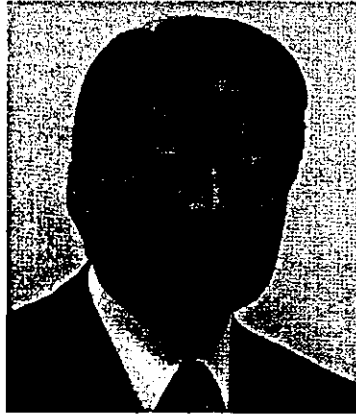


巻頭言

— バイオマテリアル：新しい生命医科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, 無機の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, 新しい生命医科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プリンは, 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

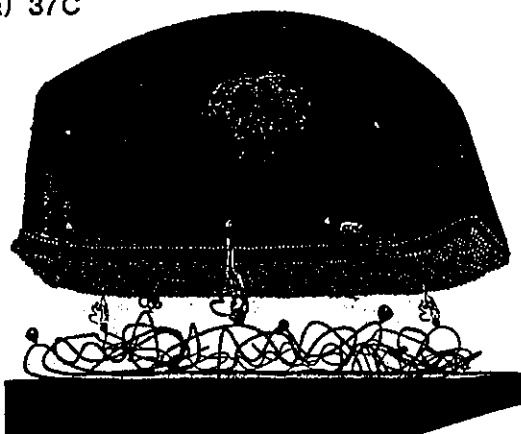
Nikkei Advanced Technology Report

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℃

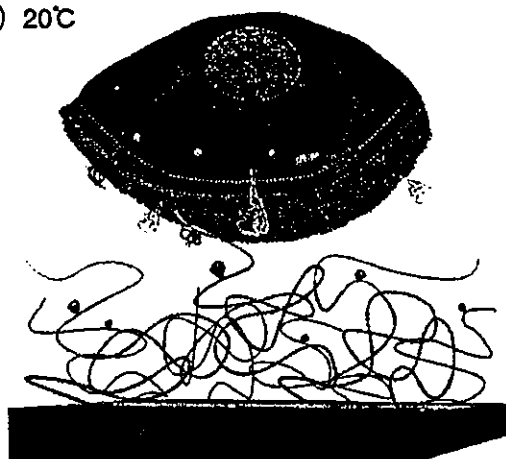


Fig 1 温度応答性高分子に生理活性因子を結合させた細胞培養法。37℃では体性幹細胞の機能を維持したまま培養できる (a)。20℃に温度を下げて細胞を回収する (b)

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 (Fig 1) 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

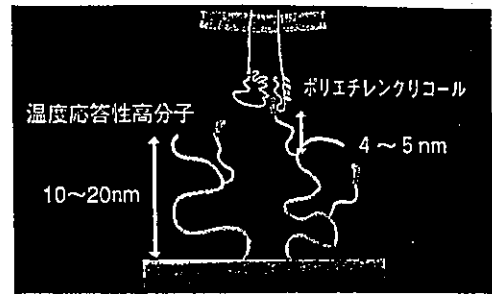


Fig 2 細胞シートを回収する新技術。高分子にポリエチレングリコールが結合すると細胞をはがしやすくなった

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ピラーや、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)などを作製することに成功した。

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。

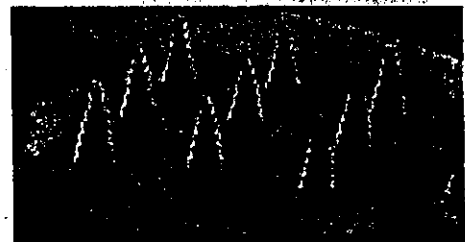


Fig 1 円すい状の柱を並べたデバイスの拡大写真。下部の直径は650μm、先端部は100μm、高さは1.8mm

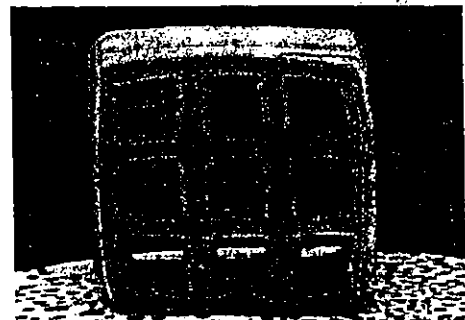


Fig 2 9個の穴を設けたブロック。各穴は縦横1.1mmの正方形で、奥行きは2.4mm。細胞や組織などを培養できる

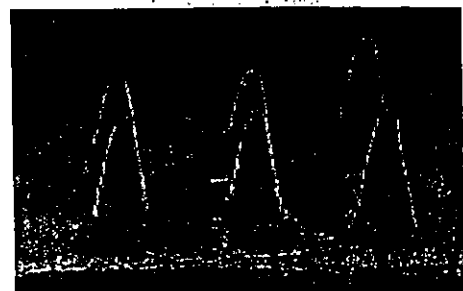


Fig 3 生体内で徐々に分解する様子。針状に加工した生分解樹脂をマウスに埋め込み、4週間後に観察した

生体組織を再生する ——高分子と水の相互作用制御が拓く再生医療の新技术法——



東京女子医科大学
先端生命医科学研究所

助教授 菊池 明彦 KIKUCHI Akihiko



東京女子医科大学
先端生命医科学研究所

教授 岡野 光夫 OKANO Teruo

はじめに

ひとの体は約60兆個の細胞から形成される。この数多くの細胞が、それぞれ役割を持って組織、臓器を形成している。これらの組織、臓器は互いに密接に連携し、協調しながら体の中でさまざまな機能を発揮している。病気となりこの調和が乱れたときに治療が必要となる。疾病にもよるが、薬だけの治療ですむものもあれば、生涯にわたる機能不全をもたらすものもある。後者の場合、これを置換する人工臓器が用いられる。これまでに、国内外で数多くの研究が展開され、実際に医療として確立した人工臓器もあるが、これらは生体で発現する臓器の機能の一部のみを代替しているにすぎない。より生体臓器に近い人工臓器の開発手法として、1990年代から「ティッシュエンジニアリング(組織工学)」の概念が提唱され¹⁾、現在、さまざまな組織、臓器のティッシュエンジニアリング研究が、世界的に活発に展開されている²⁾。はじめに開発されたティッシュエンジニアリングでは、目的とする細胞が接着可能な、多孔質で生分解性をもつポリ乳酸(PLA)やポリ(乳酸-グリコール酸)(PLGA)などに代表される材料を用いる。これらの材料上の細胞は、時間とともに自ら分裂・増殖して組織を形成する一方、細胞の接着した材料は次第に生体内で分解し、最後には成長した細胞から構成された組織のみとなる。このような手法で、耳や鼻、指骨などの骨・軟骨やそのほかの組織構築が行われている。

