

## 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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659354

研究課題名（和文） 組織細胞工学を用いた細胞多層化および血管導入法の開発と応用

研究課題名（英文） Development of tissue engineering for three-dimensional tissue regeneration

研究代表者

森田 育男（MORITA IKUO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60100129

研究成果の概要（和文）：

当該研究においては、ベタ基板を作成し、骨芽細胞を培養後、羊膜へ転写し、ヌードラットを用いた頭蓋部骨欠損モデルへの再生効果の検証を行った。その結果、ベタ基板を用いて骨芽細胞の骨欠損部への移植により、迅速な骨再生に成功した。さらに、構築した血管へのペリサイトの装着による血管の安定化、血管付き骨芽細胞シートを作成することに成功した。また、これら細胞付き羊膜の褥瘡モデルを用いての治療効果を検討した。

研究成果の概要（英文）：

To establish the angioplasty method using the novel printing technique, we developed a new substrate prepared by coating glass with polyethylene glycol to create a non-adhesive surface and subsequent photo-lithography to finely tune the adhesive property for efficient cell transfer. MicroCT analysis showed rapid and effective bone formation by the cell-equipped amniotic membrane. The cell-printing and transfer technology used to create the cell-equipped amniotic membrane was beneficial for the cell delivery system. Moreover, using scar model we developed the cell-equipped amnion membrane was examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1400000	0	1400000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	2800000	420000	3220000

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

科研費の分科・細目：再生歯学

キーワード：再生医療、血管内皮細胞、血管再生、骨芽細胞、骨修復

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀の医療はゲノム医療と再生医療と呼ばれている。しかし、現実的にはこれらの医療にはいくつかの問題がある。その一つは安全性の問題であり、前者は遺伝子導入法の問題、後者は自己の細胞・組織を用いることができない場合には、免疫抑制剤を一生使

うことになり、ガンの発症リスクを抱えることになる。さらに、細胞組織工学を用いた再生医療においては移植した組織へいかに効率よく血管を導入するかが成功のカギになっている。このような背景のもと、我々は印刷技術を応用して、任意にパターンニングされた血管網を *in vitro* で作成する技術を世界

ではじめて考案した (*Biochem Biophys Res Commun* 2007)。さらに、使用すべき血管内皮細胞の培養法の開発を行い、末梢血からの血管内皮細胞前駆細胞の単離・増幅・分化法を確立し (*Exp Cell Res*, 2008) 自己の細胞での血管構築法を開発した。しかし、現在まで血管の三次元構築を体外で成功した例はなく、我々の方法も、羊膜を用いた血管の二次元構築であり、多層の細胞で作成した移植組織への血管の導入が急務となっている。そこで、これまでの方法に改良を加え、細胞の多層化に加え、血管を多層化組織に導入する方法を開発する。

## 2. 研究の目的

再生医療分野において緊急に解決しなければならない問題は、移植した組織への栄養・酸素供給のための血管構築法の確立である。申請者らはこれまで、印刷技術を用いた血管の体外における二次元パターンニング構築に成功し、移植に伴う血流、機能回復を報告するとともに、血管を作成する細胞を自己の末梢血から単離・増幅する方法を確立した。そこで、本研究においては、これまでの技術のさらなる展開を目指して、細胞の多層化を行うとともに、その多層化細胞に血管を三次元的に導入し、より迅速で確実な再生医療を可能とするものである。

## 3. 研究の方法

細胞の多層化を行うため、ベタ基板の作成を行う。ポリエチレングリコール (PEG) を基板すべてに付着させたのち、紫外線を照射することにより疎水性から親水性に変える。この親水性基板に骨芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞などを播種接着させる。この細胞付着基板を羊膜に転写する。この羊膜を体内に移植することにより、細胞の多層化を図る。さらに、血管内皮細胞付き基板をのせ、血管内皮細胞もしくは血管を多層組織に転写する。このような操作により得られた細胞付き羊膜を骨、皮膚欠損部に移植し、その効果を確認する。

