

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03814

研究課題名（和文）次世代再生医療のための血管連結オルガノイド移植技術の開発

研究課題名（英文）Development of a vascularized organoids transplantation technology for next-generation regenerative medicine

研究代表者

山本 雅哉（Yamamoto, Masaya）

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：10332735

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究を通じて、オルガノイドなどの細胞凝集体内へ微小な管腔構造を導入する技術確立した。また、血管内皮細胞を接着させて導入することも示した。さらに、体内埋入後もオルガノイドの機能を維持させるため、細胞凝集体内部での拡散を更新させる中空チタンマイクロチューブを導入する技術を開発した。オルガノイド単独でも物質の拡散が改善され、生存率の向上が期待できる。オルガノイドを誘導する技術としてサンドイッチ培養法を開発し、iPS細胞から心筋細胞への分化が促進できることを示した。また、その分化効率、ハイドロゲルの特性に影響されることも明らかにした。さらに、分子を細胞凝集体内部へ導入する技術も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた研究成果は、材料科学・循環生理学・再生医療の融合という、既存の学術分野に対して新しい学理を開拓することに結びつき、学術の深化が期待される。さらに、本研究成果を他の臓器のオルガノイドへの展開も可能である。その結果、次世代再生医療や創薬など、オルガノイドを利用した医療分野に対する波及効果を介した研究成果の社会還元が見込まれる。本研究は、オルガノイド移植を実現するために必要となる学術基盤に加えて、医療の高度化により社会還元の可能性が期待され、学術的・社会的創造性が高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, a technique for introducing microtubule structures into cell aggregates such as organoids was investigated. It was shown that vascular endothelial cells can be introduced by utilizing microtubule structures. Furthermore, in order to maintain the function of organoids after implantation in the body, a material was developed to introduce hollow titanium microtubes that renew diffusion within the cell aggregates. The organoids alone are expected to improve the diffusion of the material and increase survival rates. A sandwich culture method was developed as a technique for inducing organoids, and it was shown that differentiation from iPS cells to cardiomyocytes can be promoted. It was also shown that the differentiation efficiency is influenced by the properties of the hydrogel. Furthermore, a technique for introducing molecules into the inside of cell aggregates was also developed.

研究分野：生体材料学

キーワード：オルガノイド 微小血管 血管連結 移植 再生医療 中空チタンマイクロチューブ

1. 研究開始当初の背景

血液が届かなければ生体組織は生存できない。しかし、直径数 mm の血管を縫合する外科手術を直径 5~130 μm の微小血管に対して行うこともできない。このため、研究代表者らの血管新生を利用した細胞移植技術 (*J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2002) あるいは Okano らのよりサイズの大きい細胞シートや立体造形組織に対するマイクロ流体技術を用いた血管連結移植技術 (T. Okano et al., *Nat. Commun.*, 2013) などが研究されてきた。さらに、近年、より高機能な細胞構築物として、臓器機能の一部をもつオルガノイドが、国内外で急速に研究開発されている (F. Schutgens et al., *Annu. Rev. Pathol.*, 2020)。オルガノイドは、細胞よりも大きいサブミリサイズの細胞凝集体であり、血管の豊富な部位での単純拡散による栄養・酸素の供給では維持できない。一方、オルガノイドは立体造形組織よりも小さく、マイクロ流体技術を用いた移植技術にも適さない。このように、難治疾患に対する治療戦略として、高機能のオルガノイドを移植する次世代再生医療が期待される中、従来法とは異なる方法論により、体内の血管と連結する必要があるという、移植技術に対する未解決な学術的課題を見いだすに至った。

本研究課題の核心をなす学術的「問い」

	細胞	オルガノイド (細胞凝集体)	立体造形組織 (細胞シート など)	生体組織・臓器
サイズ	数 μm	数mm以下	数cm	数cm以上
血管連結	血管豊富な部位 からの拡散	?	マイクロ流体 技術の利用	血管新生誘導

