

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300177

研究課題名(和文) 脱細胞化生体組織を基盤とする組織完全復元化技術の開発

研究課題名(英文) Development of the technology for the entire tissue restoration using decellularized tissues

研究代表者

岸田 晶夫 (KISHIDA, AKIO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60224929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：種々の脱細胞化生体組織を用い、これらを組み合わせることによる生体組織の完全復元化技術の開発を試みた。脱細胞化技術および組織複合化技術を開発し、in vitroおよびin vivoでの検討により、足場材料として必要ないくつかの要素を見いだした。大動脈組織と皮膚の薄切化と成形法、パーツ化した骨組織の再構成、および脱細胞化骨髄内への造血組織を再構築など、脱細胞化生体材料の加工法および得られた再構築物の生体活性を確認し、本研究で提唱した基本的なコンセプトの実現可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Here we tried to develop the technology for the restoration of entire tissue by putting small pieces of the decellularized tissue together. The decellularization technique was brushed up sophisticatedly and the restoration and rebuilding techniques of small pieces was newly developed. By in vitro and in vivo study, we found the core factors which was necessary to scaffold materials. Also, we established the methodology for preparing a slice of an aorta tissue and the skin tissue, for rebuilding bone tissue from small pieces, and for reconstitute hematopoietic system in decellularized bone marrow. All of these reconstructed tissues were confirmed to well function in living body. As conclusion, the feasibility of the basic concept that we proposed in this study were proven successfully.

研究分野：生体材料学

キーワード：再生医療 脱細胞化組織 コラーゲン 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

組織工学の提案(Langer R and Vacanti JP, Science, 1993) および iPS 細胞の発見 (Takahasi K and Yamanaka S, Cell, 2006) により、再生医療についての期待は高まっている。すでに皮膚、軟骨などは実用化段階にあるものの、大型臓器や難治疾患治療への応用はいまだ途上である。

生体での組織および器官再生を生体外で再現するためには、再生医療の3要素である細胞、増殖因子、足場材料を個別にとらえるのではなく、細胞の集合状態、増殖因子のタイムリーな供給、機能細胞の集合を制御できる足場材料の構造、およびそれら全体の動態の制御が重要であると考えられる。それらの機序を検討する最も直接的な方法は、生体内での再生および発生を経時的に観察し、各要素の寄与を明らかにすることである。このためには、生体内で再生するモデルが必要である。生体で再生する組織・器官としては、生殖系、造血系および上皮系が知られている。これらの再生過程について、細胞の集合状態、増殖因子の供給および足場(細胞の3次元配置の制御)のそれぞれを人為的に制御することにより、再生の機序についての知見が得られることが期待される。

申請者はこれまでに、超高压処理を用いた脱細胞化組織を調製し、これを新しい再生医療用足場材料として応用する研究を展開し、脱細胞化組織が組織完全復元の基盤材料となる可能性を見いだした。これらの知見から脱細胞化組織を用いた再生が期待される。

2. 研究の目的

組織再生には、細胞、増殖因子および足場が必要であるが、生体内での再生には、血流や物理刺激などの要素も関連する。脱細胞化組織をパーツごとに組み合わせ、細胞の集合状態等、人為的に制御できる要素については、生体内と生体外で、血流や物理刺激など人為的な制御が困難な要素については生体内での過程を観察することで、組織再生に必要な要素が何であるかを明らかにする。本研究では、角膜、骨髄、血管など比較的構造が単純な組織の再生法を確立する。

3. 研究の方法

大型臓器・組織の完全復元化のための基盤技術として、要素材料となる単純組織(皮膚、角膜、骨など)が、それ自身が再生の障害にならないように調製する技術を確立する。細胞の3次元配置や栄養供給、物質交換、機械

的特性など、種々の要因について臓器・組織再生に必要な基礎データを得ることを念頭に置いた検討を行う。

(1) 骨・皮膚・小口径血管などの脱細胞化条件の最適化

まず、基盤材料である上記組織について脱細胞化条件を調製する。それぞれの組織について、高静水圧処理、界面活性剤処理を比較検討し、本研究に適した方法を採用する。

(2) 骨・皮膚・小口径血管の生体外および生体内における再構築

上記の組織に骨髄、筋肉、皮膚および血管組織から採取した細胞を播種し、生体外での接着・増殖を検討する。生体内での再構築については、小動物の皮下に異所性に移植し、組織再構築現象を観察する。

