

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04292

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンティング技術、幹細胞技術を用いた冠動脈バイパス用人工血管の開発

研究課題名(英文) Development of artificial blood vessel for coronary artery bypass using bio-3D printing technology and stem cell technology

研究代表者

伊藤 学 (Itoh, Manabu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50555084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：接着系細胞が元来有する細胞凝集現象により細胞のみで構成される細胞凝集塊＝スフェロイドに着目し、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構築するバイオ3Dプリンタ技術を開発し、血管再生の研究を進めてきた。バイオ3Dプリンタで構築した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10～20倍以上の力学的強度(圧力破碎試験)を有する小口径人工血管の作製に成功した。さらにヒト由来線維芽細胞を主体とする小口径人工血管を用いて、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た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来異物を全く含まず細胞のみで3次元的な組織を造る技術を利用し、大動物への長期移植に成功した報告は極めて少ない。虚血性心疾患のみならず従来の人工血管では移植不能な様々な血管不全症例に応用され、多くの人類のhealth careに貢献できる可能性が見いだされた。また本研究のさらなる発展により自己組織での臓器再生・移植モデルが確立されれば、免疫応答、感染の危険性を回避できる次世代の再生治療モデルの確立につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have developed a bio 3D printer technology that creates tissues with complex shapes using spheroids as one unit. 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 which a surgical technique is applied using a small-diameter 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 血管再生 冠動脈バイパス バイオ3Dプリンタ 人工血管

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は先進諸国における死亡原因の上位を占める疾患であり、我が国においても生活様式の変化や高齢化に伴って、糖尿病や末期腎不全を合併した動脈硬化性の虚血性心疾患が増加している。虚血性心疾患に対する冠動脈バイパス術は、1962年に Sabiston が大伏在静脈グラフトを用いて初めて臨床応用し、すでに 55 年余の歴史を持つ外科治療である。その劇的な治療効果から、動脈グラフトを用いた血行再建、心拍動下冠動脈バイパス術による低侵襲化へと進化を遂げてきた。カテーテルやステントを用いた血管内治療による新しい医療が広がっている昨今でも、狭窄や閉塞のある病変部分を迂回して安定した血流を確保できる冠動脈バイパス術は未だニーズの高いものである。冠動脈バイパス術においては小口径人工血管の開発が発展途上にあるため、すべて患者自身の内胸動脈や橈骨動脈、胃大網動脈、大伏在静脈など限られた部位の自己血管を取り出して、使用しなくてはならない。再手術ですでに自己血管が採取されている場合、あるいは鎖骨下動脈起始部の高度狭窄や、動脈グラフト自体の動脈硬化、下肢静脈瘤などの影響で、適正な自己血管を使わずに冠動脈バイパス術を断念しなければならない症例も経験する。故に冠動脈バイパス術に応用できる生体適合性、抗血栓性に優れた新たな小口径人工血管が待ち望まれている。2012 年のノーベル医学・生理学賞を受賞した京都大学山中教授の iPS 細胞をはじめとする幹細胞研究が発展し、臨床応用に向けた研究開発が加速している。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やコラーゲンなどの細胞の scaffold(足場材料)が必要となる。一方、scaffold を用いないアプローチとして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、食道粘膜などは再生医療として臨床応用されるようになった。しかしながら血管や弁などの複雑な形態学的特徴、力学的作用を有する臓器を 3 次元的に構築し移植する技術は発展途上であるため、新たなブレイクスルーが求められてきた。

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を用いた血管再生の研究を進めてきた。スフェロイドを 1 つの単位として、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バイオ 3D プリンティング技術であり、本技術によって外在性の scaffold (足場材料)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が可能となった。

2. 研究の目的

上記バイオ 3D プリンティング技術を用いて細胞のみで構築された小口径人工血管を作製し、移植後の開存性や血管壁のリモデリング効果を解析することで、冠動脈バイパスに应用可能な小口径人工血管を開発する。

3. 研究の方法

血管組織型スフェロイドの作製：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 プリンティング技術を用いた人工血管の構築法及び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・病理組織学的評価。大動物への移植法の確立。移植後の開存性、血管壁のリモデリング効果の解析。移植後の生存率、開存性、免疫応答、及び血管壁の内皮化やリモデリング効果を検討する。

4 . 研究成果

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。HDFB のみのスフェロイドと比較するとHiPS-EC を混合したスフェロイドではVEGF1 の発現は減少していた。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。これらの所見は組織の大型化の際の中心部への血流維持や壊死の予防のみならず、ヒト iPS 由来内皮細胞の特性、挙動を把握する上で重要な結果と考えられた。バイオ3Dプリンタで構築した管状構造体をバイオリクターで成熟させることで、ヒト正常血圧10~20倍以上の力学的強度(圧力破碎試験)を有する小口径人工血管の作製に成功した。さらにヒト由来線維芽細胞を主体とする小口径人工血管を用いて、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た。長期間開存後に剖検した人工血管において、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がみられた。また、移植期間が長くなるにつれ、これらの生体血管由来の細胞種の局在範囲が広がっている所見が得られ、細胞の遊走が経時的に進むことが確認された。

外来異物を全く含まず、細胞のみで3次元的な組織を造る技術を利用し、長期移植に成功した報告は極めて少ない。虚血性心疾患のみならず従来の人工血管では移植不能な様々な血管不全症例に応用され、多くの人類のhealth careに貢献できる可能性が見いだされた。また本研究のさらなる発展により自己組織での臓器再生・移植モデルが確立されれば、免疫応答、感染の危険性を回避できる次世代の再生治療モデルの確立につながると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 7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, et al.	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 13(12): e0209162	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 松林久美香、伊藤学、小林英司、中山功一	4. 巻 72
2. 論文標題 バイオ3Dプリンタを用いた人工血管再生	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 最新醫學	6. 最初と最後の頁 58-64
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	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 臨牀透析	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 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 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 e1901831
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 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 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 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9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Itoh M
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 (招待講演)
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会 (招待講演)
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 (招待講演)
4. 発表年 2019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 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 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

〔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	天本 宗次郎 (Amamoto Sojiro) (10842908)	佐賀大学・医学部・医員 (17201)	
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	蒲原 啓司 (Kamohara Keiji) (70555086)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	
研究分担者	野出 孝一 (Node Koichi) (80359950)	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	古川 浩二郎 (Furukawa Koujiro) (90264176)	佐賀大学・医学部・客員研究員 (17201)	
研究分担者	木塚 貴浩 (Kitsuka Takahiro) (20796487)	佐賀大学・医学部・医員 (17201)	削除：2020年1月7日
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	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 Yousuke) (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