

平成27年5月10日

平成26年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：佐賀大学大学院工学研究科

職名：教授

氏名：中山 功一

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

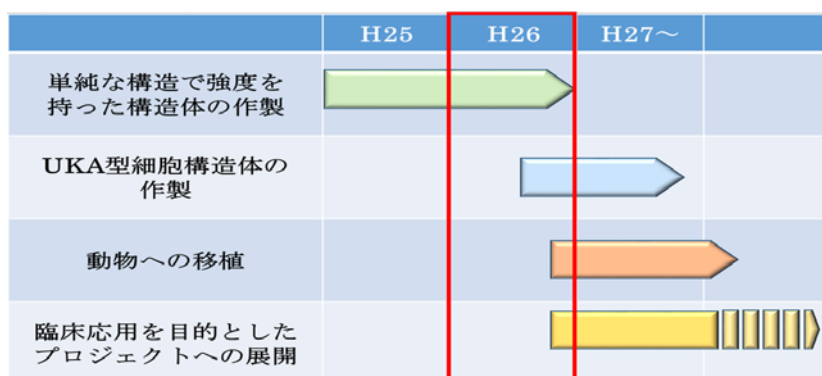
記

1. 研究課題：大型細胞構造体作製を目指した、構造体内部細胞動態の解析
2. 再生医科学研究所共同研究者： 戸口田 淳也 教授
3. 研究期間：平成26年4月1日～平成27年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

我々は細胞だけで大型立体構造体を作成するバイオ3Dプリンタを開発している。将来的に実質臓器の再生を目指すうえで、構造体内部に毛細血管網を内包する必要がある、構造体内部の細胞動態を明らかにし、どのような細胞を3次的に配置するか検討する必要があると考えられる。本共同研究では、iPS細胞から分化誘導した各種細胞を用い、細胞種の組合せとデザインマップ上での配置を反映した細胞構造体を作製し細胞動態について解析を行うことを目標とした。

図1 ロードマップ

本年度は、iPS由来NC細胞を用いて、移植可能な強度を持った人工関節様大型構造体の作製を目指し条件検討を行った。(図1)



① 構造体作製方法の最適化と至適培養条件の検討

iPS 細胞から分化誘導した各種細胞を用いて構造体の作製を行う。また、構造体の至適培養条件（細胞配置・培養装置等）の探索を行う。

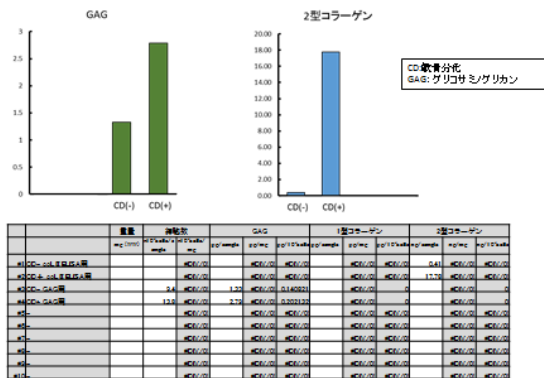
iPS 細胞からの軟骨分化確認

佐賀大学での人工関節様大型細胞構造体作製に着手するため、細胞構造体作製のための細胞ソースとなる iPS 細胞の軟骨分化誘導確認を行った。

軟骨分化確認は、ELISA を用いた。2～3 週間の分化誘導で軟骨細胞に多く発現する GAG(グリコサミノグリカン)と 2 型コラーゲンの発現の増加が確認出来た。(図 2)

図 2 軟骨分化確認

軟骨分化確認:ペレット培養での軟骨分化 day14の結果



軟骨分化確認:ペレット培養での軟骨分化 day21の結果



iPS 細胞分化誘導軟骨細胞を用いた構造体作製方法の検討

我々は、細胞凝集作用を利用したスフェロイドを用い、細胞構造体作製を行っている。この手技を用いて構造体を作製するため、以下の条件で軟骨分化誘導培地の添加後、作製構造体の状態確認を行った。

Control:軟骨分化培地添加ナシ

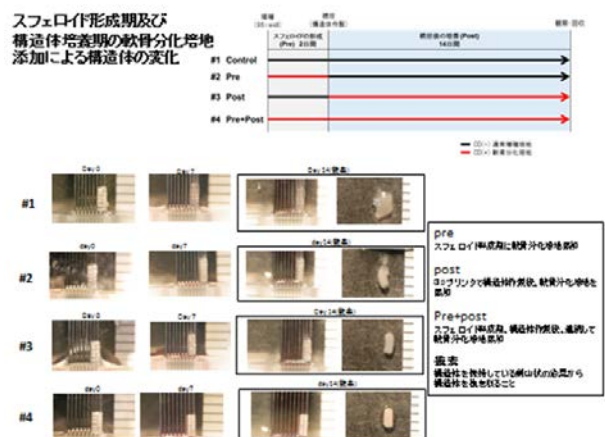
Pre:スフェロイド形成期に軟骨分化培地添加

Post:バイオ 3D プリンタで構造体作製後、軟骨分化培地添加。

Pre+Post:スフェロイド形成期、構造体作製後、連続して軟骨分化培地添加

軟骨分化培地添加を行わなかった構造体は、強度が不足し形状を維持することが出来なかった。また、スフェロイド形成期から、軟骨分化培地の添加を行った構造体は、無添加の構造体に比べて強度の増強は見られたが、内部の融合が不十分な印象であった。そこで、構造体作製後に分化を行うこととした。(図 3)

図 3 作製構造体の分化の検討



② 構造体の品質と細胞動態の解析

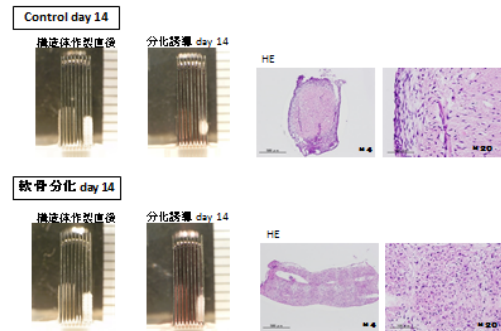
作製構造体の品質を解析するため、組織学的な評価を行った。

作製構造体の内部細胞状態の確認

軟骨分化を行わなかった構造体内部の細胞配置は不均等であり、構造体全体に細胞が存在していなかった。これに対して、軟骨分化を行った構造体では比較的構造体内部に細胞が満たされていた。(図4)

今後、移植可能な強度を持つ大型の構造体を作製するためには、構造体内部の細胞配置を均一にすることが必要と考えられるため、この結果をもとに、構造体デザインと培養条件の再検討を継続して行っている。

図4 作製構造体の組織学的評価



5. 研究成果の公表

本年度は、研究成果の公表は行わず、さらなる条件検討と解析を進め、公表を行う予定としている。