

BIOLOGY TOPICS

細胞シート工学を利用した組織再構築

しみず たつや おかの てるお
■ 清水 達也・岡野 光夫

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所



清水 達也
1992年東京大学医学部医学科卒業。99年同大学大学院医学系研究科修了、同年東京女子医科大学先端生命医科学研究所助手、2003年同講師、現在に至る。研究テーマは組織工学的手法による心筋組織再生。趣味は旅行。

Key words : 再生医療, 組織工学, 細胞シート

はじめに

近年、欠損部あるいは機能不全に陥った組織・臓器に対する新たな治療法として再生医療が注目を集め、下肢虚血に対する骨髄単核球細胞移植など細胞を使ったいくつかの治療法が臨床応用されるに至っている。再生医療には細胞を注射針などで不全部に注入する細胞移植療法と組織工学 (tissue engineering) 的手法により細胞から組織を再構築したうえで移植する方法がある。後者はこれまでの医学だけでは実現が困難であった研究領域であり工学的な技術との融合により急速に進歩しつつある。ここでは、組織工学を基盤とした再生医療の現状について概説し、当研究所が開発した独自の組織工学的手法『細胞シート工学』による種々の組織再構築に関する研究を紹介する。

1. 組織工学 (tissue engineering)

組織工学は1993年、工学者である Langer お

よび外科医である Vacanti が提唱した学際的な学問である。細胞から組織を再構築するという研究は皮膚などに関してそれ以前より行われていたが、彼らはマウスの背中で耳を再生させたことにより組織工学を世界に知らしめた。組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM)、細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場として3次元の生体吸収性材料を用いた。細胞を3次元の支持体に播種・培養後、生体内に移植すると、生体吸収性の支持体が徐々に分解、細胞が産生するECMと置換され生体に類似した組織が再構築されるという手法である。組織工学において組織再生の足場として用いられる生体材料の多くは生体吸収性の高分子である。これには天然高分子と合成高分子がある。いずれも酵素分解あるいは加水分解によって高分子主鎖が切断され吸収される。天然高分子の中でよく利用されているのは生体のECMの主成分であるコラーゲンである。一方、合成高分子としては、ポリ乳

Cell sheet engineering for tissue reconstruction : Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Institute of Advanced Biomedical Engineering and science, Tokyo Women's Medical University

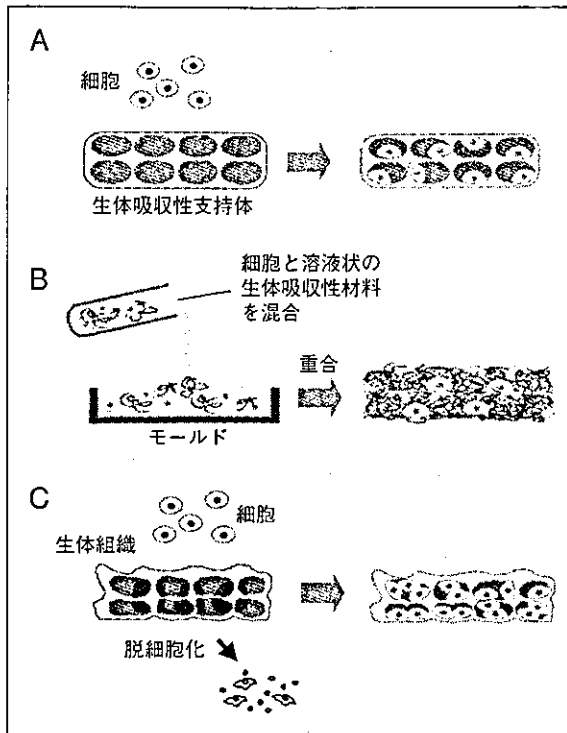


図1 生体吸収性支持体を用いた組織工学的手法

- A. 生体吸収性高分子からなる支持体を作成し、それを足場として細胞を播種する手法。
 B. 溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合する手法。
 C. 生体由来の組織を脱細胞化したのちにそれを支持体として細胞を播種する方法。

酸 (PLA), ポリグリコール酸 (PGA), およびそれらの共重合体が最も盛んに使用されている。また、生体由来の組織が支持体として用いられる場合もある。具体的な方法としては①生体吸収性高分子からなる多孔性の3次元支持体を作製、それを足場として細胞を播種する方法 (図1 A), ②溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したのちモールドに流し込み、重合させることで細胞を3次元化する方法 (図1 B), ③生体組織を界面活性剤やマイクロウェーブを用いて脱細胞化した結合組織を支持体として細胞を播種し培養する方法 (図1 C) がある。それぞれ支持体は生体が産生するECMと置換されて組織が再生される。

これら生体吸収性の3次元生体材料を細胞の足場として用いた組織工学の研究は殆どすべての組織に対して行われている。既に組織工学的に製造された軟骨・皮膚は商品化されており、また血管に関しても臨床応用されている。

2. 細胞シート工学による組織再構築

生体吸収性の支持体を用いる組織工学的手法においては支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことやまた移植後支持体の分解に伴い炎症反応が生じることが問題となっている。また骨、軟骨、血管、弁など細胞が疎な組織の作製には適しているが心筋、肝臓など細胞の密な組織を作製するには新たな技術開発が必要となっている。そこで我々は最初から3次元的な足場を整えることにより組織を再生するという既存のコンセプトに対し、温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できる培養基材を用い、細胞をシート状に回収、この細胞シートを一つの組織として移植したり、積層化により3次元組織を再構築したうえで移植するという独自のコンセプト「細胞シート工学」を提唱し新たな治療法の確立に取り組んでいる。

この培養基材は通常のパリスチレン培養皿上に温度応答性高分子であるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) を電子線を用いて薄く (数十 μm) 共有結合させたもので、通常の培養温度である37 $^{\circ}\text{C}$ では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32 $^{\circ}\text{C}$ 以下では親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿の使用により、接着した細胞をトリプシンやディスパーゼなどの蛋白分解酵素を用いること

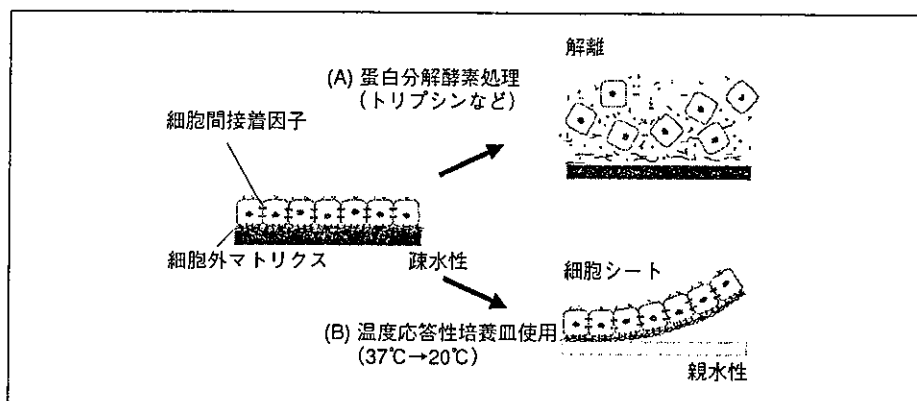


図2 温度応答性培養皿からの細胞シートの脱着

細胞を密に培養した場合は細胞と細胞が細胞間接着因子により互いに接着する。(A) 蛋白分解酵素を用いた場合は細胞と培養皿の接着が解離するとともに、細胞間接着も破壊されるため、それぞれの細胞は解離して浮遊することになる。(B) これに対し、温度応答性培養皿を使った低温処理においてはこの細胞間接着は全く影響を受けずに、シート下面のECMと培養皿表面の接着のみ解離するため細胞がシート状に脱着する。

