

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293273

研究課題名(和文) 構造体内灌流システムによる栄養血管網付き三次元再生組織の大型化

研究課題名(英文) Increasing in size of 3-dimensional regenerative tissue by intra-structural perfusion system.

研究代表者

小山 博之 (KOYAMA, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10241994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究担当者らは、血管新生を誘導するマトリックス材料とともに多数のスフェロイド(直径数百 μm の細胞集塊)を移植して移植母床から各スフェロイド間に血管網を発達させることにより、トータルとして栄養血管網付き三次元再生組織を構築する方法を提唱してきた。本研究では、この三次元再生組織の大型化を達成するための技術として、マトリックス材料に内包されたスフェロイドのviabilityを保つための培養液灌流システムの基盤を確立した。また、血管内皮細胞をマトリックス材料内で培養して三次元の血管網様構造の構築し、これを移植して宿主の血管系と連結させることにより、迅速に栄養血管網を構築する技術も開発した。

研究成果の概要(英文)：To construct a 3-dimensional regenerative tissue with vascular system, we selected an approach to accumulate cell-spheroids as building blocks and simultaneously infill angiogenesis-inducible matrix material among the spheroids for induction of neovascular in-growth. The angiogenesis-inducible matrix material has a function to rapidly induce neovascular growth from recipient bed into the inside of the material. The aim of the present study is to establish novel techniques which enable to increase in size of the regenerative tissue. For this purpose, we developed an intra-structural perfusion system of culture medium to preserve viability of cell-spheroids embedded in the material. Further, we also developed method for preparing vasculature-like structure in the material. The vasculature-like structure was constructed by culturing endothelial cells, and could rapidly become true vascular network after transplantation.

研究分野：再生医学、組織工学、血管生物学

キーワード：血管新生 足場材料 三次元再生組織 大型化 生体材料 ハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

(1) 大型で高機能な三次元再生組織を構築し生体内で機能させるためには、ライフラインとしての栄養血管網を付与することが必須であるが、これを実現する有効な方法は確立されていない。再生組織に対する栄養血管付与技術の研究は、国内外ともにけして多いとはいえないものの、研究動向としては大きく二つのアプローチが存在している。その一つはマイクロ流路などを用いて組織工学的に血管網を構築するアプローチであり、Vacanti JP らによるマイクロファブリケーション技術を用いた血管内皮細胞のパターン培養が有名であるが、機能する血管網の構築には未だ課題は多い。もう一つは、血管新生を利用したアプローチで、再生組織の中に予め血管構成細胞や各種幹細胞等を組み込むことにより、移植母床から再生組織内へと発達する血管網構築を促進・加速するというコンセプトである。このアプローチでは、すでに人工の構造体内において血管網の作成に成功したという報告もあり、将来性により期待がもてると考えられている。

(2) 研究代表者らも、かねてより再生組織への栄養血管網付与技術開発に取り組んできた。開発方針としては血管新生のメカニズムを活用することとし、微小再生組織ユニットであるスフェロイドを複合化する独自のストラテジーを採用した。スフェロイドは、培養が可能な直径数百ミクロン程度の細胞集塊であり、微小ではあるが機能性に優れた再生組織として注目されている。また微小であることから in vivo において組織液の受動拡散のみで暫くは viability を保つことができるため、移植母床からの新生血管をスフェロイド周囲に誘導することができれば、微小ではあるが栄養血管を伴った再生組織を作成することが可能である。そしてこれを多数のスフェロイドで同時に実施すれば、トータルとして相当程度のサイズを持った血管網付き再生組織を作ることができる考えたのである。また、これを実現するためには、移植されたスフェロイドの周囲に移植母床から迅速かつ強力に新生血管を誘導する事が必要であり、その目的で研究代表者らは「血管新生制御マトリックス」(特願2012-118380)の基盤技術を開発済みであった。これは、in vivo において移植母床から材料自身の内部に向かって迅速・強力に血管新生を誘導する作用を有するとともに再生組織の三次元足場としての機能も有する新規の生体材料である。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、前記のスフェロイドを用いたストラテジーを発展させ、ある程度のバルクを持った血管網付き三次元再生組織を構築する技術を開発することにある。しかし、再生組織のバルクが大きくなるほど、栄養血管網が再生組織内へ十分に誘導されるまでの

