

## 調査報告 (12)

### 膀胱

(担当：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 白柳慶之)

#### 1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

重度の臓器障害に対しての根治療法として臓器移植が現在広く受け入れられてきているが、ドナー不足や移植免疫など多くの問題を抱えているのが現状である。近年、それらの問題を解決すべく再生医工学の分野に力が注がれている。腎泌尿器系の臓器も例外ではなく、とりわけ膀胱の再生は比較的研究も進んでいるので、以下に紹介する。

膀胱の機能は、低圧で多量の尿を貯留し、必要に応じてこれを排出し膀胱を空にすることである。しかし、膀胱壁の繊維化、膀胱の異常収縮、膀胱を支配する神経の機能不全は低コンプライアンス、高圧の膀胱の原因となる。膀胱機能異常を来す疾患としては、先天性疾患（後部尿道弁、膀胱外反症、尿道上裂）、外傷（損傷、頻回の膀胱内操作）、炎症（慢性膀胱炎、間質性膀胱炎、膀胱結核）、放射線障害、機能的拘縮（神経因性膀胱、特発性不安定膀胱）などがある。そしてこれらの疾患を原因として尿路感染症、尿失禁、腎障害、腎不全などを引き起こす。

現在のところ、膀胱の再建には自己の腸管を使う方法が一般的である。しかし、感染症、結石の形成、代謝異常、癌の発生など未解決の問題を多く抱えている。これまでに、腸管以外の自己組織（皮膚、腹膜、筋膜、脳硬膜、大網）や合成ポリマー（シリコン、ポリビニル、テフロン）など多くの材料が膀胱再建に用いられてきた<sup>1)</sup>。しかし、これらの試みは機械的、構造的、あるいは生物学的適合性の問題により失敗に終わっている。したがって、細胞や組織を用いた膀胱の再生は、新たな膀胱再建の

方法として近年急速に研究が進んでいる分野の一つである。

#### 2 細胞、組織ソース

自己の臓器や人工物を用いた膀胱再建の基礎的な研究は1970年代をピークに下火になっていた。1993年、R. LangerとJP. VacantiがTissue Engineeringの概念を提唱し<sup>2)</sup>再び研究が盛んになった。現在、膀胱の再生は主に3つの方法で研究が進められている。すなわち、1) 小腸粘膜下組織 (small intestinal submucosa; SIS) を用いる方法<sup>3)</sup>、2) 無細胞性膀胱マトリックス (bladder acellular matrix allograft; BAMA) を用いる方法<sup>4)</sup>、3) 生体内で吸収されるポリマーの足場 (scaffold) に細胞を撒く方法<sup>5)</sup>がある。SISはブタの小腸内腔から粘膜を、外壁から漿膜と筋層を取り除いて作製されており、無細胞でコラーゲンに富んでいる。ヒトに移植をするときはXenograftとなる。BAMAは機械的あるいは化学的に膀胱組織から細胞成分を取り除くことにより作製される。ヒトに移植するときはヒトの膀胱からBAMAを作製し、Allograftとなる。細胞を撒いた足場によって膀胱を再生する場合は、自己の膀胱から上皮細胞と平滑筋細胞を分離し、*in vitro*で培養し増殖させ、これを膀胱の形をした足場に撒くといった方法をとる。以下、表1にまとめる。

表1

SIS: small intestinal submucosa	ブタの小腸	異種移植
BAMA: Bladder acellular matrix graft	同種の膀胱	同種移植
Biodegradable scaffold + cells	生体吸収性のポリマー + 自己の膀胱から採取した細胞	自家移植

### 3 培養・移植法

SISはブタの小腸組織から回収される。小腸組織から粘膜層、漿膜層、平滑筋層を機械的に除去する。その結果、コラーゲン成分に富んだ粘膜下層が約0.1mmの厚さで回収できる。すでにSISはCook Biotechnology社よりSurgisis™として市販されており、膀胱再建以外に大動脈、大静脈、心臓、靭帯、皮膚などの再生に利用されている<sup>6)</sup>。BAMAは膀胱組織から機械的あるいは化学的に細胞成分を取り除くことによって作製される。すでにラット、イヌ、ブタなどの動物実験モデルにて、30-75%の膀胱部分切除を行い、これをSISやBAMAで置き換えると粘膜、漿膜、平滑筋層の3層すべてが再生した<sup>3), 4), 7), 8)</sup>。

生体吸収性の足場に自己の膀胱細胞を播種して膀胱を再生する方法では、やく1cm<sup>2</sup>の膀胱生検検体から分離した膀胱の上皮細胞と平滑筋細胞を*in vitro*で培養し増殖させる。次にこれらの細胞を膀胱の形をしたポリマー(polyglycolic acid; PGA)上に播種した後、宿主ですでに膀胱三角部以外を切除したイヌに再度移植する。移植後11ヶ月までに、移植された新膀胱は尿を貯留するための正常の容量とコンプライアンス、宿主由来の神経組織の増生、そして正常な組織学的構造を有していた<sup>9)</sup>。

### 4 今後の課題

いずれの方法も動物実験において

は良好な成績を収めているが、未だ臨床応用例の報告は公にされていない。実際、SISはブタの小腸組織を使用しており、異種からの組織移植となるためその安全性の確立にはまだ時間がかかるものと思われる。BAMAは同種移植になるが、臨床応用されても多臓器と同様にドナー不足となる可能性が高い。生体吸収性の足場に細胞を播種する方法は、その手技や行程が複雑であり、また病的な膀胱の細胞が十分量増殖しかつ、生体に移植されたときに新膀胱として正常に作用するかどうかはいっさい検討されていないため、臨床での成功には今しばらく時間がかかるものと思われる。

### 6 参考文献

1. Kim BS, Mooney DJ, Atala A: Genitourinary system. in: Lanza RP, Langer R, Vacanti JP, editor. Principles of tissue engineering second edition. San Diego: Academic Press: 655-667, 2000
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.*; 260:920-926, 1993.
3. Kropp BP, Rippey MK, Badyrak SF, et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long term canine bladder augmentation. *J Urol.*; 155:2098-2104, 1996.
4. Piechota HJ, Dahms SE, Probst

- M, Gleason CA, Nunes LS, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. *Br J Urol.* ;81: 548-559, 1998.
5. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. *De novo* reconstruction of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol.* ;17:149-155, 1999.
6. Park KD, Kwon IK, Kim YH. Tissue engineering of urinary organs. *Yonsei Med J.* ;41(6):780-788, 2000
7. Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *Br J Urol.* ; 85: 362-371, 2000
8. Reddy RP, Barrieras DJ, Wilson G, Bagli DJ, et al. Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allograft in porcine model. *J Urol.* ;164: 936-941, 2000

