

「再生医療に挑戦する機械工学」 特集号発刊に際して

Preface to the Special Issue of “Mechanical Engineering Trying to Make Breakthroughs in Regenerative Medicine”



牛田 多加志

Takashi USHIDA

- ◎1985年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了(工学博士), 1992年筑波大学大学院医学系研究科助教授(連携), 1993年工業技術院産業技術融合領域研究所主任研究官, 2000年東京大学大学院工学系研究科助教授, 2003年より現職
- ◎研究・専門テーマは, バイオメカニクス, 再生医療工学
- ◎正員(フェロー), 東京大学教授 大学院医学系研究科疾患生命科学センター再生医療工学部門 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1/
E-mail: ushida@m.u-tokyo.ac.jp)

1997年, ヒトの耳の形をした組織を皮下に移植されたヌードマウスの写真がセンセーショナルに報道された。この写真は多くの誤解を生むものであったが, この写真により再生医療というものに対する関心は大きく高まったのは事実である。このマウスの実験を進めた研究室を主宰する Harvard Medical School の Vacanti と MIT の Langer らは, 1993年に“Tissue Engineering”というコンセプトを提唱した。Tissue Engineering とは, 細胞・組織と生分解性高分子等を組み合わせることにより, 三次元組織を再生しようとする工学のことである。一方, 再生医療において用いられる細胞のソースについては, 1981年, イギリスのケンブリッジ大学の Evans によるマウス ES の樹立, それから17年後の1998年, アメリカのウィスコンシン大学の Thomson によるヒト ES 細胞の樹立, そして, 2006年にマウス iPS 細胞が樹立された後, 翌年の2007年にはヒト iPS 細胞が樹立された。

このように再生医療では, 細胞ソースにおいて大きな進展があり, 基礎から臨床研究まで精力的に研究が進められている。しかしながら, これまでに臨床応用された, または臨床応用が計画されている組織は, (疑似)二次元組織か, 軟骨組織のように血管構造を含まない三次元組織である。細胞は酸素供給および栄養供給が絶たれると壊死を起こす。たとえば直径2mm程度の細胞の集合体では, その中心に存在する細胞から壊死を起こしていく。私たちの体は細胞を壊死から守るために, 密な毛細血管網を形成している。このように, ある大きさ以上の再生組織には毛細血管網が必要である。そして, 移植時には速やかに患者の血管網と繋がり, 血流が開始されなければならない。また, 生体組織は異方性であり, さまざまな細胞群により構成されている。このようなヘテロな三次元組織を再生することも求められている。

上述のポイントは, 三次元組織再生のための障壁の例であり, それら以外にも多くの高い障壁がそびえ立っている。これらの障壁を突破するためには, 工学的な技術の寄与が大きく求められている。どのように的確に細胞を分化コントロールするか, どのようにヘテロな三次元組織, それも血管網を装備した三次元組織を再構築していくか, さらに再構築した三次元組織をどのようなリアクタで組織培養するか, これらの技術的な障壁を乗り越えることにより, はじめて再生医療の実現化という目標が達成されると考えられる。世間的には, ES細胞, iPS細胞さえあれば, どのような組織, 臓器でも再生できる時代がすぐそこにあるかのように語られてはいる。これは1981年にマウス ES 細胞が樹立されたときにも同じように語られていた。しかし, それから30年余り, 三次元組織化においては決定的なブレイクスルーはまだ出現していない。つまり, 再生医療の歴史という意味では, まだ始まりの始まりである。今後の再生医療の歴史は, 工学系からの寄与, とくに材料工学と並んで機械工学によって大きく作られていくと期待される。

(原稿受付 2013年10月17日)

2014年1月号「再生医療に挑戦する機械工学」特集号企画小委員会: 主査 牛田多加志(東京大学), 幹事 坂元尚哉(川崎医療福祉大学), 委員 安達泰治(京都大学)

総説

再生医療における 3 要素 + 1 要素

Three Essential Factors Plus One in Regenerative Medicine

牛田 多加志

Takashi USHIDA



◎1985 年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了 (工学博士), 1992 年筑波大学大学院医学系研究科助教授 (連携), 1993 年工業技術院産業技術融合領域研究所主任研究官, 2000 年東京大学大学院工学系研究科助教授, 2003 年より現職

◎研究・専門テーマは, バイオメカニクス, 再生医療工学

◎正員 (フェロー), 東京大学教授
大学院医学系研究科疾患生命工学センター再生医療工学部門
(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1/
E-mail : ushida@m.u-tokyo.ac.jp)

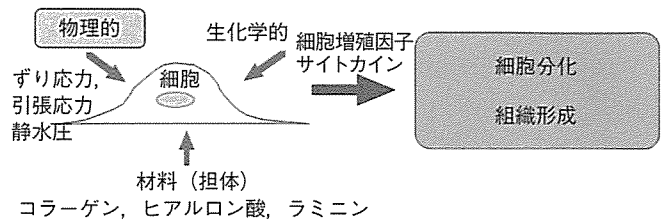


図 1 再生医療における 3 要素 + 1 要求

1. はじめに

再生医療における基盤技術は、いかに細胞を分化コントロールするか、そしていかに組織構築を行うか、これらの二つの目標を実現するものとして開発が進められている。再生医療においては 3 要素というものが存在する。一つは細胞ソースである。これは再生医療というコンセプトの根幹をなすものであり組織再生の中核をなすものである。2 番目としては三次元培養担体が挙げられる。そして 3 番目としては生化学因子が挙げられる。細胞増殖因子やサイトカインに代表される生化学因子は、細胞に対してはリガンドとしてレセプタ (受容体) に結合し細胞内にシグナルを伝達し、細胞の遺伝子発現をコントロールし、ひいては細胞の分化をコントロールする。したがって、適切なタイミングで適切な生化学因子の添加は細胞の分化コントロールおよび組織再生には必要不可欠である。一方、4 番目のファクタとして注目を集めつつあるのが、物理刺激因子である。細胞は生体中でさまざまな物理的な刺激を受けており、適正な物理刺激はなんらかの受容機構により細胞内にシグナルとして伝達され生化学因子と同様に細胞分化および組織再生をコントロールすることが知られている。この 3 要素 + 1 要素を総合的に組み合わせることにより、細胞の分化コントロールおよび組織再生が達成されると考えられている (図 1)。

