

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462147

研究課題名(和文) 組織工学と幹細胞研究を融合させた新規自己細胞由来人工気管、肺による再生医療

研究課題名(英文) Scaffold-free trachea and lung tissue engineering using bio-3D printing system

研究代表者

町野 隆介 (MACHINO, Ryusuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：90728081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、spheroidを自由に構築するBio-3D Printer Regenova®を用いて、自己細胞のみで構成した新たな人工気管の開発を行っている。ヒト皮膚線維芽細胞(NHDFs)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)で作成したリングと、ヒト関節軟骨細胞(NHACs)、HUVECs、MSCsで作成したリングを蛇腹状に組み合わせ、気管の構造と類似した構造体の作製を行い、カテーテル補助下にラット頸部気管への移植に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have reported Scaffold-free structures made by a fully biological self-assembly approach, which we implement through a Bio 3D printing system. We evaluated which types of cells, how many cell types or how mixed of these cells are suitable for enough strength as a structure. And here, we report development of scaffold-free trachea. There are various cell types, which consist of native trachea. In this study, human cartilage cells (NHACs), human fibroblasts (NHDFs), Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) and human mesenchymal stem cells from bone marrow (MSCs) were used for scaffold-free trachea. They were aggregated into spheroids. Now, complicated structure, which is more similar like native trachea with the bellows pipe shaped tube consisted of 2 types of spheroids (NHDFs + HUVECs + MSCs and NHACs + HUVECs + MSCs) was made, and which had enough strength to suture in transplantatinon. Furthermore, the tubes were already implanted into rats with support of catheter.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：気管再生 scaffold-free バイオエンジニアリング スフェロイド バイオ3Dプリンター

### 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞の発見により、再生医療および組織工学が注目されている。肺、気管支領域では、ラットでの肺脱細胞化、再細胞化や組織工学を用いて自己細胞で気管を作成する技術が報告されているが、肺の再細胞化後の機能不全や免疫抗原の残存、人工気管の強度不足の問題があり、肺、気管の立体構造の構築、再生の研究、開発はまだ発展途上の段階である。

### 2. 研究の目的

Nakayama らは、本来、ほとんどの細胞が有する接着能を利用したスフェロイド形成および、スフェロイド同士が接着融合するという性質を利用し、scaffold (ポリマー等の外来異物となる足場) を使用せず、任意の細胞のみから形成される複雑な立体構造を作成する技術を開発した。BioRapid Prototyping System (以下 BRP システム) と称する本技術は、整形外科の関節軟骨再生を目的として開発された技術であるが、本研究ではこの BRP システムと体組織細胞、幹細胞を用いて融合させることで、人工気管の作成に応用し、自己細胞のみで構成した、抗免疫性、抗感染性を有し、異物除去能を有する、新たな人工気管の開発、及びこの三次元構造を構成するメカニズムの解明を行うことを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

人工気管の作製において、まずは気管軟骨は軟骨細胞を、軟骨間靭帯は線維芽細胞を中心としたスフェロイドを用いて作成することとし、それぞれ単一の細胞で作成したチューブの強度の検討および、ほかの細胞 (臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs)、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs)) の組み合わせによる組織強度の検討 (Tissue Puller を用いて tensile strength を測ることで組織の強度とした) を行ったのちに、線維芽細胞、軟骨細胞それぞれの検討において最も強度が高かった 2 種類のスフェロイドを組み合わせ、より気管を模したチューブを作製し、これをラット頸部気管に移植、生体内での変化を検討することとした。

### 4. 研究成果

線維芽細胞 (NHDFs) のみからなるスフェロイドを用いて作成したチューブ状構造体において、循環培養期間を長くすることで構造体の強度の上昇を認めた。また培養期間が長い構造体の外縁には膠原繊維からなる厚い層を認めたことより、強度の上昇に細胞自身による細胞外マトリックス (ECM) の生成が大きく関与していることが予想された。ECM の産生量は細胞によって異なり、また構造体内で組み合わせる細胞の種類によっても変わるため、移植操作に対応可能な硬度のチューブ状構造体の作製を目指し、細胞の組

み合わせの検討を行った。その結果、NHDFs のみからなるスフェロイドから作成したチューブより、NHDFs に臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs)、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) を加えて作成したスフェロイドで作成したチューブ (以下、fibrous tube) が、より ECM の産生が多く、強度も上昇することを発見した。そこで軟骨細胞 (NHACs) に対しても同様の検討を行ったところ、NHACs においても、HUVECs、MSCs を加えたスフェロイドで作成したチューブが最も強度が上昇した (以下 cartilaginous tube)。また MSCs のみで作成したチューブの collagen II 免疫染色により、TGF- $\beta$  等の軟骨分化誘導因子を加えることなく、MSC が軟骨に分化していることが推測された。

この結果より、fibrous tube と cartilaginous tube を蛇腹状に組み合わせ、気管の構造とより類似した長さ 5mm、内径 2mm 程度の構造体の作製を行った (図 1)。

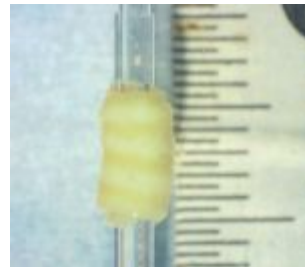


図 1

この気管様構造体は native rat (F344 9w) の気管の強度には劣るものの、fibrous tube、cartilaginous tube よりも、より強い組織強度を有していた (図 2)。

