

## 剣山式を用いた人工臓器の最近の進歩

\*<sup>1</sup>佐賀大学医学部附属再生医学研究センター、

\*<sup>2</sup>佐賀大学医学部胸部・心臓血管外科

YU JUNJIE \*<sup>1</sup>, 伊藤 学\*<sup>2</sup>, 村田 大紀\*<sup>1</sup>, 中山 功一\*<sup>1</sup>

Junjie YU, Manabu ITOH, Daiki MURATA, Koichi NAKAYAMA



YU JUNJIE



伊藤 学

### 1. はじめに

世界的な高齢化と臓器提供の不足により、人工臓器の必要性が高まっている。その結果、関連分野における人工臓器への関心とともに、供給・需要・市場の増加が予想される。人工臓器は使用される素材に応じて分類されるが、本稿では剣山式 (Kenzan method) バイオ3Dプリンティング技術を用いて作製された、細胞のみからなる人工臓器について紹介する。

### 2. 人工臓器開発の技術の現状

臓器は、特定の機能を実行するために特化した機能単位を構造的に形成する組織の集合体で、一部の臓器 (心臓、腎臓、膵臓など) は損傷すると再生しにくくなる。人工臓器とは、その損傷した臓器を機能的に代替・複製・補強するための、人体に埋め込み可能で生体工学的な装置や組織のことである。人工臓器はその作製に使用される素材に応じて、①ポリマーや金属で作られた機械型 (mechanical)、②一部が生体細胞で構成され、残りはポリマーや金属で作られた生体力学型 (biomechanical)、そして、③生体細胞だけでもしくは生分解性ポリマーと構成された生物型 (biological) に分けられる<sup>1)</sup>。機械型と生体力学型は、人体内の故障した臓器を一時的に置換・修復することが可能だが、生物型は、機能不全の臓器を完全に置換・修復することが可能である<sup>1)</sup>。

バイオプリンティングは人工組織・臓器製造 (biofabrication) の1つであり、組織工学 (tissue engineering)

における有望な技術として開発されてきた。患者由来の細胞で生体機能をもつ組織や臓器を人工的に作製する技術が組織工学であり、生体由来材料や生分解性高分子を細胞の足場 (scaffold) として利用することが一般的である。この技術により細胞を空間的に構築することができ、解剖学的に複雑な組織形態を精巧かつ迅速に再現し、血管ネットワークを構築することができる。また、疾患モデリングやハイスループットの薬物スクリーニングを可能にし、従来の組織工学および再生医療戦略の技術的限界を克服する。

過去10年間で、この分野に新しい生体材料とバイオプリンティング技術が登場したことにより、飛躍的な成長を遂げた。世界のバイオプリンティング市場は、2024~2036年の予測で年平均12%の成長率を示しており、2021年、日本からの医療機器 (バイオプリンティングツールを含む) の輸出総額は約87億ドルであった<sup>2)</sup>。

バイオプリンティング技術は一般的に足場を基にした (scaffold-based) 方式と足場なしを基にした (scaffold-free) 方式に分けられる。さらに、scaffold-basedバイオプリンティング技術は押し出し式 (extrusion-based)、光造形法 (stereolithography) などに分けられ、バイオインク (細胞、生体材料および成長因子) に大きく依存している。バイオインクは、プリンティングしようとする細胞を保護する一方で、プリンタのノズルを通過する際にせん断応力 (shear stress) を発生させ、細胞の生存率を低下させるという逆説的な現象を起こす<sup>3)</sup>。また、バイオインクの配合は、特定の粘度特性を示す必要があるため、バイオプリンティング過程の最適化とそれに伴う構造物の機能評価には多くの時間がかかるなど、膨大な作業負荷が伴う。また、細胞足場を生体内へ移植した際には、異物反応、劣化による強度低下および細菌感染時のバイオフィーム形成など、様々な問題が存在し、これらが臨床応用を妨げてきた<sup>4)~6)</sup>。

#### ■ 著者連絡先

佐賀大学医学部附属再生医学研究センター  
(〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1)  
E-mail. junjie81@cc.saga-u.ac.jp