図1 本研究課題の核心をなす学術的「問い」

2. 研究の目的

本研究目的は、材料科学・循環生理学・分子再生医療の観点から、血管連結オルガノイド移植技術に対する学術的「問い」を明らかにすることによって、次世代再生医療を加速する新たな学術的基盤を構築することである。本研究では、オルガノイドに対する微小血管導入技術、およびこの微小血管に対する体内微小血管連結技術を開発し、オルガノイド内の微小血管循環と機能維持とを評価する。この目的を達成するため、本研究では、図に示す研究課題を設定した。

研究課題①オルガノイドに対する微小血管導入 研究課題②オルガノイドに対する体内微小血管連結 研究課題③血管連結オルガノイドの機能維持

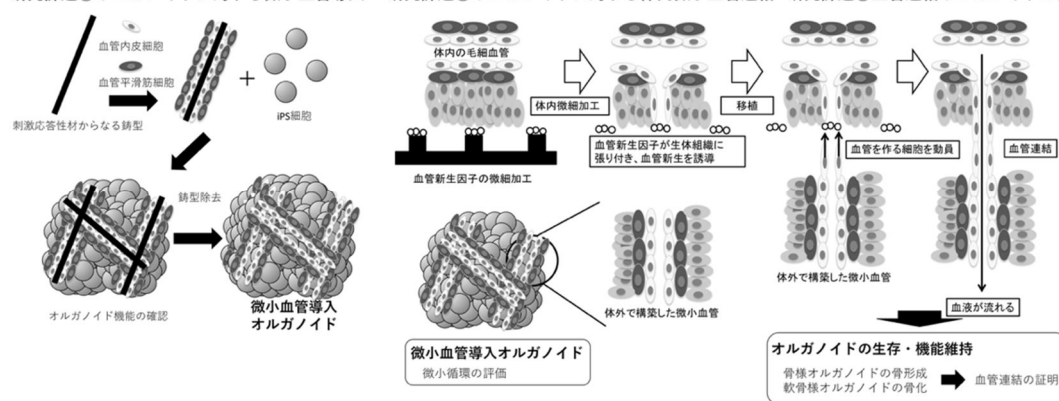


図2 本研究課題

3. 研究の方法

(1) オルガノイドに対する微小血管導入

刺激応答性ハイドロゲルとして、細胞傷害性の低い糖が結合することによって水可溶性される糖刺激応答性ハイドロゲルを調製し、それから分岐構造をもつ鋳型を作製した。また、鋳型に対して血管内皮細胞を播種し、コラーゲンゲル内に包埋後、刺激応答性に鋳型を除去することにより微小血管を導入した。

オルガノイドの前段階として、細胞凝集体を利用して、その内部に低分子化合物をデリバリーするための分子デリバリーシステムについても検討を行った。

オルガノイドの分化誘導技術として、サンドイッチ培養について検討し、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の心筋分化誘導、ならびにサンドイッチ培養に用いるための自己修復型新規ハイドロゲルについて検討した。

(2) オルガノイドに対する体内微小血管連結

刺激応答性ハイドロゲル鋳型を用いて細胞凝集体内への微小血管導入について検討した。

(3) 血管連結オルガノイドの機能維持

オルガノイドの機能維持のために、オルガノイド内への拡散を促進する中空チタンマイクロチューブを導入について検討した。具体的には、電界紡糸法により有機チタンを含むナノファイバーを作製後、熱処理することにより中空チタンマイクロチューブを作製した。さらに、得られた中空チタンマイクロチューブを間葉系幹細胞からなる細胞凝集体内部に組み込み、微小循環をもつ細胞凝集体を作製した。また、イオンビームを使ったエッチングにより、細胞凝集体内部で中空構造を保っていることを確認した。

4. 研究成果

(1) オルガノイドに対する微小血管導入

刺激応答性ハイドロゲルとして、細胞傷害性の低い糖が結合することによって水可溶化される糖刺激応答性ハイドロゲルを調製し、それから分岐構造をもつ鋳型を作製した。すなわち、ゼラチンに対して m-アミノフェニルポロン酸 (APBA) を導入することによってシスジオール構造をもつ糖と結合することにより溶解性が変化するハイドロゲルを作製することができた。図 3 は、糖としてソルビトールを用いて APBA ゼラチンハイドロゲルを除去した例である。

