

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670597

研究課題名(和文) 組織工学による3次元自己細胞由来心血管組織を用いた次世代型心臓手術技術の開発

研究課題名(英文) Development of Scaffold-free Three-Dimensional Cardiovascular Tissue Engineering from Autologous cell for Next Generation of Cardiovascular Surgery

研究代表者

古川 浩二郎 (Furukawa, Kojiro)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90264176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のみで構築する3次元化心臓血管外科組織構築法を開発した。主な血管の構成細胞である、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、繊維芽細胞を用い、各種細胞の懸濁液を混合させ、自己凝集現象である血管組織型スフェロイドを作成した。目的とする3次元形状とするため、組織体形成装置を独自に開発した。本装置を用いることにより細胞だけを3次元化させ比較的強度を持たせた心膜型(弁膜型)組織体、円筒形の血管型組織体を構築することに成功した。本手法は、きわめて簡便に細胞の凝集現象の、時間、空間的凝集能を制御して3次元組織を構築する手法であり次世代の心臓血管外科領域の再生医療研究にきわめて有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our present study is to develop a novel strategy to fabricate scaffold-free vascular tissue utilizing the spheroid formation and self-assembling of spheroid. The commercially available human umbilical vein endothelial cell, human aorta smooth muscle cell, and human normal dermal fibroblasts were purchased. These cells were formed vascular type tissue spheroids. We also develop the simple bio-fabrication system. In this system, vascular type patch were processed to form vascular patch like construct and vascular-shape construct. Our strategy is very simple, but several distinct characteristics compared to reported strategy. Without expensive devices, complicated procedure, we can fabricate scaffold-free three-dimensional vascular structure. Our novel 3-D vascular fabrication system can conveniently generate completely scaffold-free vascular structures. The strategies can support vascular tissue engineering and regenerative therapy.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心臓血管外科 再生医療 組織工学 幹細胞 自己細胞 3次元化組織

1. 研究開始当初の背景

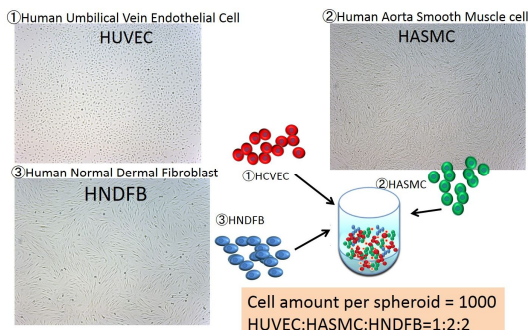
心臓血管外科領域の進歩はめざましく、小児および成人開心術の成績は日々向上をしている。一方、複雑心奇形、心臓弁疾患、大血管疾患などに対してより低侵襲で長期予後が見込めるデバイス、手術手技のさらなる開発も必須であると考えられる。我々は、近年、接着系細胞が元来有する基本的機能である細胞凝集現象を利用した技術を開発した。本技術は細胞のみで構成される細胞凝集塊 = スフェロイド (Spheroid) に形成し、さらにスフェロイドを一つの単位として複雑な形状の組織を任意の3次元化した構造へと構築する技術を開発してきた。本技術は全く外来異物を含まず細胞のみで組織を構築できる点、スフェロイド形成段階で ECM (細胞外マトリックス) が生理的に産生されており生体に近い機能を発現できている点で他の技術と比較し有利であると考えている。本研究ではこの技術を心臓外科領域の治療法に応用しこれまで治療困難な疾患に対する次世代型心臓手術技術として開発を行いたいと考えている。