間にスフェロイドの機能が低下する可能性が増大するため、移植後の再生組織内においてスフェロイドを良好なコンディションに保つための技法を確立することが必要と考えた。その技法として、血管新生制御マトリックスの優れた浸透性を活用した「構造体内灌流システム」を着想した。構造体内灌流システムとは、多数のスフェロイドを包埋した血管新生制御マトリックス(以下、S/M 構造体)内に灌流用チューブを留置し、そこから培養液を持続供給するシステムである。移植後に、このチューブを通じて体外からS/M 構造体内に培養液を供給すれば、栄養血管網が完成するまでの間、in vivo において in vitro に準じた環境をスフェロイドに提供できる。さらに、S/M 構造体内に速やか栄養血管網を構築する技法の開発も必須と考えた。これを実現する一つの方法として、血管新生制御マトリックス内に予め血管構成細胞や幹細胞を組み込んで培養してS/M 構造体内に予め血管網様構造を構築しておくというアプローチを着想した。S/M 構造体内に予め構築した血管網様構造に、宿主の血管網を連結できるのなら、結果として迅速な栄養血管網の構築が可能となると考えたのである。

(2) 以上の着想に基づき、本研究においては次にあげる4項目について検討した。

In vitro における構造体内灌流システムの確立

多数のスフェロイドまたは細胞を包埋した血管新生制御マトリックス内に灌流用チューブを留置し、そのチューブから培養液を灌流することによる構造体内三次元培養法を確立する。

構造体内における血管様構造の構築

栄養血管付与の迅速化を目的に、構造体内に in vitro で予め血管網様構造を構築しておく技術を開発する。血管新生制御マトリックス内に血管内皮細胞や間葉系幹細胞を包埋し培養することにより、三次元の血管網様構造の構築し、これを移植して宿主の血管系と連結した構造体内血管網の構築が可能か否かを検証する。

構造体内灌流システムを用いた血管網付き再生組織の生体内構築

上記で開発した構造体内灌流システムを付加したS/M 構造体をラットモデルに移植し、体外から培養液を灌流することにより、構造体内部での培養環境を維持しながら血管網付き再生組織を生体内で構築する技術の確立を目指す。

血管網付き三次元再生組織の大型化技術の開発

上記又はの技術を開発することができたら、それらより得られた知見に基づいて血管網付き三次元再生組織の大型化を目的とした構造改変を行い、ラットモデルでの検証を通じてその最適化を行う。

3. 研究の方法

(1) In vitroにおける構造体内灌流システムの確立

研究代表者らが開発した「血管新生制御マトリックス」は、オリゴ糖酸化物である架橋剤によってアテロコラーゲンを化学架橋（共有結合）したハイドロゲルであり、強力な血管新生誘導能に加えて、*in vivo*においても極めて安定な構造と高い浸透性を具備している。そのため、包埋した多数のスフェロイドと灌流用チューブをそれらの位置関係を保ちながら安定して支える足場となる上、培養液を浸透させつつ灌流するための基質としても機能することが期待できると考えた。

まず、最も基本的な仕様の構造体内灌流システムとして次のような装置の作成を試みた。本体は、輪切りにしたePTFE人工血管（内径6mm 高さ4mm）で、その側壁を串刺しにするように径0.97mm ポリエチレンチューブ（PE-50tube）を貫通させ貫通部を接着した。チューブの片端は切り詰めて盲端とし、人工血管の中央付近においてチューブの両サイドに小孔を設けた。盲端でないチューブ端より、チューブ内に灌流液を充填した後、人工血管内にS/M構造体を入れてゲル化させた。この状態で人工血管内に収納されたS/M構造体の中心にポリエチレンチューブの小孔が位置しているため、チューブから培養液を持続注入すると、S/M構造体の中心から辺縁部に向かって培養液が浸透し、周囲にオーバーフローするという仕組みだ。

