

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業
機能的生体組織製造技術

Development of Medical Device and Systems for Advanced Medical Services /
Technology of Manufacturing Functional Body Tissue

研究開発課題名：立体造形による機能的な生体組織製造技術の開発/バイオ3Dプリンタで造形した小口径 Scaffold free 細胞人工血管の臨床開発

Development of Manufacturing Technology of Functional Body Tissue by Three
Dimensional Modeling/Development of Scaffold-free Small Caliber blood
vessels modeled with Bio 3D Printer.

研究開発担当者 国立大学法人佐賀大学医学部臓器再生医工学研究室 教授 中山功一

所属 役職 氏名：Department of Regenerative Medicine and Biomedical Engineering, Faculty of
Medicine, Saga University Professor Koichi Nakayama

実施期間：平成28年4月1日～平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

我々は従来の再生医療 / ティッシュエンジニアリングの手法とは全く異なるアプローチで、細胞だけで大型の立体細胞構造体を作製することに成功しており、関節軟骨の再生医療の分野で臨床応用を開始している。さらに細胞凝集塊を積み上げる技術を発展させ、任意の XYZ の位置に複数の細胞を配置することにも成功し、ロボットシステム「バイオ3Dプリンタ」により、三次元データと細胞を投入するだけで、生きた細胞による立体的な構造体を作ることも可能となった。

本プロジェクトでは医療ニーズの高い小口径人工血管を、バイオ3Dプリンタを用いて細胞のみで作製し、非臨床での POC を取得する。さらに透析用の動静脈バイパス用グラフトとしての臨床応用を実現し、同時に各種臓器再生における血管再建としての応用に向けての研究開発をすすめ、血管構造体の作製工程の最適化及び大動物実験による有効性の検証を実施する。さらに、実用化を見据え、非臨床安全性試験の実施及び製品の製造工程・最終規格を確立し、複数の患者由来細胞を用いた製造試験を実施する。最終的にはヒト臨床研究を開始することを目標とする。

本年度は主に製造工程の改善と臨床応用を見据えた動物試験を引き続き行った。その結果、内圧1000mmHg以上の耐圧を持った構造体が安定して作製できるようになり、臨床応用を見据えて従来内径

2 ミリ程度であった構造体を上肢の血管用グラフトに適合しやすいよう内径 5 ミリに変更しても強度的に問題ないことを確認した。また、培養条件を再度検討し、短期間に強度を向上させる培養方法を見出し、さらなる最適化を進めている。

昨年度実施したミニブタへの移植試験では、上腕動静脈シャントと同等なサイズを検討し、ミニブタの頸動静脈バイパスへの移植手技の確立および一か月の生存は得られるようになった。しかし、組織学的所見から、移植後 2 週間程度で激しい拒絶反応が起こっており、その結果構造体の閉塞が判明した。そのため当初の目標である一か月程度の開存結果が得られていなかった。これは種を超えた移植であるため当初から激しい拒絶反応が起こることが想定されていたが、従来の標準的な免疫抑制のプロトコルでは制御できなかったため、ブタ自身の細胞を用いた同種移植の検討も行った。しかし、ヒト細胞で確立していた血管構造体の作製プロトコルではブタの細胞では安定して構造体が作製できなかった。そのため、より強力な免疫抑制のプロトコルを導入した結果、一か月以上の開存が得られた。一か月の血管造影でも内径の狭小化はみられず、一定の流量が得られていた。回収後の移植部には正常の血管とほぼ同等の組織の再生が部分的に起こっていることが確認できており、より技術的には長期の開存が期待できると思われる。免疫抑制が強力すぎるため、さらなる長期データを得るのは困難であるが、より長期の移植データを得られるよう改善を務める。

さらに臨床応用にむけて周辺環境の整備も行った。

[英文]

We developed a novel method to create a designed scaffold-free tubular tissue from multicellular spheroids (MCS) using a “Bio-3D printer (Regenova®, Cyfuse Biomedical K.K., Japan)”-based system, which enables us to load MCSs into needles and produce programmable three-dimensional structures. We generated scaffold-free tubular tissues from MCS composed of endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts using the Bio-3D printer, which were successfully implanted in nude rat models in an acute study. We newly set up the Bio-3D printer in Saga University and Kyoto prefectural university of medicine in this year. Large animal study (immunosuppressed mini pig) was underway. Vascular structures (length 1-2 cm, diameter 5 mm) was implanted in mini pig (shunt model: the internal jugular artery to vein). The flow in the graft was assessed by ultrasonography every other week after implantation, and evaluated by angiography after one month. All animals were survived and post-operative event such as bleeding was not observed.

