

図 1 心筋組織に対する再生医療

不全心筋に対する再生医療のアプローチとしては、①単離した細胞を心筋組織内に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法、②骨髄など生体内の幹細胞を、サイトカインを用いて不全心筋組織に動員する方法、③組織工学の技術を用い、三次元的な心筋組織を再構築し移植グラフトとして移植する方法がある。

管内皮細胞、平滑筋細胞に分化しうる多能性の幹細胞が存在し、必要に応じて流血中に動員され、組織の再生に寄与しうることが明らかにされた。近年、これらの細胞を骨髄から単離して心筋組織に移植する代りにサイトカインを用いて流血中への動員を増大して血管新生、心筋再生を促進させるというあらたな試みが研究されている。Orlicらは stem cell factor と granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) の 2 種類のサイトカインをマウス心筋梗塞モデルへ投与することにより心機能が改善したことを報告している<sup>8)</sup>。また、G-CSF 単独による心機能改善効果も報告されており、すでに血液疾患の治療に用いられている G-CSF の皮下投与は、非侵襲的で簡便な治療法として注目を集めている。メカニズムに関しては骨髄からの幹細胞の動員に加え、梗塞局所での炎症・治癒過程の修飾も一因と考えられており、臨床における治療効果の評価に加え基礎的なメカニズム解明も必須である。

### ● 組織工学的手法による心筋組織の構築

細胞移植療法は細胞浮遊液としてたがいに解離した状態の細胞を不全心筋組織内に注入するため、移植する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あら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、近年急速に進歩してきた組織工学 (tissue engineering) の技術を用い、体外で心筋組織を再構築し移植用のグラフトを作製する研究がはじまっている<sup>9)</sup>。

組織工学は工学者である Langer および外科医である Vacanti らにより提唱されたものであるが<sup>10)</sup>、彼らは生体組織の再構築には、①細胞、②細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM)、③細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であると、その足場の ECM の代りに生体吸収性の支持体を用いた。この支持体に細胞を播種・培養した後、生体内に移植することにより支持体が徐々に分解し、生体がつくり出す ECM と置換され、生体と同様の組織が再生されるという概念である。現在、この手法によりあらゆる組織再生の研究が行われており、心筋組織についても研究報告数が増えつつある。具体的には生体吸収性高分子を用い多孔性の支持体を作成し、それを足場として細胞を播種する手法 (図 2) と、溶液状の支持材料と細胞を混合した後、重合・ゲル化する手法がある (図 3)。

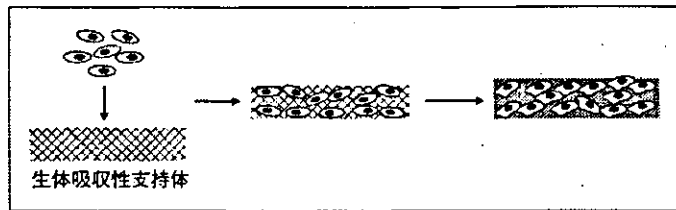


図 2 生体吸収性高分子を利用した組織再構築(1)

あらかじめ作製した生体吸収性高分子からなる多孔性の三次元支持体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。

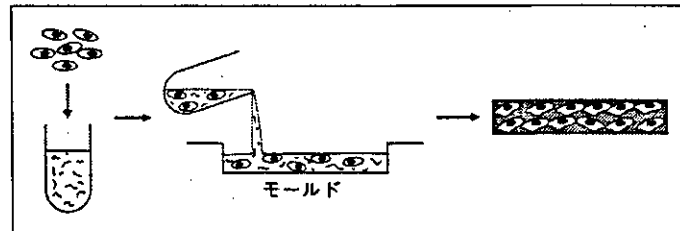


図 3 生体吸収性高分子を利用した組織再構築(2)

溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合した後、適当な形状の型(モールド)に流し込み、重合・ゲル化させることで細胞を三次元的に培養する。図 2 と同様に生体吸収性材料は徐々に分解し、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。

前者の手法としては生体吸収性高分子としてポリグリコール酸(PGA)、ゼラチン、アルギン酸を用いた研究が報告されている。Brusacらは、PGAを用い多孔性の支持体を作製し、これに心筋細胞を播種した。回転式培養装置を用いることにより心筋細胞の接着数を増大させた。これによって表層部に構築された心筋組織が生体心筋組織と同様の形態ならびに電気生理学的特性を有することを示している<sup>11)</sup>。Liらはゼラチンを使った心筋移植グラフト作製の研究を行っている。メッシュ状のゼラチンに心筋細胞を播種・培養することで移植グラフトを作製し、心筋梗塞モデルへの生着を確認するとともに<sup>12)</sup>、右心系心筋欠損部への移植によりゼラチンが完全に分解した後も組織として残存し、欠損部を補完することを示した<sup>13)</sup>。また、Leorらは多孔性のアルギン酸を用いたグラフトの心筋梗塞モデルへの移植により心拡大が抑制され、心機能が維持されることを報告している<sup>14)</sup>。

一方、Zimmermannらは後者の手法として足場となる材料と心筋細胞を混合して培養する研究を行っている<sup>15)</sup>。彼らは支持体として生体内 ECM

の主成分であるコラーゲンを用い、その溶液と培養心筋細胞を混和してシリコンモールド内で培養することにより三次元心筋組織を構築した。モデルとして *in vitro* での張力測定を可能とし、種々の薬剤に対する生体心筋組織と同様の張力変化を確認するとともに、伸展負荷により組織に配向性を付与することに成功している。また近年、支持体として脱細胞化した生体組織を用いる試みもあり、膀胱組織を脱細胞化したものに心筋細胞を播種しグラフト化するという研究も行われている<sup>16)</sup>。

### ●細胞シート工学による心筋組織の構築

以上のように、三次元的な心筋組織の再生には、ECMの代りとなる生体吸収性高分子を用いる手法が世界的な主流である。しかし、これらの研究においては、支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なため、生体内のような細胞の密な心筋組織の再構築が困難であることが問題となっている。すなわち、初期にECMの代替として三次元生体吸収性材料を用いる以上、それらが分

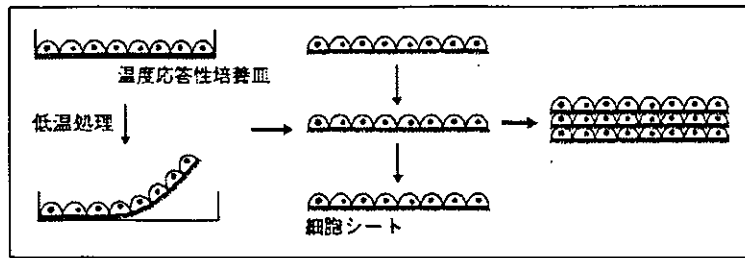


図4 細胞シート積層化による組織再構築

温度応答性培養皿から低温処理のみで脱着した細胞シートを積層化することにより、三次元的な組織を再生する。作製された組織は、生体吸収性支持体を含むことなく、細胞および細胞そのものが産生するECMからのみ構築される。

解・吸収された後を生体あるいは細胞由来のECMが置換するため、結果として細胞が疎で結合組織の多い組織となる。また、移植後支持体の分解に伴い、炎症反応が惹起されることも問題となっている。そこで著者らは、これら生体吸収性支持体そのものに起因する問題を克服する手法として、支持体を用いずにシート状の細胞を回収し積層化することで三次元組織を再構築する新規手法、細胞シート工学(cell sheet engineering)により心筋組織再生の研究を行っている。

細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用いる。この培養皿は通常の培養温度である37°Cでは細胞が接着するのに対し、32°C以下の低温では細胞非接着性となる。これによって、低温処理のみで細胞が培養皿表面から細胞間接着やECMを維持したまま損傷を受けることなくシート状に脱着する。また、細胞シート下面のECMは細胞シート積層時に“糊”として働き、短時間での積層化が可能である(図4)。

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。数日中に重層化した2枚の心筋細胞シートは同期して拍動するようになり、形態的にも心筋細胞シート間にギャップジャンクションを含む密な接着が形成されることが示された<sup>17)</sup>。さらに、心筋細胞シートを*in vitro*で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。つぎに重層化した心筋細胞シートを免疫拒絶を起こさないヌードラットの背部皮下組織に移植したところ、ホスト心臓の心電図とは独立した心筋移

植グラフトに固有の電位が測定された。移植部を切開したところ、移植グラフトが自律的に同期して拍動することが確認された。移植組織には周囲の皮下組織から血管が侵入し、毛細血管網が発達し、組織切片上、円柱状に伸びた細胞、細胞内の横紋、細胞間のギャップジャンクションと心筋様組織の再構築が確認された<sup>18)</sup>。経時的な変化として、ホストラットの成長に合わせてグラフトのサイズ、厚さ、張力、電気伝達速度が増大することが明らかとなっている。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<sup>19)</sup>。また、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も確認している(大阪大学機能制御外科との共同研究による)<sup>20)</sup>。

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あらゆる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。

#### ● 心筋組織に対する再生医療の課題と展望

不全心筋に対する再生医療としては、心筋細胞の代替としての筋芽細胞や多能性の骨髄細胞を用いた細胞移植の臨床応用がはじまったところであるが、今後ヒトに移植可能な心筋細胞をあらかじめ分化誘導し大量に培養する技術が確立されれば、これらの心筋細胞を注入する細胞移植療法がより有効な治療として用いられるであろう。一方、現在研究段階である組織工学的手法による心筋組

織の再構築に関しては、細胞ソースの問題に加え、いかに組織内に血管網を構築し、より厚く機能的な組織とするかが課題となっている。これは多くの臓器再生に共通の課題であり、多くの組織工学者があらたな技術革新を追究しており、実現すれば再生医療を飛躍させるものと考えられる。急性期の治療に関しては事前に自己の細胞ソースを確保し移植することは困難なため、サイトカインによる幹細胞の動員が有効かもしれない。また、人工心臓あるいは補助人工心臓をブリッジとして用い、その間に自己細胞を採取・培養し移植するといった治療が可能となるかもしれない。さらに移植後、細胞や組織が生着し機能するようになるまでのブリッジとして機械的な人工心臓を用いることも有効であろう。

このように、今後その発展が期待される再生医療は、内科・外科の領域を超えた複合的な医療であり、たがいに連携して最適な治療法を確立していく必要がある。また、再生医療の有効性に関しては不明な点やコントラバーシヤルな点が数多く、臨床での治療効果の適正な判断と基礎研究によるメカニズムの解明が必須である。

#### 文献

1) Makino, S. et al. : *J. Clin. Invest.*, 103 : 697-705,

1999.  
 2) Beltrami, A. P. et al. : *N. Engl. J. Med.*, 344 : 1750-1757, 2001.  
 3) Reinlib, L. and Field, L. : *Circulation*, 101 : E182-E187, 2000.  
 4) Tomita, S. et al. : *Circulation*, 100 : II 247-II 256, 1999.  
 5) Orlic, D. et al. : *Nature*, 410 : 701-705, 2001.  
 6) Asahara, T. et al. : *Science*, 275 : 965-967, 1997.  
 7) Menasche, P. et al. : *Lancet*, 357 : 279-280, 2001.  
 8) Orlic, D. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 10344-10349, 2001.  
 9) Fuchs, J. R. et al. : *Ann. Thorac. Surg.*, 72 : 577-591, 2001.  
 10) Langer, R. and Vacanti, J. P. : *Science*, 260 : 920-926, 1993.  
 11) Bursac, N. et al. : *Am. J. Physiol.*, 277 : H433-H444, 1999.  
 12) Li, R. K. et al. : *Circulation*, 100 : II 63-II 69, 1999.  
 13) Sakai, T. et al. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 121 : 932-942, 2001.  
 14) Leor, J. et al. : *Circulation*, 102 : III 56-III 61, 2000.  
 15) Zimmermann, W. H. et al. : *Circ. Res.*, 90 : 223-230, 2002.  
 16) Robinson, K. A. and Matheny, R. G. : *Heart Surg. Forum*, 6 : 8, 2002.  
 17) Shimizu, T. et al. : *J. Biomed. Mater. Res.*, 60 : 110-117, 2002.  
 18) Shimizu, T. et al. : *Circ. Res.*, 90 : e40-e48, 2002.  
 19) Shimizu, T. : *Heart Surg. Forum.*, 6 : 4, 2002.  
 20) Miyagawa, S. et al. : *Heart Surg. Forum.*, 6 : 3, 2002.

## 細胞シートを用いた心筋の組織工学

Myocardial tissue engineering by cell sheet technology

清水達也(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

Tatsuya SHIMIZU

◎重症心不全患者に対する次世代の再生医療として注目されているのが、組織工学(tissue engineering)の技術により細胞から再構築した心筋組織の不全心筋部への移植である。世界的には、生体吸収性の支持体に細胞を播種する方法により心筋組織を再構築する研究が行われている。一方、著者らの研究室では、シート状の細胞を積層化することで三次元組織を再構築するという新規手法(細胞シート工学)により心筋組織の再生を試みている。すでに肉眼レベルで同期して拍動する心筋組織の作製が可能となっている。組織工学による心筋再生は、細胞ソース、三次元組織構築法、血管新生法、移植法と多分野にまたがって解決すべき課題も多いが、今後フィールドを越えた研究者・臨床医の連携、技術開発により臨床応用可能になると予測され、重症心不全患者に対する医療に大きく貢献することが期待されている。

**Key word** 心筋再生, 組織工学, 細胞シート

再生医療(regenerative medicine)あるいは組織工学(tissue engineering)の近年の急速な進歩により、不全・欠損組織の補完を目的とした細胞単独あるいは再生組織の移植が種々の臓器において現実的なものとなっている。重症心不全の患者に対しても自己の筋芽細胞や骨髄単核球細胞を用いた細胞移植療法がすでに臨床応用されており、その成果に期待がかかっている。一方、次世代の再生医療として注目されているのが、細胞を使って engineer した心筋組織(心筋パッチ)の不全心筋部への移植である。アメリカではこの心筋パッチの開発を目的とした大型のプロジェクトが進行中であり、世界的な研究者人口も増加している。

本稿では、tissue engineering による心筋組織再構築に関する研究の現状と将来展望について概説するとともに、著者らが提唱している独自の組織工学的手法“細胞シート工学”による心筋組織再構築の研究について紹介する。

### Tissue engineering による心筋組織再構築の現状

Tissue engineering は 1993 年、工学者である Langer および医師である Vacanti が共同で提唱した概念であり、医学と工学の融合により生まれたあらたな学問である<sup>1)</sup>。実際には細胞から組織を再構築するという研究は以前より行われていたが、マウスの背中で耳を再生させたことにより彼らは tissue engineering を世界に知らしめた。彼らのコンセプトは、組織の再生には、①細胞、②細胞の足場となる細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)、③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、ECM の代替としてポリグリコール酸やポリ L 乳酸およびその共重合体からなる生体吸収性の高分子を用いた。この支持体に細胞を培養し生体内に移植することにより支持体が徐々に分解し、細胞がつくりだす ECM と置換され、生体類似の組織が再構築されるというものである。これまでに、骨、軟骨、血管をはじ

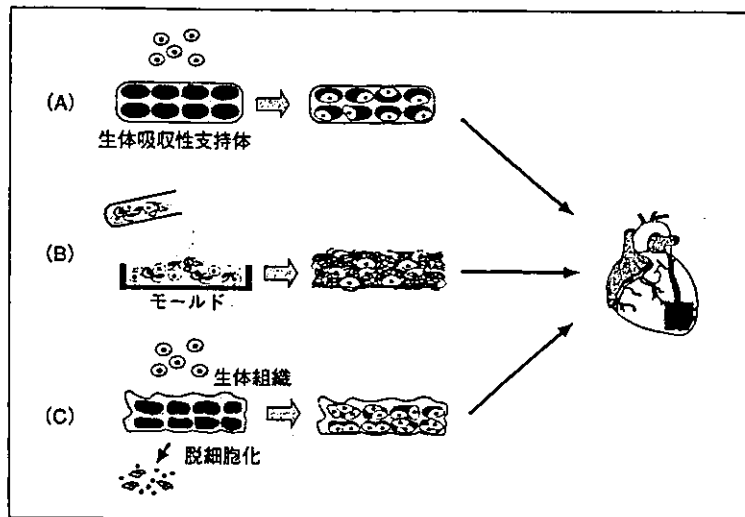


図1 支持体を用いた心筋組織の再構築

A: 生体吸収性高分子からなる多孔性の三次元支持体を作製，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後，モールドに流し込み，重合させることで細胞を三次元化する。

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。

めあらゆる組織に関して，細胞の足場として生体吸収性の三次元高分子材料を用いた組織再生の研究が行われている。

心筋組織に関しても Langer および Vacanti の提唱したコンセプトに基づいた研究が報告されている<sup>2)</sup>。これらの研究は細胞の足場の作製法の観点から大きく3つの手法に分類できる。①生体吸収性の高分子材料からなる支持体を作製し，それを足場として細胞を播種する(図1-A)，②溶液状の支持材料と細胞を混合したうえで重合し三次元化する(図1-B)，③生体由来組織を脱細胞化して支持体とし細胞を播種する(図1-C)。

①の手法としては生体吸収性高分子としてポリグリコール酸，コラーゲン，ゼラチン，アルギン酸を用いた研究が報告されている。Bursac らは，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し，回転式のバイオリアクターを用いることにより心筋様組織を構築，その電気的特性を解析している<sup>3)</sup>。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し，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<sup>4,5)</sup>。生体吸収性高分子としてアルギン酸を用いた研究では，心筋梗塞モデルへの移植により収縮能の改善は認めなかったものの心拡大が回避されたと報告されている<sup>6)</sup>。

つぎに，②の手法として Eschenhagen らは，ECMの主成分であるコラーゲンの溶液と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三次元の心筋組織を作成その張力の測定を可能とし，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<sup>7)</sup>。

③の手法は食道や弁の組織再生にも用いられている手法であるが，心筋に関しても膀胱組織を脱細胞化したものに心筋細胞を播種しグラフト化する研究が行われている。

以上のように，培養心筋細胞と支持体となる生体材料を用いた心筋組織再構築の研究が世界的に行われている。

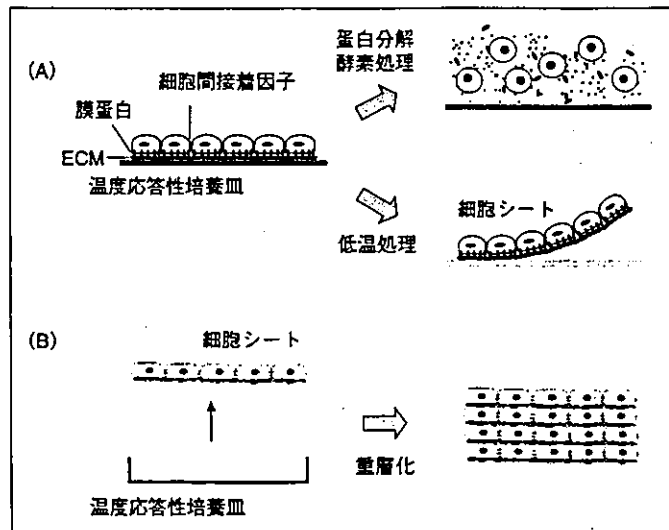


図 2 温度応答性培養皿からの細胞シートの脱着と細胞シートの積層化

A: 細胞を密に培養した場合は細胞と細胞が細胞間接着分子によりたがいに接着する。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。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。

B: 細胞シートの積層化により、三次元組織を再構築できる。

### 細胞シート工学による心筋組織再構築

Tissue engineering は組織再構築の足場として生体吸収性高分子を使うというコンセプトで展開してきた。しかし、支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なため、肝や心筋組織のような細胞の密な組織の再構築が困難であることが課題となっている。また、支持体の分解に伴い炎症反応が生じることも問題となっている。そこで著者らは、支持体を用いずにシート状の細胞を回収し積層化することで三次元組織を再構築する“細胞シート工学”とよばれる手法により組織再構築の研究を行っている。シート状の細胞の回収には、通常の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温度応答性培養皿を用いる。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 以下の低温処理で親水性表面に可逆的に変化し細胞非接着性となる。これによって、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温度変化のみで脱着させ

ることが可能で、細胞を密に培養した場合は、低温処理により細胞と培養表面の接着が解離し細胞がその下面の ECM 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-A)。また、細胞シート下面の ECM があらたな細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため、速やかな積層化が可能である(図 2-B)。

著者らはこの技術を心筋組織再構築に応用した<sup>8,9)</sup>。新生仔ラットから単離した心筋細胞を温度応答性培養皿上に培養し、電気的に結合した心筋細胞を低温処理を行いシート状に回収、重層化した。重層化後数日で 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。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 *in vitro* でコラーゲン膜上に 4 層まで積層化したところ、全体が同期して拍動し、

肉眼レベルでその動きが確認された。つぎに重層化した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、ホスト心臓の心電図とは異なる心筋移植グラフトに固有の電位が測定された。移植部を切開したところ、心筋グラフトが肉眼レベルで拍動するのが確認された。移植組織内には毛細血管網が新生しており、円柱状に伸びた心筋細胞、gap junction、デスモゾームなど生体心

サイド  
メモ

細胞シート工学

細胞は培養皿とインテグリンなどの膜蛋白およびフィブロネクチンなどのECMを介して接着するが、通常細胞の脱着にはトリプシンなどの蛋白分解酵素が用いられ、膜蛋白やECMを破壊することにより培養皿からの解離を起こす。これに対し、著者らは低温処理のみで細胞を膜蛋白およびECMとともにに損傷を与えずに脱着させることのできる温度応答性培養皿を開発した。この培養皿は、温度応答性高分子ポリN-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)を、電子線を用いて培養皿表面に共有結合させたものである。PIPAAmは温度に反応して、親水・疎水の可逆的な変化を起こす。ECMを介した細胞の接着は培養皿表面の親水・疎水性に依存しており、通常の培養温度である37℃では軽度疎水性となり、細胞接着性であるのに対し、32℃以下の低温では高度に親水化するため細胞非接着性となり、培養皿表面のPIPAAm分子とECMの結合が解離し、細胞が膜蛋白やECMとともに損傷を受けることなく脱着する。細胞を密な状態に培養した場合は、細胞と細胞が細胞接着分子を介して直接あるいはECMにより接着する。蛋白分解酵素を使用した場合は、細胞と培養皿の接着が解離するとともに、細胞どうしの接着も破壊されるため、細胞は解離して浮遊する。これに対し温度応答性培養皿を使った場合は低温処理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と培養皿の接着のみ解離するためシート下に細胞が脱着する。また、細胞シート下面に維持されているECMは他の培養皿への移動時や細胞シート積層時に“糊”として動き再接着を促進する。

この細胞シートを用いた組織工学的手法を細胞シート工学とよび、単層シート移植(皮膚・角膜)、同一細胞シートの積層化による均一な組織構築(心筋)、数種の細胞シートの積層化による層状構造の組織構築(肝・腎・血管)の研究が行われている。



図3 重層化心筋細胞シートの組織切片像  
重層化心筋細胞シートの移植後3週間の時点での組織切片像(Azan染色)を示す。皮下組織内の層状の心筋組織内には円柱状に伸展した心筋細胞および多数の毛細血管(矢印)を認める。

筋組織類似の組織像を示した(図3)。移植後、最長1年まで、心筋グラフトが拍動を維持したまま生着することが明らかとなっている。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、収縮力が增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行っているが、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(詳細は澤の稿「心筋細胞シート移植による心不全治療」参照)。

将来の課題と展望

心筋組織の再構築(myocardial tissue engineering)における当面の課題としては、①細胞ソース、②組織内血管網の再構築によるスケールアップ、③移植法、があげられる。

①に関しては代替として筋芽細胞を使うことにより臨床への応用が可能かもしれない。一方、胚性幹細胞(ES細胞)や骨髄由来の幹細胞から心筋細胞を分化誘導する試みが世界中で行われており、近い将来、臨床で使用可能な心筋細胞が開発されればそれらの細胞を用いた心筋組織の構築が可能であろう。

②は tissue engineering の研究フィールドに共通の課題である。心筋組織などのように細胞が密



な組織の場合、酸素・栄養の透過性の問題から再構築可能な組織の厚みは100 $\mu$ m程度と考えられている。これを解決する方法として組織を灌流したり、血管となりうる細胞と一緒に播種したり、血管新生を促進する遺伝子を導入する方法などが追究されている。また、三次元の支持体の内部に毛細血管網となるような管腔を微細加工し、内部に血管内皮細胞を播種したうえで目的の細胞を播種するという試みもある。著者らの研究室でも灌流培養装置や内皮細胞との共培養シートを使用し、より厚い組織の作製を追究している。また別のアプローチとして、すくなくとも*in vivo*においては重層化心筋細胞シート(3枚)の移植を血管新生に必要な時間をおいて繰り返すことにより、より厚い(~1mm)心筋組織の構築に成功している。

③の移植法に関しては、パッチ状のものをつくり不全部にはりつけるか欠損部と置換する研究が行われているが、細胞移植でも問題となっているようにホストと移植グラフトの電氣的・機能的なつながりがどうなるのかを十分に検証する必要がある。また、臓器そのものの再構築を目標にチューブ状の心筋組織を作製しようという試みもある。

#### おわりに

組織工学による心筋再生は、細胞ソース、三次元組織構築法、血管新生法、移植法と多分野にまたがって解決すべき課題も多いが、今後既存のコ

ンセプトにこだわらないフィールドを越えた研究者・臨床医の連携、技術開発により臨床応用可能になると予測され、重症心不全患者に対する医療に大きく貢献するものと考えられる。

#### 文献

- 1) Langer, R. and Vacanti, J.P.: Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926, 1993.
- 2) Nugent, H.M. and Edelman, E.R.: Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 92: 1068-1078, 2003.
- 3) Bursac, N. et al.: Cardiac muscle tissue engineering: toward an *in vitro* model for electrophysiological studies. *Am. J. Physiol.*, 277: H433-H444, 1999.
- 4) Li, R. K. et al.: Construction of a bioengineered cardiac graft. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 119: 368-375, 2000.
- 5) 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.
- 6) Eschenhagen, T. et al.: Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J.*, 11: 683-694, 1997.
- 7) Leor, J. et al.: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation*, 102: III56-61, 2000.
- 8) 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.
- 9) 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.

## 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

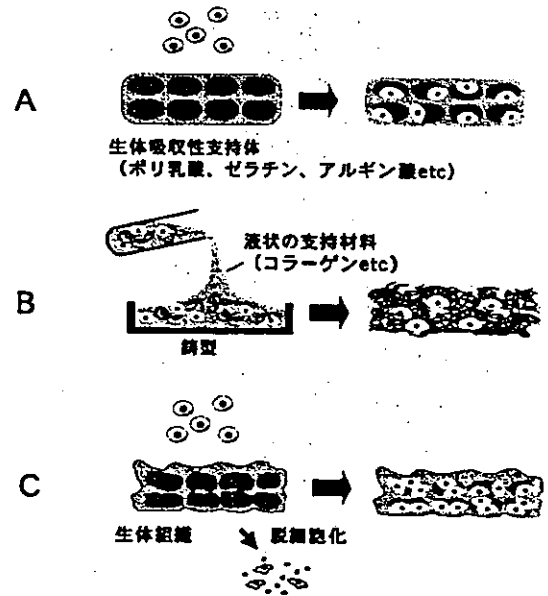
であった研究領域であり、工学的な技術との融合により急速に進歩しつつある。ここでは、血管、弁、心筋に関する組織工学の近年の動向を概説するとともに、当研究所が開発した独自の組織工学的手法「細胞シート工学」による3次元心筋組織の再構築に関する研究を紹介する。

## 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<sup>1)</sup>。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 次元支持体を作成し、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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。Shin'oka ら<sup>4)</sup>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<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>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もある。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<sup>11)</sup>。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。

この他、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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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<sup>11)</sup>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<sup>12)13)</sup>。生体吸収性高分子としてアルギン酸を用いた Leor ら<sup>14)</sup>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<sup>15)</sup>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

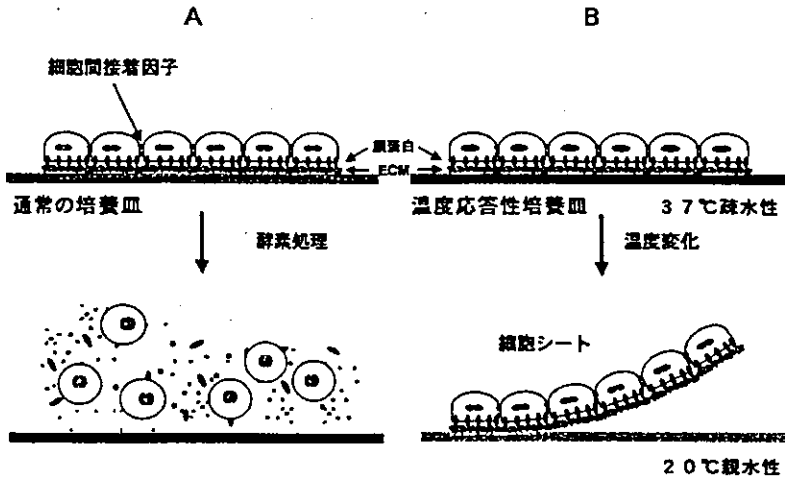
生体吸収性の支持体を用いる組織工学的手法においては支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことや、移植後支持体の分解に伴い炎症反応が生じることが問題となっている。また骨、軟骨、血管、弁など細胞が疎な組織の作製には適しているが心筋、肝臓など細胞の密な組織を作製するには新たな技術開発が必要となっている。そこでわれわれは足場を整えることにより組織を再生するという既存のコンセプトに対し、温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できる培養基材を用い、細胞をシート状に回収、細胞シートの積層化により3次元組織を再構築する独自のコンセプト「細胞シート工学」を提唱し組織工学に取り組んでいる。

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<sup>16)17)</sup>。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

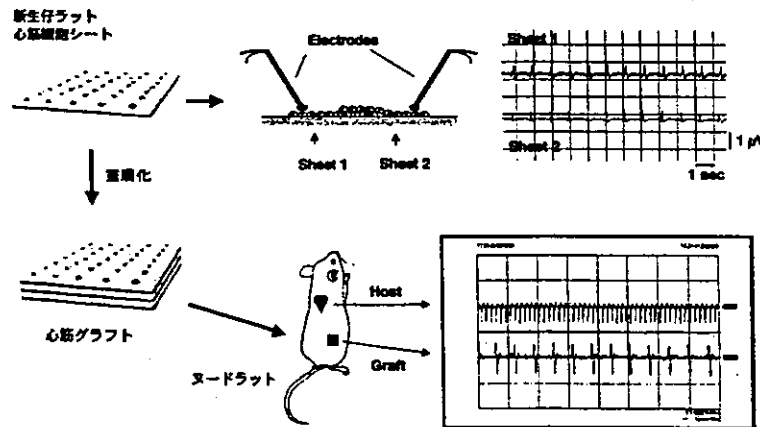
を低下させることにより細胞がその下面の接着因子・細胞外マトリックスとともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合はまったく解離せず維持されるため、トリプシンを用いたときのように細胞をばらばらにすることなく、シート状に回収できる(図2)。また細胞シート下面の接着因子が新たな培養基材や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため、速やかな接着・積層化が可能である。すでに種々の細胞シートの移動・積層化を可能としている<sup>18)</sup>。

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<sup>19)</sup>。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<sup>20)</sup>。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*, 2002<sup>29)</sup>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、培養を自動的におこなう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ってくると推察される。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械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<sup>1)</sup>。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<sup>2-4)</sup>。

## 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とも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 $\mu\text{m}$ ときわめて高密度な血管網が形成されている<sup>5,6)</sup>。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、単離胚組織を*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 $\mu\text{m}$ 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<sup>7)</sup>。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 $\mu\text{m}$ 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<sup>8,9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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 $\mu\text{m}$ 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

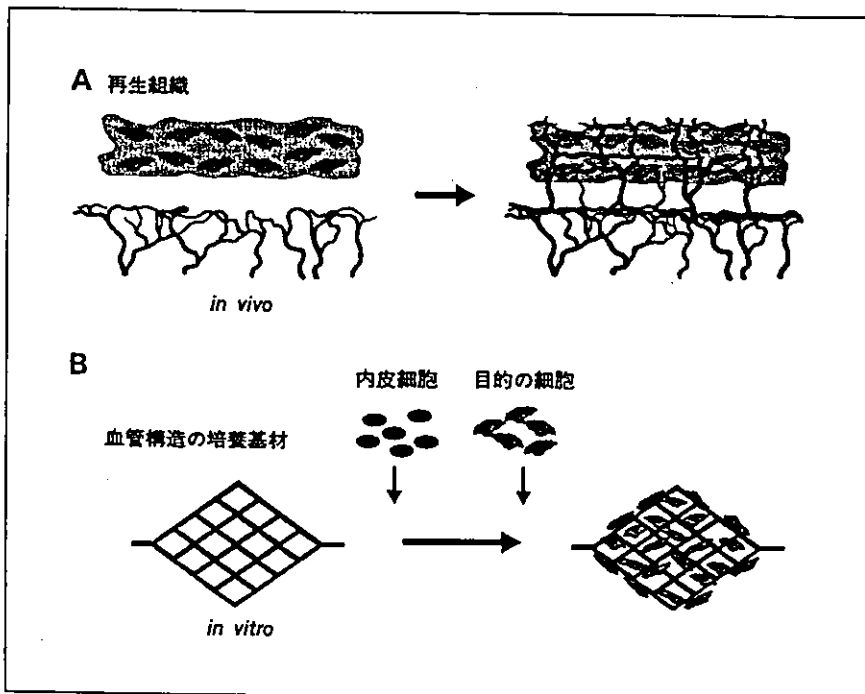


図1. 組織工学における血管網新生のアプローチ

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，移植後のホスト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。骨髄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<sup>11)</sup>。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

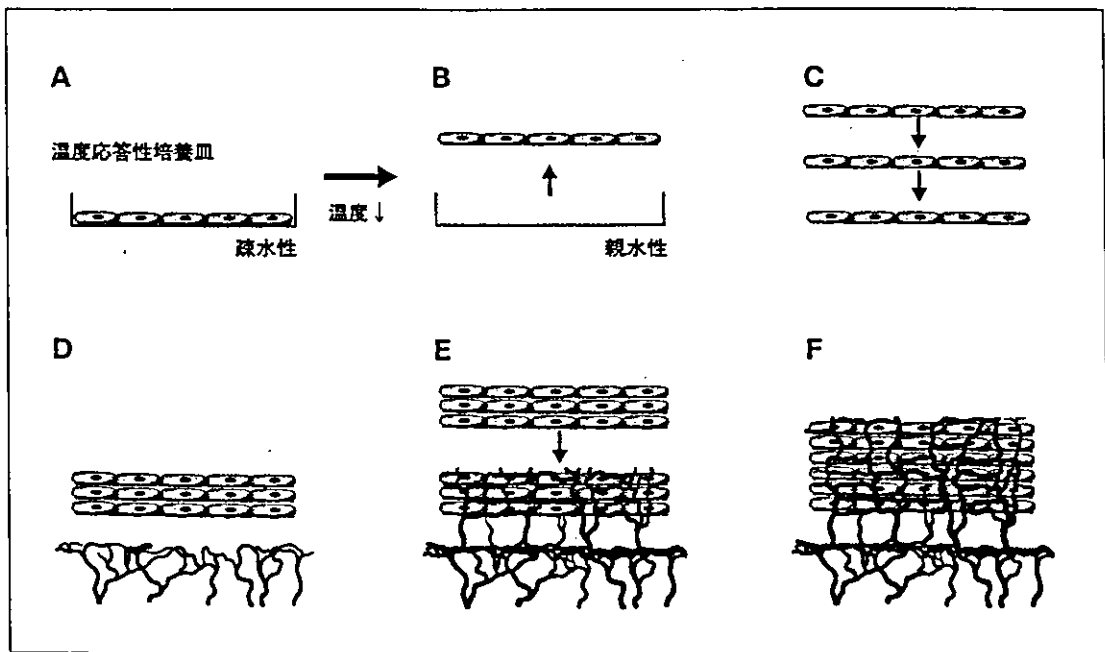


図2. 細胞シートの回収・重層化と心筋グラフトの多段階移植による血管網新生

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。