さらに、床ずれモデルを作成し、細胞付き羊膜の移植効果を調べる。

## 4. 研究成果

1. 当初の計画通り、ポリエチレングリコールをコートした基板全体を光リソグラフィ法を用いることにより、親水化し、播種した細胞が基板全体に付着できるベタ基板を作成した。この基板上に骨芽細胞を播種したのち、羊膜へ転写すると、図1に示すように転写1時間後には、ほぼすべての細胞が羊膜上に転写された。この羊膜をマウスの骨欠損モデルに装着すると、図2に示すように羊膜上の骨芽細胞は多層化し、良好な骨が再生されること

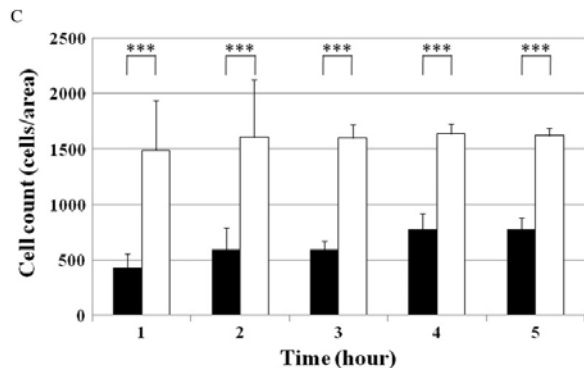
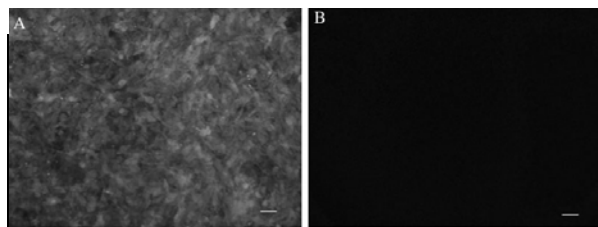


図1. 骨芽細胞の羊膜上への転写。黒棒：羊膜に直接細胞を播種、白棒：基板から羊膜への転写、後の細胞数の経時変化。

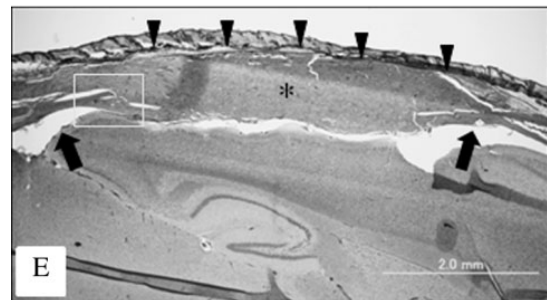


図2. 羊膜移植後の骨細胞の多層化

が明らかとなった。このような効果は、羊膜のみ、細胞のみでは図3のように認められず、本方法の優位性が実証された。

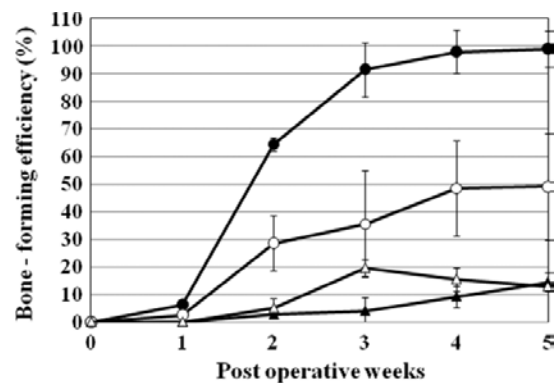


図3. 細胞付き羊膜の骨修復の時間経過上から、骨芽細胞付き羊膜移植、細胞を移植後羊膜を装着、細胞のみ、羊膜のみ

2. 血管を体外で作成するために、臍帯血から血管を構築する能力を持つ血管内皮細胞を確実に採取する方法を確立した、本方法で採取した細胞は、図4、図5に示すように血管内皮細胞のマーカーをすべて発現していた。