このシステムに心筋細胞スフェロイドや肝細胞スフェロイドを組み込み、培養液を灌流させて経時的に観察することにより、このシステムの検証を行った。

(2) 構造体内における血管様構造の構築

再生組織の中に予め血管構成細胞や幹細胞を組み込み、これを培養して血管様構造を作成しておくことにより、再生組織に対する栄養血管付与を迅速化することが可能か否かを検証した。まずはヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）や間葉系幹細胞を様々な条件で血管新生制御マトリックス内に混和して構造体を作成し培養した。そして経時的に形態を観察することにより、構造体内に効率的に血管様構造を作成するための条件を検討した。また、構造体内に予めHUVECにより血管様構造を作成した後にヌードラットモデルに移植し、移植後5日目に標本を回収して組織学的に解析した。ヒトの血管内皮細胞に特異的な抗体等を用いて免疫染色を実施することにより、ラットの血管系が構造体内の血管様構造と連結し、血管網の構築に寄与するか否かを検証した。

(3) 構造体内灌流システムを用いた血管網付き再生組織の生体内構築

In vitro 評価により最適化された条件で、心筋細胞スフェロイドによるS/M構造体と肝

細胞スフェロイドによるS/M構造体を作成し、それぞれに構造体内灌流システムを付加した後にヌードラットに移植した。具体的には、S/M構造体を収納した灌流システム本体をラットの腹直筋筋膜下に埋植する一方で、灌流用チューブは皮下を這わせて背部から体外へ誘導した。そして、このチューブをラット背部にルアーハーネスを用いて固定したスプリングテータ付き持続注射用ルートと接続したが、この持続注射用ルートはケージ外のシリジポンプに連結されており、そこから培養液が送液されるという仕組みである。培養液に含まれる血清は基本的にはラット血清を用いるように調製した。移植手術後5日目に解剖して移植部の状態を評価するとともに、移植物を回収して組織学的に検討した。このデータに基づき、培養液の注入スピードや期間を調節し、適切な注入条件を検討した。

(4) 血管網付き三次元再生組織の大型化技術の開発

詳しくは「研究成果」の項で述べるが、構造体内灌流システムを適応したS/M構造体を、心筋細胞スフェロイドと肝細胞スフェロイドを用いて作成して検証したところ、心筋細胞スフェロイドにおいてより明確な三次元再生組織構築を認めた。そのため大型化技術の開発は心筋細胞を用いて実施することとした。

大型化へのアプローチとしては、ジャングルジム様の足場状に組み込まれた灌流路の中にS/M構造体を組み込むことを当初は想定していた。しかし心筋細胞スフェロイドで作成した三次元再生心筋は、拍動に伴いジャングルジム様足場の間をすり抜けるように収縮していくことが明らかになった。そのため、当初予定していた初めから大型の構造体を作成するというアプローチは放棄し、収縮に応じてS/M構造体を順次追加していくアプローチに変更して大型化をめざした。

4. 研究成果

(1) In vitroにおける構造体内灌流システムの確立

「研究の方法」の項で、基本的な仕様の構造体内灌流システムとして述べた装置を試作した。ePTFE人工血管で作成したシステム内にまずは血管新生制御マトリックスのみを充填してポリエチレンチューブより培養液を灌流させる実験を実施した。様々な灌流速度に設定して灌流させたところ、灌流速度が10ml/dayを超えても、ゲル化したマトリックス内に液だまりを形成することなく培養液が浸透・排液され、この灌流システムが期待通りに機能することが明らかになった。

