



Title	生細胞でつくる人工血管：再生医療に革命をもたらす新素材
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	化学. 2008, 63(6), p. 32-36
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50287
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

解説

生細胞でつくる人工血管

——再生医療に革命をもたらす新素材

まつさき みちや あかし みつる
松崎典弥・明石 満
大阪大学大学院工学研究科

生体外での細胞組織化技術への期待

再生医療は、生体外で生体に似た形態と機能をもつ組織(生体類似組織)をつくり、欠損・疾患部位へ移植して再生修復させることを目的としており、移植医療・再建外科医療に代わる「第三の医療」として注目されている¹⁾。生体組織は、①細胞、②細胞の足場となるタンパク質・糖タンパク質で構成される細胞外マトリックス(ECM)、の二つにより高度に組織化され、機能を発現している。そのため、再生医療では、①幹細胞などの細胞源、②細胞接着・増殖のための足場材料、③細胞増殖・分化誘導に重要な細胞増殖因子、の三つの要因を組み合わせ活用することが重要である。

2007年末、京都大学の山中教授らにより、ヒト皮膚細胞から人工多能性幹細胞(iPS細胞)をつくりだす革新的な技術が報告された²⁾。iPS細胞の樹立により胚性幹細胞(ES細胞)が抱えていた倫理的問題が解決され、再生医療の実現化が現実味を帯びてきた。そこで求められているのが、生体外での細胞組織化技術の開発である。

では、なぜ細胞の組織化が重要なのか? それは、細胞だけでは再生医療の実現が困難だからである。たとえば細胞のみを用いた再生医療技術として細胞移植があげられるが、移

植細胞の流出や壊死により移植効率が極端に低いため、十分な治療効果を得ることは難しい³⁾。しかし、もしiPS細胞から分化誘導された複数種類の細胞を用いて生体類似組織を構築できれば、再生医療の本来の目的である組織構築と移植による治療が実現される。また、生体類似組織は薬剤や化粧品の効果判定にも有効であるため、再生医療という枠にとどまらず、創薬や化粧品分野への応用が期待される。

交互積層法を応用した細胞積層化技術

これまで、ポリ乳酸やコラーゲンなどの生分解性高分子を足場材料とすることで、細胞の三次元培養と移植による再生医療技術が研究されてきた。しかし、この手法では複数種類の細胞とECMを組織化することは困難である。また近年、細胞シート法⁴⁾や磁性リポソームを用いた手法⁵⁾による細胞の重層化が報告されているが、操作が煩雑で、かつ標的組織に適したECMの種類や厚さを制御することは難しい。

そもそも通常の細胞培養では、細胞は細胞の表面に接着できない。これは、細胞表面どうしの静電的な反発がおもな原因である。では、どのように設計すれば細胞を組織化(積層化)できるのか? 筆者らは、細胞の基材表面への接着機構に着目した。細胞は、材料表面へ直接接着することではなく、材料表面へ吸着した培地中の(もしくは細胞が産出した)ECM成分と、インテグリン分子(細胞表面タンパク質の一つ)を介して接着することが知られている。つまり、ECM層が存在すれば細胞は接着できるわけである。もし、接着している細胞膜表面にECM薄膜を形成できれば、次の細胞の接着足場が提供されることとなり、細胞の表面に細胞が接着できるはずである。そこで、標的組織に重要なECM薄膜を、標的組織を形

松崎典弥(まつさき みちや)

<所属>大阪大学助教(大学院工学研究科)、<出身大学>鹿児島大学大学院理学研究科(2003年修了)、<研究テーマ>機能性高分子・バイオマテリアル、<趣味>映画鑑賞

明石 満(あかし みつる)

<所属>大阪大学教授(大学院工学研究科)、<出身大学>大阪大学大学院工学研究科(1978年修了)、<研究テーマ>高分子化学、バイオマテリアル、<趣味>テニス

成する複数種類の細胞表面へ形成し、細胞の接着と ECM 薄膜の形成を繰り返すことで、望みの細胞と適した ECM で形成された積層化組織が構築できると考えた。つまり、細胞の表面に ECM の“のりづけ”をつくることで、細胞を1層ずつ積み上げていく方法である。

細胞表面へ ECM 薄膜を形成する手法として、ナノメートルオーダーで高分子薄膜を調製できる交互積層法 (LbL 法) を用いた⁶⁾。LbL 法は、相互作用をもつ2種類の高分子溶液に基板を交互に浸漬することで、分子1層レベルで薄膜を調

製できる手法である。ECM 薄膜成分として、接着タンパク質として知られているフィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) を用いた。FN は柔軟な多機能性糖タンパク質で、細胞の接着だけでなく、移動や分化誘導にも重要な役割を果たしており⁷⁾、細胞表面の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンやコラーゲン (ゼラチン)、ヘパリンとの相互作用ドメインをもつ⁸⁾。そこで、さまざまな細胞表面へ FN と G の薄膜 (FN-G 薄膜) をつくり、薄膜形成と細胞接着を繰り返すことで細胞の積層化を試みた (図1)。とくに、血管内皮細胞と平滑筋細胞の階層構造である血管壁に似た組織の構築に取り組んだ。

細胞表面への薄膜の形成

細胞表面への FN-G 薄膜形成を評価するため、細胞膜モデルであるリン脂質2分子膜上への FN-G 薄膜の形成を、水晶発振子マイクロバランス (QCM) を用いて検討した。Krishna らの報告⁹⁾に従い、DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine) と DPPA (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate) の4:1の2分子膜を QCM 基板上に作成し、FN と G 溶液に交互に浸漬した結果、振動数の逐次的な減少が観察され、FN-G 薄膜の形成が確認された (図2)。形成された膜の厚さは1, 7, 23 ステップ (浸漬回数) で2.3, 6.2, 21.1nm であ

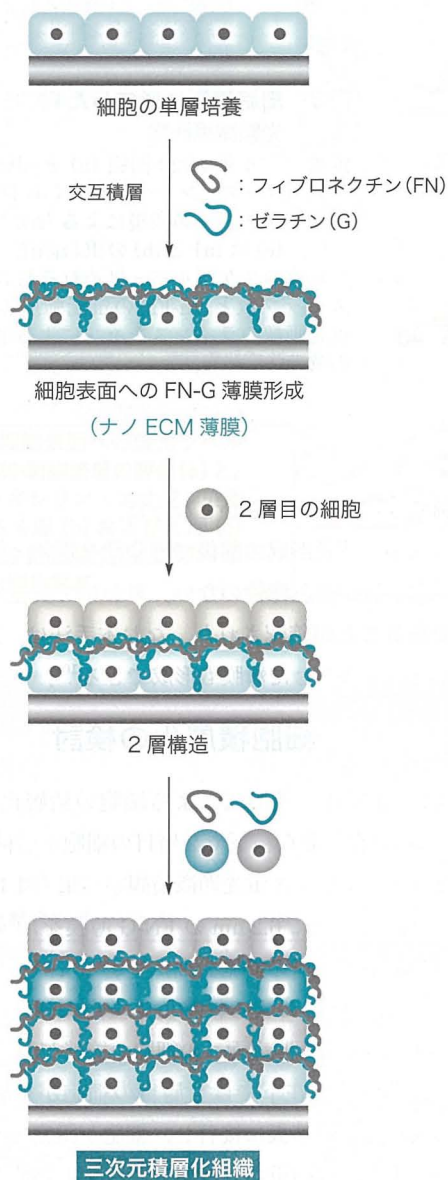


図1 細胞表面への FN-G 薄膜形成と細胞積層化

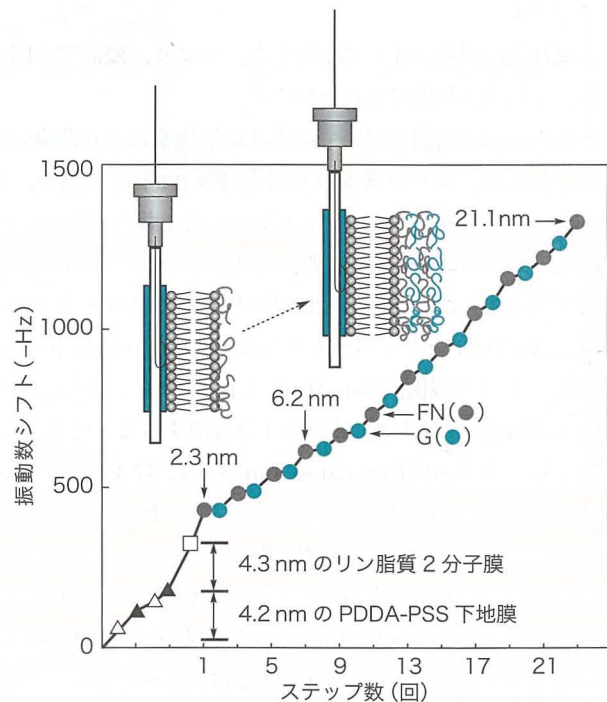


図2 リン脂質2分子膜上への FN-G 薄膜形成による QCM の振動数変化

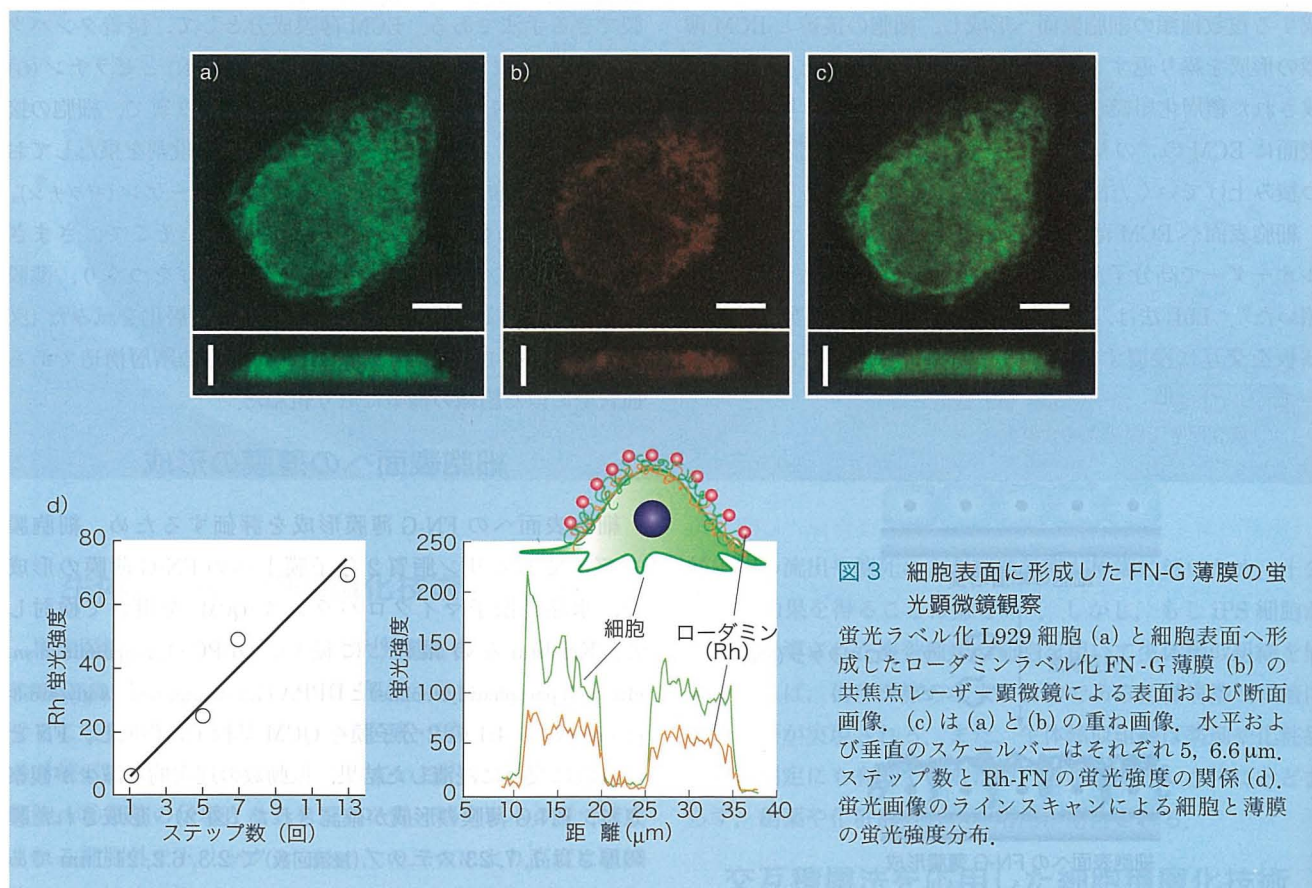


図3 細胞表面に形成したFN-G薄膜の蛍光顕微鏡観察

蛍光ラベル化L929細胞(a)と細胞表面へ形成したローダミンラベル化FN-G薄膜(b)の共焦点レーザー顕微鏡による表面および断面画像。(c)は(a)と(b)の重ね画像。水平および垂直のスケールバーはそれぞれ5, 6.6 μm。ステップ数とRh-FNの蛍光強度の関係(d)。蛍光画像のラインスキャンによる細胞と薄膜の蛍光強度分布。