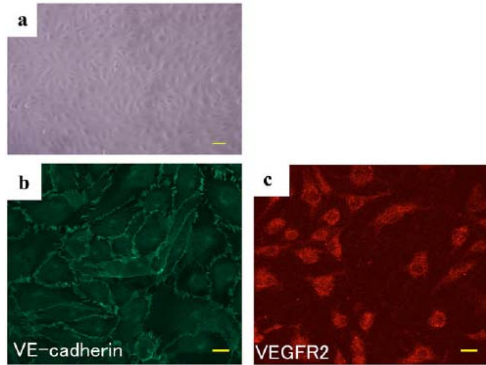


図4. 臍帯血から採取した血管内皮細胞前駆細胞の表面マーカーの発現 (VE-カドヘリン、VEGFR2)

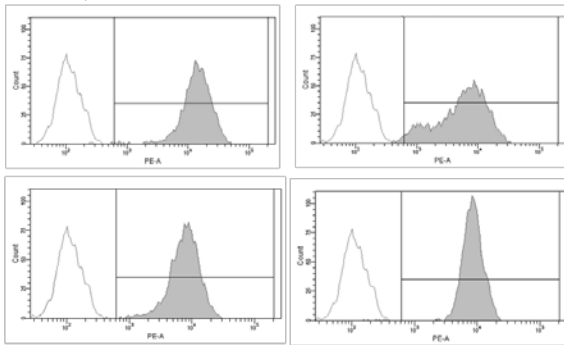


図5. 臍帯血から採取した血管内皮細胞前駆細胞の表面マーカーの発現 (CD31, CD34, CD73, CD146)

さらに、その作成した強固にする目的で、臍帯から間葉系幹細胞を培養、もしくは大網からペリサイトを培養したのち、作製した血管と共培養することでペリサイト付き血管の作製にも成功した (図6)。

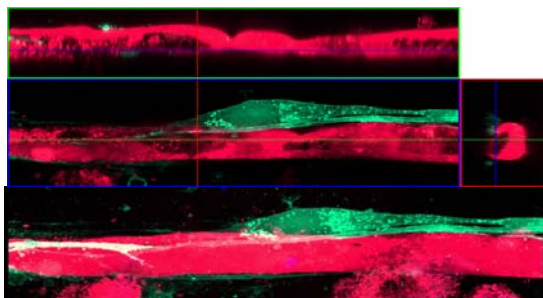


図6. 上段: 血管内皮細胞のみによる血管  
中段、下段: ペリサイトとの混合培養による血管

さらに、新しい試みとしてリンパ管内皮細胞による体外でのリンパ管の作製を試みた。その結果、リンパ管内皮細胞は血管内皮細胞より管腔形成しづらいが、時間をかけることにより管腔構造を取ることが明らかとなるとともに、血管内皮細胞との共培養では、その細胞同士が混在する管腔様構造物は取らず、別々に管腔を作ることも明らかになり、新たな細胞学の構築が可能となった。

3. これらの実験結果のもと、新たな試みとして、床ずれ (褥瘡) モデルを作成することを試みた。特に、問題となる床ずれはIII期、IV期褥瘡であることより、ヌードマウスの臀部に磁石を用いることにより、血行障害によるIII期、IV期褥瘡モデルを作製した。そのモデルを図7に示す。