次に、心筋細胞スフェロイド又は肝細胞スフェロイドで構築したS/M構造体を、この構造体内灌流システムに適応し、それぞれの細胞に対応した培養液を6ml/dayの速度で灌流させた。心筋細胞スフェロイドによるS/M構造体

では、灌流開始1日後にはスフェロイド構成細胞から突起が伸び出し始め、2-3日後までには異なるスフェロイド細胞の突起が互いに接合してスフェロイド間のネットワーク構造を形成した。その後、そのネットワーク全体が拍動をはじめ、続いてネットワークの密度が高まることにより、灌流開始後2週間程度で全体として細胞が密に接着した三次元再生心筋組織を構築するに至った。構造体内灌流システムによりviabilityが保たれつつ、血管新生制御マトリックスが三次元組織構築の良好な足場となり得たことを示す結果と考えた。

一方、肝細胞スフェロイドで構築したS/M構造体では、灌流開始後3日程度で各スフェロイドから周囲に突出するように細胞の伸びだしが見られ、肝細胞の増殖を示唆する所見と考えられた。また、一部のスフェロイドは嚢胞状の形態を取り、胆汁排泄性蛍光物質を用いた検討により、嚢胞の中には胆汁成分が排出されていることが明らかになった。しかし、互いのスフェロイドが接合して三次元再生肝組織を構築するには至らなかった。

(2) 構造体内における血管様構造の構築

血管新生制御マトリックス内に様々な密度でHUVECを包埋して構造体を作成し、培養したところ、 $2.0\text{-}2.5 \times 10^6$ cells/ml程度の密度で包埋した時、最も迅速に三次元血管様構造を構築することができた。具体的には、培養開始後1日でHUVEC間のネットワークができはじめ、2日後にはcapillary formationと呼ばれる三次元の血管網様構造が完成した。包埋する細胞の密度がこれより低いとHUVECは包埋直後の球状の形態のまま経過し、細胞から突起を伸ばすという挙動も示さなかった。一方、細胞密度が高すぎると細胞同士が当初から接着しているような状況になるため、明らかなネットワーク構造となりにくかった。また、HUVECに間葉系幹細胞を併用することも試みたが、HUVEC単独で包埋した時と比べ構築された三次元血管様構造の形態に有意な差異は見いだせなかった。なお、上記の結果は、構造体内灌流システムを適応した培養においても同様の結果を得ることができた。

次に、内部にHUVECによる三次元血管様構造を構築した構造体を、ラット腹直筋筋膜下に移植する実験を実施した。移植後5日目に、移植した構造体を回収し、組織学的に観察したところ、構造体内には発達した管腔ネットワークが観察され、その内部は赤血球で満たされていたことから、血管網が構築されたと考えられた。また、この組織標本をヒトCD31に対する特異抗体を用いて免疫染色したところ、構造体の中心部に存在する血管網が染色されるのに対し、辺縁部に存在する血管網は染色されないことが判明した。これは、構造体中心部においては、HUVECにより形成された血管様構造が血管網になり、移植母床から構造体内へ発達してきた宿主の血管と連

結して血流供給を受けていることを示唆する。事実、慎重に観察するとヒトCD31陽性の部分と陰性の部分が壁に混在している血管を見出すことができ(ヒトとラットのキメラ血管)、ラットの血管系が構造体内部に作成したHUVECによる血管網構造と確かに連結したことを明示する所見と考えられた。以上より予め構造体内に血管内皮細胞により血管網様ネットワークを作成しておけば、移植後において迅速に構造体内に栄養血管網を誘導することが可能であることが示された。