なく脱着させることが可能である。さらに、細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、温度を降下させることにより細胞がその下面の接着因子・ECMとともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるため蛋白分解酵素を用いたときのように細胞をばらばらにすることなく、シート状に回収できる(図2)。また細胞シート下面の接着因子が新たな培養基材や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため速やかな接着・積層化が可能である。既にこの培養皿を用い、種々の細胞シートの回収が可能となっている。

細胞シートの再生医療への応用としては①単層シートの移植 ②同一細胞シートの積層化により構築した均一な組織の移植 ③数種の細胞シートの積層化により構築した層状構造を呈する組織の移植がある(図3)。それぞれ対象組織・臓器として①角膜、膀胱(上皮)、歯周組織、②心筋、③肝臓などが挙げられる。以下に、それぞれについてのこれまでの研究成果を示す。

3. 単層シート

(1) 角膜

角膜移植に関しては、ドナー角膜の不足が問題となっており、組織工学的手法による角膜再生が追求されてきた。角膜は組織構造が比較的単純な層構造を呈し、細胞シートによる再生医療のもっとも良い応用例の一つである。我々は、自己の健常側角膜輪部より採取した角膜上皮の幹細胞を温度応答性培養表面上で培養して細胞シートを作製、これを損傷した病変角膜部に移植する治療法を開発した。さらに、両眼性疾患に対しては、自己の口腔粘膜から採取した細胞を用いて細胞シートを作製し移植する方法も確立した。既に本法のヒトへの臨床応用を開始、視力の回復を確認している(大阪大学眼科との共同研究)。

(2) 膀胱

現在、膀胱機能不全や悪性腫瘍などによる膀胱の欠損に対しては自己の消化管を使用した再建が行われているが、消化管粘膜の残存

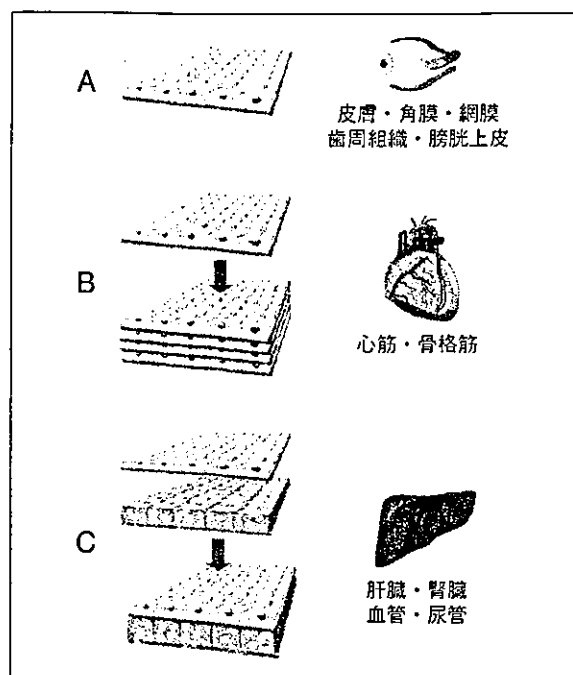


図3 細胞シートの再生医療への応用

温度応答性培養皿から回収した細胞シートの再生医療への応用として3つのコンセプトがある。単層シートの移植(A)。同一の細胞シートを重層化した均一な組織の移植(B)。異なる細胞シートの重層化による層状組織の移植(C)。

に起因する電解質異常、結石の形成などの合併症が大きな問題となっている。これらの問題を解決するために尿路上皮細胞シートを作製し、消化管粘膜を切除した消化管平滑筋層上に移植した。尿路上皮シートは消化管平滑筋層上に生着し、膀胱組織と同様の尿路上皮組織層が再生された。この粘膜置換型フラップは従来の手術方法に細胞シート技術を融合した新規の手法であり、早期の臨床応用が期待されている。

(3) 歯周組織

歯周病は、成人の8割以上が患っているといわれており、歯根膜を中心とする歯周組織の炎症により、放置すれば歯の脱落を招く。

従来の治療法では失われた歯周組織は再生することなく、高齢化社会におけるQOL (Quality of Life) の低下の大きな要因といえる。そこで、我々は歯根膜組織由来細胞シートを歯周組織欠損部位へ移植することで、きわめて効果的に歯根組織膜が再生することを明らかとした(東京医科歯科大学歯学部との共同研究)。この技術は歯周組織の再生治療や歯根膜を持った次世代の人工歯根の開発に大きく貢献するものと考えている。

4. 同一細胞シートの積層化

心筋

心筋組織に対する再生医療としては、心筋細胞の代替として自己の筋芽細胞や骨髄由来の細胞を用いた浮遊液注入による細胞移植治療が既に臨床応用されている。一方、組織工学的なアプローチとしてコラーゲンゲル、ポリ乳酸、アルギン酸あるいはゼラチンからなる3次元の支持体を用いた心筋細胞の3次元培養の研究が報告されている。しかし、3次元支持体を用い心筋細胞培養を行うことは細胞の密な接着や自由な収縮弛緩の妨げになると考えられる。そこで我々は心筋細胞シートを重層化することで支持体を用いない心筋組織の再生を追求してきた。重層化した心筋細胞シート間には電気的にも形態的にも結合が生じ、組織全体が同期して拍動することが確認され、*in vitro*で4枚まで積層化したところ肉眼レベルで拍動する心筋組織が構築された。さらにヌードラット背部皮下組織への移植実験を行ったところホストの心電図とは異なるグラフト由来の電位が確認された。また心筋グラフトの肉眼レベルでの拍動が確認さ

れるとともに組織切片上、多数の新生血管を認め、心筋様組織が再生されていた。既に移植後1年まで、心筋グラフトが拍動を維持したまま生着しうることを確認している。さらに重層化心筋細胞シートの心筋梗塞モデルへの移植実験により心機能が改善することが確認されている（大阪大学臓器機能制御外科との共同研究）。将来、幹細胞生物学の発展によりヒトに移植可能な心筋細胞の分化誘導法が確立されれば体外で再生した心筋組織を不全心に移植することも可能となることが予測される。

で肝細胞シートと内皮細胞シートの重層化共培養を行ったところ、アルブミン合成能を維持した2ヶ月以上にわたる肝細胞の長期培養が可能となっている。これは、肝細胞と内皮細胞との層状の接着により生体に似た環境を再現し、細胞相互間のコミュニケーションを可能にしたことによるものと考えられる。この手法を基盤として、3次元的な肝組織を再生・移植するための技術開発を行っている。

以上に挙げた組織・臓器の他、皮膚・網膜・尿管・血管・腎臓などに関しても細胞シートの技術を使った研究を進めている。

5. 異なる細胞シートの積層化

おわりに

肝 臓

肝臓は生体内である程度の再生能をもつものの、その形態・機能の複雑さ故に組織工学的手法での再生が困難な組織のひとつである。肝組織は肝実質細胞と血管内皮細胞が層状に配列し、生体内における合成、代謝を効率的に行っている。肝実質細胞は、通常の培養環境ではその分化機能を著しく低下させ、長期培養も困難であることが知られている。そこ