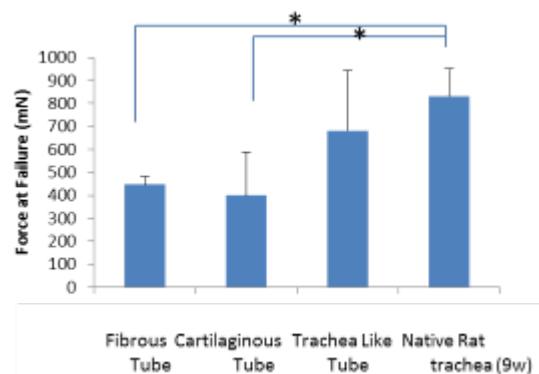


図 2

この気管様構造体をラット頸部気管へステント補助下に移植し、1 週間の生存を確認した (図 3)。



図 3

また移植した気管様構造体は周囲組織との癒合も良好であり、1 週間で、周囲血管との junction および構造体内への血液流入が確認され（図 4）構造体内部には CD31 免疫染色において微小血管構造が確認された（図 5.6）。

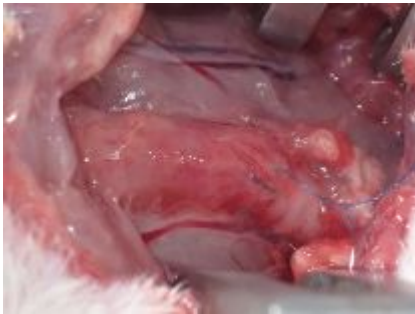


図 4

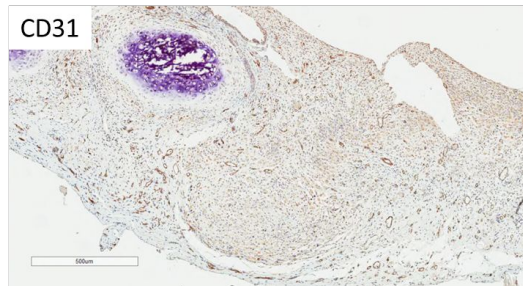


図 5

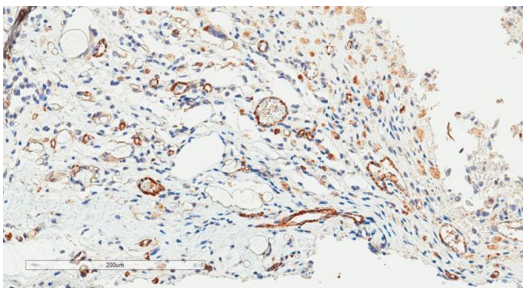


図 6

生体にとって異物である scaffold を用いずに、自己の細胞のみで構造体を作製できる本技術は、成長に伴った臓器の成長も期待でき、今後の移植医療に貢献できるものとする。

##### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

Bio-3D Printer を用いた自己細胞由来 Scaffold free の人工気管の作成

町野隆介 松本桂太郎 谷口大輔 武岡陽介 田浦康明 土肥良一郎 畑地豪 宮崎拓郎 土谷智史 山崎直哉 今岡由紀 Ruben Groen 福岡順也 中山功一 永安武 第 16 回日本再生医療学会

2017.03.07-09 仙台国際センター 宮城県仙台市

Bio-3D Printer を用いた自己細胞由来人工気管の作成

町野隆介 松本桂太郎 谷口大輔 武岡陽介 田浦康明 土肥良一郎 畑地豪 宮崎拓郎 土谷智史 山崎直哉 今岡由紀 Ruben Groen 福岡順也 中山功一 永安武 第 68 回日本気管食道科学会

2016.11.17-18 京王プラザホテル 東京都新宿区

Bio-3D Printer を用いた自己細胞由来人工気管の作成

町野隆介 松本桂太郎 谷口大輔 武岡陽介 田浦康明 今岡由紀 Ruben Groen 福岡順也 中山功一 永安武 第 4 回細胞凝集研究会

2016.09.09 札幌全日空ホテル 北海道札幌市

Bio-3D printer Regenova を用いた自己細胞由来人工気管の作成

町野隆介 松本桂太郎 谷口大輔 武岡陽介 田浦康明 今岡由紀 Ruben Groen 福岡順也 中山功一 永安武 第 48 回日本結合組織学会

2016.06.24-25 長崎大学医学部良順会館 長崎県長崎市

バイオ 3D プリンター Regenova を用いた新規自己細胞由来人工気管の作成

町野隆介 松本桂太郎 谷口大輔 武岡陽介 田浦康明 宮崎拓郎 土谷智史 山崎直哉 中山功一 永安武 第 15 回日本再生医療学会

2016.03.19-20 大阪国際会議場 大阪府大阪市

Bio-3D Printer Regenova を用いた新規自己細胞由来人工気管の作成

町野隆介 松本桂太郎 谷口大輔 武岡陽介 田浦康明 畑地豪 北村由香 宮崎拓郎 土谷智史 山崎直哉 中山功一 永安武 第 3 回細胞凝集研究会

2015.11.20 城山観光ホテル 鹿児島県鹿児島市

Scaffold-Free Trachea Tissue Engineering Using Bioprinting  
Ryusuke Machino, Keitaro Matsumoto,

Yasuyuki Taura, Naoya Yamasaki,  
Katsunori Tagagi, Tomoshi Tsuchiya,  
Takuro Miyazaki, Koichi Nakayama,  
Takeshi Nagayasu. American Thoracic  
Society International Conference  
2015.05.15-20 Colorado Convention  
Center Denver Colorado (USA)

教授  
研究者番号：80284686

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

町野 隆介 (MACHINO, Ryusuke)  
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・  
客員研究員  
研究者番号：90728081

### (2)研究分担者

中山 功一 (NAKAYAMA, Kouichi)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：50420609

田浦 康明 (TAURA, Yasuaki)  
長崎大学・病院(医学系)・助教  
研究者番号：60437887

松本 桂太郎 (MATSUMOTO, Keitaro)  
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・  
講師  
研究者番号：80404268

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)  
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・