

# 組織構築のためのバイオマテリアル

## Biomaterials for Tissue Engineering

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96I00201)

### プロジェクトリーダー

岡野 光夫 東京女子医科大学医用工学研究施設・教授

### コアメンバー

片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科・教授

青柳 隆夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所・助教授

菊池 明彦 東京女子医科大学先端生命医科学研究所・講師



## 1. 研究目的

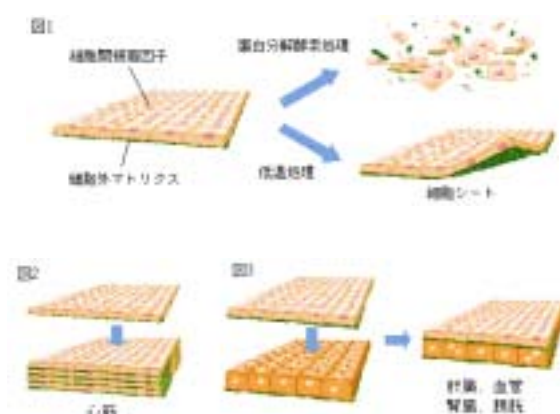
組織工学 (Tissue Engineering) は医学と工学の融合した学際的な研究領域であるが、その開発研究には種々のバイオマテリアルが使用されている。特に Langer および Vacanti が提唱した生分解性高分子から作製した3次元のバイオマテリアルを組織再生のための細胞の足場として使用するという手法が広く応用されており、組織工学の分野を発展させた。これに該当プロジェクトでは、温度のみで細胞の接着・脱着を制御できる新規のバイオマテリアルを開発し細胞をシート状にその構造と機能を損なうことなく回収する方法を確立することを第1の目的とした。第2に細胞シートを一つのユニットとして重層化する『細胞シート工学 (Cell Sheet Engineering)』という新しいコンセプトで3次元組織を組み立て、Tissue Engineering をさらに推進することを目指すとした。

## 2. 研究成果概要

### 温度応答性培養皿と細胞シート工学

温度応答性培養皿は、温度応答性高分子であるポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) を電子線を用い市販の培養皿に表面グラフトしたものである。培養温度 (37℃) では疎水性の表面となるため、細胞が接着するのに対し、低温 (32℃ 以下) では高度に親水化するため細胞が培養皿表面からその構造と機能を損なうことなく自発的に脱着する。さらに、細胞を密な状態に培養した場合は細胞と細胞外マトリクス (ECM) からなる細胞シートを脱着、回収できる。この技術はトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いた既存の細胞回収法では不可能であったことを可能としている。すなわち、細胞や ECM、細胞間の接着が切断されることなく維持されるため細胞をシート状に回収できる (図1)。さらに細胞シートと培養皿を接着させていたフィブロネクチンなどの細胞接着因子は細胞シートの下面に維持されるため他の表面に移動時や細胞シート積層時に『糊』として働き再接着を促進する。我々はこの培養皿を用い、肝細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、腎上皮細胞、皮膚表皮細胞、心筋細胞、角膜上皮細胞など種々の細胞シートの回収・移動に成功した。さらに

この細胞シート単層による皮膚・角膜組織の再生、同じ細胞シートの重層化による心筋組織再構築 (図2)、異なる細胞シートの積層化による肝臓・血管・腎臓・膀胱組織の再構築 (図3) の研究を行い細胞シート工学による組織再構築の基盤技術を確立した。



### 心筋組織の再構築

重症心不全に対する最終的な治療法である心臓移植はドナー不足という問題に直面しており、新たな治療法の開発が切望されている。近年、幹細胞生物学の発展により、ヒトに移植可能な培養心筋細胞系が確立される可能性が示唆されており、虚血性心疾患や拡張型心筋症に対する心筋細胞移植療法が世界的な研究のターゲットとなっている。さらに海外においては組織工学的手法を用い体外で培養心筋細胞から心筋組織を構築する手法の開発も始まっている。具体的には、コラーゲンゲル、ポリ乳酸あるいはゼラチンからなる3次元の支持体を用いた心筋細胞の3次元培養が行われている。これに対し、我々は細胞シート工学による3次元心筋組織の構築を試みた。温度応答性培養皿を使用することにより収縮弛緩機能を維持したシート状の心筋細胞を回収することが可能となった。この心筋細胞シートを重層化したところ2枚のシート間に電気的にも形態的にも結合ができ、組織全体が同期して拍動することが示された。4枚まで積層化したところ肉眼レベルで拍動する心筋組織が構築された。さらにヌード (免疫拒絶を示さない) ラット背部皮下組織への移植実験

を行ったところ3週間の時点でホストの心電図とは異なるグラフト由来の電位が確認された。心筋グラフトの肉眼レベルでの拍動が確認されるとともに組織切片上、多数の新生血管を認めた。少なくとも3ヶ月まで移植心筋グラフトが拍動を維持したまま生存することが確認されている。このように温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学により自律拍動する心筋グラフトの作製が可能となったが、現在さらなる積層化ならびに不全心筋モデルへの移植実験を行っている。

### 3. 結論

本プロジェクトにより組織構築のための新規バイオマテリアルを開発するとともに新たな組織工学的手法を確立した。細胞シート工学は、既存の技術では不可能であったことを可能としており、Tissue Engineeringにおけるブレークスルーになると考える。皮膚・角膜に関しては臨床応用可能な段階にあり、前記したような心筋組織をはじめ、肝臓、膀胱、血管など3次元組織構築のための基盤技術は確立しつつあり、幹細胞生物学の発展により細胞ソースの問題がクリアされれば近い将来臨床応用も可能になるものと考えている。我々の研究施設では細胞シート工学をベースに新たなバイオマテリアル・技術の開発も行っており、生体に移植可能な組織構築へ向けて包括的な研究を続けている。

### 主な発表論文

- 1) A Kikuchi, M Okuhara, F Karikusa, Y Sakurai, T Okano. "Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces." J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 9, 1331-1348, (1998).
- 2) M Yamato, M Okuhara, F Karikusa, A Kikuchi, Y Sakurai, T Okano. "Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperature-responsive polymer." J. Biomed. Mater. Res., 44, 44-52, (1999).
- 3) A Kushida, M Yamato, A Kikuchi, T Okano. "Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: The noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces." J. Biomed. Mater. Res., 54(1), 37-46, (2001).
- 4) M Yamato, M Utsumi, A Kushida, C Konno, A Kikuchi, T Okano. "Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without dispass by reducing temperature." Tissue Eng. 7, 473-480, (2001).
- 5) T Shimizu, M Yamato, Y Isoi, T Akutsu, T Setomaru, K Abe, A Kikuchi, M Umezu, T Okano. "Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture

surfaces." Circ. Res. 90, e40-e48. (2002).

- 6) M Harimoto, M Yamato, M Hirose, C Takahashi, Y Isoi, A Kikuchi, T Okano. "Novel approach for achieving double layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes" J Biomed Mater Res, in press.