

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H02674

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンタ、幹細胞技術を用いた心血管組織の開発と、組織内細胞動態の解明

研究課題名(英文) Development of cardiovascular tissue using bio 3D printer, stem cell technology, and elucidation of cellular dynamics in tissue

研究代表者

森田 茂樹 (Morita, Shigeki)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70243938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の自己凝集現象(スフェロイド形成)とスフェロイド同士の融合現象を利用して任意の形状の立体細胞構造体を構築するバイオ3Dプリンタを開発し、心血管組織再生の研究を進めてきた。ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞を使用して外在性のScaffold(足場材料)を含まない、大型化した拍動する3次元(3D)管状心筋構造体の作製に成功した。またバイオ3Dプリンタで構築した構造体をバイオリアクターで成熟させることで、ヒト正常血圧の10～20倍以上の力学的強度を有する血管構造体を作製し、さらに外科的手法を加える免疫不全ミニブタへの長期移植実験に成功し、移植後のリモデリング、細胞遊走を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞を用いて形態学的特徴、力学的作用を有する移植可能な立体的組織を構築するには、一般的には生体融解性ポリマーなどの細胞のscaffold(足場材料)が必要となる。本研究ではscaffoldを使用することなく、大型化した拍動する3次元(3D)管状心筋構造体の作製に成功し、血管構造体においては大動物への長期移植実験に成功した。末期重症心不全や従来のグラフトが移植不能な末期血管不全などに応用でき多くの人類のhealth careに貢献できる可能性が見い出された。機能的な3次元組織構築に成功した技術は新規性も高く、自己細胞由来臓器作成医療ビジネスモデル成功の可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We have developed a bio 3D printer that constructs a three-dimensional cell structure of any shape in a Scaffold free state. We have succeeded in creating a large, beating three-dimensional (3D) tubular cardiomyocyte without extrinsic Scaffold using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CM). By maturing a tubular structure constructed with a bio 3D printer in a bioreactor, we succeeded in producing a small-diameter artificial blood vessel having a mechanical strength (burst pressure test) of 10 to 20 times or more that of human normal blood pressure. Furthermore, we succeeded in a long-term transplantation experiment into immunodeficient mini pigs to using a artificial blood vessel mainly composed of human-derived fibroblasts.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：組織工学 幹細胞技術 細胞内動態 心血管組織 バイオ3Dプリンタ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工心臓や人工血管など循環器領域における人工臓器はめざましい進歩をとげる一方、心不全、動脈硬化性の血管不全は依然として先進諸国における死亡原因の上位を占める疾患であり、問題点を解決する新規臓器再生治療法の開発が待ち望まれている。近年、iPS 細胞をはじめとした幹細胞研究が加速しているが、細胞を用いて機能的な立体組織を構築する技術は発展途上にある。組織は本来、細胞同士が集合体を形成しており、その間隙を埋めるように細胞外マトリックスと呼ばれるタンパクが存在する。このような構造を人工的に作り出すのが組織工学であり、コラーゲンなどの生体由来材料やポリ乳酸など医療用材料として薬事承認されている生分解性高分子を、細胞の足場 (scaffold) として利用するのが一般的であった。しかし、基本的には異物である scaffold は炎症を引き起こし、感染する危険もあるため、scaffold を用いずに細胞組織のみで 3 次元的な組織を構築する試みがなされてきた。近年では細胞をシート状に培養・回収して移植する細胞シート工学が開発され、心筋膜、角膜、食道粘膜など 2 次元培養下での再生臓器は臨床応用されるようになったが、心筋壁、血管や弁など、その他の多くの複雑な形態学的特徴、力学的作用を有する細胞のみでできた 3 次元化組織構造体は発展途上にある。