り、交互浸漬回数に従って増加した。つまり、浸漬する回数によって膜厚を制御できたといえる。

また、実際の細胞を用いて蛍光顕微鏡観察により薄膜の形成を評価した。ローダミンラベル化FN(Rh-FN)を用い、マウスL929線維芽細胞表面への薄膜形成を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)により観察した。セルトラッカーグリーンで蛍光ラベル化したマウスL929線維芽細胞をカバーガラスへ播種し、6時間インキュベートすることで接着・伸展させた。Rh-FN/トリス緩衝液(50mM, pH=7.4)に37℃, 15分浸漬したあと、50mMのトリス緩衝液に1分浸漬することで洗浄し、続いてG/トリス緩衝液(50mM, pH=7.4)に37℃, 15分浸漬させたあとに洗浄した。このステップを7回繰り返したあとに蛍光顕微鏡観察を行った(図3)。その結果、細胞由来の緑の蛍光と薄膜由来の赤の蛍光像が完全に一致し、重ね合わせることで黄色になったことから、細胞表面へのFN-G薄膜の形成が示唆された。また、FNとG溶液への浸漬回数(ステップ数)の増加に伴いRh-FNの蛍光強度が増加したことから、実際の細胞表面においても浸漬回数によって形成される膜厚

が制御できることが明らかとなった。

そのほか、薄膜形成の前後で細胞数や形状・機能に影響はなく、本手法が細胞毒性のない、きわめて安全な薄膜形成の手法であることが確認された。なお本手法は、FN-G以外にもFNをベースとした薄膜も形成できる¹⁰⁾。

細胞積層化の検討

実際に、FN-G薄膜形成による細胞の積層化を検討した。FN-G薄膜存在・非存在下で2層目の細胞を播種し、6時間培養したあとの位相差・蛍光顕微鏡観察結果(図4a)を見ると、1層目の細胞表面に6.2nmのFN-G薄膜を形成した場合、2層目の細胞が1層目の細胞表面へ接着している様子が確認できる。また、DAPIによる核染色の蛍光顕微鏡観察により核の重なり、つまり細胞表面への細胞の接着が明らかとなった。

一方、薄膜非存在下では2層目の細胞が1層目の細胞の隙間に入り込んで基板に接着し、細胞が緻密にパッキングしていた。また、核の重なりも観察されず、細胞が積層化されないことが確認された。1層目の細胞表面に2.3nmのFNの

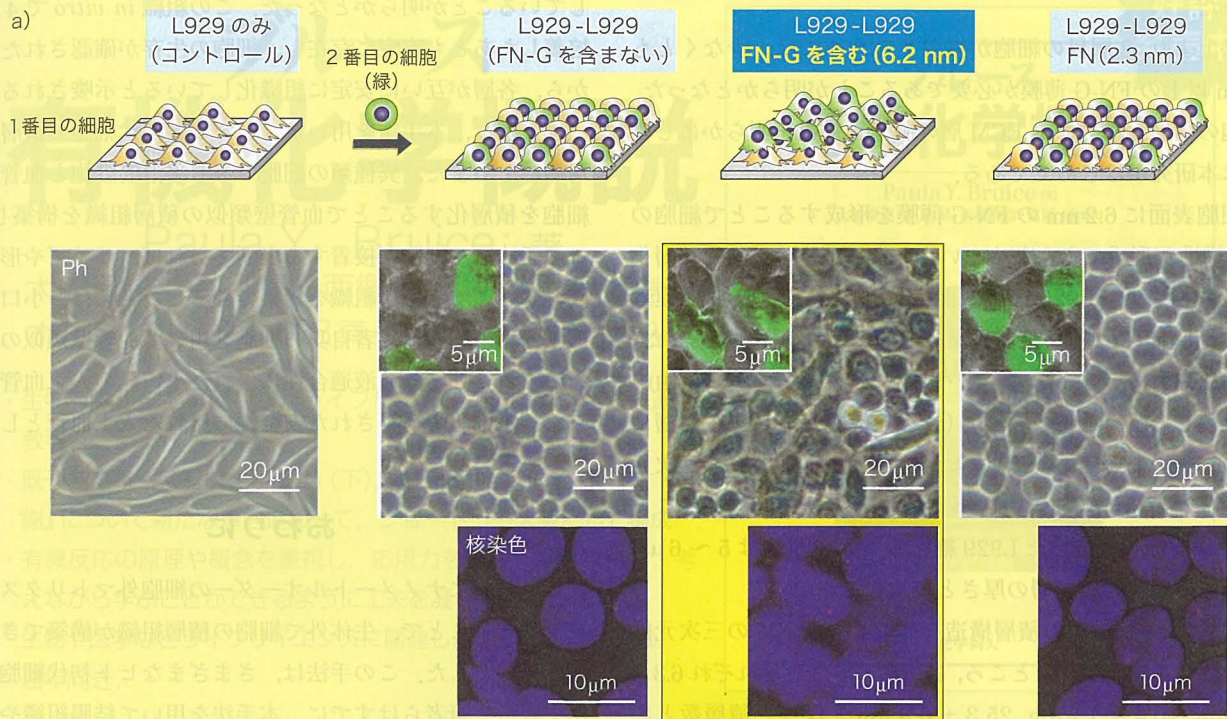


図4 細胞の積層化と積層構造の確認

FN-G 薄膜存在・非存在下でのL929細胞表面への蛍光ラベル化L929細胞接着の評価(a)と、ヘマトキシリン・エオジン染色による4層(b)および1層(c)のL929細胞積層組織のパラフィン切片写真。

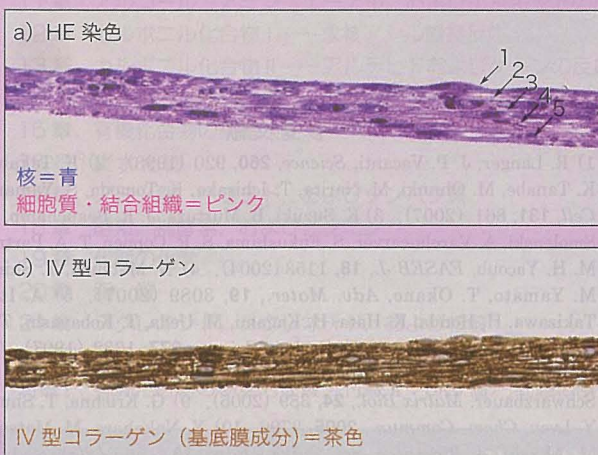
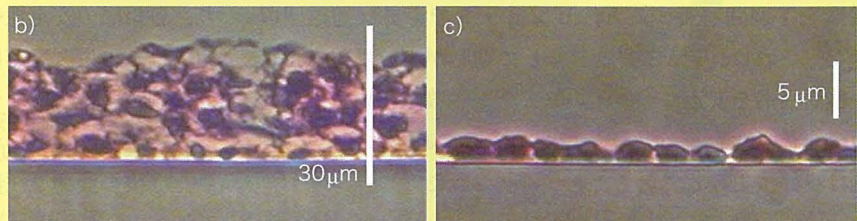


図5 血管壁類似組織の作製

4層のヒト血管平滑筋細胞層と1層のヒト血管内皮細胞による血管壁類似構造のHE染色(a), 第Ⅷ因子の免疫染色(b), IV型コラーゲンの免疫染色写真(c)。

みの薄膜を形成した場合、同様に細胞の積層化は観察されなかった。

以上より、2層目の細胞が接着するためには、少なくとも6 nm以上のFN-G薄膜が必要であることが明らかとなった。細胞の積層化に対するECM層の膜厚の効果を明らかにしたのは本研究がはじめてである。