## 調査報告（13）

### 角膜

東京歯科大学市川総合病院眼科講師

熊本大学医学部眼科学教室教授

東京歯科大学市川総合病院角膜センター長

榛村 重人

谷原 秀信

篠崎 尚史

#### 1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

角膜移植を必要とし、待機中の患者数は日本国内だけでも推定で2万2千人はいるとされている。死後提供を必要とする角膜の絶対数は足りなく、国内では年間1700例前後の角膜移植件数で横這いである。これらの患者とはまた別に、スティーブンスジョンソン症候群、眼類天疱瘡や角膜化学傷・熱傷に罹患し、通常の角膜移植が禁忌とされてきた患者も存在する。正確な症例数は把握し切れていないものの、これらの疾患は、角膜上皮細胞のステムセルが枯渇していることが最大の問題点である。角膜上皮ステムセルの分離同定、あるいは臍帯血細胞、ES細胞などから角膜細胞の分化誘導が可能となれば、ドナー不足を解消できると同時に、ステムセル移植を必要とする患者を救済する道が開ける。日本国内の失明者（約20 50万人）の救済に大きく貢献できるとともに、再就職や身障者に対する社会負担を軽減することが可能となる。

#### 2 細胞ソース

角膜上皮細胞は5 6層よりなる重層扁平上皮であり、最表層のsuperficial cellsは細胞間のtight junctionが緻密で外界とのバリアーとして機能している。最下層は円柱形をした基底細胞が一層見られる。基底細胞にはtransient amplifying cell (TAC)が含まれており、有限回数の分裂をしながらsuperficial layerまで移動する。最終的に最表層の細胞が脱落するまでのturn overは、約7日間とされている。Basal cellが細胞分裂できる回数は限られているが、角膜上皮細胞を恒常的に供給するstem cellの存在が明らかとなり、解剖学的に角膜を囲む輪部に存在することがほぼ確実となった。

スティーブンスジョンソン症候群など輪部機能不全を伴う疾患の角膜を再構築するには、輪部に含まれるstem cellを移植する必要がある。KenyonとTseng<sup>1</sup>らは片眼性の輪部機能不全に対して、健眼からの輪部移植を最初に報告した。角膜上皮を供給するためには輪部全周は必要なく、健眼から一部を移植するだけで角膜上皮の構築ができることが証明された。その後、嚴重な免疫抑制を条件に、両眼性病変に対して輪部のアロ移植が行われるようになった。現在でも皮膚化した眼球表面の再構築は難しいが、涙液機能や眼瞼形態が比較的温存されている症例に対してはアロの輪部移植で約50%の成績で角膜上皮の再構築に成功している<sup>2</sup>。これは手術が不可能であったときと比べると、飛躍的な進歩である。

一方で、胎盤組織由来の羊膜を眼球表面の再構築に用いるようにあってから、治療成績は向上した。今世紀初頭では胎盤組織の羊膜を熱傷の治療に利用した報告があり、眼科の領域でも結膜の癒痕に使われていた記録が残っている。しかし、近年また基底膜の代替組織として羊膜を利用する手技がKimとTseng<sup>3</sup>らによって報告された。羊膜には厚い基底膜があり、I V型、V型コラーゲンとラミニンを豊富に含むため、上皮細胞の接着や遊走に適している。角膜上皮がなかなか修復しない遷延性上皮欠損に対して、羊膜移植によって上皮化を促進させることが可能である。これは、基底膜の環境さえ整えれば輪部機能が残っている症例で上皮化が得られることを示している。上皮化促進効果に加え、羊膜を代理基底膜として用いることでケラチンなどの角膜上皮固有の遺伝子が正常に分化することや、抗炎症効果も証明されている<sup>4</sup>。羊膜の主な機能で、以下のものが報告されている：

- 1) 新生血管抑制作用
- 2) 低免疫原性
- 3) 抗炎症効果
- 4) 上皮細胞の接着亢進
- 5) 増殖組織の癒痕化の抑制

現状を整理すると、角膜再生を実現するにはまず、代替基底膜と細胞という、二つのリソースを必要とする。まず、基底膜として想定されるものは、(1) 帝王切開時に提供していただく羊膜と、(2) バイオポリマーを用いた人工基底膜が挙げられる。また、角膜再生に用いる細胞ソースとして考えられるのは、(1) ドナーより分離した上皮、および内皮とそのステムセル、(2) 本人、および親族より分離した上皮ステムセル、(3) ES細胞を分化誘導させた上皮、および内皮。(1) および(2) についてはすでに臨床実績があるため、今後はステムセルの分離培養が目標となる。

### 3 単離・培養・増殖法

角膜上皮と内皮のステムセルを単離する試みは、今のところ成功していない。組織内の局在を示唆する報告はなされているため、分離培養の実現は数年中には可能となるのと予想される。すでに上皮ステムセルを含む輪部組織を組織培養し、羊膜をキャリアーとして組織移植する技術は確立されつつある<sup>5,6</sup>。内皮は現状では、ドナー角膜を移植するほか手段はない。羊膜を医療材料として提供する技術が確立されれば、培養上皮シートの安定供給も可能となる。

### 4 治療・移植法あるいは使用法

分離培養された上皮ステムセルは、羊膜あるいは合成ポリマーをキャリアーにして、角膜上に移植することは技術的に容易であると予想される<sup>6</sup>。一方で、内皮については、角膜裏面に生着させる必要があるため、組織糊や分子化学的な接着技術を確立する必要がある。角膜内皮細胞は単層構造のため、細胞シートの形で分離培養ができれば、本来内皮が備えているポンプ機能の静水圧を利用して接着を試みることも可能である。

### 5 今後の課題

羊膜を基質として用いた培養上皮移植は、ステムセルを用いた角膜再生の第一歩であることは間違いない。だが、角膜の構造は実質と内皮を含む三層構造であり、最終的に角膜を再生するには各層の再構築も必要となる。現在は実質を作成するための素材開発や実質細胞の colonization についての研究が盛んに行われている<sup>7</sup>。天然ポリマーに期待される機能は、恒久的な移植に使える人工角膜の実質としてのほか、いずれ吸収される一時的な補填剤としても期待されている。用いられるポリマーや架橋剤の開発によって、いずれも実現可能と思われる。

角膜上皮については、すでにステムセルに特異的なマーカーとされる分子が報告された<sup>8,9</sup>。もっとも難題となるのは、ヒトでは増殖能があまりないとされている角膜内皮細胞の分離とセルライン化であろう。今後は各細胞層のステムセルを分離同定する作業と、embryonic stem cell (ES細胞) から分化誘導する研究は同時に進行すると予想される。そして遺伝子導入技術で免疫回避など、組織適合性が向上すれば近い将来に人工角膜による角膜再生は実現する可能性はある。

### 参考文献

- 1.Kenyon KR, Tseng SC: Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989 96: 709-22
- 2.Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al.: Stem cell transplantation of corneal epithelium for the treatment of severe ocular surface disorders. *New Eng J Med* 1999 340: 1697-1703
- 3.Kim JC, Tseng SCG: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995 14: 472-484
- 4.Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20:408-13.

5. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19(1):65-71.
6. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotomoto C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2001;119(2):298-300.
7. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343(2):86-93.
8. Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999;286(5447):2169-72.
9. Sun L, Sun TT, Lavker RM: CLED: a calcium-linked protein associated with early epithelial differentiation. *Exp Cell Res* 2000 259: 96-106.
10. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al.: p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 98: 3156-61.