2. 研究の目的

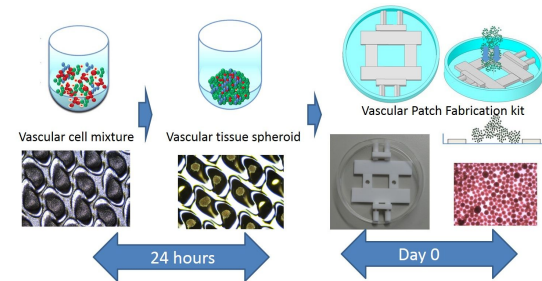
近年の iPS 細胞をはじめとした幹細胞研究や組織工学技術がめざましく発展し臨床応用へむけた研究開発が加速する中で、我々は自己の細胞のみで任意の形状の立体細胞構造体を構築する組織工学の新技术を開発してきた。本研究目的は、新規組織工学技術および幹細胞研究を心臓血管外科領域の手術に応用し、足場 (scaffold) となるコラーゲンや生体溶解性素材すらも、含まない自己細胞のみで構成した組織による次世代型心臓血管外科治療方法の開発を目指す。本研究期間内内では、細胞のみで3次元化した円筒形の構造体 (血管構造体)、平板上の構造体 (弁膜・心膜様構造体) を作成し外科的加療応用への可能性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

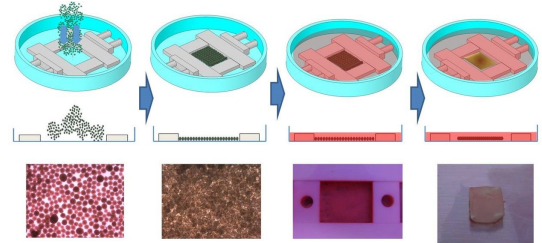
市販のヒト由来、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC)、ヒト繊維芽細胞 (HNDFB) を使用した。以下の図に示すように、血管を構築する主な細胞3種類を混合し、血管組織型スフェロイドを作成後し、独自に開発した組織体形成装置を用いて、スフェロイドを



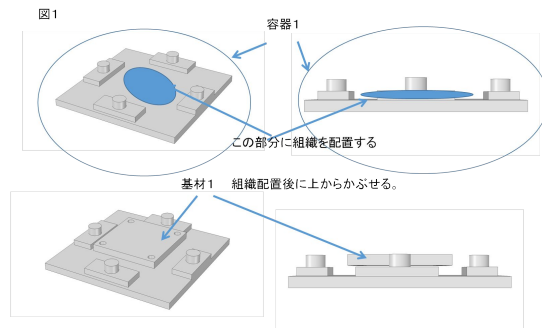
効率的に平板状構造に構築する。さらに平板状構造体を



上図： の工程のシェーマ

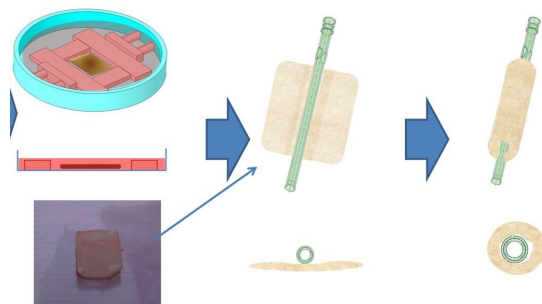


上図： の工程のシェーマ続き



上図； の工程における培養装置

リアクターを用いて構造を維持したまま 4 週間の培養を行う系を開発して組織学的変化を観察する。



上図 平板状構造体を円筒形構造体へ加工する技術開発

平板状構造体を円筒形構造体へと加工する技術系を開発して組織学的な評価をする

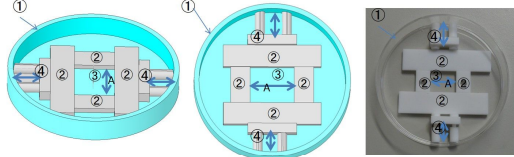
4. 研究成果

結果 1 :

