

した洗浄液で2週間震盪洗浄した。この処理により、多くの組織では深部まで十分に細胞成分が除去され、その一方でEVG染色においてコラーゲン繊維やエラスチン繊維はそのまま保存されていることが確認された。また、力学試験を行うと力学特性は処理前と同様に保持され、さらにPCR法にてブタ内在性レトロウイルス (PERV) -DNA が検出されなくなっていた。

以上より、本法は異種組織移植を行うための生体 scaffold 作製法として有望であると考えられた。

## ■ 心臓弁

脱細胞化異種心臓弁の先駆例として CryoLife 社の Syner Graft 心臓弁があり<sup>2)</sup>。2001年に欧州で市販された。しかしその成績が必ずしも満足のいくものでなかったこともあり、現在は販売が中止されている。心臓弁の脱細胞化法としては Haverich らが界面活性剤である Triton X-100 やトリプシンによる方法を<sup>3)</sup>、また Ingham らが SDS による細胞除去の有用性を報告している<sup>4)</sup>。

われわれも当初 Triton X-100 溶液を用いた心臓弁の脱細胞化を検討していたが、24時間の浸漬処理と2週間の洗浄を行った後も表層から1mm程度までしか細胞が除去されず、弁基部の組織内部では大部分の細胞成分が残存した。また、洗浄後も組織中に Triton X-100 の残留を認め、力学特性においても弁弾性率が有意に増加したため、最終的にこの方法による脱細胞化処理を中止し、新たな脱細胞化法として超高压処理法の開発へ移行した。超高压処理を行った弁では組織深部まで細胞が完全に除去され、力学特性への影響も認めなかった。

心臓弁 scaffold を移植する場合、宿主の自己細胞をあらかじめ移植片に組み込んで移植することで抗血栓性や組織の再構築促進が期待される。われわれはブタ同種心臓弁移植実験において、移植予定の宿主ブタから採取した大腿動脈の血管内皮細胞を分離・培養し、十分な細胞数まで増やした後に心臓弁 scaffold へ播種する方法を検討した。心臓弁は複雑な形状であるため細胞浮遊液中への単純な静置では表面全体に均一に播

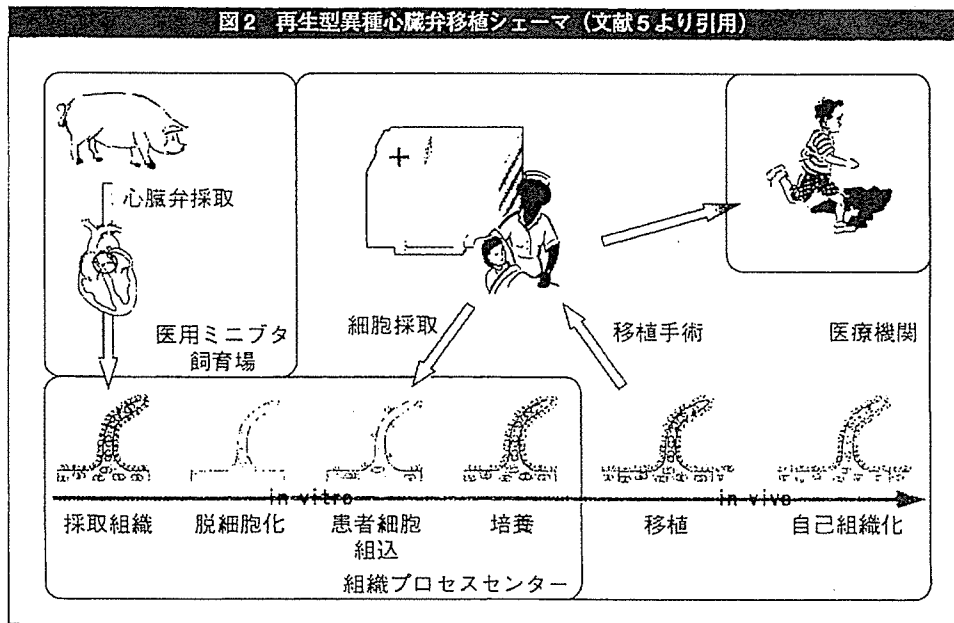
種できないことから、採血管用ローラー攪拌器を改良した2軸回転バイオリアクターと遠心型血液ポンプを利用した循環型バイオリアクターを独自に開発し、順に4時間および2日間の播種・培養を行うことで、心臓弁全体を内皮細胞で confluent に覆うことに成功した。

この方法を用いて、Triton X-100 により脱細胞化したブタ肺動脈弁に宿主内皮細胞を播種してから同所性に同種移植を行い、細胞播種を行わないで移植した脱細胞化弁、凍結保存弁と移植後成績を比較した。細胞播種脱細胞化弁では移植後1カ月の時点で内腔表面が一層の内皮細胞に覆われ、3カ月までに組織内部の再細胞化(平滑筋細胞、繊維芽細胞)が進行した。一方、未播種の脱細胞化弁や凍結保存弁では内皮細胞による被覆までは同様に認められたが、その後の組織内再細胞化が進展せず、また凍結保存弁においては脱細胞化弁と比べて炎症細胞の浸潤が顕著であった<sup>5)</sup>。従って、われわれの開発したバイオリアクターによる血管内皮細胞播種が移植弁組織の早期再細胞化に有用であると考えられた。現在、超高压処理した脱細胞化弁とバイオリアクターによる内皮細胞播種を組み合わせた移植の検討を行っており、将来的には組織の再構築をさらに促進する目的で幹細胞を含めた複数の細胞種を導入したテーラーメイド型移植用心臓弁の開発を計画している(図2)。

## ■ 気管

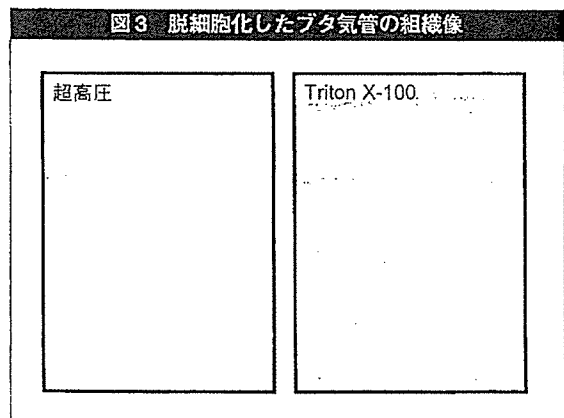
悪性腫瘍や良性疾患による癒痕・狭窄などにより気管の long segment を切除すると、再建に何らかの補填が必要となるため、人工気管や同種・異種気管の移植可能性が検討されてきた。そして、気管においても凍結保存や界面活性剤などによりドナー細胞(特に上皮細胞、腺細胞)を除去することで、移植時の抗原性が著しく減弱することが各種の動物実験において報告されている<sup>6,7)</sup>。

われわれは、超高压処理により脱細胞化したブタ気管を scaffold として移植利用する目的で、同法を他の脱細胞処理法(凍結保存および Triton X-100 処理)と比較検討した。超高压処理気管は 980 MPa (10,000 気圧)、



4°Cで10分間加圧後、2週間緩徐に震盪洗浄し、その後PBS中に浸漬し4°Cの冷所にて保存した。凍結保存気管は液体窒素にて急速冷却後、-80°Cで凍結保存した。Triton X-100処理気管は1% Triton X-100溶液で24時間処理した後、2週間洗浄し、その後PBS中に浸漬し4°Cの冷所にて保存した。各処理気管の病理像を比較すると、凍結保存では当然のことながら気管組織内に細胞成分がほぼ完全に残存しており、Triton X-100処理後も浅部組織の細胞成分は消失したものの軟骨内はほとんど除去できていなかった。一方、超高压処理を行った気管では軟骨部細胞成分の残存が他の処理法に比べ少なかった(図3)。

次いで、ラットを用いた同種気管移植実験を行った。B-Nラットの気管を凍結保存、Triton X-100処理および超高压処理したところ、Triton X-100処理気管では



管腔構造が維持できないほどに軟骨強度が低下したため移植困難と判断し、凍結保存気管と超高压処理気管をLewisラットへ同所性に移植した。4週間後に摘出し病理検査を行うと、両処理気管とも上皮の再生は比較的良好であったが、軟骨部にはほとんど新たな細胞は認められなかったため、軟骨部の再細胞化を早期に誘導する工夫が必要と考えられた。間葉系幹細胞は軟骨を含む各種細胞への分化が明らかとなっていることから、現在われわれは、宿主の間葉系幹細胞を移植時に気管 scaffold に導入することで軟骨部も含めた早期再細胞化を実現するべく、その至適導入方法を検討

している。さらに、超高压処理したブタ気管 scaffold についても、将来的な臨床応用を目指し同種・異種移植実験を計画している。

## ■ ■ おわりに

われわれの開発した超高压処理法による生体組織の脱細胞化について概説した。同種・異種組織 scaffold の作製法として本法は、組織深部まで脱細胞化を行うことができるとともに、組織の力学特性保持やウイルスを含む滅菌などの点で従来法と比較して優れていると考えられ、さらに保存時に凍結の必要がないため保存や輸送に関してもメリットがあると考ええる。われわれは、脱細胞化処理した組織 scaffold に宿主の自己細胞を組み合わせた再生型組織移植の臨床化の早期実現を目指し、研究を続けている。

## 文 献

- 1) 高压生物学と高压技術. 鈴木敦士, 林 力丸編. 京都: さんえい出版, 1997.
- 2) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, *et al.* Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13: 87-92.
- 3) Teebken OE, Puschmann C, Aper T, *et al.* Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 305-312.
- 4) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000; 10: 83-124.
- 5) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 生物組織スキャフォールドを用いたテラーモード心臓弁. *循環器病研究の進歩* 2003; 43: 65-71.
- 6) Yokomise H, Inui K, Wada H, *et al.* Long-term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 930-934.
- 7) Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, *et al.* Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: The antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 108-114.
- 8) Murakawa T, Nakajima J, Motomura N, *et al.* Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 153-160.
- 9) 角田卓也, 西岡宏, 船本誠一, 他. 異種移植を目指した気管 Scaffold の開発—超高压処理による脱細胞化—. *生体医工学* 2004; 42: 36.
- 10) Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-592.