## 調査報告（14）

### 網膜

東京歯科大学市川総合病院眼科講師

熊本大学医学部眼科学教室教授

東京歯科大学市川総合病院角膜センター長

榛村 重人

谷原 秀信

篠崎 尚史

#### 1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

我が国における失明の主要な原因は、糖尿病網膜症、緑内障、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症などであるが、これらの共通点は、網膜神経細胞の細胞死と軸索障害により、視覚受容の神経回路網が破綻することにある。したがって、網膜再生医療は、現在治療の施しようのない失明性眼疾患に対する根本的治療法になりうる概念であり、その臨床応用が期待されている。網膜再生現象が注目されたのは、1960年代に発表された一連の初期胎生期網膜再生現象の報告によるが、成熟動物においてこのような現象は認められていない。破綻した視覚神経回路網を再建するために、一つの可能性として、人工網膜の開発が試みられているが、まだ有効な治療手段として確立されておらず、研究が進められている。こういった状況の中で、幹細胞生物学の発展により神経幹細胞や胚性幹細胞（ES細胞）を網膜神経細胞に分化誘導できることが報告されている。さらに、眼科手術法と移植再生医療技術の進歩に伴い、網膜組織に対する組織移植や細胞移植が一部で臨床応用されている。そこで、これらをさらに発展させた形での臨床応用可能な網膜移植再生医療が期待されるようになった。

#### 1 細胞ソース

Gourasら<sup>1</sup>が、ラット眼網膜下に胎児網膜細胞を移植することで、網膜再生の可能性を示した。その後、網膜移植については、神経網膜移植再生と網膜色素上皮移植があるが、それぞれについて既にいくつかの臨床研究が報告されている。神経網膜再生については、現在のところ有効な治療手段が確立されていない失明性疾患であることから、網膜色素変性症が主たる対象疾患とみなされているが、理論的にはすべての失明

性眼疾患が対象と考えられる。神経再生における臨床研究としては、Kaplanら<sup>2</sup>が、死体眼から視細胞層をシート状に摘出して、実際の失明眼網膜下に移植するという臨床実験を遂行し、その後、Humayun, de Juanら<sup>3</sup>が眼疾患を有する患者に同様に網膜視細胞の移植実験を行った。他方、網膜色素上皮再生に関する臨床研究としては、加齢黄斑変性における網膜色素上皮障害が視覚障害に関連するため、これを補うために色素上皮移植が考案された。その臨床研究としては、加齢黄斑変性症患者に対するPeymanら<sup>4</sup>の網膜色素上皮移植、Abeら<sup>5</sup>（東北大）の自家虹彩色素上皮細胞移植などの報告があるが、これらは直接的に神経網膜を再生するものではなく、その意味はあくまでも加齢黄斑変性などで生じる網膜色素上皮障害を修復することとどまる。

これまでの網膜移植再生医療の臨床的な試みの結果においては、(1)免疫学的拒絶反応による問題が存在すること、(2)移植されるべき細胞資源の確立に問題がある、(3)安全で確実な臨床応用の手法が確立されていない、(4)機能的神経回路網に移植細胞が組み込まれて、臨床的に視機能改善を得たことが証明できていない、などの根本的な問題を抱えていることが示されたことになる。

上記のように、神経再生としての網膜再生細胞ソースには、道義的・倫理面での問題と供給の安定性から、かなりの制限が生じると推定される。そこで、臨床応用可能な形で、より道義的問題が少ない安定した細胞ソースの開発が不可欠である。高橋ら<sup>6</sup>（京都大）は、動物実験としては、ラット脳海馬由来神経幹細胞を幼弱ラット眼硝子体内へ注入することで、移植された神経幹細胞が網膜内へ侵入生着して、神経分化することを報告した。さらに成獣ラット眼に

についても、通常の状態では網膜内に移植することができないが、機械的創口を網膜に作成することで、ラット脳海馬由来神経幹細胞を移植・神経分化できることを報告した<sup>7</sup>。これらの実験結果は、神経幹細胞が、周囲の環境に適合して分化することを示している。さらに最近、毛様体色素上皮には神経幹細胞が存在することが報告されたことで、網膜再生医療にとって大きな知見と考えられた<sup>8</sup>。さらに高橋らは、ほ乳類の虹彩にも、神経細胞になりうる細胞群が存在することを証明されており、Crx遺伝子を操作することで、これらの虹彩由来細胞を視細胞様の表現形を獲得できることを証明した<sup>9</sup>。また、サルES細胞を用いて、ドパミン性ニューロンや色素上皮細胞に分化誘導できることを報告しており、これらが新しい細胞ソースとして注目されている<sup>10</sup>。また、骨髄間質細胞が形質転換により、神経細胞に分化誘導できることも注目されている。

現状を整理すると、網膜再生に関する細胞ソースとして考えられるのは、(1) 網膜から分離採取した視細胞シートや網膜神経細胞、(2) 遺伝子操作などで分化誘導されたES細胞、(3) 虹彩由来の神経幹細胞、(4) 毛様体由来の神経幹細胞、(5) 骨髄間質細胞などが挙げられる。このうち、(2) は無尽蔵な細胞資源として有望であり、近日本邦においてヒトES細胞が樹立された時点での大きな進歩が期待される。(3) (4) (5) は自家細胞を採取することが可能であり、免疫や倫理的問題を回避できるために、近い将来での臨床応用に期待される。

### 3 単離・培養・増殖法

既に毛様体色素上皮細胞と虹彩組織から、多様な網膜神経細胞に分化可能な神経幹(前駆)細胞が存在することが報告されている。虹彩組織と毛様体組織を採取するにあたっては、従来の緑内障手術で既に一般的な手術として行われている虹彩切除術もしくは線維柱帯切除術の手法を応用することで、比較的安全に虹彩や毛様体の採取は可能である。これは、目的領域の角膜輪部に隣接した強膜組織に切開をして、周辺部虹彩と毛様体突起部を把持・切除するこ

とで、必要な毛様体・虹彩組織を採取することが可能になる。その後、採取したサル眼虹彩・毛様体組織から、虹彩細胞および毛様体色素上皮細胞を単離培養した上で、浮遊培養と培養液中に分化誘導因子を添加することで、多分化能を有する神経幹(前駆)細胞へと誘導する。

### 4 治療・移植法あるいは使用法

単離・培養・増殖された神経幹細胞の移植については、硝子体手術的アプローチを行って移植することが可能となる。基本的には3ポートシステムで硝子体手術を行い、その後に硝子体中へ神経幹細胞を含んだ人工灌流液で置き換える。あるいは、網膜下移植については、機械的に穿刺するか、機械的に創傷を作成した上で、神経幹細胞を含んだ人工灌流液を網膜下へ注入する。

### 5 今後の課題

このように国内において、網膜の神経再生については、一連の網膜移植臨床研究で示された問題点を克服するために、精力的に実験が行われている。免疫学的拒絶反応に対しては、自家組織からの神経幹細胞を樹立することで、回避できる可能性がある。網膜における神経再生については、上記の虹彩組織とともに毛様体からも、神経幹細胞を樹立できることが報告されている<sup>11</sup>。また細胞資源の問題についても、このような自家組織由来神経幹細胞が有望であるし、さらにES細胞を分化誘導することで無尽蔵に細胞資源を得ることもできるかもしれない。

