

臓器再生における構造デザインの最近の進歩

*¹東京科学大学工学院機械系人間医療科学技術コース・機械工学コース、

*²東京大学大学院工学系研究科機械工学専攻

古川 克子*^{1,2}, 篠原 誠*²

Katsuko S FURUKAWA, Makoto SHINOHARA



古川 克子



篠原 誠

1. はじめに

細胞の再生能力を引き出しながら臓器を再生させる再生医療研究は、ネズミの背部に移植したヒト外耳の外観がニュースで大々的に取り上げられたことから、1990年代に広く認知されるようになった^{1),2)}。このころから、大学・企業・投資家による多角的な取り組みが始まり、再生医療（組織工学）研究が急激に推進されるようになった。再生医療研究には、細胞、担体（スキャフォールド）、増殖因子と呼ばれる再生医療の3要素（図1）がある²⁾。典型的な再生医療のアプローチとして、目標とする臓器の構造（足場）を生体内分解性の材料で作製し、そこに任意の細胞を播種し、さらに発生の過程または組織治癒の過程で組織・生体内部に存在する因子（成長因子など）を添加して組織形成を促すものである。

最も重要な要素は、細胞であり、細胞を用いないアプローチは組織工学・再生医療の定義からははずれることとなる。近年、幹細胞の基礎生物学に関する研究が進み、その結果として骨髄性幹細胞³⁾、末梢血由来幹細胞⁴⁾、臍帯血由来幹細胞、胎盤由来幹細胞、そして人工多能性幹細胞（iPS細胞）⁵⁾を含む幹細胞による臓器構築技術に期待が寄せられている。幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、骨格筋細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞など多くの臓器を構成する細胞に分化可能な性質、多分化能を有することが報告されてから、幹細胞を用いた組織工学・再生医療研究の今後の展開が期待されている。これらの幹細胞の多分化能に関する証明の

多くは、2次元培養による成果であり、現段階では幹細胞から移植可能な3次元的な構造をもった再生臓器の構築を意味していない。細胞生物学者が発見した最新の幹細胞における知見を利用して、いかに3次元的な構造を有する臓器構築を試みるかが今後の課題となっている。

2. 再生医療へのアプローチ

組織工学・再生医療において、細胞と細胞外マトリックスからなる3次元的な構造と、これにより実現される組織の機能をいかに再現するかが最大の課題であり、様々な培養手法の開発が行われてきた。細胞を培養し増殖させる方法は比較的薄い組織に適しており、例えば心筋、皮膚などのシートや軟骨のペレットなどの再生に関しては臨床治験

再生医学の3要素

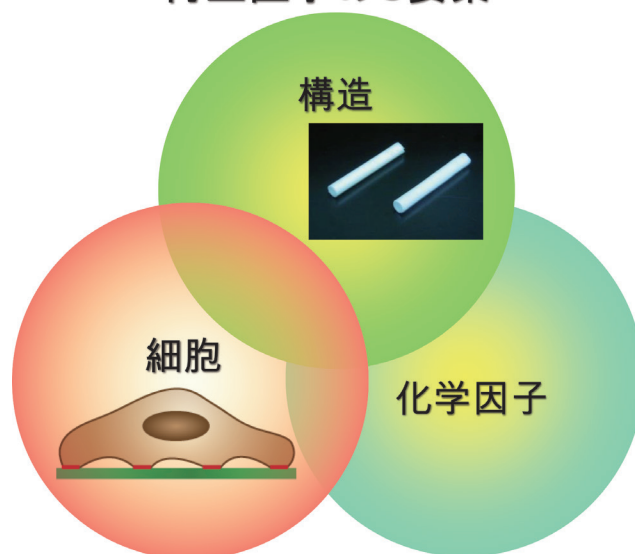


図1 典型的な再生医療のアプローチ

■ 著者連絡先

東京科学大学工学院機械系人間医療科学技術コース・機械工学コース

(〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1-I1-28)