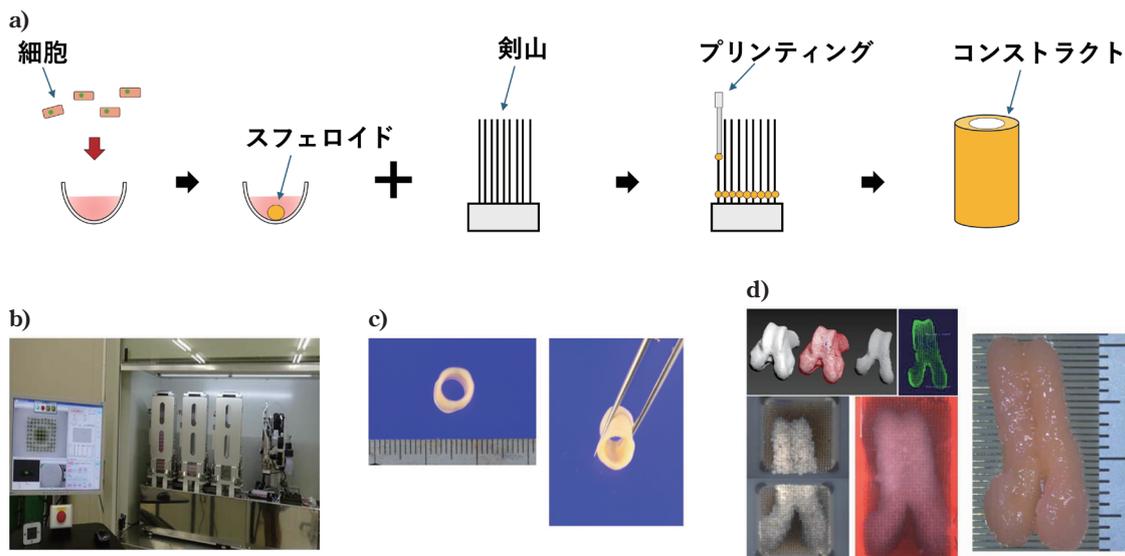


図1 剣山式バイオ3Dプリンティング技術と人工組織構築への応用  
 a: プリント方式の概念図, b: 剣山式バイオ3Dプリンタ<sup>30)</sup>, c: 小口径人工血管<sup>24)</sup>, d: 関節面形状の人工軟骨<sup>30)</sup>

このような問題を解決するために、scaffold-free方式が提案された。例えば、Nakayamaらが開発した剣山式<sup>7)</sup>および、Souzaらが開発したナノ粒子を用いた3D細胞培養法がある<sup>8)</sup>。岡野らが考案した細胞シート工学は、バイオプリンティング技術ではないがscaffold-freeの代表的な技術であり、世界初のfirst-in-human角膜上皮移植や心臓移植など、既に様々な組織再生の臨床実験に応用されている<sup>9), 10)</sup>。

本稿では、剣山を基盤とした「生物型」人工臓器に焦点を絞り、学術論文やニュース、国内外の政府機関の報告書などの情報を基に紹介する。

### 3. 剣山式

剣山式バイオプリンティングはscaffold-free方式であり、scaffold-based方式と比較すると、チューブのような単純な構造しか作れないと思われがちであるが、この技術は曲面のある複雑な構造をもつものであっても作製することができる。そのため、小口径の血管から大きな骨や軟骨組織まで、幅広い組織再生に応用されている(図1)。この技術の特徴は、構造体の基となる細胞凝集塊(スフェロイド)と、凝集塊の空間的な位置取りを規定する剣山状のneedle arrayが使用されることである。スフェロイドは低接着性96ウェルプレートで形成され、バイオ3Dプリンタ「regenova」(Cyfuse)を用いてneedle arrayの針に串刺しの状態となるよう1つ1つ配置される。このプリンティング過程には細胞以外の物質(合成ポリマーやヒドロゲル)は使用されないため、移植後に足場から起こる炎症反応のリスクがない。プリンティング後には、スフェロイド

