

Fig. 3. Temperature-regulated adhesion of ECs onto patterned dual thermoresponsive surfaces: (a) patterned metal mask with 1 mm \varnothing holes. EC morphologies cultured on pattern-grafted dishes for 3 days. (b) at 37°C, and (c) at 27°C; (d) grown ECs on P(IPAAm-BMA) co-grafted domains 1 day after transfer to 37°C; (e) complete surface coverage of ECs after 3 days at 37°C; (f) reducing culture temperature leads to spontaneous cell monolayer detachment from hydrated culture surfaces. Scale bars: (a)–(c) 1 mm, and (f) 1 cm.

In culture, the majority of IPAAm sequences preferentially distribute to the water interface in order to show surface thermoresponsive nature, while BMA units may act to anchor and restrict the mobility of PIPAAm chains and to increase the hydrophobicity of PIPAAm chains. Such a characteristic may have a crucial role in cell adhesion and lifting behaviour as will be discussed in the following section.

3.2. Temperature-regulated site-selective EC adhesion

Patterned dual thermoresponsive surfaces were then used to investigate cell adhesion behaviour depending on culture temperature. ECs were seeded at a density of 1.0×10^5 cells/cm² onto patterned surfaces, and cultured at temperatures of 37°C and 27°C, respectively, for 3 days. Cells cultured at 37°C adhere completely over the surface without preference for different grafted polymers, indicating that both surface domains exhibit relatively hydrophobic states (Fig. 3b), whereas at 27°C cells adhere only onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains with no cell adherent to hydrated PIPAAm regions (Fig. 3c). Since BMA units restrict PIPAAm chain mobility and also increase chain hydrophobicity, P(IPAAm-BMA) co-grafted domains adsorb serum proteins that facilitate cell adhesive characteristics. Therefore, site-selective cell adhesion on these patterned dual thermoresponsive surfaces is regulated with surface hydrophobicity, depending on culture temperature.

Patterned TCPS dishes cultured cells only on P(IPAAm-BMA) co-grafted domains at 27°C. These dishes were then transferred to an incubator thermo-

stated at 37°C to observe how cells behave on the patterned dual thermoresponsive surfaces. One day after the temperature change, cells started to proliferate, expanding into areas beyond the initially occupied circular P(IPAAm-BMA) co-grafted domains (Fig. 3d). This expansion into the matrix occurred because cell repellent PIPAAm at lower temperature becomes dehydrated and hydrophobised at the elevated temperature, and both domains are then cell adhesive. Eventually, cells cover the entire surface to reach confluence (Fig. 3e). These confluent cell monolayers on the patterned thermoresponsive surfaces then can be detached as a tissue-like cell sheet by reducing culture temperature again from 37°C to 20°C where both surface chemistries become hydrophilic and no longer cell-adhesive (Fig. 3f). According to the XPS data, IPAAm sequences concentrated at the TCPS surface, adjacent to adherent cell monolayers, consistent with their ability to force adherent cells from the surface upon hydration. Selective cell adhesion on the desired regions of the patterned surfaces and recovery of confluent cultured cell monolayers were achieved simply by regulating culture temperature.

3.3. Patterned co-culture of two cell types

By exploiting these temperature-dependent surface property alterations, patterned co-culture of HCs and ECs on the patterned dual thermoresponsive surfaces was then performed. Seeded rat primary HCs adhered only onto relatively hydrophobic P(IPAAm-BMA) co-grafted domains without cells adhered onto the PIPAAm-grafted matrix at 27°C in an initial 5-h culture

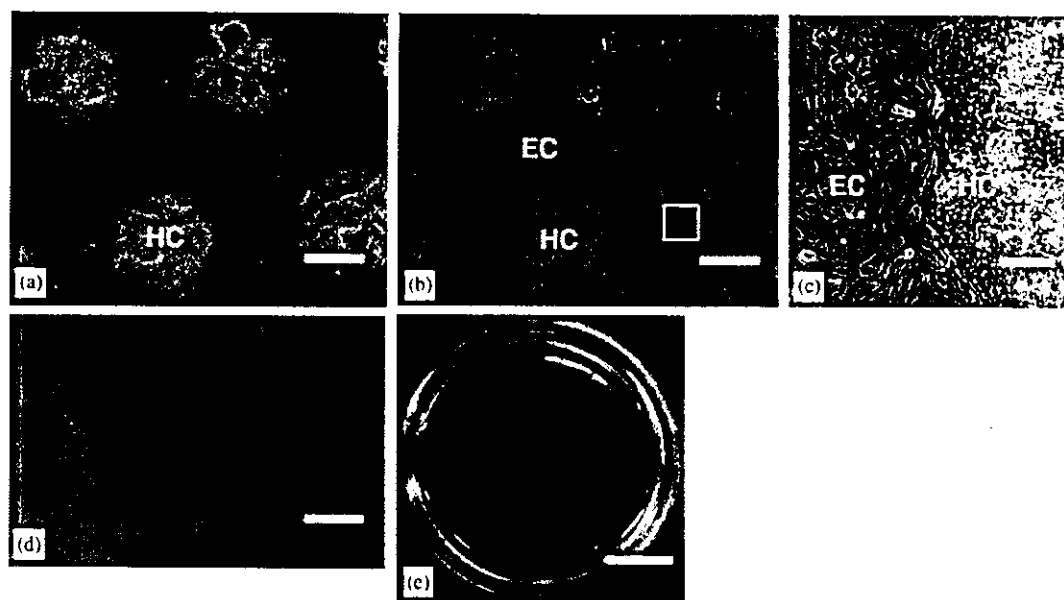


Fig. 4. Patterned co-culture of HCs and ECs: (a) Selective adhesion of rat primary HCs onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains cultured at 27°C for 2 days and then at 37°C for additional 2 days. (b) Sequentially seeded ECs adhere to hydrophobised PIPAAm regions and co-culture with pre-seeded HCs at 37°C into organised patterns. (c) Magnified view of the periphery of patterned co-cultures (square region in (b)). (d) Reducing culture temperature to 20°C induces spontaneous detachment of the patterned co-cultured cell monolayer. (e) Macroscopic view of detaching co-cultured cell monolayer from patterned dishes. Scale bars: (a), (b) and (d): 0.5 mm, (c): 0.2 mm, and (e): 1 cm.

period. After an additional 2-day culture at 27°C, the temperature was then raised to 37°C in order to promote seeded HC spreading, and P(IPAAm-BMA) co-grafted domains were completely covered with HCs with intercellular interactions (Fig. 4a). Rapid proliferating cells such as ECs and fibroblasts tend to proliferate beyond P(IPAAm-BMA) co-grafted domains with increased culture temperature to 37°C. However, rat primary HCs did not rapidly proliferate and kept within the circular P(IPAAm-BMA) co-grafted domains even after the additional 2-day culture at 37°C. The second cell type (ECs) was then seeded onto HC-preadhered patterned surfaces. These ECs adhered and spread only onto hydrophobised PIPAAm-grafted regions at 37°C where no HCs were present. Finally, successful co-culture of HCs and ECs in coordinated monolayer patterns was achieved (Figs. 4b and c).

Patterned co-culture with opposite cell seeding order (ECs as primary cell type and HCs as the secondary) was also investigated. After ECs covered P(IPAAm-BMA) co-grafted islands at 27°C, rat primary HCs were seeded and cultured at 37°C. It is of interest that HCs, unlike ECs, did not distinguish the PIPAAm-grafted and EC-preadhered P(IPAAm-BMA) co-grafted domains, and adhered not only to hydrophobised PIPAAm matrices but also onto pre-cultured ECs. As the co-culture was extended, ECs started proliferating, expanding the area over the P(IPAAm-BMA) co-grafted domains. Finally, HCs were randomly scattered onto EC cultures. Yet, it was difficult to place two cell types into each desired

domain with this cell seeding order. Reasons why HCs tend to adhere onto EC monolayers has not been resolved.

Co-cultured cell monolayers, shown in Figs. 4b and c, completely detached from patterned dual thermoresponsive dishes as contiguous cell sheets readily using only low temperature incubation at 20°C, producing uniformly non-cell adhesive polymer-grafted domains across the surface (Figs. 4d and e). While no direct interactions occur between endogenous sinusoidal ECs and HCs in native liver tissues, cultured co-planar ECs and HCs on these patterned surfaces remain connected to each other using intact extracellular matrices secreted below them. Therefore, these two cell types are recovered as a connected cell monolayer.

