総説

再生医療における 3 要素 + 1 要素

Three Essential Factors Plus One in Regenerative Medicine

牛田 多加志

Takashi USHIDA

◎1985 年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了 (工学博士), 1992 年筑波大学大学院医学系研究科助教授 (連携), 1993 年工業技術院産業技術融合領域研究所主任研究官, 2000 年東京大学大学院工学系研究科助教授, 2003 年より現職

◎研究・専門テーマは, バイオメカニクス, 再生医療工学

◎正員 (フェロー), 東京大学教授
大学院医学系研究科疾患生命工学センター再生医療工学部門
(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)
E-mail : ushida@m.u-tokyo.ac.jp

図 1 再生医療における 3 要素 + 1 要素

1. はじめに

再生医療における基盤技術は, いかに細胞を分化コントロールするか, そしていかに組織構築を行うか, これらの二つの目標を実現するものとして開発が進められている。再生医療においては 3 要素というものが存在する。一つは細胞ソースである。これは再生医療というコンセプトの根幹をなすものであり組織再生の中核をなすものである。2 番目としては三次元培養担体が挙げられる。そして 3 番目としては生化学因子が挙げられる。細胞増殖因子やサイトカインに代表される生化学因子は, 細胞に対してはリガンドとしてレセプタ (受容体) に結合し細胞内にシグナルを伝達し, 細胞の遺伝子発現をコントロールし, ひいては細胞の分化をコントロールする。したがって, 適切なタイミングで適切な生化学因子の添加は細胞の分化コントロールおよび組織再生には必要不可欠である。一方, 4 番目のファクタとして注目を集めつつあるのが, 物理刺激因子である。細胞は生体中でさまざまな物理的な刺激を受けており, 適正な物理刺激はなんらかの受容機構により細胞内にシグナルとして伝達され生化学因子と同様に細胞分化および組織再生をコントロールすることが知られている。この 3 要素 + 1 要素を総合的に組み合わせることにより, 細胞の分化コントロールおよび組織再生が達成されると考えられている (図 1)。

2. 細胞ソース

再生医療においては, 細胞は基本要素の第一に挙げられるものであり, 再生医療における主役と言える。私たちの

体は約 60 兆個もの細胞で成り立っていることが知られている。そしてそれぞれの細胞がさまざまな機能を果たしながら全体として調和し, 生体という巨大システムを統一した形でコントロールしている。これらの細胞の中には神経細胞のように一生, 生き続ける細胞から, 白血球のように月の単位で誕生, 死滅する細胞まで, その寿命もさまざまである。再生医療においては, これらのさまざまな細胞をいかに適材適所に利用するかが課題である。

再生医療においては, その細胞ソースを成熟細胞に求めるのではなく, 幹細胞に求める研究が活発になってきている。幹細胞とは, 自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞のことであり, 細胞分化のカスケード (連鎖的経路) の中で種々の幹細胞が存在する。そのカスケードのトップに存在する幹細胞が ES (Embryonic Stem) 細胞である。1981 年, イギリスのケンブリッジ大学の Evans によりマウス ES が樹立された。それから 17 年後の 1998 年, アメリカのウィスコンシン大学の Thomson によりヒト ES 細胞が樹立された。ES 細胞においては, 受精卵の破壊という倫理的な問題を避けることができない, といった大きなデメリットを抱えているが, 2009 年にアメリカでは ES 細胞研究に対して連邦政府助成が解禁され, 2010 年 7 月にはアメリカのジェロン社に対して, 脊髄損傷患者を対象としてヒト ES 細胞を使用する臨床試験が承認された。

そして, 2006 年にマウス iPS 細胞が樹立された後, 翌年の 2007 年にはヒト iPS 細胞が樹立された。これを受けて, 2010 年に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(ヒト幹指針) の対象にヒト iPS 細胞が含まれるように改訂された。つい最近 (2013 年 5 月) のことであるが, オレゴン健康科学大学のチームが, ヒトクローン胚 (受精卵の核を患者の細胞の核と入れ替えて樹立した胚) からヒト ES 細胞を樹立することに成功した。このヒト ES 細胞は自家細胞であり, クローン人間ができる可能性が潜在的に存在する。