を構成する細胞由来の細胞外マトリックス(ECM)が分泌され、これが立体的な構造を保持する役割を担う。

### 4. 剣山式を用いた人工臓器の作製

#### 1) 心臓

心疾患は心臓弁膜症や心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈などを含む疾患概念で、国内の心疾患死亡者数は1950年から持続的に増加する傾向にあり<sup>11)</sup>、2022年にわが国の死亡原因の2位を占めた<sup>12)</sup>。心疾患の心筋梗塞とこれにより発生する心不全は、再生できない心筋細胞の消失により発生する疾患である<sup>13)</sup>。2016年の心不全の粗死亡率は10万人当たり100人以上であり、また冠動脈疾患の粗死亡率も10万人当たり100人以上である<sup>11)</sup>。心疾患に対しては、薬物治療法が開発されているにもかかわらず、根本的な治療が難しい。

最も効果的な治療法として知られている心臓移植の場合、ドナーの制限により現実的ではないのが現状である。Yeungらが、ヒト心臓線維芽細胞、人工多能性幹細胞(iPSC)由来心筋細胞、およびヒト臍帯静脈内皮細胞からなるスフェロイドを用いて作製した心臓パッチをヌードラットに移植した結果、梗塞部位の平均血管数の増加、および瘢痕面積の有意な減少が確認され、対照群と比較して、実験群では心機能が改善する傾向が示された<sup>14)</sup>。さらに同様の手法で、Kawaiら、Araiらは拍動するチューブ型心臓様構造体を作製し、今後、先天性心疾患患者や薬物検査などに応用する可能性を示唆した<sup>15), 16)</sup>。

## 2) 肝臓と胆管

肝臓は、解毒、エネルギー代謝、および免疫反応などを担うため、生命維持に欠かすことのできない重要な臓器である。2015年には、日本で約9.5万人がB型・C型肝炎による肝硬変に罹患したと報告されている<sup>17)</sup>。末期の肝疾患に関して現在、肝移植以外に有効な治療法は存在しない。Yanagiらは、ヒト肝細胞、ヒト間葉系幹細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて肝臓様の細胞構造体を作製し、ヌードラットの肝切除部位に異種移植した結果、胆管増殖が構造体の内部に確認されたと報告した<sup>18)</sup>。しかし、移植した細胞は、宿主の肝臓から100  $\mu$ m以内に存在した細胞しか生存していなかったため、細胞構造体の内部には血管網を作製し、必要な血流を移植した細胞に供給する必要がある。

術後胆道狭窄は肝移植における深刻な合併症ではあるが、内視鏡的ステント留置術により治療が可能である<sup>19)</sup>。Hamadaらは、狭窄した胆管を置換する目的で、線維芽細胞のみで構成された管状の構造体を作製してブタに移植した結果、宿主の胆道上皮細胞が構造体の内腔へと遊走することはなかったが、構造体内部への血管新生が観察されたと報告した<sup>20)</sup>。

## 3) 血管

血管疾患には大動脈瘤、大動脈解離、末梢動脈性疾患、および下肢静脈瘤など血管に関連する様々な障害や病気が含まれる<sup>21)</sup>。これらの疾患は心筋梗塞、脳卒中など、心臓や脳に関連する病気を引き起こす可能性がある。現在使用されている人工血管は、Dacron, expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), polyurethane (PU), およびpolyolefin-elastomer-polyester (PEP)などの合成高分子から作られているが、破裂や炎症反応などの副作用が発生し、特に小口径人工血管は閉塞しやすという難題がある<sup>22), 23)</sup>。Itohらはそのような課題を解決すべく、小口径細胞製人工血管を開発した<sup>24)</sup>。免疫不全ブタモデルに移植後、作製した人工血管は自己組織に置換され、長期間血流を維持するなど、有意な結果が示された。またNagaishiらは、剣山式を用いてヒト大動脈平滑筋細胞、ヒト大動脈内皮細胞、およびヒト皮膚線維芽細胞で血管状の動脈の構造体を作製し、動脈硬化症研究用モデルとしての可能性を示唆した<sup>25)</sup>。