3.4. Immunofluorescent studies on patterned co-cultures of HCs and ECs

To confirm site-selective adhesion of HCs and ECs on patterned surfaces, co-cultured cells (Fig. 5a) were triple-stained with rhodamine-conjugated phalloidin for F-actin, FITC-conjugated anti-rat albumin antibody for HCs, and Hoechst 33258 for nuclei of both cell types. Albumin-expressing HCs were detected with green fluorescence shown in Fig. 5b. Albumin synthesis is not detected in EC-adhered domains: these two cell domains were fluorescently distinct, indicating successful co-culture of HCs and ECs without invasion of each cell type into different domains. In our system, the first

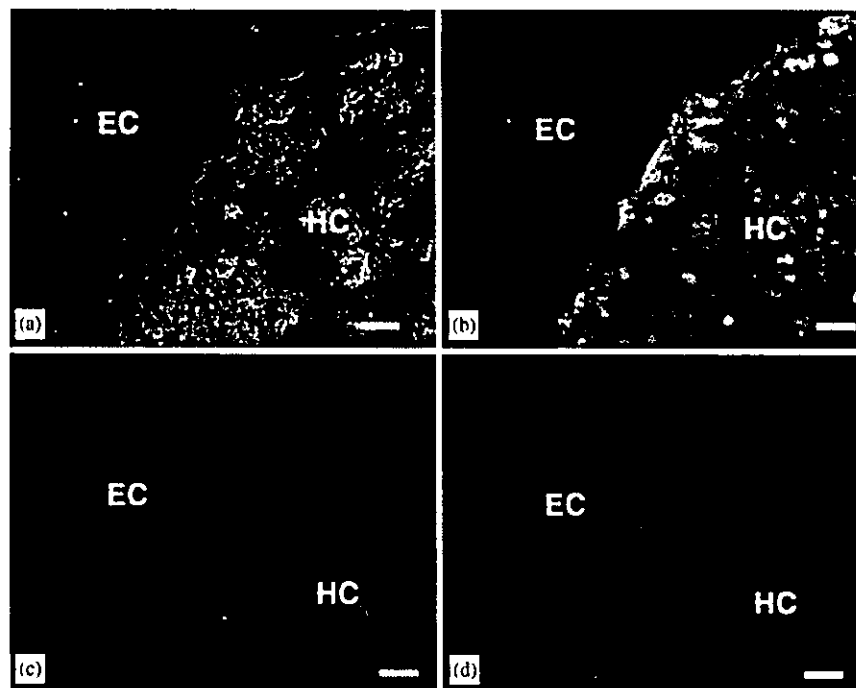


Fig. 5. Fluorescence micrographs of co-cultured cells 3 days after EC seeding. (a) Phase contrast. (b) Albumin-positive HCs (green fluorescence immunostaining) with albumin-negative ECs. (c) Nuclei staining of both cell types with Hoechst 33258 (blue). (d) Cytoskeletal actin microfilaments stained in both cell types with rhodamine-phalloidin (red). Scale bars: 100 μm .

cells were seeded at 27°C and cultured for 2 days. Cultured HCs were considered to be damaged during culture at this low-temperature incubation: HCs spread well after transfer back to the incubator set at 37°C and required co-culture up to 12–14 days to achieve cell densities equivalent to HC monoculture systems that typically occur in 6–8 days. These cells also show albumin synthesis by in situ fluorescent staining, suggesting that the cells were not irreversibly damaged during culture at 27°C for 2 days.

4. Conclusions

Results show that our patterned dual thermoresponsive surfaces permit full recovery of co-cultured cell sheets by changing surface hydrophilic/hydrophobic characteristics using culture temperature. This system should prove suitable for tissue engineering to construct complicated tissues through overlaying patterned co-cultured cell sheets. In addition, patterned surface modification using EB processes and metal masks in the present study is simple and rapid. Improved control of cell orientation and ratios of different cell types in the monolayer is essential for further applications. Patterning of surfaces with a variety of domain sizes, area fractions and shapes should be achieved by using arbitrary designed masks. Construction of tissue-like

constructs having more elaborate structures should then be possible.

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor David W. Grainger, Colorado State University, for his valuable comments and discussions throughout this research. The present research was financially supported in part by the Grant-in-Aid for Scientific Research A (Grant No. 13308055) from the Japan Society for Promotion of Science, and by the Grant-in-Aid for “The Centre for Tissue Engineering and Regenerative Medicine” in the COE Program for the 21st Century, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

References

- [1] Bhatia S, Balis U, Yarmush M, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13: 1883–900.
- [2] Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DID, Whitesides GM, Ingber DE. Engineering cell shape and function. *Science* 1994;264:696–8.

- [3] Lu L, Kam L, Hasenbein M, Nyalakonda K, Bizios R, Gopferich A, Young JF, Mikos AG. Retinal pigment epithelial cell function on substrates with chemically micropatterned surfaces. *Biomaterials* 1999;20:2351–61.
- [4] Sugawara T, Matsuda T. Photochemical surface derivatization of a peptide containing Arg–Gly–Asp (RGD). *J Biomed Mater Res* 1995;29:1047–52.
- [5] Ito Y, Chen G, Guan Y, Imanishi Y. Patterned immobilisation of thermoresponsive polymer. *Langmuir* 1997;13:2756–9.
- [6] Bhatia S, Yarmush M, Toner M. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;34:189–99.
- [7] Roth EA, Xu T, Das M, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials* 2004;25:3707–15.
- [8] Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999;20:2363–76.
- [9] LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A. Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Adv Drug Deliver Rev* 1996;22:133–86.
- [10] Yamato M, Kwon OH, Hirose M, Kikuchi A, Okano T. Novel patterned cell coculture utilising thermally responsive grafted polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;55:137–40.
- [11] Yamato M, Konno C, Utsumi M, Kikuchi A, Okano T. Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials* 2002;23:561–7.
- [12] Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002;90:e40–8.
- [13] Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilising temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 2002;62:464–70.
- [14] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 2003;24:2309–16.
- [15] Heskins M, Guillet JE, James E. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci Chem* 1968;A2:1441–5.
- [16] Bac YH, Okano T, Kim SW. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(*N,N*-alkyl substituted acrylamides) in water. *J Polym Sci: Polym Phys* 1990;28:923–36.
- [17] Kanazawa H, Yamamoto K, Matsushima Y, Takai N, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive chromatography using poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified silica. *Anal Chem* 1996;68:100–5.
- [18] Kikuchi A, Okano T. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phase for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci* 2002;27:1165–93.
- [19] Malmstadt N, Yager P, Hoffman AS, Stayton PS. A smart microfluidic affinity chromatography matrix composed of poly(*N*-isopropylacrylamide)-coated beads. *Anal Chem* 2003;75:2943–9.
- [20] Kikuchi A, Okuhara M, Karikusa F, Sakurai Y, Okano T. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci: Polym Ed* 1998;9:1331–48.
- [21] Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 2000;1:377–81.
- [22] Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;54:37–46.
- [23] Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng* 2001;7:473–80.
- [24] Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003;22:S28–34.
- [25] Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Umezumi M, Okano T. Control of cell adhesion and detachment using temperature and thermoresponsive copolymer grafted culture surfaces. *J Biomed Mater Res* 2004;69A:70–8.
- [26] Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymer surfaces: control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem: Rapid Commun* 1990;11:571–6.
- [27] Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells. *Method Cell Biol* 1976;13:29–83.
- [28] 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* 1993;27:1243–51.
- [29] Tatenos C, Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 1996;148:383–92.
- [30] Sakai H, Doi Y, Okano T, Yamada N, Sakurai Y. Thermo-responsive polymer surfaces for cell culture: analysis of the surfaces and control of the cell attachment/detachment. In: Ogata N, Kim SW, Feijen J, Okano T, editors. *Advanced biomaterials in biomedical engineering and drug delivery systems*. Tokyo: Springer; 1996. p. 229–30.
- [31] Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Ultra thin poly(*N*-isopropylacrylamide) grafted layer on poly(styrene) surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir* 2004;20:5506–11.
- [32] Childs MA, Matlock DD, Dorgan JR. Surface morphology of poly(caprolactone)-*b*-poly(dimethylsiloxane)-*b*-poly(caprolactone) copolymers: effects on protein adsorption. *Biomacromolecules* 2001;2:526–37.
- [33] Briggs D, Seah MP. *Practical surface analysis*, vol. 1, 2nd ed. Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy. Abington: Wiley; 1990.