機能的神経回路網への移植細胞の組み込みについては、細胞外マトリックスや生理活性因子群の研究や、人工移植片による軸索誘導などが、突破口になるであろう。これらの方向性にある国内の研究としては、谷原ら(熊本大)は、上記の高橋らとの共同研究において、ラット脳海馬由来神経幹細胞の網膜移植により、神経幹細胞が網膜移植後に神経分化を生じうることを確認した<sup>7</sup>。また神経回路再構築を司る分子機構として、網膜神経細胞ソーティングやシナプス形成に中心的な役割を果たすと考えら



れている同種選択性細胞接着分子カドヘリンにおいて、II型カドヘリンやプロトカドヘリンの存在を証明した<sup>11-13</sup>が、これらが網膜神経回路網の形成に係わることを示した<sup>14</sup>。さらに視覚神経回路網発生や網膜内軸索誘導に、プロテオグリカンが重要な役割を果たすことを証明した<sup>15-18</sup>が、その一方で、前述の海馬由来神経幹細胞が神経細胞に分化誘導する条件下で、特異なプロテオグリカン発現パターンに変化することも証明した<sup>19</sup>。また一方で、BDNFやCNTFなどの神経栄養因子を硝子体投与することで、網膜障害モデル眼で神経保護効果を発揮することも証明している<sup>20-22</sup>。このように谷原らの研究グループは、神経幹細胞や網膜神経細胞の生存、軸索誘導、神経回路網形成にかかわる分子機構の解析を中心にしており、網膜再生における機能的神経回路網の再構築にとっての重要な情報を与えている。

また出沢ら（横浜市立大解剖講師）は、視神経再生および網膜神経節細胞の神経保護について、移植された末梢神経中シュワン細胞を足場として、視神経が接触しながら延びていくことを示した<sup>23</sup>。末梢神経による視神経再生は、グリア細胞成分の影響が大きいこととともに<sup>24</sup>、シュワン細胞を主成分とした人工移植片でも視神経再生を誘導できることを確認している<sup>25</sup>。このように彼女らの研究グループは、視神経軸索の再生の面から、網膜再生研究を行ってきており、特に人工移植片による視神経軸索誘導は、再生された網膜から投射される神経軸索を機能的視路神経回路網に誘導するために重要な情報であろうと考えられている。

現時点では臨床的に視機能改善を証明できる有効な臨床プロトコルを確立できてはおらず、今後は具体的な臨床プロトコルを目指して、霊長類での実験による安全性の検証を経て、臨床応用に具体的に踏み切ることが求められる。

## 6 参考文献

1 Gouras P, Du J, Kjeldbye H, Yamamoto S, Zack DJ. Long-term photoreceptor transplants in dystrophic and normal mouse retina. *Invest*

*Ophthalmol Vis Sci.* 1994 Jul;35 (8) :3145-53.  
2 Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Wolf ML, Del Priore LV. photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa. A safety study. *Arch Ophthalmol.* 1997 Sep;115 (9) :1168-72.  
3 Humayun MS, de Juan E Jr, del Cerro M, Dagnelie G, Radner W, Sadda SR, del Cerro C. Human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Sep;41 (10) :3100-6.  
4 Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL, Alturki W, Nelson NC Jr, Desai U. A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. *Ophthalmic Surg.* 1991 Feb;22 (2) :102-8.  
5 Abe T, Yoshida M, Tomita H, Kano T, Sato M, Wada Y, Fuse N, Yamada T, Tamai M. Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results. *Tohoku J Exp Med.* 2000 May;191 (1) :7-20.  
6 Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci.* 1998 Dec;12 (6) :340-8.  
7 Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, Ide C, Honda Y. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Dec;41 (13) :4268-74.  
8 *Science* 287: 2032,  
9 Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, Nishida A, Honda Y, Takahashi M. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci.* 2001 Dec;4 (12) :1163-4.  
10 Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa SI, Nakatsuji N, Sasai Y. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2002 Feb 5;99 (3) :1580-1585.

- 11 Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S: Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *the EMBO Journal* 12: 2249-2256, 1993.
- 12 Tanihara H, Sano K, Heimark RL, St John T, Suzuki S: Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhesion and Communication* 2: 15-26, 1994.
- 13 Tanihara H, Kido M, Obata S, Heimark RL, Davidson M, St John T, Suzuki S: Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins. *Journal of Cell Science* 107: 1697-1704, 1994.
- 14 Honjo M, Tanihara H, Suzuki S, Tanaka T, Honda Y, Takeichi M: Differential expression of cadherin adhesion receptors in the neural retina of the postnatal mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41: 546-551, 2000.
- 15 Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Honda Y: Spatiotemporal expression patterns of 6B4 proteoglycan/phosphacan in the developing rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41:1990-1997, 2000.
- 16 Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Kido N, Honda Y: Upregulated expression of neurocan, a nervous-tissue specific proteoglycan, in transient retinal ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41:2748-2754, 2000.
- 17 Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Otori Y, Nishida A, Honjo M, Kido N, Honda Y: Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in retinal neural network formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41: 4338-4346, 2000.
- 18 Inatani M, Honjo M, Otori Y, Oohira A, Kido N, Tano Y, Honda Y, Tanihara H. Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42; 1930-1938, 2001.
- 19 Inatani M, Haruta M, Honjo M, Oohira A, Kido N, Takahashi M, Honda Y, Tanihara H. Upregulated expression of N-syndecan, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in undifferentiated neural stem cells. *Brain Research* 920: 217-221, 2001.
- 20 Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y: Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Research* 884: 59-67, 2000.
- 21 Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y: Expression of ciliary neurotrophic factor by activated retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41: 552-560, 2000.
- 22 Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C: BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40: 2130-2140, 1999.
- 23 Dezawa M, Kawana K, Adachi-Usami E. The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997 Jun;38 (7) :1401-10.
- 24 Dezawa M, Kawana K, Negishi H, Adachi-Usami E. Glial cells in degenerating and regenerating optic nerve of the adult rat. *Brain Res Bull.* 1999 Apr;48 (6) :573-9.
- 25 Negishi H, Dezawa M, Oshitari T, Adachi-Usami E. Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat. *Brain Res Bull.* 2001 Jun;55 (3) :409-19.

