

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02895

研究課題名(和文)自己細胞を用いた人工気管による再生医療と難治性気道疾患への応用

研究課題名(英文) Scaffold-free artificial trachea for tracheal diseases

研究代表者

松本 桂太郎 (Matsumoto, Keitaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：80404268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ3Dプリンターを用いて、再生医療に用いる自己細胞および幹細胞のみからなる、人工気管の作製と移植を行った。ヒト細胞による馬蹄形軟骨輪と膜様部に平滑筋細胞構造体を用いた人工気管支の作製とヌードラットへの移植による機能解析と自家移植を目指したラット自己細胞を用いた人工気管の構築と自家移植を行った。ヒト骨髄幹細胞を軟骨への分化させる条件を決定し、蹄形の軟骨輪の作製、欠損した部位に平滑筋構造体を補填し、実際の気管と同様の形態をした人工気管を作成した。ヌードラットへの移植で数ヶ月の生存を得た。Fischer344ラットの骨髄細胞から人工気管を作成し、自家移植にて1年以上の長期の生着に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気道の再建、再生医療は、実臨床では非常に難しく普及していない。人工物を用いた代替気管では感染、劣化などの問題が生じるため、細胞のみから作成した人工気管が必要となる。当研究では、この問題を解決する可能性がある軟骨を主体とし、膜様部を平滑筋構造体で作成した人工気管を作成し、ラットへの移植による長期生存を得た。これにより、将来的に気道悪性腫瘍、外傷、気管軟化症、熱傷などの疾患において、外科治療の適応範囲の拡大、患者のQOLに寄与できる可能性があることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Fabrication and transplantation of an artificial trachea composed of autologous cells and stem cells for regenerative medicine using a bio 3D printer. We constructed artificial trachea using horseshoe-shaped cartilage rings and smooth muscle cell structures in the membranous part using human cells and transplanted into nude rats for functional analysis and autologous transplantation of the artificial trachea using rat autologous cells. (1) Conditions for differentiation of human bone marrow stem cells into cartilage were determined, hoof-shaped cartilage rings were created, smooth muscle structures were supplemented at the defective site, and an artificial trachea with a morphology similar to an actual trachea was created. Survival of several months was obtained by transplantation into nude rats. (2) An artificial trachea was created from bone marrow cells of Fischer 344 rats, and long-term survival of more than one year was successfully achieved by autotransplantation.

研究分野：再生医療

キーワード：気道再生 バイオ3Dプリンター 臓器再生

## 1. 研究開始当初の背景

気管再生においては、未だ臨床応用の域まで達していない。そのために、治療に制限があり、医療及び医療工学が発達した現在でも、解決できない気道疾患は多数存在する。小児では、小児気管気管支軟化症(3万人に1人)、気管・気管支狭窄など、成人では、進行肺癌に対する気管支形成をともなう手術における気管・気管支合併症(10-20%)、肺移植後(世界で年間4000例)に頻発する気管支軟化症(5-10%)などがあり、致命的、代替治療が存在しないという点において深刻である。

自己細胞のみからなる人工臓器による再生医療は、感染、拒絶、炎症などがなく、免疫抑制剤が不要であるという点から理想的であり、様々な研究が行われている。近年では、複雑な形状、様々な種類の細胞を組み合わせることができるバイオ3Dプリンターが登場した。とくに、我々のRegenova™は、細胞凝集による500µmほどのスフェロイドを組み上げて、構造体を立体化することにより、足場(スキャフォールド)を使用しない理想的な臓器の作製を可能とした(図1)。

人工気管の研究は、Vacantiらが1994年に気管軟骨の報告を行って以降、脱細胞化スキャフォールドも含め、多くの研究がなされてきた。多くが人工物を用いるが、感染、生体への刺激、それ自体が成長できないこと、弾性力、自己収縮力、神経支配欠損が問題点として挙げられる。

図1. バイオ3Dプリンターと人工臓器作製テクノロジー



自己細胞のみからなる人工臓器による再生医療は、感染、拒絶、炎症などがなく、免疫抑制剤が不要であるという点から理想的であり、様々な研究が行われている。近年では、複雑な形状、様々な種類の細胞を組み合わせることができるバイオ3Dプリンターが登場した。とくに、我々のRegenova™は、細胞凝集による500µmほどのスフェロイドを組み上げて、構造体を立体化することにより、足場(スキャフォールド)を使用しない理想的な臓器の作製を可能とした(図1)。

## 2. 研究の目的

バイオ3Dプリンターを用いて、再生医療に用いる自己細胞のみからなる生体に近い構造の人工気管の作製および大動物への移植手術方法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 軟骨輪を持つ気管構造体の作製

実際の気管に近い構造体の作製を目指し、ヒト細胞を用いた軟骨細胞主体の輪状構造体と基本構造である線維芽細胞主体の構造体を交互積層さらには馬蹄形の軟骨輪を積層し、気管を模した構造体を作製した。これを、ヌードラットへ移植し、評価を行った(図2)。

### (2) 自家細胞による人工気管作製と移植

F344ラットの骨髄幹細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞にて作製した人工気管を、F344ラットへ自家移植後、評価を行った。

