

## 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 1 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23860078

 研究課題名（和文）新しい再生医療の実現に向けた自己組織化誘起型生体内バ  
イオプロセスのシステム化

 研究課題名（英文） Construction of in-body self-organized tissue fabrication bioprocess  
for the realization of novel regenerative medicine

研究代表者

岩井 良輔 (IWAI RYOSUKE)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：60611481

研究成果の概要（和文）：

我々は、生体内組織形成術として無毒で非分解性の材料を鋳型として皮下に埋入することで、生体反応によりその周囲を被包化する結合組織をバイオチューブ人工血管として開発しているが、このバイオチューブには内皮細胞層が存在しないため移植後の血管組織への再構築化までの数ヶ月間は血栓閉塞の恐れがあった。本研究では、内皮や平滑筋の前駆細胞を含む細胞群(ADSC)を充填した多孔性円筒鋳型を皮下埋入することで、移植前にすでに内皮細胞や平滑筋細胞層を有する血管に近似したバイオチューブの作製に成功した。また、細胞の一体凝集化技術を開発し、ADSCの凝集体を移植時のバイオチューブに貼付することで、移植後わずか3週間の早期の血管組織への再構築化を達成した。生体内組織形成術に細胞工学技術を融合した本技術は、バイオチューブの人工血管としての有用性を高めるだけでなく、他組織の作製に対する新たな基盤技術にもなり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

BIOTUBES, prepared by using in-body tissue architecture technology (IBTA), are one of the most promising vascular grafts in regenerative medicine because of their adequate mechanical property and excellent biocompatibility as vascular grafts. However, their walls were very thin and composed of only connective tissues with mainly collagen fiber and fibroblasts and lack of endothelium, which may lead to thrombotic occlusion. In this study, vascular-like tissues with endothelial cells and smooth muscle cells components were successfully prepared by the combination of IBTA and delivery of adipose-derived vascular stromal cells (ADSCs) from the specially designed porous mold. Additionally, rapid maturation with endothelialization of BIOTUBE grafts was also achieved by patching of giant drops of ADSCs spheroids. These technologies are considered to be a promising key-technology for the realization of not only cardiovascular tissues but also other tissues regenerative medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：移植・再生医療、バイオリアクター、生体材料

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループでは、生体内組織形成術としてシリコンやアクリルのような無毒で非分解性の円筒形材料を皮下に埋入することで、生体反応によりそれらを被包化する結合組織から得られる管状組織体をバイオチューブ人工血管として開発している。このバイオチューブはすでに、5年以上の長期の移植試験において高い耐圧性と開存性が示されていることに加え、完全に自己組織からなるため免疫拒絶の問題がなく、成長性も期待できることから、これまでにない極めて有用な小口径人工血管となり得ると考えられた。しかし一方で、バイオチューブの壁厚は0.1 mm程度と非常に薄いため術時の操作性に優れない、また、その組成がほぼコラーゲンと繊維芽細胞のみからなるため、移植後の血管内皮化再生においては数ヶ月の時間を要するなど改良の余地があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の生体内組織形成術の単純な生体内バイオプロセスに、細胞工学的アプローチにより内皮や平滑筋細胞の前駆細胞を含む細胞群（ADSC）を、

- ① バイオチューブの作製段階において導入することで、バイオチューブの移植前にすでに内皮や平滑筋細胞を有するバイオチューブの開発する
- ② バイオチューブの移植時に導入することで、移植バイオチューブの早期の血管組織への再構築化を達成するという2点を目的とした（図1）。