したがって, 細胞を利用する場合に, 重要な観点として, 自家細胞か他家細胞か, そして成熟細胞か幹細胞か, といった観点が重要なポイントとなる。

2.1 自家細胞か他家細胞か

再生医療において、その細胞ソースを誰に求めるか、という観点から、組織を再生するために自らの細胞（自家細胞）を用いるケースと、他人の細胞（他家細胞）を用いるケースが存在する。それぞれにメリットとデメリットとがあり、それらを勘案しながら、適切な細胞ソースを定める必要がある。自家細胞を用いる場合のメリットとしては、拒絶反応がない点が最も特筆すべき点である。自分の細胞を用いるため、たとえ体外で培養、組織形成が行われたとしても、細胞そのもの、そして細胞が産生するマトリックス（細胞外基質）、そしてそれらの複合体である再生組織に対しては、当然ながら拒絶反応は生じない。またウイルスの問題もクリアされる。これは用いられる細胞および再生される組織にウイルスが潜んでいない、ということの意味してはいない。ウイルスの問題がクリアされる、ということは、自家細胞を用いることにより新たにウイルスに感染することはない、ということの意味する。一方、デメリットとしては、採取部位が限られているということが挙げられる。自身の組織を採取して、そこから細胞を得る必要があるが、採取のために自身の組織の一部を損壊するため、その部位は限定される。また、再生医療の対象は（白血病治療などの一部の例外を除き）主に中高年が対象となる。中高年の組織から採取される細胞は一般的にアクティビティ（生理活性）が低いことが知られている。とくに細胞分裂能という観点では著しく劣っている。正常な細胞ではヘイフリック限界と呼ばれる分裂回数の限界があり、そのために中高年から採取される細胞に残された分裂回数は小さいとされる。再生医療においては当然のことながら、採取した組織よりも大きい組織を再生するため、細胞分裂能は必要不可欠な要素である。ただし、このヘイフリック限界は正常細胞に適用されるものであり、後述する幹細胞にはこのヘイフリック限界は適用されない。

他家細胞を用いることのメリットは、自家細胞と異なり得られる細胞のアクティビティは必ずしも低くないことである。またヒトの細胞である限りはウイルス感染のチェックは可能である点も、自家細胞に劣るものではない。他家細胞を用いる場合には、あらかじめ細胞を用意し組織再生を進めておくことができるという利点がある。再生医療の実現のためには産業化が必要不可欠であるが、産業化という観点では他家細胞を用いた組織再生には大きなメリットがある。また火傷治療などの緊急性の高いケースにおいては、他家細胞を用いた再生医療は有効である。一方、デメリットとしては、移植に際しては拒絶反応が必然的に起こるため、免疫抑制剤の使用を避けることができないことが挙げられる。また、ケースによっては倫理的問題が生ずる可能性がある。他家細胞を得る場合、他人の組織の一部を損傷するため、その採取に当たっては倫理的問題に対して細心の配慮が必要である。他家細胞の場合は、屍体から採取されるケースも存在する。それゆえ、アクティビティの高い細胞も得ることができるという他家細胞のメリットに繋がるのではあるが、同様に倫理的問題への配慮が必要である。

2.2 成熟細胞と幹細胞

自家細胞か他家細胞かという選択は、誰からという視点であるが、一方、どこからという、どのような分化段階の細胞を用いるかという視点が存在する。私たちの体は60兆個もの細胞で構成されていることは前述のとおりである