### (3) 血管内皮細胞の評価

人工気管の移植では、人工気管内の血管形成が重要である。自家血管細胞とiPS細胞由来血管内皮細胞の比較検討を行った。

F344ラットの骨髄幹細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞にて作製した人工気管を、F344ラットへ自家移植後、評価を行った。

### (4) 軟骨細胞シートで包んだ構造体のラット皮下移植による軟骨組織の熟成

強度に重要な軟骨の熟成のために、生体内での軟骨組織環境を作製することで、より質の高い軟骨組織の作製方法の検討を行った。

### (5) ヒト骨髄幹細胞から軟骨細胞への分化と馬蹄形軟骨輪の作製

馬蹄形軟骨輪作製には多くの細胞を必要とするため、分化プロトコルの再検討を行った。また、このプロトコルを用いて馬蹄形軟骨輪を作製した。

### (6) ヒト骨髄幹細胞から平滑筋細胞への分化と膜様部の作製

骨髄幹細胞から分化型平滑筋細胞作製のプロトコル作製を行った。このプロトコルを使用した平滑筋細胞の作製および平滑筋構造体の作製を行った。

### (7) 大動物移植のための大サイズ人工気管の作製

## 4. 研究成果

### (1) 軟骨輪を持つ気管構造体の作製

ヌードラットへ移植し、1ヶ月の生存を得た。人工気管はラット気管へ生着し、上皮の進展も見られた。ただ、気管軟骨は部位により存在した箇所としない箇所がみられ、人工気管は作製した個体による差が見られた(図2、3)。

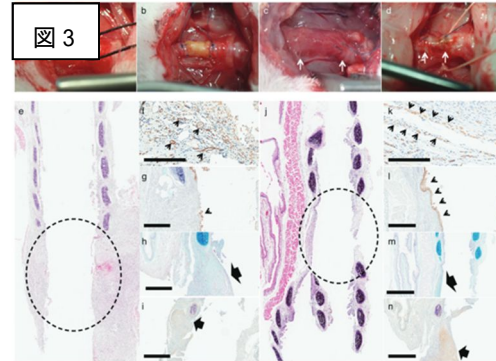
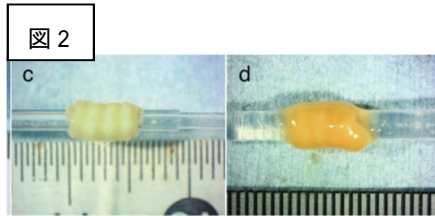


Figure 3. a) Macroscopic and microscopic findings after tracheal transplantation. Defects after trachea resection during the operation. Photograph of the surgical field b) after graft transplantation, c) day 7, and d) day 35 after transplantation (arrows: junction between the graft and the trachea). The trachea-like tube is within the dotted line. Histological and immunohistochemical staining with anti-CD31 antibodies showing capillary-like tube formation in the graft (f). Immunohistochemical staining with anti-pan-cytokeratin antibodies showing that the epithelialization started on day 7 and extended to day 35 (g). Immunohistochemical staining with Alcian blue (h) and collagen II (i) (arrowheads) became clearer in the trachea-like tubes over time. Scale bars = 200  $\mu$ m (f), 400  $\mu$ m (g), and 700  $\mu$ m (h,i).

(2) 自家細胞による人工気管作製と移植による長期生存

F344 ラットへの自家細胞による人工気管では、1年の長期生存が得られ、人工気管の生着が確認できた(図4)。

(3) 血管内皮細胞の評価

iPS 細胞由来の血管内皮細胞は、ラット血管内皮細胞と比較して、構造体内での小血管形成において、劣っていた(図5)。

(4) 軟骨細胞シートで包んだ構造体のラット皮下移植による軟骨組織の熟成

強度に重要な軟骨の熟成のために、軟骨シートの効果を検討したが、軟骨組織の成熟に寄与しなかった。

(5) ヒト骨髄幹細胞から軟骨細胞への分化と馬蹄形軟骨輪の作製

ヒト骨髄幹細胞から軟骨細胞への分化プロトコルを作製した。分化効率とコストバランスを考慮したプロトコルとした。これを用いて分化させた軟骨細胞を用いて馬蹄形軟骨輪作製し、ラットへ移植、生着に成功した(未発表データ)。

(6) ヒト骨髄幹細胞から平滑筋細胞への分化と膜様部の作製

骨髄幹細胞から分化型平滑筋細胞作製のプロトコル作製を行った(特願 2022-000769)。このプロトコルを使用した平滑筋細胞の作製および平滑筋構造体の作製を行った(未発表データ)。