いっぽうで私たちの研究室では、細胞と材料とを一緒に生体内に移植する方法ではなく、新しく開発した細胞培養皿上で増殖させた細胞組織をその形のまま脱着・回収し、これを単層組織のまま、あるいは重層化組織として機能させ、移植に用いる再生医療の研究と

臨床応用を展開している。本稿では、私たちが開発した温度応答性表面の性質と、これを用いたこれまでの研究を解説したい。

温度変化にตอบสนองして物性を变化させる表面

私たちは1980年代から、水溶液中で温度変化に感応しその溶解性を大きく变化させる、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(以下PIPAAm)(図1)に注目し、この材料の薬物徐放基材としての応用^{3,4)}や、酵素反応を制御する新しい高分子-酵素複合体の開発を検討してきている^{5,6)}。一方で、固体表面にPIPAAmを化学固定させると、この表面は水中、温度

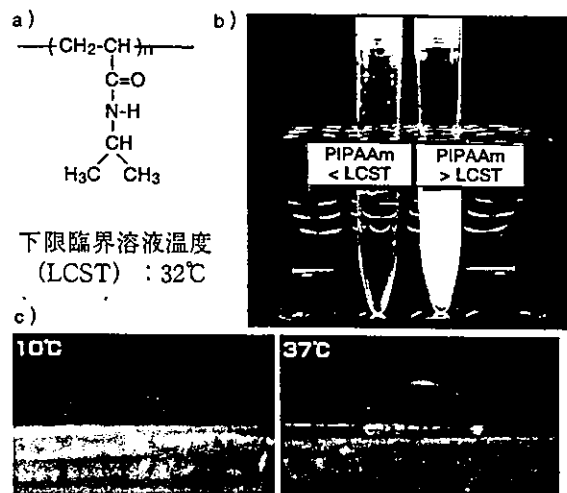


図1 温度応答性ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)のa)化学構造と、b)温度変化にตอบสนองした水溶性変化、c)PIPAAm修飾表面の水に対するぬれ性変化

変化にตอบสนองして低温で親水性を示し、温度上昇に伴い約32℃を境に高温側で疎水性へと変化する温度応答性を示す(図1c)^{7,8)}。

このPIPAAm修飾表面の調製には、表面アミノ基とカルボキシル基含有PIPAAmとのアミド結合形成による方法と、IPAAmモノマー溶液を塗布後直ちに電子線照射しIPAAmモノマーの重合と表面への固定を同時に行う手法などを用いた⁹⁾。いずれの方法でも基材表面にきわめて薄層のPIPAAm層が形成される。すなわち、PIPAAm修飾表面を低エネルギーのエキシマレーザーでアブレートし基材表面が露出する程度までPIPAAm層を剥離し、これを疎水性蛍光色素の吸着と表面の飛行時間型二次イオン質量分析(ToF-SIMS)との併用により基材表面の露出を確認するとともに、原子間力顕微鏡(AFM)でアブレート部位を走査し、表面グラフト層の厚みが約20nmであることを確認した(論文投稿中)。一方、全反射赤外分光分析(ATR/FTIR)から表面グラフトポリマー量は約2 μg/cm²と求められ、この値でPIPAAmの比重が1のときに計算される膜厚がAFMで求めたそれとよく一致した。いずれにしても、これは野球場に毛髪1本分の厚みの薄膜を欠陥なく広げたことと同じ状態であり、超薄層のポリマー層が表面に形成されていることがわかる。

PIPAAm修飾表面は、PIPAAmグラフト分子の温度変化に伴う水和状態の変化に応じ、低温側で水和、親水性を示したのに対し、32℃で接触角が不連続に変化し、高温側でPIPAAm鎖の脱水和が生起し、表面は疎水性を示した(図1c)。

分子を見分ける

私たちは、共立薬科大学の金澤秀子教授らと共同で研究を推進し、上述のように調製した温度応答性表面をシリカビーズ上に形成させ、これをステンレス製カラムに充填し、水系溶離液のみを用いる新しいクロマトグラフィーシステムを構築した^{10~12)}。このカラムを用い、疎水性の異なる種々ステロイドホルモンの混合物を、温度制御に伴う表面特性変化と疎水性化合物との疎水性相互作用の大きさの違いを見分け、疎水性度の高い溶質ほど強く疎水性相互作用を生起し、保持時間が延長し効率的な分離が達成された(図2)。しかも、溶離中に温度を動的に制御しグラジエント溶出を行うこともできる。すなわち、高温で疎水性度の小

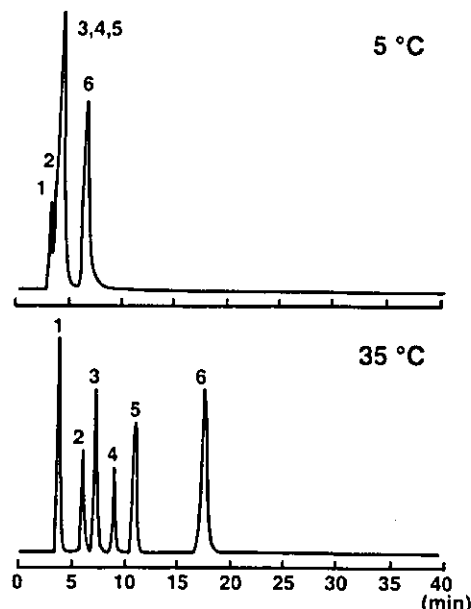


図2 温度応答性カラムを用い、温度を種々変化させたときのステロイド類とベンゼンの保持挙動変化。(溶離液：水)
ピーク：1. ベンゼン；2. ヒドロコルチゾン；3. プレドニゾロン；4. デキサメタゾン；5. 酢酸ヒドロコルチゾン；6. テストステロン

さな溶質を分離後、カラム温度を下げ疎水性度の高い溶質とカラム担体との相互作用を弱め溶出を加速し、短時間内に高効率分離を達成する、温度のステップグラジエントに基づく分離を実現した。分子量が3,000程度のポリペプチドであれば、疎水性相互作用の制御のみで水系での分離を実現できることを明らかとした¹¹⁾。特にタンパク質や細胞を分離する場合、分離後の生理活性や、生存率を維持することがきわめて重要であることを考え合わせると、水系のみの溶離液で分離できる本手法は、この要求に適合するものとして有用性が高いと考えている。従来これらの分離に使われる、オクタデシル基で修飾されたカラムで、水/有機溶媒の組成を変化させながら分離を行う逆相クロマトグラフィーに変わるシステムとなることが明らかとなった。

さらに、弱酸、あるいは弱塩基を有する温度応答性ポリマーで修飾した表面を用いると、荷電をもち、疎水性度の異なる生理活性物質をも分離できることが最近明らかとなりつつある^{13, 14)}。このシステムで、従来は逆相クロマトとイオン交換クロマトとを複合させながら多段階に分離を行っていたペプチドであるアン

ギオテンシンは、分子量がほぼ等しく、生理活性の大きく異なるペプチドであるが、この分離をわずか1本のカラムを通過させるだけで、効果的に分離できることを明らかとしている。

一方、この表面をレセプター分子と目的リガンド分子との親和性制御に利用し、溶離液組成をまったく変えることなく、温度変化のみでアフィニティー制御を行い、分離を達成するシステムも提案した^{15, 16)}。

このように、諸種の物性を有する生理活性物質を効率的に、機能を維持しながら分離するシステムをPIPAAm修飾カラムで達成できることを明らかにし、新しい分離担体としての特性と利用を提案している。

細胞から組織をつくる

さて、緒言で述べた温度応答性培養皿を用いた組織形成による再生医療研究の展開に話を戻そう。温度応答性培養皿に播種した細胞は、市販のポリスチレン製培養皿(TCPS)上のそれと同じように接着、分裂、増殖し、培養皿一面に広がる⁹⁾。このとき、TCPSでは、トリプシン処理し細胞外マトリクスタンパク質を分解するとともに、カルシウムイオンをキレートし除去しないと培養皿から細胞を回収することはできない。あるいは、物理的にスクレイパを用い、引きはがす方法がとられる。このとき、トリプシン処理では、回収細胞は1つずつの細胞浮遊液の状態、スクレイパを用いた場合でも不定形の不安定な組織片として回収されるのみである。ところが、温度応答性のPIPAAm修飾培養皿では、培養温度を37℃からPIPAAmが水和する20℃に下げただけで表面からきわめて非侵襲的に脱着・回収できる。このとき、細胞は細胞間結合を保ち、かつその下面には細胞外マトリクスタンパク質をも維持したまま1枚の連続した組織である「細胞シート」として脱着する^{17, 18)}。細胞下面の細胞外マトリクスタンパク質は、新しい培養皿へ移植する際、あるいは組織を重層化させる際の「接着剤」としての役割を持つ。このとき、先に述べたPIPAAmのグラフト量(あるいは厚み)がきわめて重要で、グラフト量が $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ から $2.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のとき、37℃で細胞が接着する一方、転移温度以下にすると自発的に脱離する。一方、これ以下のグラフト量では、細胞は接着・増殖するものの、低温処理しても脱着しない。逆にグラフト量が $2.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を超えると播種した細胞が37℃でもまったく生着しない。温度変化に伴う細胞の

接着/脱着制御を実現する表面設計のキーはこの点に集約されるといっても過言ではない。肝実質細胞や、グリア細胞などでは、トリプシン処理により非可逆的な細胞傷害が起こり、その生存率や機能の大幅な低下が生起する。一方で、温度応答性培養皿から低温処理による脱着・回収法ではこれらのような細胞傷害はまったく起こらない点は注目に値する。さらに、本回収法で用いる低温処理(20℃で数分から2時間程度)の間にアポトーシスを誘導しないことも明らかとしている¹⁹⁾。

このようにして調製した「細胞シート」を組織形成の1ユニットと考え、図3に示すような戦略で、単層組織として、同一細胞からなる重層化組織として、さらに、性質の異なる2種類以上の細胞シートとの重層化組織としてそれぞれ組織形成に関する検討を進めている。

単層組織：表皮細胞シートや角膜上皮細胞シートは、培養皿から低温処理で剥離後直ちに移植に供し、熱傷やアルカリ火傷の治療などの臨床応用がすでに開始されている。通常、角膜移植では、献眼された眼球1個から1眼分の角膜が取れるのみであり、また移植時の縫合が必須である。これに対し、角膜上皮細胞シートの移植では、一枚の移植用角膜上皮細胞シートを作製するのに数mm角の角膜輪部組織があれば十分で、しかも、シートの下面に細胞外マトリクスタンパク質が存在するため角膜実質層に5分ほどで完全に接着し、縫合する必要がまったくない²⁰⁾。さらに、この細胞シート移植では、細胞-細胞間接着が良好に維持されている結果、移植直後から高いバリア機能を発揮した。

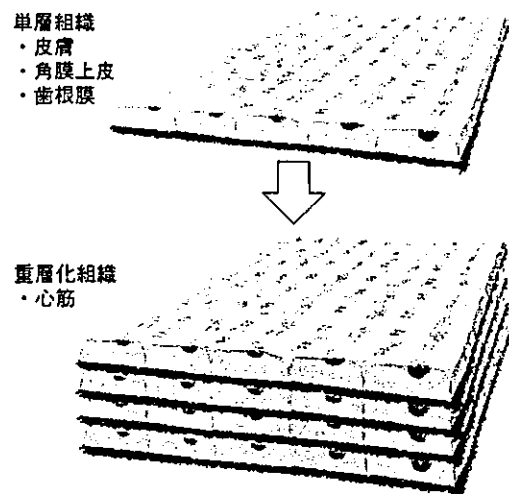


図3 温度応答性培養皿を用いた「細胞シート工学」に基づく単層組織、重層化組織の構築と再生医療への応用

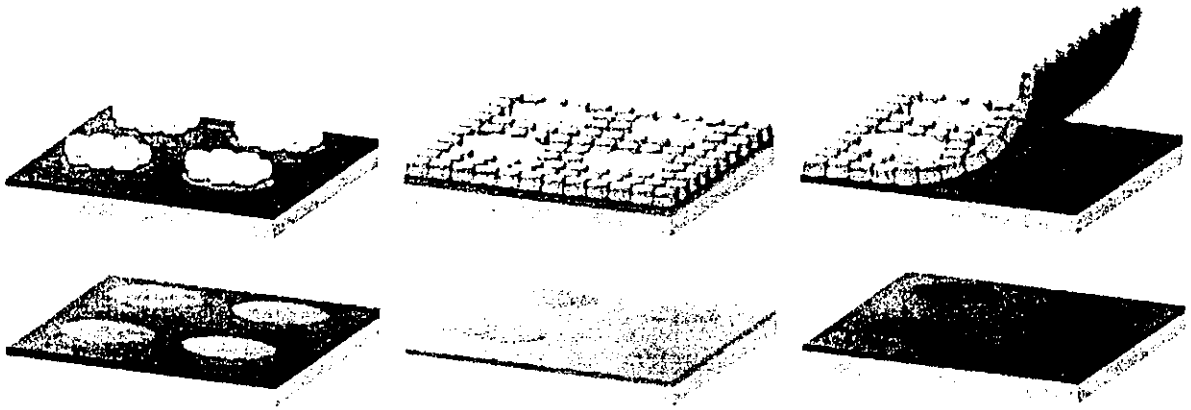


図4 パターン化共培養のためのパターン化温度応答性培養皿

転移温度の異なる2種類の温度応答性高分子をパターン状に固定化する。両者の転移温度の間の温度で細胞は一方の疎水性ドメインのみに選択的に接着する(左)。次に両ドメインの転移温度より高い温度で別の細胞を播種しパターン化共培養を実現した(中)。最後にいずれの転移温度よりも低い温度で1枚の共培養細胞シートを剥離・回収した(右)。

歯槽膿漏に代表される歯周病は、高齢化社会における重要な問題の一つであり、現状では歯周組織の再生はきわめて困難で、対症療法に頼らざるを得ない。私たちは、歯根膜とよばれる歯周組織の細胞を培養系で増殖させ、1枚の細胞シートとして調製した。これを歯周に移植すると、きわめて良好な再生が起り、対照群で見られた、いわゆる歯周ポケットがまったくできないことを、最近明らかとした。

重層化組織：心筋梗塞患者の治療を根本的に変革する手法として、心筋組織の再生を検討している。心筋細胞はそれ自身が自発的な拍動を伴って培養することが可能である。この細胞の単層細胞シートを重層化させると、肉眼でもその拍動が確認できるほどの心筋様組織が再生できる。重層化させた心筋細胞シート間には、ギャップジャンクションが形成され、複数の細胞シートが同期して拍動していることを確認した^{21, 22)}。これを心筋パッチとして心臓表面に移植すると、ホストの梗塞心をもつラットの心臓と同期して拍動し、心機能の顕著な改善を認めた。これまでに検討されている、注射で心筋細胞の懸濁液を組織に移植する手法と異なり、生着率を向上させ、細胞の散逸のない新しい治療手段となりうる。

臨床における膀胱の再建には、胃や腸が用いられるが、これら組織の上皮に由来する合併症が問題となっている。この上皮を除いた組織に、膀胱上皮細胞シートを移植し²³⁾、上述の合併症を起こすことなく生体膀胱に類似した組織の作製に成功した。

細胞のパターニングと共培養細胞組織：PIPAAmの表面固定に用いる電子線は、プラスチックやカバーガ

ラスなどのきわめて薄い膜で容易に遮蔽できる。これを利用し、パターン状にPIPAAmを表面固定し、培養温度を任意に制御して異なる性質の2種類の細胞のパターン化共培養に成功した^{24, 25)}。このような共培養は、単に2種類の細胞を同時に播種すればできるわけではなく、部位特異的に一方の細胞を接着・培養後、第2の細胞を播種して初めて実現できる。この手法を利用し、親水性モノマー、あるいは疎水性モノマーを共重合させ²⁶⁾、転移温度の異なる2種類の温度応答性ドメインを調製できた。ここに、温度と播種細胞とを制御してそれぞれの細胞が特定ドメインにのみ共培養される細胞組織を調製した(図4；論文投稿中)。両ドメインの転移温度より低温で、共培養組織は1枚のシートとして回収できた。さらに興味深いことに、パターン化共培養した肝実質細胞のアルブミン産生能、ならびにアンモニア代謝に伴う尿素合成能の肝細胞特有の機能が単独で培養した場合より有意に増大していることが明らかとなった。このことは、パターン化温度応答性培養皿を用い始めて明らかになったことであり、現在この詳細を解析中である。

おわりに

本稿では、温度変化にตอบสนองして水との相互作用を大きく変化させる温度応答性高分子で修飾した表面を用いた、分離システムの構築と、組織再生に関し私たちのアプローチの一端を概観した。温度応答性高分子の固定密度、量を制御して初めて実現する、新しい組織再生手法や、水系のみで高効率分離を達成するクロマ

トグラフィーシステムは、これからますます重要になると考えられ、さらなる発展を目指して研究を展開している。ナノメートルレベルで厳密に制御した高分子修飾技術により、細胞の機能を賦活化し組織形成を行う新手法も発展させているが、これらの成果はまた別の機会に紹介したいと思う。

本稿で紹介した研究は、同研究所の大和雅之助教授、清水達也講師をはじめとする多くのスタッフとの成果である。さらに、皮膚移植の臨床は東京女子医科大学形成外科野崎幹弘教授、副島一孝助手との、角膜移植は大阪大学田野保雄教授、西田幸二講師との、歯周組織は東京医科歯科大学歯学部長谷川昌輝医師、石川烈教授との、心筋細胞シートについては大阪大学医学部宮川 繁医師、澤 芳樹助教授、松田 暉教授との、膀胱再建は本学泌尿器科白柳慶之医師、東間 紘教授との共同研究の成果であることをここに記し、感謝申し上げます。

[参考文献]

- 1) Langer, R.; Vacanti, J. P. *Science* 1993, 260, 920-926.
- 2) Vacanti, J. P.; Vacanti, C. A. In *Principles of Tissue Engineering*; Lanza, R. P.; Langer, R.; Vacanti, J., Eds.; Academic Press: San Diego, 2000, p 3-7.
- 3) Okano, T.; Bae, Y. H.; Jacobs, H.; Kim, S. W. *J. Control. Rel.* 1990, 11, 255-265.
- 4) Okano, T.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Takei, Y.; Ogata, N. *J. Control. Rel.* 1994, 36, 125-133.
- 5) Matsukata, M.; Takei, Y.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Sakurai, Y.; Okano, T. *The J. Biochem. Biotechnol.* 1994, 116, 682-686.
- 6) Matsukata, M.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Bioconjugate Chem.* 1996, 7, 96-101.
- 7) Takei, Y. G.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Macromolecules* 1994, 27, 6163-6166.
- 8) Yakushiji, T.; Sakai, K.; Kikuchi, A.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Langmuir* 1998, 14, 4657-4662.
- 9) Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H.; Karikusa, F.; Sawasaki, Y.; Sakurai, Y. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 1990, 11, 571-576.
- 10) Kanazawa, H.; Yamamoto, K.; Matsushima, Y.; Takai, N.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Anal. Chem.* 1996, 68, 100-105.
- 11) Kanazawa, H.; Kashiwase, Y.; Yamamoto, K.; Matsushima, Y.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Anal. Chem.* 1997, 69, 823-830.
- 12) Kanazawa, H.; Sunamoto, T.; Matsushima, Y.; Kikuchi, A.; Okano, T. *Anal. Chem.* 2000, 72, 5961-5966.
- 13) Kobayashi, J.; Kikuchi, A.; Sakai, K.; Okano, T. *J. Chromatogr. A* 2002, 958, 109-119.
- 14) Kobayashi, J.; Kikuchi, A.; Sakai, K.; Okano, T. *Anal. Chem.* 2003, 73, 2027-2033.
- 15) Yoshizako, K.; Akiyama, Y.; Yamanaka, H.; Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Carredano, E.; Kikuchi, A.; Okano, T. *Anal. Chem.* 2002, 74, 4160-4166.
- 16) Yamanaka, H.; Yoshizako, K.; Akiyama, Y.; Sota, H.; Hasegawa, Y.; Shinohara, Y.; Kikuchi, A.; Okano, T. *Anal. Chem.* 2003, 75, 1658-1663.
- 17) Kikuchi, A.; Okuhara, M.; Karikusa, F.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 1998, 9, 1331-1348.
- 18) Hirose, M.; Kwon, O. H.; Yamato, M.; Kikuchi, A.; Okano, T. *Biomacromolecules* 2000, 1, 377-381.
- 19) Kushida, A.; Yamato, M.; Konno, C.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 51, 216-223.
- 20) Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y.; Watanabe, K.; Isoi, Y.; Maeda, N.; Watanabe, H.; Nagai, S.; Kikuchi, A.; Tano, Y.; Okano, T. *Transplantation* 2004, 77, 379-385.
- 21) Shimizu, T.; Yamato, M.; Kikuchi, A.; Okano, T. *Tissue Eng.* 2001, 7, 141-151.
- 22) Shimizu, T.; Yamato, M.; Isoi, Y.; Akutsu, T.; Setomaru, T.; Abe, K.; Kikuchi, A.; Umezumi, M.; Okano, T. *Circul. Res.* 2002, 90, e40-e48.
- 23) Shiroyanagi, Y.; Yamato, M.; Yamazaki, Y.; Toma, H.; Okano, T. *Tissue Eng.* 2003, 9, 1005-1012.
- 24) Yamato, M.; Kwon, O. H.; Hirose, M.; Kikuchi, A.; Okano, T. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55, 137-140.
- 25) Yamato, M.; Konno, C.; Koike, S.; Isoi, Y.; Shimizu, T.; Kikuchi, A.; Makino, K.; Okano, T. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 67A, 1065-1071.
- 26) Tsuda, Y.; Kikuchi, A.; Yamato, M.; Sakurai, Y.; Umezumi, M.; Okano, T. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004, 69A, 70-78.

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心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。

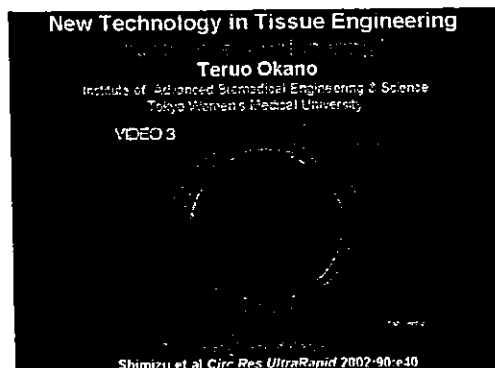


図1

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。

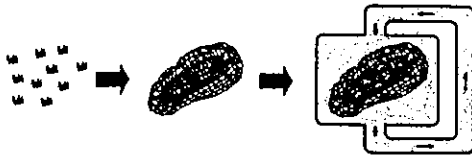
社会と薬との関わりについて考えると、今やタンパク製剤の問題、遺伝子治療の問題、さらに細胞を使った治療の問題などとすさまじい勢いで発展している。社会の倫理観や人々の生活の変化に比べ、技術革新の方が先行し、社会の大変革が今起きようとしており、このことを総合的に判断することが極めて難しい時代に突入したことについて述べたいと思う。

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)。

Cell + Scaffolds + Culture(GF)



Vacanti-Langer Concept
for Tissue Engineering

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るということ、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上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

Figure 3

- 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おいて、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）。

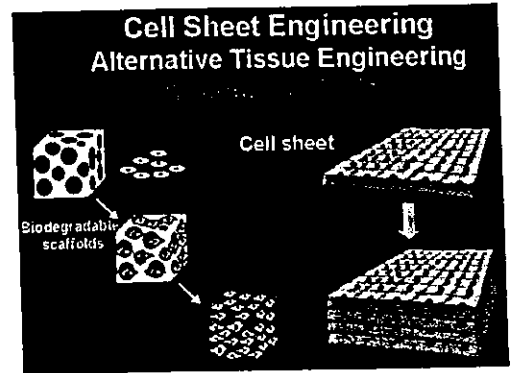


図4

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）。

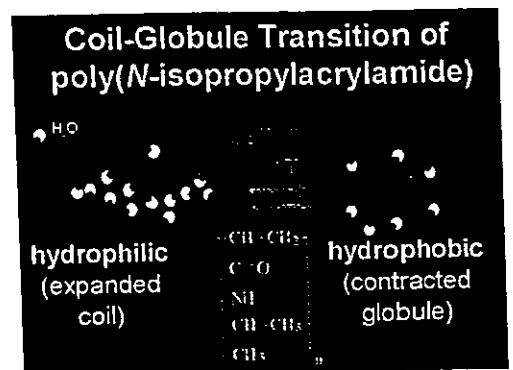


図5

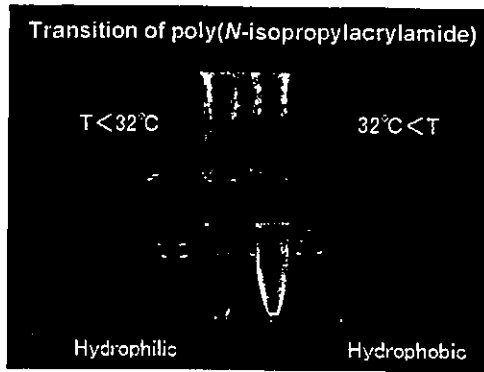


図 6

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和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)。

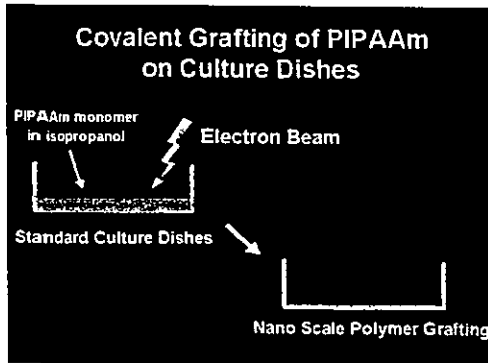


図 7

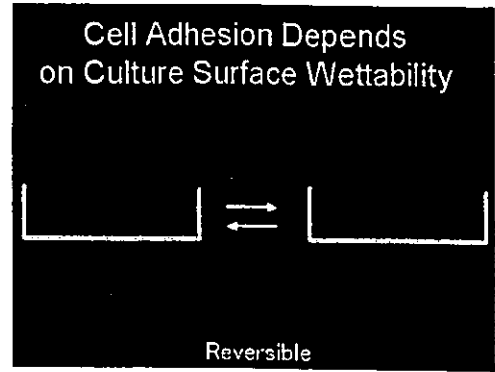


図 8

このような表面を作製すると、37℃では脱水和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)。

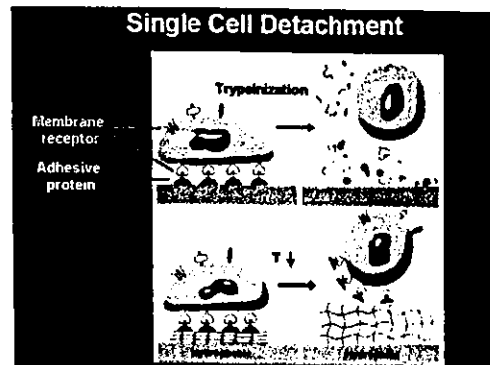


図 9

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うとしており、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、インタクティブな形で細胞を回収することができるようになっている。このことの意味がどういふことなのか、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)。

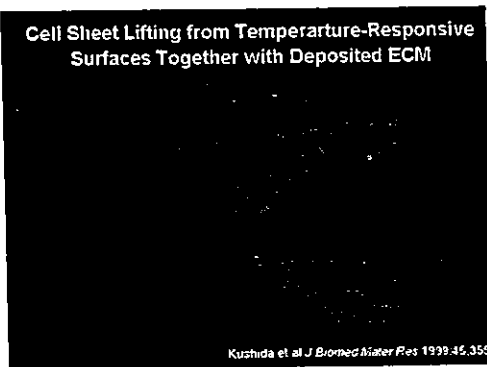


図10

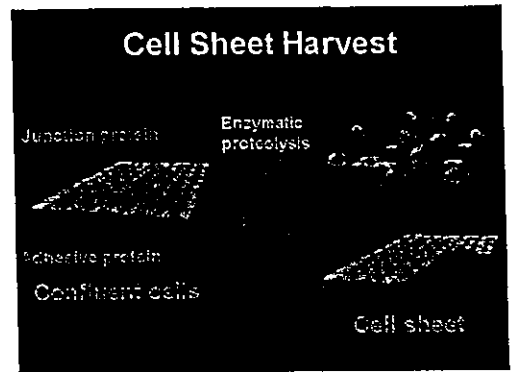


図11

このときに二重染色で核とタンパクを染めると、ファイブロンectin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

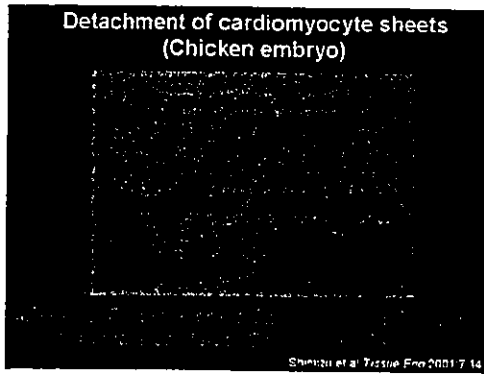


図12

と接着のプロテインが切断されるため、感染に弱くて再接着しにくい皮膚しか取れない。ところが、私たちのグループでは非常に感染に強い皮膚が取れる。同様に網膜もつくることができる。角膜の上皮、内皮、これはもう目が見えなくなった人たちのために非常に朗報となる。

それから、心筋の組織、これはこういう細胞シート同士を重ねることによって構造的に結合するだけではなくて、機能的にも結合し、それぞれのシートが動いて拍動しているが、重ねることによって同期して動く。まさに機能が結合することが実現したといえる (図13)。

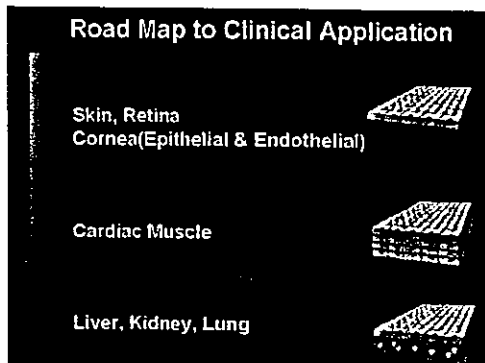


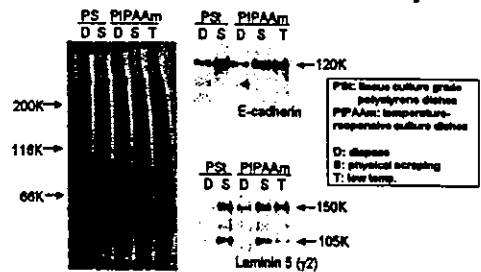
図13

例えば肝臓は血管の内皮細胞と肝実質細胞が積層化されている肝小葉構造となっている。

この共培養素で肝細胞は高度な機能を長期に維持されており、肝臓の細胞だけを培養しても1週間くらいしか培養できない。現在、肝細胞の長期培養ができないため、薬の毒性評価には、動物を丸ごと使わなければならない。ところが、肝実質細胞の上に血管の内皮細胞をのせた、また肝小葉構造をつくと、肝臓の細胞を数ヶ月にわたって生かすことができるようになる。

このように細胞シートと細胞シートを重ねて構造ができると同時に、重ねることによって、そこに機能連結が起きる。まさにサイトカインを介したコミュニケーションが起きるのだということを私たちは示してきている。これはケラチノサイトという皮膚の表皮の培養結果である。通常、皮膚の表皮は、培養し、それをDispaseという酵素ではがす。Dispaseではがしたとき、120Kに現れる、細胞と細胞のジャンクション・プロテインのE-cadherinがDでかなり破壊されているのがご覧頂けると思う。それに対してスクレープ (S) といって、かき取ったときにはちゃんとこのたんぱく質が残っている。温度ではがしたとき (T) には、かき取ったのと同じようにcadherinが残っている。それから、Lamininという接着タンパクがあるが、Dispaseで処理する (D) と消えてきているが、温度ではがしたとき (T) には残っている (図14)。

Immunoblotting of harvested keratinocytes

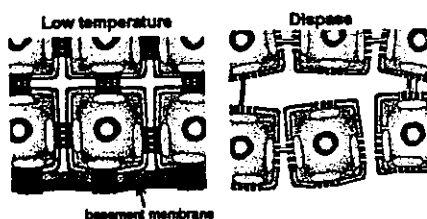


Junction and Adhesive Proteins remained intact in the cell sheets harvested by lowering temperature.

図14

バイオ皮膚をつくるベンチャーは世界中でたくさん興っているが、すべてDispaseを利用して皮膚を利用しているのが現状である。一方で外科医たちからは、例えば10枚のせたときに生着するのは2〜3枚で、あとは脱落していった、生着率が極めて低いことを指摘している。同時に、非常に感染に弱い。そのことは私たちの研究でDispaseで処理したためにジャンクション・プロテインがやられているためであることが示された(図15)。

それから、この基底膜になっているタンパク、Laminin 5とかファイブネクチンから成っているタンパクが破壊されているのではないかということがまさに証明できた。私たちの作った皮膚はジャンクション・プロテインがきっちりと残っていることが証明され、現在、東京女子医科大学の形成外科で臨床が開始されている。



Schematic drawing of harvested keratinocyte sheets

図15

角膜移植への朗報

角膜は周知のように、日本では1年間に2万人くらいの患者が移植を必要としている。累計で十数万人が角膜移植を待っているのだ。ところが、実際には1,600〜1,700くらいの角膜移植しかできていない。これはドナー不足のためである。私たちとしては、一個の角膜を一人にいれるという医療から、一個の角膜を数十個、数百個にしてしまえば一つの

ドナーから多数の患者を治療できると考える。1mmとか2mmの組織の切片から1個を作れないかということ、まさに最近、大阪大学眼科の西田講師らとの共同研究で成功している。これは、大阪大学の田野教授、西田博士と、そのグループと一緒にやっている。角膜は三層からできており、角膜上皮、実質、内皮であり、角膜の表皮だけかえれば治療できるというケースがある(図16)。

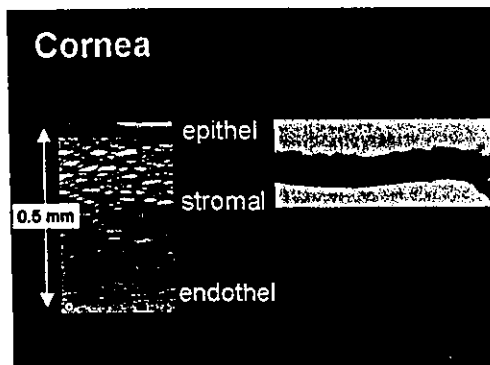


図16

そういう人に対しては、濁ったところを取り出して、温度応答性表面で作った角膜の表皮を、片側がノリ(接着タンパク質)になっているので、のせて治療している。動物レベルではかなりできるようになってきており、1mmとか2mmから1個の角膜ができることから、患者の両親とか、兄弟から細胞が取れる場合や、本人の片目から取れる場合は、培養して増やして移植することができる。今までとは全然違う移植の新しい幕開けが起きるのではないかとということで、共同研究を進めている。

網膜という光を感知する場所では、細胞が極性を持った構造となっていて、培養皿の上でグロース・ファクターを上から入れてもうまく極性が出てこない。多孔膜の上に温度応答性表面をつくっておいて、下側からグロース・ファクターを入れると極性がきれいに作

れる (図17)。

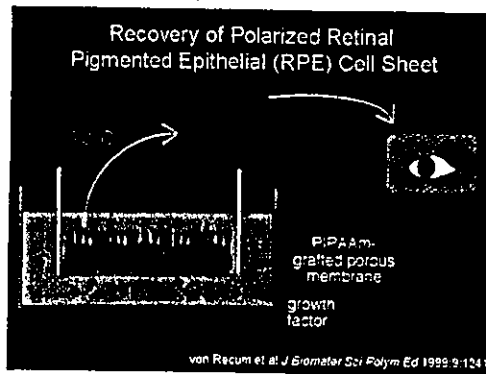


図17

このような状態にして温度ではがして、このシートを移植することもできるようになってきた。これはRPEセルという網膜色素上皮だが、ウサギの目にヒヨコから取った網膜色素上皮を移植したものである。図18のように、完全に接着している。

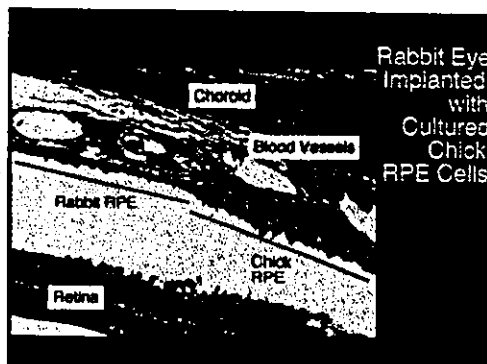


図18

肝細胞の長期培養の革命的成功

細胞が簡単に移植できるのだということは、シートの片面にノリがついていることに起因しているわけである。肝臓の細胞の上に血管の内皮細胞がのっている肝小葉構造を実際肝臓は持っている (図19)。

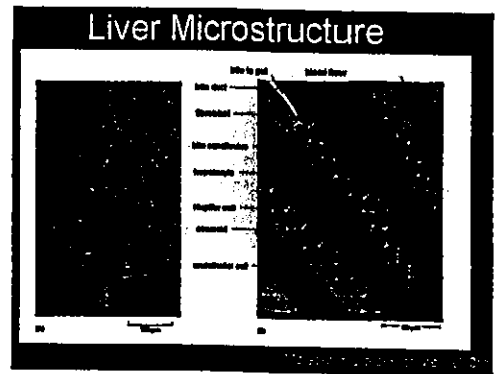


図19

この構造によって肝臓は高機能を維持しているのが、私たちは肝実質細胞とこの内皮細胞を二重構造にして肝小葉モデルを作製し、長期培養を可能にした。

通常、肝細胞と、内皮細胞を単にまぜて培養皿の上にはらまけば一緒に培養できるのだからいいのではないかと思うかもしれない。ところが、一緒にまぜて培養しても共培養はできない。両方の細胞が生きるといえることはないのだ。共培養は、細胞の集団と別の細胞の集団をつくっておいて、重層化させることができる (図20)。

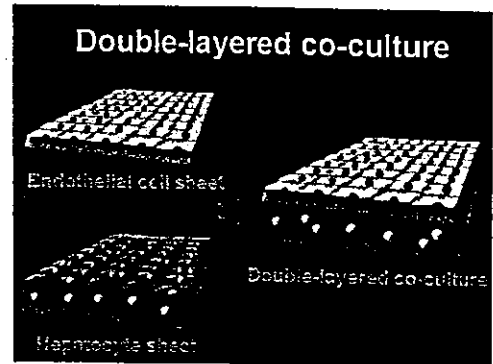


図20

これは共焦点レーザー、顕微鏡を用いて、縦型に切断した画像をコンピュータでつくるわけだが、肝細胞が放出しているアルブミンを緑に染めている。肝細胞がアルブミン産生を

し、赤いところがF-actin. だから細胞全体である。内皮細胞と肝細胞が二重層になっている、肝細胞はアルブミンを長期に産生していることがこの図で理解できると思う (図21)。

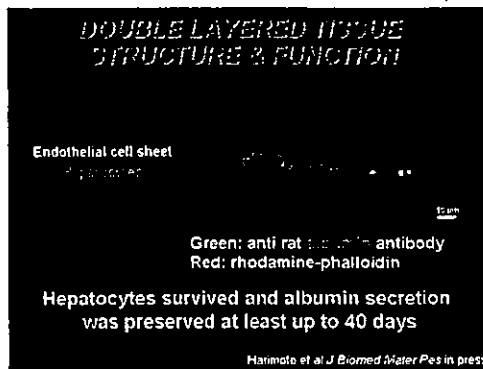


図21

40日後であっても肝細胞は高機能を示している。通常、肝細胞は1週間くらいで死んでしまう。このように数ヶ月にわたって肝細胞を生かすことができるわけだから革命的であるといえよう。