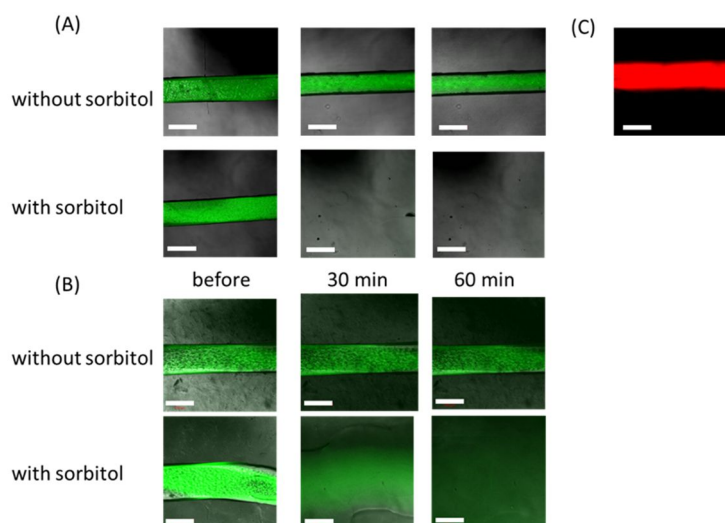


図 3 ソルビトール添加前後の鋳型
(A) 培養液中、(B) コラーゲンゲル内、
(C) コラーゲンゲル内の管腔構造に蛍光標識デキストランを注入

図 4 は、血管内皮細胞 (HUVEC) をコラーゲンゲル内の管腔内壁へ転写後、培養 3 日目の共焦点レーザー顕微鏡画像を示す。細胞膜を pHK26 により蛍光標識した HUVEC が直線状および Y 字状の管腔構造を形成している様子が観察された。

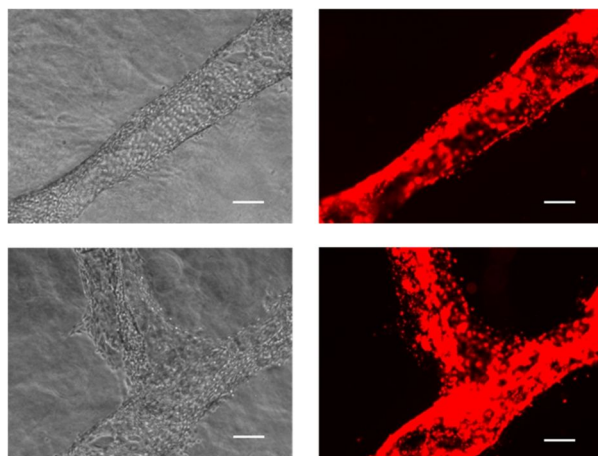


図 4 HUVEC をコラーゲンゲル内の管腔内壁へ転写 3 日後の共焦点レーザー顕微鏡画像

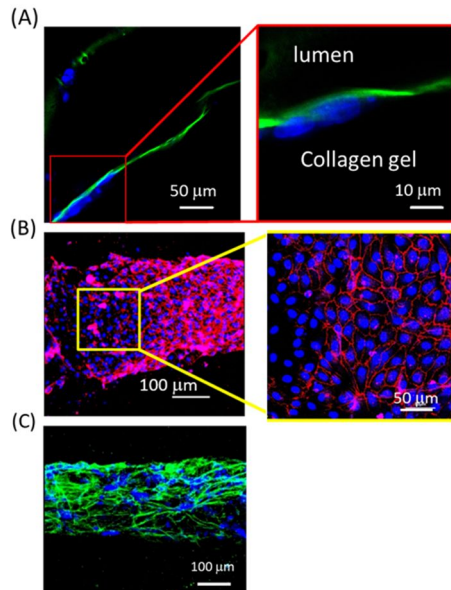


図 5 に培養 3 日後のコラーゲンゲル内の管腔内壁に接着した HUVEC に対する蛍光免疫染色画像を示す。血管内皮細胞の内腔面に発現している ICAM-I に対する免疫染色を行ったところ、コラーゲンゲル内の管腔構造の内側に ICAM-I が局在していた(図 5A)。次に、隣り合う血管内皮細胞間に見られるアドヘレンスジャンクション (VE-Cadherin、図 5B) ならびにタイトジャンクション (ZO-1、図 5C) が隣り合う血管内皮細胞間に局在していた。

