

図1 再生医療研究への流れ

利用して、生体機能の再生をはかる医療が考えられるようになった(図1)。

2. 再生医療のための幹細胞

このような再生医療の可能性が大きく進展してきた背景には、ヒト体内にも多くの幹細胞が存在することが明らかになってきたことによる。幹細胞とは、様々な細胞へ分化できる能力をもったまま未分化状態で自己複製できる細胞で、胚性幹(ES)細胞と体性幹細胞に分類される。前者は、ヒトES細胞が世界各国で樹立されてきてはいるものの、まだ倫理的な問題や多くの技術的な問題があり、その医療への応用実現には多くの年月が必要と思われるが、後者については着実に定着し始めている。

体性幹細胞の医療への応用には、自家移植と同種(他家)移植がある。自家移植では、従来形成

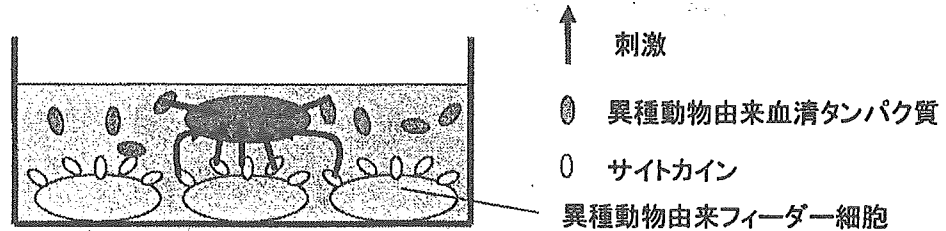
外科や整形外科の医療機関内で皮膚や骨の異所への移植は古くから行われており、皮膚、軟骨、角膜などは、体外増幅が産業化されたり、あるいは、されようとしてきている。

さらに、自家細胞を、本来とは異なる臓器に移植することも盛んに研究されるようになってきている。特に、骨髄中の間葉系幹細胞が様々な細胞に分化しうることが示されてから、様々な臓器の再生に用いられるようになってきた。2003年には、閉塞性動脈硬化症やパーチャー病など虚血下肢治療のために患者自身の骨髄細胞を用いる方法が初めて一部保険が適用できる「高度先進医療」として認可を受けた。現在、骨髄細胞を歯周病治療、心疾患、脳疾患(脳梗塞)、脊髄損傷などへ治療応用する研究は盛んに行われている。

しかし、骨髄細胞は採取に患者自身の負担が高いため他の細胞ソースを用いることも研究され

幹細胞の対外増幅

従来型の細胞培養



開発するバイリアクター

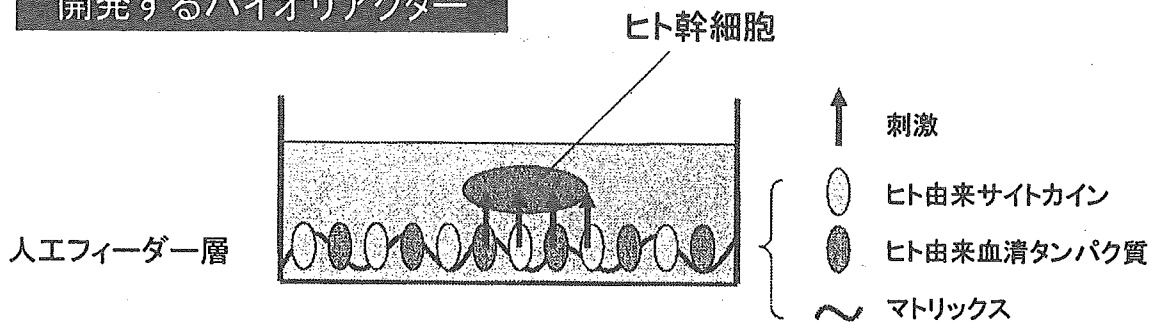


図2 開発目標となる幹細胞体外増幅用のナース細胞を模倣した人工基材。

ている。血液からの幹細胞で急性心筋梗塞患者の治療を行った例や、患者自身の口の粘膜の細胞を使って目の角膜を再生する臨床試験の成功が報じられている。また最近、成人の鼻粘膜細胞を用いた脊髄損傷治療や、患者の太ももから筋肉の一部を用いた疾患治療が計画されている。脂肪吸引でとった脂肪組織中の幹細胞も細胞ソースとしては有用で、臨床応用が試みられている。

一方、同種（他家）移植では、ドナーからの直接の臓器移植に加えて、冷凍保存した臍帯血を用いた治療もかなり行われるようになってきている。現在、日本には全国に11の公的なバンクがあり、日本の人口1億2千万人に必要となる数2万種が満たされたため、研究用への提供も理化学研究所を介して行われるようになってきている。

3. 幹細胞の体外増幅

このように再生医療は着実に臨床の場で応用されるようになってきているが、幹細胞を用いた医療をより広く実現してゆくための一つの大きな課題は、非常に僅かしかない幹細胞を如何に増幅するかということである。幹細胞の培養には通常フィーダー細胞あるいはナース細胞と呼ばれる細胞を共存させて行う必要がある。従来研究レベルでは、ヒト幹細胞といえども、動物から採取した血清や異種動物由来の細胞を培養液に共存させて行われてきた。異種動物由来の血清や細胞の使用は、これまでしばしば指摘され問題になってきたように様々な病原体による感染を招く恐れがある。そこで、これら異種動物由来の生体成分を混在させない完全な人工幹細胞培養系を確立する必要がある。我々は、まずは、異種動物由来のナース細胞を、ヒト由来細胞に置き換えること、さらには、これら細胞の機能を代替できるような人工的な細胞模倣

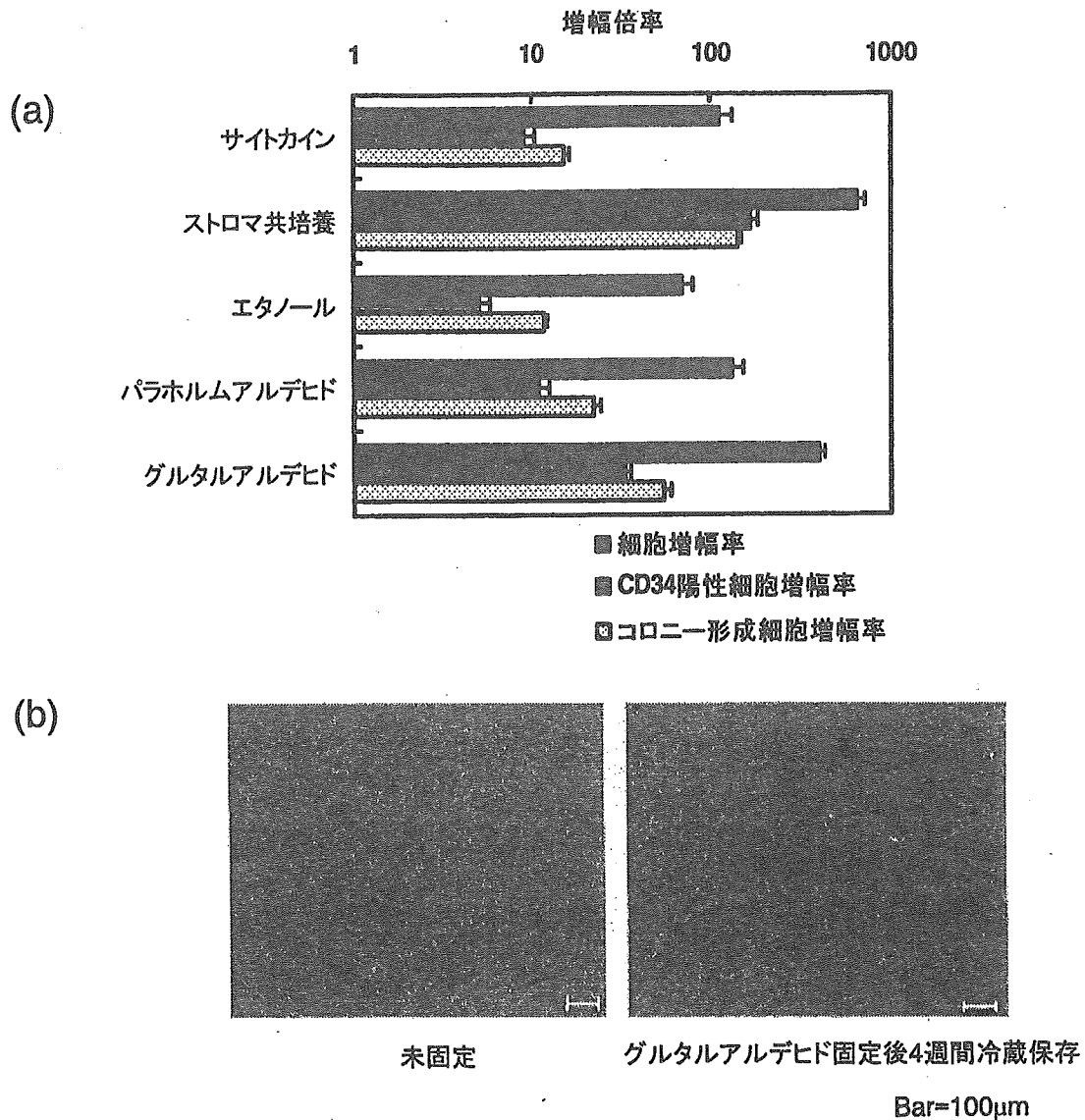


図3

(a) サイトカイン(トロンボポエチン, 幹細胞成長因子(SCF), Flt 3リガンド)添加, 不死化ヒトストローマ細胞上, 各種固定化剤で固定化したストローマ細胞上での臍帯血造血幹細胞の培養(2週間)。(b) グルタルアルデヒド固定化前後のヒトストローマ細胞の位相差顕微鏡像。