## 肝臓

(担当：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 大和雅之)

### 1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

肝臓は代謝臓器の代表であり、最大の実質臓器として非常に多くの機能を有している。また遺伝性疾患からウィルス感染や化学物質の被爆などの後天的な障害まで幅広い病因があり、それぞれに応じた治療戦略が必要である。

発現量がそれほど多くない遺伝子の先天的な一遺伝子異常といった症例では、少量の肝実質細胞を注射により移植することで十分な治癒効果が期待できる。

しかし、肝臓中の実質細胞の大部分が消失することで生じた肝不全に対しては、線維化により組織構造が破壊しているため、導入した細胞が生着する場が存在しないこと、そもそも十分な肝機能の発現に必要な細胞数を注射のみで導入することは非現実的であることから、肝組織構造の再建技術の開発が急務である。

一方、肝臓は高等動物の他の臓器では見ることのできない旺盛な再生能を有しており、1/3以上の肝切除後にも正常な大きさにまで再生しうることが知られている。よって、急性劇症肝炎などでは体外循環型のハイブリッド型人工肝臓を短期間使用し、その間に肝臓の再生に期待するという戦略も検討されている。この場合、短期利用を前提としていることから免役隔離した異種動物肝実質細胞の利用が可能である。

また、肝臓は薬物代謝の大半を司る臓器であるため、肝実質細胞の医薬品開発における利用が近年活発になっている。

この他、現在の臨床で用いられている血液製剤の多くが、生体内では肝実質細胞によって合成されていることから、肝実質細胞を効率良く培養できる技術が確立できれば、血液製剤をバイオリアクターで製造できる可能性がある。

### 2 細胞ソース

肝臓中の細胞の大多数は代謝機能の大半

を担う肝実質細胞である。肝臓中に張り巡らされた漏洩性の毛細血管系である類洞は、類洞内皮細胞と星細胞からなり、少量のクッパー細胞（マクロファージ様細胞）などを含む。星細胞はビタミンAの貯蔵をおこなう他、血管平滑筋細胞と同様の機能を担うと考えられている。肝実質細胞と類洞内皮細胞の間にはディッセ腔と呼ばれる粗な細胞外マトリックスの領域があり、星細胞はここに位置している。この他、胆管壁には胆管上皮細胞が構成する。

肝実質細胞は培養系ではほとんど増殖させることができないので、臨床に必要な数を得るには大量の肝組織から細胞を単離するか、近年研究が進んでいる幹細胞を利用する必要がある。

注射により肝実質細胞を導入する場合、さほど多くの細胞を用いないため、数例おこなわれた臨床研究はアログラフトである。しかし、基礎的な研究の大部分が比較的ヒト肝実質細胞と似た性質を示すとされているラット肝実質細胞を用い、ホストとしては免疫抑制剤なしに生着が期待できる同系ラットを用いている。マウスやイヌ、ブタの肝実質細胞はヒトやラットに比べると培養しやすく、若干の増殖も期待できるが、ヒトのモデルとしては問題が多いと考えられる。

体外循環型のハイブリッド型人工肝臓の作成にはきわめて大量の細胞数が必要となるため、ラットではなくブタやイヌから単離した肝実質細胞が利用されている。しかし近年、ブタからヒトに感染するレトロウィルスの存在が明らかになり、ブタ肝細胞の臨床応用には特別の注意が必要であると言わざるをえない。

肝臓の幹細胞については長らく諸説が入り乱れ、現在においてもなお決着をみていない。以下に、これまでに明らかになった事実を整理する。

成体肝臓中にも未分化な肝細胞前駆細胞が存在し、適切な培養条件下では増殖し、また肝実質細胞および胆管上皮細胞に分化

する。このような肝細胞前駆細胞は肝実質細胞より小型ではあるが比較的性質の似た小型肝細胞と呼ばれる細胞と、さらに未分化だと考えられる卵型細胞(オーバルセル)がある。加えて、これらよりもさらに未分化で肝幹細胞とも呼ぶべき細胞も単離されている。

これらのうち、卵型細胞は骨髄由来であると考えられている。

骨髄移植を受けた患者の肝臓中に、移植骨髄と同じ染色体をもつ肝細胞が見つかることから、骨髄中に肝細胞の幹細胞が存在することは確かなようである。

近年、ES細胞から肝実質細胞を誘導する研究も盛んであるが、臨床に用いるにはいまだ多くの研究が必要である。

肝実質細胞が生理機能に必須の種々のタンパク質を合成分泌していることから、臨床応用をめざす場合、異種細胞では抗原性の問題を克服できないとの考えから、むしろヒト肝ガン由来の細胞株を利用する研究も少なくない。このような細胞株は無限寿命を獲得しているが、一方、分化機能が十分でないため、この細胞にさらに発現が必要な遺伝子を導入する研究がある。

同様にヒト線維芽細胞などのより培養しやすい細胞に肝特異的な遺伝子を導入し、これを利用する研究も報告されている。

### 3 単離・培養・増殖法

肝細胞は通常コラゲナーゼかん流法により単離するが、大形動物では難しく、新しい方法の開発が必要である。いずれにせよ、肝実質細胞はトリプシンなどのタンパク質分解酵素に対して障害を受けやすく、コラゲナーゼを用いるのが一般的である。

コラゲナーゼで組織を分解してえられた細胞浮遊液を低速遠心かけると、密度の大きい肝実質細胞だけを分離することができる。内皮細胞と星細胞などの非実質細胞や前駆細胞は通常、密度勾配により分離する。

肝幹細胞は複数の抗表面抗原抗体を組み合わせたFACSにより単離する。

すでに述べたように、肝実質細胞は培養系でほとんど増殖しない。また通常の培養法では数日のうちに分化機能を消失して死滅してしまう。比較的細胞が接着しにくい

表面に肝実質細胞を播種すると、スフェロイドと呼ばれる細胞塊を自発的に形成する。この状態で肝実質細胞は比較的長期に分化機能維持をおこなう。

星細胞は平滑筋細胞と同様に生体内ではアクチン線維を多数もつ収縮型の表現型を示すが、培養系では容易に脱分化して合成型の表現型を示す。これに呼応して細胞内に蓄積したビタミンAの油滴が消失する。

類洞内皮細胞の培養はこれらに比べ難しくない。

## 4 細胞の担体、作製プロセス

### 4.1 細胞移植

注射による肝実質細胞移植では細胞懸濁液を門脈より導入するケースが多い。生着率が非常に低いことを考慮すると、分化した肝実質細胞の細胞移植よりも、前駆細胞や幹細胞の移植が望ましいと考えられる。

導入効率を上げることを目的として、生分解性の担体の利用が古くから検討されている。大量の細胞を保持し、血管系の侵入を促すために適切な孔径と空隙率の最適化が必要であるが、近年、Computer-Assisted Design and Manufacture (CAD/CAM)技術の応用が始まっている。たとえば、Therics社(1)が開発したTheriFromは、マクロおよびマイクロレベルの構造を制御して種々のポリマーの三次元的成型が可能である。インクジェットプリンターがインクの液滴を紙表面に吹き付けて字や画像を描くように、ポリマーを吹き付けて作製する二次元レイヤーを積層していくことで複雑な三次元構造を作製する三次元印刷(3-dimensional printing, 3DP)技術を用いるため、最外表面のみならず内部表面のテクスチャも制御できる(2)。複数のノズルを有し、接合剤のみならず薬物や細胞までもが同時に10ミクロンの精度で噴射できる。

移植床からの高度の血管新生の誘導を期待して血管内皮細胞との混合播種やVEGF徐放性ポリマーなどを用いて、早期に血管新生を促す試みがある。また、移植する肝実質細胞にVEGFやHGFなどの血管新生因子遺伝子を導入する研究もある。

さらにマイクロファブリケーション技術により毛細血管構造を再現する試みも始まっている。シリコンウェーハ上にフォトリ

ソグラフィにより、最小幅10ミクロンの毛細管網パターンを作った(3)。

細胞接着を抑制する培養皿上や回転する培養容器中で細胞と細胞付着性のビーズを混在させて培養すると、多数の細胞がビーズ表面に接着し細胞塊を形成させたまま培養することができる。肝細胞等では毛細胆管様の構造が再構築できるなど、この細胞塊は組織様構造を模していると考えられている。しかし、1Gの地上では重力のために大きな細胞塊を作製・維持することは困難である。

NASAの人工衛星内での培養実験を元に、円筒形のバイオリアクターの回転を制御することにより地上でも擬似的な無重力を実現するバイオリアクターが市販されている。この疑似無重力環境下では、大きな細胞塊を作ることができる他、細胞密度のわずかな差異もその一因である細胞種毎の細胞の分離が生じないため、複数種の細胞が混在する細胞塊を形成し共培養することができる。

しかし、毛細管系の導入がない細胞塊では、たとえリアクターの回転に基づく灌流が生じて、細胞塊表層から200ミクロン以上ある細胞塊中心部では酸素・栄養分の供給不足、老廃物の蓄積による細胞死(ネクロシス)が生じるため、臨床応用が期待されるにより大きな細胞塊の構築には、無重力だけでは十分でないことは明らかである。毛細管系再生技術の開発が強く待たれる。

#### 4.2 体外循環

体外循環型のハイブリッド型人工肝臓では、中空糸モジュールに細胞を導入し、これを体外循環回路に接続する。全血を用いたり、血漿分離をおこなったり、中空糸の内側や外側に細胞を入れたり、様々な手法が検討されている。

中空糸を使わずに、ウレタンフォームを用いてスフィロイドを固定化したり、多数積層できるようにデザインしたりアクターを用いる研究がある。

いずれも短期の使用が前提となっているため、完全埋込み型のものに比べ、生体適合性などの要求は高くない。

#### 5 今後の課題

肝臓が極めて多機能であることもあり、他の臓器に比べ研究は少ないものの、臨床応用への道のりは短くない。いずれの要素技術においても、満足のいく技術開発が達成できていないと言わざるをえない。

安定に供給できる細胞ソースの開発もきわめて重要である。このような観点からも細胞・組織バンクの整備が必要である。

#### 6 参考文献

- 1) <http://www.therics.com/>
- 2) S. S. Kim, H. Utsunomiya, J. A. Koski, B. M. Wu, M. J. Cima, J. Sohn, K. Muka, L. G. Griffith, J. P. Vacanti, Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels, *Ann. Surg.* 1998; 228: 8-13
- 3) The Charles Stark Draper Laboratory, Inc., Massachusetts, USA, <http://www.draper.com/>
- 4) Lalan S, Pomerantseva I, Vacanti JP., Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg.* 2001; 25(11):1458-66.
- 5) Tzanakakis ES, Hess DJ, Sielaff TD, Hu WS., Extracorporeal tissue engineered liver-assist devices. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000; 2:607-32.
- 6) Hutmacher DW., Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001; 12(1):107-24.
- 7) Stockmann HB, Hiemstra CA, Marquet RL, IJzermans JN., Extracorporeal perfusion for the treatment of acute liver failure. *Ann Surg.* 2000; 231(4):460-70.
- 8) Marx U, Bushnaq H, Yalcin E., European research and commercialisation activities in the field of tissue engineering and liver support in world wide competition. *Int J Artif Organs.* 1998; 21(2):119-26.
- 9) Minuth WW, Sittlinger M, Kloth S., Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications.

Cell Tissue Res. 1998; 291(1):1-11.

10) Davis MW, Vacanti JP., Toward development of an implantable tissue engineered liver. *Biomaterials*. 1996; 17(3):365-72.

11) Dixit V, Gitnick G., Artificial liver support: state of the art.

*Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996; 220:101-14.

12) Yarmush ML, Toner M, Dunn JC, Rotem A, Hubel A, Tompkins RG., Hepatic tissue engineering. Development of critical technologies. *Ann N Y Acad Sci*. 1992; 665:238-52.

13) Asonuma K, Vacanti JP., Cell transplantation as replacement therapy for the future. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 1992; 4(2):249-54.

14) Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R., Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng*. 1991; 113(2):143-51.

15) Jauregui HO, Gann KL., Mammalian hepatocytes as a foundation for treatment in human liver failure. *J Cell Biochem*. 1991; 45(4):359-65.

## 調査報告 (16)

### 膵ランゲルハンス氏島移植

(担当：東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター外科 寺岡 慧)

#### 1. 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

糖尿病患者の実数は690万人とされ、潜在的には1390万人にのぼるとされている。インスリン治療法の改善により治療成績は改善しつつあるが、糖尿病性腎症、アンギオパシー、ニューロパシーなどの進展を完全には阻止し得ず、糖尿病性腎不全、心筋梗塞、脳血管障害、網膜症、四肢壊疽、起立性低血圧、腸管麻痺、膀胱機能傷害などの糖尿病合併症は糖尿病患者の生存率、Quality of Life (QOL) に大きく影響している。とくに糖尿病性腎不全については、新規透析導入患者にの原疾患に占める糖尿病性腎症の割合は年々増加し(37.5%)、今や慢性糸球体腎炎を抜いて一位となっており、しかも糖尿病性透析患者の長期生存率は不良である。しかもそのQOLは不良であり、根治的な治療法の開発・導入が急務と考えられる。

欧米においては、膵臓移植、膵腎複合移植が普及しつつあり、近年その成績も向上し、糖尿病ないし糖尿病性腎不全の根治的治療法として確立されつつある。しかし移植数は1500件/年で頭打ちとなっており、欧米においてさえドナー不足は深刻な問題となっている。わが国においても本格的に脳死ドナーからの膵腎複合移植が再開されたが、数例が実施されたにすぎず、今後その増加を図るとしても、わが国における糖尿病患者ないし糖尿病性腎不全患者の数からすると到底その需要をまかなえるものとは言いがたい。

これに対し膵ランゲルハンス氏島(膵島)移植については、1970年代

に膵島の分離法が開発されて以来、散発的に行われてはいたがその成績は不良であり、最近までインスリン離脱率は10%以下であった。しかし最近になって脳死ドナーからの新鮮ラ島を、ステロイドを用いず、低容量の calcineurin inhibitor と IL-2 receptor antagonist、silymarin を用いた新しい免疫抑制法で移植し、良好な成績がえられたことが報告され、再び膵島移植が注目を浴びている。しかし1人の患者のインスリン離脱には、2~3人のドナーが必要であるとされ、また成功例もいまだ少数例であり、ドナー不足の現状を打開しうるものとはなりえないと考えられる。

以上より、異種動物からの膵島細胞の利用、ES細胞からのB細胞への分化誘導、遺伝子工学的手法を用いた自己体細胞のB細胞への誘導などにより得られた、グルコース応答性インスリン分泌細胞の作出が必要となってくる。この分野での研究・開発の現状は、異種膵島細胞を免疫隔離法(microencapsulation、diffusion chamberなど)を用いて移植する方法、異種膵島細胞を遺伝子工学的方法により修飾して免疫隔離法を用いて移植する方法、異種あるいは同種ES細胞をB細胞に分化誘導して移植する方法、異種動物の体細胞、初期胚の内部細胞塊あるいは受精卵を用いて遺伝子改変クローン動物を作出して得られたB細胞を移植する方法、自己臓器特異的幹細胞から種々の転写因子によりB細胞を誘導する方法などが研究されている。