E-mail: furukawa.k.aj@m.titech.ac.jp

表1 造形方法

プロセス	材料	原理	精度	特徴
UV光造形 (stereolithography)	光硬化性樹脂	レーザーによる樹脂の光重合	$>10\mu\text{m}$	高精度
二光子光造形 (Two Photon Stereolithography)	光硬化性樹脂	フェムト秒レーザーを用いた二光子効果による樹脂の光重合	$>0.1\mu\text{m}$	極めて高精度
デジタルライトプロセッシング (DLP)法	光硬化性樹脂	プロジェクター形式による投影	$15\sim100\mu\text{m}$	高速造形が可能
粉末焼結法 (SLS)	セラミックス, 金属, 樹脂	レーザーの熱で焼結	$>100\mu\text{m}$	セラミックス, 金属単体可
バインダー吐出法	粉末一般	粉末にバインダー吐出	$>150\mu\text{m}$	接着できる粉末なら 何でも可。着色容易
溶融物押出法 (FDM)	熱可塑性樹脂, 低融点金属, ガラス	シリンジ内で加熱・溶解した樹脂をノズルから吐出	$>200\mu\text{m}$	材料の混在が可能

DLP, digital light processing; FDM, fused deposition modeling; SLS, selective laser sintering; TPL, two photon stereolithography; UV, ultraviolet.

が行われているモデルもある。しかし、骨などの3次元的な深さのある組織では深部への栄養供給に問題があるため、これに代わって細胞の足場となる3次元担体を用いて培養を行う研究が、ここ数年めざましい進歩を遂げた。担体を用いる再生医療の代表的なアプローチは、次に述べるようなものである。

まず、生体内分解性の樹脂やセラミックスをスポンジ状の構造体に成形し、担体とする。そこに細胞を播種すると領域全体で細胞が増殖して細胞外マトリックスが分泌され、担体形状にあわせて3次元的に細胞が分布するとともに、組織としての機能の再現が進行する。同時に担体が徐々に分解するため、結果として意図した3次元構造が維持されながら、細胞と細胞外マトリックスのみからなる組織が構築される。これまでにスポンジ状の担体による組織の再生^{6),7)}や、セラミック多孔質を用いた骨担体の再生^{8)~10)}が報告されている。しかし、実際に生体に移植するには再生組織の外部形状が患部のそれと同じである必要があり、担体の形状もそれに合ったものでなくてはならない。また、担体の内部は細胞が接着できるような空洞や面が存在する必要がある。これらの担体形状への要請から、最近では、担体の外部および内部の加工技術・制御技術に関する工学技術が多く報告されている。

3. 再生医療と3次元造形技術

近年、ラピッドプロトタイピングや3次元造形などと呼ばれる付加加工技術の発展が著しく、再生医療分野への応用も進んでいる。これまでの切削加工等では、工具が材料と干渉して加工が不可能であったが、付加加工を行うことにより実現できるようになった。また、金型が不要なため、

射出成形を行う樹脂製品と比べて少量生産を行う際のコストが低減される。さらに、設計から生産までの時間が短縮されるため、製品の試作段階における外観や構造の評価などの用途として理想的であり、産業用途での技術開発が行われている。近年、素材選択の自由度や加工精度が改善されると同時に、特許の期限切れによる安価な製品の登場が価格低下を促した結果、これらの技術の普及が急速に進んだ。また、用途も試作にとどまらず、最終製品の加工に利用されるまでになった。

産業用では、加工形状の自由度からジェットエンジンのタービンなどの製造や、小ロット品の加工法としての採用が報道されている。個人向けでは、商品のデータを送付し消費者宅で製造することで、物流・在庫コストの低減が可能であるとされる。また、遠隔地でも製品を得ることができるという利点に関しては、国際宇宙ステーションなどアクセスが難しい場所での適用が特に期待されている。医療向けには、外科手術前に患者本人の臓器や血管のモデルを用意し、手術の練習を行うサービスなどが実用化されている。再生医療においては1点ものの加工が求められていること、付加内部に空孔のある構造が必要とされていることから、これらのラピッドプロトタイピング技術の再生医療への適用が期待されている。

3次元造形法の再生医療分野での利用では、はじめに外傷により欠損した部位に埋める充填剤を加工するための研究が行われた。例えば、歯科や骨欠損部位の充填での例が報告されている。最近では、欠損部位に適合する形状をもつ自家細胞からなる組織を培養するための培養担体の加工法として、様々な手法が研究されている(表1)。例えば、生体内分解性のプラスチックを融点以上の温度で液状化し