## 4) 軟骨・骨軟骨

軟骨には血管、神経およびリンパ管がなく、また、豊富なECM(特にII型コラーゲン)で構成されているため、損傷を受けた際には組織修復を担う細胞や周囲に存在する軟骨細胞の遊走(migration)が非常に制限されるため、自己修復能力に限界がある<sup>26)</sup>。また、軟骨欠損は骨軟骨病変を引き起こし、最終的には変形性関節症に発展する<sup>27)</sup>。

Murataらは、剣山式バイオ3Dプリンタを用いて自己脂肪幹細胞からなる細胞構造体を作製し、ウサギおよびミニブタの骨軟骨欠損孔へと移植することで、骨軟骨の再生に成功したと報告した<sup>28), 29)</sup>。また、Nakamuraらは、iPSC由来の間葉系幹細胞からなる細胞構造体を作製し、軟骨分化誘導を5週間施すことにより、最大6 cm<sup>2</sup>の優れた力学的特性を有した軟骨組織体を作製し、軟骨欠損を早期に再建できることを報告した<sup>30)</sup>。

## 5) 気管

気管は軟骨の輪で構成されており、喉頭と肺をつなぐ形状と機能が臨床的に非常に重要である。気管内挿管に伴う粘膜損傷や気管合併症の発生、さらに甲状腺腫瘍による気管狭窄や気管切除後の欠損が生じるため、気管の再建が必要とされる<sup>31)~33)</sup>。損傷した気管の治療法としては、自家移植片<sup>34)</sup>、同種移植片<sup>35)</sup>、および人工気管がある<sup>36)</sup>。成人では気管全体の長さの約50%、小児では約30%<sup>37)</sup>を除去しても機能は維持できるが、再建が難しい場合は人工臓器移植が必要である。Machinoらは、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト間葉系幹細胞、ヒト膝関節軟骨細胞、およびヒト皮膚線維芽細胞で小口径チューブ型気管を開発し、ラットへの移植後には構造体の内腔に気管上皮細胞が遊走し、構造体の内部には毛細血管が侵入することを報告した<sup>38)</sup>。

## 5. 将来展望

剣山式バイオ3Dプリンティング技術を活用することにより、精巧な人工組織を高い再現性で作製できるため、臓器移植に際したドナー不足の問題を解決する有望な方法であると考えられる。また、前述の人工臓器以外にも、神経再生<sup>39)</sup>、尿管<sup>40)</sup>、および腱<sup>41)</sup>などの分野でも使用されており、他の組織・臓器の作製にもこの技術が応用され始めている。

また、細胞構造体を多層で作製する場合、細胞層間に酸素や栄養分が十分に供給されず移植前に構造体の中心部の細胞が壊死するために、組織再生に必要な数の細胞を十分に供給できないという限界がある。この問題を解決するためには、移植前の時点において細胞構造体の内部に血管を誘導する必要があるが、これにより細胞活性を維持するだけでなく、移植後の宿主組織との生着率を高めることができると考えられる。血管誘導(prevascularization)に関するバイオプリンティングは様々な研究が存在するが、機能的な毛細血管を備えた人工臓器は未成熟な状態である場合が多いため、いまだに解決すべき課題が多く残されている。そこで我々は現在、移植前の細胞構造体に血管新生を誘導するために、動静脈ループ(AV loop)と構造体との境界に血

管床 (vascular bed) を作製する試みを実施している。

## 6. おわりに

剣山式バイオ3Dプリンティング技術は、細胞構造体の長さや厚さを自由に調整することができ、チューブやパッチ、および複雑な形状のものも作製することが可能である。また、患者自身の細胞を利用することで、患者オーダーメイドの臓器を作製することもできる。理論的には、患者自身の幹細胞を使用すれば、免疫拒絶反応を惹起することなく、人体のあらゆる臓器を作製することができる。そのため、このような技術の普及と発展により、我々の老化や病気による身体的限界を克服し、身体能力を強化することで、歴史学者ユヴァル・ノア・ハラリの著書に描かれている「神になる人間」が実現する日も、そう遠くないかもしれない。

## 利益相反の開示

中山 功一：【役員・顧問職】株式会社アルクタス社外取締役、  
【株】株式会社アルクタス、株式会社サイフューズ  
創業者株  
そのほかの著者には規定されたCOIはない。