#### 2. 細胞ソース

##### 1) 異種動物

##### ① マウスインスリンノーマ細胞

トランスジェニックマウスに発生させたインスリンノーマから樹立された MIN6 細胞を用いて、ヒトへの応用を考慮して MIN6 細胞を遺伝子工学的に修飾し、バイオハイブリッド型人工膵島に利用できるようにいくつかの改良が行われている。ブドウ糖に反応してヒトインスリンを分泌する MIN6-hins 株の樹立、さらに単純ヘルペス tk 遺伝子を導入し、薬剤 ganciclovir 投与により、外部より増殖を制御できる MIN6-hins-tk 細胞株が樹立されている。

#### ② 成熟ブタ膵島

成熟ブタより膵臓を摘出し、分離された膵島を用いる。超急性拒絶反応を防止する目的で、DAF 遺伝子導入ブタが作出されており、これから膵島を分離して用いることが可能となっている。最近やはり超急性拒絶反応を防止する目的で、 $\alpha$  1,3GT を knockout した (hetero) ブタが作出されているが、今後 homo で  $\alpha$  1,3GT を knock out したブタの作出が計画されている。また  $\alpha$  1,3GT を knock out した体細胞核を核移植して得られた遺伝子改変体細胞クローンブタの作出が計画されている。

#### ③ 遺伝子改変クローンウシ

$\alpha$  1,3GT を knock out した体細胞核を核移植して得られた遺伝子改変体細胞クローンウシの作出が進行中である。

#### 2) ヒト ES 細胞

ヒト ES 細胞から転写因子により B 細胞を分化誘導する計画が進行中である。

#### 3) 自己臓器特異的幹細胞

最近、PDX-1 等の転写因子により、膵管上皮細胞、肝細胞、腸管上皮 crypt cell から B 細胞が誘導されたとする報告がなされ、特定の臓器に臓器特異的幹細胞が存在し、これを一定程度脱分化させた上で、転写因子により特定の細胞に分化させる可能性が示された (transdifferentiation)。

### 3. 単離・保存法

膵を摘出後、主膵管より消化酵素液 (コラゲナーゼなど) を注入膨化した後、細切し、種々の方法で消化する。消化組織より膵島を COBE2991 cell processor を用いた連続密度勾配法により純化、精製する。消化酵素液の種類、消化法、純化・精製法などは動物種などにより若干の相違がある。

膵島分離後培養し、膵島収集、洗浄後、膵島凍結保存液中に浮遊させ、プログラムフリーザーを用いて凍結する (step-wise freezing)。凍結した膵島を液体窒素内 (-196 °C) で保存する。

凍結前後に一部の膵島を用いて quality assessment を行う。収量、純度、Trypan-blue 染色による viability、static incubation によるインスリン分泌能、感染の有無などを確認する。

### 4. 移植法

#### 1) 完全埋込型バイオハイブリッド人工膵島

##### ① Microencapsulation 法

高分子工学、tissue engineering の手法を駆使した免疫隔離膜の開発により膵島のカプセル化が開発され、小動物糖尿病モデルにおいてはその腹腔内移植により、同種移植の場合は免疫抑制薬を必要とせず、異種移植の場合でもごく少量の免疫抑制薬で長期生着が可能となっている。しかし大動物モデルでのさらに安定した長期生着が課題であり、また問題が生じた場合に回収不能であることなど、安全性においても解決すべき課題が残されている。

##### ② Diffusion chamber 法

MIN6-hins あるいはブタ膵島を三次元培養マトリクス内で培養し、免疫隔離高分子膜を用いた diffusion chamber 内に封入し、これを腹腔内、あるいは皮下に移植する。皮下移植の場合は、移植床の血流の確保が不可欠であり、VEGF、FGF などの増



殖因子による移植局所における血管新生が埋込型人工膵島の長期機能の確保に有用である。大動物への腹腔内移植、小動物への皮下移植においては月単位の生着が可能となっている。しかしさらに移植膵島の長期機能の安定性、異種膵島からのレトロウイルスなどの未知の感染性病原体の問題等、今後解決されるべき課題が残されている。

## 2) 膵島移植

### ①門脈内移植

同種膵島移植の場合は門脈内に移植される。門脈内に移植された膵島は肝臓内に生着する。現在、同種移植においては最も一般的な移植法である。

### ②その他

その他の移植部位としては、実験的には腎被膜下、髄腔内、皮下などが試みられている。

## 5. 今後の展望

今後、膵島細胞・組織を用いた糖尿病の治療については、膵臓移植を別とすれば、脳死ドナーからの新鮮膵島の移植(9)が主流になると予想されるが、先に述べた理由から、下記の種々の方向性の検討がよりいっそう加速されることは間違いない。

### 1 血液幹細胞からの B 細胞再生?

(auto)

### 2 組織特異的幹細胞からの B 細胞再生 (auto)Transdifferentiation... 膵管上皮、肝細胞、腸管上皮

### 3 ES 細胞からの B 細胞への分化誘導 (allo/xeno)

### 4 auto ES 細胞の作成(?) と B 細胞への分化誘導 (auto)核移植によるクローン作成

### 5 不死化 B 細胞... MIN6 (xeno)

### 6 自家体細胞からの B 細胞の作成... Glut-2, glucokinase (auto)

### 7 EG 細胞からの B 細胞への分化誘導? (allo)

### 8 バイオハイブリッド型人工膵島 (allo/xeno)

### 9 同種膵島移植 (allo)

## 膵臓

（担当：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 大和雅之）

### 1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

膵臓はトリプシンやリパーゼなどの消化酵素の分泌の他、血糖値制御をおこなうペプチドホルモンの分泌をおこなう。消化酵素については内服的に補充が可能であるため、現状では、糖尿病の治療をめざした試みが各種なされている。これには血糖値に応じてインシュリンを合成分泌するランゲルハンス島またはその担当細胞であるβ細胞などを用いる。

また、インシュリンを大量分泌できる細胞かまたは、遺伝子組み換えによりインシュリンを高度に発現する細胞を用いて治療に用いるヒトインシュリンを大量に合成する技術はすでに実用化している。現在、臨床に用いられているインシュリンはこのような組み換え体である。

### 2 細胞ソース

糖尿病患者の体内に移植することを目的とする組織工学的研究では、従来免疫隔離を前提に異種由来の膵β細胞の利用が検討されてきた。しかし、異種細胞の利用には以下のような問題点が存在する。患者に移植するデバイスは長期利用が前提であるため、きわめて高度な免疫隔離技術の確立が必要である。また、異種細胞が作るインシュリンはアミノ酸配列や糖鎖の付加などがヒトインシュリンと異なり、抗原性の懸念がゼロではない。この他、ブタ細胞では、ブタからヒトに感染するレトロウィルスの存在が明らかになり、ブタ細胞の臨床応用には特別の注意が必要であると言わざるをえない。

ヒト細胞を用いる場合、多くの症例で先天的な遺伝子異常に帰因するため、患者本人の細胞の利用は、遺伝子治療技術との組み合わせ以外では難しい。同種の場合、すでに死体2体から摘出したランゲルハンス島を患者に移植する方法の最適化がおこな