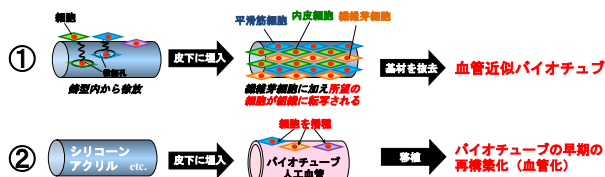


図1 研究戦略

### 3. 研究の方法

#### ① 作製段階におけるADSCの導入

細胞放出性鋳型として直径0.5 mmの微細孔を180個有するアクリル製の円筒形鋳型（外径：5 mm、長さ：24 mm）を、3次元光造形機を用いて作製した。一方、ラット鼠後部から採取した脂肪をコラゲナーゼにより消化処理することによって得られたADSCをマトリゲルに懸濁し円筒鋳型内に（ $0.4 \sim 2.4 \times 10^7$  cells/ml）を流し込み室温下でゲル化させた後、鋳型をラット後背部皮下結合組織内に作製した間隙に自家埋入した。埋入から2週

間後、得られたバイオチューブの力学的特性および、組織学的評価を行った。

#### ② 移植時におけるADSCの導入

バイオチューブの移植時にADSCを懸濁液の状態で播種しても、大半はバイオチューブ以外の周辺組織に流出してしまう。そこで、バイオチューブへの細胞の新たな移植形態として、細胞の凝集体を作製しこれをバイオチューブに貼付する方法を考案した。

#### A：細胞凝集体作製用培養皿の開発

カチオン性高分子としてPoly(dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA)を、アニオン性高分子としてプラスミドDNAを用い、それらの混合比によって電荷比(+/-)を変化させたポリイオン錯体を作製し、その水溶液をポリスチレン製培養皿に添加し、加温(37°C)により吸着させることで表面電荷量の異なるカチオンリッチ（正荷電）な培養表面を作製した。

#### B：移植バイオチューブへの凝集体の貼付

シリコン円柱鋳型をラット背部皮下に4週間埋入することで作製したバイオチューブ（内径：1.5 mm、長さ：15 mm）をメタノール脱水した後、腹部大動脈に自家移植した。血管吻合終了後、本研究において開発した細胞凝集体作製用の培養皿を用いて作製した計3個のGFPでラベルしたADSC凝集体をバイオチューブ外表面に貼付し閉腹した。

### 4. 研究成果

#### ① 作製段階におけるADSCの導入

埋入2週間後に皮下から鋳型を摘出したところ、ADSCを充填した鋳型の周囲にはADSCを充填しなかった従来のアクリル棒の周囲よりも明らかに重厚な組織が形成していた。特に、 $3.0 \times 10^6$  cells以上のADSCを充填した鋳型から得られたバイオチューブは管腔構造を維持できるほどの自立性を有し、それらの壁厚は従来のバイオチューブの約6倍（0.8 mm以上）を示すとともに、弾性率も胸部大動脈と同等の約1.2 MPaに達した。加えて、これらのバイオチューブは生体血管と比較しても十分に満足できる操作性を有していた。

一方、得られたバイオチューブの組織学的分析を行った結果、従来のアクリル棒から得られたバイオチューブには内皮マーカーや平滑筋マーカーの陽性細胞はほとんど認められなかったが、ADSC充填鋳型を用いて得られたバイオチューブは内腔面（鋳型との接

面)に内皮マーカー陽性細胞が層状に集積し、壁内には血管様の円周方向に層状に配向した太いコラーゲン繊維に加えて、平滑筋マーカー陽性細胞の点在を認めるなど、生体血管壁に近似した組織を有していることが分かった(図2)。