が、それら60兆個の細胞はもとをたどれば1個の受精卵が分裂を繰り返した結果である。受精卵が分裂を繰り返しながら分化のカスケードを降りていき、最終的には成熟細胞となって、それぞれの機能をそれぞれの場所で果たすことになる。再生医療における細胞ソースの選択肢の一つは、この成熟細胞を細胞ソースとして用いることである。たとえば、軟骨組織を再生するための細胞ソースとして軟骨細胞を用いる方法である。一方、成熟細胞を用いることは、前述のようにその採取箇所が限定的であることと、分裂回数に制限があるというデメリットを伴う。そこで、細胞ソースを、成熟細胞ではなく幹細胞に求める戦略を採用する研究が盛んになってきている。

2.2.1 ES細胞およびiPS細胞 幹細胞 (Stem Cell)

とは、自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞と定義されている。自己複製能とは、自己と同一の細胞に分裂可能な能力のことである。一つの受精卵から分裂を繰り返すことにより成熟細胞に分化していくように、一般的には細胞分裂と細胞分化は並列して生ずる。一方、幹細胞は分裂しながらも、分化を進めることなく、いわばその場で足踏みする状態を維持できる能力を持つ。そして潜在的には多くの成熟細胞に分化可能であるという多分化能を持つ。この多分化能の最も高い位置に存在している細胞がES細胞である。つまりすべての成熟細胞に分化可能な能力を持つ。このES細胞は、受精卵を破壊して作製されることから、倫理的問題から切り離すことはできない。ES細胞は受精卵から作製されることから他家細胞である。しかしながら核を入れ替えるというクローン技術を用いれば自家細胞になり得るが、これまでヒトでは成功していなかった。2013年5月、ヒトクローン胚からヒトES細胞が樹立された。このES細胞は自家細胞であり、すべての細胞種に分化可能な細胞である。

一方、ES細胞が不可避に持つ倫理的問題をクリアすべく、iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞が開発された。この技術は、成熟細胞の分化状態をES細胞の状態まで巻き戻す技術である。分化のカスケードを末端まで下ってきた成熟細胞に再び分化カスケードをES細胞までいわば遡上させる技術である。この技術により受精卵を破壊することなくES細胞様の細胞を得ることができ、さらに自己細胞、他家細胞どちらも作製可能である。一方、なぜES細胞様細胞にまで分化が巻き戻るのか、その詳細なメカニズムは依然不明であることや、癌化のリスクが現時点ではゼロとなっていない点や、完全には巻き戻っていない徴候も散見されるといった点で、引き続き基礎研究を続ける必要がある。しかしながら、今後、再生医療における細胞ソースの最も有力な候補であることは間違いないと考えられる。

2.2.2 血液幹細胞および骨髄性幹細胞 幹細胞の定義は上述したとおりであるが、生体中にはさまざまな箇所に幹細胞が存在することが見出されている。その中で、最も有名で再生医療において臨床応用という点でも最も成功している幹細胞が、骨髄に存在する幹細胞である。骨髄に存在する幹細胞としては血液幹細胞と骨髄性幹細胞の2種類が知られている。血液幹細胞は、血球である赤血球、各種の白血球、血小板、マクロファージ、破骨細胞などに分化可能な幹細胞であり、血球と呼ばれるすべての細胞を産生することが可能である。血液幹細胞は白血病治療に用いられており、細胞移植 (Cell Transplantation) の再生医療において最も頻繁に臨床応用されている。治療においては、

いったん、血球細胞をすべて死滅させるため、一時的に免疫力がゼロとなる。したがって、無菌室で過ごす等の措置が必要であるが、治療そのものは採取した骨髄を静脈に注入するという細胞移植である。骨髄に僅かに含まれる血球幹細胞が骨髄内に定着し、細胞分裂を開始し、そしてその一部を分化のカスケードに流すことができれば、再び血球が産生される。この場合、血液幹細胞と産生される血球細胞は他家細胞である。骨髄の中に存在するもう一つの幹細胞である骨髄性幹細胞は中胚葉系の幹細胞であり、潜在的に骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、腱、靱帯細胞に分化可能であるため、これらの細胞により構成される組織である骨組織、軟骨組織などを再生する場合の細胞ソースとして期待されている。