(3) 角膜組織の再構築

脱細胞化角膜の上皮、内皮および実質について、初代培養系を用いて細胞を播種し、生体外再構築を行う。脱細胞化ブタ角膜を用い、ウサギに移植して再生を観察する。

(4) 再生過程の検討について

組織切片観察による細胞浸潤や集合状態の観察に加えて、免疫染色による細胞種の同定、フローサイトメトリーによる細胞画分の変化等について検討する。

(5) 複合組織体の構築

骨・皮膚および小口径血管を組み合わせる組織体を構築するための基礎検討を行う。小パーツ化した脱細胞化組織を再構築し、形状やサイズを自在に構築する技術について検討する。それぞれの組織を生体内で組織構築した後に組み合わせ、生体内および生体外で観察する。

4. 研究成果

(1) 骨・皮膚・小口径血管などの脱細胞化条件の最適化

本研究の中心技術である高静水圧(HHP)法およびSDS, Triton-X100, コール酸ナトリウムなどの界面活性剤を用いて脱細胞化を試み、それぞれの組織とそれぞれの目的に適した脱細胞化法を見いだした。多くの組織について種々の条件を設定したため、すべてを記すことはできないが、特徴的な一例として、歯槽骨の脱細胞を試みた際、歯根膜を損なうことなく脱細胞化する方法を探索した結果、HHP法とSDS法を連続して組み合わせることで目的が達成できることを見いだした。それぞれの脱細胞化法の特性について多くの知見を得た。

(2) 骨・皮膚・小口径血管の生体外および

生体内における再構築

骨・皮膚・血管組織について生体内での組織再生を検討した。適切な脱細胞化を行うことによって、異物反応性が少なく、速やかな再細胞化が可能であることを示した。特に、骨を皮下に移植した際に、骨髓組織内に赤色骨髓が形成され、造血巣として機能している可能性が示されたため、新しい造血組織作製について検討を行った。生体外で間葉系幹細胞の分化促進機能や微細構造の検討を行い、さらに生体内移植の検討により、骨髓内の細胞網組織の存在が造血巣再生に必要な構造であることを見いだした。

(3) 角膜組織の再構築

角膜実質組織を脱細胞すると、一時的に透明性が失われるが、角膜内に移植すると再透明化する。脱細胞技術を改良し、透明性を保ったまま脱細胞化することに成功した。また、角膜上皮細胞、角膜内皮細胞を *in vitro* で播種すると、上皮側と内皮側でそれぞれの細胞の挙動が異なることを見いだした。このことは、細胞の再配置のためには最適な微細構造が存在することを示唆している。この知見により、組織再生のために異所性に組織を応用するには注意が必要であることが示された。

(4) 再生過程の検討について

血管組織への内皮細胞・平滑筋細胞の播種、角膜組織への内皮細胞・上皮細胞の播種および骨髓組織への間葉系幹細胞の播種の結果より、組織再生の過程として、初期の細胞接着は重要であるが、その接着様式がさらに重要であることが示唆された。人為的に3次元空間に細胞を配置しても、細胞の3次元配置にはそれぞれの細胞の周囲環境への対応や他の細胞との連携が必要であり、必ずしも意図したとおりの結果は得られなかった。細胞を大まかに環境に設置し、細胞自体が組織内に浸潤したり細胞外マトリクスを分泌したりして、自らを含む3次元構造を構築する方法論の確立が必要であると考えられた。この知見により、これまでできるだけ組織の微細構造を保持することを念頭に脱細胞化を行ってきたが、部分的に構造を失った組織が細胞播種後の組織再構築に重要であると考えられた。

(5) 複合組織体の構築

複合組織体の構築のために、単純組織を組み合わせる技術の開発を試みた。これは、例えば血管網を内部に有する組織体を構築するために、血管枝を中心に外周を脱細胞化南組織で被覆するなどを想定している。

