

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

3Dプリンターを用いた一体系管状型気道用足場による  
一期的気道再生の研究

研究代表者 古村 眞 (医学部 小児外科)

## 緒 言

我々は、気管狭窄症の治療を再生医療で治療するための研究を行っている。気道再生の研究は、1994年 Vacanti Cらが、牛軟骨の細胞から管状の再生軟骨チューブを無胸腺ラットの頸部気管へ移植したのが最初である<sup>1)</sup>。気道の最も重要な機能は、呼吸する為の開存性である、そこで我々は気道のフレームとなる軟骨再生の研究を中心に行ってきた。軟骨細胞を足場に播種し、生体へ移植して再生した軟骨は、6週で気管軟骨と同じ力学的強度になることを証明した<sup>2)</sup>。この基礎的研究から、ステント系足場を開発し、家兎の気管前壁欠損モデルで、軟骨細胞増殖因子を徐放化し再生軟骨パッチが実現することを実証した<sup>4)</sup>。また、粘膜上皮は、足場内面をコラーゲンコートすることで、自律再生することを確認している<sup>4)</sup>。

2012年には、既に気管狭窄症の患児に、死体気管由来のマトリックスと骨髄細胞を用いた臨床応用例が報告されている<sup>2)</sup>。また、Macchiarini Pらが14例の円柱状の人工再生気管を移植しているが、半数の症例が3か月以内に死亡しており、長期生存例にはステント挿入が必要と報告されている<sup>5)</sup>。我々は、より生体に近い材料で分化・成熟の可能性の高いシリンダー型の再生気道であるBIO-AIR-TUBEを共同研究者らと開発した(特願2013-1773289)。膜様部と輪状靱帯に相当する部分は、BIO-TUBEによって再生させ、軟骨輪は足場材料に軟骨細胞を播種させて軟骨輪を再生させている。このBIO-AIR-TUBEには、再生軟骨輪の形状の足場を使用する必要がある。本研究の最終的な目標は、3Dプリンターで造形したポリ乳酸多孔体による足場を用いて再生軟骨輪を得ることである。このポリ乳酸の足場は、共同研究者らが鼻尖部軟骨の臨床研究で使用した材料であり生体への安全性が確認されている。従来、ポリ乳酸多孔体の足場材料は金型をつくり造形されている。この造型法では、時間を要し複雑な形状を造形することが技術的に困難である。しかし、3Dプリンターを用いて、ポリ乳酸による足場を造形でできれば、複雑な形状の足場を立体的に造形することが容易となる。本研究では、まず、3Dプリンターで造形したポリ乳

酸の足場によって、軟骨再生が可能であるか検討することを目的とした。

## 材料と方法

以前、報告した方法<sup>3,4,6)</sup>に準拠して、豚耳介軟骨から軟骨細胞を分離・培養した。耳介軟骨組織の周囲線維性組織を鈍的鋭的に除去し軟骨の小片を1 mm<sup>3</sup> サイズまで細切した。細切した軟骨小片は、50 ml コニカル型遠沈管内の0.3%コラゲナーゼタイプ2 (Worthington, Freehold, NJ) 内に入れ、37℃恒温槽内で強振盪40分間反応させた。酵素処理後の懸濁液を100 µmのナイロン製セル・ストレーナー (BD Falcon, Bedford, MA) にて濾過し、430G 5分4℃で遠心分離した。遠心後のPelletをPBS (phosphate-buffered saline) (和光製薬、大阪) で洗浄し単離した細胞は、1型コラーゲンコーティングされた培養皿 (アサヒ硝子、船橋) に、細胞密度6400 cells/cm<sup>2</sup> で単層培養した。培地はDMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle medium/f12) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) に5%FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma)、濃度100 ng/mlのFGF-2 (fibroblast growth factor-2) (科研製薬株式会社、東京)、5 µg/mlインスリン (Sigma) を加えたもので行った。培養液は、週に2回交換した。1継代した軟骨細胞を足場材料に播種した。

生分解性ポリ乳酸による足場は、SCOVO C170 (アビー株式会社、横浜) によって作成した。ポリ乳酸による0.5x0.5x0.5 mmの柱を0.5 mm間隔に配置した格子を作成した。これを2層に重ねて足場材料とした(図1)。