心筋細胞への適応

のせるということは、構造的にのせているだけではなく、機能的に連結しているのだということを意味している。まさにサイトカインを介した細胞集団と細胞集団の間にコミュニケーション場ができて、組織を作り上げていることを意味している。

心筋細胞をbiodegradableな高分子の中に入れて組織をつくらうという試みは世界中でやられているが、目に見えて動くような組織はなかなかできなかった。ところが、私たちは心筋細胞シートを重ねていくことによって心筋組織を作ること成功した (図22)。

現在、大阪大学第一外科の松田教授、澤助教授たちと共同研究をしており、冠状動脈をくくって心筋梗塞のモデルをつくっている。血

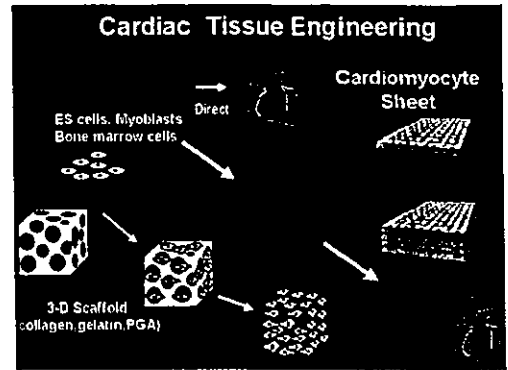


図22

流が閉ざされるから梗塞部分ができる。動きが悪くなってしまった心筋に対し、シートをつくって、貼り付けて治療する (図23)。現在、骨格筋や何かで細胞を取って注射するという治療はもう臨床が始まっている。

Schematic Drawing of Cardiac Graft Transplantation onto Impaired Heart

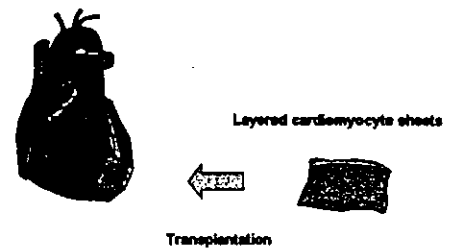


図23

しかし、先程から何度も繰り返しているように、そういう細胞は酵素で処理されるため、機能的にかなり落ちた細胞となり、これを使わざるを得ない。そういう意味ではシートを使うことによって極めて効率的な治療ができるだろうと思う。

われわれは梗塞のモデルつくった。血管を結んで血流を止めて2週間後に梗塞を確かめると、心臓の一部が動かなくなっている。この上に心筋のシートを貼り付ける。ちょうど2週間後に見てみると、心筋組織がき

れいに動き始めている。梗塞モデルをつくると、最初の45%まで心臓からの拍出流量が低下し、2層のシートを貼り付けた結果心拍出量は65%まで回復した。つまり、梗塞モデルをつくり、心筋細胞シートを貼り付けることで動かなくなっていた心筋の梗塞部分を治療することができることを示している。

最後に

まさに細胞のシートを使うという技術革新が起きることによって新しい治療が始まる。これから薬という概念、あるいは移植という概念が新しい技術によって大きく変革しようとしていると言っていいと思う。今までの薬とか、今までのバイオロジーとか、今までの医学とか、タテ型学問領域がそのままの延長線上に大きな発展はなく、ヨコ型の集学的なアプローチによって技術革新が起きるのだと思う。私たちの研究所は内科医、外科医、セルバイオロジスト、モレキュラーバイオロジスト、それから高分子学者、機械などのエンジニアも含めて、一緒に研究をやっているような体制をつくりながら研究を進めている。

おそらく一般に思われているほど再生医療が医療現場の中で動き始めるのは遅くないのではないかと思う。たぶん10年くらい後を考えていると思うが、かなり前倒して医療現場の中に入り込んでいくのではないかと思う。現実にもう治療が始まっているところもあり、今後、大きく発展が期待される。

細胞シート工学

Cell Sheet Engineering

大和 雅之・岡野 光夫

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

Key Words

temperature-responsive,
cornea, tissue engineering

■ はじめに

我々は、生分解性高分子製足場を用いることなく、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」を提案し、その体系的追求に尽力している。すなわち細胞シート工学とは、細胞-細胞間接着と細胞自身が培養の間に作り出す細胞外マトリックスによりシート状をなす細胞集団すなわち細胞シートを根幹単位として、これを用いて組織構造を再構築する技術の総称である。

■ 通常、培養細胞の回収に用いられるトリプシンなどのタンパク質分解酵素は細胞-細胞間接着を破壊してしまうため、培養細胞を細胞シートとして回収することはできない。この問題を解決するため、我々は温度応答性培養表面を開発した。温度応答性培養表面には、温度に応じて親水性・疎水性を大きく変化させる温度応答性高分子が共有結合的に固定化されており、タンパク質分解酵素を用いることなく、温度を下げるだけで培養細胞をまったく非侵襲的に回収することができる。肝実質細胞等の多くの細胞がトリプシン処理により非可逆的に分化機能を消失するが、この方法では分化機能を維持したまま細胞を回収できる。また、温度応答性培養表面を用いて作成した細胞シートは、底面に培養の間に沈着した細胞外マトリックスを接着したまま回収されるため、容易に他の表面に接着する¹⁾。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、正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。

Masayuki Yamato, Mitsuo Okano
Institute of Advanced Biomedical Engineering
and Science

2 (476)

表皮細胞シート²⁾や角膜上皮細胞シート³⁾は、そのまま移植に供して熱傷やステーブンス・ジョンソン症候群などの角膜上皮幹細胞疲弊症の治療に用いることができ、すでに臨床応用を開始している。従来の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、縫合の必要がまったくない。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。歯周病は高齢化社会における重要な問題の一つであるが、歯周組織の再生はきわめて困難で、いまだ対症療法的な治療しかない。我々は培養系で増殖させた歯周組織(歯根膜)の細胞で細胞シートを作製し、これを病変部位に移植することで歯周組織がきわめて良好に再生することを見出した。この他、細胞シートを積層して心筋梗塞部位に移植する心筋再生技術についても取り組んでいる⁴⁾。

さらに細胞シート工学を再建外科と組み合わせることで、血管系と神経系を有する機能をもつ分厚い組織構造を再構築することができる。たとえば我々は、膀胱の小片から膀胱上皮細胞を採取し、これを温度応答性培養皿上で培養して膀胱上皮細胞シートとして回収し、胃や小腸の上皮組織と置換して膀胱再建をおこなう新手法の開発に取り組んでおり、現在イヌを用いた動物実験をおこなっている⁵⁾。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おこさない新しい膀胱再建術が開発できた。

Medical Science Digest Vol 30(12), 2004