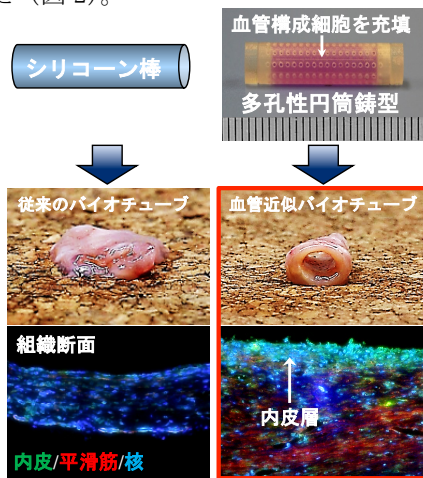


図2 ADSC充填鑄型と得られた血管近似バイオチューブ

以上より、ADSCを多孔性円筒形鑄型と組み合わせることで、鑄型内部から侵出したADSCと鑄型外周をカプセル化する結合組織との融合により、構造的、力学的特性に加え組織学的にも生体血管に極めて近似した管状組織体を自動的に作製することに成功した。本バイオチューブは移植直後から生体血管と同等の機能を発揮することが期待される。また、本研究で開発した体内培養技術を用いれば、所望の細胞種と所望の形状の鑄型を組み合わせることで、血管のみならずこれまでにない複雑な構造と機能を有する生体臓器に近似した移植用組織体の開発が期待できる。

② 移植時におけるADSCの導入

A: 細胞凝集体作製用培養皿の開発

PDMAEMAとプラスミドDNAの混合液の表面吸着により作製した表面電荷量の異なる培養表面でADSCを培養した結果、電荷比(+/-)が低い(2以下)表面では通常の細胞培養と同様に単層で増殖したが、電荷比を高く(4以上)すると、細胞接着が不安定となり、組織体の形状に変化を生じ細胞播種密度が低い( $4.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)と培養5日目には全面に毛細血管様の網目構造体が、高いと一つの巨大な細胞凝集体が得られた(図3)。

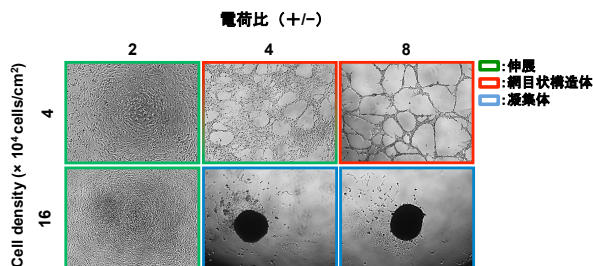


図3 網目状構造体と細胞凝集体の作り分け

また、細胞凝集体は播種密度を  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 以上に保った状態で単に培養面積を増加させるだけで0.1~1 mm以上まで容易にサイズ制御が可能であった(図4)。

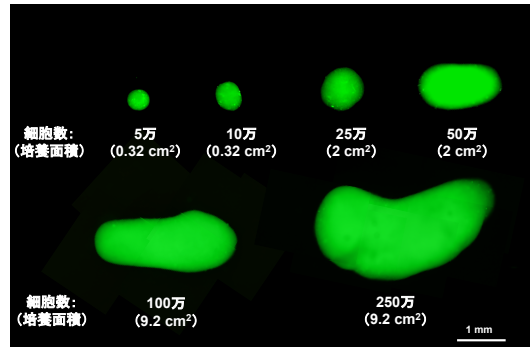


図4 細胞凝集体のサイズ制御

以上より、PDMAEMAとDNAとのポリイオン錯体の混合吸着により作製した荷電培養皿を用いることで、ADSCの網目状構造体や凝集体を単に細胞播種密度をコントロールするだけで形成させることが可能となった。このような細胞構造体はバイオチューブへの貼付による早期血管化に加え、再生医療における3次元組織化や細胞移植にも有用なツールとなり得ると期待される。

B: 移植バイオチューブへの凝集体の貼付

ラット腹部大動脈に移植したバイオチューブにADSC凝集体を貼付した。術後3週間後、バイオチューブは破綻や瘤形成を認めることなく開存性を維持し、壁厚は内径を維持したまま宿主血管と同等にまで増加していた。組織分析により、ADSC凝集体由来のGFP陽性細胞はバイオチューブの全周を被覆するとともに壁内部にも浸潤、内腔面まで到達していることが分かった(図5)。また、バイオチューブの内腔面はほぼ完全に内皮細胞で被覆され、その一部はGFP陽性細胞であったことから、血液や宿主血管からの遊走内皮細胞に加え、ADSC凝集体由来の細胞が直接的にバイオチューブの内皮化に寄与していることが示唆された(図5)。