基材の開発を行うことを目標として研究を行っている(図2)。¹⁻³⁾

4. ヒト臍帯血造血幹細胞の体外増幅

再生医療の最も進んだ分野は、骨髄移植である。ドナーから骨髄細胞を採取し、患者体内へ導入すると、造血幹細胞が生着し血球が生み出されるようになる。造血幹細胞の入手先は、骨髄、末梢血

から、臍帯血へと進展してきた。臍帯血は、これまで廃棄されていたものを使用できる上に、ドナーに負担がなく、組織適合性が寛容で、冷凍保存も可能である。しかし一般に採取可能な臍帯血からは充分量の造血幹細胞が得られず、成人の治療には困難が伴う場合がある。そこで、最近では2種類の臍帯血を混ぜて行うような治療も試行されるようになってきている。

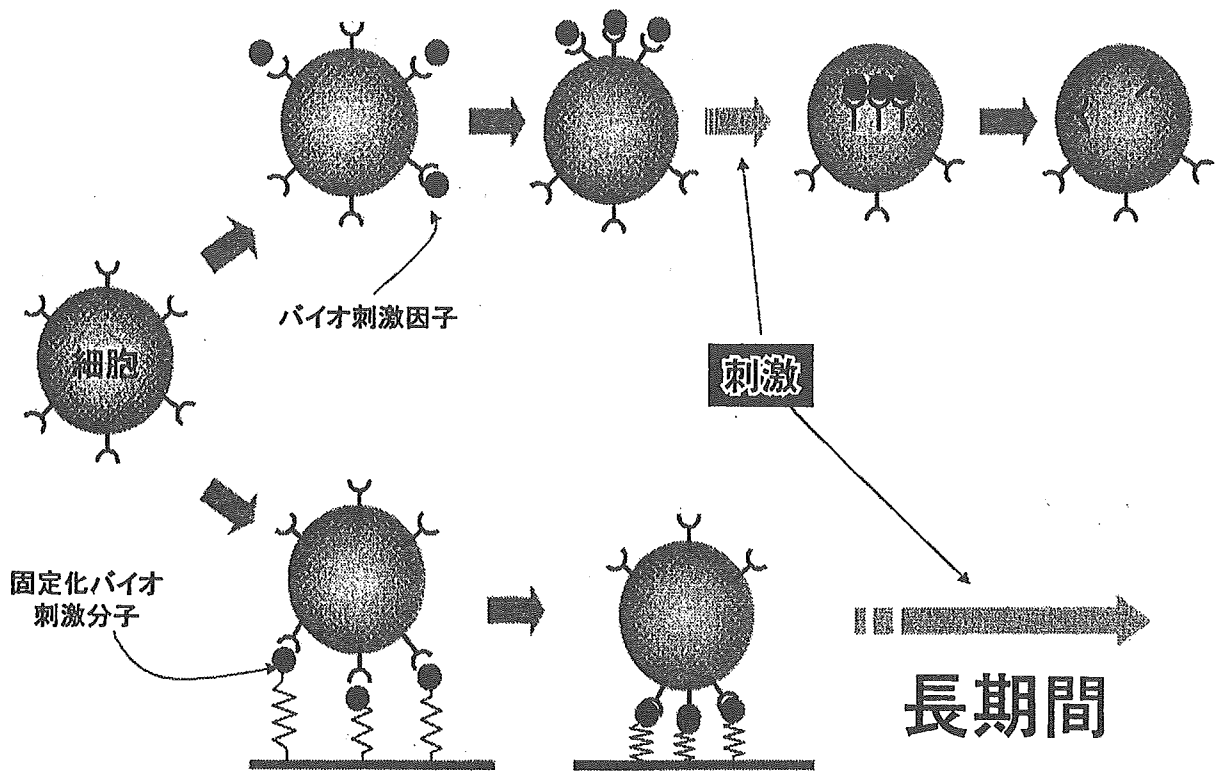
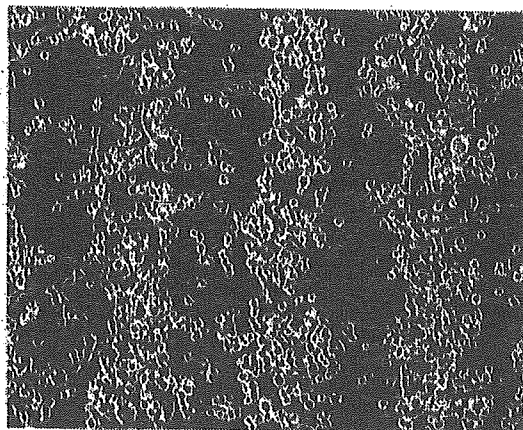


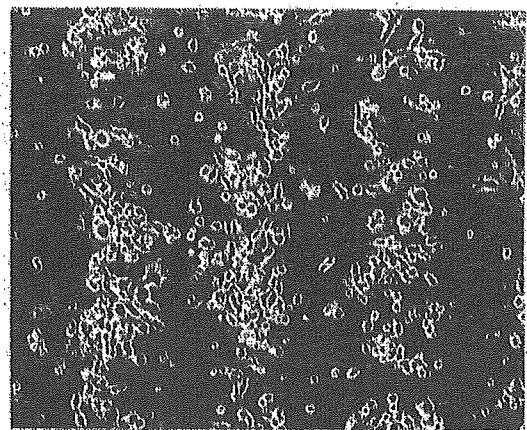
図4 固定化した成長因子による細胞機能制御機構

溶解状態のバイオシグナル分子は、受容体と相互作用して錯体を形成すると、膜上で集合し、やがて細胞内に取り込まれ、分解されるが、固定化したバイオシグナル分子は内在化を受けずに長期間刺激を伝達し続ける。

1回目培養



2回目培養



100μm

図5 エリスロポエチン固定化基板上的のエリスロポエチン依存性ヒト白血病由来細胞の培養
1回培養に用いた固定化エリスロポエチンを2回目の培養に用いることも可能であった。

Notchリガンド固定化領域

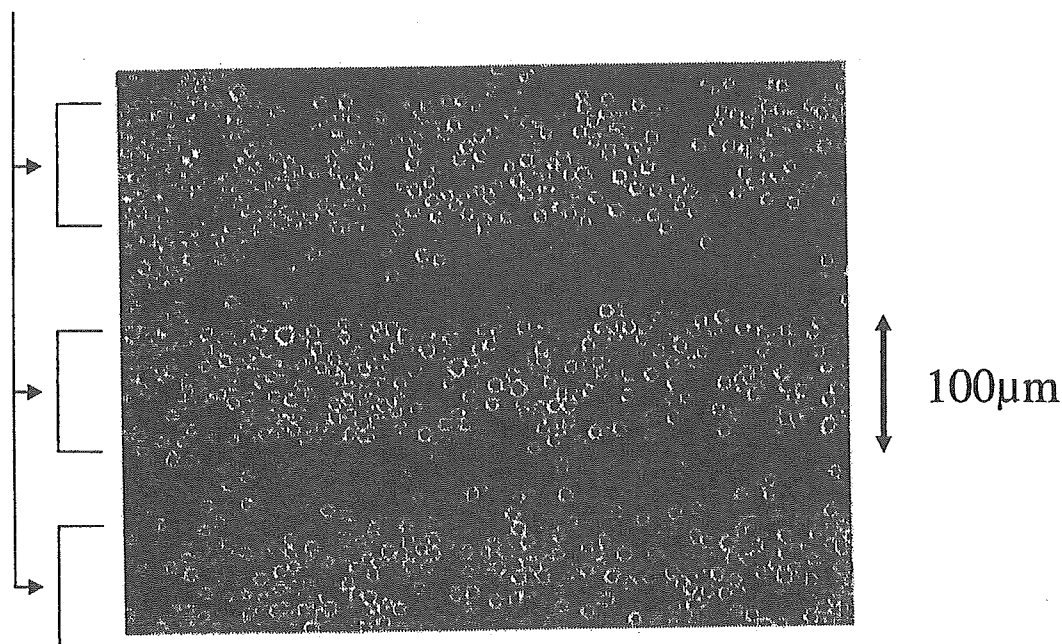


図6 Notch リガンド固定化基材上でのヒト白血病由来細胞 TMD7 の培養

Notch リガンドは旭化成の坂野誠治博士から、TMD7 細胞は東京医科歯科大学の東田修二博士から各々分与を受けた。

一方で、造血幹細胞を体外増幅させるために、これまで多くの研究が行われてきた。第一の方法は、様々な造血サイトカインを組み合わせて添加するシステムで、数多くの研究が報告されているがまだ十分な効果は得られていない。十分な効果が得られないのは、造血幹細胞が生体内で増幅するためには、骨髓内部の環境（ニッチェ）が重要な役割を果たしているためと考えられる。そこで、第二の方法として、ナース細胞やフィーダー細胞と呼ばれる細胞と共培養することによりニッチェを調製することが行われている。これにより長期間の増幅が支持される。しかし、前述のように異種動物由来細胞を用いてきた。