2.2.3 体性幹細胞 幹細胞は骨髄以外でも見出されている。とくに日々再生している組織においては幹細胞の存在が必須である。これらの幹細胞は体性 (Somatic) 幹細胞と呼ばれる。もし、これらの幹細胞が存在しなければ、成熟細胞はすぐにヘイフリック限界を迎え、その時点で組織の再生能がストップしてしまい、生命の維持にとって危機的な状況になってしまう。具体的には、体性幹細胞は、毛根、表皮、小腸上皮に存在する。たとえば表皮は日々、垢として脱落しながら再生を続けている。このため表皮は傷を残すことなく、外界とのバリアとしての機能を維持している。表皮幹細胞は、この表皮を再生する表皮細胞を常に供給し続けている。毛根、表皮、小腸上皮以外には、その再生能を裏づけるように肝臓において幹細胞が見出されている。また、神経幹細胞も見出されている。これは、それまでの神経は再生しないという学説を覆す裏づけとなった発見である。これらの体性幹細胞は、再生医療における細胞ソースの一つのカテゴリとなる可能性がある。

3. 三次元培養担体

生体中の細胞は、血球細胞のように浮遊して存在する浮遊細胞以外は、すべてマトリックス (細胞外基質) に接着して存在する接着細胞である。接着細胞においても二つのカテゴリがあり、一つはマトリックス平面上に二次元的に接着して存在する上皮系細胞 (典型的な上皮系細胞としては血管の内腔面を覆う血管内皮細胞) とマトリックス内で三次元的に存在する細胞である。そして、組織を構築する細胞のほとんどが、三次元的なマトリックス中に存在している。これらの細胞は現在ではすべてフラスコ等の中で培養可能となっているが、一方でフラスコやシャーレ等の二次元平面でこれらの細胞をどれだけ長期間培養しても (例外は存在するが) 二次元のままであり、三次元組織にはならない。したがって、三次元組織を再生するためには、何らかの工学的技術を必要とする。その典型的な方法が、三次元培養担体を用いる方法である。

3.1 生体高分子

生体は、細胞と細胞が産生するマトリックスにより構成されている。細胞はさまざまな種類のマトリックスを産生するが、その中で最も産生量が多いものがコラーゲンである。コラーゲンは30種類以上存在するが、その中で最も存在量が多い典型的なコラーゲンが、I型コラーゲンである。このI型コラーゲンを熱変性させたものがゼラチンである。コラーゲンは、細胞を接着するサイトを持ち、また含水性でありゲルとなり得るため、コラーゲンゲル内に細

胞を内包させることで三次元体を作製する手法がよく用いられる。このI型コラーゲンの抗原性を低下させるべく末端を酵素的に切断したコラーゲンはアテロコラーゲンと呼ばれ、臨床に應用されている。そのほか、関節軟骨や皮膚に多く存在するムコ多糖類であるヒアルロン酸も、その高い含水性とゲル化技術により再生医療に應用されようとしている。わが国においては、2012年7月、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングによる自家培養軟骨が薬事承認された。これは、患者から採取した軟骨組織より分離した軟骨細胞を、アテロコラーゲンゲルに包埋して培養することにより作製した三次元培養組織である。

接着細胞は、Cell-cell Interaction (細胞間相互作用) または Cell-matrix Interaction (細胞-マトリックス間相互作用) のどちらかが存在しないとアポトーシス (自発的な細胞死) を起こすようにプログラムされている。したがって、細胞を三次元的に配置し生存させるためには、生体高分子をなんらかの手法を用いて三次元培養担体に取り込む必要がある。