(3) 構造体内灌流システムを用いた血管網付き再生組織の生体内構築

心筋細胞スフェロイド又は肝細胞スフェロイドで構築したS/M構造体を、構造体内灌流システムに適応し、ラット腹直筋筋膜下に移植した。移植後5日目に構造体を回収し組織学的に検討したが、ラットの移植母床から構造体内への新生血管網の発達は認められなかった。それどころか、移植母床の組織と構造体表面の間には液性成分で満たされた間隙が介在しており、母床からの血管網の進入を阻んでいるかのような所見を呈していた。構造体内灌流システムは、チューブから供給される培養液が構造体周囲にオーバーフローするように作られているため、オーバーフローした培養液が構造体周囲に一時的に貯留することにより、移植母床と構造体表面の接合を阻害しているものと考えられた。そのため、培養液の灌流速度を小さくすることにより、構造体周囲への培養液の貯留を少なくして血管網の進入を可能にできるか検討してみたが、結果は同様であった。以上より、本システムを実用的なものにするためには、周囲への排液をコントロールする何らかの工夫が必要であることが示唆された。

(4) 血管網付き三次元再生組織の大型化技術の開発

三次元再生組織の構築に成功した心筋細胞スフェロイドを用いて大型化にむけた検討を実施した。当初はジャングルジム様の足場状に組まれた灌流路の中にS/M構造体を組み込むことを想定していたため、予備実験としてポリエチレン製の網スポンジに心筋細胞S/M構造体を充填して培養することを試みた。結果としては、三次元再生心筋となり拍動を開始するとともに、再生心筋は網スポンジの間をすり抜けるように収縮していくことが観察された。従って、大型化を目指してジャングルジム様足場に心筋細胞S/M構造体を組み込んでも、内部で収縮することにより大型化は達成できないことが明らかになった。そのため、収縮に応じてS/M構造体を順次追加していくというアプローチに変更して大型化をめざした。収縮に対応させ、新たな心筋細胞S/M構造体を追加していくという方法を試み、最終的には直径6mm高さ4mmの再生心筋組織を作成する事に成功した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Nakayama A, Morita H, Hayashi N, Nomura Y, Hoshina K, Shigematsu K, Ohtsu H, Miyata T, Komuro I. Inverse Correlation Between Calcium Accumulation and the Expansion Rate of Abdominal Aortic Aneurysms. *Circ J*. 査読有. 2016;80(2):332-9. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1065.
2. Matsukura M, Hoshina K, Shigematsu K, Miyata T, Watanabe T. Paramalleolar Arterial Bollinger Score in the Era of Diabetes and End-Stage Renal Disease - Usefulness for Predicting Operative Outcome of Critical Limb Ischemia. *Circ J*. 査読有. 2016;80(1):235-42. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0704.
3. Hosaka A, Miyata T, Nishiyama A, Miyahara T, Hoshina K, Shigematsu K. Preservation of the accessory renal arteries after endovascular repair of common iliac artery aneurysm using kissing stent grafts. *J Vasc Surg*. 査読有. 2016 Feb;63(2):523-6. doi: 10.1016/j.jvs.2014.05.042.
4. Urabe G, Hoshina K, Shimanuki T, Nishimori Y, Miyata T, Deguchi J. Structural analysis of adventitial collagen to feature aging and aneurysm formation in human aorta. *J Vasc Surg*. 査読有. 63(5):1341-50. doi: 10.1016/j.jvs.2014.12.057.
5. Nemoto M, Koyama H, Nishiyama A, Shigematsu K, Miyata T, Watanabe T. Adequate Selection of a Therapeutic Site Enables Efficient Development of Collateral Vessels in Angiogenic Treatment With Bone Marrow Mononuclear Cells. *J Am Heart Assoc*. 査読有. 2015 Sep 14;4(9):e002287. doi: 10.1161/JAHA.115.002287.
6. Hashimoto T, Chen L, Kimura H, Endler A, Koyama H, Miyata T, Shibasaki F, Watanabe T. Silencing of eIF3e promotes blood perfusion recovery after limb ischemia through stabilization of hypoxia-inducible factor 2 activity. *J Vasc Surg*. 査読有. 2015 Mar 7. pii: S0741-5214(15)00067-1. doi: 10.1016/j.jvs.2015.01.004.
7. Akai T, Hoshina K, Yamamoto S, Takeuchi H, Nemoto Y, Ohshima M, Shigematsu K, Miyata T, Yamauchi H, Ono M, Watanabe T. Biomechanical analysis of an aortic aneurysm model and its clinical application to thoracic aortic aneurysms for defining "saccular" aneurysms. *J Am Heart Assoc*. 査読有. 2015 Jan 19;4(1):e001547. doi: 10.1161/JAHA.114.001547.
8. Shirasu T, Hoshina K, Yamamoto S, Shigematsu K, Miyata T, Watanabe T. Poor Prognosis in Critical Limb Ischemia Without Pre-Onset Intermittent Claudication. *Circ J*. 査読有. 2015;79(7):1618-23. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0017. *Circ J*.
9. Nishiyama A, Koyama H, Miyata T, Watanabe T. Therapeutic site selection is important for the successful development of collateral vessels. *J Vasc Surg*. 査読有. 2015 Jul;62(1):190-9. doi: 10.1016/j.jvs.2014.02.004.
10. Kamimura W, Koyama H, Miyata T, Takato T. Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture. *J Biomed Mater Res A*. 査読有. 2014 Dec;102(12):4309-16.
11. Hikiji H, Tomizuka K, Taguchi T, Koyama H, Chikazu D, Mori Y, Takato T. An in vivo murine model for screening cranial bone regenerative materials: testing of a novel synthetic collagen gel. *J Mater Sci Mater Med*. 査読有. 2014 Jun;25(6):1531-8. doi: 10.1007/s10856-014-5185-5.
12. Kobayashi H, Terada D, Yokoyama Y, Moon DW, Yasuda Y, Koyama H, Takato T. Vascular-inducing poly(glycolic acid)-collagen nanocomposite-fiber scaffold. *J Biomed Nanotechnol*. 査読有. 2013 Aug;9(8):1318-26.
13. Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano*. 査読有. 2013 Oct 22;7(10):8583-92. doi: 10.1021/nn402662d.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 須原正光、小山博之ら、急性下肢虚血に対するナノ粒子を用いた新たな治療戦略の探求、第15回日本再生医療学会、2016年3月17日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)
2. 上村涉、小山博之ら、立体組織再生のための足場材料: アテロコラーゲン-シクロデキストリン酸化物架橋ゲルを用いた