そこで私たちは、まずヒトの骨髓ストローマ細胞に、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT）遺伝子を導入し、その中からナース細胞として有望な細胞をクローニングする実験を行った。細胞

は分裂ごとにその染色体末端のテロメア領域が短縮し、これが進むと細胞の分裂が抑制されるが、hTERT 遺伝子は分裂によるテロメア長の短縮を回復させ、恒常的に発現させると細胞の形態を損なわずに不死化することができる。これまでにいくつかのクローンを得、それらが造血幹細胞増幅支持能をもつことがわかってきた。一方で、支持能が、培地に栄養分や増殖因子を補給するフィーダー作用によるだけではなく、直接の細胞間の接触によることが大きいことを、細胞を化学的に固定化しても活性を保持することから明らかにした。⁴⁾ 図3には、臍帯血から分離した造血幹細胞（CD34 陽性細胞）の増幅を測定した結果を示す。サイトカインの組み合わせだけでは、細胞数とコロニー前駆細胞数は各々 100、20 倍程度の増幅だったのに対し、生きたストローマ細胞と共培養した系では各々約 650 倍、150 倍増加した。これに対し、グルタルアルデヒドで固定したストローマ

共培養系でも約 400, 50 倍に増加し、分化能をもつ細胞を増幅させることができた。固定化剤により活性の違いはあるものの、必ずしも生きた細胞でなくても増幅支持能があり、生きたストローマ細胞には及ばないもののサイトカインを添加しただけより大きな効果があること、そして固定化することによって活性を保ったまま冷蔵できることもわかった。

第三の方法として、既知のサイトカインや、新たにストローマ細胞から増幅支持能に関与する膜タンパク質を探し出し、これらを固定化した材料の開発に取り組んでいる。これまでに、インシュリン、上皮成長因子 (EGF)、神経成長因子 (NGF)、腫瘍壊死因子 (TNF) などを固定化して細胞機能を増幅したり、制御したりできることを示してきた (図 4)。²¹ その原理を幹細胞増幅に応用しようとするものである。図 5 には、モデル細胞としてヒト白血病由来細胞 UT 7-EPO を、サイトカインとしてエリスロポエチン (EPO) を選び、マイクロパターン状固定化した EPO 上

で UT 7-EPO を培養した結果を示す。3 日間経ると EPO が固定化されていない表面では UT 7-EPO はアポトーシスを誘起され死滅したが、EPO が固定化されている領域では、増殖が観測された。⁵¹ これは固定化 EPO が UT 7-EPO に特異的に働き、アポトーシスを抑制したものと考えられる。また、一度 UT 7-EPO を剥離し、再度新しい細胞を播種して培養しても EPO 固定化領域でのみ増幅が観測され、固定化 EPO の繰り返し利用も可能であることがわかった。

一方、膜タンパク質として知られる Notch リガンドを固定化した場合を図 6 に示す。Notch リガンド固定化領域でだけ依存性細胞の接着、増殖が観測された。造血幹細胞の培養に必要なサイトカインとして、トロンボポエチン、幹細胞成長因子 (SCF)、Flt 3 リガンドなどが、膜タンパク質としても Notch リガンド以外にもいくつか知られるようになってきている。今後は、これら様々なサイトカインや膜タンパク質を組み合わせ、幹細胞培養用の人工ニッチェを構築してゆき

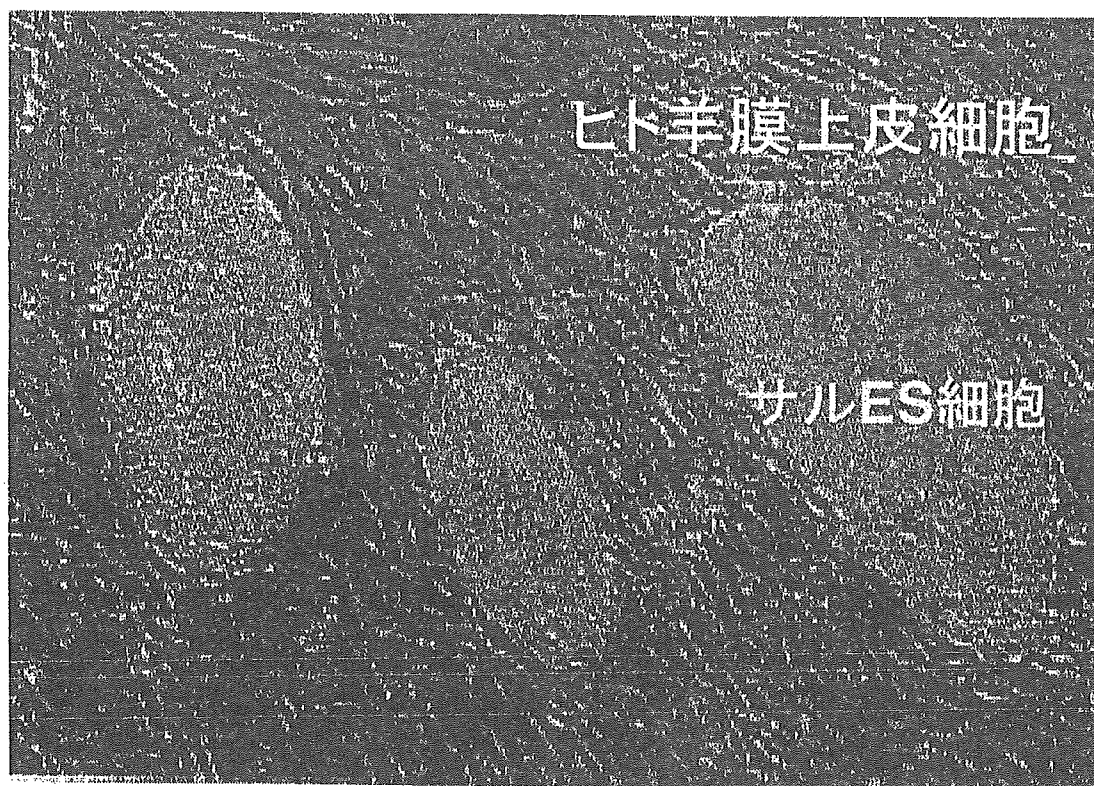
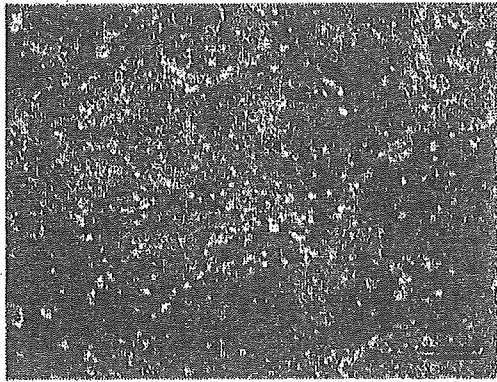
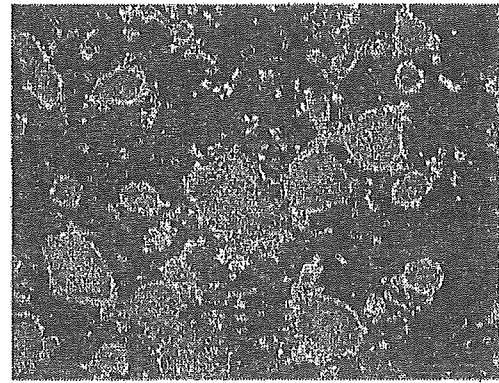


図7 ヒト羊膜上皮細胞上で培養したサル ES 細胞



100 μm

LIFなしでのマウスES細胞培養



100 μm

固定化LIF (10^4 U/well)上でのマウスES細胞培養

図8 LIFを固定化した基板上と固定化しない基板上で6日間マウスES細胞の培養を行い、アルカリフォスファターゼ染色。

たい。

5. 胚性幹 (ES) 細胞の体外増幅

ES細胞培養法についても実際の医療に用いるためには、倫理的な面以外でも技術的に解決しなければならない問題が多い。その一つは、マウスES細胞では様々な培養法が確立されているが、ヒトを含む霊長類ES細胞については、未分化状態で増幅する培養法は、異種動物由来細胞やヒト中絶胎児由来細胞をナース細胞として用いる以外に一般的には確立されていないことである。⁶⁾そこで、我々はサルES細胞培養のためのヒト由来ナース細胞の探索を行った結果、実用的なナース細胞としてヒト胎盤由来の羊膜上皮細胞及び絨毛膜板細胞が機能することを発見した。⁷⁾特に希アンモニア水で処理すると、サルES細胞を半年以上、未分化状態で安定に増幅できた(図7)。