まず、候補材料の調製と複合化として

大動脈を薄切してシート状として、これを筒状に成形して分枝の有無を制御した小口径血管の作製を検討した。薄切した血管シートの力学強度および物質透過性を測定し、素材としての特性を把握した。筒状に成形した得られた再生血管について、血流による血圧への耐性が不足していたため、外周をポリウレタンナノファイバーで被覆する技術を開発し、生体血管と同等の力学特性が再現できることを確認した。

大腿骨など大型の骨を小パーツに切り分けて再構築する際、パーツ間の間隙に繊維芽細胞が侵入すると骨-骨間の結合形成が阻害される。間隙のサイズの影響を確認するため、*in vivo* 実験を行った。その結果、間隙をなくすとすべての細胞の侵入が阻害されるが、脱細胞化骨を一定の方向で 200 μm 程度の間隙で組み合わせると、間隙内に骨再生像が得られた。骨再生について、適切な空間が必要であることが示された。

軟組織と硬組織の接合を目的として、皮膚と高分子の複合化を試みた。腱の再生を目指したものであるが、形態的には経皮デバイスとしての応用も期待できる。脱細胞化皮膚にモノマーを浸漬させ重合することで複合化が可能であるが、皮膚内へのモノマーの浸潤が不均一となり、制御が困難であった。この経験を基に、軟組織内への各種溶媒およびモノマーの浸潤についての基礎的検討を行い、軟組織内への急速な浸潤は組織を構成するコラーゲンのマクロ構造間 (100-200 μm) への侵入であり、その後、コラーゲン繊維束への拡散が生じることが明らかとなった。

(6) まとめ

脱細胞化組織の複合化による組織の完全復元化のための要素技術の開発を行った。研究の遂行中に新発見が多々有り、必ずしも計画通りの成果は得られていないが、それに勝る多くの知見を得た。特に、細胞の3次元空間への再配置については、足場材料の提供する環境が非常に重要であり、細胞が行う自己環境構築の余地を残し、活動を補助するような材料が必要であることは、今後の再生医療用材料の開発に重要な示唆を与える物と考える。また、要素材料の開発は、小口径血管や骨髓、骨片などについておおむね期待通りの成果が得られ、今後の進展が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

P. Wu, N. Nakamura, T. Kimura, K. Nam, T. Fujisato, S. Funamoto, T. Higami, A. Kishida, Decellularized porcine aortic intima media as a potential cardiovascular biomaterial, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 査読有, DOI:10.1098/icvis/ivv113 (2015).

K. Nam, R. Matsushima, T. Kimura, T. Fujisato, A. Kishida, In vivo characterization of a decellularized dermis-polymer complex for use in percutaneous devices, *Artif. Org.* 査読有, 38, 1060-1065 (2014).

K. Nam, Y. Shimatsu, R. Matsushima, T. Kimura, A. Kishida, In-situ polymerization of PMMA inside decellularized dermis using UV photopolymerization, *Eur. Polym. J.* 査読有, 60, 163-171 (2014).

P. Wu, T. Kimura, H. Tadokoro, K. Nam, T. Fujisato, A. Kishida, Relation between the tissue structure and protein permeability of decellularized porcine orta, *Mater. Sci. Eng. C*, 査読有, 43, 465-471 (2014).

J. Negishi, Y. Hashimoto, K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, Application of a vacuum pressure impregnation technique for rehydrating decellularized tissue, *Tissue Eng. C*, 査読有, 20, 724-730 (2014).

E. G. Santoso, K. Yoshida, Y. Hirota, M. Aizawa, O. Yoshino, A. Kishida, Y. Osuga, S. Saito, Y. Ushida, K. S. Furukawa, Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models, *PLOS One*, 査読有, 9, e108201, 1-13 (2014).

R. Matsushima, K. Nam, Y. Shimatsu, T. Kimura, T. Fujisato, A. Kishida, Decellularized dermis-polymer complex provides a platform for soft-to-hard tissue interfaces, *Mater. Sci. Eng. C*. 査読有, 35, 354-362 (2014).

N. Nakamura, K. Sugano, K. Nam, T. Kimura, T. Fujisato, A. Kishida, A basic study of osteogenesis between decellularized cortical bone pieces for bone graft construction, *Adv. Biomed. Eng.*, 査読有, 2, 95-100 (2013).