2. 細胞ソース

再生医療においては、細胞は基本要素の第一に挙げられるものであり、再生医療における主役と言える。私たちの

体は約 60 兆個もの細胞で成り立っていることが知られている。そしてそれぞれの細胞がさまざまな機能を果たしながら全体として調和し、生体という巨大システムを統一した形でコントロールしている。これらの細胞の中には神経細胞のように一生、生き続ける細胞から、白血球のように月の単位で誕生、死滅する細胞まで、その寿命もさまざまである。再生医療においては、これらのさまざまな細胞をいかに適材適所に利用するかが課題である。

再生医療においては、その細胞ソースを成熟細胞に求めるのではなく、幹細胞に求める研究が活発になってきている。幹細胞とは、自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞のことであり、細胞分化のカスケード (連鎖的経路) の中で種々の幹細胞が存在する。そのカスケードのトップに存在する幹細胞が ES (Embryonic Stem) 細胞である。1981 年、イギリスのケンブリッジ大学の Evans によりマウス ES が樹立された。それから 17 年後の 1998 年、アメリカのウィスコンシン大学の Thomson によりヒト ES 細胞が樹立された。ES 細胞においては、受精卵の破壊という倫理的な問題を避けることができない、といった大きなデメリットを抱えているが、2009 年にアメリカでは ES 細胞研究に対して連邦政府助成が解禁され、2010 年 7 月にはアメリカのジェロン社に対して、脊髄損傷患者を対象としてヒト ES 細胞を使用する臨床試験が承認された。

そして、2006 年にマウス iPS 細胞が樹立された後、翌年の 2007 年にはヒト iPS 細胞が樹立された。これを受けて、2010 年に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(ヒト幹指針) の対象にヒト iPS 細胞が含まれるように改訂された。つい最近 (2013 年 5 月) のことであるが、オレゴン健康科学大学のチームが、ヒトクローン胚 (受精卵の核を患者の細胞の核と入れ替えて樹立した胚) からヒト ES 細胞を樹立することに成功した。このヒト ES 細胞は自家細胞であり、クローン人間ができる可能性が潜在的に存在する。

したがって、細胞を利用する場合に、重要な観点として、自家細胞か他家細胞か、そして成熟細胞か幹細胞か、といった観点が重要なポイントとなる。

2.1 自家細胞か他家細胞か

再生医療において、その細胞ソースを誰に求めるか、という観点から、組織を再生するために自らの細胞（自家細胞）を用いるケースと、他人の細胞（他家細胞）を用いるケースが存在する。それぞれにメリットとデメリットとがあり、それらを勘案しながら、適切な細胞ソースを定める必要がある。自家細胞を用いる場合のメリットとしては、拒絶反応がない点が最も特筆すべき点である。自分の細胞を用いるため、たとえ体外で培養、組織形成が行われたとしても、細胞そのもの、そして細胞が産生するマトリックス（細胞外基質）、そしてそれらの複合体である再生組織に対しては、当然ながら拒絶反応は生じない。またウイルスの問題もクリアされる。これは用いられる細胞および再生される組織にウイルスが潜んでいない、ということの意味ではない。ウイルスの問題がクリアされる、ということ、自家細胞を用いることにより新たにウイルスに感染することはない、ということの意味する。一方、デメリットとしては、採取部位が限られているということが挙げられる。自身の組織を採取して、そこから細胞を得る必要があるが、採取のために自身の組織の一部を損壊するため、その部位は限定される。また、再生医療の対象は（白血病治療などの一部の例外を除き）主に中高年が対象となる。中高年の組織から採取される細胞は一般的にアクティビティ（生理活性）が低いことが知られている。とくに細胞分裂能という観点では著しく劣っている。正常な細胞ではヘイフリック限界と呼ばれる分裂回数の限界があり、そのために中高年から採取される細胞に残された分裂回数は小さいとされる。再生医療においては当然のことながら、採取した組織よりも大きい組織を再生する必要があるため、細胞分裂能は必要不可欠な要素である。ただし、このヘイフリック限界は正常細胞に適用されるものであり、後述する幹細胞にはこのヘイフリック限界は適用されない。

他家細胞を用いることのメリットは、自家細胞と異なり得られる細胞のアクティビティは必ずしも低くないことである。またヒトの細胞である限りはウイルス感染のチェックは可能である点も、自家細胞に劣るものではない。他家細胞を用いる場合には、あらかじめ細胞を用意し組織再生を進めておくことができるという利点がある。再生医療の実現のためには産業化が必要不可欠であるが、産業化という観点では他家細胞を用いた組織再生には大きなメリットがある。また火傷治療などの緊急性の高いケースにおいては、他家細胞を用いた再生医療は有効である。一方、デメリットとしては、移植に際しては拒絶反応が必然的に起こるため、免疫抑制剤の使用を避けることができないことが挙げられる。また、ケースによっては倫理的な問題が生ずる可能性がある。他家細胞を得る場合、他人の組織の一部を損傷するため、その採取に当たっては倫理的な問題に対して細心の配慮が必要である。他家細胞の場合は、屍体から採取されるケースも存在する。それゆえ、アクティビティの高い細胞も得ることができるという他家細胞のメリットに繋がるのではあるが、同様に倫理的な問題への配慮が必要である。

2.2 成熟細胞と幹細胞

自家細胞か他家細胞かという選択は、誰からという視点であるが、一方、どこからという、どのような分化段階の細胞を用いるかという視点が存在する。私たちの体は60兆個もの細胞で構成されていることは前述のとおりである

が、それら60兆個の細胞はもとをたどれば1個の受精卵が分裂を繰り返した結果である。受精卵が分裂を繰り返しながら分化のカスケードを降りていき、最終的には成熟細胞となって、それぞれの機能をそれぞれの場所で果たすことになる。再生医療における細胞ソースの選択肢の一つは、この成熟細胞を細胞ソースとして用いることである。たとえば、軟骨組織を再生するための細胞ソースとして軟骨細胞を用いる方法である。一方、成熟細胞を用いることは、前述のようにその採取箇所が限定的であることと、分裂回数に制限があるというデメリットを伴う。そこで、細胞ソースを、成熟細胞ではなく幹細胞に求める戦略を採用する研究が盛んになってきている。