以上の背景の中、細胞が本来もつ自己凝集能力によって形成される細胞凝集塊 (スフェロイド) を立体的に構築するロボットシステム「バイオ 3D プリンタ」を用いて心血管組織を再生する研究を行ってきた。このシステムは、スフェロイドを 1 つの単位として適切な大きさ、任意の XYZ の位置で 3 次元データを元に配置することで、スフェロイドが融合し任意の形状の構造体を構築する技術であり、本技術によって外在性の scaffold を一切含まない細胞のみによる機能的な立体構造体を作ること可能となった。本研究の基盤となるスフェロイドには、複数種の細胞を混合することが可能で、混合する細胞の種類や比率を変えることで、さまざまな性質を持たせることができる特徴がある。

2. 研究の目的

本研究ではバイオ 3D プリンタ技術にヒト iPS 由来細胞などの幹細胞技術を応用することで移植可能な機能的な心血管組織を開発すると共に、その組織の成熟過程や、生体内移植後における細胞動態を解明する。

3. 研究の方法

ヒト iPS 由来細胞で構成された心筋・血管組織型スフェロイドの最適化：細胞ソース、細胞比率の最適化、培地条件の最適化・細胞接着条件の評価及び最適化。バイオ 3D プリンタを用いて心筋・血管組織を構築するモデルの確立・生体環境に近いバイオリアクター内での組織成熟方法の確立 (構造体の力学的評価、病理組織学的評価) 動物への移植法の確立。移植後構造体のリモデリング効果や組織内細胞動態を評価する。

4. 研究成果

ヒト iPS 由来心筋細胞を用いて大型な組織を作製するために大量の iPS 由来心筋細胞が必要となる。簡便で安価な iPS 由来心筋細胞を入手するため、iPS 細胞 253G1 株で PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit を用いた分化誘導を行った。iPS 由来心筋細胞及び線維芽細胞、iPS 由来血管内皮細胞を混合させたより高機能な心筋組織型スフェロイドの作製を用いて拍動する心筋構造体の作製に成功した。心筋細胞の成熟要素の 1 つとして、電気刺激が言われており、心筋の発生過程において電気刺激は、収縮とは無関係に心筋特異的遺伝子発現や心筋分化に影響を及ぼすことが示唆されている The Gibco® PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit を使用し、iPS 細胞を心筋前駆細胞まで分化させた後、培養筋細胞電気刺激システムを用いて、電気刺激を与えながら培養した群と電気刺激を与えず培養した群で心筋成熟や分化、収縮性に違いがあるか検討を行った。両群ともにトロポニン T、アクチニン、β-レセプター抗体を使用して、免疫染色を行い共焦点顕微鏡で観察を行った。トロポニン T、アクチニン、β-レセプターは電気刺激群で密に観察された。電気刺激群での心筋成熟優位性が示唆されたが、拍動性においては評価困難であった。

また血管新生促進や血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生分泌促進が期待される合成化合物をスフェロイド形成段階の培養添加因子として加えることで、より高機能な iPS 細胞由来心筋スフェロイドの作製に成功し、PDE を介して拍動、収縮が促進されることを確認した。

ヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞 (iPSC-CM) を使用して足場のない大型化した 3 次元 (3D) 管状心臓構造の作製に成功した。イソプロテレノール、プロプラノロール、またはプレビスタチンなどの薬剤の心毒性や心筋の反応を *in vitro* で評価できる可能性が見いだされた。

血管組織型スフェロイドの最適化に向けて、iPS-ECs (ヒト iPS 由来内皮細胞) と HDFB (ヒト皮膚線維芽細胞) の混合型スフェロイドを作成し、共焦点レーザー顕微鏡で内皮細胞の分布を観察した。スフェロイドはあらかじめヒト iPS 由来血管内皮細胞 (HiPS-EC) とヒト皮膚線維芽細胞 (HDFB) を Cell tracker violet で染色し、固定後に組織を透明化することで中心まで共焦点レーザー顕微鏡での観察が可能であった。スフェロイド内で一部中心から