(7) 大動物移植のための大サイズ人工気管の作製

いまだ十分な強度の人工気管作製が困難であり、実験を継続中である。

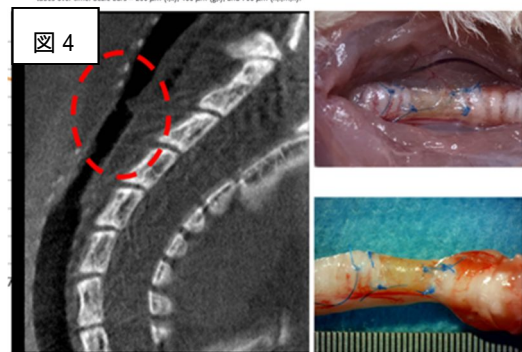


図 5

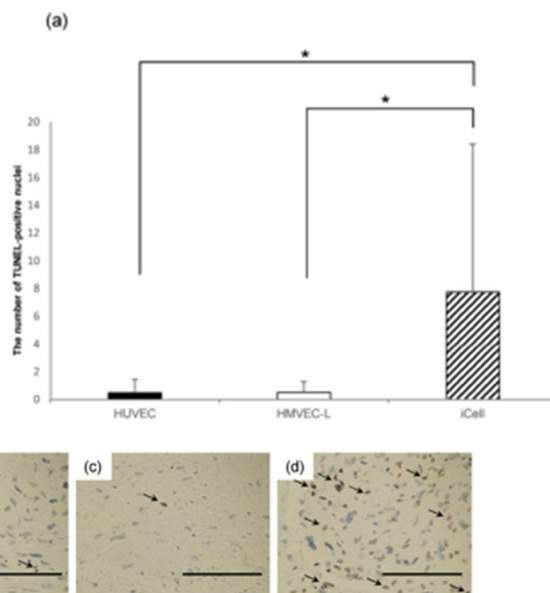


Fig. 4. TUNEL staining. a) Total number of TUNEL-positive cells (arrows) is significantly greater in the iCell group than in the HUVEC and HMVEC-L groups. b) HUVEC group, c) HMVEC-L group, d) iCell group. Scale bars = 100  $\mu$ m. \*P < 0.05. TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick-end labeling; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; HMVEC-Ls, human microvessel endothelial cells from the lung; iCells, induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taniguchi D., Matsumoto K., Machino R., Takeoka Y., Elgalad A., Taura Y., Oyama S., Tetsuo T., Moriyama M., Takagi K., Kunizaki M., Tsuchiya T., Miyazaki T., Hatachi G., Matsuo N., Nakayama K., Nagayasu T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Human lung microvascular endothelial cells as potential alternatives to human umbilical vein endothelial cells in bio-3D-printed trachea-like structures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101321 ~ 101321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2019.101321	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 Machino Ryusuke, Matsumoto Keitaro, Taniguchi Daisuke, Tsuchiya Tomoshi, Takeoka Yosuke, Taura Yasuaki, Moriyama Masaaki, Tetsuo Tomoyuki, Oyama Shosaburo, Takagi Katsunori, Miyazaki Takuro, Hatachi Go, Doi Ryoichiro, Shimoyama Koichiro, Matsuo Naoto, Yamasaki Naoya, Nakayama Koichi, Nagayasu Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Replacement of Rat Tracheas by Layered, Trachea Like, Scaffold Free Structures of Human Cells Using a Bio 3D Printing System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 1800983 ~ 1800983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.201800983	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松本桂太郎
2. 発表標題 体性幹細胞スフェロイドを用いたScaffold-freeの人工食道・人工気管による再生医療
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本桂太郎
2. 発表標題 外科治療に必要なバイオ3Dプリンターによる管腔臓器の現在地
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口大輔、松本桂太郎、町野隆介、永安武
2. 発表標題 バイオ3Dプリンターを用いた気道再生
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口大輔、松本桂太郎、町野隆介、永安武
2. 発表標題 気道再生医療のためのバイオ3Dプリンター技術の活用
3. 学会等名 第18回再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本桂太郎、谷口大輔、町野隆介、永安武
2. 発表標題 Artificial proximal airway construction using Bio-3D printer
3. 学会等名 2018 TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本桂太郎、谷口大輔、町野隆介、永安武
2. 発表標題 Artificial trachea and esophagus using bio-3D printer "Regenova"
3. 学会等名 CuSTOM 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本桂太郎、谷口大輔、町野隆介、永安武
2. 発表標題 Tracheal replacement by scaffold-free tissue engineered trachea made by bio-3D printer
3. 学会等名 2019 American Thoracic Society (ATS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Keitaro Matsumoto, Takeshi Nagayasu	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 179
3. 書名 Kenzan Method for Scaffold-Free Biofabrication	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 分化型平滑筋細胞の製造方法	発明者 松本桂太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-000769	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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	永安 武 (Nagayasu Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	中山 功一 (Nakayama Koichi) (50420609)	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	李 桃生  (Li Tao-Sheng)  (50379997)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授    (17301)	
研究分担者	土谷 智史  (Tsuchiya Tomoshi)  (30437884)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員教授    (17301)	
研究分担者	町野 隆介  (Machino Ryusuke)  (90728081)	長崎大学・病院（医学系）・助教    (17301)	
研究分担者	朝重 耕一  (Tomoshige Koichi)  (70457547)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教    (17301)	
研究分担者	田浦 康明  (Taura Yasuaki)  (60437887)	長崎大学・病院（医学系）・助教    (17301)	

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		
米国	Eben Alsberg	Department of Bioengineering	University of Illinois at Chicago