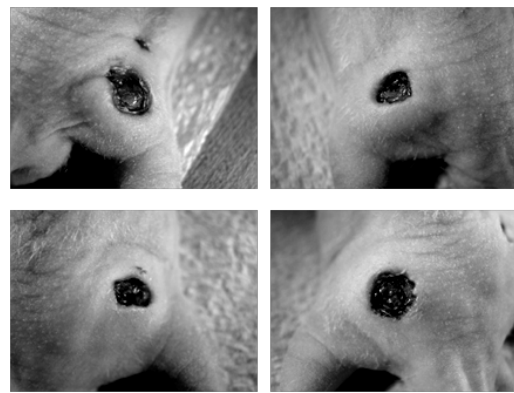


図7. 磁石を7時間装着、1時間除去するサイクルを9回繰り返すことによる、下掘れ式の骨露出型の褥瘡

本モデルに羊膜、血管付き羊膜、成長因子含有ナノゲルを移植したが、残念ながら、細胞付き羊膜の治癒促進効果は認められなかった。しかし、これは、用いたマウスが高い修復能をもつ動物であることに起因すると考えられることより、現在、大型動物で実験を行っているところである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Akahori T, Kobayashi A, Komaki M, Hattori H, Kahahama K, Ichinose S, Abe M, Takeda S, Morita I. Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hindlimb ischemia in mice, **Tissue Engendering, Part A**. 16(3):953-959, 2010
- ② Yoshida T, Komaki M, Hattori H, Negishi J,

Kishida A, Morita I, Abe M., Therapeutic Angiogenesis by Implantation of a Capillary Structure Constituted of Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 30(7):1300-1306, 2010

- ③ 3. Tsugawa J, Komaki M, Yoshida T, Nakahama K, Amagasa T, Morita I, Cell-printing and transfer technology applications for bone defects in mice. **J Tissue Eng Regen Med** 5(9) : 695-703, 2011
- ④ 4. Oshima-Sudo N, Li Q, Hoshino Y, Nakahama K, Kubota K, Morita I, Optimized method for culturing outgrowth endothelial progenitor cells., **Inflammation and Regeneration**, 31(2), 219-227, 2011
- ⑤ 5. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Sampath Narayanan A, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. **J Cell Physiol.** 227(2):649-57, 2012
- ⑥ 6. Nakamura M, Soya T, Hiratai R, Nagai A, Hashimoto K, Morita I, Yamashita K. Endothelial cell migration and morphogenesis on silk fibroin scaffolds containing hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res A.** 100(4):969-77, 2012

[学会発表] (計 6 件)

- ① 須藤乃里子、吉田朋子、星野優子、小牧基浩、中浜健一、久保田俊郎、安部まゆみ、森田育男 生体外で作成した血管網を用いた血管再生療法. 第 31 回日本炎症・再生医学会 2010 年 8 月 5~6 日東京.
- ② 森田育男 印刷技術を用いた組織再生 第 89 回工学フォーラム 2010 年 5 月 14 日 京都
- ③ Ikuo Morita A new technology for tissue regeneration by using cell printing and transfer. The 33rd Annual Scientific Meeting of Association for Dental Sciences of the Republic of China. November 26-28, 2010 Taipei Taiwan
- ④ Ikuo Morita Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hind limb ischemia in mice. Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2010 December 5-7, 2010 Shanghai, China
- ⑤ Oshima-Sudo N, Yoshida T, Akahori T, Komaki M, Nakahama K, Abe M, Morita I. Vascular regeneration using cell-printing system. The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting 2011.12.8-10 Tokyo

- ⑥ 森田育男、須藤乃里子、吉田 朋子、小牧 基浩、中浜 健一、安部まゆみ血管再生法に用いるヒト血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞の単離・培養法及び性質について 第 32 回日本炎症・再生医学会 2011. 6.2-3 京都

[図書] (計 1 件)

森田育男 シーエムシー出版 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み 2012 125 - 134 (209)

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

名称: 細胞含有シート

発明者: 森田育男、小林暁子、服部秀志、黒田正敏

権利者: 東京医科歯科大学、大日本印刷

種類: 特許

番号: 第 4 8 3 6 3 5 5

取得年月日: 平成 2 3 年 1 1 月 1 8 日

国内外の別: 国内

名称: 人工細胞組織の作成方法、及びそのための基材

発明者: 森田育男、中村真人、三宅秀之、服部秀志、小林弘典、栗原正彰

権利者: 大日本印刷

種類: 特許

番号: 特許第 2541513

取得年月日: 2011 年 2 月 1 日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/dent/cell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 育男 (MORITAA IKUO)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 60100129

(2) 研究分担者

仲浜 健一 (NAKAHAMA KENICHI)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 60281515

小牧 基浩 (KOMAKI MOTOHIRO) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号: 30401368