再生医工学の現状と展望

播元政美, 岡野光夫

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

Tissue Engineering (組織工学あるいは再生医工学) は、「組織の再生, 維持, 修復のために細胞を用いた組織・臓器・器官の代替品の開発を行なう, 工学・生物学・医学の学際的な研究分野」⁽¹⁾と定義される。この新しく提案された学問領域は, 細胞を用いた先端医療テクノロジーとして世界的に注目され, 大きく発展しようとしている。

臓器移植は, 失われた臓器機能を回復させる上で, 我が国においても着実な成果を上げている。しかし, 移植医療を待ち望むレシピエントに対し, ドナー数は世界的に, 圧倒的に不足しているのが現状である。ドナー数確保のためには社会的な取り組みがきわめて重要であり, 最近ではドナー対象となれない高齢者や感染症をもつ患者などが, 同じ条件をもつレシピエントへの移植を前提に, ドナー (マージナルドナー) となれるような制度も検討されつつある。一方で, こうした移植医療の進歩とともに, より広く高度な再生医療を実現するための新たな先端医療技術の確立は, 緊急かつ必須であると認識され, アメリカをはじめヨーロッパ各国で再生医工学が国家プロジェクトとして推進されている。

人工血管, 人工心臓, 人工腎臓, 眼内レンズ, 人工関節に代表される人工臓器は, 救命治療の効果を着実に上げてきた。しかし 21 世紀を迎えた今, 患者の QOL (quality of life) の向上を考えた人工臓器システムの高度な機能化, 特に長期的な埋め込み型人工臓器の実現を目指す研究に大きな期待が寄せられている。生体に触れ

でも異物として認識されない材料の追究とともに、人工系の中に細胞を組み込んだ、より高機能化したハイブリッド人工臓器を可能にする再生医療のテクノロジーは、人工系では達成しえなかった高度な複合機能を実現する。このことは、多数の患者への臓器移植を達成することと同時に、快適な生活を目指す21世紀の医療の中で、革命的な治療法を与えると期待されている。実際に、ハーバード大学医学部の Vacanti 教授は、細胞とその足場となる生分解性高分子、およびサイトカインの三者を統合させた組織再生システムを提案した。すなわち、ヒトの耳の形に生分解性高分子の乳酸-グリコール酸共重合体を形成し、これに軟骨細胞を導入してヌードマウスの背中にヒトの耳を作ったのであるが、これは最近の大きな話題となり、再生医療の新しい世界的な流れを作った。

人工臓器、細胞工学、遺伝子工学、発生・再生工学がただ単に集合するのではなく、概念とテクノロジーの真の統合を目指した、組織工学、再生医工学の挑戦が始まったのである。

再生医工学のためのテクノロジー(1)

1. 細胞の source としての幹細胞

成体の臓器で実質機能を担っている細胞は、臓器再生のために必要な細胞を補えるほどの増殖能はみせない。旺盛な細胞増殖能を保持し、いずれはそれぞれの臓器で細胞機能を発揮するような可能性をもつ未分化な細胞(幹細胞)の発見は、臓器再生の有力な細胞供給源として注目される。同時に、幹細胞を増殖因子、分化調節因子などの液性因子と混合し患部へ注入する細胞移植も、新しい治療法として発展が期待される。幹細胞はその由来から、発生以前の段階にある受精卵と生体の2つに大別できる。

受精卵から個体発生する過程で、臓器は形成されていく。あらゆる臓器への分化が可能な全能性に近い意味をもつ多能性幹細胞(初期胚由来:ES細胞,始原生殖細胞由来:EG細胞)は、発生過程に再生と同じメカニズムを含むと期待される細胞である⁽²⁾。発生学的、生化学的に、どんな条件のもとでどの臓器が分化発生するか、たとえばアクチビン濃度依存的に血球や筋肉、腸の形成が誘導されるといった情報が明らかになるにつれ、動物レベルからヒトへの応用が検討されてきた。ヒトES細胞株も樹立され、現在、分化過程のメカニズムの解明に向けた基礎研究で大いに役立っている。しかし、実際の臨床応用のために越えていかなければならないハードルが

表1 ■ 幹細胞関連ベンチャー

企業名	所在地	専門
Astrom Biosciences	Ann Arbor, MI	造血幹細胞
Geron Corp.	Menlo Park, CA	胚性、胎性幹細胞
Layton BioScience	Atherton, CA	胎性神経幹細胞
NeuralSTEM	Bethesda, MD	胎性神経幹細胞
Biopharmaceuticals		
Neuronix Inc.	Malvern, PA	神経幹細胞
Nexell Therapeutics Inc.	Irvine, CA	造血幹細胞
Osiris Therapeutics	Baltimore, MD	間葉系幹細胞
ReNeuron	London	神経幹細胞
Stem Cell Sciences	Melbourne, Australia	胚性幹細胞
StemCells Inc.	Sunnyvale, CA	成体神経幹細胞