## 総説

## 生体材料の遺伝子発現による評価

岸田晶夫\*

## 1. はじめに

医用材料の基本条件<sup>1)2)</sup>は、最小限の生体機能代行性と生体安全性(非毒性)と生体適合性の3つである。前2者は不可欠条件であり、今日のほとんどすべての材料はそれらの最低レベルを満足している。それに対して、生体適合性は必ずしも必須ではない。優れた特性を持っている材料でも、生体適合性が不十分のために医療に適用できない場合もあると言われ、これまでに多くの研究が行われてきた。しかしながら、今日では医用材料の生体適合性についての議論は拡散している感がある。これは開発される医療材料が、これまでの汎用的なものからより合目的なものに特化されているためである。このような現状をふまえて、生体適合性についての考えから新しい評価法について紹介する。

## 2. 生体と材料の相互作用について

医療用材料(バイオマテリアル)は、損傷あるいは失われた組織の機能を代行・改善するために、生体内に設置されたり、チューブと連結されて生体外で器官の機能代行をしたりする。バイオマテリアルを用いるためには、それが生体内であれ生体外であれ、最初に生体組織を傷つけなければならない。生体組織が傷つけられるかまたは破壊されると、周辺の細胞は創傷治癒反応を開始する。創傷への急性反応は炎症反応である。白血球は、創傷部位に於いて、侵襲と感染に対して防御反応を起こす。損傷組織によって放出される化学メディエーターが白血球を集めさせ、炎症反応の引き金となる。炎症のこの第1段階は急性炎症と呼ばれる。この段階にかかわる白血球の大部分は好中球である。次の段階は慢性炎症である。単球と呼ばれる白血球は、炎症部位に移動し、成熟してマクロファージ(異物や老廃細胞を捕食・消化する細胞)となる。治癒に不利な異物反応がなく、さらに感染が全くない場合には、炎症反応は軽微なものとなる。その後、創傷治癒が開始され肉芽組織が形成される。移植されたバイオマテリアルがマクロファージと異物巨細胞で

覆われるようになるとき、一般的には、肉芽組織形成から線維組織による被包化が進行し、最終的にカプセル化によって周辺組織と隔離される。肉芽組織やカプセル化などの創傷治癒部が形成される程度は周囲の組織の注入される材料、その表面特性、および細胞の再生能に依存する。この正常な治癒過程が進行する場合に、生体内に移植されたバイオマテリアルを「生体適合性である」と呼ぶことができる。一方、材料の化学的、物理的特性あるいは移植部位での材料の動きによって慢性炎症が引き起こされるかもしれない。それらの反応は細胞の損傷をもたらすので、炎症反応のための引き金が引き続けられ、その結果、炎症が持続する。このように、「生体適合性」は材料と生体組織の間の反応を決定するための用語であり、かつ生体システムとバイオマテリアルの相互作用の結果であると説明される。

## 3. 生体適合性について

生体適合性は定義するのが難しいが、通常、「材料が特定の用途について、適切な宿主反応の範囲内で効果を発揮する能力のこと」と定義されている<sup>3)</sup>。また、他の表現では、「生体に対して全く影響を与えない(少なくとも観察している時間範囲内で)物質は生体適合性である」と表される<sup>4)</sup>。また、我々がどのようにバイオマテリアルを使用したいかによって、バイオマテリアルの生体適合性の定義は異なる。「細胞接着性」について例を挙げれば、バイオマテリアルが組織に植えつけられるのであるなら、そのバイオマテリアルに対して細胞が接着し増殖できることが生体適合性の要件であると考えられる。一方、血液に接触するのであれば、血液細胞が接着しないことが生体適合性の要件である場合と、早期に内皮細胞の接着と増殖が必要である場合の相反する特性のいずれもが、生体適合性の要件となる場合もある。他の見方をすると、バイオマテリアルと組織界面が、使用されている期間内で安定しているとき、そのバイオマテリアルは生体適合性であると言える。界面(インターフェイス)が不安定であると、刺激、炎症、損傷、免疫源性、発熱源性、毒性、変異原性または発癌性などの反応の惹起が懸念され、そのバイオマテリアルは「生体非適合性である」と定義される。このように種々の生体適合性についての考え方があり、その評価法・試験法については、それぞれの状況に応じたものを選択する必

平成17年5月20日受付

\* 東京医科歯科大学生体材料工学研究所: 東京都千代田区神田駿河台2-3-10  
Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University: 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

(194)

要がある。

#### 4. 生体適合性評価法

一般に、細胞や器官などで構成される生体システムと関連して用いられるいずれの分子、材料、またデバイス (機器) も臨床応用する前に、生体システムへの効果を試験しなければならない。実際に市販される (されている) バイオマテリアルに関しては、生物学的適合性の試験は高度に規制されている。しかしながら、この試験では「生体適合性」という単語は「無毒性」と同じ意味で使用される。一般に、生体適合性試験を実行するための方法のためのガイドラインが、ASTM 特別部会 F04 や国際標準化機構 (ISO) の第 194 技術部会 (TC194) による規格の中で議論されている。ISO 10993 規格に基づいて、米国の食品医薬品局 (FDA) は米国とヨーロッパでの主な試験法を統一した。また、日本の当局は医療機器の毒物学的な試験試行のための国際向けガイドラインを発行している。このドキュメントは Medical Materials の Basic Biological Tests と Devices<sup>3</sup> のための Guidelines として非公式の翻訳で利用可能である<sup>6)</sup>。それは ISO 10993 と構成と内容について共通部分をもっている<sup>7)</sup>。

試験法としては、生体外 (in vitro) と生体内 (in vivo) で評価する二法がある。通常は in vitro 試験から実施する。いくつかの試験法で、材料と細胞が直接に接触した状態で試験される。直接接触法の利点は、簡便であり、生体内移植において細胞が材料に接触している状況のための最高のモデルであるということである。他の試験法では、材料は最初に液体で抽出され、その抽出液について試験される。用いられる状況 (臨床の) または材料の特質によって、使用される抽出法は異なっている。一般に、2 種の溶媒 (1 つは極性溶媒、もうひとつは非極性溶媒) が使用される。これらの試験は、細胞毒性、免疫系への刺激 (特にアレルギー)、慢性炎症の惹起、血液と血液成分への影響、および変異原性と腫瘍形成を含む遺伝因子への効果について検討するようにデザインされている。

in vitro 試験で問題なかった場合に続いて、in vivo 試験が必要である。これは動物を用いて安全性評価と機能評価を行うものである。硬組織バイオマテリアル (人工関節や人工骨) を試験するには、試験に必要な十分量の緻密骨を得るためには、犬や羊が必要になる。他のバイオマテリアルに関しては、初期の通常の移植部位は皮下である。マウス、ネズミおよびモルモットを使用し、線維性カプセルの厚さ、バイオマテリアル周辺の炎症などが調査される。また、安全性評価に特化した生物学的安全性評価はすべての新しいバイオマテリアル、およびこれまでに用いられているバイオマテリアルでも新しい目的で使用される場合には必要となる。

#### 5. 生体適合性評価の新しい考え方

バイオマテリアル-生体組織間の相互作用はさまざまな疾病の状態と治療に関連している。最近、バイオマテリアル-生体組織間の相互作用は、再生医学や生体工学と呼ばれる領域で注目されている。この領域では、バイオマテリアルは、恒久的足場材料、生体内分解性足場材料、ドラッグデリバリー用デバイス、およびバリアー材料として利用される。生体適合性の研究の先端領域では、研究者は生体適合性の新局面に直面する。バイオマテリアルが生体内でどのように働くかを知ることができたなら、我々は生体適合性の分子論的な背景が明らかになり、これを基盤に新しいバイオマテリアルを設計することができる。生体とバイオマテリアルの相互作用を分子レベルで理解するために、分子生物学の成果を利用した新しい評価法が提案されている。以下に、これらの新しい技術の一端を紹介する。

材料と生体との相互作用は大別すると次のように分類できる。分子レベル (界面物性)、タンパク質レベル (吸着および変性)、細胞レベル (接着、増殖、機能発現) および生体レベル (動物実験) の 4 つである。多くの研究のうち、材料に生体活性物質 (タンパク質やペプチド) を複合化した材料についての生体との相互作用、いわゆる特異的な相互作用の研究は一応の成果を挙げているが、大多数の材料で問題となる非特異的相互作用を主とする細胞の認識については、細胞の接着や形態変化などの初歩的な評価にとどまっている。

