

# バイオ 3D プリンタを用いた 次世代型透析用人工血管の開発

伊藤 学

佐賀大学医学部胸部心臓血管外科

key words : バイオ 3D プリンタ, 透析用人工血管, 細胞製人工血管

## 要 旨

外来異物を用いて作製した現行の透析用の人工血管は、抗血栓性、抗感染性、生体適合性などの面で解決すべき課題が多く残されている。これまで我々は、外在性の足場（スキャフォールド）材料をまったく含まず、細胞だけで任意の立体構造体を構築するバイオ 3D プリンタを利用した研究に取り組んできた。本研究では、本バイオ 3D プリンタを用いて細胞のみで構築された細胞製人工血管を作製し、機械的強度や移植後の開存性、病理組織学的評価をすることで、臨床応用の可能性を究明し、次世代型透析用人工血管の開発を目指した。

## 1 目 的

末期腎不全で維持透析を含む腎代替療法が必要な患者は、2010年に世界で260万人に及んでいる。2030年にはさらに倍以上に増加する可能性があることが、Liyang らの検討で示されている<sup>1)</sup>。本邦においては、末期腎不全患者も糖尿病性腎症の増加と共に年々増え続け、2015年には、維持透析患者が32万例を超え、国内のみで年間約12,000本もの透析用人工血管が販売されている。

外来異物を用いて作製した既存の小口径人工血管（口径6mm未満）は、抗血栓性、抗感染性、生体適合性などの面で解決すべき課題が多く残されており、再生医療・組織工学的アプローチによる新たな人工血

管の開発が期待されている。特に、透析のさいにブラッドアクセスとして用いられる既存のePTFE製（フッ素系樹脂）などの小口径人工血管においては、送脱血のための穿刺部からの感染が波及しやすく、血栓閉塞しやすい問題があり、移植後1年間の一次開存率は35.4~64.5%と臨床現場で満足できる成績ではなく、新たな製品が待ち望まれている<sup>2,3)</sup>。血液透析用の人工血管に限らず、外来異物を材料とした人工血管はひとたび感染すると、バイオフィーム（菌膜）を形成しやすく、人工血管を完全に除去しなければ、致死的な敗血症状態へと悪化する可能性がある。また移植後急性期に限らず、慢性期においても、レシピエントの免疫力低下を契機に、う歯や外傷、再手術など、体内への菌侵入を介して感染する危険性は完全には回避できない。

2007年にYamanakaらによりヒトiPS細胞の樹立が報告され<sup>4)</sup>、これまで受精卵の破壊という胚性幹細胞（ES細胞）における倫理的問題の解決策の糸口が見い出された。そして、免疫拒絶反応の問題を解決できる自己の細胞を用いた組織再生がより現実味を帯び、再生医療に対する期待が高まっている。細胞の移植法として、従来は細胞をターゲットとなる組織・臓器に直接注入することが多く行われていたが、生着率が低いという問題があった。そこで、ばらばらの細胞ではなく細胞の塊（細胞凝集塊、スフェロイド）を用いるアプローチ<sup>5)</sup>、細胞シートを用いるアプローチ<sup>6)</sup>、さらには3次元的な立体を構築するアプローチなどの開発

が進められている<sup>7,8)</sup>。

近年、細胞が本来もつ自己凝集能力によって形成される細胞凝集塊（スフェロイド）を立体的に構築するバイオ 3D プリンタが開発された。スフェロイドを一つの単位として、任意の XYZ の位置で 3 次元データを元に配置することで、スフェロイドが融合し任意の形状の構造体を構築するロボット技術であり、本技術によって、外在性のスキャフォールドを一切含まない細胞のみによる機能的な立体構造体を作ることが可能となった。

本研究の目的は、バイオ 3D プリンタを用いて細胞製人工血管を作製し、組織学的な評価や力学的機能評価や、組織学的評価を行うとともに、動静脈シャントの代用血管として動物に移植することで、次世代型透析用人工血管としての臨床応用の可能性を探ることである。

## 2 方法

接着系細胞が元来有する基本的機能である細胞凝集現象により、細胞を低接着性のウエルに置いておくだけで細胞同士が融合し、きれいな球体（スフェロイド）になる。2 次元培養と比較して、スフェロイド形成段階で細胞外マトリックスが生理的に産生されているのに加え、単一細胞のみの培養より複数の細胞を組み合わせたほうがより高機能化することが知られており、まず細胞ソース決定、およびスフェロイドの最適化を行った。次にスフェロイドを一つの単位として、指示どおりに積層するバイオ 3D プリンタを用いて、細胞だけで管状の構造体を作製した。任意の XYZ の位置に複数のスフェロイドを配置するロボットシステムであり、スフェロイド、三次元デザインデータ、剣山を用いることで、細胞だけで任意の形状の立体構造体を作ることができる。

細いノズルで吸い上げたスフェロイド（直径 400～600 μm）を 3D デザインどおりに移送し、剣山の針に刺して固定する。しばらく培養するとスフェロイド同士が融合するので、融合後に剣山を引き抜くとスキャフォールドフリーの細胞製人工血管が得られる。その後、力学的強度、生理学的、分子生物学的機能を向上させるため、バイオリアクタで灌流培養を行った。細胞製人工血管の力学的機能評価、組織学的機能評価を行い、移植直前までの条件の最適化を行った。成熟工

程を経て最終的にでき上がったヒト細胞製人工血管を、免疫抑制剤を投与したミニプタに動静脈シャントの代用血管として移植し、移植後の開存性を評価した。

## 3 結果

バイオ 3D プリンタの基盤材料となるスフェロイドの細胞ソースの最適化において、混合する線維芽細胞の比率が高いほど細胞の凝集速度および、作製した細胞製人工血管の強度が向上する傾向を認めた。バイオリアクタでの培養期間の延長とともに、細胞製人工血管の強度が向上した。本結果を基に、線維芽細胞を主体とする細胞製人工血管同士の連結に成功し、長軸方向への延長が可能となった。

約 1 カ月間の灌流培養後の病理組織学的検査では、Masson trichrome 染色において、コラーゲンを含む細胞外マトリックス産生の増加とともに、生体動脈に似た層構造を認め、圧力破砕による強度試験では 1,000 mmHg 以上（ヒト正常血圧の約 8 倍程度）の耐圧性があることを確認した。ヒト由来細胞製人工血管のミニプタへの異種移植（シャントモデル）では、新たな免疫抑制手法を用いることで数カ月以上の開存を確認した。

## 4 考察

組織は本来、細胞同士が集合体を形成しており、その間隙を埋めるように細胞外マトリックスと呼ばれるタンパクが存在する。このような構造を人工的に作り出すのが組織工学であり、コラーゲンなどの生体由来材料やポリ乳酸など、医療用材料として薬事承認されている生体分解性高分子を、細胞の足場（スキャフォールド）として利用するのが一般的であった<sup>9)</sup>。

人工血管に対する再生医療・組織工学的アプローチとしては、

- ① 内側を血管内皮で被覆した人工血管<sup>10)</sup>
- ② コラーゲンを基盤とした人工血管
- ③ 生体分解性ポリマーをスキャフォールドとして用いた人工血管
- ④ 脱細胞化した血管組織で作製した人工血管
- ⑤ 自己組織のみで self-assembly されたスキャフォールドフリーの人工血管

が想定されている<sup>11)</sup>。臨床応用まで開発が進んだものは、③の生体分解性ポリマーで作られた人工血管であ

る。先天性心疾患の症例で下大静脈-肺動脈の間を連結するために使用された<sup>12)</sup>。生体分解性のスキャフォールドを用いるアプローチは、スキャフォールドが分解されたあとの長期耐久性に課題があり、血圧が低い右心系への応用に限られている。ポリグリコール酸の生体分解性ポリマーに平滑筋細胞を播種して、その後脱細胞する③、④の複合型アプローチがあり、血液透析用の人工血管として臨床研究 (Phase II 試験) まで進んでいる<sup>13)</sup>。しかしながら、6カ月の一次開存率が63%と、既存人工血管との比較で未だ優位性は示されていない。基本的には、生体内に埋め込まれた各種生体材料 (=スキャフォールド) は、炎症を引き起こす。バクテリアに対して抵抗性が乏しく、感染の危険もあるため、近年スキャフォールドを用いずに細胞組織のみで3次元的な組織を構築する試みがなされてきた。