血管組織型平板状構造体をこれまでのロボット制御による構築技術から、簡便に各研究室レベルで短時間で、安価に構築できる装置を開発した。

PTFE 素材によるパーツを、市販の低接着性培養皿内で仮の枠体を構築し、任意の面積の平板状構造体を構築できるキットを開発した。

組織型移植片作成用モールドシステム



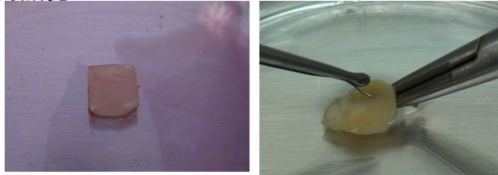
1. 底面が細胞底接着処理を施した容器内(①)にて、厚さ2-5mmの範囲のPTFE等の低接着性、低弾性、低溶解性な素材からなるパーツを組み合わせ、一定の空間(②)を形成する。
この空間(②)は、細胞凝集塊(大きさ50-500µm)は透過できないがメディアムは透過可能な程度に相互にパーツが同じPTFE等の同素材で形成される長さを調節できる部品からなるアジャスターパーツ(③)による適度な圧着により形成される。
これらのパーツによって形成される空間(②)は、圧着され細胞凝集塊が拡散しなければ必ずしも方形でなくてもよく、円形、あるいは三角形であっても構わない。
さらに、この空間を形成するパーツ(②)は培養する容器の中で圧着を解除することによって、圧着前に矢印Aに示す方向にスライドさせることで目的とする任意の底面積を有する空間を作成することができる。
なおこの空間は市販の低接着性培養皿でもよく、形状や円形、方形などであってもよいが、細胞凝集塊を配置する空間で培養する細胞・組織を十分に培養できる余地を留めることができる容器が望ましい。
②の空間の底面積や形状は問わないが、容器底面からの高さは2-5mm程度がよく、それより低い(2mm)と、細胞凝集塊が容器の移動など空間外に飛び出した際に3次元構造体が作成できない。高すぎると(5mm)場合は容器内の底面積が狭くなり細胞の過剰な融合不良を引き起こす。

(上図) 組織体形成モールドシステム (キット)

結果 2 :

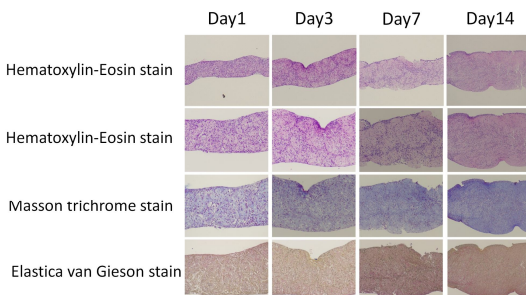
平板状組織を独自に開発したリアクターシステムを用いて平板状組織を作成することに成功した。

肉眼所見



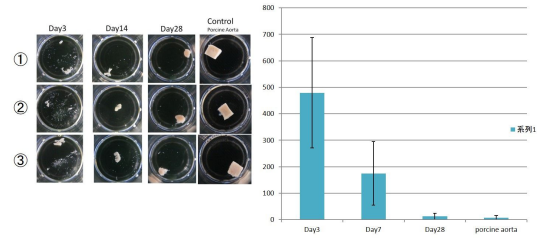
(上図) 本システムで得られた平板状組織

結果 3 : リアクターシステムで平板上組織は強度を増しながら成熟することが確認できた。

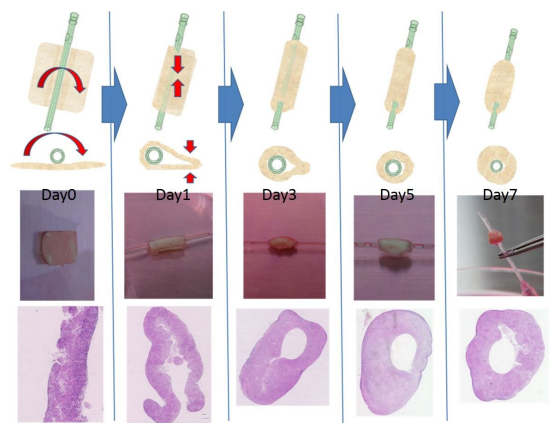


(上図) パッチの組織学的変化を継時的に検討した。組織体は厚みを増すも、内部に壊死などなく成熟することが示唆された。

結果 4 : 組織体は強度を増しながら成熟する。リアクターで培養した構造体を、ボルテックスによる振動で破壊する実験を行った。破壊された、組織体の肉眼的所見と、断片化された組織の破片数を下図に示す。