軟骨細胞の播種は、1%アテロコラーゲングル (株式会社高研、東京) 300 µL中に1.5x10<sup>7</sup>個の細胞を懸濁させたものを3Dプリンターで造形した足場に播種して37℃で2時間インキュベートした(図2)。

この移植片を無胸腺マウス (n=4) の皮下に移植し、移植4週後に移植片を摘出した。

## 結 果

移植4週後に摘出した移植片は、乳白色の組織が再生されていた(図3)。足場材料は、再生組織内に透見され

ており、残存していた。足場材料の周囲には、軟骨様の組織が認められており、軟骨と同等の弾性硬の硬さを有していた。

## 考 察

本研究によって、3Dプリンターで作成された立方体のポリ乳酸による足場材料で軟骨再生が確認された。

組織は、足場材料、細胞、そして成長因子の3因子を用いて再生される<sup>7)</sup>。必要な組織の大きさと形状は、足場の造形によって調整することが可能である。今回の研究で、3Dプリンターで再生された足場材料によって、足場とほぼ同じ大きさと形状の軟骨が再生されたことから、再生組織の大きさと形状を3Dプリンターによる足場で自由に調整できると考えている。

最終的には、軟骨輪様組織、膜様部・輪状靱帯様組織の足場を3Dプリンターで造形し、それぞれの細胞をリク

ルートあるいは播種することで気管を再生することが可能と考えている。CTあるいはMRI検査から得られた患者3D画像データから、3Dプリンターを使用して個々の症例に必要な気道長・径をオーダーメイドで作製することが可能となる。つまり、必要な気道を病態にあわせて再生することができる。また、足場材料を造型するための金型を作成する必要がなくなり、短期間の造型が可能となり、再生医療の問題点であるコストの削減という観点からも有用と思われる。治療が必要となった場合、短期間で足場材料が造型されるということは、臨床応用する上では重要なことである。

生分解性のプラスチックとともに組織学的検討をさらに追加する必要があるが、肉眼所見、触診所見は軟骨組織であった。3Dプリンターの性能あるいは樹脂の改良に

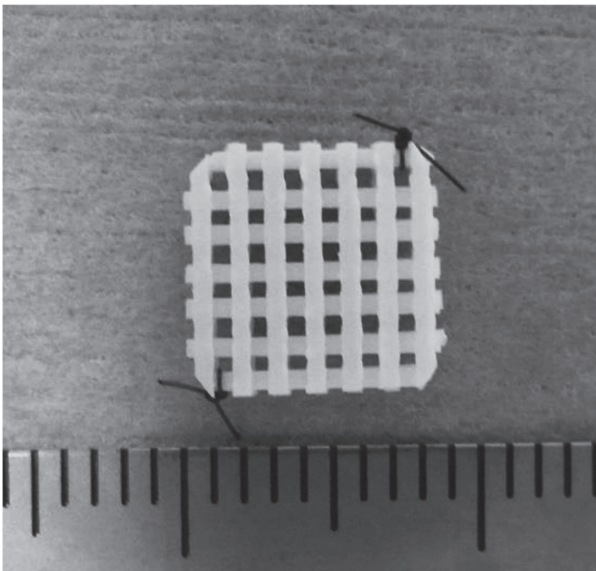


図 1.

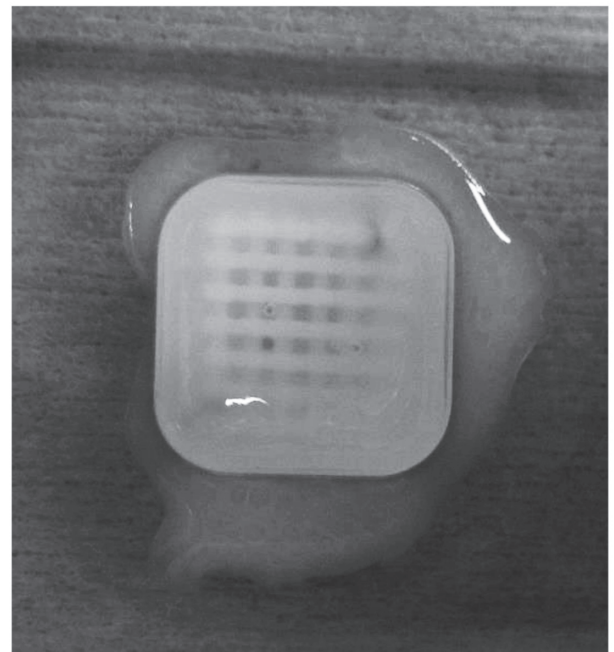


図 2.