また、マウスES細胞のフィーダー細胞を用いない培養法は確立されているものの、いくつかの添加物を必要とする。その中の一つが、Leukemia Inhibitory Factor (LIF)である。そこで、LIFを固定化し、その上でマウスES細胞を培養した(図8)。するとLIF固定化基材上で培養し

たマウスES細胞は、アルカリフォスファターゼ活性を指標に染色でき、このことから未分化を維持したまま増殖できることがわかった。これまでに固定化した様々なサイトカイン同様、LIFは固定化しても活性を維持することがわかった。⁸⁾今後、分化を制御できる様々なバイオシグナル分子を固定化することにより、ES細胞から様々な分化状態を制御した組織構造化ができることと期待できる。

6. 終わりに

体性幹細胞を用いた再生医療は着実に発展してきている。一方で、ES細胞については、2004年のアメリカ大統領選でも争点の一つになった。結局は、ヒトES細胞研究に消極的なブッシュ大統領の勝利となったが、このような連邦政府とは別に、アーノルド・シュワルツネッガー知事のカルフォルニア州では、住民投票による賛成多数の支持を受け、今後10年間で州予算から約30億ドルを、ヒトES細胞研究を中心とした再生医療の基礎研究に出資することになった。カルフォルニア州は、もともと生殖医療の発達した地域の1つであり、治療を受けるための訪問者も多く、ヒト

ES細胞樹立のためのヒト胚の入手は容易な地域である。ヒトES細胞の研究は、アジア地域での進展も著しいが、カリフォルニア州がこの領域の研究を大きく発展させることは間違いない。日本でも基礎研究に根ざす様々な可能性を生かしながらの臨床応用への展開が望まれる。

参考文献

- 1) 伊藤嘉浩 造血幹細胞培養のための人工マトリックス. 分子細胞療法 2 : 52-55, 2003
- 2) 伊藤嘉浩 再生医工学のためのバイオマテリアル表面. 表面科学 25 : 16-22, 2004
- 3) 伊藤嘉浩, 野川誠之, 金野智浩 他 幹細胞の体外培養のためのバイオマテリアル. 再生医療学会誌 3 : 55-61, 2004
- 4) 野川誠之, 伊藤嘉浩 固定化培養基材—造血幹/前駆細胞の体外増幅を目指して—. 遺伝子医学MOOK 1 : 88-93, 2004
- 5) Ito Y, Hasuda H, Yamauchi Y, et al. Immobilization of erythropoietin to culture erythropoietin-dependent human leukemia cell line. Biomaterials 25 : 2293-2298, 2004
- 6) 伊藤嘉浩, 金野智浩, 宮本寛治 ES細胞培養技術. バイオインダストリー 21 : 5-11, 2004
- 7) Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. Stem Cells 22 : 433-440, 2004
- 8) Makino H, Hasuda H, Ito Y Immobilization of leukemia inhibitory factor (LIF) to culture murine embryonic stem cells, J Biosc. Bioeng 98 : 374-379, 2004

再生医療用ナノファイバー

Nanofiber for Regenerative Medicine

伊藤嘉浩^{*1} Oh Hyeong Kwon^{*2} Inn-Kyu Kang^{*3}

近年、エレクトロスピンニング法によるナノファイバーの研究が盛んに行われるようになり、様々な素材や形状のものが作られるようになった。そこで、ナノファイバーを用いた再生医療用材料、主に生分解性高分子を用いたティッシュエンジニアリングのためのスキャホールド（足場）として、将来へ期待がかかっている。本稿では、再生医療分野におけるナノファイバー研究についての現状を概説した。

1. はじめに

2004年2月、シーエムシー出版から『ナノファイバーテクノロジーを用いた高度産業発掘戦略』¹⁾なる書籍が出版された。ナノファイバーテクノロジーは米国と韓国で特に盛んに研究されている。バイオマテリアル分野で特に用いられる方法はエレクトロスピンニング法あるいはエレクトロスプレー法と呼ばれる方法で、安価な装置でナノサイズ材料ができることもあり、様々な素材が加工されている。ここでは、エレクトロスピンニング法について概説し、その医療分野への応用について述べる。

2. エレクトロスピンニング法

エレクトロスピンニング法の歴史を表1に示す。

1917年にZelenyにより、溶液に高い電場をかけると不安定なconeが形成され、臨界電圧以上ではスプレー現象が生じることが発見され、エレクトロスピンニング法の特許は、1934年になる。その後、医用目的の特許なども現れたが、今日のように研究が盛んになったのは、90年代半ばからで、製造装置が安価で、容易にナノ構造体が得られることによる。

図1には製造原理を示す。試料は、微細な先端をもつキャピラリーに収められ、キャピラリー先端から導電性基板に数キロボルトの高電圧を印加すると試料が静電気力によって噴射される。

写真1には、実際筆者らが作成した装置の写真を示す。エレクトロスピンニング法のメカニズムはまだ十分に解明されていないが、概略は以下のよう²⁾に考えられている。まず、電圧の印加により

^{*1}Yoshihiro Ito (財)神奈川科学技術アカデミー 伊藤「再生医療バイオリクター」プロジェクト プロジェクトリーダー；(独)理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

^{*2}Oh Hyeong Kwon Department of Polymer Science & Engineering Kumoh National Institute of Technology Assistant Professor

^{*3}Inn-Kyu Kang Department of Polymer Science Kyungpook National University Professor

表1 エレクトロスピンニング法によるナノファイバーの歴史

1917	Zeleny	エレクトロスプレー現象の研究
1934	Formhals	電場を使った酢酸セルロースのエレクトロスピンニング (USP 1975504 (1934), USP 2160962 (1939))
1971	Baumgarten	アクリルポリマーのエレクトロスピンニング (繊維径 500~1,100nm)
1977	ICI	創傷被覆用ナノファイバーマット (USP 4044404)
1981	Manley <i>et al.</i>	ポリエチレンとポリプロピレンのエレクトロスピンニング
1989	Reneker <i>et al.</i>	エレクトロスピンニング装置の開発と様々な高分子のナノファイバー化
1994	Reneker <i>et al.</i>	ポリエチレンオキシドのエレクトロスピンニング
1995 以降		加工条件による繊維形状の分析 ナノファイバーの用途展開 エレクトロスピンニング法の原理と機構の解明

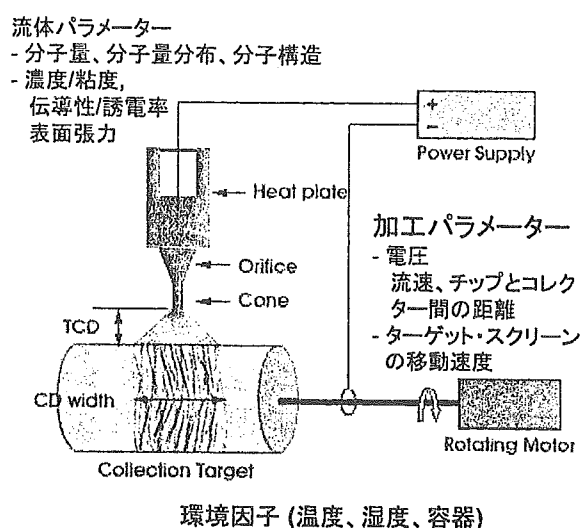


図1

キャピラリー先端の液体表面に電極と反対符号の電荷をもつイオンが集まる。液体表面に蓄積された電荷と電場の相互作用によってキャピラリー先端ではメニスカスが半円状に盛り上がる。より高い電場の下では、Taylor-Cone と呼ばれる円錐状のメニスカスが形成される。電場をさらに大きくし、静電気力反発が表面張力を上回ると、液体の一部が Taylor-Cone から飛び出し、液滴あるいはジェットとして噴出を始める。噴出された液滴あるいはジェットは、強く帯電しており、電場により導電性基板へ引き寄せられる。場合によっては、液滴内部での静電気力反発によってさらに

分裂して細かい液滴あるいはジェットを形成する。形成された液滴のサイズは極めて小さく、表面積が体積より非常に大きいため、きわめて短時間のうちに溶媒が蒸発する。通常、溶媒は飛行過程に蒸発するので、基板には乾燥した溶質分子がデポジットされる。このとき基板上にナノスケールの粒状、紡錘状、繊維状などの構造体が形成される。一般に、分子量の比較的低い試料からは粒状構造（ナノパーティクル）が、高い試料からは繊維構造（ナノファイバー）が形成されやすく、このような方法を最も一般的にはエレクトロスプレー法といい、特に繊維構造体のみを形成させる場合にエレクトロスピンニング法と呼ばれている。

図2には電界強度とファイバーの形成の様子を表す。これまでに、表2に示すように様々なナノファイバーが得られてきた。生体高分子としても多くの研究が行われてきている。

ナノファイバーの特徴をまとめると、

- ①高い比表面積
- ②高いアスペクト比（長さ/直径）
- ③不織布の多孔性制御可能
- ④様々な高分子液体（溶液、溶融体）に適用可能
- ⑤簡便で安価なプロセス

となり、現在、医療分野では、創傷被覆材、ティッシュエンジニアリングのスキューホルド（足場）、

ガラス・シリンジ (10ml, 22G 金属ニードル)

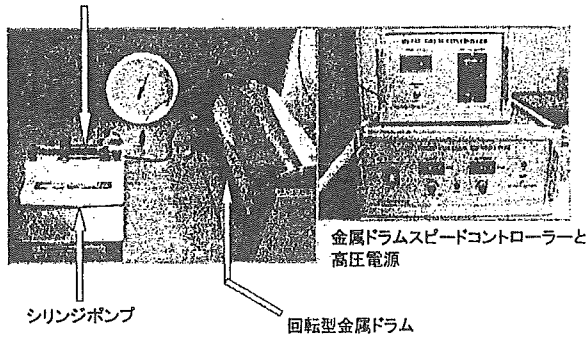


写真 1

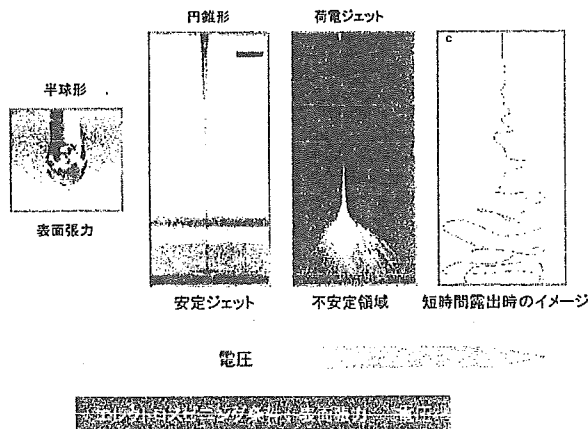


図 2

人工血管, ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用が進められている。

3. ナノファイバー作成

ここで, どのようなナノファイバーが作られるかを, 筆者らの例をもとに説明する³⁾。ここでは, バクテリアが産生する生分解性高分子として知られるポリ (β -ヒドロキシアリコノエート) 誘導体 (PHBV) をナノファイバーにする。写真 2 には, 高分子溶液の濃度を変えたときのナノファイバーの形状を示す。低濃度溶液ほど細い直径のナノファイバーが得られる。また, 写真 3 に示すようにスピニング距離を長くするほど, また写真 4 に示すように電場を強くするほど, 直径が細くなる傾向も見られた。

また, 同じ高分子でも溶解させる溶媒によってもナノファイバーの形状はかなり異なる。その例

表 2 ナノファイバーの例

ポリマー分類	ポリマー	溶媒
高性能ポリマー	ポリアミド ポリアミック酸	フェノール m-クレゾール
液晶ポリマー	アラミド ポリ (γ -ベンジル グルタメート)	硫酸 DMF
繊維ポリマー	ポリアクリロニトリル ナイロン	蟻酸 蟻酸
ポリオレフィン	ポリプロピレン 低密度ポリエチレン	熔融 熔融
伝導性ポリマー	ポリアニリン	硫酸
生体高分子	DNA コラーゲン フィブリノーゲン PLGA ポリ (ヒドロキシ ブチレート-co-バ レレート)	水 HFP HFP/MEM HFP クロロホルム
コポリマー	ナイロン 6-ポリア イミド	蟻酸
ブレンド	PET/PEN ブレ ンド	熔融

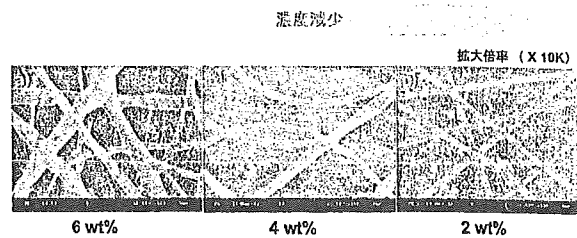


写真 2

を写真 5 に示す。図 3 には直径の分布を示す。

松田らは, このエレクトロスピニング法を発展させて多層法や混合法を編み出している⁴⁾。例えば, I型コラーゲン, スチレン化ゼラチン, セグメント化ポリウレタン, ポリオキシエチレンの 4 種類の高分子を連続あるいは同時に噴出させることで様々な複合組織体を創出できることを報告している。

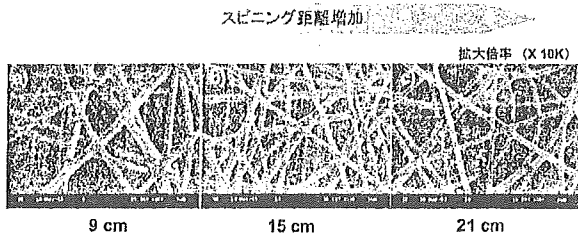


写真 3

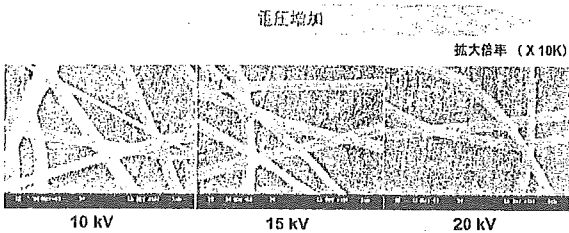
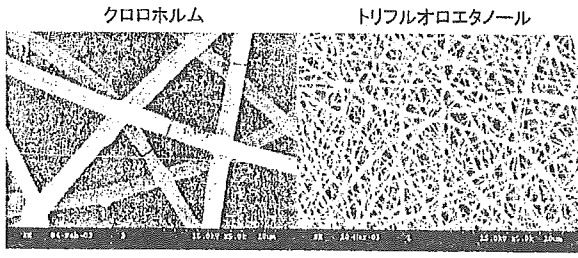


写真 4



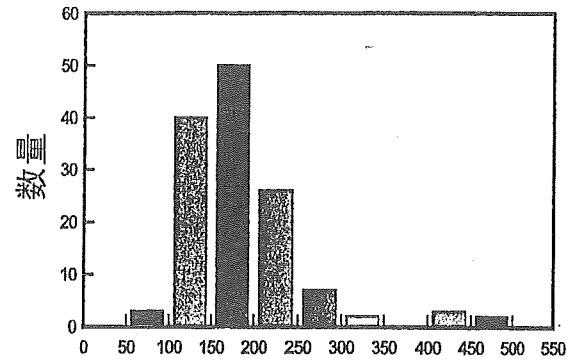
最小径形成条件下でナノファイバー化

写真 5

さらなる展開として繊維を交差させたり、平行に並べたりもできるようになっている。また、ゾルゲル法と組み合わせてセラミックのナノファイバーを作成したり、中空のナノファイバー化も可能になってきており、これらの製造技術の発展により、新しい可能性が広がってきている⁵⁾。

4. 医療への応用研究

医療分野への応用を目指した研究としては、生分解性高分子のナノファイバーを用いたものが最も多く報告されている。例えば、Kimらは、ポリ乳酸ナノファイバーを作成し、比表面の増加により、これらの分解速度が顕著に速くなることを報告している⁹⁾。Liらは、ポリ(ϵ -カプロラクトン)ナノファイバーから3次元構造物を調製し、



繊維径 (nm)

最小	56.569
最大	466.905
幅	410.336
平均	184.715
標準偏差	69.352
サンプル数	130

図 3

軟骨細胞の培養を行っている⁷⁾。細胞培養用のポリスチレンプレートに単層で存在するナノファイバーより、軟骨細胞の発現型を保持し、細胞成長も促進したことから、軟骨ティッシュエンジニアリングのスキヤホールド(足場)として有望であると報告している。Bolandらは、ポリグリコール酸でナノファイバーを作成し、さらに酸処理を行うことで、生体適合性が向上することを報告している⁸⁾。ポリ乳酸共重合体として、Ramakrishnaのグループは、ポリ(L-乳酸-co-カプロラクトン)共重合体からナノファイバーを作成し、溶媒キャスト法で作成した平膜に比べて、平滑筋細胞や内皮細胞が接着しやすく成長しやすいこと^{9, 10)}を、Bhattaraiらは、ポリ(p-ジオキサノン-co-L-乳酸)-ブロッカー-ポリエチレングリコール共重合体からナノファイバーを作成し、NIH3T3繊維芽細胞がナノファイバーの配向に沿って並び成長することを報告している¹¹⁾。

Kattiらは、生分解性ナノファイバーを利用した抗生物質徐放システムを報告している¹²⁾。ポリ(乳酸-co-グリコリド)(PLGA)をエレクトロス

ピニング法でナノファイバーにし、抗生物質としてセファゾリンを導入した。すなわち、PLAGAとセファゾリンをジメチルホルムアミドとテトラヒドロフランの混合溶媒に溶解して、紡糸することにより調製された。筆者らは、生分解性のポリ(3-ヒドロキシブチル酸-co-3-ヒドロキシバレリク酸)からエレクトロスピンニング法でナノファイバーを調製し、ヒドロキシアパタイト(HAp)との複合化を行っている¹³⁾。ナノファイバー化によって生分解性が顕著に促進され、HApとの複合化によりさらに促進されることが見出された。しかし現在のところ、HApとの複合化による顕著な細胞応答の差は見出されていない。複合化の方法を変えることにより、HApの効果が現れるかを検討中である。

天然高分子のナノファイバーとしては、絹フィブロインの報告が最近2つある。Minら¹⁴⁾は、絹フィブロインの蟻酸溶液からの再生ナノファイバーを作成し、50%メタノール水溶液で化学処理した。これは、ヒト・ケラチノサイトや繊維芽細胞の接着を促進したと報告されている。さらに、Jinら¹⁵⁾は、カイコの絹水溶液からのナノファイバー(直径約700nm)を作成し、通常の絹ファイバー(直径約15 μ m)との比較を行ったところ、前者が、ヒト骨髄ストローマ細胞の接着、伸展、成長において高い支持能があったと報告しており、ナノファイバーのティッシュエンジニアリングへの有用性を明らかにしている。

非分解性高分子としては、ポリウレタンのナノファイバー膜を創傷被覆材として用いた例も報告されている¹⁶⁾。これは、水分蒸発を制御し、高い酸素透過性をもち、浸出液の排出を促進するが、その孔が超微細であるために微生物の侵入を阻止できる。組織学的にも創傷被覆材として有用であると結論している。

この他にも、ナノファイバー化ではないが、エレクトロスプレー法でリン酸化カルシウム(CaP)をデポジットしたバイオマテリアルが報告されている¹⁷⁾。この技術では、カルシウムとリン酸を含んだ有機溶液がノズルから噴出される。チタン合

金(TiAl6V4)の上にCaPをエレクトロスプレーし、その上でラットから採取した骨髄細胞を播種して培養すると、他の方法でCaP被覆した場合より、骨芽様細胞の増殖促進が観測されたとしている。

5. おわりに

通常の紡糸では2マイクロメートル以下のサイズのものを作るのは難しい。また、フラーレンやカーボンナノチューブとは違い、組織化の制御がしやすい。そのようなことから、エレクトロスピンニング法を用いたナノファイバーについては指数関数的に発表論文が増加しており、医療以外に様々な応用展開が報告されている^{1, 5)}。繊維は日本が得意とする技術分野であるが、ナノファイバーに関しては遅れをとっているようである。今後の大いなる発展が期待されるだけに、日本における一層の展開が望まれる。

文 献

- 1) 本宮達也監修, 「ナノファイバーテクノロジーを用いた高度産業発掘戦略」, シーエムシー出版(2004)
- 2) 山形豊, 松本英俊, 高分子, 52, 829(2003)
- 3) I. S. Lee, O. H. Kwon, W. Meng, I. -K. Kang, Y. Ito, *Macromol. Res.*, 12, 374-378(2004)
- 4) S. Kidoaki, I. K. Kwon, T. Matsuda, *Biomaterials*, 26, 37-46(2005)
- 5) Y. Dzenis, *Science*, 304, 1927-1919(2004)
- 6) K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y. -S. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, *Biomaterials*, 24, 4977-4985(2003)
- 7) W. -J. Li, K. G. Danielson, K. G., P. G. Alexander, R. S. Tuan, *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A, 1105-1114(2003)
- 8) E. D. Boland, T. A. Telemeco, D. G. Simpson, G. E. Wnek, G. L. Bowlin, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 71B, 144-152(2004)
- 9) X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, S.

- Ramakrishna, *Biomaterials*, 25, 1883-1890 (2004)
- 10) C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Biomaterials*, 25, 877-886 (2004)
- 11) S. R. Bhattarai, N. Bhattarai, H. K. Yi, P. H. Hwang, D. I. Cha, H. Y. Kim, *Biomaterials*, 25, 2595-2602 (2004)
- 12) D. S. Katti, K. W. Robinson, F. K. Ko, C. T. Laurencin, *J. Biomed. Mater. Res. Part B, Appl. Biomater.*, 70B, 286-296 (2004)
- 13) Y. Ito, H. Hasuda, T. Kamitakahara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, O. H. Kwon, I. -K. Kang, *J. Biosci. Biotechnol.*, in press (2005)
- 14) B. -M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, W. H. Park, *Biomaterials*, 25, 1289-1297 (2004)
- 15) H. -J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 25, 1039-1047 (2004)
- 16) M. -S. Khil, D. -I. Cha, H. -Y. Kim, I. -S. Kim, N. Bhattarai, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 67B, 675-679 (2003)
- 17) M. C. Siebers, X. F. Walboomers, S. C. G. Leeuwenburgh, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen, *Biomaterials*, 25, 2019-2027 (2004)



特集にあたって

横山昌幸*1 伊藤嘉浩*2

ナノテクノロジーが大々的に展開されるようになり、バイオテクノロジーと融合したナノバイオテクノロジーへ、そして近年、ナノメディシンとして応用を志向する研究領域が注目されるようになってきた。しかし、ナノメディシンといっても、医学分野では、すでにナノレベルのデバイスは使われている。それは、ドラッグデリバリーシステムの分野である。

血液を介して薬物を疾病組織・臓器に運搬するためには、毛細血管の直径約 $5\mu\text{m}$ よりも薬物キャリアーが小さいことが前提となるが、実際にはこの上限よりも遙かに小さな 100nm 以下のものが用いられている。その理由は、 400nm 位より大きいと肝臓・脾臓などで異物と判断されてしまい、血液中をうまく循環できないためによる。それに加えて、固形がん組織などに血液から移行する経路を通過するためにも 400nm 以下が必要とされる。このようにナノレベルの大きさが最も直接的に医療で活用されるのが薬物ターゲティングである。

これと同様にナノサイズのシステムで診断用の放射性同位元素や造影剤のキャリアーシステムは、

「分子イメージング」の概念と半導体のナノ粒子の出現により、これからの大きな発展が期待されている。再生医療材料の分野でも、精緻な構造を求める動きがある。それは、細胞のようなマイクロメートルレベルの領域でも、細胞骨格系タンパク質の制御に基材のナノメートル・サイズの構造が影響を与え、細胞接着に影響することが報告されるようになってきているからである。ナノメートル・レベルの構造制御は、細胞機能を積極的に制御する因子になる可能性がある。

ただ、最近気にかかることとして、ナノ物質の生体や環境への悪影響を指摘する研究が多く発表されるようになってきたことがある。2004年英国では、フラーレンやナノチューブはフード内で使うようにと指示するようなマニュアルが公的機関から出されるようになってきている。サイズにより、体内での集積場所や作用効果も異なるという研究が報告されている。このような欧米でのナノテク材料の危険視に、日本のナノテク産業隆盛への牽制球ではないかという多少穿った見方もあるものの、日本でも、安全性に関して研究や議論が行われ始めている。カーボン系ナノマテリアル

*1Masayuki Yokoyama (財)神奈川科学技術アカデミー 横山「高分子ナノメディカル」プロジェクト プロジェクトリーダー

*2Yoshihiro Ito (財)神奈川科学技術アカデミー 伊藤「再生医療バイオリアクター」プロジェクト プロジェクトリーダー；(独)理化学研究所 中央研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

を医療にすぐに応用しようとするものはないものの、ナノメディシンの更なる発展のためには、慎重に研究を進めてゆく必要がある。

世界でナノメディシンの研究が活発化する中、2004年に、横山は(財)神奈川科学技術アカデミーで横山「高分子ナノメディカル」プロジェクトを、伊藤は(独)理化学研究所で伊藤ナノ医工学研究室を

立ち上げるなど、「ナノ」で医療応用分野を切り拓こうと志を新たにしている。

このようなことを背景に、ナノメディシンの現状の今後の展望についての特集を企画し、第一線でご活躍の研究者の方々に研究を紹介していただいた。



Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- γ Production from CD4T Cells

Tianyi Liu¹, Hitoshi Kohsaka², Motoharu Suzuki¹, Rie Takagi¹, Kumiko Hashimoto¹, Yasushi Uemura¹, Hideki Ohyama¹ and Sho Matsushita¹

ABSTRACT

Background: Based on the fact that site-specific amino acid replacement on peptide antigens stimulated T cell clones to produce increased amount of IFN- γ , we investigated this structure-function relationship, using various peptide analogues.

Methods: We used three human Th0 clones (BC20.7, BC33.5 and BC42.1) that express distinct TCR α and TCR β chains, but recognize the same TCR ligand; *i.e.*, the same framework of peptide antigen BCGa p84-100 in the context of DRB1*1405. These T cells were stimulated with various peptide analogues, followed by determination of proliferative responses and IFN- γ production.

Results: Replacement of Leu at peptide position 2 (P2) by amino acids which are less hydrophobic than the wild type (Val, Ala) or those with similar structural or neutral charge (Thr, Ser), induced increased IFN- γ production from T cells. This phenomenon was associated with structural features of TCR, especially the length of CDR3 region of TCR α . Amino acid replacement at the other positions did not induce increased IFN- γ production.

Conclusions: Amino acid substitution at P2 frequently induces increased IFN- γ production in a clone-specific manner, which is associated with the structure of CDR3 in TCRV α chains.

KEY WORDS

analogue peptide, complementarity determining region 3, interferon gamma, peptide antigens, T-cell antigen receptor

INTRODUCTION

Recent studies showed that T cell activation is not an all-or-none type of event; rather, qualitative changes in T cell responses can be induced by amino acid substitutions by either MHC molecules or antigenic peptides, *i.e.*, TCR ligands. Flexibility in recognition results in T-cell activation in the absence of a proliferative response, which is designated by the following terminology as demonstrated in previous studies by our group and others: partial agonism,¹ TCR antagonism,² anergy,³ survival⁴ and cytokine-specific up-regulation.^{5,6}

Amino acid residues on antigenic peptides have been roughly divided into two groups; one that is important for binding to TCR (T cell epitope), and the other that is important for binding to MHC (MHC anchor). However, the crystal structure of the human class II HLA-DR1 complexed with the influenza peptide reported by Stern *et al.*⁷ demonstrated that all the amino acid residues of the influenza virus peptide physically made contact with both HLA and TCR, with the exception of only one residue at the amino terminus which is buried deeply in the groove of class II, hence, there is no possibility for interaction with TCR.

¹Department of Allergy and Immunology, Saitama Medical School, Moroyama and ²Department of Bioregulatory Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

Correspondence: Sho Matsushita, Department of Allergy and Im-

munology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama, Saitama 350-0495, Japan.

Email: shomat@saitama-med.ac.jp

Received 5 May 2004. Accepted for publication 9 April 2004.

©2005 Japanese Society of Allergology

In our previous studies, single amino acid substitutions on a group I allergen in the *Cryptomeria japonica*-derived peptide resulted in a significant increase in IFN- γ production, with no remarkable changes either in proliferative response or IL-4 production.⁵ In this study, by using various analogue peptide species, we stimulated three human Th0 clones that express distinct TCR α and TCR β chains, but recognize the same TCR ligand, and tried to determine the structure-function relationship that leads to increased IFN- γ production from T cells.

METHODS

SYNTHESIS OF PEPTIDES

The wild-type BCGa p 84-100 (EEYLILSARD-VLAVVSK) and its analogue were synthesized using a solid-phase simultaneous multiple peptide synthesizer PSSM-8 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), and were purified by C18 reverse-phase HPLC (Millipore).

T CELL CLONES

BCGa p84-100-specific T cell lines were established as described.⁸ Three human CD4⁺ T cell clones (BC 20.7, BC33.5 and BC42.1) specific to BCGa p84-100+ DRA/DRB1*1405, yet bearing distinct TCR β (BV13S3, BV6S1 and BV5S4, respectively ;)⁸ established from PBMC of a BCG-primed healthy individual as described elsewhere,⁴ were used throughout the study. T cells were fed 50 U/ml human rIL-2 and irradiated autologous PBMC prepulsed with the wild-type BCGa p84-100 on a weekly basis.

ASSESSMENT OF T-CELL RESPONSES

Antigen-induced proliferation of the T cell clones were assayed by culturing the T cells (3×10^4 /well) in 96-well flat-bottomed culture plates in the presence of a peptide(s) and irradiated PBMC (1.5×10^5 /well), using RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, N.Y.) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 10% heat-inactivated autologous plasma. For the proliferation assay, cells were cultured for 72 hr in the presence of 1 μ Ci/well of [³H]thymidine during the final 16 hrs. Culture supernatants collected immediately before the addition of [³H]thymidine were used to determine lymphokine concentrations, using hGM-CSF ELISA kits (R&D systems) and hIFN- γ ELISA kits (Otsuka, Tokyo, Japan).

DETERMINATION OF TCRA GENE USAGE BY T CELL CLONES

To determine TCRVA gene usage of the T cell clones that were cultured with irradiated autologous PBMC, RNA were extracted from the cell mixture, and converted to cDNA. TCRA variable region cDNA were amplified with anchored PCR as described previously for amplification of TCRA variable region cDNA.⁹ A

Table 1 A panel of labeled TCRAV-specific oligonucleotide probes

AV gene	sequence	pool
AV4, 20	TGCTAAGACCACA/CCAGCC	A
AV11	TCTTCAGAGGGGAGCTGTG	A
AV2	ATCCTTGAGAGTTTTACT	B
AV8a	CCATTTCGAGCTGTATTTA	B
AV8b	GCATTTCGAGCTTTATTTA	B
AV15	CATTTGCTGGATTTTCGT	B
AV17	GATCTTAGGAGCATCATT	B
AV21	TGGGGGCATCAGTGCTGA	B
AV3	GAGAAGAGGATCCTCAGG	C
AV5	ACTATTCTCCAGCATACT	C
AV10	CCGTGTCCATTCTTTGGA	C
AV13	GAGAGGAATACAAGTGGA	C
AV19	CAATTTTTGTTGGCTATT	C
AV24	AGCATCTGACGACCTTCT	C
AV25	TCCTTGAACATTTATTA	C
AV26	CCTAGGGATATTGGGGTT	C
AV27	GAAAAAATATACCATCT	C
AV29	CAGGCACCTTGTTGTGGC	C
AV32	ACTCATCACATCAATGTT	C
AV18	CTTTGGCAGCCCCATTAC	D
AV23	GAGACCCTCTTGGGCTG	D
AV28	ACTAACTTTCCAAGCCTA	D
AV30	GGAGTGTGCATTCATAGT	D
AV7	GGAGGCACTA/GCAGGACAA	E
AV6	ACAGCTTCACTGTGGCTA	F
AV12	TGCCAGCCTGTTGAGGGC	F
AV14	GTGA/GTCTCCACCTGTCTT	F
AV1a	CTCCTGTTGCTCATACCA	G
AV1b	CTCCTGCTGCTCGTCCCA	G
AV1c	CTCCTGGAGCTTATCCCA	G
AV9	AAGCCCACCCTCATCTCA	G
AV16	GCCTCTGCACCCATCTCG	G
AV22	CTGATACTCTTACTGCTT	G
AV31	CCTCTCTGGACTTTCTAA	G

Oligonucleotide probes specific to TCRAV family genes. De-generated probes were used to specify AV4 and AV20, AV7, and AV14 families. Three probes for AV1 family, and two probes for AV8 family were required to specify all members of each family. These probes were grouped into seven pools (pool A to G) depending on sequence similarity.

primary PCR was followed by two sequential nested PCR. TCRAV-specific primers used for primary PCR, nested PCR, and final PCR were CA4 (5'-CAG AAT CCT TAC TTT GTG AC), CA3 (5'-ATC GGT GAA TAG GCA GAC AG), and biotinylated CA5 (5'-CAC

Table 2 TCRVA and TCRVB usage of BC clones

BC clone	TCRVA	TCRVB
20.7	(AV25S1)FCAGHNAG(AJ14S3)	(BV12S3)CASRQAGTAYE(BJ2S7)
33.5	(AV3S1)FCATERGQ(AJ13S2)	(BV6S1A1)CASSPTGTANT(BJ1S1)
42.1	(AV8S1A1)FCAASLDNY(AJ126)	(BV5S1A1)CASRRSTGE(BJ2S2)

TCRVA and VB usage are shown, with amino acid sequences in the N(D)N region.

TGG ATT TAG AGT CTC TC), respectively. A panel of labeled TCRAV-specific oligonucleotide probes (Table 1) were used to study TCRAV gene usage with PCR-ELISA.¹⁰ First, seven pools of the AV-specific probes were hybridized with immobilized PCR products in microplates to find out positive wells. Then, the products were hybridized with individual AV probes in another set of plates to pin-point the AV genes predominantly used by the cDNA. To clone the entire variable region cDNA, cDNA were amplified with CA4 and reamplified with a nested primer, CA2 (5'-ACG CGT CGA CAC TGG ATT TAG AGT CTC TC). The products were subcloned into pBluscript II SK+ (Stratagene, La Jolla), and recombinant clones with the dominant VA gene were selected with dot blot DNA hybridization using corresponding VA-specific oligonucleotides. After sequence determination of these clones, dominant clones were selected as cDNA for the T cell clones.

RESULTS

TCRVA AND VB SEQUENCES

TCRVA and VB sequences of three T-cell clones BC 20.7, BC33.5 and BC42.1 are shown in Table 2. The N(D)N region sequences are shown as one-letter codes for amino acids, between V and J segments in parentheses. As described in our earlier studies, these T-cell clones recognize BCGa p84-100 (EEYLILSARDVLAVVSK; with first anchor underlined), in the context of HLA-DRB1*1405.⁴ It is especially important to note that N(D)N region consists of 8 and 11 residues at TCRVA and VB of BC20.7 and BC33.5, respectively, whereas that of BC42.1 consists of 9 and 9 residues, respectively.

STIMULATORY ACTIVITIES OF BCGA P84-100-DERIVED ANALOG PEPTIDE L87V TO BC20.7

To evaluate the effects of single amino acid substitutions, proliferation and lymphokine production in response to analogue peptides were determined and findings were compared with those seen with the wild-type peptide. Most of the analogue peptides that stimulated BC clones showed a pattern of lymphokine production similar to that for the wild-type peptide (not shown). However, IFN- γ production of BC20.7 was increased in response to several analogue peptides at high concentration (16 μ M), especially peptide L87V in which Leu is replaced by Val at the 87th residue of the peptide BCGa p84-100, whereas neither T cell proliferation nor production of

other lymphokines, showed any remarkable change; *i.e.*, only the production of IFN- γ was affected for recognition of the analog peptide L87V. As shown in Figure 1, to determine whether or not the change of IFN- γ production was due to differences in the HLA-peptide or TCR-TCR ligand avidity between L87V and the wild-type peptide, responses of BC20.7 to several different concentrations of L87V were compared with those of the wild-type peptide. In the range of concentrations from 0.016 μ M up to 16 μ M, IFN- γ production in response to L87V constantly exceeded that of the wild-type peptide. Moreover, the plateau level of L87V-driven IFN- γ production was significantly higher. Mean IFN- γ production of BC20.7 for L87V increased significantly in comparison to the wild-type, whereas no statistical differences were noted in proliferative responses between R21K and the wild-type at a range of 0.16 μ M to 16 μ M. The IL-4 production of BC20.7 for each analogue peptide was proportional to the proliferative response to each peptide, at a range of 0.0016 to 16 μ M (not shown). In contrast, production of GM-CSF gradually increased, in a dose-dependent manner throughout the range of 0.016 to 16 μ M. These data indicate that the plateau responses and proliferation of IFN- γ are not due to saturation of the TCR ligand on the APC surface.

STIMULATORY ACTIVITIES OF BCGA P84-100-DERIVED ANALOGUES TO THREE BC CLONES

All three T-cell clones were stimulated with analogues at 16 μ M, with replacements at P1 (=86Y) through P9 (=94V). Table 3 summarizes the results, regarding proliferative responses and IFN- γ production. P1 (=86Y) replaced by Ala (A) indicates a peptide species EEALILSARDVLAVVSK. Relative IFN- γ responses are shown, where IFN- γ production was divided by proliferation. P1 replaced by A gave values of 96/100/98, indicating that BC20.7, BC33.5 and BC 42.1 exhibited 96%, 100% and 98% responses respectively, as compared with the wild-type. Asterisks indicate peptide species that did not exert full agonistic activity; *i.e.*, peptide stimulation even at 16 μ M did not give a plateau response.

Most of analogues that exhibited full agonistic activity, stimulated IFN- γ production at levels roughly similar to the wild-type peptide, *i.e.*, at around 100%. However, it is important to note that L87T, L87S, L87A, and L87V significantly ($p < 0.01$) induced increased levels of IFN- γ production of BC20.7 and BC33.5, but not of BC42.1. Such a clone-specific phenomenon was

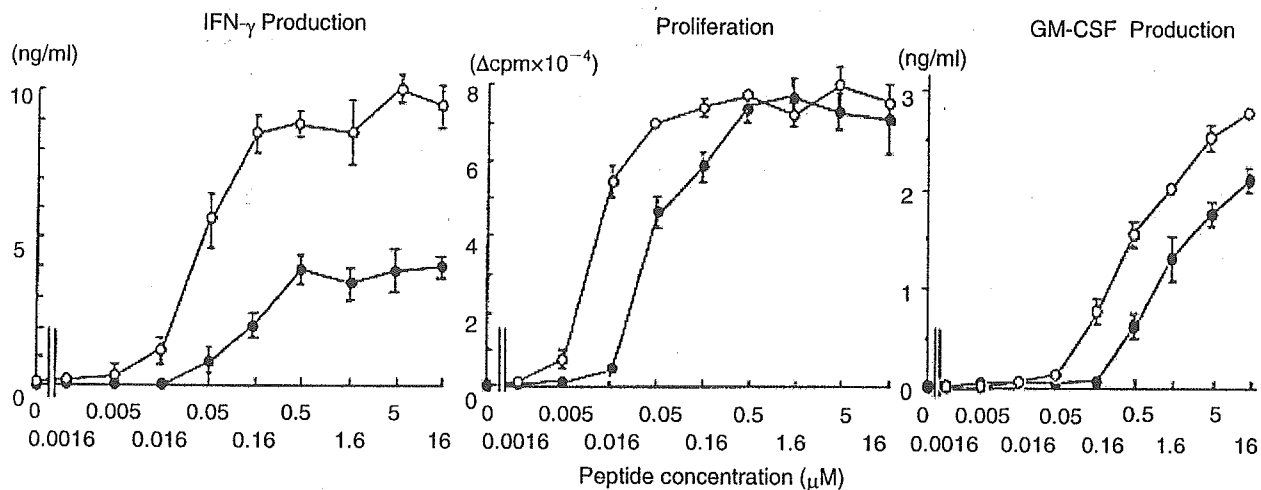


Fig. 1 IFN- γ production, GM-CSF production and proliferation of BC20.7 in recognition of either the wild-type peptide or L87V, at different concentrations. BC20.7 cells were cultured in triplicate with peptides and irradiated autologous PBMC, at the indicated concentrations. After 48-h incubation, supernatant fluids of triplicate cultures were collected. The remaining cells were pulsed with [³H]-thymidine, harvested after 16h, and subjected to liquid scintillation counting. Closed circle, wild type peptide; open circle, L87V. Results are expressed as the geometric means \pm standard error. IFN- γ production induced by L87V was significantly ($p < 0.01$) higher than that induced by the wild-type peptide, at peptide concentrations ranging from 0.016 to 16 μ M. On the other hand, plateau level of proliferation did not exhibit a significant difference, between 0.16 and 16 μ M ($p > 0.05$). GM-CSF production did not reach a plateau response even at 16 μ M, without any statistical difference between L87V and the wild-type peptide, at 16 μ M.

also observed when P5- and P8-substituted analogues were tested. Thus, S90E, S90G, S90M, D93Q, D93T and D93Y exhibited full agonism, in a clone-specific manner.

DISCUSSION

It is not very easy to identify TCR genes used by T cell clones, since they are usually cultured with irradiated autologous PBMC that includes polyclonal T cells. Random cloning of TCR cDNA derived from the cultured cells is minimally helpful in the identification, unless a large number of clones are examined. This problem was circumvented by the use of PCR-ELISA that was developed for TCRBV use,⁹ and established in the present report for TCRVA usage. This technique allowed us to quantitate TCRV gene usage in the cDNA samples, and thus to identify the TCRV gene used by the T cell clones.

Three T-cell clones used in the present study recognize the same TCR ligand, as proven in our previous study. This is based on the fact that these clones recognize BCGa p 84-100^(84EEYLILSARDVLAVVSK¹⁰⁰) in the context of DRB1*1405, and react to truncated peptides in a similar fashion.¹¹ Both BC20.7 and BC33.5 have 8 and 11 residues at N(D)N region of TCRVA and VB, respectively, whereas BC42.1 alone exhibits a different pattern, *i.e.*, 9 residues at N(D)N regions of TCRVA and VB. When peptide antigen is presented by class II MHC molecules, the N-terminal

half of antigenic peptide is recognized mainly by CDR3 of TCRVA, whereas the C-terminal half is recognized by CDR3 of TCRVB, which corresponds to N(D)N regions.¹² Interestingly, certain amino acid replacements on P2 induced increased IFN- γ production in BC20.7 and BC33.5 but not in BC42.1 cells, whereas those on P8 exhibited full agonism in BC 42.1 cells alone. It is thus likely that structural features of VACDR3 and VBCDR3 are responsible for specific responses induced by P2 and P8 analogues, respectively. Shuffling of N(D)N sequences between BC 42.1 and BC 20.7, or between BC 42.1 and BC 33.5 is underway to address this point.

Only L87T, L87S, L87A, and L87V induced IFN- γ enhancement. These arrangements are either smaller hydrophobic (A and V), or structurally similar neutral amino acids (T and S), indicating that close contact between P2 and TCRVA is taking place. Indeed, such a phenomenon is also seen in B-cell somatic hypermutation.¹³ Thus, B-cell V region mutation in immunoglobulin heavy chain genes shows higher affinity than the germ-line sequence, usually associated with Gly, Ala, Val, Ser, Thr, or Cys, *i.e.*, small hydrophobic or small neutral residues. Apparently these mutations are not associated with static charges, but can affect either hydrogen bonding, van der Waar's force, or hydrophobic interactions.

In our previous studies using cedar pollen-derived peptides, T to V replacement on P2 also induced IFN-