

【総説】再生医工学的アプローチによるバイオ人工臓器の開発

三 好 浩 稔 (人間総合科学研究科 先端応用医学専攻 / 基礎医学系)

最近では、再生医療という言葉が広く一般に用いられるようになってきた。ここでは、再生医療と再生医工学はどのように関係しているのか、また、再生医工学が実際にどのように治療に応用され、どんな研究が行われているのか、について述べることにする。

再生医工学における細胞培養

再生医療という概念が広く認識されるようになった原因のひとつに、再生医工学分野の進歩が挙げられる。再生医工学 (tissue engineering) とは、「細胞を用いることによって、重度に損傷した生体組織や臓器を再生あるいは再構築する技術」と考えることができ、90年代前半に Langer と Vacanti により提唱された生命科学と工学の境界領域にある学問である。再生医工学には3つの重要な因子があり、それは、1) 組織を形成するための細胞、2) 細胞の分化・増殖を制御するシグナル分子、そして 3) 細胞が増殖するための担体 (scaffold)、である。ここで、担体とはコラーゲンなどの生体由来材料や生体吸収性ポリマーで造られたスポンジ状、あるいは綿状のものであり、この担体によって再生すべき組織の形状を決定したり、細胞が増殖するための空間を提供している。

通常、細胞の培養はディッシュ上で1層に伸展した状態で行われ、このような培養方法を単層培養という(図 1-a)。それに対して、担体を用いることで細胞を立体的に培養する方法は三次元培養と呼ばれ(図 1-b)、工学の分野では古くから微生物の培養などに用いられてきた方法である。動物細胞の三次元培養法の多くは微生物の培養方法を応用したものであり、培養に適した様々な形状や素材の担体とともに、いくつかの型式の培養装置が考案されてきた。従って、担体を用いた細胞の三次元培養を前提とした再生医工学では、生物工学、高分子工学、あるいは化学工学などの工学系分野の寄与が極めて大きい。

再生医工学と再生医療

一方、再生医工学の領域が広がるにつれて、この領域への発生学の関与も急速に増大してき

た。発生学分野の進歩はめざましく、幹細胞などの未分化な細胞の分化・増殖に及ぼすシグナル分子(種々の増殖因子やサイトカインなど)の影響が次々と明らかにされてきた。このような基礎的な成果を臨床応用へと展開するためには、再生医工学的な手法を用いることが有望な方法のひとつであると考えられたためであろう。工学の分野では、細胞を増殖させることの必要性は従来から認識されていたが、発生学の関与によって、細胞を分化・成熟させることにより生体組織を構築することの可能性や重要性が明確にされたことで、再生医工学の新たな展望が拓けた。

発生生物学の進歩により、最近では、体性幹細胞などの未分化な細胞を体内に移植することで治療が試みられるようになってきた。例えば、骨髄細胞、臍帯血や末梢血を用いた造血幹細胞移植はすでに確立された治療法として広範に行われており、最近では骨髄中の細胞を移植することで比較的細い血管を再生することも臨床的に行われている。このような細胞移植には工学的な要素はあまり含まれないため、厳密な意味での再生医工学とは言い難い。一方で、人工皮膚に代表されるように、担体内部に培養した細胞を担体ごと移植するような治療は典型的な再生医工学である。再生医工学と再生医療を明確に区別することは困難な面があるが、以上のことをまとめると、再生医工学と細胞移植をあわせたものが再生医療だといえるだろう。

再生医工学的な培養皮膚の開発

再生医工学が人工臓器の開発に応用されている例のうち、もっとも成果が得られているのが人工皮膚である。皮膚は角化細胞からなる表皮と、その下の線維芽細胞が産生したコラーゲンを多く含む真皮から構成されている。そのため、人工皮膚といっても、1) コラーゲンのみを移植することにより生体内で真皮組織を再生させる人工真皮、2) コラーゲンや生体吸収性の担体内部に線維芽細胞を含む培養真皮、そして 3) 担体内部に線維芽細胞と角化細胞を含む培養皮膚、などいくつかの種類があり、このうち再生医工学的な手法を用いたものは 2) と 3) である。

米国では、ヒト線維芽細胞を用いた2種類の同種培養真皮が製品化されている。ひとつは、担体に生体吸収性高分子(グリコール酸と乳酸の共重合体)を用いるものであり(Dermagraft[®])、もうひとつはシリコン膜が貼付されたナイロンメッシュを担体とするものである(TransCyte[®])。さらに、線維芽細胞を含んだコラーゲンゲル上に角化細胞を播種した同種培養皮膚(Apligraf[®])も製品化され、難治性皮膚潰瘍の治療に用いられている。一方、日本でも患者自身の角化細胞を薄いシート状にした自家培養表皮がまもなく製品化される見込みであることから、再生医工学の概念が提唱される以前から研究が行われていたこれらの培養皮膚がようやく製品化の段階に到達したといえる。