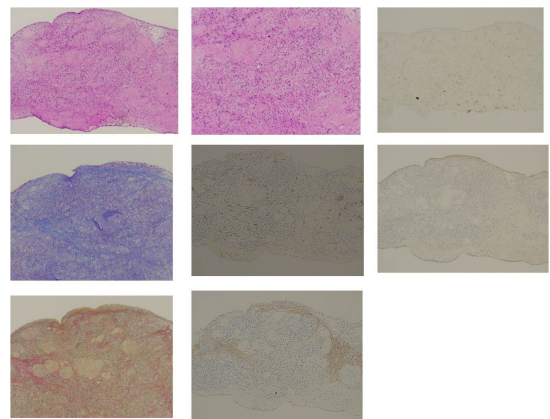


結果 5 : 生成途中の平板状組織は、その両端を接着させる操作を加えるだけで円筒形組織へとつくり替えることができる。



結果 6 :

組織体の組織学的特徴を、免疫組織学的手法で評価した。CD31、VW f、コラーゲン、SMAなどを染色した。



結論 :

血管などを構成する主な細胞である、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、繊維芽細胞を自己凝集現象、自己組織化現象を利用して3次元化し立体的な心血管組織を構築する技術を開発した。

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 1 件)
Ryo Noguchi, Furukawa Kojirou
Development of a Three-Dimensional
Prevascularized Scaffold-Free
Contractile Cardiac Patch for Treating
Heart Disease
Journal of Heart and Lung
Transplantation; (査読有) in press

[学会発表](計 5 件)
1.野口 亮, 古川浩二郎, 野出孝一, 森田茂樹: 細胞のみで立体的心臓血管臓器を構築し移植する技術の開発. 第 44 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2014,2,19. 熊本
2. 野口 亮, 蒲原啓司, 古川浩二郎, 野出孝一, 森田茂樹: 細胞のみで構築する 3 次元血管組織型パッチの開発. 第 42 回日本血管外科学会学術総会. 2014,5,22. 日血外会誌 23(2): 367. 青森
3. 野口 亮, 古川浩二郎: 細胞のみで 3 次元心血管組織を構築する技術による心不全治療法の開発. 第 1 回 iHF フォーラム. 2014,8,9. 東京
4. 野口 亮, 蒲原啓司, 古川浩二郎, 森田茂樹: 細胞のみで 3 次元脈管構造体を簡便に作成する技術開発. 第 14 回日本再生医療学会総会. 2015,3,19. 横浜

5. Noguchi R, Furukawa K:
Development of Simple Strategy to Fabricate Scaffold-free Three-dimensional Vascular Tissue-like Structures. 第 79 回日本循環器学会学術総会. 2015,4,24. 大阪

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 1 件)

名称: 組織体形成装置及び組織体形成キット
発明者: 野口亮
権利者: 佐賀大学
種類: 特許

番号: 特願 2015-55254
出願年月日: 平成 27 年 3 月 18 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
古川浩二郎 (FURUKAWA Kojirou)
佐賀大学医学部、准教授
研究者番号: 90264176

(2)研究分担者
野口亮 (NOGUCHI Ryo)
佐賀大学医学部 助教
研究者番号: 70530187

森田茂樹 (MORITA Shigeki)
佐賀大学医学部 教授
研究者番号: 70243938

伊藤学 (ITOH Manabu)
佐賀大学医学部 助教
研究者番号: 50555084

(3)連携研究者
()

研究者番号: