

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  
Research and Development of Advanced Medical Devices and Systems to Achieve the Future of Medicine

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／細胞を用いた機能的な立体組織および立体臓器作製技術の研究開発／高機能足場素材とバイオ3Dプリンタを用いた再生組織・臓器の製造技術の開発  
Development of the functional biotissue production technology by the three-dimensional shaping / Research and development of the functional three-dimensional tissue and the three-dimensional organ manufacturing technology using cells. / Development of the production technology of the regenerated tissue and organ using high-performance scaffold and the bio3D printer

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究  
開発課題名： バイオ3Dプリンタ及び成長因子・細胞注入システムの設計開発  
Design and Development of a bio-3D printer and a cell inculcation system

研究開発分担者： 製造技術研究部門 上級主任研究員 清水 透  
所属 役職 氏名 Toru Shimizu, Chief Senior Researcher, Advanced Manufacturing Research Institute

分担研究  
開発課題名： バイオ3Dプリンタの評価技術の開発研究  
Research on evaluation technology of bio 3D printer

研究開発分担者： 製造技術研究部門 上級主任研究員 清水 透  
所属 役職 氏名 Toru Shimizu, Chief Senior Researcher, Advanced Manufacturing Research Institute

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(研究開発課題代表： 東京大学医学部附属病院 口腔顎顔面外科・矯正歯科 教授、 東京大学医学部

(1) 共通技術：生体適合性の高い足場材料として富士フイルムの開発した「ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチド(RCP)」とオリンパステルモバイオマテリアルの開発した  $\beta$ -TCP を採用し、骨、半月板、皮膚(創傷被覆材)の構造を模倣した足場を設計した。短時間での細胞侵入を可能にする内部構造を構築した。3D プリンタは、積層造形方式とディスペンサ方式とで作成したサンプルを評価して、材料汎用性が高い積層造形方式を採用した。積層造形方式 3D プリンタのプロトタイプ機を完成するとともに、造形用データを作成する技術を構築した。骨に関しては、作製した足場を臨床応用先となる東大に提供し、半月板に関しては、作製した足場を臨床応用先となる阪大に提供し、ミニブタによる実験で有効性を確認した。

(2) 骨：ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて RCP/ $\beta$ -TCP 足場素材の仕様および体外培養した細胞の投与方法の最適条件を確立し、大動物での評価において足場素材微細構造の適正な設計指針を獲得した。次に(足場素材+成長因子)/細胞の相互作用の検証として、*in vitro* において MSC に対して効率的に骨誘導可能な至適成長因子量を決定した。また、*in vivo* において成長因子の安全性を確認した。実験動物モデルを用いた有効性検証において、ミニブタの骨欠損モデルの有用性を確認した。最後に、細胞担持微細構造足場を用いた再生骨評価として、ミニブタを用いた大動物系での検討を行った結果、足場および細胞搭載による有用性を確認した。これらの結果をもとに、PMDA とも事前相談を実施し、臨床導出への道を策定した。

(3) 皮膚：皮膚再生医療材料として脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)を担持した RCP とキトサンの複合材料を考案した。今年度は、各素材の性能評価を実施し、いずれも難治性潰瘍における皮膚再生に有効な機能を有していることを明らかにした。皮膚潰瘍の治癒過程では表皮真皮間乳頭構造が消失し、潰瘍の再発リスクとなる。皮膚再生グループでは、RCP の粉体積層造形物を表皮ケラチノサイトの足場とすることで、細胞増殖ならびに遊走を促進し治癒期間を短縮するばかりではなく、表皮真皮間乳頭構造を再現できることを示した。また、皮膚潰瘍の最大の治癒阻害要因は細菌感染である。今回、緑膿菌を用いた培養実験ならびにラットにおける創傷感染実験により、キトサンの静菌作用を確認した。

(4) 半月板：当研究は、従来の再生医療材料では再現困難であった正常半月板微細構造を模倣した人工半月板を、RCP を材料として開発し、幹細胞治療との組み合わせにより正常組織に迫る半月板再生技術を確立させることを目的とする。今年度においては、以下の結果を得た。1.RCP を用いた三次元造形化 RCP 組織の候補構造を決定した。2.大動物への移植実験を実施し、人工半月板と幹細胞の組み合わせにより高い軟骨保護作用を認めた。3.移植組織の力学強度の解析では、細胞担持により移植組織のリモデリングが進行していることが推察された。4.移植組織の組織学的解析では、移植後 12 週で細胞担持群ではいずれの群においても良好な組織誘導性を認めた。サフラニン O 染色性はいずれの群でも認めなかったが、正常半月板様組織への変化を見るためには長期移植半年~1 年以上による評価が必要であると考えられた。

(5) 軟骨：至適な RCP 架橋条件と細胞保持のための空間構造を有し、物質交換が容易な足場素材を PLLA/RCP 複合体を用いて 3D プリンタで作製して仕様を確定し、生体外組織成熟した細胞を搭載することで、*in vivo* 移植により良好な軟骨を再生可能であることを確認した。次に、素材・因子複合体/細胞の相互作用の検証として、*in vitro* において、IGF-1 を細胞と共に足場素材に搭載し、成長因子の使用法および細胞投与方法の最適な条件を決定し、安全性を確認した。最後に、移植による有効性の検討として、ラット、ビーグルを用いた動物実験を行い、足場素材および再生軟骨の性能を評価した結果、*in vitro* 同

様に良好な再生軟骨組織形成が確認された。

(6) 膝関節：ラット、ミニブタの脛骨における骨軟骨複合欠損作製後の行動学的、解剖学的、組織学的評価から、欠損モデル作製が可能であることを確認した。また、複合骨・軟骨用足場素材の仕様検討として、RCP、RCP/ $\beta$ -TCP コンポジット、あるいは RCP と  $\beta$ -TCP の複合化を応用して、軟骨・骨一体型の 3 次元足場素材仕様の検討をおこなった。作製した構造体にあらかじめ体外にて培養、成熟化した細胞の投与を行い、*in vitro* にて各々の組織成熟度の評価をおこなった。

(7) 細胞評価技術：骨芽細胞（骨形成細胞）分化の指標となるバイオマーカー遺伝子として Col1a1 (I 型コラーゲン  $\alpha$  1 鎖) が、軟骨細胞（軟骨形成細胞）分化の指標となるバイオマーカー遺伝子として Col2a1 (II 型コラーゲン  $\alpha$  1 鎖) が適していることを確認した。次に Col1a1 の転写制御領域である 2.3 kb プロモーター断片、あるいは Col2a1 の転写制御領域である Col2a1 遺伝子第一イントロンに存在する Sox9 結合エレメントの制御下で緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescent protein-GFP) を発現するトランスジェンをもつ細胞を作製した。これらの細胞を RCP 中で培養したところ、分化特異的な GFP 蛍光を検出できることが確認され、骨・軟骨再生のイメージング法を確立した。また、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析 (クロマチン免疫沈降シーケンス、RNA シーケンス) を行い、骨芽細胞と軟骨細胞に特徴的な遺伝子発現状態とエピゲノム状態を反映する遺伝子領域 50 箇所程度を、細胞評価用マーカー領域として選定した。さらに、トランスジェニック動物を用いた検証も終了した。

#### 【英文】

(1) Common fundamental technology: We adopted "Recombinant peptide based on human collagen type-I (RCP)" developed by Fujifilm as a scaffolding material with high biocompatibility and  $\beta$ -TCP developed by Olympus Terumo Biomaterial to mimic the structure of bone, meniscus and skin (wound dressing). We built the internal structure that allows cell entry in a short time. By evaluating samples made by a layered modeling method and a dispenser method, we adopted the layered modeling method that shows high availability to materials. We completed the prototype machine of the layered modeling type 3D printer and constructed a technology for creating modeling data. Regarding bone, we provided the prepared scaffold to the University of Tokyo, which is the clinical application destination, and for the meniscus, we provided the prepared scaffold to Osaka University, which is the clinical application destination, and confirmed its effectiveness in miniature pigs experiments.

(2) Bone: In the rat calvarial defect model, the basic specification of the RCP/ $\beta$ -TCP scaffold and the appropriate method to apply *in-vitro*-cultured cells were determined, and in the assessment with larger animals, the appropriate design guidelines for the microstructures of the scaffold was established. Then, as the validation of interaction between (scaffold + growth factor) / cell, the optimal amount of growth factors that can effectively induce bone in MSC was determined *in vitro*. We also confirmed the safety of growth factors *in vivo*. In the validation test for an experimental animal model, the efficacy of a miniature swine bone defect model was confirmed. Finally, bone regeneration using cell-loaded microstructural scaffolds was examined in a large animal model using miniature pigs, and the usefulness of the scaffold and cell-loading were confirmed. Based on these results, consultations with PMDA was done, and the way to the clinical application of this regenerative bone was developed.

(3) Skin: The papillary structure between epidermis and dermis supports to the mechanical strength of skin. The lack of this ultrastructure following wound healing is a risk factor of recurrence of

cutaneous wound. Here we showed that the overlaid structure of RCP beads realized the regeneration of the papillary structure at the bottom of epithelializing tissue as well as the promotion of wound closure. Bacterial infection of wound is the most critical factor to inhibit the progression of healing. We also showed the bacteriostatic action of chitosan in the in vitro and vivo experiment using *Pseudomonas aeruginosa*.

(4) Meniscus: There have been no satisfactory clinical results obtained for the treatment of patients with incurable meniscal tear since any conventional approach of regenerative medicine couldn't artificially reproduce meniscal micro-structure. This research aims to develop a novel tissue engineered meniscus, mimicking the native meniscal micro-structure, with a combination of stem cells and RCP. In the 2016 fiscal year, we have obtained the following results. 1) A 3D structure of RCP-based engineered meniscus has been optimized. 2) The engineered meniscus combined with stem cells was implanted into meniscal defect in miniature pigs, which exhibited a highly chondroprotective effect. 3) The results of mechanical testing suggested the accelerated tissue remodeling especially in stem cell-seeded engineered meniscus. 4) By histological analysis, the implanted tissue showed the progression of new tissue regeneration at 12 weeks post-implantation especially in stem cell-seeded engineered meniscus. As to Safranin O staining, there were no significant differences detected between each group, and thus further follow-up (until 6 months or 1 year post-implantation) should be necessary to observe the remodeling to normal meniscus.

(5) Cartilage: We made scaffold which has optimized RCP crosslinking conditions and has a spatial structure for maintaining cells and is easy to exchange substances with the interior part of the structure using PLLA / RCP composite by 3D printer, and the specification of the scaffold was determined. We confirmed that favorable cartilage could be regenerated in vivo by loading cells matured in vitro. Secondary, as a demonstration of the interaction of the scaffold -growth factor composite/cell, IGF-1 is embedded in the scaffold together with the cell. The method to use growth factor and the administration method of cell cultured in vitro were determined, and the safety was confirmed. Finally, as an investigation of effectiveness by transplantation, animal experiments using rat and Beagle were performed, and the performance of the scaffold and regenerative cartilage was evaluated. As a result, good regenerative cartilage formation was confirmed as in vitro one.

(6) Knee joint: By the behavioral, anatomical and histological evaluation after osteochondral defect creation in the tibia of rat and miniature pig, we confirmed it possible to prepare a defect model. In addition, as a specification examination of scaffold material for composite bone and cartilage, we studied three-dimensional scaffold specifications of cartilage/bone integrate type by applying RCP, RCP/ $\beta$ -TCP composite or RCP/ $\beta$ -TCP complex. Cells cultured and matured in vitro were mounted on the scaffold beforehand. Each tissue maturity was evaluated in vitro.

(7) Evaluation technique for cells: We confirmed that Col1a1 (type I collagen alpha I chain) and Col2a1 (type II collagen alpha II chain) are suitable for bio-marker genes, which represent osteoblast (bone-forming cell) and chondrocyte (cartilage-forming cell) differentiation, respectively. We then generated cells expressing the green fluorescent protein (GFP) gene under the control of a 2.3-kb promoter fragment of the Col1a1 gene or a Sox9 binding element located in the intron 1 of the Col2a1 gene. When the cells were cultured in RCP, GFP expression was detected in differentiation-specific

manners. Thus, we have established imaging methods, which monitor regeneration of bones and cartilages. By genome-scale analyses using the next-generation sequencer, i.e., chromatin immunoprecipitation sequencing and RNA sequencing, we identified about 50 genomic regions that represent osteoblast- or chondrocyte-distinct patterns of gene expression and epigenome. These regions, which have been already verified in transgenic animals, are supposed to work as marker regions in the cell assessment.

### 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 0件、国際誌 0件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. レーザービーム積層造形による軽金属の3Dプリンティングについて、清水透、軽金属学会東海支部平成28年度第一回講演会、名古屋工業大学
2. 金属3Dプリンティング技術の実力と課題について、清水透、塑性加工学会第68回塑性加工技術フォーラム、諏訪
3. 金属3D積層造形装置の開発動向とその軽金属造形への利用、清水透、軽金属学会第101回シンポジウム、早稲田

(4) 特許出願

該当なし