関節軟骨の再生

整形外科領域では、自己修復能に乏しい関節軟骨を修復することが大きな課題のひとつである。この問題に対して、患者自身の関節の非荷重部(軟骨がなくてもあまり影響がない部分)から軟骨片を採取し、ここから軟骨細胞を単離・培養したのち、自家骨膜でパッチした軟骨欠損部に増殖させた軟骨細胞を注入するという治療法が開発された。これら一連の操作のうち、軟骨片から酵素処理で軟骨細胞を単離し、単層培養系において細胞を増殖させるという工程は米国においてすでに商業化されており、日本でも医療機関との臨床研究が試みられた。しかし、これらの治療では単層培養によって脱分化した軟骨細胞が移植後に十分な機能を発現するか不明な点があり、浮遊させた細胞のみを移植するために細胞が欠損部で均一に分布しないという欠点もある。そこで、軟骨細胞を培養する際にコラーゲンゲルを担体として三次元培養し、ゲルごと移植する方法も臨床応用されている。

一方、上記の方法では軟骨細胞の採取と移植という二段階手術になり、大量の細胞を採取することも難しい、といった欠点がある。そこで、軟骨細胞のかわりに、採取が比較的容易で大量に得られる自家骨髄間葉系幹細胞を用いる方法も検討されている。われわれの研究室でも、三次元培養系において間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させたものを担体ごと移植する実験を行った。その結果、移植片では軟骨細胞の特徴であるII型コラーゲンとグリコサミノグリカンを産生していたことから、間葉系幹細胞は軟骨細胞に分化していることがわかった。間葉系幹細胞は軟骨だけでなく骨、心筋、骨格筋や神経などに分化でき、しかも

盛んに増殖することから、今後は様々な臓器の再生に利用されるであろう。

バイオ人工肝臓の開発

再生医工学的な手法が応用された人工臓器のうち、上記の皮膚と軟骨以外で比較の実用化に近いものとして、角膜、心筋や骨が挙げられる。角膜や心筋は、細胞をシート状に培養したものを移植することによって治療が試みられている。また、骨は多孔性ハイドロキシアパタイトセラミックスやリン酸三カルシウムなどの担体に、間葉系幹細胞などを播種することで作製される。

このような臨床応用された、あるいは臨床応用が近い人工臓器の構造上の特徴を考えると、培養上皮、角膜、心筋のようにシート状のもの、あるいは三次元構造を持つものでも軟骨のように小規模なものが多く、ほとんどの組織は単一の細胞から構成されている。言い換えれば、立体的で容量が大きく、しかも数種類の細胞から成るような臓器、例えば肝臓のような臓器を人工的に造ることは、再生医工学的手法を持ってしてもいまだに非常に困難である。

われわれは、再生医工学的手法を用いてバイオ人工肝臓の開発を行っている。バイオ人工肝臓は、劇症肝炎などの重篤な肝不全患者に対して、肝移植までの、あるいは患者自身の肝臓が回復するまでの期間、一時的に患者の肝機能を代行する装置である。バイオ人工肝臓は大量の肝細胞を装置内で培養する必要があることから、われわれは多孔質のポリビニルホルマール樹脂を担体とする充填層型リアクターを開発した(図2)。この充填層型バイオ人工肝臓内部には100~200gのブタの成熟肝細胞が培養されており、この細胞によって肝不全モデル動物の血漿中の毒物が解毒されるとともに、生体に必要な物質が供給される。

現在、欧米で臨床応用されているバイオ人工肝臓は、この装置と同様にブタなどの成熟肝細胞が細胞源として用いられている。ところが、成熟した肝実質細胞はほとんど増殖しないため、細胞を高密度に培養する、あるいは細胞の機能を長期間にわたり維持することが極めて困難であった。さらに、肝臓は肝実質細胞、内皮細胞や星細胞などの数種類の細胞が規則正しく配列されており、このような構造を人工的に構築することはほぼ不可能である。そこで、未分化な肝細胞を多く含み、増殖能に富んだ胎児期の肝臓細胞に着目し、この胎児肝細胞を三次元培養系において増殖させるとともに、大人の肝細胞へと成熟させることを