いくつか存在するのも事実である。ヒト(第三者)の受精卵由来であるため、免疫拒絶反応をなくす投薬と併用するという選択以上に、細胞そのものに免疫拒絶反応を起こさせない遺伝子操作が必要であろう。一般化し、治療に利用していくためには、再生医療のテクノロジーの確立と同時に、倫理的問題などを熟慮することは避けて通れない。また、本来は流産など自然淘汰されて発生しないはずの因子をもつような個体発生を経ていない細胞でも、人為的に発生させること、未分化の細胞が分化させた細胞に少しでも混入した場合には、奇形腫を形成することなどもわかっている⁽³⁾。

一方、個体発生後の成長した我々の身体の中にも、再生を担う様々な幹細胞が存在している。骨髄には血管幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、脳には神経幹細胞、肝臓や脾臓には肝細胞、脾外分泌細胞、脾内分泌細胞な

「再生医工学の基礎(Tissue Engineering)」

連載予定

- 再生医工学の現状と展望
播元政美, 岡野光夫(東京女子医大)
- 再生医工学の臨床応用
 - 培養人工皮膚の作製法と移植による
口腔再生技術 畠 賢一郎(名大医)
 - 角膜幹細胞による角膜再生技術
榛村重人, 坪田一男(東京歯大)
- 骨格を再建する再生医工学
 - 指骨格の再生: 骨・軟骨・腱の再生技術
磯貝典孝(近畿大医)
 - 骨の三次元構造 大串 始((独)産総研)
- 循環器の再生医工学
 - 成長する培養人工血管の再生技術
新岡俊治(東京女子医大)
 - 細胞シート工学による心筋組織再生技術
清水達也(東京女子医大)
- 再生医工学の次世代テクノロジー
大和雅之(東京女子医大)

どへ分化する幹細胞の存在が認められている。患者由来の幹細胞を採取し増殖させ、人工臓器とともに同じ患者へ適用可能となれば、免疫拒絶反応という壁を回避できる。あらゆる臓器においていち早く幹細胞が発見され、広く利用可能な手法やシステムを作成することは、再生医療の実現へ向けたスピードを増すものと期待される。表1に、すでにアメリカを中心として始動している幹細胞関連のベンチャー企業を示した。

2. 細胞の足場としての材料

生体内に埋入あるいは生体成分と接触させて利用するバイオマテリアルに、金属材料、セラミックス材料、高分子材料（ポリ乳酸、セグメント化ポリウレタンウレア）、人工腎臓へのセルロースアセテート、ポリアクリロニトリル、人工肺へのポリプロピレン製中空糸、人工血管へのダクロン（ポリエチレンテレフタレート）やゴアテックス（延伸ポリテトラフルオロエチレン）などがある^(4,5)。人工材料を生体内に埋め込んだり、血液と接触させた際、生体は材料を異物と認識し、血栓形成や炎症、貪食などの生体反応を生じることが知られている。

長期的な材料の劣化や生体反応を回避するテクノロジーとして、生体内で分解・溶解する生分解性高分子の利用が知られている。乳酸-グリコール酸共重合体は、生体内で乳酸とグリコール酸に徐々に分解し、長期的には吸収されるバイオマテリアルである。これをスポンジ状に必要な形にし、この中に細胞を効果的に導入することができる。細胞をその材料上に播種、培養、増殖させると、細胞はコラーゲンやプロテオグリカンなど細胞外マトリックスを合成して基質上に沈着させる。この細胞を含むコンストラクトを生体に埋入すると、高分子部分は徐々に分解・吸収され、同時に組み込まれた細胞や産生された細胞外マトリックスなどに置換されていく。ヒトの人工耳は、耳の形状に型取られたシリコンでこれまで代替されていたが、耳型のポリ乳酸、ポリグリコール酸に培養軟骨細胞を播種し培養することで、生体適合性を獲得した培養人工耳の作製が可能になった⁽⁶⁾。また、これまで使用されてきたダクロン繊維など人工材料製の人工血管は、体の成長とともに大きさが変化しない。このため、小児の人工血管手術では成長とともに擬似的な狭窄状態となりやすく、数年おきに人工血管を交換する手術を余儀なくされていた。しかし、チューブ状に成形されたスポンジ状の生分解性高分子内に、患者由来の血管細胞を培養したものを用いた治療が臨床応用された^(7,8)。幼少時期に適用された人工血管が、体の成長とともにリモデリングされることが期待される点は、生分解性高

分子の有用性を大きく示すものといえる。

3. 細胞外環境を提供する細胞外マトリックス

生体内で細胞は、コラーゲンやラミニン、プロテオグリカンといった細胞外マトリックスを産生し細胞外に沈着させ、またそれらによって構造的にも機能的にも支えられている。これら生体由来物質の細胞外マトリックスの利用は、より生体内に近い細胞機能を発揮する組織を構築する上で重要であると考えられる。しかし、人工臓器に適用されるほどの精製、加工、量産といった技術は開発されていないことや、最近ではウシやブタという伝染病感染の恐れなどから、積極的な利用が制限されつつある。食品や化粧品ならば馴染みのあるコラーゲンでさえ、人工臓器への応用は少ない。

細胞外マトリックスは、基礎研究によって、細胞の生理機能、病理的变化の制御を担い、繊維症や硬化症などとそのマトリックス環境が相関していることが示唆されている。人工臓器として組み込まれた細胞がより生理的な分化機能を発揮するためには、マトリックス環境を操作することも含まれる。細胞外マトリックスは、人工材料に接着させにくい細胞への接着剤としての利用に加え、細胞の増殖や分化機能に大きな影響を与えることから、ヒトへの応用や再生医療との接点を探る基礎研究の発展とともに開拓されるであろう。未知の可能性を秘めた存在でもある。これまでに報告されている生分解性高分子と単離された細胞との組合せで実現した再生組織は、いずれも比較的単純な構造をもち、機能においても界面との低摩擦化や尿の貯留など、物理的な代替が主たるものであった。21世紀に達成させることが必要な心臓や肝臓、腎臓といった複雑な構造および高度な代謝機能をもつ臓器・器官には、これまでのアプローチとは異なり、細胞機能や三次元の組織構築と高度な機能保持を実現しなければならない。細胞間に構造的な結合と同時に、サイトカインを介したコミュニケーションをもデザインした、細胞からの組織・臓器・器官の再生法が強く望まれる。

再生医工学のためのテクノロジー(2)

1. 酵素によらない細胞脱着

種々の細胞種を増殖させた後に、構造と機能を損なうことなく、培養皿から剥がし出す技術はきわめて重要である。現在、培養した細胞の剥離は、ディスパーゼやトリプシンなどの酵素の利用によって行われている。しかし、酵素は材料と細胞間のタンパク質を分解すると同時に、細胞

図 1 ■ 温度応答性高分子を固定化した培養皿表面の性質とそれを利用した細胞の接着と脱着

表 2 ■ 培養細胞の回収方法と特徴

	回収時	細胞間接着や受容体類の破壊	細胞外マトリックスの分解
トリプシン処理		+++	+++
ディスペラーゼ処理		+	+
低温処理		ほとんどなし	ほとんどなし

トリプシンやディスペラーゼなど酵素処理による細胞の回収では、細胞間接着や受容体の破壊、細胞外マトリックスなどの分解が生じてしまう。高分子固定化培養皿を用い、酵素を用いない低温処理による細胞の回収は、細胞間接着を維持し、細胞外マトリックスをほぼ intact な状態で細胞層に沈着させたまま回収可能である。

表面のレセプターやリガンドなど重要なタンパク質の破壊を生起させてしまう。筆者らは、培養皿上に温度応答性高分子を固定化することにより、培養細胞を酵素処理せずに脱着させ、その構造と機能を保持する新しい技術の開発に取り組んでいる。

温度にตอบสนองして水との親和性を可逆的に変化させる高分子（ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)、以下 PIPAAm) を、通常のポリスチレン培養皿上に共有結合的に固定化した温度応答性培養皿を作製した。この PIPAAm 表面は、下限臨界溶液温度（約 32°C）以上で通常の培養皿表面と同じく疎水性を示し、下限臨界溶液温度以下で PIPAAm 鎖の水和により親水性を示す（図 1）。細胞は 37°C においてこの表面上で、通常の培養皿上と同様に、接着し増殖後コンフルエント（集密状態）となる。32°C 以下に下げると、培養皿表面の親水化に伴い細胞が脱着し、コンフルエントの状態の細胞がそのシート状の構造を保持したまま回収可能となる⁹⁾。細胞シートの接着表面側に存在する接着タンパク質を主とした細胞