3.2 生分解性高分子

三次元培養担体の素材として生体高分子を用いることは、細胞の接着という点では利点であるが、一方でその成形の難しさや機械的強度の弱さなど、臨床应用到際して問題となる点も多い。そこで、これらの欠点を補う材料として生分解性高分子が用いられている。生分解性高分子は、加水分解により高分子鎖が切断されて、最終的にはモノマーになる高分子である。再生医療において利用される典型的な生分解性高分子は、ポリ乳酸 (PLLA)、ポリグルコール酸 (PGA)、そしてそれらのブロック共重合体である PLGA である。生分解時間はそれぞれ、年のオーダー、週のオーダー、そして月のオーダーである。再生医療においては、生分解性高分子は、組織再生と同期して生分解することが期待されるため、その生分解時間とのマッチングからポリ乳酸と共に PLGA がよく用いられる。生分解性高分子は疎水性であるために、そのままでは細胞が接着することが困難なため、表面改質またはコラーゲンなど生体高分子とのハイブリッド構造が求められる。また、生分解性高分子はバルクの状態では再生医療材料としては適さず、その内部に細胞を播種可能なような構造、たとえば多孔質構造や繊維構造が求められる。

3.3 リン酸カルシウム

骨のマトリックスは主にコラーゲンとハイドロキシアパタイトで構成されている。ハイドロキシアパタイトはリン酸カルシウムの一種であるが、コラーゲンと共に骨芽細胞によって産生される。リン酸カルシウムは、その Ca/P の比率に応じさまざまな種類が存在するが、その中でハイドロキシアパタイトは Ca/P が 1.67 である。生理的な条件下では最も生成しやすいリン酸カルシウムである。このハイドロキシアパタイトは、骨組織においてはアパタイト周囲に骨組織を形成させるという骨伝導能を持つが、筋肉などの異所においても、ハイドロキシアパタイトを埋入することにより、その周囲に骨組織を形成させるという骨誘導能をも併せ持つ。したがって、骨欠損部分に充填するバイオマテリアルとして、これまでも臨床に應用されてきている。再生医療においても骨再生のための三次元培養担体の素材として應用されているが、一方でその生分解時間が比較的長いという欠点がある。生体の骨組織ではリモデリングと呼ばれる機構が存在し、破骨細胞によりコラーゲンやアパ

タイトが分解され、引き続いて骨芽細胞によりコラーゲンやアパタイトが産生されながら、常に骨組織がターンオーバーしている。このリモデリングに移植したアパタイトが巻き込まれにくいことが知られている。そこで、ハイドロキシアパタイトに似たリン酸カルシウムで Ca/P が 1.5 である三リン酸カルシウム (TriCalcium Phosphate, TCP) が再生医療において利用されている。この TCP の利点は生分解時間がハイドロキシアパタイトと比較して短く、上述の生分解高分子と同様に骨組織の再生と共に分解吸収される。

4. 生化学刺激

現在、ほとんどの細胞は生体外で培養可能である。MEM (Minimum Essential Medium) と呼ばれる培養液の発展のおかげである。MEM には、ミネラル、ビタミン、アミノ酸などが適切に配合されている。MEM には種類があり、培養する細胞に応じて適切な MEM を選択する必要がある。MEM だけで細胞を一定期間培養することは可能であるが、細胞分裂することではなく、次第にアクティビティを失い、死滅する。それを避けるために、培養液には血清 (一般的にはウシ胎児血清) を一定割合混合する。血清にはさまざまな生化学的因子が含まれているが、その代表的なものが細胞増殖因子である。細胞増殖因子には、線維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、神経細胞増殖因子など各種の細胞増殖因子が知られている。これらの細胞増殖因子は特定の細胞の細胞膜に存在するレセプタと結合する。レセプタに結合することによって生ずるシグナルは、核に伝達され遺伝子発現をコントロールし、最終的には細胞増殖および細胞分化をコントロールすることが知られている。血清にはこれらの細胞増殖因子が多種含まれており、細胞培養を行うために必要不可欠である。一方、血清にウシなどヒトとは異種の動物の血清を用いることは、とくに再生医療において問題となる。具体的には、血清に含まれる可能性のあるウイルスの問題が大きい。したがって、再生医療においては、移植の対象となる患者自身の血清、いわゆる自己血清を用いるケースが存在する。そもそも血清はロットによって、細胞増殖や細胞分化に及ぼす効果が異なる。これは含有する増殖因子の種類や量がロットによってばらついているからである。したがって、再生医療においては無血清培地、すなわち血清を使うことなく、各種細胞増殖因子を定量的に配合した培地の開発が進められている。

