮発性のアルデヒドであるホルムアルデヒドが多く産生されたためと考えている。また、それぞれの糖酸化物をアテロコラーゲン溶液に添加してゲル形成能を評価したが、ラフィノース酸化物によるゲル化時間は4時間、スクロース酸化物によるゲル化時間は12時間であり、他の糖酸化物では48時間観察してもゲル化しなかった。以上より、架橋剤として最も実用性が期待できるのはラフィノ

ース酸化物であると考えた。

次に、ラフィノース酸化物によるアテロコラーゲンゲルの架橋反応を、アミノ酸含有生理食塩水の添加により自在に停止させる方法を開発した。これによって、ゲルの架橋密度をコントロールして血管誘導能やスカフォールド性能を容易に最適化することが可能となった。また、凍結保存による架橋反応の分割法も開発した。この技術は、細胞や組織を短時間で包埋し三次元的に配置することを可能とするもので、操作中の viability 低下防止に加え、実用性の向上に大きく貢献すると考えられる。

以上の技術により最適化されたラフィノース酸化物による新規ゲル内に、血管内皮細胞を包埋し三次元培養したところ、培養翌日からゲル内部に血管内皮細胞の分岐した管腔構造が観察され、2日目には管腔が三次元的に繋がった網目構造が確認された(図1A)。その後、網目構造はゲル内部全体に拡がり14日間の観察でもその配置が崩れることはなかった。心筋細胞スフェロイドのゲル内三次元培養でも、培養翌日にはスフェロイドから触手様の細胞の突起が認められた。その後、突起どうしが三次元的に連結することによりスフェロイド間の三次元ネットワークを形成し(図1B)、7日目を目安として全体が拍動を始めた。拍動の開始とともにゲル全体は収縮傾向を示したが、14日目においても三次元的配置は失われなかった。これらの所見は、この新規ゲルが三次元配置用スカフォールドとして良好に機能することを示唆している。

図1 新規血管新生誘導ゲル内での三次元培養



この新規ゲルは、ラット腹直筋膜下にインプラントされ、血管新生誘導能を評価された。インプラント5日目の評価では、組織標本上、ゲル周辺から内部に向けて血管豊富な肉芽組織の進入を認めた(図1C)。また、アテロコラーゲン成分の凝集によるゲルの変形・縮小は認められず、生体内環境においても安定した材料であることが示された。

(4) 大型再生臓器に対する栄養血管付与技術の開発

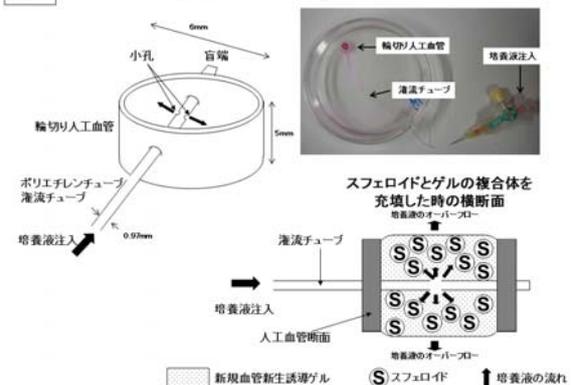
①三次元配置用材料による再生臓器の大型化実験

肝細胞スフェロイドを新規血管新生誘導ゲルとともに大型コンテナに入れてヌードラットに移植し、栄養血管誘導と肝細胞スフェロイドの生着を評価した。しかし、移植後5日目の組織標本による評価では、移植物の辺縁部(移植母床から1mm以内)には血管網の進入があり、肝スフェロイドの生着も認められたが、そこより内部(移植物の中心部)には血管の分布は無く、viableな肝細胞も認められなかった。このことから、再生臓器の大型化に伴い、スフェロイドの生存期間の限界に栄養血管誘導が追い付かなかった可能性が示唆された。

④ 細胞や組織の viability 低下防止を目的としたゲル内灌流システムの開発

ゲル内に配置した細胞や組織の viability 低下を防止するため図2のような「ゲル内灌流システム」のプロトタイプを作成した。血管内皮細胞や心筋細胞スフェロイドを新規血管新生誘導ゲルとともにこの灌流システム内に入れ、灌流用チューブより培養液を持続注入したところ、250 μ L/h までの速度なら、ゲル構造を壊すことなく浸透させられることが明らかになった。径6mm、幅5mmの再生組織への培養液補給としては、250 μ L/hは十分な量であると考えられる。また、灌流培養液のみで血管内皮細胞や心筋細胞スフェロイドのゲル内三次元培養が可能であることも確認できた。

図2 「ゲル内灌流システム」のプロトタイプ



以上の研究により、再生組織に対する栄養血管網付与技術開発のための基盤が確立されたと考えている。研究担当者は、「ゲル内灌流システム」を応用することにより、本研究で提示したストラテジーによる栄養血管網付与技術開発を継続している。この技術の完成により、高次元の機能と構造を持つ再生臓器開発が可能となれば、ドナー不足に悩む移植医療を補って余りある医療体系を構築することができるかと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件) すべて査読あり

1. Nakayama A, Miyata T(3/9), et al, Predictors of mortality after emergency or elective repair of abdominal aortic aneurysm in a Japanese population. Heart and Vessels, 2012, 10.1007/s00380-012-0319-5
2. Nakayama A, Miyata T(3/12), et al, Inverse association between the existence of coronary artery disease and progression of abdominal aortic aneurysm. Atherosclerosis. 222: 2012, 278-83, 10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.031
3. Kagaya H, Koyama H(2/9), Miyata T(9/9), et al, Impact of polyplex micelles installed with cyclic RGD peptide as ligand on gene delivery to vascular lesions. Gene Therapy. 19: 2012, 61-69, 10.1038/gt.2011.74.
4. Kamimura W, Koyama H(2/5), Miyata T(4/5) et al, A calcium-cross-linked hydrogel based on alginate-modified atelocollagen functions as a scaffold material. Journal of biomaterials science. Polymer edition, 23:2012,609-628, 10.1163/092050611X555678
5. Nagayoshi M, Koyama H, Miyata T(5/6), et al, Enhanced Neovascular Formation in a Novel Hydrogel Matrix Consisting of Citric Acid and Collagen. Annals of Vascular Diseases. 4: 2011, 196-203, 10.3400/avd.oa.11.00017
6. Oba M, Koyama H(11/12), et al, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery, Biomaterials, 32:2011,652-663, 10.1016/j.biomaterials.2010.09.022.
7. Oba M, Koyama H(9/10), et al, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble flt-1Molecular pharmaceuticals, 7:2010,501-509, 10.1021/mp9002317

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 小山博之ら、血管網の発達を促す微小環境を構築するための新規マテリアル開発、第12回 日本再生医療学会総会、2013年3月23日、神奈川県横浜市
2. 上村 渉、小山博之、組織再生用三次元細胞培養システム：オリゴ糖酸化物—アテロコラーゲンゲルの開発、第12回 日本再生医療学会総会、2013年3月21日、神奈川県横浜市
3. Koyama H, Selective and Sustained Delivery of bFGF for the Development of Collateral Vessels The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery, July, 2, 2010 Kyoto, Japan

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：酸化オリゴ糖で架橋したゲル材料

発明者：上村 渉、小山博之

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2012-118380

出願年月日：2012年5月24日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 博之 (KOYAMA HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10241994

(2) 研究分担者

宮田 哲郎 (MIYATA TETSUROU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70190791

三浦 裕 (MIURA YUTAKA)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40557980