## 文 献

- 1) Wang X: Bioartificial Organ Manufacturing Technologies. *Cell Transplant* **28**: 5-17, 2019
- 2) SDKI (渋谷データカウント) : 3Dバイオプリンティング市場調査レポート、規模とシェア、成長機会、およびトレンド洞察分析—コンポーネント別、技術別、アプリケーション別、エンドユーザー別、および地域別—世界予測2024 - 2036年. <https://www.sdki.jp/reports/3d-bioprinting-market/61865> Accessed 26 July 2024
- 3) Boularou S, Al Hussein G, Khan K. A, et al: An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting* **20**: e00093, 2020
- 4) Elalouf A: Immune response against the biomaterials used in 3D bioprinting of organs. *Transpl Immunol* **69**: 101446, 2021
- 5) Turnbull G, Clarke J, Picard F, et al: 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater* **3**: 278-314, 2017
- 6) Kuijjer R, Jansen EJ, Emans PJ, et al: Assessing infection risk in implanted tissue-engineered devices. *Biomaterials* **28**: 5148-54, 2007
- 7) Murata D, Arai K, Nakayama K: Scaffold-Free Bio-3D Printing Using Spheroids as "Bio-Inks" for Tissue (Re-) Construction and Drug Response Tests. *Adv Healthc Mater* **9**: e1901831, 2020
- 8) Souza GR, Molina JR, Raphael RM, et al: Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* **5**: 291-6, 2010
- 9) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) : iPS細胞

から作製した角膜上皮を4人の患者に移植する世界初の臨床研究が完了. <https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20220422-03.html> Accessed 26 July 2024

- 10) 大阪大学大学院医学系研究科・医学部 : iPS細胞から作製した心筋細胞シートの医師主導治験の実施～治験計画前半の移植実施報告～. <https://www.med.osaka-u.ac.jp/archives/24240> Accessed 27 July 2024
- 11) 久松隆史, 三浦克之 : わが国における心疾患の死亡率・罹患率の動向. *日循予防誌* **53**: 1-8, 2018
- 12) 厚生労働省 : 令和4年(2022)人口動態統計月報年計(概数)の概況. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai22/dl/gaikyouR4.pdf> Accessed 30 October 2024
- 13) 日本心臓財団 : 心筋梗塞, 虚血性心不全とは. <https://www.jhf.or.jp/check/opinion/category/c4-2/> Accessed 19 September 2024
- 14) Yeung E, Fukunishi T, Bai Y, et al: Cardiac regeneration using human-induced pluripotent stem cell-derived biomaterial-free 3D-bioprinted cardiac patch in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* **13**: 2031-9, 2019
- 15) Kawai Y, Tohyama S, Arai K, et al: Scaffold-Free Tubular Engineered Heart Tissue From Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Bio-3D Printing Technology in vivo. *Front Cardiovasc Med* **8**: 806215, 2022
- 16) Arai K, Murata D, Takao S, et al: Drug response analysis for scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printer. *Sci Rep* **10**: 8972, 2020
- 17) 日本肝臓学会 : 肝がん白書 令和4年度. [https://www.jsh.or.jp/lib/files/medical/guidelines/jsh\\_guidlines/liver-cancer\\_2022.pdf](https://www.jsh.or.jp/lib/files/medical/guidelines/jsh_guidlines/liver-cancer_2022.pdf) Accessed 27 July 2024
- 18) Yanagi Y, Nakayama K, Taguchi T, et al: In vivo and ex vivo methods of growing a liver bud through tissue connection. *Sci Rep* **7**: 14085, 2017
- 19) Morelli J, Mulcahy HE, Willner IR, et al: Long-term outcomes for patients with post-liver transplant anastomotic biliary strictures treated by endoscopic stent placement. *Gastrointest Endosc* **58**: 374-9, 2003
- 20) Hamada T, Nakamura A, Soyama A, et al: Bile duct reconstruction using scaffold-free tubular constructs created by Bio-3D printer. *Regen Ther* **16**: 81-9, 2021
- 21) 日本心臓財団 : 動脈・静脈疾患(動脈瘤, 静脈瘤, 動脈解瘤). [https://www.jhf.or.jp/topics/cat\\_cat14/](https://www.jhf.or.jp/topics/cat_cat14/) Accessed 29 July 2024
- 22) 馬場 健, 金岡祐司, 大木隆生 : 人工血管の現状と最近の進歩. *人工臓器* **44**: 146-51, 2015
- 23) 片平晋太郎, 齋木佳克 : 人工血管—最近の進歩. *人工臓器* **51**: 136-40, 2022
- 24) Itoh M, Mukae Y, Kitsuka T, et al: Development of an immunodeficient pig model allowing long-term accommodation of artificial human vascular tubes. *Nat Commun* **10**: 2244, 2019
- 25) Nagaishi Y, Murata D, Yoshizato H, et al: Scaffold-free human vascular calcification model using a bio-three-dimensional printer. *Biofabrication* **15**, 2023
- 26) Bhosale AM, Richardson JB: Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* **87**: 77-95, 2008
- 27) Murata D, Fujimoto R, Nakayama K: Osteochondral Regeneration Using Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* **21**: 3589, 2020

