

## 幹細胞再生医療のための機能性足場とバイオリアクタの開発

Development of functional cell scaffolds and bioreactors for regenerative medicine based on stem cells

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授



### 研究の概要

本研究の目的は、再生医療の実現に必要な幹細胞の増殖、分化を促すための医工学的な技術、方法論を研究開発することである。種々な生体吸収性高分子からなる3次元不織布やスポンジを作製、それに細胞接着因子を組み込むことで細胞親和性の優れた機能性足場を創製した。足場の力学的性質や表面性質の修飾、細胞親和性の向上によって、骨髄あるいは脂肪組織由来の組織幹細胞の増殖が高まり、分化の制御も可能となった。これにバイオリアクタ技術を組み合わせることで、上述の細胞への効果はより強調されることがわかった。一連の研究によって、幹細胞の *in vitro* での増殖と分化を制御するための生体組織工学技術の基礎的知見が集積された。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学、再生医工学材料

### 1. 研究開始当初の背景

再建外科治療と臓器移植の2大先端医療に限界が見えてきている状況の中で、細胞の増殖分化能力を利用した再生誘導により、自己の生体組織、臓器の再生修復を促進する試みがある。この再生医療の実現には、再生現象に関する幹細胞の研究が必要である。しかし、幹細胞研究だけでは再生医療はとて実現できない。そこで、細胞を増殖分化させ生体組織の再生誘導を促すための医工学的な技術、方法論（生体組織工学）が必要である。例えば、幹細胞の培養基材、バイオリアクタ、生体組織の再生誘導を促す足場材料、あるいは細胞増殖因子の利用法などに関する技術が必要である。

組織幹細胞の中で、造血系幹細胞に対して、他の組織幹細胞では、分化研究は行われているが、その分離と増殖技術の研究は遅れており、国内外を通じて未熟である。

### 2. 研究の目的

足場とは、細胞を立体的に配置させ、その増殖を促進させるための細胞親和性に優れた3次元材料である。しかし、多孔質体や不織布などの3次元構造体だけでは不十分であり、細胞を付着、増殖させるための技術を積極的に足場に加えることが必要と

なる。本研究の目的は、幹細胞の接着、増殖能の優れた機能性足場を創製することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、ゼラチン、コラーゲン、ポリグリコール酸などの生体吸収性高分子材料から様々なスポンジや不織布を作製した。次に、これらのスポンジや不織布に、抗体、細胞増殖因子、あるいは細胞接着因子を固定化し、積極的に細胞の接着、増殖を促す生物機能を付与した。加えて、幹細胞の増殖促進のための細胞培養バイオリアクタを設計した。得られた組織幹細胞の分化能力について *in vitro* および *in vivo* 動物実験で評価した。

### 4. 研究の主な成果

本研究を通じて、組織幹細胞の増殖、分化が、その足場材料と培養条件に大きく影響することを、改めて確認する新しい研究結果が得られた。

(1) 幹細胞の増殖、分化に与える足場の物理化学的性状の影響：繊維径の異なるポリエチレンテレフタレート (PET) 繊維からなる不織布中でのラット骨髄より採取した未分化間葉系幹細胞 (MSC) の増殖と分化を調べた。12  $\mu\text{m}$  以上の繊維径をもつ PET 不織布への細胞の初期接着と増殖が、他の繊維径の PET 不織布と比較して、よいことがわかった。静置培養と振とう培養に比べて、旋回培養法が

MSC の増殖効率が優れていた。静置培養では、不織布表面付近でのみ細胞は増殖していたが、旋回培養では、不織布の表面近傍、内部ともに良好な細胞増殖が見られた。MSC の骨分化は PET 不織布の繊維径にほとんど影響をうけなかった。増殖の悪かった静置培養法では、MSC の骨分化がよくなり、逆に、MSC の増殖の良好な旋回培養法においては、細胞の骨分化は抑制された。ヒト脂肪組織から単離、採取した脂肪組織由来幹細胞 (PLA) の増殖、分化特性および足場に対する効果は、MSC と同様であった。