2.2.1 ES細胞およびiPS細胞 幹細胞 (Stem Cell)

とは、自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞と定義されている。自己複製能とは、自己と同一の細胞に分裂可能な能力のことである。一つの受精卵から分裂を繰り返すことにより成熟細胞に分化していくように、一般的には細胞分裂と細胞分化は並列して生ずる。一方、幹細胞は分裂しながらも、分化を進めることなく、いわばその場で足踏みする状態を維持できる能力を持つ。そして潜在的には多くの成熟細胞に分化可能であるという多分化能を持つ。この多分化能の最も高い位置に存在している細胞がES細胞である。つまりすべての成熟細胞に分化可能な能力を持つ。このES細胞は、受精卵を破壊して作製されることから、倫理的な問題から切り離すことはできない。ES細胞は受精卵から作製されることから他家細胞である。しかしながら核を入れ替えるというクローン技術を用いれば自家細胞になり得るが、これまでヒトでは成功していなかった。2013年5月、ヒトクローン胚からヒトES細胞が樹立された。このES細胞は自家細胞であり、すべての細胞種に分化可能な細胞である。

一方、ES細胞が不可避に持つ倫理的な問題をクリアすべく、iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞が開発された。この技術は、成熟細胞の分化状態をES細胞の状態まで巻き戻す技術である。分化のカスケードを末端まで下ってきた成熟細胞に再び分化カスケードをES細胞までいわば遡上させる技術である。この技術により受精卵を破壊することなくES細胞様の細胞を得ることができ、さらに自己細胞、他家細胞どちらも作製可能である。一方、なぜES細胞様細胞にまで分化が巻き戻るのか、その詳細なメカニズムは依然不明であることや、癌化のリスクが現時点ではゼロとなっていない点や、完全には巻き戻っていない徴候も散見されるといった点で、引き続き基礎研究を続ける必要がある。しかしながら、今後、再生医療における細胞ソースの最も有力な候補であることは間違いないと考えられる。

2.2.2 血液幹細胞および骨髄性幹細胞 幹細胞の定義は上述したとおりであるが、生体中にはさまざまな箇所に幹細胞が存在することが見出されている。その中で、最も有名で再生医療において臨床応用という点でも最も成功している幹細胞が、骨髄に存在する幹細胞である。骨髄に存在する幹細胞としては血液幹細胞と骨髄性幹細胞の2種類が知られている。血液幹細胞は、血球である赤血球、各種の白血球、血小板、マクロファージ、破骨細胞などに分化可能な幹細胞であり、血球と呼ばれるすべての細胞を産生することが可能である。血液幹細胞は白血病治療に用いられており、細胞移植 (Cell Transplantation) の再生医療において最も頻繁に臨床応用されている。治療においては、

いったん、血球細胞をすべて死滅させるため、一時的に免疫力がゼロとなる。したがって、無菌室で過ごす等の措置が必要であるが、治療そのものは採取した骨髄を静脈に注入するという細胞移植である。骨髄に僅かに含まれる血球幹細胞が骨髄内に定着し、細胞分裂を開始し、そしてその一部を分化のカスケードに流すことができれば、再び血球が産生される。この場合、血液幹細胞と産生される血球細胞は他家細胞である。骨髄の中に存在するもう一つの幹細胞である骨髄性幹細胞は中胚葉系の幹細胞であり、潜在的に骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、臍、靭帯細胞に分化可能であるため、これらの細胞により構成される組織である骨組織、軟骨組織などを再生する場合の細胞ソースとして期待されている。

2.2.3 体性幹細胞 幹細胞は骨髄以外にも見出されている。とくに日々再生している組織においては幹細胞の存在が必須である。これらの幹細胞は体性 (Somatic) 幹細胞と呼ばれる。もし、これらの幹細胞が存在しなければ、成熟細胞はすぐにヘイフリック限界を迎え、その時点で組織の再生能がストップしてしまい、生命の維持にとって危機的な状況になってしまう。具体的には、体性幹細胞は、毛根、表皮、小腸上皮に存在する。たとえば表皮は日々、垢として脱落しながら再生を続けている。このため表皮は傷を残すことなく、外界とのバリアとしての機能を維持している。表皮幹細胞は、この表皮を再生する表皮細胞を常に供給し続けている。毛根、表皮、小腸上皮以外には、その再生能を裏づけるように肝臓において幹細胞が見出されている。また、神経幹細胞も見出されている。これは、それまでの神経は再生しないという学説を覆す裏づけとなった発見である。これらの体性幹細胞は、再生医療における細胞ソースの一つのカテゴリとなる可能性がある。

3. 三次元培養担体

生体中の細胞は、血球細胞のように浮遊して存在する浮遊細胞以外は、すべてマトリックス (細胞外基質) に接着して存在する接着細胞である。接着細胞においても二つのカテゴリがあり、一つはマトリックス平面上に二次元的に接着して存在する上皮系細胞 (典型的な上皮系細胞としては血管の内腔面を覆う血管内皮細胞) とマトリックス内で三次元的に存在する細胞である。そして、組織を構築する細胞のほとんどが、三次元的なマトリックス中に存在している。これらの細胞は現在ではすべてフラスコ等の中で培養可能となっているが、一方でフラスコやシャーレ等の二次元平面でこれらの細胞をどれだけ長期間培養しても (例外は存在するが) 二次元のままであり、三次元組織にはならない。したがって、三次元組織を再生するためには、何らかの工学的技術が必要とする。その典型的な方法が、三次元培養担体を用いる方法である。

3.1 生体高分子

生体は、細胞と細胞が産生するマトリックスにより構成されている。細胞はさまざまな種類のマトリックスを産生するが、その中で最も産生量が多いものがコラーゲンである。コラーゲンは30種類以上存在するが、その中で最も存在量が多い典型的なコラーゲンが、I型コラーゲンである。このI型コラーゲンを熱変性させたものがゼラチンである。コラーゲンは、細胞を接着するサイトを持ち、また含水性でありゲルとなり得るため、コラーゲングル内に細

胞を内包させることで三次元体を作製する手法がよく用いられる。このI型コラーゲンの抗原性を低下させるべく末端を酵素的に切断したコラーゲンはアテロコラーゲンと呼ばれ、臨床に応用されている。そのほか、関節軟骨や皮膚に多く存在するムコ多糖類であるヒアルロン酸も、その高い含水性とゲル化技術により再生医療に応用されようとしている。わが国においては、2012年7月、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングによる自家培養軟骨が薬事承認された。これは、患者から採取した軟骨組織より分離した軟骨細胞を、アテロコラーゲングルに包埋して培養することにより作製した三次元培養組織である。

接着細胞は、Cell-cell Interaction (細胞間相互作用) または Cell-matrix Interaction (細胞-マトリックス間相互作用) のどちらかが存在しないとアポトーシス (自発的な細胞死) を起こすようにプログラムされている。したがって、細胞を三次元的に配置し生存させるためには、生体高分子をなんらかの手法を用いて三次元培養担体に取り込む必要がある。

3.2 生分解性高分子

三次元培養担体の素材として生体高分子を用いることは、細胞の接着という点では利点であるが、一方でその成形の難しさや機械的強度の弱さなど、臨床応用に際して問題となる点も多い。そこで、これらの欠点を補う材料として生分解性高分子が用いられている。生分解性高分子は、加水分解により高分子鎖が切断されて、最終的にはモノマーになる高分子である。再生医療において利用される典型的な生分解性高分子は、ポリ乳酸 (PLLA)、ポリグルコール酸 (PGA)、そしてそれらのブロック共重合体である PLGA である。生分解時間はそれぞれ、年のオーダー、週のオーダー、そして月のオーダーである。再生医療においては、生分解性高分子は、組織再生と同期して生分解することが期待されるため、その生分解時間とのマッチングからポリ乳酸と共に PLGA がよく用いられる。生分解性高分子は疎水性であるために、そのままでは細胞が接着することが困難なため、表面改質またはコラーゲンなど生体高分子とのハイブリッド構造が求められる。また、生分解性高分子はバルクの状態では再生医療材料としては適さず、その内部に細胞を播種可能なような構造、たとえば多孔質構造や繊維構造が求められる。

3.3 リン酸カルシウム

骨のマトリックスは主にコラーゲンとハイドロキシアパタイトで構成されている。ハイドロキシアパタイトはリン酸カルシウムの一種であるが、コラーゲンと共に骨芽細胞によって産生される。リン酸カルシウムは、その Ca/P の比率に応じさまざまな種類が存在するが、その中でハイドロキシアパタイトは Ca/P が 1.67 である。生理的な条件下では最も生成しやすいリン酸カルシウムである。このハイドロキシアパタイトは、骨組織においてはアパタイト周囲に骨組織を形成させるという骨伝導能を持つが、筋肉などの異所においても、ハイドロキシアパタイトを埋入することにより、その周囲に骨組織を形成させるという骨誘導能をも併せ持つ。したがって、骨欠損部分に充填するバイオマテリアルとして、これまでも臨床に応用されてきている。再生医療においても骨再生のための三次元培養担体の素材として応用されているが、一方でその生分解時間が比較的長いという欠点がある。生体の骨組織ではリモデリングと呼ばれる機構が存在し、破骨細胞によりコラーゲンやアパ

タイトが分解され、引き続いて骨芽細胞によりコラーゲンやアパタイトが産生されながら、常に骨組織がターンオーバーしている。このリモデリングに移植したアパタイトが巻き込まれにくいことが知られている。そこで、ハイドロキシアパタイトに似たリン酸カルシウムでCa/Pが1.5である三リン酸カルシウム (TriCalcium Phosphate, TCP) が再生医療において利用されている。このTCPの利点は生分解時間がハイドロキシアパタイトと比較して短く、上述の生分解高分子と同様に骨組織の再生と共に分解吸収される。

4. 生化学刺激

現在、ほとんどの細胞は生体外で培養可能である。MEM (Minimum Essential Medium) と呼ばれる培養液の発展のおかげである。MEMには、ミネラル、ビタミン、アミノ酸などが適切に配合されている。MEMには種類があり、培養する細胞に応じて適切なMEMを選択する必要がある。MEMだけで細胞を一定期間培養することは可能であるが、細胞分裂することなく、次第にアクティビティを失い、死滅する。それを避けるために、培養液には血清 (一般的にはウシ胎児血清) を一定割合混合する。血清にはさまざまな生化学的因子が含まれているが、その代表的なものが細胞増殖因子である。細胞増殖因子には、線維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、神経細胞増殖因子など各種の細胞増殖因子が知られている。これらの細胞増殖因子は特定の細胞の細胞膜に存在するレセプタと結合する。レセプタに結合することによって生ずるシグナルは、核に伝達され遺伝子発現をコントロールし、最終的には細胞増殖および細胞分化をコントロールすることが知られている。血清にはこれらの細胞増殖因子が多種含まれており、細胞培養を行うために必要不可欠である。一方、血清にウシなどヒトとは異種の動物の血清を用いることは、とくに再生医療において問題となる。具体的には、血清に含まれる可能性のあるウイルスの問題が大きい。したがって、再生医療においては、移植の対象となる患者自身の血清、いわゆる自己血清を用いるケースが存在する。そもそも血清はロットによって、細胞増殖や細胞分化に及ぼす効果が異なる。これは含有する増殖因子の種類や量がロットによってばらついているからである。したがって、再生医療においては無血清培地、すなわち血清を使うことなく、各種細胞増殖因子を定量的に配合した培地の開発が進められている。

5. 物理刺激

細胞を分化させる方法としては、生化学因子を添加する方法が一般的であるが、この方法は分化させる細胞の細胞数と比例した量の生化学因子を必要とする。そして、分化にかかわるコストも分化させる細胞数に比例する。たとえば再生軟骨の創製のためには、 $10^8 \sim 10^9$ 個ほどの細胞数を必要とするとされている。これは通常、実験室レベルで用いる細胞数の100~1000倍であり、コストも100~1000倍かかる。このコストは、再生医療の実現化のための障壁の一つとなっている。

生体内ではさまざまな物理的刺激が生理的な条件下で組織・細胞に負荷されている。たとえば大腿骨には歩行など

により圧縮・引張応力が負荷されており、骨組織の微小変形や骨組織内の微小な体液移動による流動電位が生じている。また血管系には血流によるずり応力が血管内皮細胞に、また拍動によるストレッチが血管平滑筋細胞、血管内皮細胞に負荷されている。したがって、このような生理的な刺激をシミュレーションして、生体組織を生体外で三次元再構築しようとする研究が始まっており、たとえば培養液の灌流を制御することにより再生血管にずり応力やストレッチを与えながら再構築する研究が進められている。また、軟骨組織の再構築のために軟骨組織に生理的に負荷されている静水圧を負荷する研究が行われている。

物理刺激の受容機構はまだ十分には解明されていないが、細胞が物理刺激を受容することにより、細胞内にシグナルが伝達されることが知られている。この細胞内のシグナル伝達に関わる分子は生化学刺激と同じ分子を利用している。つまり物理刺激はその受容メカニズムは生化学刺激とは異なるが、いったん細胞内にシグナルが伝達されると、そのシグナルは生化学刺激のそれと同等の経路を活性化することが知られている。生化学刺激はレセプタに結合する因子であるリガンドと、そのカウンターパートであるレセプタとは一対一対応し、レセプタ直下にある特定のシグナル伝達経路を活性化するという点で特異性が高いが、物理刺激においては同時に複数のシグナル伝達経路を活性化することが知られており、物理刺激は特定の生化学因子の代替にはなり得ないと考えられている。一方、複数のシグナルを同時に細胞に入力することができることから、特定の細胞に対する特定の分化コントロールにおいて有効であるとも考えられている。したがって、物理刺激は生化学刺激を置き換えるものではなく、お互い補完し合うことで、細胞の分化コントロールを最適化することが可能と考えられる。

物理刺激を用いて細胞の分化コントロールを行う培養システムを構築するコストは、生化学刺激に比較し高いが、いったんシステムを構築した後は、分化させたい細胞数とコストとは1次的な比例関係にはなく、コストの上昇は僅かである。現時点においては、物理刺激による細胞分化は、その確実性、特異性などにおいて生化学刺激に大きく劣っているが、再生医療の実現化をコスト面で考慮した場合、物理刺激による分化コントロールは、今後無視することができない方法の一つとして位置づけられると考えられる。

6. おわりに

本稿においては、再生医療における基礎的な、また一般的な事項について4要素という観点から解説を加えた。再生医療における工学研究は、現時点での最先端の技術をいかに細胞分化および組織再生に適用していくかにフォーカスを当てている。本企画のテーマである「再生医療に挑戦する機械工学」について、本稿をバックグラウンドとして、各事例紹介をお読みいただけたら幸甚である。

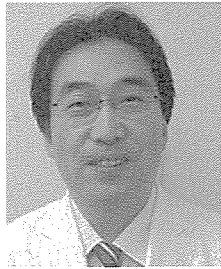
(原稿受付 2013年10月17日)

軟骨再生医療の現状・今後の展望

Current Status and Prospects of Articular Cartilage Regeneration

佐藤 正人

Masato SATO



◎1991年防衛医科大学卒業，1997年大学院時代から椎間板再生の研究に着手。2001年防衛医科大学医学研究科博士課程修了，博士（医学）。2003年から東海大学。厚生労働科学研究費補助金再生医療実用化研究事業「関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現」研究代表者

◎研究・専門テーマは、関節軟骨の修復・再生，機能評価

◎東海大学教授 医学部外科学系整形外科
 (〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143 東海大学医学部外科学系整形外科 / E-mail : sato-m@is.icc.u-tokai.ac.jp)

1. はじめに

わが国で2件目となる保険収載された細胞・組織加工製品（なぜか再生医療製品ではなくこの名称になっている）が運動器領域にも登場したことは喜ばしい限りである。広島大学の越智光夫教授らの方法をもとに開発された自家培養軟骨ではあるが、その実現には基礎研究から13年もの歳月を要したとも聞いている。今後、後続の再生医療製品への道が開け、審査期間のいっそうの短縮が望まれる。世界に目を向けると軟骨の再生医療製品は百花繚乱の様相を呈している。各製品の優劣をつけるだけの臨床経験の蓄積がまだなされていないが、長期的には自然淘汰されていくものと考えられる。アメリカでの審査は、日本に負けず劣らず厳しいものであるとも言われている。それは、アメリカで約20年前に承認されたGenzyme社（現Sanofi社傘下）の自家培養軟骨Carticel以来、多くの軟骨再生医療製品に関しての治験は開始するけれども、ある程度進んだ所ですべて中止またはペンディングとなっている。そのため、軟骨再生医療製品はいまだにCarticelだけであるのは意外な事実でもある。これは、適応患者の選別とそのリクルートが困難であること、並びにFDA審査ではコントロールのない試験は許されず、常に比較試験でなければならないといった、種々のハードルをクリアできないことに原因があるらしい。一方、韓国では最終分化した細胞や体性幹細胞からなる軟骨再生医療製品の審査はさほど厳しくなく、すでに各種の軟骨再生医療製品が臨床で使用可能である。各国の事情によりレギュレーション側の問題は、かなり異なることが想像できる。

2. 軟骨再生医療の現状

アメリカ NIH (National Institute of Health) が管理運営する臨床試験（治験）の登録サイトである ClinicalTrials.gov において「cartilage」で検索すると2013年10月10日現在319件が検索されてくるが、そのうち状況が不明なものを除外し、現在オープンなものは渉猟し得た限りでは98件となる。さらに細胞、組織、組織工学的軟骨移植による治療法に関するものは24件あるが、自家軟骨細胞、他家軟骨細胞・組織、骨髄間葉系幹細胞、臍帯血由来間葉幹細胞等さまざまである。関節軟骨再生医療においては、マイクロフラクチャー法をコントロールにした比較試験が多いが、既存の再生医療製品である Carticel との比較試験も散見される。本邦では、先に紹介した保険収載されたジャパンティッシュエンジニアリング社のジャックがこの分野の製品としては唯一のものである。本邦の軟骨再生医療に関する実施中の治験は現在確認できなかった。一方、厚生労働大臣の意見書の発布をもって実施されている関節軟骨再生に関してのヒト幹細胞臨床研究としては、渉猟し得た範囲では大阪大学で2件、東海大学で1件の計3件だけである。大阪大学では骨髄間葉系幹細胞移植を多施設共同研究として実施するものと、培養滑膜細胞により作製した細胞組織複合体移植という内容の異なる2件の臨床研究を実施中である。東海大学では、滑膜細胞との共培養法で作製した軟骨細胞シート移植による臨床研究を実施している。一方、ヒト幹細胞臨床研究指針以前より、東京医科歯科大学では滑膜由来の幹細胞を単離して高密度浮遊液にして関節鏡視下に細胞移植するという臨床研究を実施しており、実質国内では4件の臨床研究が行われている。

3. 軟骨再生医療に求められる課題

2013年、ついにわが国の65歳以上の人口は3000万人を超え、4人に1人が高齢者となった。国策として進められている健康日本21（第2次）の基本的な方向として、すべての国民が共に支え合い、健やかで心豊かに生活できる活力ある社会の実現を目指し、そのために健康寿命の延伸と健康格差の縮小を達成すべき目標の最重要事項に挙げている。健康寿命は男性70.42歳、女性73.62歳で十分に高水準ではあるが、平均寿命が男性79.55歳、女性86.30歳ということから考えると、人生の後半において要介護に近い生活を男性で9年、女性で12年以上平均して送るこ

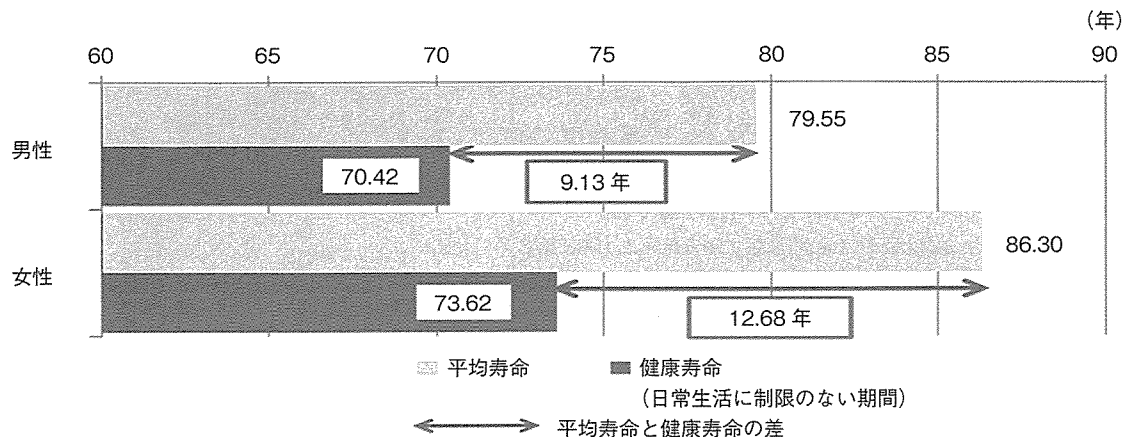


図1 健康寿命と平均寿命

資料：平均寿命（2010年）は厚生労働省「平成22年完全生命表」、健康寿命（2010年）は厚生労働科学研究費補助金「健康寿命における将来予測と生活習慣病対策の費用対効果に関する研究」

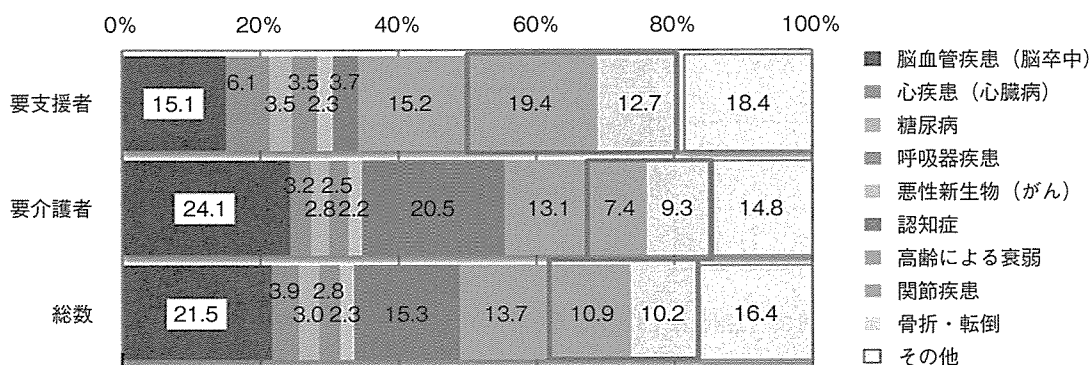


図2 要介護度別に見た介護が必要となった主な原因
(資料：厚生労働省「平成22年国民生活基礎調査の概況」)

となる(図1)。要介護、要支援となる原因はさまざまではあるが、関節疾患と骨折・転倒による原因を共に運動器疾患とすれば、「平成22年国民生活基礎調査の概況」で第1位となっている脳血管疾患を凌駕するほどになる(図2)。つまり運動器疾患の克服は、喫緊に克服しなければならない重要課題である。日本整形外科学会では、運動器の障害によりすでに要介護になっているか、要介護のリスクが高い状態をロコモティブシンドローム(通称：ロコモ)と命名し、名称の啓蒙活動を行っており、変形性膝関節症はその代表的疾患である。

関節軟骨の再生医療が変形性膝関節症の克服にどの程度貢献できるのか、今後、世界の研究進捗を見守る必要がある。外傷による小さな軟骨欠損に対する治療としては、アメリカを始めとする諸外国ではすでに2万例を超える自己細胞による再生医療の手術症例の蓄積がある。これから言えることは、再生医療が真に必要な変形性膝関節症の治療には20年近く経過した現在でも、いまだに到達する気配すら感じられないということである。このことから関節軟骨を再生させることが、いかに難しいことなのか推察できる。変形性膝関節症の病態は多因子であることが多く、単に細胞移植だけで解決できるわけではない。たとえば、膝のアライメントが悪ければそれを矯正するような骨切り術を併用しなければ、メカニカルストレスが変わ

らないままでは、治療効果は長期間維持されないことは容易に想像できる。また、変性した軟骨では移植した細胞が生着しにくいことも予想され、修復再生環境を整える治療法も併用していかなければならない。再生医療は治療である以上、臨床症状の緩和を目指すものではあるが、手術を伴うためアウトカムはもっと高くあるべきである。ヒアルロン酸の関節内注射や消炎鎮痛剤と同じ効果効果では情けない。構造的にも硝子軟骨での機能再建を目指すべきである。アウトカムを正しく診断できる機器やバイオマーカーの開発にも期待が寄せられているが、関節軟骨の機能に基づいた定量的な評価法はなかなか難しい。変形性関節症は経過が長く、治療効果判定も長期に非侵襲に定量的に評価するべきものである。それを可能ならしめる技術開発が待望されている。

4. 軟骨細胞シートによる関節治療の可能性

現在、われわれが東海大学で実施中のヒト幹細胞臨床研究で使用する軟骨細胞シートは、温度応答性培養皿を用いて3週間かけて培養し、積層化して作製する。この培養皿は、東京女子医科大学先端生命医科学研究所所長・教授岡野光夫博士が開発したもので、独自のナノ表面設計により

細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究
(ヒト幹細胞臨床研究)

2011.2.23 学内論理委員会承認
 2011.8.26 第 65 回厚生科学審議会科学技術部会で承認
 2011.10.3 厚生労働大臣の意見書(厚生労働省発医政 1003 第 3 号) 発出
 2011.11.29 第 1 例目臨床研究開始 組織採取し, 細胞シート作製開始
 2011.12.21 第 1 例目細胞シート移植(東海大学医学部付属病院)
 現在 10 例がエントリーされ, そのうち 7 例に細胞シートが移植された。
 いずれも術後経過は良好

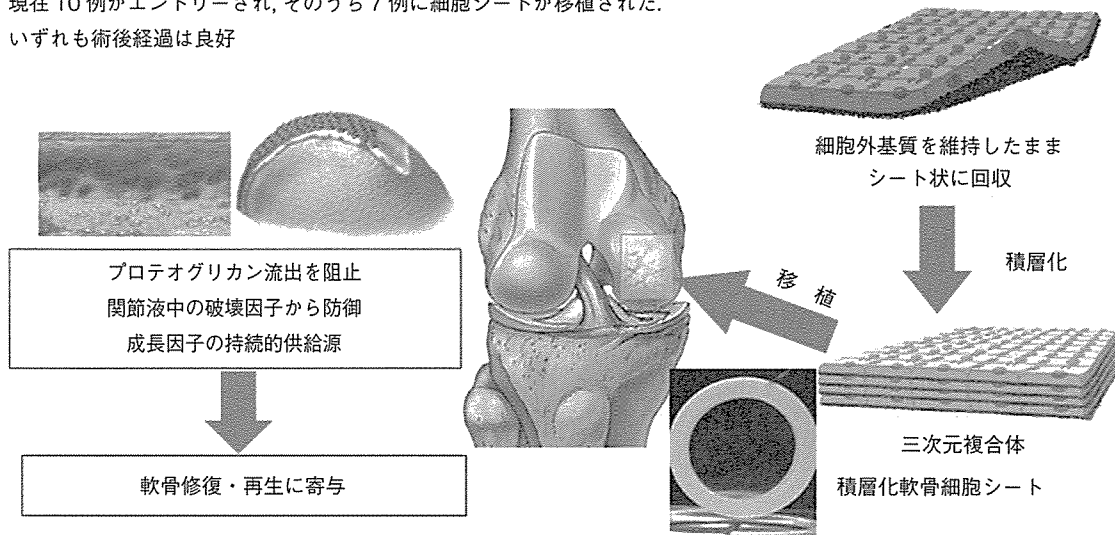


図 3 細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究

温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを器材表面に固定化することで器材表面は 32℃を境に可逆的に疎水性の細胞接着表面から親水性の細胞遊離表面に変化する⁽¹⁾⁽²⁾。この特性により、トリプシン等、細胞に損傷を与える酵素を一切用いることなく、温度を下げるだけで、無傷な細胞と細胞外マトリックスがシート状に回収可能である。すでにこの温度応答性培養皿を用いて作製した細胞シートによる臨床研究ならびに治験は、心筋、角膜、食道粘膜、歯根膜、関節軟骨の五つの異なる分野で開始され、再生医療の実現を目指している。

興味深いことに、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートは、通常の平面培養の軟骨細胞とは異なる特性を有している。播種直後の培養皿への接着のし難さが、かえって軟骨本来の形質を導くために通常二次元培養で生じる脱分化が起こりにくい⁽³⁾⁽⁴⁾。また、損傷軟骨表層部に移植すると他の組織工学的軟骨と同等以上の組織修復再生効果を発揮する^{(3)~(4)}。これは、主として積層化細胞シートが分泌する TGF β や PGE2 などの液性因子による効果と考えている。積層化細胞シートを構成する軟骨細胞がオートクライン、パラクライン、そしてマトリクライン効果により、同数の単離した細胞が分泌する分泌量の数十倍にもなることがわかっている⁽⁴⁾。ただし、細胞シートの作製に関しては、動物と異なりヒトでは軟骨細胞シートの積層化は難しく、とくに脱分化しなかった市販のヒト軟骨細胞では作製は困難である。ヒト細胞を用いる場合は、短期間で活性の高い積層化軟骨細胞シートを作製するには、滑膜細

胞との共培養法が必須であり、関節内環境を疑似した培養方法が効果的である⁽⁴⁾。

われわれが実施しているヒト幹細胞臨床研究(図 3)は、従来の軟骨再生医療とは一線を画し、日本で初めて変性した膝関節軟骨にも適応が認められたものである⁽¹²⁾。現在までに 10 例がエントリーされ 7 例の移植が終了しているが、重篤な有害事象はなく、いずれも術後経過は良好である。臨床研究の詳細は URL : <http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/> を参照いただきたい。

- I 対象患者
 - 外傷または変性により生じた膝関節軟骨損傷を有する患者。
- II 選択基準
 - 下記の選択基準をすべて満たし、かつ同意能力を有する患者を対象とする。
 - (1) 20 歳から 60 歳までの性別を問わない患者。
 - (2) 膝関節軟骨損傷を有するもの。
 - (3) 関節鏡所見で軟骨損傷が Outerbridge 分類 Grade III 以上のもの。
 - (4) 膝関節大腿骨内顆または外顆部のいずれかに 1.0cm² 以上 4.2cm² 未満の軟骨欠損を有し、従来の骨髄刺激法やモザイクプラスティなどが適応となる患者。
- III エンドポイント
 - (1) 有害事象の頻度
 - (2) 術後 1 年での臨床評価基準における点数

- (3) 術後1年での単純レントゲン写真評価基準における点数
- (4) 術後1年でのMRI評価基準における点数
- (5) 術後1年での超音波検査による粘弾性評価
- (6) 術後1年での組織学的評価点数

5. 軟骨細胞シートの将来展望

われわれは体外で、できるだけ正常に近い特性の軟骨を作製するといった従来の組織工学的アプローチを諦めた。それは、正常に近い軟骨組織をいくら作製できたとしても、細胞成分が極めて少なく、マトリックスが極端に多い構造体を移植後にどのようにして維持することが可能なのか、という点が解決されない限り、再生医療には適さないと見極めたからである。先人から受け継がれた歴史からも、臨床現場で経験した多くの事例からも、関節軟骨の自然治癒力が極端に低いことは自明である。細胞は、ばらばらの状態で移植しても、血球系の細胞でない限り生着するのは極めて少数である。細胞シートは手と手を取り合うように細胞同士のコミュニケーションを維持し、バイアピリティが高い状態で、組織特異的な形質発現を維持したまま移植することが可能である。つまり局所の組織修復再生に最も効果的な状態で移植されるため治療効果が高い。損傷された組織を修復するために移植される場合、正常な組織形態に近い必要は全くない。損傷部に長期間留まり、損傷部からプロテオグリカン等のマトリックス流出を阻止し、関節液中のカタボリックファクタから損傷部を保護し、さらに自らも液性因子を供給し、修復に必要な細胞そのものも動員する。これらの一連の組織の修復・再生に適した機能を細胞シートは有していると考えられる。繰り返しになるが、軟骨細胞シートは、移植前は決して正常な軟骨組織ではない。