- 28) Murata D, Kunitomi Y, Harada K, et al: Osteochondral regeneration using scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells made by a bio three-dimensional printer with a needle-array in rabbits. *Regen Ther* **15**: 77-89, 2020
- 29) Yamasaki A, Kunitomi Y, Murata D, et al: Osteochondral regeneration using constructs of mesenchymal stem cells made by bio three-dimensional printing in mini-pigs. *J Orthop Res* **37**: 1398-408, 2019
- 30) Nakamura A, Murata D, Fujimoto R, et al: Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration. *Biofabrication* **13**, 2021
- 31) 部坂弘彦, 太田史一, 松井真人, 他: 気管内挿管による喉頭, 気管合併症. *耳鼻展望* **40**: 62-70, 1997
- 32) 白崎加純, 宮本颯真, 後藤正博, 他: 良性の甲状腺腫瘍による気道狭窄で緊急気道確保を要した2症例. *日救急医学会誌* **33**: 940-5, 2022
- 33) Kanazawa Y, Takeuchi M, Tateya I, et al: Clinical epidemiology of tracheal invasion from thyroid cancer in Japanese population: Functional outcomes and effect of aging. *Cancer Epidemiol* **50**: 107-12, 2017
- 34) Fabre D, Kolb F, Fadel E, et al: Successful tracheal replacement in humans using autologous tissues: an 8-year experience. *Ann Thorac Surg* **96**: 1146-55, 2013
- 35) 中西良一, 白日高歩: 同種気管移植 —手術手技について—. *産業医科大学雑誌* **13**: 47-51, 1991
- 36) 華岡 肇, 窪田哲昭, 門倉義幸: コラーゲン人工気管再建における線毛上皮の再生に関する研究. *昭和医学会誌* **63**: 222-30, 2003
- 37) Grillo HC: Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg* **73**: 1995-2004, 2002
- 38) Machino R, Matsumoto K, Taniguchi D, et al: Replacement of Rat Tracheas by Layered, Trachea-Like, Scaffold-Free Structures of Human Cells Using a Bio-3D Printing System. *Adv Healthc Mater* **8**: e1800983, 2019
- 39) Mitsuzawa S, Ikeguchi R, Aoyama T, et al: The Efficacy of a Scaffold-free Bio 3D Conduit Developed from Autologous Dermal Fibroblasts on Peripheral Nerve Regeneration in a Canine Ulnar Nerve Injury Model: A Preclinical Proof-of-Concept Study. *Cell Transplant* **28**: 1231-41, 2019
- 40) Takagi K, Matsumoto K, Taniguchi D, et al: Regeneration of the ureter using a scaffold-free live-cell structure created with the bio-three-dimensional printing technique. *Acta Biomater* **165**: 102-10, 2023
- 41) Nakanishi Y, Okada T, Takeuchi N, et al: Histological evaluation of tendon formation using a scaffold-free three-dimensional-bioprinted construct of human dermal fibroblasts under in vitro static tensile culture. *Regen Ther* **11**: 47-55, 2019