(2)幹細胞の増殖、分化に与える足場表面の化学的・生物学的性質の影響：金蒸着 PET フィルム表面へ片末端が CH<sub>3</sub>, OH, COOH、および NH<sub>2</sub> 基のアルカンチオールを反応させ、異なる化学官能基を種々の比率で表面導入した。フィブロネクチン (FN)、コラーゲン (Coll)、ゼラチン、ラミニンなどの細胞接着タンパク質を PET フィルムへコーティングした。FN、Coll、ゼラチンコーティング PET フィルム上では、他のフィルムに比べて、MSC、PLA の初期接着、増殖が高まった。ある接触角領域において細胞の増殖が高まることもわかった。細胞の増殖がよいほど骨分化は高まったが、脂肪分化は、表面が FN、Coll、ゼラチンがコーティングされている場合にのみ、高まった。また、ラミニン、FN コーティング PET フィルム表面において、PLA の神経分化程度が高まった。ある塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) コーティング濃度領域で MSC と PLA の骨分化が高まったが、骨分化程度は培養液中の bFGF 濃度の低下とともに上昇した。

(3)幹細胞の増殖、分化に与える足場の力学的性質の影響：コラーゲンスポンジの力学補強のために、ポリグリコール酸 (PGA) 繊維を組み込んだ PGA スポンジは、通常のスポンジとは違って、培養中での収縮は見られず、MSC の増殖と骨分化も高くなった。

#### 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

生体組織工学の key 技術は、足場材料とその加工技術、バイオリアクタなどであり、国内外を通じて、日本が学術的、企業的にリードしている。本研究成果により、足場技術に関する新しいかつ系統的な研究成果が得られ、日本の優位性が高まった。iPS 細胞や ES 細胞が利用できる現在、本研究で得られた技術は、組織幹細胞以外の細胞にも応用が可能であり、その学術的、社会的価値とインパクトは大きい。患者の病気を治す以外の目的として、幹細胞を利用した薬の代謝、毒性評価などの創薬、加えて、

幹細胞の生物医学研究の目的にも本研究成果は応用可能であり、再生医療およびその関連分野への波及効果はきわめて大きい。繊維補強コラーゲンスポンジは、すでに研究用試薬として市販され、また、幹細胞移植治療に対する足場の併用の有効性が国内外で実証されている。将来、足場と組み合わせた細胞移植治療は現実のものとなっていくことは疑いなく、今後、世界において本研究成果の位置づけが極めて重要となっていくと信じる。

#### 6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., Umezawa, A. : A custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res.* 70, 415-418, 2004

Yasuda, K., Inoue, S., **Tabata, Y.** : Influence of culture method on the proliferation and osteogenic differentiation of human adipo-stromal cells in non-woven fabrics. *Tissue Eng.* 10(9-10), 1587-1596, 2004

Inoue, S., Hori, Y., Hirano, Y., Inamoto, T., **Tabata, Y.** : Effect of culture substrate and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of human adipo stromal cells. *J. Biomater. Sci., Polym. Eds.* 16(1), 57-77, 2005

Takamoto, T., Hiraoka, Y., and **Tabata, Y.** : Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in collagen sponge reinforced with different poly(ethylene terephthalate) fibers. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 18(7), 865-881, 2007

Inoue S, Iida Y, Otani Y, Hirano Y, **Tabata Y.** : Adhesion behavior of human adipo-stromal cells on self-assembled monolayers with different surface densities or gradients RGD peptide. *Journal of Biomaterials Science*, 20, 495-510(2009)

Inoue S, Imamura M, **Tabata Y.** : Adipogenic differentiation of adipo-stromal cells incubated with basic fibroblast growth factor in the solution and coated form. *Journal of Biomaterials Science*, 20, 483-494(2009)

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te02/index-j.php3>