外側へと内皮細胞が遊走する所見を認め、また、内皮細胞を混合させるタイミングや手法により異なった細胞の挙動が観察された。ヒト由来線維芽細胞を主体とする管状構造体をバイオリアクターで成熟させることで、ヒト正常血圧の10~20倍以上の力学的強度（圧力破碎試験）を有する構造体の作製に成功した。さらに外科的手法を加える免疫不全ミニブタへの長期移植実験に成功し、長期間開存後に剖検した構造体において、SMA及びデスミン陽性平滑筋細胞、ERG陽性血管内皮細胞の局在を確認した。

本研究ではscaffoldを使用することなく、大型化した拍動する3次元（3D）管状心筋構造体の作製に成功し、血管構造体においては大動物への長期移植実験に成功し、移植後のリモデリング、細胞遊走を確認した。末期重症心不全や従来グラフトが移植不能な末期血管不全などに応用でき多くの人類のhealth careに貢献できる可能性が見い出された。機能的な3次元組織構築に成功した技術は新規性も高く、自己細胞由来臓器作成医療ビジネスモデル成功の可能性もある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Itoh Manabu, Mukae Yosuke, Kitsuka Takahiro, Arai Kenichi, Nakamura Anna, Uchihashi Kazuyoshi, Toda Shuji, Matsubayashi Kumika, Oyama Jun-ichi, Node Koichi, Kami Daisuke, Gojo Satoshi, Morita Shigeki, Nishida Takahiro, Nakayama Koichi, Kobayashi Eiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an immunodeficient pig model allowing long-term accommodation of artificial human vascular tubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10107-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitsuka Takahiro, Itoh Manabu, Amamoto Sojiro, Arai Ken-ichi, Oyama Junichi, Node Koichi, Toda Shuji, Morita Shigeki, Nishida Takahiro, Nakayama Koichi	4. 巻 14
2. 論文標題 2-C1-C.OXT-A stimulates contraction through the suppression of phosphodiesterase activity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mukae Y, Itoh M, Noguchi R, Furukawa K, Arai K, Oyama J, Toda S, Nakayama K, Node	4. 巻 53
2. 論文標題 The addition of human iPS cell-derived neural progenitors changes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 61-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2018.05.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Arai K, Murata D, Verissimo AR, Mukae Y, Itoh M, Nakamura A, Morita S, Nakayama K.	4. 巻 13(12)
2. 論文標題 Fabrication of scaffold-free tubular cardiac constructs using a Bio-3D printer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0209162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0209162.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 伊藤学、五條理志、野出孝一、小林英司、森田茂樹、中山功一	4. 巻 29(3)
2. 論文標題 スキャフォールドフリーバイオ3Dプリンタを用いた小口径細胞製人工血管の開発	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医工学治療	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤 学, 中山功一, 五條理志, 野出孝一, 森田茂樹	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 バイオ3Dプリンティング技術を利用したscaffold free小口径細胞人工血管の開発	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 血管医学	6. 最初と最後の頁 63-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi R, Nakayama K, Itoh M, Kamohara K, Furukawa K, Oyama J, Node K, Morita S.	4. 巻 35(1)
2. 論文標題 Development of a Three-Dimensional Prevascularized Scaffold-Free Contractile Cardiac Patch for Treating Heart Disease.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Heart Lung Transplant.	6. 最初と最後の頁 137-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Arai Kenichi, Murata Daiki, Takao Shoko, Nakamura Anna, Itoh Manabu, Kitsuka Takahiro, Nakayama Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Drug response analysis for scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65681-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 伊藤 学	4. 巻 36-5
2. 論文標題 人工材料を用いない自家細胞製人工血管の可能性と将来展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床透析	6. 最初と最後の頁 505-506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Kenichi, Murata Daiki, Takao Shoko, Verissiamo Ana Raquel, Nakayama Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Correction: Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0230428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murata Daiki, Arai Kenichi, Nakayama Koichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Scaffold Free Bio 3D Printing Using Spheroids as "Bio Inks" for Tissue (Re)Construction and Drug Response Tests	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 1901831 ~ 1901831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.201901831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 伊藤 学, 松林久美香, 中山功一, 小林英司	4. 巻 27-2
2. 論文標題 新たな免疫不全ブタモデルを用いたヒト細胞製人工血管の安全性・有効性検証	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 141-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤 学, 松林久美香, 中山功一	4. 巻 12-3
2. 論文標題 自己細胞製人工血管の臨床応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 354-361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Itoh Manabu
2. 発表標題 Translational research of Kenzan method Bio-3D Printer for vascular surgery.
3. 学会等名 Thailand-Japan International Symposium for Regenerative Medicine. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 学, 中山功一, 小林英司
2. 発表標題 新たな免疫不全ブタモデルを用いたヒト細胞製人工血管の安全性・有効性検証
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 学
2. 発表標題 心臓血管再生医療研究と臨床応用に向けて
3. 学会等名 第27回佐賀心不全研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 学
2. 発表標題 バイパス治療の役割と人工血管再生医療への取り組み
3. 学会等名 第19回 日本病院総合診療医学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 学
2. 発表標題 組織工学を用いた小口径細胞製人工血管の現状と展望
3. 学会等名 第28回 腎疾患治療連携研究会組織工学を用いた小口径細胞製人工血管の現状と展望
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitsuka T, Itoh M, Amamoto S, Arai K, Oyama J, Node K, Nakayama K, Morita S, Nishida T.
2. 発表標題 2-Cl-C.OXT-A Stimulates Contraction through Suppression of PDE Activity in hiPSC-Derived Cardiac Organoids
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabu Itoh
2. 発表標題 Translational research of scaffold free tubular tissue modeled with Kenzan method Bio-3D Printer for cardiovascular surgery.
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤学
2. 発表標題 バイオ3Dプリンティング技術を用いた小口径細胞製人工血管の臨床開発
3. 学会等名 第5回先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤学
2. 発表標題 心臓血管外科領域における臓器再生への試み
3. 学会等名 第11回九州医療センター地域医療研修会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mukae Y, Itoh M, Furukawa K, Kitsuka T, Arai K, Oyama J, Nakayama K, Node K, Morita S.
2. 発表標題 Addition of human iPS-derived neural progenitors influences the contractile function of cardiac spheroids.
3. 学会等名 Biofabrication(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 荒井健一、小島敦子、迎 洋輔、伊藤学、森田茂樹、中山功一
2. 発表標題 バイオ3Dプリンタを用いたチューブ型心筋構造体の作製
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 伊藤 学, 中山功一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 腎と透析	5. 総ページ数 5
3. 書名 【再生医療up to date】【多次元構造臓器の再生】スキャフォールドフリー小口径細胞製人工血管 臨床 応用に向けて	