生体との相互作用を検討する一手法として、材料表面上への細胞の接着・増殖について観察する方法がある。これは表面処理技術を用いて種々の表面性状の材料を調製し、その上に細胞を播種して接着細胞数の計測や形態を観察することで、表面の物理化学的性質が細胞接着や増殖に及ぼす影響を明らかにしようとするものである。これまで、細胞の接着・増殖について大まかに材料表面の物理化学的特性で整理できることが明らかになっているが、一方で例外的な結果が得られる場合もあり、結果の解釈が困難なことも多い。生理学的な立場からは、細胞接着はフィブロネクチンなどの接着タンパク質を仲介して説明される。一方、それらの接着タンパク質に依存しない細胞接着も存在している。いわゆる無血清培養における細胞培養はすべてそうであるが、接着性タンパク質の存在しない環境でも細胞は多種多様な接着を行う。それらはいわゆる「非特異的相互作用」として説明されていた。「非特異的相互作用」とは、物理化学的相互作用が代表的なもので、たとえば同じ表面自由エネルギーの材料であれば、同じタンパク質の吸着量、細胞接着を示すというものである。これはコロイド科学的な解釈であり、接着の初期 (30 分~2 時間) では比較的適合する。しかし、必ずしも表面自由エネルギーで整理できるとは限らず、その場合に

は他の非特異的相互作用の影響(たとえば電荷など)を組み合わせて、現象の説明を行っている。

このような「非特異的相互作用」を理解するためには単純な表面を作成して細胞の反応を調べる必要がある。しかし、表面自由エネルギーを一定にして電荷量を変化させるなどの改質は非常に難しい。一方、材料ではなく細胞に着目すると、細胞が材料をどのように認識しているかを直接調べた例はほとんどない。細胞の反応を接着や増殖などのマクロな解析だけでなく、最新の細胞生物学の手法を用いてミクロな反応を検討できれば、生体側の材料認識のメカニズムを明らかにできる可能性がある。それを用いて、材料設計の指針を得られれば、新規材料設計も容易に行える。細胞が材料と接触すると、情報収集(レセプターの活性化)→状況認識(細胞内カスケードの活性化)→対応策策定(転写因子活性化)→対応準備(転写・タンパク質合成)→対応策実施(タンパク質機能発現・接着)の一連の反応が細胞内で起こる。細胞の接着や増殖というのは最終の対応策実施段階を観察しているわけであるが、その前段階についての情報についての研究はほとんどない。ここでは材料と生体との相互作用のうち、特に非特異的相互作用について、細胞内の遺伝子レベルで理解することを目的とした評価法について検討した。

#### 6. 遺伝子発現評価について

材料に対する細胞の反応を遺伝子発現で評価するためにはいろいろな手法が考えられる。直接に発現遺伝子を知るにはノーザンブロット法が適している。しかし、ノーザンブロット法は大量の細胞を必要とするため、大表面積の細胞接着用材料が必要である。材料開発のための基礎検討のためには簡便に大量のサンプルを処理できることを第一に考える必要がある。このような条件に適合する逆転写酵素を用いたポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)による遺伝子発現評価法を用いた。

PCR法はPolymerase Chain Reactionの略で、Mullisらによって1985年に発表された技法である<sup>9)</sup>。PCRの原理はDNAポリメラーゼ反応を利用したDNAの増幅反応の繰り返しであり、DNAの熱変性、プライマーとのアニーリング及び伸長反応を1サイクルとして、このDNAポリメラーゼ反応をn回繰り返すことで2<sup>n</sup>倍にDNAを増幅する。このため非常に高感度であり、極微量のサンプルからでも検出が可能である。mRNA発現をPCR法によって解析するには、mRNAを逆転写酵素で変換したcDNAを鋳型にすることによりPCRに用いることができ、reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法と呼ばれる<sup>9-11)</sup>。

また、解析対象としては、熱ショックタンパク質(Heat-Shock-Protein(HSP))に注目した。HSPは、生物がそれぞれの育成温度より高温の環境にさらされると(熱ショック)特異的に発現量が多くなる一群のタンパク質として発見された。

しかしその後、熱ショックばかりでなく、遷移金属・酸化ストレス・生体内での虚血・炎症・分化誘導試薬などの様々なストレス因子によっても誘導されることがわかり、より一般的にストレスタンパク質と呼ばれている。HSPには多くの種類があり、その分子量に由来した命名がされている。HSP70はもともと一般的なHSPであり、熱ショックをはじめとする様々なストレスに対応して発現する。HSP47は近年、細胞接着や組織修復に重要な役割を果たしているコラーゲンの特異的分子シャペロンであることが明らかにされた。これらのHSPはそれぞれの刺激に対して迅速に発現されることから、材料と接触した細胞の応答を見積もるために有用と考えた。

#### 7. HSP mRNA 発現評価<sup>12-17)</sup>

HSP発現評価では、HeLaS3細胞を用い、種々の材料上の播種した細胞のHSP遺伝子の発現を解析した。図1に各高分子材料上で24時間培養後のHSP70Bの相対的な発現量を示す。HSP70Bは熱のようなストレスに対する細胞の応答の指標を表す最も一般的な熱ショックタンパク質である。HSP70Bの発現量は組織培養用ポリスチレン(TCPS, No.7)を境として発現量に大きな差異が生じており、TCPSより親水性の材料では発現が大きく誘導され、ポリエチレン(PE)、シリコーン膜(Silastic<sup>TM</sup>)、フッ素系高分子(6F)などの疎水性の高い材料ではTCPSとほぼ同程度の発現量を示した。

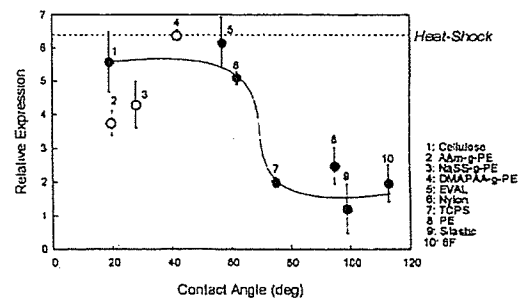


図1 RT-PCR法によるHeLaS3細胞におけるHSP70BのmRNA発現評価(●:固相表面, ○:水和表面)  
Heat-Shock: 熱処理(45°C, 20分)時の発現

これよりHSP70Bは親水・疎水の異なる材料に対して、それぞれ異なる発現挙動を示すことが分かる。TCPS上に接着した細胞に熱処理(45°C, 20min)した場合の発現量と比較すると、親水性の材料に接着した細胞は、熱処理時と同程度の刺激を受けていることがわかる。また、親水性の材料ではTCPSや疎水性の材料と比較して細胞の接着数は少ないにも関わらず、細胞当たりに対してHSP70B発現の刺激を与えていると考えられる。さ

らに細胞接着数(性)と HSP70B の発現結果を比較すると、NaSS-g-PE (p-styrenesulfonic acid sodium salt (NaSS)を表面グラフト重合した PE) と TCPS, ナイロンと疎水性材料 (PE, Silastic™, 6F)は同じような細胞接着数を示しているにも関わらず、HSP70B 発現挙動には明らかな差異がみられ、両者の間に相関関係はみられなかった。

このように高分子材料に接着・接触した細胞の HSP 発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性の材料で発現が高い結果が得られた。しかし、これら一連の HSP 発現のシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態であると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパクの吸脱着などが動的な環境におかれ、材料表面と直接接したり離れたりを繰り返し、周りの環境が刻々と変化していることが刺激となっているとも考えられる。同様の考察が由井らによって報告されている<sup>18)</sup>。これより、材料上の吸着タンパク質同様に、材料表面の物理化学的性質も HSP 発現に直接的な役割を果たしていると考えられる。

また、同じ時間だけ材料と接触していても接着しない細胞が存在する。特に非電荷親水性材料では大多数の細胞が接着していない。これらの非接着細胞の HSP70B の mRNA 発現を調べた結果が図 2 である。一見して、接着細胞と同様の傾向を示していることが分かる。すなわち HSP70B 遺伝子の発現と細胞接着とは直接には関係がなく、細胞は材料に触れただけでも認識を行っていることになる。

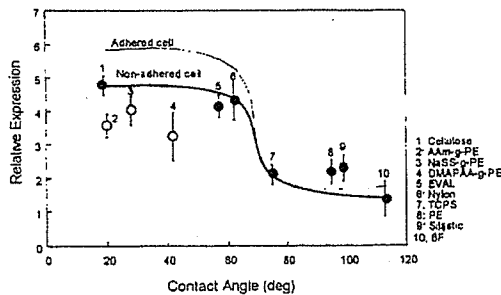


図 2 RT-PCR 法による HeLaS3 細胞における HSP70B の mRNA 発現評価: 接着細胞と非接着細胞の比較 (●: 固相表面, ○: 水和表面)

図 1, 2 では材料の水濡れ性 (対水接触角) で材料を整理しているの、物理化学的性質が HSP70B 遺伝子発現のパラメータのように思われる。表面自由エネルギーで HSP70B 遺伝子の発現が制御されているならば、これはある種の特異的相互作用と考えることもできる。事実は単純ではないだろうが、このよう

な材料の性質が複数の非特異的相互作用を同時に発揮するのであれば、ここで観察された細胞の反応もそれぞれの材料に対して特異的なものとは考えることを著者らは提案している。