外マトリックスも細胞シートとともに回収され、細胞が脱着した後の PIPAAm 表面にタンパク質成分は残らない。トリプシンやディスペラーゼなどの酵素処理では大きく破壊されてしまう細胞間接着や、細胞膜上に発現する受容体など膜タンパク質や細胞外マトリックスを分解することなく回収できる（表 2）。酵素処理による細胞機能への影響を回避できる点は、臨床応用上、生体への適合性や安全性のより高いものを提供できると期待される。

2. 細胞シート積層による三次元組織構築

肝臓や腎臓は、異種の細胞層が巧みに重なる層状構造によって臓器が構築され、高度な機能を発現している。PIPAAm 培養皿から回収された細胞層（細胞シート）を、別の表面上や別の細胞層上に積層可能とする技術を確認するという、高度な機能を再生する新しいテクノロジーを開発する立場から、筆者らは再生医工学研究を推進している。

PIPAAm 培養皿から回収した細胞シートは、別の培

図 2 ■ 細胞シートの積層による三次元組織構築

温度応答性培養皿から脱着回収した内皮細胞シートを、肝細胞上に積層することにより三次元的層状組織を実現した。内皮細胞シートと積層共培養系において肝細胞は、分化型形態およびアルブミン産生機能を培養長期にわたって発現維持した。A：位相像，B：アルブミン抗体染色像。ともに培養 23 日目。

養皿表面へ、その構造と大きさを変化させることなく移動、再接着させることが可能であり、ほとんどすべての細胞が生きたまま、移動前と同様の機能を発揮する。これまでに、培養血管内皮細胞シート^(9,10)、培養肝細胞シート⁽¹¹⁾、培養腎上皮細胞シート⁽¹²⁾、培養心筋細胞シート⁽¹³⁾などが回収可能なことを明らかにしてきた。幹細胞をはじめ、培養でき、二次元表面への接着が可能な細胞であれば、細胞種を問わず普遍的に用いることが可能であると考えられる。

別の細胞層上への積層は、心筋や血管、肝臓などの組織を模倣して検討されている。心筋細胞は、培養皿上

でも収縮機能を発揮する特徴をもっている。心筋細胞シートとして回収した 1 枚のシートは、一つ一つの細胞の収縮が全体として同調、同期している⁽¹³⁾。興味深いことに、この心筋細胞シートを二重に積層した場合、2 枚の細胞シートの全体が一つの拍動周期として同期することがわかった。すなわち、上下の細胞シートが電気的にも繋がった機能的組織であることが示唆されている。また、あらかじめ通常の培養皿上に培養した肝細胞の上に、血管内皮細胞シートを移動、積層させることについても検討されている⁽¹⁴⁾。この二層構造は長期間にわたって維持され、層状構造を保持する共培養系の実現に成功した。肝細胞の分化機能を維持した長期培養はきわめて困難であり、通常は 1 週間ほどで機能低下し生存細胞数も減少してしまう。また内皮細胞との共培養もきわめて困難である。これに対し図 2 のように、肝細胞上に培養内皮細胞シートを積層した共培養系では、肝細胞は分化型形態およびアルブミン産生機能を長期に発現維持することが観察された。細胞シートの利用は、シートに含まれる細胞、細胞外マトリックス、液性因子などをきわめて非侵襲的な 1 つの構造単位として操作し、生体に近い層状組織構築を可能とする点、その中で細胞が高度な機能を発現維持可能である点で有効であると考えられる。

展望

細胞シートを構造単位として三次元の層状組織を形成させるテクノロジーは、細胞シートを多層に重層化することによって、新しい臓器・器官の再生法と何層まで積層できるかを明らかにするチャレンジから始められている。生体外で再構築した層状組織の機能発現は、二次元

図 3 ■ パターン化高分子固定表面を用いた共培養

温度応答性高分子 (PIPAAm) を直径 1 mm 穴パターン状に固定化した培養皿を作製した。37°Cにおいて培養皿全面に接着した肝細胞は、低温処理にて PIPAAm を導入した部分の細胞のみが脱着する。脱着した細胞を回収した後、再度 37°Cに戻し内皮細胞を播種すると、肝細胞の接着していた領域に内皮細胞を接着させることができ、パターン状の共培養が実現した。A：ポリスチレン培養皿表面，B：PIPAAm 固定化表面。

平面で行なってきた細胞培養技術の常識では考えられない現象が発見されると同時に、これまで検討しえなかった組織を用いた基礎的解析への期待も大きい。臓器に存在する細胞種を増やし重ねることで再建組織を構築する手法の追究は、臓器における高度な機能発現に必要な構造単位や、生理機能や病理メカニズムの解明に、新しい観点から大きく貢献すると考えられる。細胞シートは、高分子を表面に電子線重合で導入する際のマスクパターンさえあれば、形と大きさを自由に制御したものを容易に作製、操作できる^(10,14)。1 mm 以下単位のパターン構造をもたせた表面に、2 種の細胞を共培養する技術も開発されており(図 3)、同時にこれらをシートとして回収することも検討している。