再生医療は今まで治療が困難であった疾患に対する新たな治療法として期待され、種々のアプローチで開発が行われ、研究者人口も増大している。その中で温度応答性培養皿およびそれを使った細胞シート工学は既存の培養技術では不可能であったシート状の細胞の回収・移動・重層化を実現し世界的にも注目されており、再生医療分野をさらに発展させる新技術として貢献するものと考えられる。

< BIO Information >

第18回 日本臨床内科医学会 in 岡山のお知らせ

会 期：2004年9月19日（日）～20日（月・祝）
会 場：岡山衛生会館・おかやま三光荘・岡山プラザホテル
テーマ：21世紀の理想の医療を目指して
～ 良質な医療提供とかかりつけ医の役割 ～
会 長：亀山一郎（亀山内科院長）

主なプログラム：基調講演 医療保険制度と診療報酬体系（講師 遠藤久夫・学習院大学経済学部教授）
インフルエンザの展望（講師 柏木征三郎・福岡日赤血液センター所長）
良質な医療提供とかかりつけ医の役割（講師 伴信太郎・名古屋大学医学部教授）

教育講演／ワークショップ／シンポジウム／市民公開講座 他

組織工学の心血管病への応用

清水達也*

SHIMIZU Tatsuya

*東京女子医科大学先端生命医科学研究所

SUMMARY

近年、欠損部あるいは機能不全に陥った組織・臓器に対する新たな治療法として再生医療が注目を集め、循環器領域においても組織工学的手法により細胞から血管、弁、心筋組織を再構築する研究が加速している。世界的には生体吸収性の支持体を細胞の足場とする手法が主流であるが、われわれは支持体を用いることなくシート状の細胞を積層化することにより3次元組織を再構築する独自の手法「細胞シート工学」を確立した。すでに肉眼レベルで拍動する心筋組織の構築に成功している。今後より高機能な組織の作製には、医学と工学の融合による新たな技術開発が必須である。

POINTS

- 組織工学は医学と工学の融合による新たな学問である。
- 生体吸収性高分子を細胞の足場とするのが組織工学の主流である。
- シート状の細胞の積層化により3次元組織の構築が可能である。
- 細胞シート工学により肉眼レベルで拍動する心筋組織の再構築が可能である。

KEY WORDS

組織工学, 生体吸収性高分子, 細胞シート

はじめに

近年、欠損部あるいは機能不全に陥った組織・臓器に対する新たな治療法として再生医療が注目を集め、循環器領域においても細胞を使いたいくつかの治療法が臨床応用されるに至っている。再生医療には回収した細胞を注射針などで不全部に注入する細胞移植療法と組織工学的手法により細胞から組織を再構築したうえで移植する方法がある。後者はこれまでの医学だけでは実現が困難

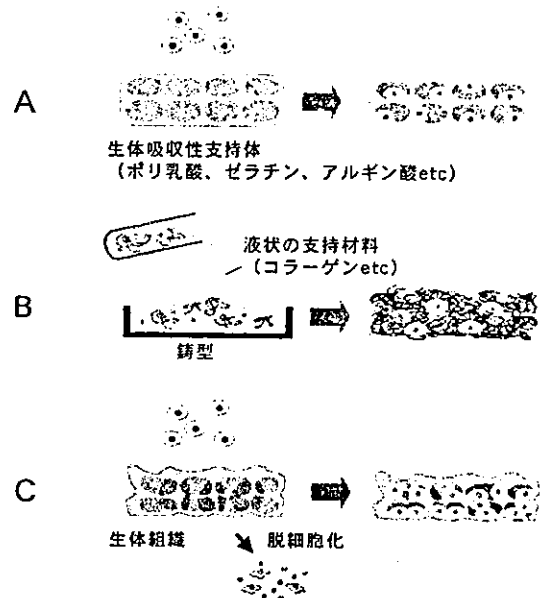
であった研究領域であり、工学的な技術との融合により急速に進歩しつつある。ここでは、血管、弁、心筋に関する組織工学の近年の動向を概説するとともに、当研究所が開発した独自の組織工学的手法「細胞シート工学」による3次元心筋組織の再構築に関する研究を紹介する。

組織工学 (tissue engineering) は学際的な学問である

組織工学は1993年工学者である Langer および外科医である Vacanti が提唱した学際的な学問である¹⁾。組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM)、細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場として3次元の生体吸収性材料を用いた。細胞を3次元の支持体に播種・培養後、生体内に移植すると、生体吸収性の支持体が徐々に分解、細胞が産生する ECM と置換され生体に類似した組織が再構築されるという手法である。組織工学において、組織再生の足場として用いられる生体材料の多くは生体吸収性の高分子である。これには天然高分子と合成高分子がある。いずれも酵素分解あるいは加水分解によって高分子主鎖が切断され、吸収される。天然高分子のなかで最も多く利用されているのは生体の ECM の主成分であるコラーゲンである。一方、合成高分子としてはポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、およびそれらの共重合体が最も盛んに使用されている。また、生体由来組織が支持体として用いられる場合もある。具体的な方法としては①生体吸収性高分子からなる支持体を作成し、それを足場として細胞を播種する手法 (図① A)、②溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合する手法 (図① B)、③生体由来組織を脱細胞化したのちにそれを支持体として細胞を播種する方法がある (図① C)。これら生体吸収性の3次元生体材料を細胞の足場として用いた組織工学の研究は、ほとんどすべての組織に対しておこなわれている。

組織工学により血管の再構築が可能である

狭窄あるいは閉塞血管に対する外科的治療法としてはポリエチレンテフタレート (PET, ダクロン) やポリテトラフルオロエチレン (ePTFE, Gore-Tex) などの合成素材を用いた人工血管の置換術がおこなわれ、口径の大きな血管では開存率も向上している。しかし、冠動脈などのような小口径 (<5 mm) の血管に対する治療に関しては血管閉塞が高率に生じるため、使用できないの



図① 支持体を用いた組織工学的手法
 A: 生体吸収性高分子からなる多孔性の3次元支持体を作製、それを足場として細胞を播種する。支持体は徐々に分解し、細胞あるいは生体が産生するECMと置換されて組織が再生される。B: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したのちモールドに流し込み、重合させることで細胞を3次元化する。C: 生体組織を脱細胞化した結合組織を支持体として細胞を播種し、培養する。
 (著者作成による)

が現状である。さらに小児の心血管疾患に対する治療にこれまでの人工血管を用いる場合には、成長に伴って再手術が必要となる。これらの問題点を解決しうる治療法として、組織工学的手法を用いた血管の再構築・移植が追究されている。

以前より血管閉塞の原因となる血栓を防止するため、合成素材から成る人工血管の内面にあらかじめ血管内皮細胞を播種・培養しておくという研究が数多くおこなわれてきた²⁾。近年、種々の前処理法により細胞接着性を向上させることも可能となっているが、長期的な開存性に関しては明確な有効性が示されていないのが現状である。生体吸収性支持体を用いる手法としては Niklason らがポリグリコール酸 (PGA) を管状にした支持体に平滑筋細胞を播種培養後、血管内皮細胞を内面に播種、拍動流下で培養することにより血管組織を再構築した³⁾。Shin'oka ら⁴⁾はこの技術を小児先天性疾患の患者を対象に初めて臨床応用した。その結果、手術後の血管の開存