K. Nam, K. Yamamoto, K. Kasahara, T. Kimura, S. Funamoto, S. Shimizu, T. Higami, T. Masuzawa, A. Kishida, Fundamental study on the development of a surgical device for polymer-tissue adhesion using vibration damping of polymeric materials, *J. Appl. Polym. Sci.*, 査読有, DOI: 10.1002/app.39464 (2013)

船本誠一、吾郷友亮、橋本良秀、根岸淳、南広祐、木村剛、樋上哲哉、岸田晶夫、酸素供給マトリクスとしての脱細胞化肝臓の応用、ライフサポート、査読有, 25, 76-81 (2013).

J. Negishi, S. Funamoto, T. Kimura, K. Nam, T. Higami, A. Kishida, *J. Tissue Eng. Reg. Med.* 査読有, DOI:10.1002/term.1662 (2012).

K. Nam, Y. Sakai, Y. Hashimoto, T. Kimura, A. Kishida, Fabrication of a heterostructural fibrillated collagen matrix for the regeneration of soft tissue function, *Soft Matter*, 査読有, 8, 472-480 (2012).

J. Negishi, S. Funamoto, T. Kimura, K. Nam, T. Higami, A. Kishida, Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure, *J. Artif. Org.*, 査読有, 14, 223-231 (2011).

Y. Hashimoto, S. Funamoto, T. Kimura, K. Nam, T. Fujisato, A. Kishida, The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell., *Biomaterials*, 査読有, 32, 7060-7067 (2011)

〔学会発表〕(計 105 件)
(国内発表 79 件、海外発表 26 件、下記は代表的なものを 5 件表示)

N. Nakamura, K. Nam, T. Kimura, T. Fujisato, T. Tsuji, H. Iwata, A. Kishida. The Appropriate Microenvironment Prepared by Decellularized Cancellous Bone Induced Ectopic Hematopoiesis, *TERMIS-AM 2014 Annual Conference and Exposition*, 13-16 Dec. 2014, Washington, USA

N. Nakamura, K. Nam, T. Kimura, T. Fujisato, T. Tsuji, H. Iwata, A. Kishida. Decellularized Cancellous Bone Induced HSC Homing and Neovascularization. *TERMIS-EU 2014 Chapter Meeting*, 10-13 June 2014, Genova, Italy

Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki, J. Negishi, T. Honda, S. Hattori, T. Fujisato, T. Kimura, H. Kobayashi, A. Kishida. Feasibility study of corneal regeneration by decellularized corneal transplantation, TERMIS-NA 2011 Annual Conference and Exposition, 11-14 Dec. 2011, Houston, USA.

N. Nakamura, S. Funamoto, Y. Hashimoto, K. Nam, T. Kimura, T. Fujisato, H. Iwata, A. Kishida. Functional Evaluation of Microenvironment in Decellularized Bone Marrow, The 3rd Asian Biomaterials Congress, 15-17 Sep. 2011, Busan, Korea.

A. Kishida, S. Funamoto, Y. Hashimoto, J. Negishi, K. Nam, T. Kimura, T. Higami, H. Kobayashi, T. Fujisato. Tissue Engineering with Decellularized Biological Matrices, The 3rd Asian Biomaterials Congress, 15-17 Sep. 2011, Busan, Korea.

〔図書〕(計1件)

南広祐、岸田晶夫、エヌ・ティー・エス、第2編 第3章 第4節 脱細胞化組織と人工材料との複合化、大政健史、福田淳二監修、三次元ティッシュエンジニアリング、2015, pp.323-330.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：粒子状脱細胞化組織を含むハイブリッドゲル

発明者：岸田晶夫・樋上哲哉・日渡謙一郎・羽室強

権利者：東京医科歯科大学・札幌医科大学・株式会社 ADEKA・一般財団法人化学及血清療法研究所

種類：特許

番号：特願2013-097399

出願年月日：2013年5月7日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸田 晶夫 (KISHIDA, Akio)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60224929

(2)研究分担者

木村 剛 (KIMURA, Tsuyoshi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授