細胞表面に6.2 nmのFN-G薄膜を形成することで細胞の2層構造が形成できたため、いよいよ、細胞の三次元積層化に取り組んだ。L929細胞表面への6.2 nmのFN-G薄膜形成と細胞播種・接着を4回繰り返し、4層構造を構築した。図4(b)は、パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色した写真である。図4(c)の1層構造と比べて4層になっている様子が示され、また、CLSM観察による三次元イメージ解析の結果、その厚さはおよそ25 μm であることがわかった。接着したL929細胞の単層の厚さは5~6 μm なので、理論的な4層の厚さと一致していた。

さらに1, 3, 4層の積層構造を作成し、CLSMの三次元解析より厚さを測定したところ、各層数の厚さはそれぞれ $6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $16.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$, $25.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ となり、積層数と厚さが理論的な厚さとよく一致することも確認された。この4層構造を1週間培養すると、ピンセットで容易に剥離回収できた。これは、FN-G薄膜を介して細胞が十分に組織化され、積層構造を安定に保っていることを示唆している。積層化組織全体の生存細胞数は1週間培養したあとも変化せず、細胞は良好に生存していることが確認された¹¹⁾。

血管壁類似組織の構築

これまでの結果から、本手法で細胞を積層化できることが明らかとなった。そこで、生体に見られる代表的な階層組織である血管壁の作製に着手した。生体外で血管の構造が構築できれば、再生医療だけでなく、創薬や薬剤試験における組織モデルとしても有効である。先述したのと同様の手法でヒト臍帯動脈血管平滑筋細胞(UASMC)の4層構造を作製し、6.2 nmのFN-G薄膜をUASMC層の最表面に形成したあと、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を接着させた。

この4層のUASMCと1層のHUVECからなる5層組織を3日間培養したあとのパラフィン切片写真を図5に示す。それを見ると、HE染色写真から5層構造が確認され、HUVECに特異的な第Ⅷ因子の免疫染色写真より、最外層にHUVECが存在している様子が明らかとなった。さらに、IV型コラーゲンの免疫染色の結果、すべての層においてIV

型コラーゲンの産生が確認され、各層の細胞が基底膜を構築していることが明らかとなった。この組織*in vitro*で4週間培養したあとも安定に存在し、細胞の生存が確認されたことから、各層が互いに安定に組織化していると示唆される。

以上より、本手法を用いることでヒト初代細胞の積層化が可能にし、また、異種類の細胞である平滑筋細胞と血管内皮細胞を積層化することで血管壁類似の積層組織を構築した。この手法は、細胞が接着する表面であれば、サイズや形状を問わずどこでも積層組織を構築できる。たとえば、小口径の人工血管の内壁に患者自身の細胞を用いて血管壁類似の構造をつくることで、血液適合性に優れた小口径の人工血管が得られ、生細胞で構築された安全性に優れた人工血管として期待される。

おわりに

細胞表面にナノメートルオーダーの細胞外マトリクス薄膜を形成することで、生体外で細胞の積層組織が構築できることを見いだした。この手法は、さまざまなヒト初代細胞に応用できる。筆者らはすでに、本手法を用いて結腸組織や肝組織、骨格筋組織、心筋などのモデル組織の作製に成功しており、各組織の安定性や機能評価に取り組んでいる。これらの組織は、再生医療だけでなく、発がん実験や薬剤・化粧品の効果判定用の組織モデルとして、診断への応用も有効である。

本手法は、新しいナノバイオテクノロジーとして期待される。今後の展開を注目していただきたい。

参考文献

- 1) R. Langer, J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
- 2) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 3) K. Suzuki, B. Murtuza, J. R. Beauchamp, R. T. Smolenski, A. Varela-carver, S. Fukushima, S. R. Coppen, T. A. Partridge, M. H. Yacoub, *FASEB J.*, **18**, 1153 (2004).
- 4) N. Matsuda, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, *Adv. Mater.*, **19**, 3089 (2007).
- 5) A. Ito, Y. Takizawa, H. Honda, K. Hata, H. Kagami, M. Ueda, T. Kobayashi, *Tissue Eng.*, **10**, 833 (2004).
- 6) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997).
- 7) R. O. Hynes, "Fibronectins," Springer, New York (1990).
- 8) Y. Mao, J. E. Schwarzbauer, *Matrix Biol.*, **24**, 389 (2005).
- 9) G. Krishna, T. Shutava, Y. Lvov, *Chem. Commun.*, **2005**, 2796.
- 10) Y. Nakahara, M. Matsusaki, M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **18**, 1565 (2007).
- 11) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, M. Akashi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007).