However, there were severe immune rejection were observed after two weeks of implantation. To overcome the rejection we choose stronger immunosuppression protocol. Finally, there were no obvious immune rejection in graft area after one month, and Angiography showed good flow in implanted area. Mechanical evaluation (burst test and tension test) of the tubular tissue cultured in a bioreactor for one month was performed. We confirmed resistance of more than 1000mmHg in the burst test. Further studies are promising for the clinical application of this novel technology.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 1 件)

1. Moldovan NI, Hibino N, Nakayama K. Principles of the 'Kenzan' method for robotic cell spheroid-based 3D bioprinting. Tissue Engineering Part A(Tissue Engineering Part B: Reviews) . 2016,Online ahead of editing.
2. 荒井 健一, 中山 功一. バイオ3Dプリンタを用いた立体構造体の作製と将来的な展望. バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線. 2016, 2016年12月16日号Ⅲ編1章, 117-125.
3. 伊藤 学, 中山 功一, 五條 理志, 野出 孝一, 森田 茂樹. バイオ3Dプリンティング技術を利用した scaffold free 小口径細胞人工血管の開発. 血管医学 別刷, 2016, 17(1), 63-68.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Scaffold-free Bio-3D printing for solid organ fabrication, 口頭, Nakayama K, European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative International Society 2016(TERMIS), 2016/6/28-7/1, 国外.
2. Scaffold-free bio-3D printing for solid organ fabrication, 口頭, Nakayama K, 2016 The 7th Annual Meeting of Asian Cellular Therapy Organization, 2016/11/11-13, 国外.
3. Bio 3D printing scaffold-free blood vessels, 口頭, Verissimo AR, Nakamura A, Matsubayashi K, Itoh M, Nakayama K, 2016Joint Annual Scientific Meeting of The Australian Atherosclerosis Society, (AAS), High Blood Pressure Research Council of Australia, (HBPRCA), and Australian Vascular Biology Society, (AVBS), 2016/12/7-10, 国外.
4. バイオ3Dプリンタの開発と組織・臓器作成の試み, 口頭, 中山 功一, 日本歯科理工学会 平成28年度春期第67回学術講演会, 2016/4/16, 国内.
5. スキャフォールドフリーバイオ3Dプリンタを用いた器官・臓器作製の試み, 口頭, 中山 功一, 第55回日本生体医工学会大会, 2016/4/26-28, 国内.
6. 臓器再生を目指したバイオ3Dプリンタの開発とその応用について, 口頭, 中山 功一, 第59回春季日本歯周病学会, 2016/5/20, 国内.
7. 臓器再生を目指したバイオ3Dプリンタの開発, 口頭, 中山 功一, 化学工学会 第48回秋季大会, 2016/9/6-8, 国内.
8. Building multi-layered blood vessels using scaffold-free 3D bioprinting, ポスター, Ana Verissimo, 第4回細胞凝集研究会, 2017/9/9, 国内
9. バイオ3Dプリンタを用いた臓器再生の試み, 口頭, 中山 功一, 第52回日本移植学会総会, 2016/9/29-10/1, 国内.
10. 再生医療実現に向けての課題と挑戦：アカデミアの技術を患者に届ける, 口頭, 中山 功一, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内.
11. スキャフォールドフリーバイオ3Dプリンタを用いた血管再生医療の試み, 口頭, 中山 功一, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内.
12. スフェロイド形成ロボットを用いたスフェロイドの作製, 藤川 眞麗恵, 下戸 健, 秋枝 静香, 宮崎 雄大, 中山 功一, 石川 篤, 日垣 秀彦, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内.
13. バイオ3Dプリンタを用いた立体的 scaffold-free 細胞構造体による小児外科領域の再生医療研究, 柳 佑典, 中山 功一, 小林 英司, 絵野沢 伸, 田村 忠士, 張 秀英, 岩崎 昭憲, 田口 智章, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7-9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 臓器再生を目指したバイオ 3D プリンタの開発について, 中山 功一, 奈良先端科学技術大学院大学 大学院生講義, 2016/4/20, 国内.
2. iPS 細胞を用いた再生人工血管, 中山 功一, Yokohama Vascular Surgery Forum 2016 横浜市立大学心臓血管外科, 2016/5/24, 国内.
3. 高密度スキャフォールドフリー脂肪由来幹細胞構造体, 中山 功一, 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 平成 28 年度再生医療プログラム間連携のための情報交換会, 2016/5/30-31, 国内.
4. 骨折の治療から着想したバイオ 3D プリンタの開発とその応用について, 中山 功一, 佐賀県医療センター好生館ライフサイエンス研究所 再興記念シンポジウム 市民公開講座, 2016/7/9, 国内.
5. バイオ 3D プリンタの開発と組織・臓器作成の試み, 中山 功一, 名古屋イノベーション研究会 第 19 回セミナー「バイオ 3D プリンタの開発と組織・臓器作成の試み」, 2016/12/13, 国内.
6. 「剣山」に細胞、血管づくり, 中山 功一, 読売新聞, 2016/6/14, 国内.
7. 3D 印刷で血管や神経, 佐賀大学、サイフューズ、日本経済新聞, 2016/7/16、国内
8. Soon printing a human heart on demand will no longer be sci-fi, Koichi Nakayama, CNBC, 2017/1/24, 海外.

(4) 特許出願

平成 28 年度内の特許出願：なし