が確認されている。支持体として異種の血管や小腸粘膜下組織を脱細胞化したものを用いた研究もおこなわれている。一方、L'Heureux ら⁹⁾は平滑筋細胞および線維芽細胞をアスコルビン酸を含む培地で1ヵ月程度培養することで細胞自身が作り出す細胞外マトリクスを増大させ、ハンドリングできる程度の厚さにした。さらにそれをチューブに巻き付けて管状にしたのち、内面に血管内皮細胞を播種、還流培養装置を用い管内を拍動還流することで2000 mmHgまで耐えうる血管組織を実現した。また、Campbell ら¹⁰⁾はシリコンチューブを腹腔内にいれることでその周囲に管状の血管様組織を作製、それを血管と置換したところ長期に開存することを示した。

このようにいくつかの手法で生体に類似した血管組織の構築は可能になっているが、小口径で動脈圧に耐えうる血管をいかに作るかが課題となっている。

心組織工学により、心臓弁の再構築が可能である

弁膜症に対する代替弁には従来、機械弁と異種動物由来の生体弁がある。前者は血栓予防のため抗凝固療法を生涯にわたり必要とし、感染に対する注意も必要である。後者に関しては石灰化や耐久性の問題があり、術後遠隔期の再手術の可能性がある。またいずれの場合も先天性奇形など若年の患者に対する治療としては、時間の経過で成長することがないため不十分である。これらの諸問題を解決するために組織工学による心臓弁の再構築が追求されている。

Mayer らのグループは生体分解性高分子を用いた心臓弁の作製の研究を精力的におこなっている⁷⁾⁸⁾。当初はPGA-polyglactinの共重合体を用い多孔性の(porus)弁支持体を作製しそれに細胞を播種していたが、血管瘤の形成が問題となったため、近年はより強度、柔軟性にすぐれたPGA-PHA (polyhydroxyalkanoate) 共重合体やP4HB (poly-4-hydroxybutyrate) を用いた弁作製をおこなっている。作製した支持体に血管から単離・増殖させた平滑筋細胞や線維芽細胞を含む細胞を播種・培養後、表面に内皮細胞を播種、数日中に動物に対する弁置換術をおこなっている。彼等の報告ではヒツジに移植後5ヵ月は支障なく機能していたとしており、強度的にも生体

に近いものが作製されている。

細胞の足場として脱細胞化した異種動物弁を用いる研究もおこなわれている。従来グルタルアルデヒドを用いた固定がおこなわれているが、移植後の石灰化などの問題がある。これに対しては種々の脱細胞化法が追求されており、CryoLife社は特殊な弁処理技術を使い、ブタ心臓弁を脱細胞化したSynerGraftを開発、すでに細胞を播種しない形で臨床応用されている。現在、これに細胞を播種して弁組織を再生する研究がおこなわれている。

その他、コラーゲンやフィブリンなど種々の生体吸収性支持体を用いた弁組織の再構築がおこなわれているほか、バイオリアクターを用いて負荷を加え、生体外で組織化することもおこなわれている。

組織工学による心筋組織再構築の研究が始まっている

心筋の組織再生は細胞移植療法として1990年代前半から研究され、虚血性心疾患や拡張型心筋症に対する細胞移植の有効性が示されてきた⁹⁾。現段階ではヒトに移植可能な心筋細胞のソースが確立されていないため、その代替として自己の筋芽細胞や骨髄細胞の心筋への注入による治療が臨床応用されている¹⁰⁾。しかしながら、これらの細胞移植療法では細胞が互いに解離した浮遊液として組織内に注入されるために移植場所の制御が困難なことや、流出・壊死により細胞が損失することが新たな課題となっている。また、単離した細胞の移植では先天性心疾患など欠損組織に対する治療は不可能である。そこで次世代の心筋再生治療として、組織工学の技術を用い、体外で心筋組織を再構築して移植用のグラフト(心筋パッチ)を作製する研究が追求されている。多くの研究において、LangerおよびVacantiが提唱したコンセプトが用いられている。

Papadaki ら¹¹⁾はポリグリコール酸からなる生体吸収性の支持体に心筋細胞を播種、回転式のバイオリアクターを用いることによって心筋様組織を構築、その電気的特性を解析している。また、Li らのグループはスポンジ状のゼラチンを使った心筋グラフトを作製、心筋梗塞モデルに移植したところ心機能の改善を認め、さらに右

心系心筋欠損部に移植したところ、ゼラチンが完全に分解された後も組織として残存し欠損部を補完したと報告している¹²⁾¹³⁾。生体吸収性高分子としてアルギン酸を用いた Leor ら¹⁴⁾の研究では心筋梗塞モデルへの移植により心拡大が回避されたと報告している。Zimmermann ら¹⁵⁾はコラーゲン溶液と培養心筋細胞を混和しシリコン製のモールド内で培養することにより、3次元の心筋組織を作成その張力の測定を可能とした。また反復伸展刺激により細胞が配向性を獲得し肥大することを報告している。

このように培養心筋細胞と種々の生体吸収性材料を用いることにより3次元的心筋組織構築の可能性が示されており、不全心筋治療のための心筋パッチ作製に大きな期待がかかっている。

細胞シート工学により自律拍動する心筋組織再構築が可能となっている

生体吸収性の支持体を用いる組織工学的手法においては支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことや、移植後支持体の分解に伴い炎症反応が生じることが問題となっている。また骨、軟骨、血管、弁など細胞が疎な組織の作製には適しているが心筋、肝臓など細胞の密な組織を作製するには新たな技術開発が必要となっている。そこでわれわれは足場を整えることにより組織を再生するという既存のコンセプトに対し、温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できる培養基材を用い、細胞をシート状に回収、細胞シートの積層化により3次元組織を再構築する独自のコンセプト「細胞シート工学」を提唱し組織工学に取り組んでいる。

この培養基材は通常のポリスチレン培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線を用いてグラフトしたもので、通常の培養温度である37°Cでは疎水性表面となり細胞接着性であるが、32°C以下に温度を低下させることにより親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿の使用により、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく脱着させることが可能である¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、温度

を低下させることにより細胞がその下面の接着因子・細胞外マトリックスとともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合はまったく解離せず維持されるため、トリプシンを用いたときのように細胞をばらばらにすることなく、シート状に回収できる(図2)。また細胞シート下面の接着因子が新たな培養基材や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため、速やかな接着・積層化が可能である。すでに種々の細胞シートの移動・積層化を可能としている¹⁸⁾。

この温度応答性培養皿を用い、新生仔ラット心筋細胞シートを回収・重層化した。重層化後2枚の心筋細胞シートは同期して拍動し、一方の心筋細胞シートへの電気刺激が他方のシートへ伝達することが確認された¹⁹⁾。さらに形態的にも2枚の心筋細胞シートは密に接着し、ギャップジャンクションが形成されることが示された。心筋細胞シートを4層まで積層化したところ、肉眼レベルで全体が同期して拍動することが確認された。さらに重層化した新生仔ラット心筋細胞シートを移植組織に対し免疫拒絶を起こさないヌードラット(F344)の背部皮下組織に移植したところ、3週間の時点でホスト心臓の心電図とは独立した心筋移植片に固有の電位が測定された(図3)。さらに移植部を切開したところ、心筋移植組織が周期的に拍動するのが確認された。移植片には周囲の皮下組織から血管が侵入、毛細血管網が発達していた。さらに組織切片上、円柱状に伸びた心筋細胞や細胞間のギャップジャンクションなど心筋様組織の構築が観察された²⁰⁾。すでに移植後1年まで、心筋グラフトが拍動を維持したまま生着しうることを確認している。また、時間の経過とともに移植組織のサイズ、電気伝達速度、収縮力が増大することが示されており、移植した心筋組織がホストの月齢に合わせて成長しうることも示されている。重層化心筋細胞シートの心不全治療への応用に関しては大阪大学臓器機能制御外科と共同研究をおこなっているが、ラット心筋梗塞モデルへの移植実験により心機能の改善が確認されている。

このように細胞シート工学はシート状の細胞の回収という既存の技術では不可能であったことを可能としており、生体吸収性材料を用いない新たな組織工学的手法として心筋組織の再生に大きく貢献するものと考えられる。

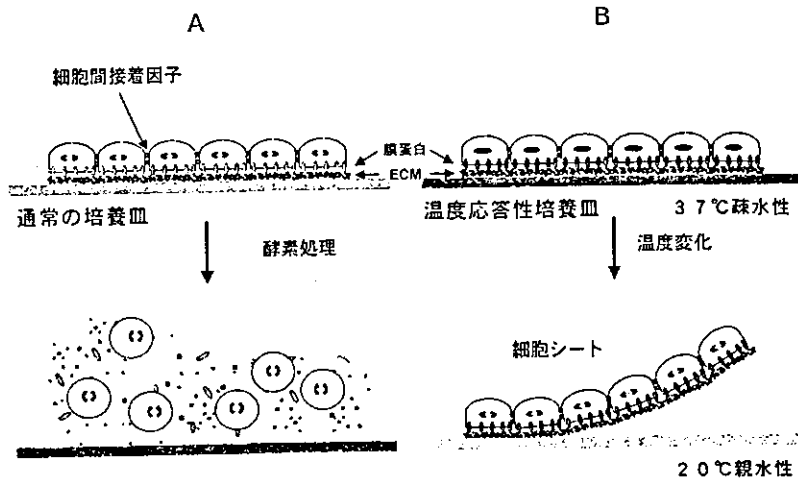


図2 温度応答性培養皿からの細胞シートの脱着
 細胞は培養皿表面とフィブロネクチンなどの細胞接着因子およびインテグリンなどの膜蛋白を介して接着する。細胞を密に培養した場合は細胞と細胞が細胞間接着因子により互いに接着する。A：蛋白分解酵素を用いた場合は細胞と培養皿の接着が解離するとともに、細胞間接着因子も破壊されるため、それぞれの細胞は解離して浮遊することになる。B：これに対し、温度応答性培養皿を使った場合、温度を下げることで培養皿が疎水性から親水性に変化し細胞非接着性となる。これにより細胞間接着はまったく影響を受けずに、シート下面のECMと培養皿表面の接着のみ解離するため細胞がシート状に脱着する。(著者作成による)

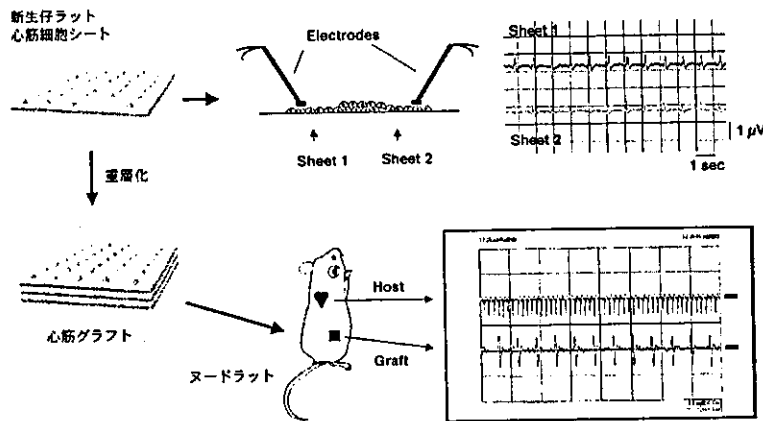


図3 新生仔ラット心筋細胞シートの重層化と移植
 温度応答性培養皿から脱着した新生仔ラット心筋細胞シートを部分的に重層化しそれぞれの単層部位で電位を測定したところ、2枚の心筋シート(Sheet 1およびSheet 2)は同期して拍動した(上段)。ヌードラットの背部皮下組織に重層化心筋細胞シートを移植したところ、3週間の時点でホストの心電図とは異なる移植グラフト由来の電位が測定された(下段)。(Shimizu T *et al*, 2002²⁰)より改変引用)

心血管病に対する組織工学において更なる医工連携が重要である

組織工学におけるひとつの大きな課題は細胞ソースで

ある。とくに心筋に関してはヒトに移植できる心筋細胞の分化誘導・大量培養法の確立が強く期待されている。このステップに関しては細胞の選別、培養を自動的にこなす装置の開発が有用かもしれない。次に3次元組織

の再構築に関しては、生体吸収性高分子を利用した組織工学としてすでに医工の融合が成果をあげているが、拍動・血流・圧力といった物理的負荷に耐える心血管組織の作製には素材、構造、分解速度などに関しより適した材料の開発が求められている。生体組織の脱細胞化法に関しては、グルタルアルデヒド処理などで生じるような細胞毒性や石灰化を回避する手段として高圧処理やマイクロウェーブ処理が用いられている（国立循環器病センター）。3次元組織の高機能化に関しては回転式の組織培養装置や反復伸展刺激装置などのバイオリアクターが工学的に開発されており、これらのデバイスを使用することでより生体に近い組織が作製されることが報告されており、今後更なる創意工夫が期待される。また、近年半導体加工技術やレーザー加工を用いた微細加工は培養表面の形態変化や細胞接着因子の局在化により細胞接着のマイクロオーダーでの制御を可能としており、より複雑な組織の構築が可能となるかもしれない。とくに作製組織にいかにか毛細血管網を構築するかが組織工学の最大の課題となっており、微細加工技術が極めて重要になると推察される。最後に細胞移植に関してはNOGAシステムなどのカテーテルを用いた治療デバイスの開発が進んでいるが、組織工学的に作成された組織の移植を目的としたデバイスの開発はまだおこなわれておらず、今後できるだけ低侵襲で再生組織を移植できるような医療器機の開発も必要となるであろう。

おわりに

生体組織に匹敵する組織を構築し機能不全に陥った臓器を補助・置換するには、医学と工学の融合による既存のコンセプトにこだわらない新たな技術開発が必須である。



文 献

- 1) Langer R *et al* : Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926, 1993
- 2) Helen M *et al* : Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res* 92 : 1068-1078, 2003
- 3) Niklason LE *et al* : Functional arteries grown *in vitro*. *Science* 284 : 489-493, 1999
- 4) Shin'oka T *et al* : Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344 : 532-533, 2001
- 5) L'Heureux N *et al* : A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12 : 47-56, 1998
- 6) Campbell JH *et al* : Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* 85 : 1173-1178, 1999
- 7) Sodian R *et al* : Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 6 : 183-188, 2000
- 8) Hoerstrup SP *et al* : Functional living trileaflet heart valves grown *in vitro*. *Circulation* 102 : III 44-III 49, 2000
- 9) Reinlib L *et al* : Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease ? : A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 101 : E182-E187, 2000
- 10) Menasche P *et al* : Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357 : 279-280, 2001
- 11) Papadaki M *et al* : Tissue engineering of functional cardiac muscle : molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 : H168-H178, 2001
- 12) Li RK *et al* : Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100 : II 63-II 69, 1999
- 13) Sakai T *et al* : The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 : 932-942, 2001
- 14) Leor J *et al* : Bioengineered cardiac grafts : A new approach to repair the infarcted myocardium ? *Circulation* 102 : III 56-III 61, 2000
- 15) Zimmermann WH *et al* : Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90 : 223-230, 2002
- 16) Yamada N *et al* : Thermo-responsive polymeric surfaces ; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem* 11 : 571-576, 1990
- 17) Okano T *et al* : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27 : 1243-1251, 1993
- 18) Shimizu T *et al* : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 24 : 2309-2316, 2003
- 19) Shimizu T *et al* : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered

cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002

- 20) Shimizu T *et al* : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90 : e40-e48, 2002

SHIMIZU Tatsuya

しみず・たつや

1992年, 東京大学医学部医学科卒業.

1992~1995年, 内科研修, 循環器内科医員.

1995~1999年, 東京大学大学院医学研究科.

1999年, 東京女子医科大学医用工学研究施設助手.

2003年, 東京女子医科大学先端生命医学研究所講師.

専門: 再生医学・循環器内科.

研究テーマ: 組織工学による心筋組織再構築.

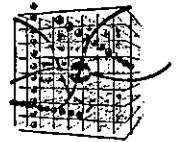
趣味: 旅行.

E-mail: tshimizu@abmes.twmu.ac.jp

組織工学における血管新生

Tatsuya Shimizu © 清水達也

東京女子医科大学先端生命医科学研究所



Summary

これまでに生体吸収性の支持体に細胞を播種して組織を再構築する組織工学的手法により、骨・軟骨など細胞密度の低い組織の再構築は可能となっているが、心臓・肝臓など細胞密度が高い組織に関しては組織内に豊富な血管網を新生する必要があり、新たな技術革新が期待されている。増殖因子により作製組織移植後のホストからの血管新生を促進する方法や微細加工技術を用いて、あらかじめ血管網を構築する方法などが追究されている。また、重層化細胞シートの多段階移植により、虚血の限界を超えた、より厚い組織の再生も可能となっており、今後の発展が期待されている。

Key words

- ◎組織工学
- ◎血管新生
- ◎心筋
- ◎細胞シート

はじめに

近年、傷害あるいは欠損した組織・臓器に対する再生医療のひとつとして、組織工学的手法により組織・臓器を再構築し移植する新たな治療法の研究が盛んに行われ、一部臨床応用されるに至っている。しかしながら、心臓・肝臓・腎臓など細胞密度の高い組織の再生に関しては、十分な栄養・酸素の供給および老廃物の除去を可能とする血管のネットワークを再生組織内にいかに新生するかが大きな課題となっている。ここでは、組織工学における血管網再構築に関する研究の現状と展望を、われわれの研究成果もふまえて概説する。

組織工学と新たな課題

1. 組織工学(tissue engineering)

組織工学は医学と工学が融合した学際的な学問である。1980年代より皮膚組織の再生の研究が行われていたが、1993年、工学者である Langer および外科医である Vacanti が、マウスの背部皮下組織内に耳の形状をしたヒトの軟骨を再生し tissue engineering

を提唱したのをきっかけに、組織工学の研究が世界的に行われるようになった¹⁾。彼らは、組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM)、細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場として3次元の生体吸収性材料を用いた。細胞を3次元の支持体に播種・培養後、生体内に移植すると、生体吸収性の支持体が徐々に分解、細胞が産生する ECM と置換され、生体に類似した組織が再構築されるという手法である。組織工学において、組織再生の足場として用いられる生体材料の多くは、生体吸収性の高分子である。これには天然高分子と合成高分子がある。いずれも酵素分解あるいは加水分解によって高分子主鎖が切断され吸収される。天然高分子の中で最も多く利用されているのは、生体の ECM の主成分であるコラーゲンである。一方、合成高分子としては、ポリ乳酸 (PLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、およびそれらの共重合体が最も盛んに使用されている。また、生体由来組織を脱細胞化して支持体として用いる場合もある。これら生体吸収性の3次元生体材料を細胞の足場として用いた組織工学の研究は、ほとんどすべての組織を対象に行われている。すでに軟骨、皮膚、太い血管に関しては臨床応用可能な組織が作製され、一部商品化されているものもある²⁻⁴⁾。

2. 細胞密度の高い組織の再構築と虚血による限界

組織・臓器は細胞および ECM より成り立っているが、骨・軟骨のように細胞密度の低い組織もあれば、心臓、肝臓、腎臓などのように細胞密度の高い組織もある。生体吸収性の高分子を細胞の足場として用いる手法で作製した組織に関しては、最終的には支持体が ECM に置換されるため、ECM 成分の多いすなわち細胞密度の低い疎な組織ができる。したがって、支持体を用いた手法では細胞密度の高い組織・臓器を再構築することは困難であり、新たな技術開発が必要となっている。細胞密度の向上を目的に、できるだけ多孔質の高分子材料の開発も進められているが、細胞播種

法などに課題があり、十分な成果は挙げられていない。

一方、組織・臓器は毛細血管網により酸素・栄養の供給を受け、老廃物が除去されている。細胞密度が低い場合は、この血管網が少なくても ECM 内での拡散によりまかなわれるが、細胞密度が高い場合は組織内に十分な血管網が必要となる。実際、軟骨・靭帯組織などではミリオオーダーで無血管の部分も存在するが、心筋組織では血管が約 10% の体積を占有しており、毛細血管相互の距離も約 15 μm ときわめて高密度な血管網が形成されている⁵⁾⁶⁾。したがって細胞密度の高い組織の再構築にとっては、それに応じた十分量の毛細血管網をいかに再生組織内に新生するかがきわめて重要な課題になっている。

毛細血管網を伴わず培地や間質液の拡散のみで生存できる組織のサイズは、細胞種、細胞密度および周囲の環境に応じて異なる。細胞密度の高い組織に関するこれまでの報告として、単離臍組織を *in vitro* で培養した場合、組織内の酸素濃度は中心部に近づくほど低下し、およそ表層より 250 μm 以上では虚血に陥り壊死が生じるということが示されている⁷⁾。また、心筋組織の再生を目的に、PGA やコラーゲンを支持体として心筋細胞を播種・培養した場合は、結果的に表層の 50~100 μm の部分にのみ細胞が密な心筋組織を再構築することが可能であるが、中心部には細胞がほとんど生着しないことが明らかとなっている⁸⁾⁹⁾。組織の酸素・栄養の拡散を増進する目的で培養液を還流したり、組織を回転培養装置内で培養することにより、2倍程度の厚みの組織を作製することは可能になっている¹⁰⁾。しかしながら、これらの効果には限度があり、毛細血管網が無い状態で再生可能な高細胞密度の組織のサイズの限界は、およそ数百 μm と考えられている。

再生組織における毛細血管網の新生

1. *in vivo* での血管新生促進

前述したように、細胞密度の高い組織のスケールア

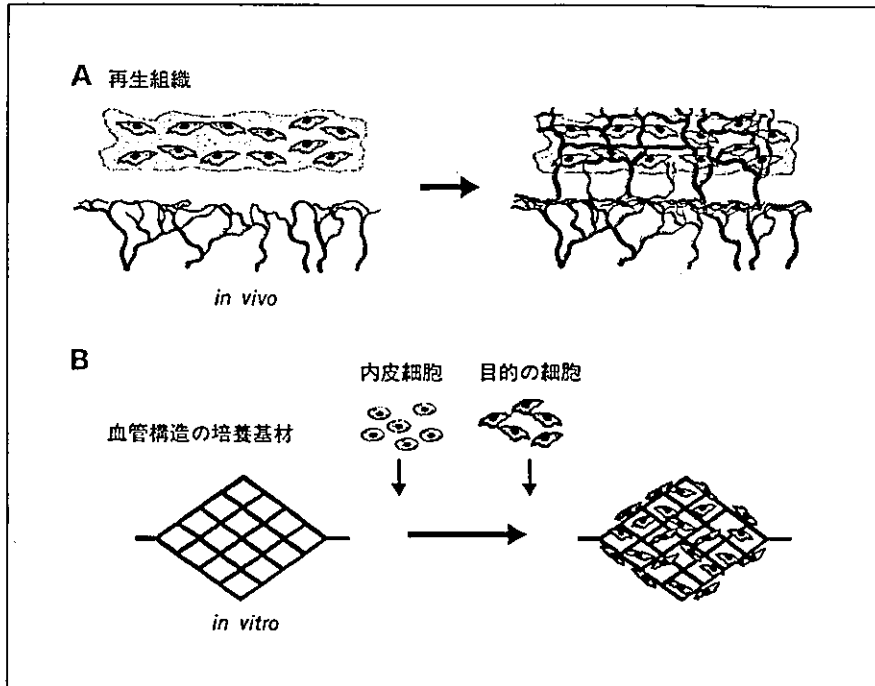


図1. 組織工学における血管網新生のアプローチ

ップには、酸素・栄養の供給，老廃物の排除のために、再生組織内にいかに毛細血管網を誘導するかが最大の課題となっている。これまで再生組織への血管網に関しては、移植後の宿主からの血管新生を待つのが一般的な手法である(図1A)。この場合、移植後血管網が新生してくるまでの初期段階において、拡散のみで生存できるか否かが最終的な組織のサイズを規定することになる。そこで、より厚い組織を作るひとつのアプローチとして、移植後の血管新生を促進する方法がある。血管新生を促進する因子としてVEGF(vascular endothelial growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor)などが挙げられるが、これらの因子を再生組織の移植とともに導入することにより血管新生を促進する方法が考えられる。蛋白単独の投与であると作用時間が短いため、ゼラチンハイドロゲルなどのデリバリーシステムを用い徐放する必要がある(前項参照)。また、これらの因子の遺伝子を移植する組織に導入し

ておくことも有効と考えられる。一方、血管網の構成成分である内皮細胞，平滑筋細胞，あるいはそれらの幹・前駆細胞を組織再構築時に共培養することで、これらの細胞が*in vivo*での血管網構築の構成成分として寄与し、毛細血管網の新生を促進する可能性もある。骨髓細胞や血管内皮前駆細胞は単独での注入療法による血管新生効果が確認されていることから、これらの細胞との共培養が有効かもしれない。さらに、液性因子と細胞あるいは遺伝子導入した内皮細胞の使用といったコンビネーションも、よりいっそう再生組織への血管新生を促進する可能性がある。

2. *in vitro*での毛細血管網の再構築

*In vivo*での血管新生に対し、*in vitro*であらかじめ毛細血管網を新生し、組織を再構築したうえで移植するアプローチが追求されている(図1B)。すでに種々の微細加工技術を用い、培養基材や高分子材料をマイクロオーダーで加工することが可能となっており、

網目状に内皮細胞をパターン化して培養することも可能となっている¹¹⁾。3次元的な網目構造の材料開発も可能と考えられ、これらに内皮細胞を播種し周囲に目的の細胞を培養することで、毛細血管網を伴った組織を *in vitro* で再生するという試みがなされている。また、血管構造を維持した脱細胞化組織を利用する研究グループもある。

これら *in vitro* で血管網を構築したうえで目的の細胞をその周囲に培養するアプローチにおいては、いかに網目構造に内皮細胞を播種し、またその間隙に目的の細胞を密に播種するか、また、最終的に生体に移植するためにはホストの血管と吻合可能な太い血管が必要であるが、そのような血管を毛細血管網とともにいかに再構築するかに関し、さらなる技術開発が追求されている。また、作製した血管網が管状を維持して再生組織内において機能的な血管となり得るのかどう

かという重要な点に関し、今後の研究により明らかにしていく必要がある。

組織工学における新たな展開

1. 細胞シート工学

生体吸収性の支持体を用いる組織工学的手法においては、支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことや、また移植後支持体がECMに置換されることから、細胞が疎な組織の作製には適しているが、細胞の密な組織を作製するには不向きであることは前述した。そこでわれわれは、この支持体を用いる手法に対し、温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できる培養基材を用い、細胞をシート状に回収、細胞シートの積層化により3次元組織を再構築する独自のコンセプトを提唱し、細胞密度の高い組織の再生を目指してい

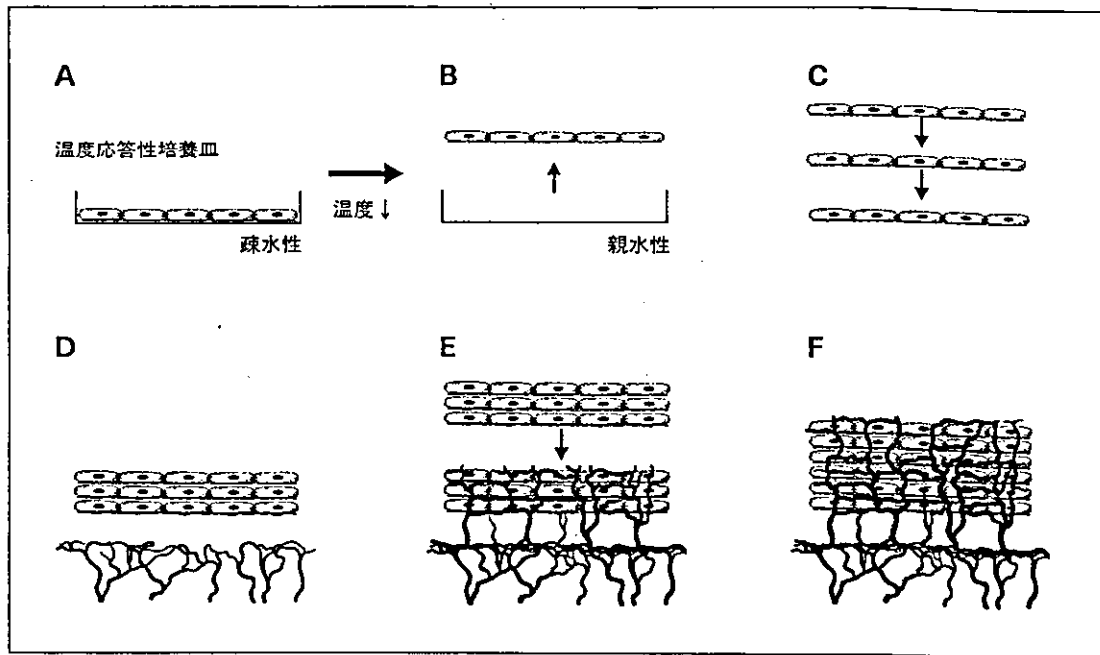


図2. 細胞シートの回収・重層化と心筋グラフトの多段階移植による血管網新生

A, B: 温度応答性培養皿にコンフルエントに培養した細胞は、温度を下げるだけでシート状に回収できる。C: 重層化により細胞密度の高い3次元組織を構築できる。D~F: 重層化心筋細胞シートを移植後血管網が新生するのを待って多段階に移植することにより、虚血の限界を超えることが可能である。