## 8. 転写因子発現評価<sup>19)</sup>

上記のような仮説を確かめるために、mRNA 発現より早期の細胞反応を解析するため、転写因子に注目した。代表的な転写因子である NF- $\kappa$ B は、外界刺激を受けた際の一次反応のスイッチとして機能していると考えられており、細胞と材料の相互作用解析に有用であると考えられた。図 3 に NF- $\kappa$ B 発現の時間変化を示す。脂質 (DPPC) 膜上では初期に発現が見られるが、その後減少し、正常レベルに戻る。一方、脂質膜と同じ親水性表面であるセルロースやアクリルアミドグラフト表面では経時的に発現量が増加していることが分かる。この結果から、同じ親水性表面をもつ材料でもそれを構成する分子種の違いにより、生体反応が異なることが示された。

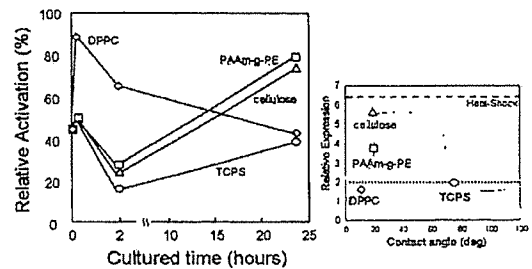


図 3 材料表面での細胞内転写因子発現の時間変化 (右図は HSP70B の mRNA 発現の比較)

高分子材料に接着・接触した細胞の HSP 発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性の材料で発現が高い結果が得られた。一方、同じ親水性材料でも脂質膜と他の高分子では細胞の認識が異なることが NF- $\kappa$ B 発現評価から示された。これらのシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態であると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパクの吸脱着などが動的な環境におかれ、材料表面と直接に接することや、周囲の環境が刻々と変化していることが刺激となっているとも考えられる。今後、より詳細な検討が必要である。

## 9. おわりに

遺伝子発現評価および転写因子発現評価のほかにも、細胞機能発現によって生体適合性の指標とする試みが報告されている<sup>20-21)</sup>。これは材料に接触した細胞が細胞-細胞間連絡のためのキ

ャップジャンクションを形成するか否かによって判定するものである。遺伝子およびタンパク質を用いるこれらの新しい方法が、生体内での適合性とどのように関連しているかはこれからの研究の積み重ねが必要である。そのためには、ゲノム、プロテオソーム解析の進展による情報を常に参照し、また動物を用いた適切な評価系を構築する努力が必要である。非毒性が最低の必要条件であった医用材料について「生体適合性」がそれに加わる日が遠からず来ると考えられる。我が国の医用材料・バイオマテリアルを国際的に通用するものにするために不断の努力が必要である。

#### 参考文献

- 1) 筏 義人：バイオマテリアル—人工臓器へのアプローチ，日刊工業新聞社，(1988)
- 2) 筏 義人：医用高分子材料，共立出版，(1989)
- 3) D. F. Williams ed., *Fundamental Aspects of Biocompatibility* (Vols. I, II), CRC Press, Boca Raton (1981)
- 4) D. F. Williams, (1987), *Definitions in Biomaterials*, Elsevier, Amsterdam.
- 5) J. H. Boss, (2000) *Biomaterials and Bioengineering Handbook*, D. L. Weiss (Ed.) Marcel Dekker, Inc., New York.
- 6) *Guidelines for Basic Biological Tests of A Medical Materials and Devices*. Unofficial translation of Japanese guideline. ISBN 4-8408-0392-7.
- 7) <http://www.iso.ch/iso/en/ISOOnline.frontpage>,  
<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/05/001.html>
- 8) K. Mullis and F. Fallona : *Methods in Enzymology*, Academic Press, (1987) p.155
- 9) D. A. Rappolee, C. A. Brenner, R. Schultz, D. Mark and Z. Werb, *Science*, **241**, 1823 (1988)
- 10) 石川冬木：実験医学, **8**, 1117 (1990)
- 11) 船渡忠男, 刀祢毅, 宮地勇夫, 石森章, *臨床病理*, **41**, 197 (1993)
- 12) A. Kishida, S. Kato, K. Ohmura, K. Sugimura and M. Akashi, *Biomaterials*, **17**, 1301 (1996)
- 13) S. Kato, T. Akagi, A. Kishida, K. Sugimura and M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **8**, 809 (1997).
- 14) S. Kato, T. Akagi, A. Kishida, K. Sugimura and M. Akashi, *Biomaterials*, **19**, 821 (1998)
- 15) A. Kishida, T. Serizawa, K. Sugimura and M. Akashi, *Chem. Lett.*, 1267 (1999).
- 16) S. Kato, T. Akagi, K. Sugimura, A. Kishida and M. Akashi, *Biomaterials*, **21**, 521 (2000).
- 17) S. Kato, A. Kishida, M. Akashi, I. Maruyama, *J. Biomater. Sci., Polym. Chem. Edn.*, **11**, 333 (2000).
- 18) N. Yui, K. Suzuki, T. Okano, Y. Sakurai, C. Ishikawa, K. Fujimoto, and H. Kawaguchi, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **7**, 253 (1995)
- 19) A. Kishida, T. Matsuyama, I. Kitajima, I. Maruyama, M. Akashi, *Biomaterials*, **22**, 541 (2001).
- 20) R. Nakaoka, T. Tsuchiya, K. Kato, Y. Ikada, A. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.*, **35**, 391 (1997).
- 21) T. Tsuchiya, *J. Biomater Sci Polym Ed.*, **11**, 947 (2000).



## トピックス

## 再生医療のための脱細胞化生物組織 (バイオスキャフォールド)

## Biological Scaffolds for a Novel Tissue Engineering Technology

岸田 晶夫

Akio KISHIDA

## Abstract

Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogeneic matrices have been widely studied to have more durability with growth potential and less immunogenicity than the current bioprotheses. Whereas they have still several problems to be solved such as degradation control of biodegradable polymeric scaffolds and transfer of unknown animal related infectious diseases. Porcine heart valves were excised and treated by cold isostatic pressure of 10,000 atm at 4°C for decellularization. They were then washed with PBS under microwave irradiation and subjected to histological and biomechanical studies. Our novel tissue processing of decellularization by ultrahigh pressure treatment for the safe valve transplantation was reported. Porcine cells and PERVs were removed completely in a short period by the CIP of 10K atm (980 MPa) followed by washing under microwave irradiation (*PowerGraft*) without changing the biomechanical property. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated. From the in vitro incubation test, the tissue was desinfected when the pressing was applied to the valves contaminated by normal bacteria floras. This processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

**Key Words :** Biological Tissue Scaffold, Decellularization, Tissue Engineering

## 1. はじめに

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植, 再生医療に用いる足場材料, あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため, 新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち, 現在でも必要性の高い心臓弁, 小口径血管, 気管, 食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料は, 生体内分解吸収性の合成材料が用いられている。しかし, 既存の材料は加工が困難で, 物性が生体のものとは大きく異なる。これらを解決するために, 我々は新しい処理法による脱細胞化生物組織および生物素材の積極的な応用を試みている。ここでは, 優れた力学特性を有する生物由来組織の高機能化を実現するための, 我々が開発した新しい加工法である超高压処理を用いた脱細胞化について紹介する。この方法により, 複雑な構造でも造形する必要がなく, あるいは生体と同等の力学特性を有する再生医療用素材を, 特別

な化学薬品を用いることなく高機能化することができる。この方法によって得られた脱細胞化生体組織は, 新規な再生医療用素材として広範な応用が期待できるが, 特に開発が望まれている循環器系再生医療の目標である, 心臓弁および血管について解説する。

## 2. 既存技術との関連

我々は2000年から, 脱細胞化した生体弁に患者自身の細胞を組み込むテーラーメイド心臓弁の開発を開始した。生物組織を選んだのは, 以前から凍結保存同種弁の臨床使用に取り組んできたことと, 心臓弁の複雑な形状を人工材料で造形することが容易でないこと, 及び人工材料は生体よりも硬いため生体と同等の力学特性を持たせるのが難しいと考えたためである。免疫反応の主要因を成すドナー由来細胞を除去し, コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化スキャフォールドに患者の自己細胞を組み込むことで, 生体適合性を高めるとともに, 自己修復性や成長性を有する代用弁が割製できると期待できる (図1)。このためには, 完全な脱細胞化処理法の開発, 及び脱細胞化スキャフォールドへの患者細胞の経込法の開発が重要である。

生体材料工学研究所 分子制御分野  
Department of Applied Functional Molecules  
Institute of Biomaterials and Bioengineering

Vol. 39 (2005)

### 3. 脱細胞化処理

国内外の脱細胞化組織を研究しているほとんどのグループは界面活性剤やタンパク分解酵素等の薬液処理によって細胞を除去している。我々も当初、Triton X-100溶液による界面活性剤浸漬処理を検討した。その結果、厚さ数百 $\mu\text{m}$ の弁葉内においては処理6時間後には細胞核は染色されなくなったが、弁葉基部の組織内細胞の核は処理24時間後でも表面から1mm以遠の組織深部では染

色されており、界面活性剤溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた（図2中）。また、細胞毒性を示すTriton X-100を洗浄除去するために数週間以上の時間を要し、その間における生体力学特性の変化や汚染の危険性についても注意が必要であった。そこで我々は、より完全な細胞除去法について検討し、液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高压印加処理法を開発した。多くのタンパク質や酵素は300MPa程度の高圧処理によって変性するとともに、酵

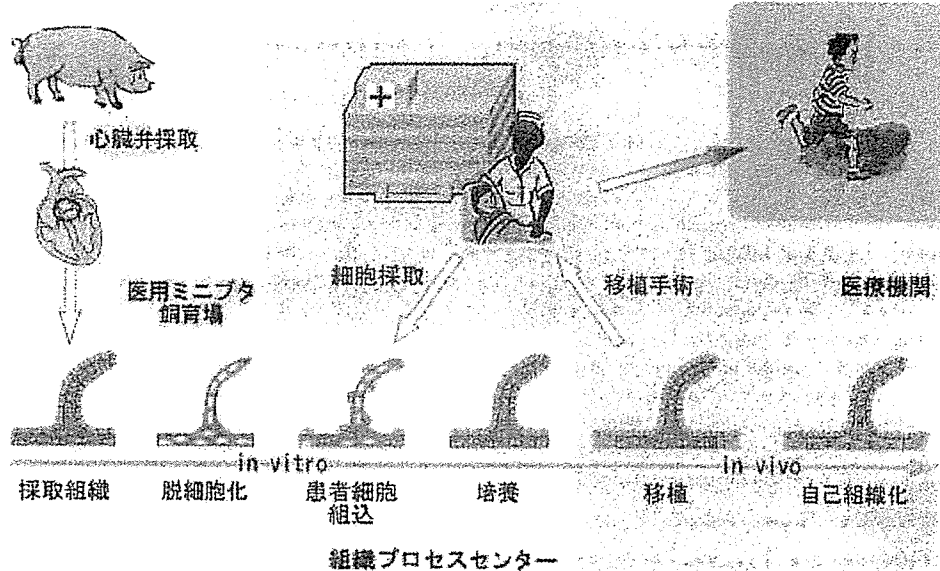


図1 生物組織スキファールドを用いたテララメード心臓弁

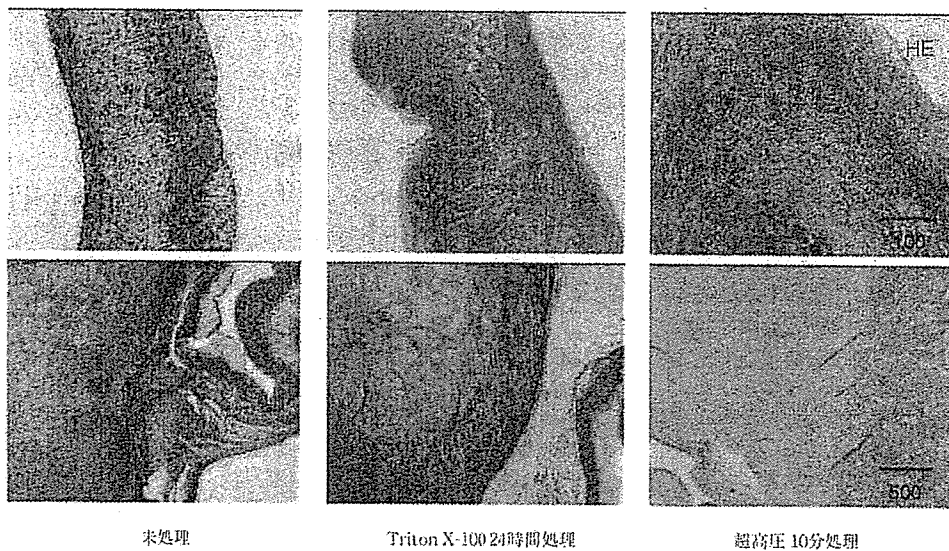


図2 脱細胞化処理された心臓弁の組織断面（上：弁葉、下：弁葉部）

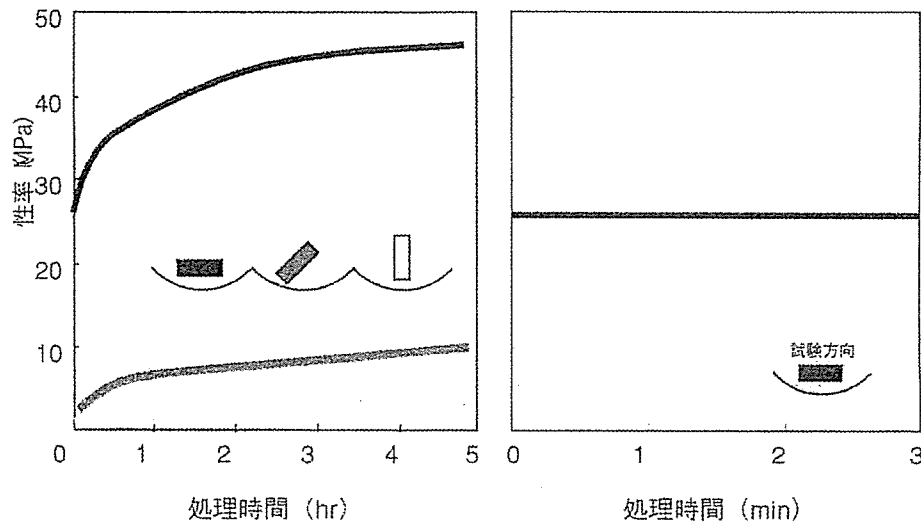


図3 脱細胞化処理された心臓弁葉の生体力学特性 (左: Triton X-100, 右: 超高压)

母や芽胞をもたない細菌は500MPaの処理で細胞膜が破壊され、殺菌される。また、HIV等のエンベロープを持つウイルスは600MPaの処理ではほぼ完全に不活化される(文献7)。清潔下にて摘出したミニブタ心臓より肺動脈弁を採取し、低温下にて980MPa(10,000気圧)の超高压印加処理(4℃, 10分間)を行い、続いて洗浄処理したところ、組織深部まで完全に細胞を除去することができた(図2右)。EVG染色したところ、超高压処理後においても弁葉内のコラーゲン線維やエラスチン線維が保存されていることが認められた。また、常在菌にてあらかじめ感染させた試料を脱細胞化処理したところ、界面活性剤処理では感染が除去できなかったが、超高压処理では脱細胞化に加えて滅菌効果も併せ持つことが確認された。力学特性を検討したところ、界面活性剤浸漬処理では、処理時間に伴って強度、弾性率とも増加する傾向を示したが、超高压処理では力学特性への影響が見られなかった(図3)。

移植組織のドナーとしては遺伝系統が明確であり、遺伝子変異が少ないと考えられるミニブタを想定している。このミニブタは遺伝的にPERVウイルスに感染しており(ゲノムに組み込まれている)、その安全性については、養豚業者者にこれまで感染例がないことなどから問題ないと考えられているが、感染性の可能性を最小限にするための方策が望まれている。異種臓器移植などを旨として開発されている遺伝子改変ブタの組織を用いる方法があるが、ここでは脱細胞化に際してPERVウイルスおよびそのゲノムの除去について検討した。遺伝子改変ブタが作出できた際には、その組織を用いることによって二重の安全性が確保できることが期待できる。PERVウイルスの除去については、一般に超高压処理がエンベロープ型ウイルスに対して7000気圧以上で不活化が可能であることが報告されており、その効果が期待で

きる。ここではゲノムに組み込まれているPERVウイルス配列の残存によって、組織再生後に宿主細胞(ヒト細胞)が遺伝子変異を誘発しないようにするために、DNA成分の除去とゲノム配列の残存について検討した。

脱細胞化処理後に洗浄した場合の洗浄期間と残存DNA量の関係を検討した。DNAは組織を細切し、溶媒抽出法にて抽出した。その結果、DNA量は洗浄の進行とともに減少していることが分かった。約1週間で洗浄効果は低くなるが、漸次減少している。残存しているDNAについて、PERV配列を対象としたプライマーを用いてPCR反応を行った。その結果、未処理の組織からはPERV配列が検出できるが、脱細胞化処理後の組織からはその配列が検出できないことが明らかになった。これは増幅回数を増加させても同じであった。これにより、残存DNAはわずかながら残っているもののPERV配列はなく、それらはゲノムDNAの断片であると考えられる。

#### 4. 移植実験

In vitroにて作成したテラーメード心臓弁を臨床研究に供する前段階として、ミニブタを用いた大動物実験を行った。Triton X-100にて脱細胞化し、レシピエントのミニブタ自己内皮細胞を播種した脱細胞化同種肺動脈弁を用い、右心バイパス下にて肺動脈弁置換手術を行った。術後1ヶ月及び3ヶ月において、心エコーと圧測定による血行動態の測定後、移植弁組織を摘出して組織学的所見を検討した。さらに、これらの結果を細胞未播種の脱細胞化同種弁移植群及び凍結保存同種弁移植群と比較した。レシピエントの自己細胞を播種した脱細胞化同種弁では、血行動態並びに肉眼的所見から、術後1ヶ月においても良好な弁機能を示していた。術後1ヶ月において、移植された脱細胞化肺動脈弁組織の内腔面が一層の細胞層によって覆われるとともに、一部組織内への細胞浸潤

が認められた。さらに術後3ヶ月においては、弁室内を含む移植組織の大部分への細胞の浸潤が認められた。浸潤した細胞を免疫染色によって検討したところ、表面層は血管内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋細胞と線維芽細胞とからなることが確認された。これに対して、未播種の脱細胞化同種肺動脈弁では、内腔表面上に血管内皮細胞の進展は認められたものの、組織内部への細胞浸潤はほとんど認められなかった。また、脱細胞化処理及び細胞播種を行わない凍結保存同種弁では、脱細胞化同種弁に比較して炎症細胞の浸潤が顕著であった。

## 5. 将来展望

未だ長期間に渡って満足できる性能を発揮する人工臓器や組織は開発されておらず、また、患者の成長に伴って人工臓器に成長性を与えることはほとんど不可能である。一方、ブタやウシ等の生物由来の医療用素材も古くから使用されてきたが、最近のBSE及びCJD問題を契機として、使用が制限あるいは禁止されつつある。生物組織スキヤフォールドではドナー由来の抗原性を減弱する必要があり、かつ動物由来の場合は未知の感染性やレトロウイルス等の除去が必須である。超高压処理による脱細胞化ではウイルスも不活化できることから、極めて高い安全性が確保できると考えている。細胞ソースをどこに求めるのかも検討すべき課題であるが、患者の負担を軽減するためには、骨髄細胞あるいは末梢血幹細胞等の利用が有効であろう。さらに臨床応用に際しては、GMP基準に適合した細胞プロセッシング設備の設置も必要である。生物組織の提供動物としての安全な医用ミニブタ育種、並びに採取から移植後までを追跡するトレーサビリティ確保を含め、テーラーメイド型移植システムを確立して早期の臨床応用を目指したいと考えている。既にいくつかの研究グループは臨床研究を始めつつある。いずれ再生型心臓弁が機械弁や異種生体弁に取って代わる日も近いであろう。

## 謝辞

共同研究者の国立循環器病センター研究所再生医療部 藤里俊哉室長、心臓血管外科沼田 智医師、庭屋和夫医師、湊谷謙司医師、臓器移植部中谷武嗣部長、及び北村 豊一郎総長に感謝します。また、研究の一部は、厚生労働

科学費ヒトゲノム・再生医療等研究事業、循環器病研究委託費事業、科学技術振興調整費、ヒューマンサイエンス総合研究事業及び日本学術振興会科学研究費補助金の補助を受けて行われました。

## 文献

- 1) 日本人工臓器学会レジストリー委員会. 人工臓器のレジストリー-2000. 人工臓器 2001; 30(suppl).
- 2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996 Nov 1;94(9 Suppl):II164-8.
- 3) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct;13(4 Suppl 1):87-92.
- 4) Teebken OE, Puschmann C, Aper T, Haverich A, Mertsching H. Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003 Apr;25(4):305-12.
- 5) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000;10(2):83-124.
- 6) Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF, Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*. 2002 Nov;74(5):1438-42.
- 7) 鈴木敦士, 林 力丸編. 高压生物学と高压技術. 1997; さんえい出版 京都.
- 8) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng* 2001 Feb;7(1):9-22.
- 9) Laube HR, Matthaus M. A new semi-automatic endothelial cell seeding technique for biological prosthetic heart valves. *Int J Artif Organs*. 2001 Apr;24(4):243-6.

## 重症心不全に対する幹細胞による 心筋再生療法の開発

*Development of regeneration of myocardium using stem cells for profound heart failure*

Keywords

細胞移植  
骨髄単核球細胞  
間葉系幹細胞  
環境因子  
血管新生

中谷 武嗣<sup>1)</sup> 富田 伸司<sup>2)</sup> 永谷 憲歳<sup>3)</sup>

- 1) 国立循環器病センター臓器移植部
- 2) 独立行政法人国立病院機構 長良医療センター心臓血管外科
- 3) 国立循環器病センター再生医療部

### Summary

Researches of cell-based therapy for profound heart failure are expanded to the regeneration of myocardium. Bone marrow cells are advantageous for exogenous cell transplantation because of autologous source, capability of regeneration of myocardium and induction of angiogenesis. Endogenous-stem cell therapy might be a promising strategy for treating failing heart.

### はじめに

重症心不全に対して各種治療が行われるが、広範囲に心筋障害をきたした症例においては、自己心のみによる回復は困難である。このような症例に対しては、心臓移植や人工心臓の適応が考慮される。心臓移植は、国際レジストリーではすでに6.6万例以上施行されており、50%生存率は9.4年に達している。また、わが国においても臓器移植法施行後、すでに27例の心臓移植が行われ、良好な成績を示している。しかし、心臓移植では適当なドナー心が必要であり、その施行数には限界がある。また、人工心臓は、拍動型に加え最近では連続流ポンプも導入され、補助期間および生活の質も向上し、心臓移植の適応とならない患者に対するdestination therapyとしても認められるようになってきた。しかし、感染症や血栓塞栓症など、いまだ解決すべき

Nakatani, Takeshi<sup>1)</sup> / Tomita, Shinji<sup>2)</sup> / Nagaya, Noritoshi<sup>3)</sup>

- 1) Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center
  - 2) Department of Cardiovascular Surgery, National Hospital Organization Nagara Medical Center
  - 3) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center
- E-mail : tnakatani@res.ncvc.go.jp

問題が残されている。

自己組織を用いた重症心不全治療法として、自己骨格筋を用いる心筋形成術の開発研究が行われ、臨床応用もされたが、補助能力に限界があり普及するに至らなかった。その中で、Marelliらのグループは、骨格筋細胞を心筋へ移植する研究を開始し、心臓への細胞移植が注目されるようになった<sup>1)</sup>。

その後、各種の細胞を用いた研究が行われてきたが、本稿では、我々の研究してきた骨髄細胞による心筋再生療法を中心に述べる。

### 外因性細胞移植(exogenous cell transplantation)

骨髄には多くの造血幹細胞のみならず間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)があり、このMSCから骨、軟骨、脂肪細胞が分化誘導される。1999年になると、5-azacytidine処理を行うことにより、骨髄細胞から心筋細胞が分化誘導されることが報告された<sup>2)</sup>。さらに2000年には、環境因子(cardiac milieu)が、骨髄細胞の心筋への分化に重要であることが示された<sup>3)</sup>。そこで、環境因子として細胞の直接接触を検討した<sup>4)</sup>。ラット新生仔心筋細胞を宿主心筋(CM)とし、GFP(green fluorescent protein)遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を移植細胞として、共培養実験系を作製した。CMとGFP-BMCとの間に隔壁を置いたdouble chamber培養では、GFP-BMCに変化を認めな

かった。これに対し、CMとGFP-BMCを混合した共培養系では、GFP-BMCの一部が2日後からCMと同期収縮を開始した。また、免疫組織染色により検討すると、1日後にはmyosin heavy chain-slowが、2日後にはコネキシン43と心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)が、4日後にはトロポニンIが経時的に各々発現し、さらに漸増した。myosin heavy chain-slow陽性細胞は5日後において約2.5%になった。この検討より、骨髄細胞が心筋へ分化するには、ホストの心筋細胞との直接接触が重要であることが明らかになった。さらに、循環しているヒト骨髄細胞が心筋細胞に分化し得ることも報告された<sup>5)</sup>。この共培養の効果に対して、2002年に細胞融合(cell fusion)が問題提起され、TeradaらはES細胞とGFP-BMCを共培養した場合、GFP発現細胞が分化増殖するようであるが、その細胞核内にはES細胞由来のDNAも含まれていたと報告した<sup>6)</sup>。しかし、その後の研究報告では、細胞融合の割合は低いとされている。また、我々の実験で示されたように、共培養においては心筋細胞の特性を経時的に獲得しており、融合のみとは考えられない。また、成人心臓からの心臓前駆細胞は、ホスト細胞への細胞融合があってもなくてもほぼ同様に心筋細胞に分化することが報告されており<sup>7)</sup>、さらに検討が必要である。

骨髄細胞による心筋再生療法の有効性について、拡張型心筋症に対する効

果の研究は少ない。そこで、ラットを用い、心機能改善効果を検討した<sup>8)</sup>。ラットドキシソルピシン不全心モデルを作製し、骨髄単核球細胞(bone marrow mononuclear cell: BMMNC)移植群、生理食塩水注入群、sham手術群の3群において、移植4週間後に心エコーおよびLangendorff灌流装置にて心機能を測定し、合わせて心重量と腹水量を測定した。その結果、BMMNC移植群は、心エコー検査において心筋壁厚が有意に維持され、心筋壁厚/内腔比も高値であった。また、Langendorff灌流装置による検討では、他群に比しdeveloped pressureが有意に高値で、end-diastolic pressureは低値であった。心重量も有意に大きく、腹水量は有意に少量であった。この結果、ラットによるドキシソルピシン心筋症モデルにおいてBMMNC移植は有効であることが示され、臨床応用の可能性が示唆された。

また、骨髄細胞による血管新生に関し、Asaharaらは、1997年に末梢血に骨髄由来の血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPC)があり、このEPCが虚血心筋における脈管新生(vasculogenesis)と血管新生(angiogenesis)に貢献していると報告した<sup>9)</sup>。さらに、Shintaniらは、BMMNCが虚血肢における血管新生をもたらすことを報告した<sup>10)</sup>。このBMMNCによる血管再生療法は、わが国において注目され、積極的に臨床応用が行われ、その安全性と有効性が示された。さらに、血管新生に骨髄細胞からのサイトカイ

ンが大きな役割を果たしている可能性が示された<sup>13)</sup>。また、虚血心筋に対する外科的注入も報告されている<sup>14)</sup>。

しかし、このBMMNCの血管新生効果の評価が難問であった。そこで、我々は、ブタ心筋梗塞モデルに対する骨髄細胞移植の効果について、心筋コントラストエコー法により検討した<sup>15)</sup>。まず、NIBSブタの左前下降枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。1ヵ月後、骨髄細胞を梗塞部へ直接注入し、myocardial contrast intensity (MCI)を測定した。移植1ヵ月後に犠牲死させ、組織学的に毛細血管密度(capillary density: CD)を測定した。その結果、MCIとCDに正の相関を認められたが、毛細血管の多くは直径10 $\mu$ m以下であった。移植梗塞部のMCIとCDは、非移植梗塞部よりも有意に増加した。これらより、骨髄細胞移植は、心筋梗塞部位での血流を改善し、さらに、心筋コントラストエコー法によりこの血流改善効果が非侵襲的にベッドサイドで評価し得ることが示された。

BMMNCは、細胞移植の細胞源として、採取法が確立されており、さらに培養する必要がなく用いやすい。しかし、十分な細胞数を得るには全身麻酔が必要であり侵襲が大きい。これに対し、MSCは増殖能力が高く、骨髄細胞を少量採取し、生体外で培養し、必要量が得られてから移植することが可能となる。

そこで、MSC移植による血管再生効果を、BMMNC移植と比較検討した。ラットの左総腸骨動脈の結紮・切

除により下肢虚血を作製した後、同数のMSCあるいはBMMNCを移植し、未治療群と比較した。移植3週間後、移植両群は、未治療群より有意な血流増加を認めたが、MSC群がより高度な血流改善を示した。また、毛細血管数も、MSC群はBMMNC群より増加していた。さらに、両群とも移植局所に移植細胞由来と考えられる血管内皮細胞を認めたが、その数はMSC群で有意に多かった。また、MSC群では移植細胞からの血管平滑筋と壁細胞への分化を認めた。さらに、BMMNCと比較しMSCでは、vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), adrenomedullin (AM)などの血管新生因子が多量に分泌していた<sup>16)</sup>。また、低酸素状態について検討すると、*in vitro*でMSCは管腔を形成した。さらに、無血清培地培養下における低酸素状態では、MSCはBMMNCに比べてアポトーシスは少なかった。したがって、MSCは低栄養および低酸素状態においてより高率に生存し得ることから、MSC移植はBMMNC移植と比較して、同等以上の血管再生作用があると考えられた。

そこで、心筋梗塞モデルにおいてMSCの経静脈投与の効果を検討した<sup>17)</sup>。左冠動脈結紮により作製した心筋梗塞モデルラットの頸静脈からMSCをカテーテルにより移植した。その結果、MSCの一部は梗塞巣周囲に集積し、さらに心筋細胞および血管内皮細胞に分化し、心機能を改善させた。

また、MSC細胞移植の拡張型心筋症への効果をラット心筋症モデルで検討した。近交系ラットの大腿骨より骨髄組織を取り出し、培養皿底面に付着するMSCを分離・培養した。このMSCを、ミオシン投与拡張型心筋症モデルラットの心筋壁内に心外膜より直接注入し、未治療群と比較した。4週間後における心エコーおよび心臓カテーテル検査では、未治療群と比較し、MSC移植群は左室拡張末期圧の有意な低下および左室収縮能の有意な改善を認めた。病理学的検討では、MSC移植群は心筋コラーゲン含量が減少し、さらに心筋壁内で血管内皮細胞や平滑筋細胞に分化し、管腔構造を形成した。また、免疫組織染色にて、心筋内に注入したMSCの一部はトロポニンT, desmin, およびコネキシン43が陽性であった。さらにMSCは種々の血管新生因子やアポトーシス抑制因子を分泌した。したがって、MSCは心筋細胞や血管細胞へ分化し、さらにバラクライン因子として心筋および血管再生に関与することが示唆された。次いで、ブタを用いた前臨床研究を行い、骨、軟骨、脂肪などへ分化しないこと、不整脈が出現しないことなど、MSC移植の安全性を確認した。

以上の結果を踏まえ、虚血性心疾患や拡張型心筋症などによる心不全例で、利尿剤、ACE阻害薬、 $\beta$ 遮断薬などの既存の治療が困難な症例を対象に、患者の骨髄液15mLを採取し、体外で培養増殖させ、カテーテルを用いて心内膜側より心筋内へMSCを注入

する臨床試験を計画した。国立循環器病センター倫理委員会に「間葉系幹細胞移植による難治性心不全治療の臨床評価」の実施を申請し、承認された。これまで数例の難治性心不全症例に対して自己MSC移植を行ったが、重度の不整脈などの副作用はなく、順調に経過している。今後、補助人工心臓装置例への応用なども検討している。

#### 内因性細胞移植(endogenous cell transplantation)

Orlicらは、2001年に急性心筋梗塞マウスモデルに顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)と幹細胞因子(SCF)を投与し、心機能の改善および生存率の改善が得られたことから、G-CSFとSCFによる幹細胞の賦活化を報告した<sup>20)</sup>。しかし、再生心筋がホストの心筋由来か骨髄由来かは不明であった。我々は、この内因性幹細胞の由来を検討した。放射線照射後のC57b6マウスにGFP-BMCを移植し、キメラマウスを作製した。心筋梗塞モデルでの検討ではG-CSF投与群で心筋梗塞1ヵ月後における生存率の改善傾向を認めた<sup>20)</sup>。また、G-CSF群では、心筋梗塞境界部のGFP-BMC数がコントロール群より有意に増加し、そのGFP-BMCのうち約20%がトロポニンI陽性細胞で、ネスチン陽性細胞も多数認めた。さらに、ドキシソルピシン投与心不全モデルにおいても同様の結果であった<sup>20)</sup>。したがって、骨髄は再生心筋の細胞源の一つで、G-CSFがその効果を増強することが示唆された。また、ヒト心筋細胞

を用いた検討において、G-CSFは病的心筋に直接働き、G-CSFレセプターを介してトロポニンI陽性細胞の増殖を増強することが確認された<sup>21)</sup>。しかし、骨髄由来の心筋細胞数が少なく、心臓ポンプ機能の改善効果には限界があった<sup>22)</sup>。

しかし、内因性幹細胞は、障害された心筋とともに動脈硬化巣にも遊走する可能性があり<sup>23)</sup>、心筋障害に対する効果的な内因性幹細胞を用いた治療には、内因性幹細胞の遊走に関する生理学的メカニズムの解明が望まれる。

#### おわりに

細胞を用いた心筋再生において、骨髄細胞は、自己細胞を用いるため拒絶反応を避けることができ、倫理的問題も少ない。さらに、心筋内に移植することで心筋と血管が同時に再生され得るため、拡張型心筋症などの難治性重症心不全に対する治療として期待される。

#### ●文 献

- 1) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, et al: Cell transplantation for myocardial repair; an experimental approach. *Cell Transplant* 1: 383-390, 1992
- 2) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999
- 3) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 (19 Suppl): II247-II256, 1999
- 4) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al: Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty; feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120: 999-1006, 2000
- 5) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6: 1282-1286, 2000
- 6) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, et al: Direct cell-to-cell interaction of cardiomyocytes is a key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage *in vitro*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125: 1470-1480, 2003
- 7) Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al: Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 107: 1024-1032, 2003
- 8) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545, 2002
- 9) Oh H, Bradfute SB, Gaillard TD, et al: Cardiac progenitor cells from adult myocardium; homing, differentiation and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12313-12318, 2003
- 10) Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al: Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* 23: 436-445, 2004
- 11) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
- 12) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al:



- Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103 : 897-903, 2001
- 13) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells ; a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360 : 427, 2002
- 14) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 73 : 1210-1215, 2002
- 15) Fujii H, Tomita S, Nakatani T, et al : A Novel application of myocardial contrast echocardiography to evaluate angiogenesis by autologous bone marrow cell transplantation in chronic ischemic pig model. *J Am Coll Cardiol* 43 : 1299-1305, 2004
- 16) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al : Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 94 : 678-675, 2004
- 17) Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al : Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 : H2670-H2676, 2004
- 18) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10344-10349, 2001
- 19) Fukuhara S, Tomita S, Ohtsu Y, et al : G-CSF promoted bone marrow cells to migrate into infarcted heart and differentiate into cardiomyocytes. *Circulation* 106 (suppl II) : A1870, 2002
- 20) Tomita S, Ishida M, Nakatani T, et al : Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *J Heart Lung Transplant* 23 : 577-584, 2004
- 21) Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T, et al : Granulocyte-colony stimulating factor directly enhances proliferation of human troponin I-positive cells derived from idiopathic dilated cardiomyopathy through specific receptors. *J Heart Lung Transplant* 23 : 1430-1437, 2004
- 22) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, et al : Endogenous bone marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarcted model. *J Heart Lung Transplant* 24 : 67-72, 2005
- 23) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al : Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction ; the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363 : 751-756, 2004



第42回日本人工臓器学会大会座長報告  
 パネルディスカッション(4)  
 ハイブリッド人工臓器の現状と未来

中谷 武嗣(国立循環器病センター臓器移植部)  
 川西 秀樹((医)あかね会土谷総合病院)

本パネルにおいては、生体材料を組み込んだ新たな人工臓器として期待されているハイブリッド人工臓器について、ハイブリッド人工腎臓、ハイブリッド人工肝臓、ハイブリッド人工膵臓に加え、ハイブリッド血管・心臓弁を取り上げた。

(P-4-1)「ハイブリッド人工腎臓開発の現状と課題」斎藤明(東海大学総合医学研究所分子病態学部門II)氏は、中空糸膜モジュールと近位尿管上皮細胞を用いたバイオ人工尿管デバイスと持続血液濾過器により、患者血液濾過液を再生し、代謝・内分泌機能を付加して体内に戻すハイブリッド人工腎臓について報告した。持続血液濾過器としては、抗血栓性と血液適合性を得るために細胞膜のリン脂質を模したポリマーなどを用い、近位尿管上皮細胞を単層に生着させたバイオ人工尿管デバイスとで長期使用可能なものにすべく検討している。人工膜種により尿管細胞の生着率や増殖能は異なった。また尿管細胞では、生着しても重層化すると機能低下がみられることより、コンフルエントな生着後にコンタクトインヒビションを保つ尿管細胞種を選択することが重要である。現状では、急性腎不全治療に短期間応用できるレベルであり、長期使用を可能とするために、今後の発展が期待される。

(P-4-2)「血液透析用ホロファイバー型モジュール(H)を用いたハイブリッド型人工腎臓」鶴岡秀一(自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門)氏は、腎臓の機能として糸球体濾過やホルモン産生に加え、尿管分泌に着目し、新たに作成可能となった様々な溶質をより多く分泌できる培養尿管細胞を用いたハイブリッド人工腎臓について報告した。多剤耐性蛋白(MDR)-1遺伝子を培養尿管細胞に導入し、細胞培養用の小型Hにコンフルエントになるまで培養したモジュールを用いることで、ジゴキシン中毒イヌの治療が可能となった。今後異なる遺伝子を用いた様々な溶質除去能を持った細胞を作成することで、より生体腎に近い尿管分泌能をもったハイブリッド型人工腎臓の開発が期待される。

(P-4-3)「ハイブリッド型人工肝臓開発の現状」中澤浩二(北九州市立大学国際環境工学部)氏は、肝移植までのブリッジや、肝臓のもつ自己再生能を促進することで肝不全に陥った自己肝の回復を促すハイブリッド人工肝臓の開発について、細胞培養法を報告した。肝細胞の高機能発現と長期維持を実現するために三次元的な細胞組織体(オルガノイド)を形成させる培養法を確立し、2つのタイプの人工肝臓を開発検討している。一つは、加工したポリウレタン発泡体ブロックの孔内で形成される肝細胞球状組織体(スフェロイド)を利用したもので、もう一つは毛細血管に模した中空糸を微小間隔で規則的に配置し、その中空糸外部空間に遠心力を利用して形成させた肝細胞オルガノイドを利用するものである。前者は温虚血肝不全ブタを用いた前臨床試験で、後者は小動物実験において良好な救命効果を持つことが確認されている。臨床応用における問題点は細胞原であり、ブタ肝細胞とともにヒト細胞についても検討を進めている。

(P-4-4)「実用化に向けたバイオ人工肝臓・膵臓の開発」小林直哉(岡山大学大学院医歯学総合研究科・消化器・腫瘍外科学)氏は、中空糸外細胞充填式モジュールによるバイオ人工肝臓(BAL)と膵臓(BAP)について報告した。BALには、ポリスルフォンを、BAPにはエチレンポリビニルアルコール中空糸を、細胞接着支持体にはポリアミン酸ウレタン共重合体コーティングPTFE不織布を各々用い、さらにレーヨン不織布を支持体とした巻巻状モジュールを作成した。BALとしては可逆性不死化ヒト肝細胞あるいは新鮮分離ブタ肝細胞を、BAPにはマウスインスリン分泌MIN6細胞あるいは新鮮分離ブタ膵島を各々充填した。肝不全モデルに対しBALを用いることで生存例がみられた。また、BAPに対しては糖負荷を行なったが、良好な血糖値のコントロールを示した。臨床化に向けた今後の研究が期待される。

(P-4-5)「基材として脱細胞化組織を用いたハイブリッド血管・心臓弁」藤里俊哉(国立循環器病センター再生医療部)氏

らは、脱細胞化した生体組織を用い、患者個人の細胞をハイブリッド化するテーラーメイド型組織移植について報告した。この脱細胞化組織基材は、移植後、自己細胞の浸潤に伴い自己組織と置換されることが期待される。脱細胞化については、超高静水圧印加を続けて洗浄処理し、組織内の細胞を除去するパワーグラフト法を開発した。この脱細胞化基材に、回転および循環培養バイオリクター装置を用いて血管内皮細胞を播種した。このようにして作成した血管および心

臓弁をミニプタによる動物実験で検討したところでは、良好な結果を示しており、臨床化にむけて研究を進めている。

本パネルにおいては、基材に各種人工臓器あるいは脱細胞化組織を用い、適当な細胞を付加することで、期待する機能を得ようとする各種ハイブリッド人工臓器が報告された。共通した問題点は、用いる細胞種の確保であり、今後の研究の進展が期待された。

# 繊維と線維(生体線維の洗浄と再生医療への展開)

Textile Fiber and Medical Fiber

澤田和也・寺田堂彦・藤里俊哉

## 1. はじめに

衣料用繊維素材は、植物や動物等の天然由来のものから、ナイロンやポリエステル等に代表される人工的なものまで、その種類が極めて多岐に渡っている。製造・加工技術の著しい進歩により、高機能化された繊維製品も多く登場し、我々の衣生活スタイルも大きく変化してきた。近年、繊維製品は工業・産業資材等にも広く応用化されていることは周知の通りであるが、それでも“繊維=衣料品”のイメージが強いことに変わりない。ここでは視点を少し変え、一般に殆ど認識されていない動物由来繊維の一種を紹介したい。動物由来繊維として連想できるものは、獣毛や絹糸等の体外で採取される蛋白質繊維であろう。しかし実際には、体内にも同様の線維が存在している。ここで、“繊維”と“線維”の単語を使い分けたが、その差に大きな意味はない。慣例的に、衣料分野では“繊維”が、医療分野では“線維”が用いられている。英語に訳せば何れも fiber であり、「細くて長いもの」という定義で本質的に同じである。さて、体内に存在する線維として、最も理解し易い例として血管を挙げる事が出来る。実際、繊維状の生体適合性高分子材料を用い、人工血管を造形することも多い。図1に血管の概略図を示した。血管組織を大雑把に見ると、遺伝情報を含む生物体の構成単位である細胞、それを支持して

いる細胞外マトリックスから成る。さらに、細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質と、コラーゲン及びエラスチンを主とする線維性蛋白質から構成されている。従って、血管組織から細胞や接着因子を除去すれば、最終的にはコラーゲン線維およびエラスチン線維が残ることになる。上述した生体内の線維とは、これらを意味しており、体の部位により組成は異なるが、脊椎動物の身体の構造要素の主体である。ここで紹介させて頂く線維のテーマは、これら生体内線維を再生医療で応用化しようとする研究例である。

## 2. 研究背景

我々の体内に疾病組織が生じた場合、その回復を図る手段として最も望ましいことは、自己治癒により組織そのものを治癒化させることである。しかし、欠損もしくは機能不全に陥った組織に対しては、代替物との置換、つまり“移植”という手段も適応される。筆者らの研究チームが対象とする組織は心臓弁であるが、これについても同様である。現在、心臓弁置換の代替物には、パイロライト製の機械弁を用いるのが主である。最近では、一生の使用に耐え得る強度を有する製品も開発されている。しかし、これらの機械弁にも多くの問題が含まれている。例えば、生涯にわたる抗血栓剤の服用は、安全性や経済面において問題が残る。

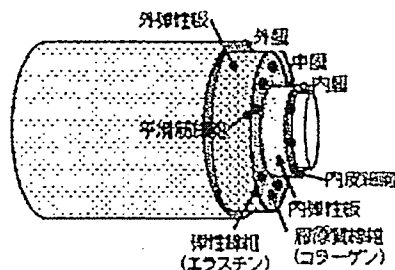
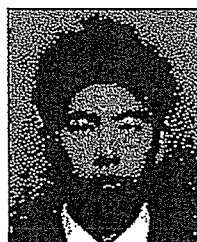


図1 血管構造の概略図



DOHIKO TERADA  
大阪工業大学 工学部 博士研究員  
博士(工学)  
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1  
〈専門〉高分子材料加工  
〈趣味〉読書



KAZUYA SAWADA  
大阪成蹊短期大学 総合生活学科  
准教授 博士(工学)  
〒533-0007 大阪市東淀川区相川3-10-62  
Tel: 06-6829-2561 Fax: 06-6829-2579  
E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp  
〈専門〉繊維加工、染色化学、コロイド化学  
〈趣味〉スキー、旅行



TOSHIYA FUJISATO  
大阪工業大学 工学部 教授 工学博士  
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1  
Tel: 06-6954-4746  
E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp  
〈専門〉再生医工学、組織工学  
〈趣味〉旅行計画