図 5 培養 3 日後のコラーゲンゲル内の管腔内壁に接着した HUVEC に対する蛍光免疫染色画像

(2) オルガノイドに対する体内微小血管連結

APBA ゼラチンハイドロゲルからなる鋳型が内包されたヒト間葉系幹細胞 (hMSC) からなる細胞凝集体断面の蛍光顕微鏡像 (図 6) を示す。画像より、鋳型の周囲への細胞接着が確認された。この結果は、鋳型の導入により細胞凝集体が影響を受けないことを示唆している。

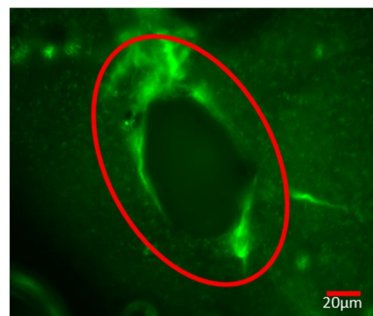
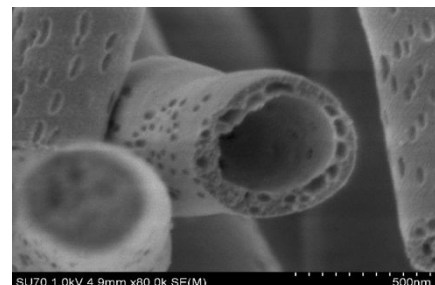


図 6 APBA ゼラチンハイドロゲルロッドが内包された細胞凝集体断面像

(3) 血管連結オルガノイドの機能維持

SEM 観察から、得られた試料は中空かつ多孔質のマイクロチューブであることがわかった (図 7)。一方、水に対する接触角測定から、得られたマイクロチューブの表面は親水性であることがわかった。また、マイクロチューブをメチレンブルー水溶液に浸漬し、紫外光を照射したところ、メチレンブルーが脱色された (データ省略)。これらの結果は、作製したマイクロチューブが、酸化チタンが示す光触媒活性を有することが示唆された。さらに、低タンパク質吸着性 U 底 96well plate に、作製したマイクロチューブとともに hMSC を播種したところ、酸化チタンマイクロチューブを内部に含む三次元細胞凝集体が確認された。

図 7 中空酸化チタンマイクロチューブの走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察



さらに、中空酸化チタンマイクロチューブを含む hMSC 細胞凝集体内に対してイオンビームを用いたエッチングにより細胞凝集体内部における形状について検討した。その結果、細胞凝集