- 三次元培養、第 15 回日本再生医療学会、
2016 年 3 月 18 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
3. 上村 渉、小山博之ら、立体組織再生を目指した足場材料：アテロコラーゲンをオリゴ糖酸化物で架橋した三次元培養基材の開発、第 15 回日本再生医療学会、2016 年 3 月 19、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
 4. 上村 渉、小山博之ら、組織移植のための血管網誘導足場基材：オリゴ糖酸化物で架橋したアテロコラーゲンゲルの開発、第 14 回日本再生医療学会、2015 年 3 月 19 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
 5. 上村 渉、小山博之ら、移植可能な三次元培養基材：オリゴ糖酸化物によるゲル架橋システムの開発、第 14 回日本再生医療学会、2015 年 3 月 19 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
 6. 根本 卓、小山博之ら、移植部位選択に焦点をあてた自家単核球細胞を用いた血管新生療法の研究、第 13 回日本再生医療学会、2014 年 3 月 5 日、国立京都国際会館（京都府京都市）
 7. 上村 渉、小山博之ら、組織再生を目指した三次元培養基材：アテロコラーゲン-酸化オリゴ糖架橋ゲルの開発、第 13 回日本再生医療学会、2014 年 3 月 4 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 博之 (KOYAMA Hiroyuki)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：10241994

(2) 研究分担者

宮田 哲郎 (MIYATA Tetsuro)
東京大学・医学部附属病院・登録診療員
研究者番号：70190791

(3) 保科 克行 (HOSHINA Katsuyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90571761