試みた。シグナル分子として oncostatin M (OSM) などのサイトカインを用い、OSM を添加する時期を調節することによって、細胞は担体上で立体的な構造を形成するとともに、成熟肝細胞の指標であるアルブミンの分泌量が劇的に増加することがわかった(図3)。従って、胎児肝細胞、あるいはさらに未分化な細胞を用いてバイオ人工肝臓を開発できる可能性が示された。

おわりに

ここでは、再生医工学の考え方や応用について、いくつかの例を示しながら主に工学的な視点から解説した。再生医工学という概念が提唱されてから十年ほどしか経過していないにもかかわらず、現在では、ここで述べた以外にも体内のほぼ全ての組織や臓器を対象とした再生医療が研究・応用されるに至った。今後は、体中の全ての臓器を形成することができる胚性幹細胞(ES 細胞)や、特定の臓器を形成できる体性幹細胞を細胞源として、色々な臓器を再構築するための研究が飛躍的に増加すると考えられる。胚性幹細胞の利用は、技術面、コスト面や倫理面で解決すべき課題も多く、その臨床応用には数十年の期間が必要であると推定されている。その一方で、間葉系幹細胞のような体性幹細胞は入手が比較的容易であり、現実的かつ汎用性の高い細胞源と考えられることから、再生医療研究や臨床応用の鍵となるであろう。

参考文献

1. Langer R, Vacanti JC. Tissue engineering. Science 260; 920-926, 1993.
2. 筏義人. 再生医工学. 化学同人, 2001.
3. 立石哲也, 田中順三. 図解 再生医療工学. 工業調査会, 2004.

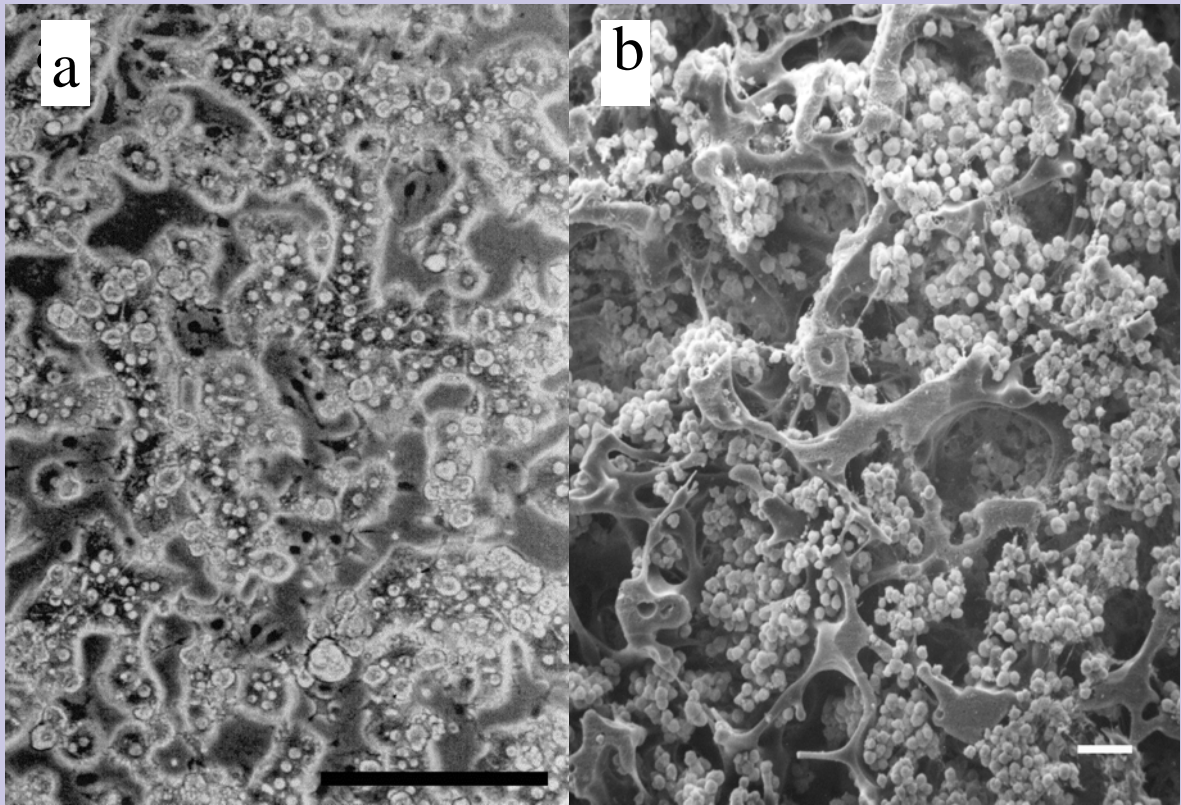


図1. 単層培養と三次元培養された成熟肝細胞
a) 単層培養、b) 三次元培養

単層培養では細胞はディッシュ上で伸展して培養されているのに対して、三次元培養においては細胞は担体の骨格上で球状を保ったまま培養されていることがわかる。バーは 50 μm 。