腎糸球体などにみられるような特異的機能を発現しているナノ～マイクロメートルのオーダーで高度に組織化されている構造、血管を組み込み血液を循環させる構造などの実現には、細胞培養技術に加えて表面の微細加工技術や血管新生因子の遺伝子導入など、多面的な技術統合が必要である。このような集学的アプローチによって、たとえば肝臓では、肝実質細胞をマイクロメートルレベルの毛細胆管や類洞に接続し、複雑な分岐構造をもつネットワークの再建に挑戦しなければならない。胆道や静脈に接続するためには、生体の再生メカニズムの利用と同時に、LSI などに利用される光リソグラフィ技術により作製された分岐構造を、マイクロメートル、ミリメートル、センチメートルオーダーへ応用するなど、新しい取り組みがきわめて重要である。肝細胞と繊維芽細胞との共培養を検討する研究で、光リソグラフィ技術を用いてマイクロメートルオーダーでの培養基質上の細胞接着ドメインを制御した例がある⁽¹⁵⁾。これら微細加工技術および量産技術の発展が、生体組織中に観察される高度な臓器機能を発現させた再建組織構築の、まったく新しい推進力となるであろう。

再生医工学の発展は、臓器再生のための新しい治療方法の確立という目的に向かっている。そして、医学、生物学や工学といった枠組みを越えた新しい領域を誕生させ、これまでにない観点をもつ独創的な研究者を輩出する可能性を秘めている。また、すでに米国では 400 を越えるバイオベンチャー企業が創出されており、我が国においても新産業の開拓につながる可能性を含んでいることは、社会的にも関心を集めるものである。新しいチャレンジへの柔軟な発想と、人類にとって緊急性の高い課題へ取り組む勇気は、再生医工学の進歩を着実なものとしていこう。

文献

- 1) R. Langer & J.P. Vacanti : *Science*, **260**, 920 (1993).
- 2) 浅島 誠, 岩田博夫, 上田 実, 中辻憲夫編:「再生医学と生命科学」蛋白質 核酸 酵素 2000 年 9 月号増刊, 共立出版.
- 3) 福田恵一:「臓器再生医学」組織細胞工学 2001 年 3 月増大号, ニュー・サイエンス社.
- 4) 東京女子医科大学医用工学研究施設編:“21 世紀を切り開く先端医療 バイオメディカル・エンジニアリング入門”, ニュー・トンプレス社, 1999.
- 5) 岡野光夫: *Clinical Engineering*, p.574, 1999.
- 6) Y. Cao, J.P. Vacanti, K.T. Paige, J. Upton & C.A. Vacanti : *Plast Reconstr. Surg.*, **100**, 297 (1997).
- 7) D. Shum-Tim, U. Stock, J. Hrkach, T. Shinoka, J. Lien, M.A. Moses, A. Stamp, G. Taylor, A.M. Moran, W. Landis, R. Langer, J.P. Vacanti & J.E. Mayer Jr. : *Ann. Thorac. Surg.*, **68**, 2298 (1999).
- 8) T. Shin'oka, Y. Imai, M. Watanabe, G. Matsumura, Y. Kosaka, T. Konuma, N. Hibino, S. Toyama, M. Yamakawa, Y. Ikada & S. Morita : *J. Artif. Organs*, **3**, 102 (2000).
- 9) A. Kushida, M. Yamato, C. Konno, A. Kikuchi, Y. Sakurai & T. Okano : *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 355 (1999).
- 10) M. Hirose, O.H. Kwon, M. Yamato, A. Kikuchi & T. Okano : *Biomacromolecules*, **1**, 377 (2000).
- 11) M. Yamato, M. Okumura, F. Karikusa, A. Kikuchi, Y. Sakurai & T. Okano : *Trans. Soc. Biomater.*, **XXI**, 82 (1998).
- 12) A. Kushida, M. Yamato, C. Konno, A. Kikuchi, Y. Sakurai & T. Okano : *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 216 (2000).
- 13) T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi & T. Okano : *Tissue Eng.*, **7**, 141 (2001).
- 14) M. Hirose, M. Yamato, O.H. Kwon, M. Harimoto, A. Kushida, T. Shimizu, A. Kikuchi & T. Okano : *Yonsei Med. J.*, **41**, 803 (2000).
- 15) S.N. Bhatia, M.L. Yarmush & M. Toner : *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 189 (1997).