われており（エドモントンプロトコルと呼ばれる）、好成績が得られているため、慎重に進めるべきである。

膵幹細胞の研究も盛んであるが、臨床応用できるレベルには至っていない。

ES細胞より膵細胞を分化させる研究は近年きわめて盛んであり、将来的には大いに期待できる。

この他、膵ガン由来のインシュリン分泌細胞を用いる研究や、インシュリン遺伝子を組み込んだ線維芽細胞などの利用も検討されているが、血糖値に応じて適量のインシュリンを合成・分泌する能力をいかにして実現するかなど、問題は多い。

### 3 単離・培養・増殖法

コラゲナーゼなどの酵素分解により単離する方法が一般的であるが、膵β細胞は比較的弱い細胞であり、酵素消化により不可逆的な障害を受けることが少なくない。また臨床には大量の細胞を短時間に調整する必要があるため、酵素を使わずに、物理的な膵臓の破碎により短時間に膵β細胞を調整する技術も開発されている。

成体から単離した分化膵β細胞は培養系ではほとんど増殖させることができないが、近年、培地組成の検討により、ある程度の期間で分化機能を維持したまま培養することができるようになった。

現状では成体から単離した細胞をそのまま免疫隔離デバイスに組み込みホストに移植するため、大量の細胞が単離できる大形動物の利用が前提となっている。

ES細胞から膵細胞へと分化させる培地組成の研究も進んでいる。

### 4 細胞の担体、作製プロセス

細胞を用いた人工膵臓のデザインにおいて、免疫隔離と体液ないし血液との効率的接触が必須である。

人工膵臓は長期の利用が前提であり、ホ

ストの免疫系から移植した細胞を守るために免疫隔離が必要となる。移植細胞が分泌するインシュリンや移植細胞が必要とする酸素・栄養分・代謝老廃物などは自由に通過でき、抗体や免疫細胞などの侵入を防ぐために、孔径などの最適化がなされている。

免疫隔離にはアルギン酸ゲル、濾過用のミリポアフィルター、中空糸などが利用されている。

近年、マイクロファブリケーション技術により孔径を厳密に制御した免疫隔離機能をもつデバイスが開発されている。

免疫隔離機能をもつゲルや膜からなる表面をもつデバイス内に細胞を導入するが、この時、細胞を安定に保持するために人工的な細胞外マトリックスの利用が一般的である。

## 5 今後の課題

長期埋入が前提であるため、きわめて高度の免疫隔離能と共に、生体適合性が必要である。

煩雑であり、注射にともなう皮膚組織の変化などの問題があるとはいえ、インシュリン注射は現在確立した治療法であり、細胞を用いることに帰因するガン化などの危険性を考慮してもなお有効な人工膵臓を作成するためには、よりいっそうの細胞レベルの研究が必要である。

## 6 参考文献

- 1) Cui W, Kim DH, Imamura M, Hyon SH, Inoue K., Tissue-engineered pancreatic islets: culturing rat islets in the chitosan sponge. *Cell Transplant.* 2001; 10(4-5):499-502.
- 2) Kinoshita N, Echigo Y, Shinohara S, Gu Y, Miyazaki J, Inoue K, Imamura M., Regulation of cell proliferation using tissue engineering in MIN6 cells. *Cell Transplant.* 2001; 10(4-5):473-7.
- 3) Maria-Engler SS, Mares-Guia M, Correa ML, Oliveira EM, Aita CA, Krogh K, Genzini T, Miranda MP, Ribeiro M, Vilela L, Noronha IL, Eliaschewitz FG, Sogayar MC., Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(6):691-7.

- 4) Castaing M, Peault B, Basmaciogullari A, Casal I, Czernichow P, Scharfmann R., Blood glucose normalization upon transplantation of human embryonic pancreas into beta-cell-deficient SCID mice. *Diabetologia.* 2001; 44(11):2066-76.

- 5) Efrat S., Cell therapy approaches for the treatment of diabetes. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001; 2(5):639-42.

- 6) Sefton MV, May MH, Lahooti S, Babensee JE., Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance. *J Control Release.* 2000; 65(1-2):173-86.

- 7) Papas KK, Long RC Jr, Sambanis A, Constantinidis I., Development of a bioartificial pancreas: I. long-term propagation and basal and induced secretion from entrapped betaTC3 cell cultures. *Biotechnol Bioeng.* 1999; 66(4):219-30.

- 8) Chaikof EL. Engineering and material considerations in islet cell transplantation. *Annu Rev Biomed Eng* 1999; 1:103-27

- 9) Efrat S., Genetically engineered pancreatic beta-cell lines for cell therapy of diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 875:286-93.

- 10) Fleischer N, Chen C, Surana M, Leiser M, Rossetti L, Pralong W, Efrat S., Functional analysis of a conditionally transformed pancreatic beta-cell line. *Diabetes.* 1998; 47(9):1419-25.

## 調査報告（18）

### 細胞・組織に及ぼすバイオマテリアルの影響

（担当：国立医薬品食品衛生研究所 療品部 土屋利江）

#### 1. 必要性

細胞・組織医療用具の日本の規制内容は、（１）細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方と（２）ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する基本的考え方の二つの文書により、（１）科学的及び倫理的妥当性を確保するための方策と（２）基本的技術要件及び厚生労働省に申請に当たっての添付資料内容を示している。また、これらの新しい細胞組織医薬品・医療用具の登場に伴って、（３）「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準」としてドナースクリーニングに関する基準の制定（薬事法第42条基準）と（４）医療用具の製造管理と品質管理規則および医療用具の輸入販売管理及び品質管理規則等の一部改正が行われた。これらは、平成13年度には施行され、平成14年3月時点で施行後、1年経過したこととなる。

これらの規制内容は、当然ながら安全対策と安全確保に重点を置いたものであり、バイオロジクス特有のリスクを考慮する一方で、細胞・組織医療用具の有効性と有効性評価の指標に関する研究も必要となると考える。

国立医薬品食品衛生研究所・療品部では、細胞・組織医療用具に必要な安全性・有効性の評価方法に力点

を置いて研究を重ねてきた。医薬品の場合と異なるのは、材料と細胞・組織との相互作用によって生じる影響である。すなわち、バイオマテリアルと直接・間接（分解・溶出成分由来）相互作用した細胞の機能を評価する方法を確立するための研究を行っている。

細胞の分化や恒常性には、細胞・細胞間のコミュニケーションが重要であるということが昔からいわれている。ここで、細胞・細胞間のコミュニケーション機能として、細胞の恒常性機能維持や細胞分化にも関連し、その重要性が注目されているギャップ結合蛋白コネキシンの機能をとりあげ、バイオマテリアルの評価法としての有用性も検討した。我々の実験系で得られた結果を中心に今年度は報告する。

#### 2. ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸の評価

皮膚等に使用される多糖類の新規有用素材としての可能性を明らかにするために、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸等の多糖類のヒト皮膚繊維芽細胞の細胞間連絡機能に及ぼす作用を明らかにした。

研究方法：ヒト皮膚繊維芽細胞はAsahi Techno Glassより購入して使用し