1. 著者名 伊藤 学, 野出孝一, 松林久美香, 中山功一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本アフェレシス学会雑誌	5. 総ページ数 5
3. 書名 バイオ3Dプリンティング技術の人工血管分野への医療応用	

1. 著者名 伊藤 学, 中山功一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 腎と透析	5. 総ページ数 86(3):291-295
3. 書名 スキャフォールドフリー小口径細胞製人工血管 臨床	

1. 著者名 伊藤 学	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本透析医会雑誌	5. 総ページ数 33:328-331
3. 書名 バイオ3Dプリンタを用いた次世代型透析用人工血管の開発	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血管拡張器具	発明者 伊藤 学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/004459	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中山 功一 (Nakayama Koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	伊藤 学 (Itoh Manabu) (50555084)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究分担者	野出 孝一 (Node Koichi) (80359950)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	古川 浩二郎 (Furukawa Kojiro) (90264176)	佐賀大学・医学部・客員研究員 (17201)	
研究分担者	五條 理志 (Gojo Satoshi) (90316745)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	荒井 健一 (Arai Kenichi) (40752960)	佐賀大学・医学部・特任助教 (17201)	
研究分担者	戸田 修二 (Toda Shuji) (80188755)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西田 誉浩 (Nishida Takahiro) (50284500)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	削除：2019年3月28日
研究分担者	迎 洋輔 (Mukae Yosuke) (90746570)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関