てノズルの先端から射出すること（溶融物押出法）によって、3次元構造体を設計できる装置が開発された。また、3次元構造の再現精度を上げるために、層ごとに機械加工した構造体を積層させることによって、臓器の内部構造を再現する手法¹¹⁾も報告された。緻密な構造を具現化するために、粉末化した生体内分解性材料をバインダーなどで積層造形する技術（バインダー吐出法）¹²⁾や、光反応性のポリマーで光造形する技術^{13)~15)}を用いて、構造体をデザインする報告もされている。これらの技術をベースにした臓器の構造体の設計手法は、多くの臓器で着実に構造体を構築する手法として、日々、材料特性、加工精度など複数の側面でも進歩している。最近では、溶融物押出法では、担体内部の酸素不足を補うために、酸素徐放性の物質を材料に含ませた状態で3次元造形することが可能となり、担体内部の細胞の生存率や分化能の制御のための担体設計法が報告されている¹⁶⁾。

3次元造形法の中でも光造形法は、担体の加工法としての期待が大きい。光造形法は目的とする形状データに対して一定間隔の切断面を算出し、一層ごとに光硬化性樹脂に対しレーザを照射、積層することで任意の形状を得る方式である。他の溶融物積層法や粉末焼結法に比べて、光造形法は加工精度、材料の選択自由度で優れているため、高機能な担体の加工に適していると考えられている。

これまで行われてきた光造形による担体加工法の研究により、構造や材料から実現される担体機能に関する成果が報告されている。例えば、実際の担体に求められる空孔の多い構造の再現、microCTでデータ化した骨形状の再現などが試みられており、任意の担体形状・構造の加工が可能となった。また、細胞の成長や分化、組織の再生には化学的な要因も重要であるが、材料への化学因子の添加による促進や、分解速度や物性の異なる材料を用いた担体の細胞増殖に関する研究なども報告されており、材料への化学的な機能の付加研究が進んでいる。

近年、光硬化性以外の材料による複雑形状の設計を実現するために、鋳型を3次元光造形した後に、任意の材料に転写する手法も開発された。この手法によって実現した複雑構造物に、細胞を播種して、組織構築を促すことが可能となっている^{17), 18)}。また、フェムト秒近赤外レーザの普及に伴い、二光子効果を光造形に利用する手法（二光子光造形）が開発され、100 nm程度まで加工が可能になるなど高い精度の3次元造形が実現され^{19), 20)}、光を用いた構造物の再生医療への適用に対する期待が高まっている。

一方、溶融物押出法において、アガロース²¹⁾、アルギン酸²²⁾、脱細胞化マトリックス²³⁾などにシングルセルの状

態の細胞を含ませて造形するアプローチも報告されており、いわゆるプリンターのインクの箇所に細胞やコーラーゲンなどを搭載し、高い空間分解能を有する臓器形成を試みた報告もある。これらは、細胞へのダメージや臓器の機械的な特性など、多くの改善の余地が残されている状況にはあるが、特筆すべき挑戦的な試みといえる。

また、シングルセルが凝集し、直径が100~1,000 μm 程度の塊を形成した細胞凝集塊を、3次元造形に用いる研究も報告されている。押し出しインク法と呼ばれるアガロースなどの物質とともに、細胞凝集塊を3D印刷するタイプ²⁴⁾、ロボットアシストシステムを用いてニードルに細胞凝集塊をポジショニングするタイプ²⁵⁾、細胞凝集塊を吸引式ロボットで移動させ、ハイドロゲルなどのなかにポジショニングさせるタイプ²⁶⁾などの3次元造形システムについても報告された。これらは筒状構造物などの具体的な成果が報告され、優れた方法として注目されているが、直径の大きな細胞凝集塊を用いていることから、構造物の設計精度の向上が課題となっている。

組織の構造を緻密に設計し、そして機能する臓器を再構成するためには、まだ、多くの問題がある。そこで、最近では、臓器から細胞を取り除いて作製した脱細胞化組織によるモデルが注目されている。生体内に移植すると、細胞が脱細胞化組織内部に侵入し、複雑な細胞配置が生体内で再構成される²⁷⁾。脱細胞化組織を用いているため、組織内部のマトリックス構造は、人工的な3次元造形技術を用いて作製したものより生体内の構造に限りなく近く、同一であるといっても過言ではない²⁸⁾。本手法はマウスラットなどの小型動物を用いた報告が多くを占める状況にあり、今後、より大型の動物を使った展開が期待されている。

4. おわりに

本稿では、再生医療における組織の3次元構造の形成法について、最近の動向を紹介した。これらの研究はまだ緒についたばかりで、今後の展開が期待される

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. Science **260**: 920-6, 1993
- 2) Principles of Tissue Engineering (3 edition), ed by Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Academic Press, USA, 2007
- 3) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science **284**: 143-7, 1999
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative

- progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964-7, 1997
- 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-72, 2007
 - 6) Ushida T, Furukawa K, Toita K, et al: Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant* **11**: 489-94, 2002
 - 7) Furukawa KS, Ushida T, Toita K, et al: Hybrid of gel-cultured smooth muscle cells with PLLA sponge as a scaffold towards blood vessel regeneration. *Cell Transplant* **11**: 475-80, 2002
 - 8) Du D, Furukawa K, Ushida T: Oscillatory perfusion seeding and culturing of osteoblast-like cells on porous beta-tricalcium phosphate scaffolds. *J Biomed Mater Res A* **86**: 796-803, 2008
 - 9) Du D, Furukawa KS, Ushida T: Oscillatory perfusion culture of CaP-based tissue engineering bone with and without dexamethasone. *Ann Biomed Eng* **37**: 146-55, 2009
 - 10) Du D, Furukawa KS, Ushida T: 3D culture of osteoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* **102**: 1670-8, 2009
 - 11) Sakai Y, Otsuka S, Hanada Y, et al: A novel poly-lactic acid scaffold that possesses a macroporous structure and a branching/joining three-dimensional flow channel network: Its fabrication and application to perfusion culture of human hepatoma Hep G2 cells. *Mat Sci Eng C* **37**: 379-86, 2004
 - 12) Huang H, Oizumi S, Kojima N, et al: Avidin-biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network. *Biomaterials* **28**: 3815-23, 2007
 - 13) Leclerc E, Furukawa KS, Miyata F, et al: Fabrication of microstructures in photosensitive biodegradable polymers for tissue engineering applications. *Biomaterials* **25**: 4683-90, 2004
 - 14) Schade R, Weiss T, Berg A, et al: Two-photon techniques in tissue engineering. *Int J Artif Organs* **33**: 219-27, 2010
 - 15) Ovsianikov A, Deiwick A, Van Vlierberghe S, et al: Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering. *Biomacromolecules* **12**: 851-8, 2011
 - 16) Pei Z, Montagne K, Namiki A, et al: Printable oxygen-generating biodegradable scaffold for thicker tissue-engineered medical products. *Artif Organs* **48**: 402-7, 2024
 - 17) Du D, Asaoka T, Ushida T, et al: Fabrication and perfusion culture of anatomically shaped artificial bone using stereolithography. *Biofabrication* **6**: 045002, 2014
 - 18) Du D, Asaoka T, Shinohara M, et al: Microstereolithography-Based Fabrication of Anatomically Shaped Beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int* **2015**: 859456, 2015
 - 19) Koroleva A, Gill AA, Ortega I, et al: Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications. *Biofabrication* **4**: 025005, 2012
 - 20) Shinohara M, Ushida T, Furukawa KS: Design and Development of In-Process-Resolution-Tunable Stereolithography System Utilizing Two-Photon Polymerization. *Adv Eng Mater* **26**, 2023
 - 21) Mukundan LM, Rajasekaran R, Das S, et al: Tailoring of agarose hydrogel to modulate its 3D bioprintability and mechanical properties for stem cell mediated bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* **309**: 142795, 2025
 - 22) Negro A, Cherbuin T, Lutolf MP: 3D Inkjet Printing of Complex, Cell-Laden Hydrogel Structures. *Sci Rep* **8**: 17099, 2018
 - 23) Pati F, Jang J, Ha DH, et al: Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* **5**: 3935, 2014
 - 24) Lang M, Chen X, Wang W, et al: Injection system for cellular assembly of 3D bio-tissue engineered constructs. *IEEE Int. Sci Eng*: 291-96, 2012
 - 25) Moldovan NI, Hibino N, Nakayama K: Principles of the Kenzan Method for Robotic Cell Spheroid-Based Three-Dimensional Bioprinting. *Tissue Eng Part B Rev* **23**: 237-44, 2017
 - 26) Dufour A, Gallostra XB, O'Keeffe C et al: Integrating melt electrowriting and inkjet bioprinting for engineering structurally organized articular cartilage. *Biomaterials* **283**: 121405, 2022
 - 27) Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al: Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14**: 213-21, 2008
 - 28) Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, et al: Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. *PLoS One* **9**: e103201, 2014