体内部で中空構造を維持できていることが確認できた。

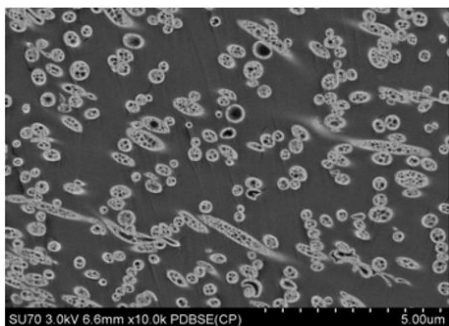


図8 細胞凝集体内部の中空チタンマイクロチューブ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Nobuyuki, Murata Atsuki, Yamamoto Yuta, Narita Fumio, Yamamoto Masaya	4. 巻 9
2. 論文標題 Adhesive Sulfobetaine Polymer Hydrogels for the Sandwich Cell Culture	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 11942 ~ 11949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.3c09708	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 Nattasit Praphawi, Niibe Kunimichi, Yamada Masahiro, Ohori Morita Yumi, Limraksasin Phoosuk, Tiskratok Watcharaphol, Yamamoto Masaya, Egusa Hiroshi	4. 巻 e2300021
2. 論文標題 Stiffness Tunable Hydrogel Sandwich Culture Modulates the YAP Mediated Mechanoreponse in Induced Pluripotent Stem Cell Embryoid Bodies and Augments Cardiomyocyte Differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202300021	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 Morimoto Nobuyuki, Ota Keisuke, Miura Yuki, Shin Heungsoo, Yamamoto Masaya	4. 巻 10
2. 論文標題 Sulfobetaine polymers for effective permeability into multicellular tumor spheroids (MCTSs)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2649 ~ 2660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1tb02337c	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 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小林 真子、Lucas Collet、蔦原 敬登、木村 剛、岸田 晶夫、山本 雅哉
2. 発表標題 3D細胞外マトリクス中のがんスフェロイド挙動評価
3. 学会等名 第173回日本金属学会秋期講演大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣江 王貴、ユン ハンヨン、上田 恭介、成島 尚之、森本 展行、小林 真子、山本 雅哉
2. 発表標題 三次元細胞培養のための酸化チタンマイクロチューブの作製
3. 学会等名 第173回日本金属学会秋期講演大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 真子、村田 梢、升本 英利、安西 眸、王 子、太田 信、橋本 良秀、木村 剛、岸田 晶夫、山本 雅哉
2. 発表標題 異なる内腔表面形状での血管内皮細胞挙動・血流動態評価
3. 学会等名 第174回日本金属学会春期講演大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山本雅哉
2. 発表標題 再生医療や環境研究を目指した医用高分子・再生医工学技術
3. 学会等名 第72回高分子年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 真子、山本 雅哉、橋本 良秀、木村 剛、村田 梢、湊谷 謙司、升本 英利、岸田 晶夫
2. 発表標題 種々の脱細胞化血管上でのヒトiPS細胞由来血管内皮細胞の挙動
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣江 王貴、ユン ハンヨン、上田 恭介、成島 尚之、森本 展行、小林 真子、山本 雅哉
2. 発表標題 三次元細胞培養のための酸化チタンマイクロチューブの作製
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本展行、村田温基、山本悠太、山本雅哉
2. 発表標題 伸縮性・自己接着性を示すスルファベタインポリマーゲル
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣江 王貴、ユン ハンヨン、森本 展行、小林 真子、上田 恭介、成島 尚之、山本 雅哉
2. 発表標題 三次元細胞培養のための酸化チタンマイクロチューブの作製
3. 学会等名 第6回日本金属学会第7分野講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 真子、Lucas Collet、蔦原 敬登、木村 剛、岸田 晶夫、山本 雅哉
2. 発表標題 細胞外マトリクス環境に着目したがん微小環境構築の検討
3. 学会等名 2023年度東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ/日本バイオマテリアル学会東北ブロック交流会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣江 王貴、ユン ハンヨン、森本 展行、小林 真子、上田 恭介、成島 尚之、山本 雅哉
2. 発表標題 三次元細胞培養のための酸化チタンマイクロチューブの作製
3. 学会等名 2023年度東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ/日本バイオマテリアル学会東北ブロック交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本展行、三浦祐樹、山本雅哉
2. 発表標題 三次元細胞凝集塊に高浸透するスルホベタインポリマーの設計
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本展行、太田桂介、三浦祐樹、山本雅哉
2. 発表標題 スルホベタインポリマー構造が及ぼす三次元細胞凝集塊への浸透効果
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本展行、太田桂介、三浦祐樹、山本雅哉
2. 発表標題 細胞凝集体浸透性に対するスルホベタインポリマー化学構造の影響
3. 学会等名 第11回DDS再生医療研究会/ 第13回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuyuki Morimoto, Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Development of sulfobetaine polymer conjugates as a drug delivery system to cancer cells aggregates
3. 学会等名 TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Stimuli-Responsive Biomaterials for engineering spheroids
3. 学会等名 The Formosa Association Regenerative Medicine (FARM) annual meeting 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaya Yamamoto
2. 発表標題 Development of biomaterials to engineer spheroids
3. 学会等名 MALAYSIAN TISSUE ENGINEERING & REGENERATIVE MEDICINE SCIENTIFIC MEETING (MTERMS) 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	江草 宏 (Egusa Hiroshi) (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

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	狩野 光伸 (Kano Mitsunobu) (80447383)	岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授 (15301)	

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			
韓国	Hanyang University			