5. 物理刺激

細胞を分化させる方法としては、生化学因子を添加する方法が一般的であるが、この方法は分化させる細胞の細胞数と比例した量の生化学因子を必要とする。そして、分化にかかわるコストも分化させる細胞数に比例する。たとえば再生軟骨の創製のためには、 $10^8 \sim 10^9$ 個ほどの細胞数を必要とするとされている。これは通常、実験室レベルで用いる細胞数の 100~1 000 倍であり、コストも 100~1 000 倍かかる。このコストは、再生医療の実現化のための障壁の一つとなっている。

生体内ではさまざまな物理的刺激が生理的な条件下で組織・細胞に負荷されている。たとえば大腿骨には歩行など

により圧縮・引張応力が負荷されており、骨組織の微小変形や骨組織内の微小な体液移動による流動電位が生じている。また血管系には血流によるずり応力が血管内皮細胞に、また拍動によるストレッチが血管平滑筋細胞、血管内皮細胞に負荷されている。したがって、このような生理的な刺激をシミュレーションして、生体組織を生体外で三次元再構築しようとする研究が始まっており、たとえば培養液の灌流を制御することにより再生血管にずり応力やストレッチを与えながら再構築する研究が進められている。また、軟骨組織の再構築のために軟骨組織に生理的に負荷されている静水圧を負荷する研究が行われている。

物理刺激の受容機構はまだ十分には解明されていないが、細胞が物理刺激を受容することにより、細胞内にシグナルが伝達されることが知られている。この細胞内のシグナル伝達に関わる分子は生化学刺激と同じ分子を利用している。つまり物理刺激はその受容メカニズムは生化学刺激とは異なるが、いったん細胞内にシグナルが伝達されると、そのシグナルは生化学刺激のそれと同等の経路を活性化することが知られている。生化学刺激はレセプタに結合する因子であるリガンドと、そのカウンターパートであるレセプタとは一対一対応し、レセプタ直下にある特定のシグナル伝達経路を活性化するという点で特異性が高いが、物理刺激においては同時に複数のシグナル伝達経路を活性化することが知られており、物理刺激は特定の生化学因子の代替にはなり得ないと考えられている。一方、複数のシグナルを同時に細胞に入力することができることから、特定の細胞に対する特定の分化コントロールにおいて有効であるとも考えられている。したがって、物理刺激は生化学刺激を置き換えるものではなく、お互い補完し合うことで、細胞の分化コントロールを最適化することが可能と考えられる。

物理刺激を用いて細胞の分化コントロールを行う培養システムを構築するコストは、生化学刺激に比較し高いが、いったんシステムを構築した後は、分化させたい細胞数とコストとは 1 次的な比例関係ではなく、コストの上昇は僅かである。現時点においては、物理刺激による細胞分化は、その確実性、特異性などにおいて生化学刺激に大きく劣っているが、再生医療の実現化をコスト面で考慮した場合、物理刺激による分化コントロールは、今後無視することができない方法の一つとして位置づけられると考えられる。

6. おわりに

本稿においては、再生医療における基礎的な、また一般的な事項について 4 要素という観点から解説を加えた。再生医療における工学研究は、現時点での最先端の技術をいかに細胞分化および組織再生に適用していくかにフォーカスを当てている。本企画のテーマである「再生医療に挑戦する機械工学」について、本稿をバックグラウンドとして、各事例紹介をお読みいただけたら幸甚である。

(原稿受付 2013 年 10 月 17 日)