る。

この培養基材は、通常のポリスチレン培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)を電子線を用いてグラフトしたもので、通常の培養温度である 37°C では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32°C 以下に温度を降下させることにより親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿の使用により、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく脱着させることが可能である¹²⁾。さらに、細胞を密に培養し、細胞が互いに接着した状態では、温度を降下させることにより細胞がその下面の接着因子・ECM とともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるため、トリプシンを用いた時のように細胞をばらばらにすることなく、シート状に回収できる(図 2 A, 2 B)。また、細胞シート下面の接着因子が新たな培養基材や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため、速やかな接着・積層化が可能である(図 2 C)。すでに種々の細胞シートの移動・積層化を可能としているほか、角膜に関しては臨床にも応用されている¹³⁾¹⁴⁾。

2. 細胞シート工学による心筋組織再構築

われわれはこの細胞シート工学により、新生仔ラット心筋細胞シートを重層化することで、細胞密度の高い心筋組織の再構築を目指している。2枚の心筋細胞シートは重層化後1時間以内に同期して拍動し、一方の心筋細胞シートへの電気刺激が他方のシートへ伝達することが確認された¹⁵⁾。さらに、形態的にも2枚の心筋細胞シートは密に接着し、gap junction が形成されることが示された。心筋細胞シートを4層まで積層化したところ、肉眼レベルで全体が同期して拍動することが確認された。さらに、重層化心筋細胞シートをヌードラットの背部皮下組織に移植したところ、移植後1年まで心筋グラフトが拍動を維持したまま生着し得ることが明らかとなった。移植片には十分な毛細血管網が発達しており、円柱状に伸びた心筋細胞が

gap junction を介して密に接着している組織像が観察された¹⁶⁾。

3. 多段階移植による血管新生

このように、細胞シートの重層化により細胞密度の高い組織の再構築は可能となっているが、より多くの細胞シートを重層化するには虚血による厚みの限界を克服する必要がある。皮下組織における重層化心筋細胞シートに関しては、枚数にして3~4枚、組織厚にしておよそ80 μ m がその限界であり、それ以上重層化して一度に移植した場合は、初期の毛細血管網の新生が不十分なため一部が壊死を起こす。この限界を克服する方法として、前述したような血管新生因子などを用いる手法も有用であると考えられるが、われわれは *in vivo* における新たなアプローチとして、最初に移植した重層化心筋細胞シートに十分な血管が新生されるのを待って新たな重層化心筋細胞シートを繰り返し移植することにより、毛細血管網を伴ったより厚い心筋組織を構築することを試みた(図 2 D~2 F)。温度応答性培養皿上から低温処理により脱着した細胞シート3枚を重層化し、ヌードラット背部皮下組織に移

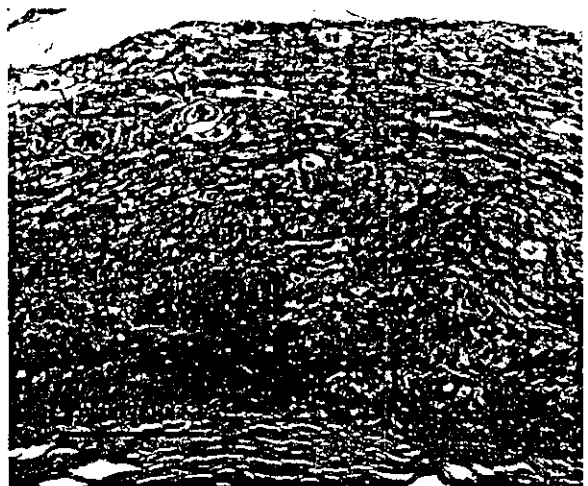


図3. 重層化心筋グラフトの組織切片像(Azan染色)
再生組織内には赤血球(橙色)を含む血管網が多数認められる(矢印)。

植した。その翌日、この心筋グラフトの上に次の3層の心筋グラフトを移植した。1週間後、2つの移植組織は完全に同期して自律拍動し、一方への移植グラフトへの電気刺激が他方の移植片に伝達されることが確認された。また、組織切片上、全層にわたって虚血による壊死は認めず、毛細血管網を伴ったより厚い心筋組織の構築が可能となった(図3)。さらにこの多段階移植を反復したところ、同期して拍動する厚さ約1mmの心筋組織の再構築が可能となった。さらに既存血管上に移植を反復することにより、血管付きの心筋グラフトを作製し、異所性に移植することにも成功している。このように、細胞シートと細胞シート、そして移植グラフトと移植グラフトの直接的な接着を可能とする独自の組織工学的手法により、細胞が密で電気的にも同期し、虚血の限界を超えた、より厚い心筋組織の再生が可能となっている。

おわりに

以上のように、組織工学においては細胞密度の高い組織の再構築、それに伴う毛細血管網の新生が大きな課題となっており、種々のアプローチで研究開発が進んでいる。その中で細胞シート工学を基盤とした *in vivo* における既存血管上への多段階移植による異所性再生組織の作製は、再生医療における新たな可能性を示すものと考えられる。一方、*in vivo* において血管が周囲の細胞と相互作用しながら組織中にネットワークを形成することを鑑みると、*in vitro* での毛細血管網の新生に関しては、前述したような血管網を再構築したうえで、その後目的の細胞を播種する方法よりも、それぞれの細胞が共存した状態で組織の再構築を試みる方が機能的な血管網が新生するのではないかと考えられる。実際、皮膚の線維芽細胞と血管内皮細胞を3次元的に共培養することにより、毛細血管網が新生し得ることが示されている¹⁷⁾。最近、われわれも *in vitro* 心筋細胞シート内で内皮細胞が網目構造を形成し得るという新知見を得ており、今後、組織工学にお

いて *in vitro* 共培養系での毛細血管網新生のメカニズムの解明ならびにその制御に関する研究が重要になってくると考えられる。

◎文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920-926, 1993
- 2) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895, 1994
- 3) Kirsner RS, Falanga V, Eaglstein WH: The development of bioengineered skin. *Trends Biotechnol* 16: 246-249, 1998
- 4) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344: 532-533, 2001
- 5) Petersen W, Tillmann B: Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)* 200: 325-334, 1999
- 6) Hossler FE, Douglas JE: Vascular Corrosion Casting: Review of Advantages and Limitations in the Application of Some Simple Quantitative Methods. *Microsc Microanal* 7: 253-264, 2001
- 7) Schrezenmeier J, Kirchgessner J, Gero L, et al: Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* 57: 1308-1314, 1994
- 8) Papadaki M, Bursac N, Langer R, et al: Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H168-H178, 2001
- 9) Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al: Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11: 683-694, 1997
- 10) Radisic M, Euloth M, Yang L, et al: High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 82: 403-414, 2003
- 11) Kaihara S, Borenstein J, Koka R, et al: Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 6: 105-117, 2000
- 12) Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27: 1243-1251, 1993

- 13) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 24 : 2309-2316, 2003
- 14) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004
- 15) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002
- 16) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90 : e40-e48, 2002
- 17) Hudon V, Berthod F, Black AF, et al : A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* 148 : 1094-1104, 2003