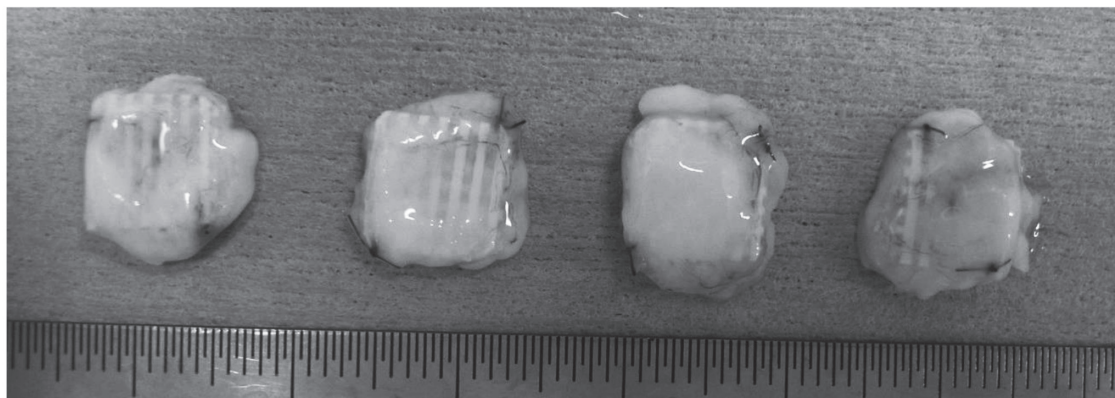


図 3.

よって、さらに微細構造の造型が可能となれば、海綿状の足場が造形されることで軟骨組織の再生が促進され、軟骨基質の産生効率も向上するものと考えられる。また、本研究では、ポリ乳酸による足場造型を行ったが、その他の生分解性ポリマー、コラーゲンなどの材料を用いてプリントアウトが可能となれば、再生組織の種類によって有用なそれぞれの足場造型が可能となる。

本研究によって、3Dプリンターによって造型した生分解性の足場材料を用いて、軟骨様組織の再生を得ることが可能であった。3Dプリンターによる足場の造型は、組織工学的手法を用いた再生医療を臨床応用するうえで基盤技術となり得るものと考えている。3Dプリンターの性能改善が、今後さらに期待される。また、組織再生を行う上で、その他の生分解性材料による造型技術が、次世代の組織再生技術になり得るものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg* 1994; 29:201-4 [discussion 204-205].
- 2) Elliott MJ(1), De Coppi P, Speggorin S, Roebuck D, Butler CR, Samuel E, Crowley C, McLaren C, Fierens A, Vondrys D, Cochrane L, Jephson C, Janes S, Beaumont NJ, Cogan T, Bader A, Seifalian AM, Hsuan JJ, Lowdell MW, Birchall MA. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet* 2012 Sep 15;380(9846):994-1000. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60737-5. Epub 2012 Jul 26.
- 3) Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Ohtani Y, Ishimaru T, Sugiyama M, Hoshi K, Iwanaka T. Study of mechanical properties of engineered cartilage in an in vivo culture for design of a biodegradable scaffold. *Int J Artif Organs* 2010 Nov;33(11):775-81.
- 4) Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T. An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J Pediatr Surg* 2008 Dec;43(12):2141-6.
- 5) Delaere PR, Van Raemdonck D. The trachea: the first tissue-engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Apr;147(4):1128-32. doi:10.1016/j.jtcvs.2013.12.024. Epub 2014 Jan 2.
- 6) Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T. Human tracheal chondrocytes as a cell source for augmenting stenotic tracheal segments: the first feasibility study in an in vivo culture system. *Pediatr Surg Int* 2008 Oct;24(10):1117-21.
- 7) Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 1988 Jan;23(1 Pt 2):3-9.

研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)

特になし