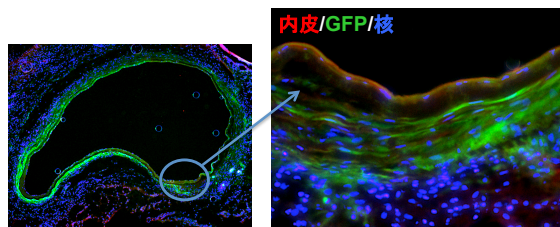


図5

以上より、ADSCs凝集体の貼付によって、これまで数ヶ月を要したバイオチューブの血管組織への再構築化の期間がわずか3週間に短縮された。本技術は特に小口径グラフトへの応用が期待される。

③ 遺伝子工学的取り組み(派生・発展研究)  
生体内組織形成術を用いた移植用組織体開発をさらに発展させるために、派生研究として遺伝子工学的アプローチによる取り組みも行った。例えば、バイオチューブの形成過程において内皮や平滑筋細胞の増殖因子や遊走因子などの遺伝子をアクリル材を被包化する線維芽細胞に導入することができれば、ADSCを用いることなく内皮細胞層や平滑筋細胞層を有するバイオチューブが得られると考えられる。まずは基盤技術の確立を目指し、疎水表面への吸着性と細胞への遺伝子導入能を併せ持つ感温性カチオン性高分子である PDMAEMA を合成した。得られた PDMAEMA はプラスミド DNA との混合によりポリオン錯体粒子を形成し、これらは加温(37℃)によって容易に培養皿表面に吸着でき、その上に細胞を播種すると錯体粒子を吸着した部分に限定的な遺伝子導入が認められた。さらに、動物皮下の動的な環境下では基材に吸着した PDMAEMA が基材表面から脱着・拡散すると想定し、PDMAEMA が基材にさらに堅固に維持される工夫も行った。その結果、pH 緩衝剤として汎用されるトリスの添加による pH 調整により、PDMAEMA の基材表面への吸着安定性が劇的に向上、遺伝子導入効率が数十倍に高まることも見出した。以上より、本研究では材料表面からの遺伝子導入の基盤技術をほぼ確立することができた。本技術と生体内組織形成術を組み合わせることで、細胞培養完全フリーでの生体近似組織体の作製が期待される。

#### 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 2 件)

- ① 岩井良輔、辻中貴大、中山泰秀、細胞放出性鋳型を用いた血管近似組織体の皮下での自動作製、人工臓器学会誌、査読無、印刷中
- ② Iwai R, Haruki R, Nemoto Y, Nakayama Y, Enhanced Transfection Efficiency of Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)-Based Deposition Transfection by Combination with Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Bioconjugate chem., 査読有, vol. 24(2), 2013, pp. 159-166. DOI: 10.1021/bc300317e

[学会発表] (計 9 件)

- ① 岩井良輔、細胞凝集体作製用培養皿を用いて得られた単一凝集体の機能評価、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 2 日、横浜

- ② 岩井良輔、細胞放出性鋳型を用いた血管近似組織体の皮下での自動作製、第 50 回日本人工臓器学会大会、2012 年 11 月 23 日、福岡
- ③ Iwai R, Subcutaneous cell delivery could form Biotube with artery-consisting cells in a short period, 39 th European Society for Artificial Organs, 9. 23.2012, Rostock (Germany)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 移植用人工組織体作製のための鋳型基材

発明者: 中山泰秀、岩井良輔、大家智憲

権利者: 独立行政法人国立循環器病研究センター

種類: 特許

番号: 2012-116780

出願年月日: 平成 24 年 5 月 22 日

国内外の別: 国内

[その他]

日本経済新聞「人工血管体内で作製」、2012 年 11 月 20 日朝刊

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩井 良輔 (IWAI RYOSUKE)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号: 60611481

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし