再生医療におけるナノテクノロジー

特集 ナノバイオサイエンス

大 和 雅 之*

Nanotechnology in regenerative medicine

In order to realize full-blown regenerative medicine that is expected to achieve permanent care, a wide variety of breakthroughs would be required. In addition, ES cells have been also focused as another cell source in clinical settings following early clinical success with somatic stem cells. Here, the current statuses of regenerative medicine and ES cell research are summarized, and the expectation for nanotechnology in this field is described.

根治治療を可能にすることが期待されている再生医療の本格的実現には、今後、多くのブレークスルーが必要である。また、すでに臨床応用がはじまっている組織中に存在する体性幹細胞につづいて、ES細胞の臨床応用が近づいてきている。本稿では、再生医療とES細胞研究の現状を概説するとともに、この分野におけるナノテクノロジーの活躍への期待を併せて述べてい。

Masayuki Yamato*

key words: 生分解性高分子, 温度応答性培養皿, クローン化ES細胞, 核移植

100年以上にもわたって再生しないと考えられてきた中枢神経系や心筋組織中にも幹細胞が存在することが、近年示されており、哺乳動物においては、ほとんどすべての組織に固有の幹細胞が存在すると考えられている。このような組織中に存在する幹細胞を体性幹細胞とよぶ。幹細胞は、その多分化能を維持しながら未分化状態で増殖する自己複製能と、複数種の終末分化細胞へと分化する多分化能の二つの異なる性質を併せ持つ細胞である。最近、このような体性幹細胞とは大きく異なる胚性幹細胞(以下ES細胞)も注目を集めている。

本稿では、これら幹細胞の活用と培養系で組織構造を再構築する組織工学を両輪とする再生医療におけるナノテクノロジーへの期待を概説したい。

再生医療の誕生：細胞移植

再生医療とは、ウイルス感染などで熱が出たら解熱剤を投与するといった対症療法的な薬物治療や、がん治療に代表される切除中心の外科的治療の

限界を越えて、本来必要な機能を回復させ、患者のQOLを維持する新世代の医療技術であり、近年大きな注目を集めている。

骨髓移植からスタートした造血系幹細胞移植は、現在では確立した治療技術となっている。このほか、細胞懸濁液の注射で有効性が示されているのは、遺伝子疾患に起因する肝不全患者への経門脈的あるいは脾臓への他家健常肝実質細胞移植や、糖尿病患者への他家膵細胞移植、パーキンソン病患者への中絶胎児由来他家神経細胞移植、膝関節軟骨の傷害に対する培養自己軟骨細胞移植など、非常に限られている。最近では、バージャー病などの下肢血行障害患者への自己骨髓細胞移植が有効であるとの報告が注目を集めている¹⁾。

同様に、心筋梗塞などの重症心不全患者への自己骨髓細胞移植あるいは自己骨格筋筋芽細胞移植もヒト臨床例が多数報告されるようになっており、その有効性が検討されはじめている²⁾。現行では心筋組織に直接、細胞懸濁液を注射しており、1回の移植に数10カ所～100カ所程度の注射が行われる。その際に注射針が不可避免的に組織を傷つけるほか、移植された細胞の生着率がきわめて低いこと、また島状の組織のみが再生し、大きな組織とならないなど

* Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University 東京女子医科大学先端生命医科学研究所

の問題点も指摘されており、この移植法が完璧でないことは間違いない。さらに、この方法では高頻度に不整脈が生じることが報告されている。

今後、これらの問題点を克服する新しい移植技術の開発が必要であり、ナノテクノロジーが活躍する舞台の一つであると考えられる。組織侵襲性が少なく、高率に細胞を組織に定着させることを可能にする新しい移植デバイスの開発が待たれている。

温度応答性培養皿

このような背景のもと、組織としての形態を持たない血液とは異なり、他の組織・臓器では細胞懸濁液の注射だけでは多くの場合で十分な組織再生が期待できず、なんらかの方法により培養系で部分的にでも組織構造を再建し、これを移植する新技術に大きな期待が寄せられてきた。

1970年代にマウス由来線維芽細胞である3T3細胞をX線照射したあとにフィーダーレイヤーとして用いることで、移植に耐えうる重層化上皮組織を培養系で作製できることが明らかになり³⁾、1980年ごろより臨床応用が開始された⁴⁾。培養皿から上皮細胞を回収するには、デイスパーゼとよばれる微生物由来の蛋白分解酵素が用いられてきた。しかし、角膜上皮では細胞の重層化の程度が低く、デイスパーゼ処理後に回収した細胞シートが非常に脆弱であることが問題となる。細胞シートの脆弱化を回避する目的で、フィブリンゲルや羊膜などの担体が用いられているが、いずれも透明ではなく、可能であればこのような担体を排除すべきであると考えられる。

筆者らは、世界に先駆けて開発に成功した温度応答性培養皿を用いることで、室温程度の低温処理のみで培養角膜上皮細胞を細胞シートとして回収し移植に供している^{5,6)}。いっさい人工物を含まないものの、細胞シートの底面には培養の間に沈着した細胞外マトリクスが組織化されたまま回収され、再度、回収した細胞シートをどこか別の表面に再接着させる際に、これが“糊”として機能する^{7,8)}。温度応答性培養皿表面に共有結合的に固定化された温度応答性高分子は、低温処理後も安定に培養皿表

面に結合しているため、細胞シート中には合成高分子などの人工物はいっさい含まない。筆者らは、すでにこの方法を用いて作製した培養表皮細胞シート(東京女子医科大学形成外科との共同研究)や培養角膜上皮細胞シート(大阪大学眼科との共同研究)の臨床応用に成功している。

このような温度依存的な細胞接着・脱着の制御を実現するためには、培養皿表面に固定化する温度応答性高分子層の厚み・密度の制御はきわめて重要である。ポリスチレン製の培養皿表面への固定では約20ナノメートルの厚みで、温度応答性高分子が均一に固定化されており、大面積へのナノオーダーでの固定化という独自のナノテクノロジーが必要である。

組織工学

上皮組織に代表される薄い組織ではなく、厚みを持った組織の再生を目指して、溶ける縫合糸としてすでに広く臨床応用されていた素材であるポリ乳酸やポリグリコール酸などの生分解性高分子製の三次元的な細胞足場を採用することにより、三次元的な形状を持つ組織を培養系で構築する可能性が追求されている^{9~11)}。すなわち、対象とする組織の形態に合わせて成型した生分解性高分子製の細胞培養用足場に細胞を播種し、培養後に患部へ移植する。生分解性高分子はある一定の半減期で分解するが、その間に足場に播種した細胞や、ホスト由来の細胞が合成・分泌したコラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリクスと置換されるため、足場どおりの形を再現した組織が再生する。逆に、生分解性高分子の分解・消失速度と細胞による細胞外マトリクスの産生速度がうまく対応していないと形が崩れることになる。

生分解性高分子製の足場は多くの場合、播種した細胞の接着面積の増大と栄養および老廃物の拡散、毛細血管の導入などを期待して多孔性となっている。あるいは繊維状に加工した生分解性高分子を用いて多くの空隙を用意する。生分解性高分子の分解と消失に合わせてホスト由来の毛細血管網の進入が達成されれば、三次元足場内の細胞にも酸素と栄養

が供給されるが、現実にはその誘導はきわめて困難である。よって、少なくとも現状では、この技術を用いた臨床研究はきわめて少ない。

さらに、平滑筋や骨格筋などの再生においては、神経系の再生もきわめて重要である。実験的に神経を切断することで刺激を遮断し、平滑筋や骨格筋を廃用性に萎縮させることが可能である。また、組織工学的技術を用いて異所的に再生させた平滑筋や骨格筋は短時間のうちに退縮してしまう。制御された神経からの刺激なしには、このような筋肉を維持することはできないことがわかる。膀胱拡大術であれば、正常な宿主膀胱から毛細血管網と神経が再生組織に侵入してくることが期待できるが、完全置換術の場合、このような侵入はほとんど期待できないと考えられる。また、毛細血管網や神経の再生組織への侵入する速度はある上限を持っていることから、再生させる組織が大きくなればなるほど侵入には時間がかかり、再生組織が退縮してしまう危険性が増大する。これが、マウスやラットなどの小動物では好成績が得られるものの、中動物、大動物へは容易に移行できない一つの大きな理由となっている。ナノテクノロジーを活用することで、毛細血管網、神経網の再生を早期に促す技術の開発が期待されている。

クローン化 ES 細胞

1981 年、マウス ES 細胞の樹立が発表された^{12,13)}。ES 細胞は、胚から単離し樹立した細胞株であり、特定の培養条件下で無限に増殖させることができると考えられている。株化と ES 細胞に固有の未分化性の維持に必要な培養条件は、これまでにさまざまな検討がされてきた。現在ではマウス胎児由来線維芽細胞がフィーダー細胞として活用されている。マウスの系では白血病阻害因子(LIF)を培地に添加することにより、フィーダー細胞を培養系から除去できる。マウスの ES 細胞は、LIF 存在下では自己複製し、培地から LIF を除去すると神経や血球、筋肉などの細胞へと分化していく。げっ歯類と霊長類の発生機構の違いから、ヒト ES 細胞では、LIF 添加によりフィーダーレイヤー細胞を培養系から除去

することはできないが、最近ではフィーダーレイヤーなしの培養条件下で未分化なままヒト ES 細胞を維持する方法も報告されている¹⁴⁾。このような幹細胞特異的な性質を維持する環境をニッチェとよぶが、その人工的再建においてもナノテクノロジーの貢献が大きく期待されている。

日本で 2005 年公開されたマイケル・ベイ監督の新作映画“アイランド”は、“生命がオーダーメイドされる場所”という刺激的な副題がつけられた SF 大作であった。舞台は 2019 年、病気や怪我により、治療が必要になったら金銭的保証を受けることができる従来の保険に代わり、病気や怪我の治療のために組織や臓器が必要になると、あらかじめ用意していた自分のクローンから必要な組織や臓器を摘出しこれを移植に供することが非合法ながら行われているという設定である。費用は 300 万ドル(約 3 億 5,000 万円)。これが高いか安いかは別にして、芸能人やスポーツ選手、弁護士などがクライアントである。

このような設定は一見、荒唐無稽なようにも思えるが、公平にみて科学的には十分可能なところにまできているといえないこともない。たとえば、1996 年に報告されたクローン羊ドリーは、哺乳類動物としては世界ではじめて報告された体細胞クローンである¹⁵⁾。保険加入者などの成人から単離した体細胞(ドリーの場合は乳腺上皮細胞)からの核移植によりクローン動物の作製が可能であることを示している。

ここで体細胞クローンとは、成体のごくありふれた体細胞から単離した核を、除核した未受精卵に移植するものである。この体細胞クローン胚を、患者の体細胞から単離した核を用いてつくり、これから ES 細胞を樹立することができれば、免疫抑制剤を必要としない再生医療の実現に向けたきわめて大きな一歩となりうる。映画“アイランド”で描かれているのは、体細胞クローン胚から ES 細胞をつくるのではなく、これを着床させてクローン個体をつくり、病気の際に提供されるスベア臓器の供給に用いるというものである。核移植はきわめて繊細な操作であり、また医療に用いる際には絶対の再現性を必要とすることからナノテクノロジーの導入による従

来技術の抜本の変革が期待されている。

筆者自身は、心臓や脾臓、神経、肝臓などでは、早ければ10年(より楽観的な見積りでは5年)以内にヒトES細胞を用いた再生医療がはじまるのではないかと考えている。さらに将来的には、クローン化ES細胞から分化させた細胞が用いられるものと推測される。

ここで、未分化な細胞の混入をどう防ぐかも大きな問題である。分化していないES細胞が混入していた場合、テラトーマを形成する可能性があり、治療に必要な分化細胞のみを完全に選別して移植に供する必要があるが、この技術も未完成である。ここでもナノテクノロジーの貢献に期待したい。

おわりに

以上、概観したように、再生医療はいまだはじまったばかりである。移植先進国アメリカにおいてさえドナー不足は深刻であり、多くの患者が新しい治療法の開発を心待ちにしている。ES細胞とこれから分化させた細胞を用いる再生医療は大きな可能性を秘めており、このような背景のもと大きな期待が持たれているのは当然である。ナノテクノロジーがこの領域にもおいても大きな期待を集めていることは当然といえよう。

文 献

- 1) Koshikawa M et al. : Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease : a pilot study. *Curr Med Res Opin* 22 : 793-798, 2006.
- 2) Smits PC : Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts : a review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiol* 52 : 525-535, 2004.
- 3) Rheinwald JG et al. : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331-343, 1975.
- 4) Gallico GG 3rd et al. : Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311 : 448-451, 1984.
- 5) Nishida K et al. : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004.
- 6) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N et al. : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379-385, 2004.
- 7) Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T : Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res* 45 : 355-362, 1999.
- 8) Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 1 : 377-381, 2000.
- 9) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926, 1993.
- 10) Vacanti JP, Langer R : Tissue engineering : the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354 (Suppl 1) : S132-34, 1999.
- 11) Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP : Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 2480-2487, 2006.
- 12) Martin GR : Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7634-7638, 1981.
- 13) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154-156, 1981.
- 14) Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER et al. : Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24 : 185-187, 2006.
- 15) Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I : Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380 : 64-66, 1996.