消化器組織構築の バイオマテリアル

大和 雅之 (Yamato, Masayuki) *1, 岡野 光夫 (Okano, Teruo) *2

*1 東京女子医科大学先端生命医科学研究所助教授, *2 同先端生命医科学研究所教授



はじめに

組織工学(ティッシュ・エンジニアリング)は、当時ハーバード大学の子供病院の消化器外科医であったジョセフ・ヴァカンティとマサチューセッツ工科大学の化学者ロバート・ランガーが共同で1980年代後半に提出した新しいコンセプトである。1993年に両者の共著による“Tissue Engineering”と題された総説がサイエンス誌に掲載され、米国では組織工学研究が大きなブームとなった。ヒトの耳を背中に背負ったネズミ(ノードマウス)の写真はLIFE誌紙面を飾り、日本でも度重なり報道された(図1)。

このコンセプトが提案された当時は幹細胞に対する研究・理解が十分でなく、むしろバイオマテリアルとして総称される材料研究が主体であった。しかし、その後の幹細胞研究の圧倒的な進歩により、組織工学は組織再生のための材料研究と幹細胞研究の2輪からなる包括的な研究体系を意味するようになっていく。最近では、再生医療

(リジェネラティブ・メディスン)という言葉も広く用いられるようになった。しかし、再生医療には、組織構造をとまなわない細胞移植(細胞懸濁液の患部への注射)や、細胞成長因子の徐放化製剤投与、遺伝子治療などの細胞を使わないさまざまな治療技術も含まれるため、厳密には組織工学は再生医療の基盤技術の1つと考えるべきである。われわれは、組織工学は培養細胞を用いて組織構造を人工的に再構築するための集学的な技術体系と定義されるべきだと考えている。

生分解性高分子を利用する 第1世代型組織工学

ネズミの背中に背負われたヒトの耳に代表される第1世代型技術の根幹をなすのは、一般に生分解性高分子と総称される素材である。組織工学が提案される1980年代後半にはすでに数多くの臨床応用が行われていた造血幹細胞移植や培養表皮移植では、細胞懸濁液やたかだか数百マイクロンという非常に薄い組織が移植されるのであり、表

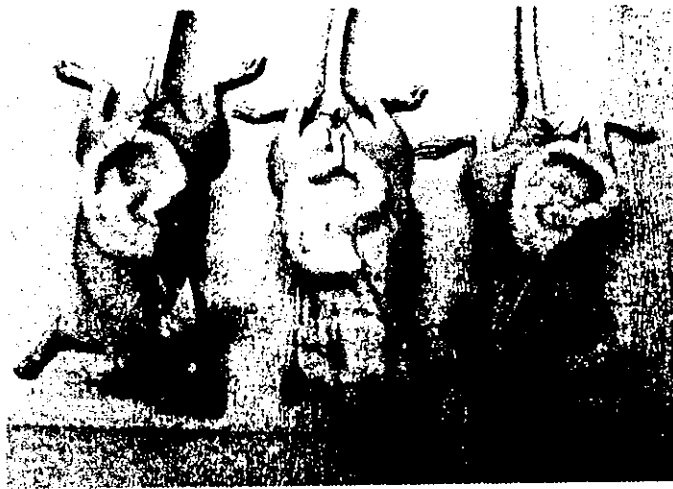


図1 ヒトの耳を背中に乗せたラット
(東京女子医科大学寺田伸一博士提供)

皮細胞の重層化は細胞自身もつ自己組織化能のみに頼っていた。これに対し、最低でも1ミリメートル程度の厚みを求めたい骨・軟骨や肝臓などの臓器では、細胞の自己組織化能のみに頼ることができないため、積極的に厚みのある組織構造を再建する手立てが必要である。ここで、その方法として高分子製の足場を用いることを提案したのがヴァカンティとランガーの大きな功績である。

ネズミの背中に乗ったヒトの耳は、ヒトの耳の形に成形した生分解性高分子製の足場に軟骨細胞を播種し、培養した後に生体へと移植する²⁾。事実上ほとんどすべての人工高分子が体内への埋入後に異物として認識され、炎症反応や線維組織によるカプセル化が生じ、ホストの身体にインテグレートされることはない。しかし、ポリ乳酸やポリグリコール酸などの生分解性高分子は体内で溶解モノマーが吸収されるか、あるいは腎排泄されるため、このような異物反応を最少に留めうる可能性がある。実際、これらの素材からなる縫合糸はすでに広く利用されている。

生分解性高分子はある一定の半減期で分解し、消失するが、その間に足場に播種された細胞やホスト由来の細胞が合成・分泌したコラーゲンやブ

ロテオグリカンなどの細胞外マトリックスと置換されることになるため、足場どおりの形を再現した組織が再生することが期待できる。ここで生分解性高分子の分解・消失速度と細胞による細胞外マトリックスの産生速度がうまく対応していないと形が崩れることになる。細胞外マトリックス産生速度は細胞数や細胞の活性に支配されているため、さまざまな精力的な研究にもかかわらず、理想的な組織再生条件は確立されていない。安定的な臨床成果を確実に得ることが必須の課題である臨床応用に際して、この問題を解決することは不可避であり、次世代再生医工学のテクノロジーとして最も早急にとりくむべき課題である。生分解性高分子と細胞の双方に関する探究と知見の蓄積が必要である。このほかにも現行の生分解性高分子には問題が少なくない。たとえば、ポリ乳酸やポリグリコール酸などの生分解性素材は非常に硬く、心臓や消化管などの伸縮性が要求される組織(現実には、骨・軟骨以外のすべての組織といつてよい)では伸縮性と生分解性を併せもった高分子の開発が求められている³⁾。

このような第1世代型の組織工学技術で作製できることが示されているのは、皮膚、血管⁴⁾、

心臓弁²⁾、軟骨、骨、気管³⁾、膀胱⁴⁾などの比較的単純な組織学的構造をもつ組織である。ヴァカンティらは生分解性高分子で作ったチューブに新生ラットから単離した腸管上皮細胞を播種し、生体に移植することで小腸や大腸様の組織構造を再生できることを示し、実際に吻合を行っている⁵⁾。現状ではラットを用いた実験であるが、同様の方法で大型動物の大きな腸管が成体由来の細胞で再生できるかは興味もたれるところである。

ただし、このような組織であってもほとんど臨床応用されていない事実を忘れることはできない。最初に作られてからすでに20年近くが経過する耳でさえ、米国では1例のヒト臨床もされていない(中国では20例以上の臨床応用があることが報告されている)。米国ではFDAの認可なしにこのような新技術のヒト臨床応用を行うことはできないことが原因の1つではあるが、このことはすなわち、FDAの承認を得るだけのデータが蓄積されていないことを意味している。

受動的足場から能動的足場へ

組織工学が提唱された当初は、幹細胞に関する理解が大幅に欠けていたこともあり、①細胞、②足場、③細胞成長因子の3つの構成要素の重要性が声高に指摘されてきた。しかし、われわれは以下に述べる理由から、これら3大要素を①幹細胞の供給、②ホスト血管系との接続、③ホスト神経系との接続の3つの観点から再考すべきであると考えている。

現行の心臓移植や肝臓移植では神経の接続なしで十分満足のいく結果が得られているが、泌尿器系や消化管系では神経系の再生は重要である。コラーゲンと合成高分子からなる人工角膜実質を開発してきたメイ・グリフィスらは、神経細胞接着性ペプチドとして知られるラミニン由来配列であるYIGSRを導入することで、ドナー由来の角膜を用いてさえ決して観察されることのない早期の神経細胞の進入が得られたことを報告している⁶⁾。

このような知見は角膜実質に限らず、ほかの神経系の導入が必要な組織の再生に用いる高分子製足場のデザインにおいても活用すべきであろう。

幹細胞については以下のような考察が重要であると考えられる。最初の組織工学といえる培養表皮の作製技術は1975年には確立しており、1981年にヒト臨床応用に成功した。これまでに、重層化扁平上皮組織の幹細胞に関する理解は、最も進んでいた造血幹細胞に次いで蓄積されていた。重度熱傷であれ母斑の治療であれ、患部の周囲や最悪の場合でも皮下などに正常皮膚が残存しており、長期的には、この部位に温存している幹細胞の患部への進入に期待することができる。一方、スチーブンス・ジョンソン症候群などの角膜上皮幹細胞疲弊症では、幹細胞は完全に消失しているため、幹細胞の移植と生着が成功しないかぎり治療効果は得られない。すべての再生医療は、幹細胞が完全に枯渇している極限から、組織中に幹細胞が潤沢に存在している逆の極限までの1次元的なスペクトルのいずれかの点に存在しており、それぞれの位置に応じて、併せて用いられるバイオマテリアルへの要求が大きく異なりうる。たとえば短腸症候群の治療や、術中に失われた短い腸管の代替物として組織工学技術を活用することを考えた場合、正常な組織中に存在する幹細胞の組織工学を用いて作製したコンストラクトへの進入が期待できる可能性がある。しかし重症肝不全などで肝実質細胞の大半が消失している場合、肝臓中の組織幹細胞に期待することは望めそうにないようである。

このような背景のもと、単に細胞集団に組織固有の形態を与え、細胞が合成・分泌する細胞外マトリックスと置換するだけの従来型の生分解性高分子製足場という受動的な存在から、積極的に幹細胞に働きかけ、組織再生に貢献するさまざまな生理活性を有する能動的な足場の開発が強く希求されている。そのためにも、消化器領域の再生医療を真に推進していくことを目指した、対象組織

の幹細胞に関する理解の十分な蓄積が必須であるように思われる。

ジェフ・ハッブルは、フィブリンの骨格に細胞接着性ペプチドを固定化して細胞接着性を向上させた上に、種々の細胞成長因子を特殊なリンカーを介して固定化した次世代型の足場の開発を行い、目覚ましい成果を上げている¹⁰⁾。ここで用いられているリンカーは、移植部位に局在することが期待されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の基質となるアミノ酸配列を有するペプチドであり、組織中でリンカーが分解され細胞成長因子の徐放が可能になるという巧妙なシステムである。

毛細血管網の導入

第1世代型組織工学の対象組織は、圧倒的に大量の細胞外マトリックスを主成分とし、細胞成分を非常に少量しか含まないため毛細血管系の要求性が非常に小さい。次世代型の組織では、むしろ細胞成分が主体であり、これらの細胞成分に酸素や栄養を供給し老廃物を除去するうえでも、またその生理学的機能を遂行するうえでも毛細血管系の導入、再生は必須である。毛細血管網を単独に再生することは、VEGFやbFGFの徐放を用いれば、生体内では不可能ではない。しかし、移植の対象になるような大きな組織を培養系で作製しようとする、これら毛細血管網の末端をポンプに接続するなどの工夫が必要である。このような工夫なしには200ミクロン以上の厚みをもつ組織は内部でネクロシスが生じてしまう。しかし、培養系でこのような末端をポンプに接続した毛細血管網を作製することは容易ではない。

前述のヴァカンティは、この問題へのアプローチとして、半導体作製を目的として開発されたマイクロファブリケーション技術を活用することを提案している¹¹⁾。すでに最先端のCPU (central processing unit)の配線幅は70ナノメートルに達しており、将来的には数ナノメートルの解像度で

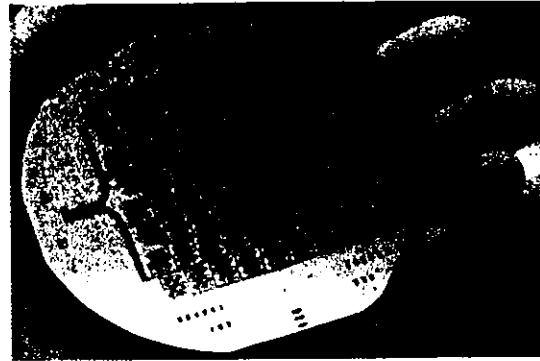


図2 シリコンウェハー上に作製した毛細血管網

生体高分子を3次元的に配置することを可能にするようなナノティッシュ・エンジニアリングが現実のものとなる可能性がないわけではないが、現行のティッシュ・エンジニアリングで要求される解像度をはるかに凌駕している。シリコンウェハー上に2次元的な毛細血管網様マイクロパターンを作製し(図2)、これを鋳型としてポリマーに転写する。導入部位からフラクタル様に多重分岐を繰り返す毛細血管網の両端は宿主血管系に接続する必要性から1ミリ程度の径をもち、一方、多重分岐の終点となる一番細いところで幅10ミクロン、深さ30ミクロンである。動脈が多重分岐を繰り返し毛細血管網となり、さらに毛細血管網の終末が再度融合を繰り返し、静脈へと合流するように、このマイクロパターンは入口と出口で対称形をなす。また分岐の数や角度などの毛細血管網の形状の詳細は、流体力学を用いたコンピュータシミュレーションによりデザインされている。すでにこの方法で作製した毛細血管網様マイクロパターンの内壁すべてに血管内皮細胞で被覆して抗血栓性を付与し、抗凝固剤を一切用いることなく、ラットの動脈、静脈に接続して血液体外循環を行うことに成功している¹²⁾。

現状では、2次元ネットワークでしかなく、また組織固有の機能を実現する実質細胞の導入もできていないため、プロトタイプの域を出るものではないが、その将来性に大いに注目したい。

細胞シート工学

最後に、再生医療へのわれわれの取り組みを紹介したい。われわれは、生分解性高分子の足場を利用することなく移植に必要な大きさの組織を再構築する新技術の開発を目指して、「細胞シート工学」とよぶ新技術の開発に体系的に取り組んできた。細胞を培養皿上で増殖させると、細胞間の接着装置を介して個々の細胞が連結した1枚の細胞シートが形成される。このような細胞シートはフィブロネクチンやラミニンなどの細胞接着蛋白質を分泌して培養皿表面に安定的に接着している。分泌された接着蛋白質は細胞外マトリックス(ECM)とよばれる固相構造を構築している。この細胞-細胞間接着およびECMの構造と機能を破壊することなく非侵襲的に細胞シートを培養皿から脱着・回収し、この細胞シートを順次重層化していくことで、3次元組織構築が可能になる。このとき、細胞シート間に構造的連結のみならず、機能的連結を再構築できれば、組織や臓器に特異的な高度な機能を再現することができるし、生体への移植後にホストの組織や臓器と一体化し、新しい再生医療が実現できる。

培養皿表面の培養細胞を脱着・回収するには、従来、トリプシンやディスパーゼなどの蛋白質分解酵素が利用されてきた。しかし、この方法では、細胞と培養皿表面を接着させている接着蛋白質を分解すると同時に、細胞膜表面の蛋白質も分解してしまい、細胞シートとして回収することはできない。そこでわれわれは培養皿の表面の構造を変化させて、細胞を脱着・回収できる全く新しい方法を開発した。すなわち、温度が37℃では表面が弱い疎水性を示し細胞が接着でき、32℃以下に下げると、培養皿表面の構造変化により親水性となり細胞が脱着するシステムの実現を世界に先駆けて完成させた。

この表面に細胞を播種すると、37℃では市販の培養皿と同様、さまざまな細胞が接着・伸展・



図3 心筋細胞シート移植により再生した心筋組織の抗第Ⅷ因子抗体染色
多数の毛細血管が再生組織内に入っている。

増殖する。その後、温度を相転移温度以下に下げるだけで、通常、培養細胞の回収に用いられているトリプシンなどの蛋白質分解酵素を必要とすることなく伸展していた培養細胞を培養皿から脱着・回収することができる。増殖した細胞が培養皿上を一面被覆した後温度を下げると、すべての細胞が連結した1枚の細胞シートとして回収される。細胞の脱着に蛋白質分解酵素を用いていないため、回収した細胞シートは、細胞-細胞間接着や培養の間に沈着したECMを保持している。このため、別の培養皿や別の細胞シート、生体組織などと再接着させる相手を選ぶことなく、回収した細胞シートを容易にほかの表面に再接着させることができる。

すでに、表皮細胞シートや角膜上皮細胞シートは、そのまま移植に供して熱傷や角膜幹細胞疲弊症の治療に用いている。通常、角膜移植では縫合が必須であるが、温度応答性培養皿を用いて作製した角膜上皮細胞シートは5分程度で角膜実質層に接着し、縫合の必要がない。また、細胞-細胞間接着が維持されているため、移植直後からきわめて良好なバリア機能を有している。また、動物実験レベルでは歯根膜細胞シート移植による歯周組織の再生にも成功している。

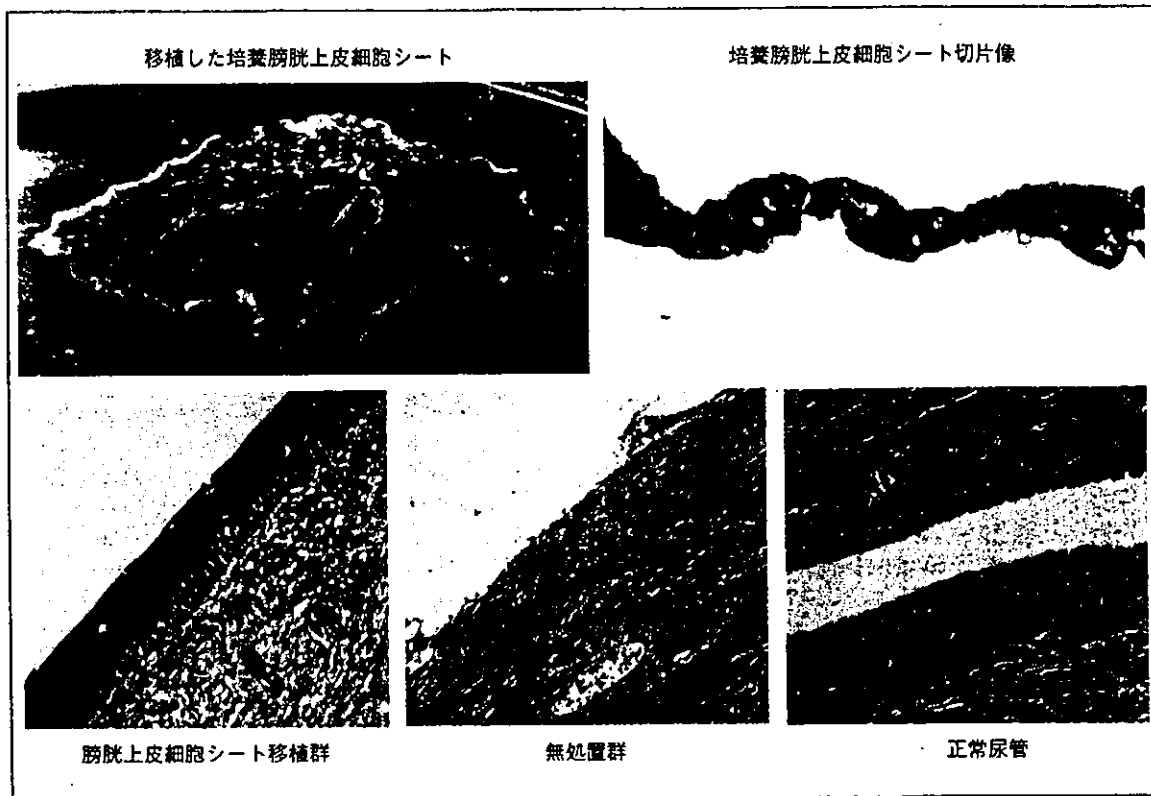


図4 脱粘膜化した胃筋層上への膀胱上皮細胞シートの移植

さらに心筋細胞シートを積層することで、肉眼でもその拍動が確認できる心筋様組織が再生できる(図3)¹³⁾。重層化させた心筋細胞シート間にギャップジャンクションが早期に形成され、複数の細胞シートが同期して拍動する。これを心筋パッチとして、心臓表面に移植すると宿主心臓と同期して拍動する。すでに、ラットの心筋梗塞モデルへの心筋パッチの移植により心筋梗塞の著明な改善がみられている。注射針を用いて細胞懸濁液を組織に注入する細胞移植では、生着率の低さや細胞の散逸が問題になっているが、細胞シート移植ではこのような問題は生じない。さらに血管内皮細胞シートを併せて移植することで宿主血管系に接続した毛細血管網が再生できた。

現在臨床で用いられている胃や腸を用いる膀胱再建術では、これらの組織の上皮に起因する合併

症が問題となっているが、培養膀胱上皮細胞シートで置換することで、このような合併症を起こさない新しい膀胱再建術の開発にも成功した(図4)¹⁴⁾。

現在、このほかにもさまざまな組織を細胞シート移植により再生させる試みに取り組んでいるが、上皮細胞シートと複数枚を積層化させた平滑筋細胞シートに必要な応じて血管内皮細胞シートを組み合わせることで、泌尿器や消化器が再生できるのではないかと仮説に基づき実験を行っている。これらの成果についてはまた別の機会に紹介したい。

References

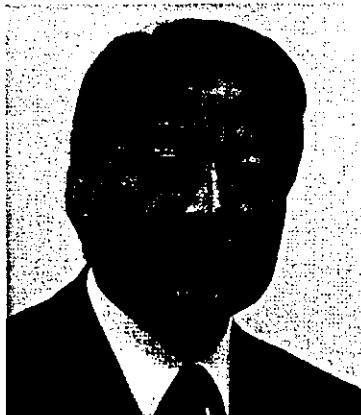
- 1) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. Science 260 : 920-926, 1993

- 2) Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, et al : Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 100 : 297-302, 1997
- 3) Lendlein A, Langer R : Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications. *Science* 296 : 1673-1676, 2002
- 4) Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al : Functional arteries grown in vitro. *Science* 284 : 489-493, 1999
- 5) Mayer JE Jr, Shin'oka T, Shum-Tim D : Tissue engineering of cardiovascular structures. *Curr Opin Cardiol* 12 : 528-532, 1997
- 6) Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, et al : A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells. *FASEB J* 17 : 823-828, 2003
- 7) Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A : De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 17 : 149-155, 1999
- 8) Grikscheit TC, Ochoa ER, Ramsanahie A, et al : Tissue-engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture. *Ann Surg* 238 : 35-41, 2003
- 9) Li F, Carlsson D, Lohmann C, et al : Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (in press)
- 10) Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, et al : Cell-demand-ed release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J* 17 : 2260-2262, 2003
- 11) Kaihara S, Borenstein J, Koka R, et al : Silicon micro-machining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 6 : 105-117, 2000
- 12) <http://www.mgh.harvard.edu/depts/tissue/projects/mains/mmain.html>
- 13) 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 : e 40, 2002
- 14) Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al : Trans-plantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue Eng* 9 : 1005-1012, 2003

巻頭言

—— バイオマテリアル：新しい生命医学の基盤テクノロジー ——

JJSB



22巻1号
平成16年1月

日本バイオマテリアル学会会長 **岡野光夫**

人工材料が生体や生体要素(蛋白質、核酸、細胞など)と接触するバイオインターフェースを分子レベルと細胞レベルで把握することは、医療デバイス、人工臓器、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、遺伝子治療、組織工学(ティッシュエンジニアリング)、再生医療など、21世紀の先端医療を飛躍させる観点からますます重要になっている。この領域はバイオマテリアルサイエンスとしてたんなる従来の縦型の学問領域の延長線上に描くのではなく、工学・薬学・医学の融合領域として位置づけることがきわめて重要である。

このような観点から、日本バイオマテリアル学会は高分子、金属、無機材料が生体とどのような相互作用を生起させるかを把握し、新しい生命医学に応用するためにバイオマテリアル設計の指針を明確にすることに大きな力を注いできている。人工関節などの整形外科用バイオマテリアル、歯科用インプラント、人工腎臓、人工肝臓、人工肺、人工血管などの人工臓器用バイオマテリアルなど、医療に大きな貢献を果たしてきた。

最近では、生分解性の乳酸-グリコール酸コポリマーの微粒子からペプチドを徐放させた前立腺がん治療のリューブリンは、日本の製薬会社からの大ヒット商品となった。この生分解性の高分子を足場として、軟骨あるいは骨細胞を導入して軟骨や骨の組織再生を行う手法が、ハーバード大学 Vacanti 教授と MIT の Langer 教授によって提唱され、世界的なブームとなって今日に至っている。まさに、バイオマテリアルが新しい領域を拡大しており、このような新領域をさらに大きく発展させるにはバイオマテリアルの基盤テクノロジーの充実と飛

躍が必須である。

創造は従来の領域の縦型の枠組みを超えて、異種の学問領域やテクノロジーを融合させるなかから生まれる。遺伝子チップを例にあげて考えてみると、アメリカではすでに30年以上前からバイオメディカルエンジニアリング(BME)の学部や学科をスタートさせ、遺伝子は必修の科目であった。リソグラフィーを専門にする研究者は遺伝子のことをよく知っており、これにより遺伝子チップという新コンセプトを世界に先駆けて創造するに至っている。

一方、日本は、リソグラフィーを専門とする人に遺伝子のことを話すと、まず100人が100人、“私の専門ではありません”と言うし、そう信じている。逆に、遺伝子を専門とする研究者は、リソグラフィーは別世界の領域であると信じている。このような社会のなかで遺伝子チップを考えることは難しい。しかし、アメリカで新コンセプトを示せばただちにそれを“まね”することはできる。日本のお家芸の、この“まね”も、韓国や中国の社会の進展によりいつまで通用するかわからない。

いま、日本では、学者や研究者たちがそれぞれ“私の専門でない”と言っているところに新領域がつぎつぎと出来、新産業が興ってきていることに気が付くべきであろう。

最近、医工連携は注目されているが、ほとんどの人が医学サイドでニーズを示し、このニーズに工学サイドのシーズで対応する、出前方式研究を思い描いている。この方式ではアメリカに追随することはできるが独創的な研究を進めることは難しい。バイオマテリアル学会は医学・薬学・工学が一体となって議論し、新しいコンセプトを世界に先駆けて提案していくことが使命であり、21世紀の日本の先端医療を強力に支援する基盤となることが期待される。学会の真価がこれから発揮されると確信している。

生命体が人工材料と触れたときに起きる生命体側の炎症反応、血栓形成反応、免疫反応などの異物認識反応の制御手法を明確にし、バイオマテリアルの表面で自由自在にコントロールするテクノロジーは21世紀に持ち越された難問ではあるが、逆にその解決に向けてバイオマテリアル研究は挑戦しつづけなければならない。

新しい学問領域の確立、学会と産業界との緊密な連携を通して新産業分野の創出を目指し、日本バイオマテリアル学会が大きく飛躍することを期待している。

ナノテク専門ニュースレター

日本経済新聞社・日経産業消費研究所

日経先端技術

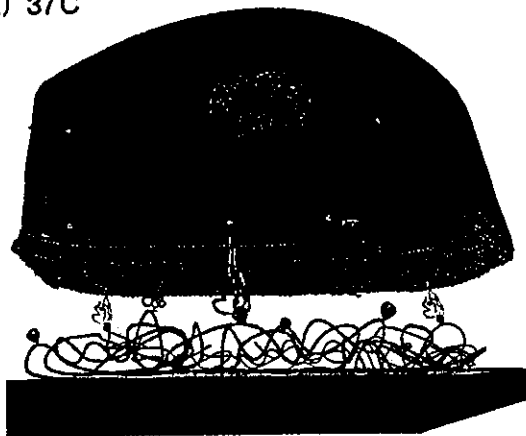
57

Nikkei Advanced Technology Report

2004.03.08

ナノテクフロンティア 極微細加工でX線を使うLIGA法が浮上 12ページ

(a) 37℃



(b) 20℃

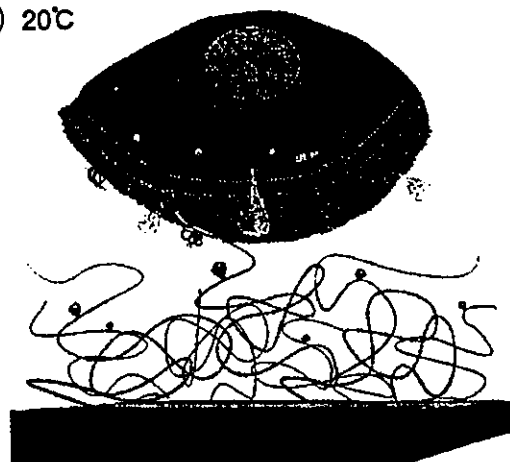


Fig1 温度応答性高分子に生理活性因子を結合させた細胞培養法。37℃では体性幹細胞の機能を維持したまま培養できる (a)。20℃に温度を下げて細胞を回収する (b)

News フラッシュ



東京女子医大の岡野教授G

生理活性因子で移植用組織を培養
定着しやすい細胞シート作製へ
成功率高い再生医療技術を実現

東京女子医科大学先端生命医科学研究所の岡野光夫教授と大和雅之助教授らは、定着しやすい移植用組織を培養する技術を開発した。生理活性因子を結合させた温度応答性高分子の上で細胞をシート状に敷き詰める手法 (Fig1) で、高分子だけの場合に比べ、細胞の接着や増殖、分化をより精密に調節できるようになったという。移植成功率の高い再生医療の実現に欠

かせない技術になると期待している。

37℃で折り畳んだ状態になり、20℃で広がる温度応答性高分子 (ポリN-イソプロピルアクリルアミド) に様々な生理活性因子を結合させた。37℃のとき高分子表面は細胞が付きやすい疎水性で培養可能になり、20℃に冷やすと細胞がはがれやすい親水性になり表面たんぱく質を傷めずに細胞を回収できる (2003年12月22日付本誌52号「ナノテクフロンティア」参照)。高分子だけの培養では、増殖させたい組織の中にある体性幹細胞をうまく活性化できず、移植後に培養組織がうまく定着しない課題があるが、新しい培養技術を用いると幹細胞の機能が維持できる。移植後の培養組織の定着率も高まる見通しだ。

また、代表的な細胞外マトリックスのフィブロネクチンから抽出した細胞接着ペプチドを高分子に付けると、細胞培養時の高分子との接着性がより高まった。

さらに、高分子に長さ4~5nmのポリエチレングリコール(PEG)を付けた場合(Fig 2)は、20℃で細胞を回収するにはがしやすくなったという。培養細胞を回収するには、ウシの血清を加えてよりはがしやすくしているが、PEGでより簡便にできるようになれば、ウシの血清が不要になり、動物からの感染症の心配をしなくて済むようになる。

研究グループは、高分子だけの細胞シート作製を第

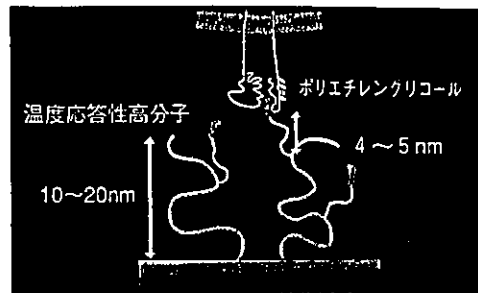


Fig 2 細胞シートを回収する新技術。高分子にポリエチレングリコールが結合すると細胞をはがしやすくなった



九大の松田教授G

生分解性樹脂をもとに医療用微小器具作製
光造形で様々な形状が可能
DDSや組織培養などに利用

九州大学大学院医学研究院の松田武久教授らは、薬剤の徐放や組織培養などに利用できる医療用のマイクロデバイス(微小器具)を作製した。紫外線で硬化する生分解性樹脂を原料にし、光造形で様々な形状にすることができる。薬物送達システム(DDS)や再生医療の研究に利用を見込んでいる。

生分解性のトリメチルカーボネートに、ポリエチレングリコールかトリメチルプロパンを結合させて光硬化性にした液状高分子を原料にした。2W/cm²の強さの紫外線を20秒ほど照射すると厚さ200μmの硬化層ができる。フォトマスクを使って形状を決め、硬化層を積み重ねて立体的な医療用デバイスを作製する。これまでに微細な柱が規則的に並んだマイクロビラーや、円すい状の柱を並べたマイクロコーン・アレー(Fig 1)、井げた状の層を多数重ねて複数の穴を設けたブロック(Fig 2)などを作ることに成功した。

生分解性なので樹脂に薬剤を混ぜておけば、体内で徐々に放出するDDSとして利用できる。マイクロコーン・アレーの中に抗炎症剤のインドメタシンを入れてマウスで効果を調べたところ、炎症を抑える作用を確認できたという。原料の配合比率などで樹脂の分解速度を調整でき、今のところ4週間ほどで円すい形が壊れ、DDSの機能が失われていくことを確かめている(Fig 3)。薬剤にもよるが、目標の作用期間は約6カ月にしている。動脈硬化治療への応用も狙っている。

また、原料にポリエチレングリコールを採用した樹

脂の上では細胞は増殖しないが、トリメチルプロパンを使った樹脂の上ではよく増殖した。細胞が増殖する樹脂を基板にし、増殖しない樹脂で区画を設ければ、細胞が混じり合わない微小な細胞培養器具を作ることができ、再生工学などの研究にも使えるとみている。

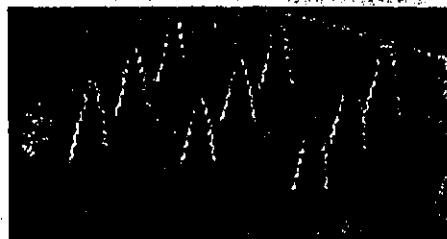


Fig 1 円すい状の柱を並べたデバイスの拡大写真。下部の直径は650μm、先端部は100μm、高さは1.8mm

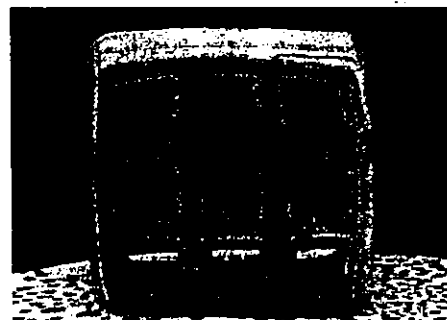


Fig 2 9個の穴を設けたブロック。各穴は縦横1.1mmの正方形で、奥行きは2.4mm。細胞や組織などを培養できる

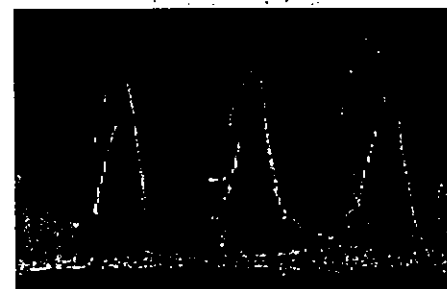


Fig 3 生体内で徐々に分解する様子。針状に加工した生分解樹脂をマウスに埋め込み、4週間後に観察した

再生医療の現状と展望

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 岡野 光夫

はじめに

薬の歴史を振り返ると、低分子の物質からタンパク質へ、さらについで最近では、遺伝子を薬として利用する時代に突入している。ここ二、三十年の間に生理活性物質が薬になるという時代を我々が体験し、これがどんどん伸びていく中で、技術革新はすさまじい勢いで起きている。これは細胞工学あるいは遺伝子工学という先端テクノロジーの発展と同期している。さらに、21世紀に入ってタンパク質や遺伝子を治療に使う流れが細胞とか組織をも使う新しい問題に直面している。そこで、細胞をこれから医療に使えるかどうかという問題を通して、どういうテクノロジーが新しい時代を切り開くのかということ述べる。

図1は、世界で初めてシャーレの中で心臓の筋細胞が拍動して動くものとして現実に目に見える形に私共の研究室でできたものである。

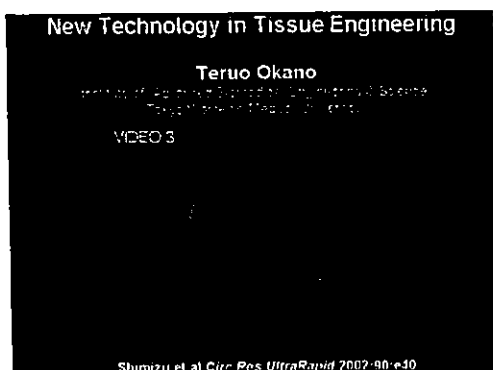


図1

コラーゲンのフィルムの上に心筋のシートを4層重層化して作製したもので、全く新しいテクノロジーが出来上がった。今までは、顕微鏡下で心臓の細胞が動いているというのにはあったが、シャーレの中で動き、1ヵ月も2ヵ月も拍動して動いている例は初めてである。このことは、これを心臓に貼り付けて心筋梗塞を治療しようとするのが実現可能なものとなってきているということである。

社会と薬との関わりについて考えると、今やタンパク製剤の問題、遺伝子治療の問題、さらに細胞を使った治療の問題などとすさまじい勢いで発展している。社会の倫理観や人々の生活の変化に比べ、技術革新の方が先行し、社会の大変革が今起きようとしており、このことを総合的に判断することが極めて難しい時代に突入したことについて述べたいと思う。

2002年に私共の清水博士、循環器内科の臨床家一研究に専念するため、3年前からうちの研究所に移り、心筋再生のプロジェクトの中心になってきた一が、3年間でこういう心臓の筋肉をつくり出すことに成功した。きょうこれから、再生医療という領域では何が起きているのか、話題提供をさせていただきたいと思う。

90年初頭にハーバード大医学部のVacanti教授という著名な医師と、MITのRobert Langer教授がTissue Engineeringという新し

いテクノロジーとそのフィールドを提案した(図2)。

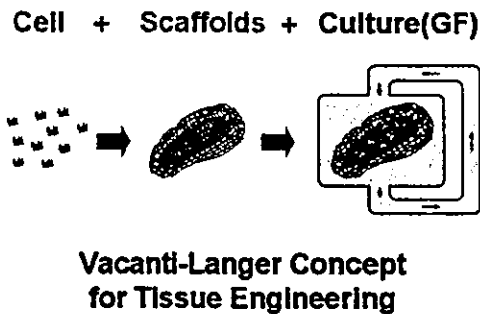


図2

それまで細胞を使ったデバイスや治療はあったが、もう少し明確なコンセプトで再生医療をやろうということで、Scaffolds(足場を意味し、ポリ乳酸などの成分分解性高分子が利用される)、細胞をそこに導入することで、成長因子の存在下で組織を作り、足場は次第に分解してなくなるという方法を彼らは提案した。現在組織工学で行われている研究は、ほとんどこのVacantiとRobert Langerが提案したコンセプトに基づいている。世界中がこれだけ加熱している中、この考え方で、生分解性高分子中に細胞を入れて、色々な臓器を作る研究を進めている。一方で、この細胞のソースの問題だが、ご存じのように、オートでやっていく、すなわち、自分の細胞で組織構築を行なうのが一番良いわけだが、最近ではES細胞を作ったり、体性幹細胞を分離したりして、細胞誘導させる研究が進んでいる。

一番重要なこととして私が強調したいことは、こういうTissue EngineeringはVacantiとLangerが提案しているように、全くの新しいフィールドであり境界領域である。日本で再生医療というと、従来の発生学の延長線にその発展を描いているが、そうではなく、目的の達成のための技術融合をさせていくべ

きフィールドなのであるということだ。

そして彼らは最初にネズミの背中に人間の耳を誘導する研究を示した。これはbiodegradableな高分子であるポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体のポリマーをスポンジ状にしておいて耳の形を作る。そこに軟骨細胞を導入してネズミの背中に入れておくと、体の中に成長因子があるので、軟骨が誘導できるということを最初に示したものである。

ハーバード・メディカル・スクールにいるAtala教授は泌尿器の外科医である。この先生は、いろいろなスポンジ状の生分解性高分子の中に細胞を入れて膀胱とか尿管をつくってしおうという研究を推進させている。

こういった方法ですべての臓器が誘導できるのだろうかということを少し考えたいと思う。軟骨組織は、細胞外のマトリックス(extracellular matrix)であるコラーゲンとか、ラミニンなどのタンパク成分の中に細胞がぼつぼつあるような組織である。まさに細胞外マトリックスが多くて、細胞が少ない組織でしかも血管系がほとんどないような組織については、われわれは組織を誘導することができるようになってきた。つまり、Cartilageとか骨とか血管とか皮膚とか膀胱、このような比較的無定形な構造でシンプルな構造、そして物理的な機能を持っていて、細胞外マトリックスが非常に多くて、血管系があまりないような組織について何とかつくれるようになってきたということである(図3)。

私共の病院の新岡講師は、Vacantiのところへ留学してきて、現在血管をつくっている。生分解性高分子のチューブをつくり、そこに細胞を入れて、血管を作製している。

現状の人工血管換術では、どうしても血管の置換が必要となる患者の場合、特に成長期にさしかかる頃、たとえば小学校へ上げる前

cartilage, bone,
blood vessel, skin,
bladder

- amorphous or simple structure
- physically functioning
- enormous amount of extracellular matrix
- low requirement for blood supply

図3

くらいの時は、通常、人工血管を使用するが、中学生くらいになると体が大きく成長するため人工血管だけが細いままになってしまう。そこで、もう一度開いて大きな人工血管に取り換えている。それを生分解性高分子でできた血管を利用すれば、子供の成長と共に成長する血管をつくることができる。この方法は既に臨床での応用を始めている。このように新しい再生医療が進展していくと、今までの治療とは全く違う効果が期待できる。

ところが、血管はすべてうまくいくのかというと、圧力の非常に大きいような動脈系ではなかなかうまくいかないのが現状である。今こういう足場をつくって置いて、四角い形にしたり、チューブにして、細胞をその中に入れて、組織になっていく過程でこの高分子は次第に溶けていって細胞からなる組織が作製できる。このように作った組織が周りの臓器あるいは組織とどのように構造的、機能的に結合していくかというのは大切な問題である。すなわち、ES細胞から肝臓の組織ができたとしても、その肝臓の組織がわれわれの体の中にどのように一体化していくのかという問題がある。今、幹細胞（ステムセル）の問題が注目されているが、ステムセルをおなかの中へ入れておけば肝臓ができてしまうのかということ、そうではない。そういう意味で

は、細胞構築を行うテクノロジーを新しく育てていかなければいけないと思う。

世界中でこういう研究を始めている中、私はむしろ細胞でシートをつくりたいと考えた（図4）。

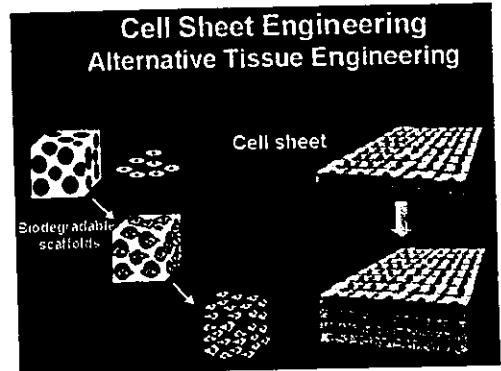


図4

培養皿の中でわれわれが細胞を培養していくと、細胞はコンプレント（単層）のシートになっていく。そのシートを取り出して自由にハンドリングできるテクノロジーを開発できればシートを重ねていくことによって、構造的、機能的に連結した組織ができるはずではないかと考えたのである。実際にその細胞シートをはがす技術開発のために、私は今インテリジェント高分子を利用している。

N-isopropylacrylamideは、32℃より低い温度では水に溶けている（図5、6）。

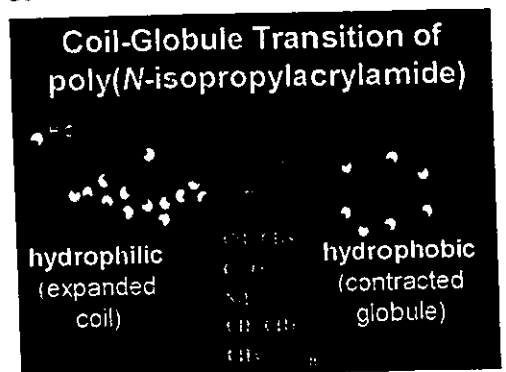


図5

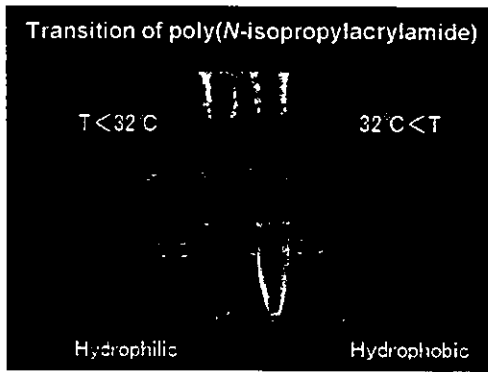


図 6

ところが、32℃より高い温度では沈殿し、温度変化に応じて構造を変化させる高分子である。この高分子は、非常に小さな温度変化の中で溶けている状態から溶けない、沈殿した状態に、まさに水和した状態から脱水した状態に変化する。この温度応答性の高分子を培養皿の表面に電子線を当てて重合と表面固定を同時に行う (図 7)。

簡単そうに見えるが、極めて均一な層でつくらないと細胞がきれいにコンプレントな単層シートにならない。そういう意味で、きれいなナノレベルの単層の高分子のコーティングをつくり、下の培養皿と高分子が化学結合を起して培養皿に接着するので、水で洗ってもはがれない (図 8)。

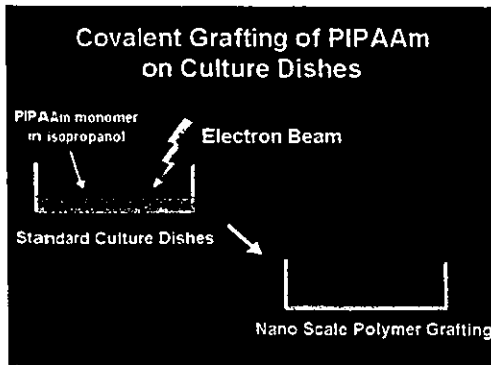


図 7

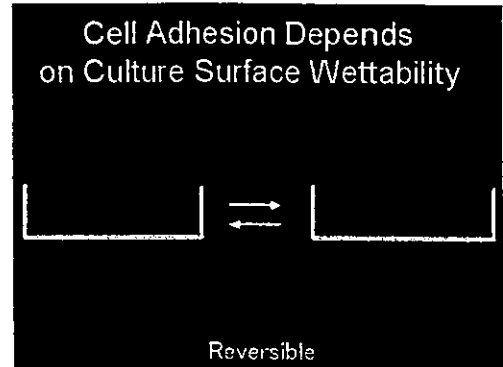


図 8

このような表面を作製すると、37℃では脱水しているから疎水性になっている。疎水性になっていると細胞が接着するという性質がある。それが温度を32℃以下に下げると今度は親水性に変化する。親水性になると細胞は接着していられないので剥離する。細胞を接着させておいて、温度を下げて細胞をはがせるという技術になるはずである。これをわれわれは10年以上かけて詳細に検討し、多くの論文を発表している。今まで細胞を培養皿の表面につけたときには、trypsinとかDispaseとかcollagenaseという酵素を使い、このため接着タンパク (Adhesive protein) が分解してしまう。同時に細胞の膜の表面についているタンパク質が分解してしまう。そのために、表面がつるつるになった、機能の落ちた細胞でしか回収できない (図 9)。

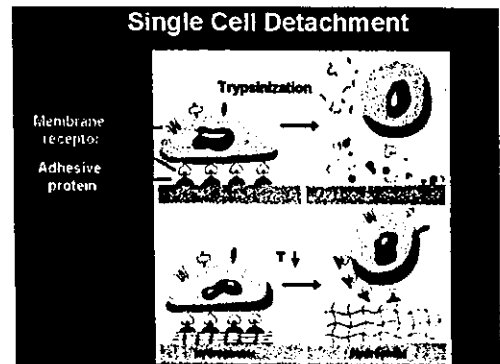


図 9

心臓に細胞を注入して治療しようなどというのは、まさにこのように取った細胞を治療に使用しており、機能は全く落ちてしまっているわけである。

ところが、私たちの方法だと、温度を下げるだけで、この接着タンパクと同時にこのリガンドやリセプター、表面の膜構造を維持し、インタクトな形で細胞を回収することができるようになってきている。このことの意味がどういことなのか、わかってもらえない時代が続いたわけだが、最近、細胞操作の重要性が高まり、私たちの技術が評価されるようになってきた。細胞もいろいろな種類で、例えばミクログリアという細胞に関して、国立精神・神経センターの高坂部長との共同研究を進めている。ミクログリアは培養できるが、酵素ではがしたときに細胞の機能を失ってしまうが、ミクログリアを培養した後、温度低下できれいにはがすことができた。これにより、今度はそこから取れるタンパクとか新しい研究に進むことができ、大きく発展できる基礎ができた。

同時に、細胞をシートにした後に、温度を下げただけで細胞シートをカーテンをめくるように表面からはがし出して使える(図10、11)。

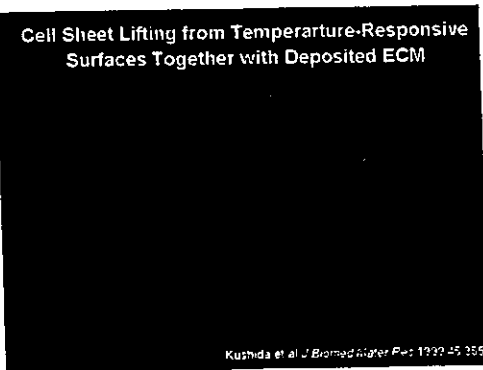


図10

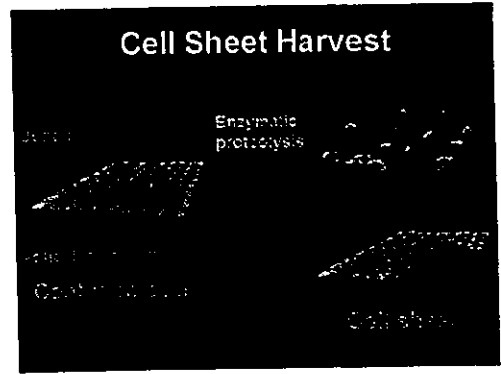


図11

このときに二重染色で核とタンパクを染めてみると、ファイブロネクチンがシートの片面に保持され、片面がノリになった細胞シートを作製できる。今まで細胞シートは酵素で処理するので、細胞内タンパク質と接着タンパク質が切れて分解されたものしか取れなかった。ところが、私たちの方法だと、温度を下げるだけで、この接着タンパクを維持して、細胞と細胞の間のジャンクション・プロテインを残して回収できるという全く新しいテクノロジーが開発できたのである。

これにより、いろいろなことができるようになる。ビデオでお見せしたいが、これは心筋の細胞である。温度を下げると、端からはがれていく。拍動しているのがご覧いただけると思う。20℃に温度を下げると細胞シートと培養面表面の間に水が入って行って、細胞がまくれ上がるようにして表面から外れていく。したがって、この細胞シートをいろいろハンドリングしていけば、移植したり、重ねて3次元の組織構築を可能にする(細胞シート工学、図12)。

こういうことで私たちのグループはいろいろなところと今共同研究を進めている。いまは世界中のベンチャーで皮膚が作られており、どこでもcollagenaseという酵素を使っ