本研究では、これらの問題を解決すべく、外来異物をまったく用いずに、自己の細胞だけで立体構造体を作製できるバイオ3Dプリンタという組織工学技術に着目し、細胞製人工血管を作製した。透析用人工血管の開発における本バイオ3Dプリンタの有用性を、素材、形態、機能、製造の面からまとめると以下のとおりである。

素材面は、スキャフォールドフリーで完全に自己細胞のみで構築でき、生体適合性、抗感染性に優れる。形態面ではデザイン、構造体の連結次第で任意の口径、長さの血管を作成可能である。機能面では、生体血管を構成する血管内皮細胞や平滑筋細胞を用いることで、血液凝固の調整、炎症の調整による抗血栓性、血管の収縮・弛緩作用など、本来、生体血管に備わった機能に期待できる。製造面では臨床応用において重要な再現性、迅速性にもおいても有用であると考えられる。本研究をさらに発展させ *in vitro* における最適条件設定ができれば、移植後異物感染を軽減できる可能性のみならず、移植後に適度な柔軟性を維持しながら自己組織と一体化し、血管の収縮・弛緩作用、血液凝固や炎症の調整による抗血栓性など、本来、生体血管に備わった生理的な機能を長期間維持できる理想的な人工血管となりうる可能性がある。

## 5 結論

バイオ3Dプリンタという新たな組織工学技術を用

いて、動静脈シャントの代用血管として大動物に移植可能な細胞製人工血管の作製に成功した。本研究をさらに発展させ *in vitro* における最適条件設定ができれば、自己細胞由来の透析用人工血管として臨床応用が期待される。

平成27年度日本透析医学会公募研究助成により得られた一部の成果は、『日医工学治療学会機関誌』に投稿したため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。なお、平成29年11月に下記雑誌に公表された。日医工学治療学会機関誌, 29, 3, 167-172.

## 文 献

- 1) Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. : Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* 2015; 385(9981) : 1975-1982.
- 2) 慢性血液透析用バスキュラーアクセスの作製および修復に関するガイドライン. *透析会誌* 2011; 44 : 855-937.
- 3) 伊藤 学, 吉戒 勝, 大西裕幸, 他 : ポリウレタン製人工血管の長期成績. *腎と透析* 2007; 63(4) : 621-623.
- 4) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131 : 861-872.
- 5) Ishihara K, Nakayama K, Akieda S, et al. : Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects *in vivo* using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Surg Res* 2014; 9 : 98.
- 6) Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, et al. : Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM : report of a case. *Surg Today* 2012; 42(2) : 181-184.
- 7) Nakayama K : *In Vitro Biofabrication of Tissue and Organs*. *Biofabrication* 2013; 1-21.
- 8) Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, et al. : Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. *PLoS One* 2015; 10(9) : e0136681.
- 9) Langer R, Vacanti JP : *Tissue engineering*. *Science* 1993; 260(5110) : 920-926.
- 10) Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, et al. : Long-term experience in autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg* 2009; 49(2) : 352-362.
- 11) Cleary MA, Geiger E, Grady C, et al. : Vascular tissue engineering : the next generation. *Trends Mol Med* 2012; 18(7) : 394-404.
- 12) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y : Transplantation of a tissue-engi-

- neered pulmonary artery. N Engl J Med 2001; 344 : 532-533.
- 13) Lawson JH, Glickman MH, Ilzecki M, et al. : Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease : two phase 2 single-arm trials. Lancet 2016; 387(10032) : 2026-2034.