図 2 . 充填層型バイオ人工肝臓

写真の中央にあるのが充填層型バイオ人工肝臓の本体である。リアクター内部には一辺 3 mm の立方体状に細切されたポリビニルホルマール樹脂多孔質体が充填されており、この多孔質体内部にブタ成熟肝細胞が固定化されている。

(<http://www.md.tsukuba.ac.jp/public/chs/sentan/saisei.htm>)

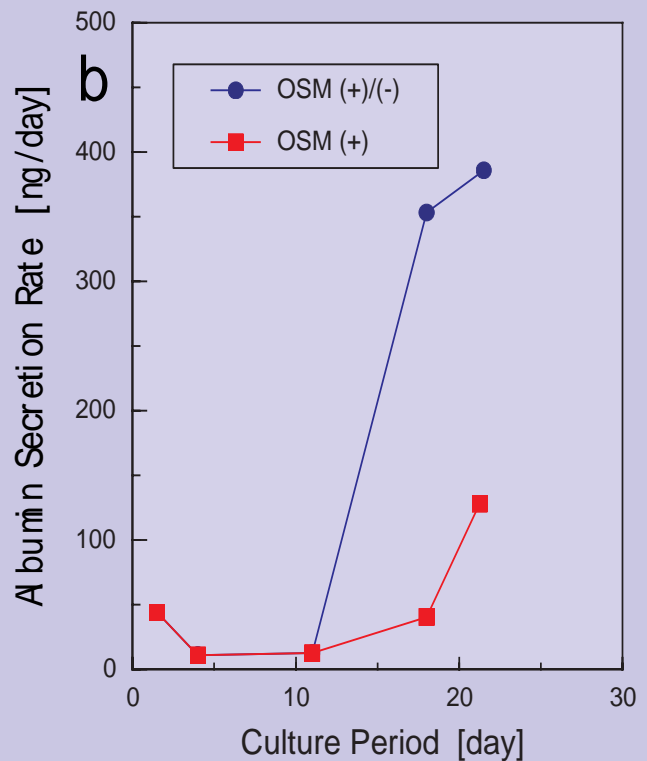
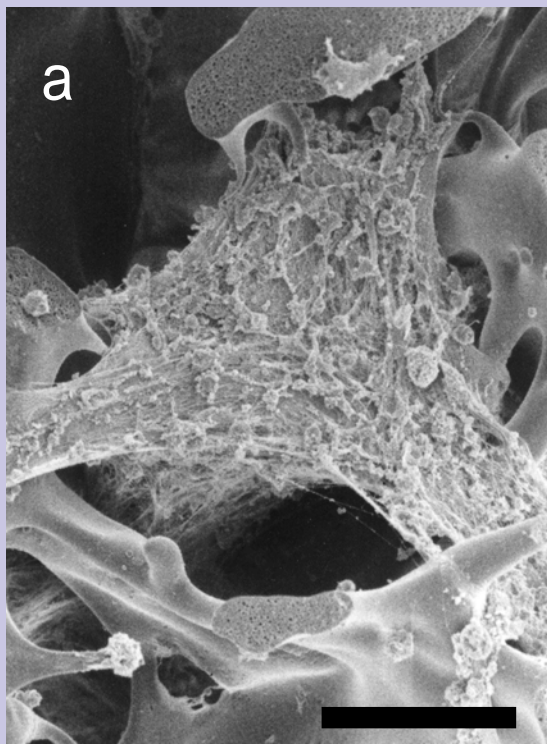


図3. 三次元培養された胎児肝臓細胞とアルブミン分泌能の経時変化

- a) 三次元培養胎児肝臓細胞 (バーは 50 μm)、
b) アルブミン分泌能の経時変化

(a) 細胞は担体の細孔をまたぐように大きな凝集塊 (写真中央) を形成し、多量の細胞外マトリックスを分泌していた。(b) 培地に OSM を添加することで、培養1週間以降、徐々に細胞のアルブミン分泌能は増加した ()。一方、培養初期には OSM 添加培地を用いて培養し、2週間以降で OSM の添加を中止すると ()、アルブミン分泌能は急激に上昇することがわかった。
(Ehashi T *et al*, *J Cell Physiol*, in press より改変)