現在は、ヒト幹細胞臨床研究として少数の患者に自己細胞シート移植を適用し、安全性をプライマリエンドポイントとして評価している段階であるが、自己細胞を用いる場合は、組織採取のための侵襲的な手術とその後の3~4週間かかる培養工程がある。つまり、目の前の患者さんをすぐに治療することができない。このようなタイムラグを排除するためにも、将来的に同種細胞シートを用いるメリットは大きく、それにより、実用化による普及も加速するものと確信している。骨・軟骨は昔から同種組織移植が経験的に行われてきたことからわかるように、免疫抑制剤を必要としない数少ない臓器(組織)の一つである。海外では細かくチップ状にした関節軟骨片がすでに市販され、実際に臨床で使用されている。われわれは、現在同種細胞ソースの検討を慎重に行っている。軟骨細胞シートの保存法に関しての特許も出願し⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾、臨床の場で待機期間なく、すぐに使用可能なレディメイドの同種細胞シートによる再生医療の実現に向けた準備を行っている。軟骨の臓器(組織)特異性を生かし、安全性と免疫応答に関しての詳細なデータを蓄積し、同種細胞移植に積極的な方々と連携して同種細胞シートによる治療を一般化させたいと考えている。

6. おわりに

現政権は、再生医療を日本の成長戦略として国策の柱とした。いわゆる再生医療推進法、安全性確保法、改正薬事法といった再生医療関連の三つの法律が今年度中に成立する予定である。今後どのように運用されていくのか、現時点では先行きを見通せない面も多いが、基礎研究でも、臨床研究でも、そして実際の普及に直接影響するレギュラトリーサイエンスにおいても、再生医療立国として世界をリードしていくことがわが国の進むべき道だと信じていたい。

(受稿受付 2013年10月10日)

●文献

- (1) Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., ほか, Mechanism of Cell Detachment from Temperature-modulated, Hydrophilic-hydrophobic Polymer Surfaces, *Biomaterials*, **16** (1995), 297-303.
- (2) Okano, T., Yamada, N., Sakai, H., ほか, A Novel Recovery System for Cultured Cells Using Plasma-treated Polystyrene Dishes Grafted with Poly (N-isopropylacrylamide), *J. Biomed. Mater. Res.*, **27** (1993), 1243-1251.
- (3) Mitani, G., Sato, M., Lee, J.I., ほか, The Properties of Bioengineered Chondrocyte Sheets for Cartilage Regeneration, *BMC Biotechnol.*, 9-17 (2009).
- (4) Kokubo, M., Sato, M., Yamato, M., ほか, Characterization of Chondrocyte Sheets Prepared Using a Co-culture Method with Temperature-responsive Culture Inserts, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, (2013), DOI: 10.1002/term.1764.
- (5) Kaneshiro, N., Sato, M., Ishihara, M., ほか, Bioengineered Chondrocyte Sheets may be Potentially Useful for the Treatment of Partial Thickness Defects of Articular Cartilage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**-2 (2006), 723-731.
- (6) Kaneshiro, N., Sato, M., Ishihara, M., ほか, Cultured Articular Chondrocytes Sheets for Partial Thickness Cartilage Defects Utilizing Temperature-responsive Culture Dishes, *Eur. Cell. Mater.*, **13** (2007), 87-92.
- (7) Ebihara, G., Sato, M., Yamato, M., ほか, Cartilage Repair in Transplanted Scaffold-free Chondrocyte Sheets Using a Minipig Model, *Biomaterials*, **33**-15 (2012), 3846-3851.
- (8) Sato, M., Cell Sheet Technologies for Cartilage Repair, Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues, (2010), 251-265, Woodhead Publishing Limited.
- (9) 佐藤正人・三谷玄弥・伊藤 聡・ほか, 分子レベルからみた整形外科疾患シリーズⅥ: 関節軟骨損傷修復のための軟骨細胞シート, *整形・災害外科*, **53**-13 (2010), 1554-1555.
- (10) Ito, S., Sato, M., Yamato, M., ほか, Repair of Articular Cartilage Defect with Layered Chondrocyte Sheets and Cultured Synovial Cells, *Biomaterials*, **33**-21 (2012), 5278-5286.
- (11) Hamahashi, K., Sato, M., Yamato, M., ほか, Studies of the Humoral Factors Produced by Layered Chondrocyte Sheets, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, (2012), DOI: 10.1002/term.1610.
- (12) 厚生労働省発医政 1003 第3号「ヒト幹細胞臨床研究実施計画について」, 平成23年10月3日.
- (13) 長嶋比呂志・佐藤正人・ほか, 凍結細胞シートの製造方法, 特願2011-260318.
- (14) Maehara, M., Sato, M., Watanabe, M., ほか, Development of a Novel Vitrification Method for Chondrocyte Sheets, *BMC Biotechnol.*, **13**-58 (2013).

事例
紹介

次世代再生医療としての器官再生

Functional Organ Regeneration as a Future Organ Replacement Regenerative Therapy

辻 孝

Takashi TSUJI



◎新潟大学大学院理学研究科修了，九州大学大学院理学研究科博士後期課程を満期退学。山之内製薬（当時）研究員（1986～1989年），日本学術振興会特別研究員（DC，1991年），日本たばこ産業（株）医薬探索研究所主任研究員（1994～2001年）を経て，2001年より東京理科大学基礎工学部助教授，2007年より教授，2009年より総合研究機構教授。同大学院基礎工学研究科教授を兼務。2010年より同大学専門職大学院イノベーション研究科知的財産戦略専攻教授を兼任。博士（理学）

◎研究・専門テーマは，器官再生医学・細胞生物学

◎東京理科大学教授 総合研究機構
（〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641
/E-mail：t-tsuji@rs.noda.tus.ac.jp）

1. はじめに

再生医療は，生物学的な発生・再生研究や，組織工学の融合による再生医学を応用して，21世紀の新たな医療システムを確立し，国民の健康と福祉に貢献することが期待されている。さらに最近では，世界的にも高いレベルの日本の幹細胞研究や再生医療技術を生かして再生医療を国策として推進することにより，高付加価値型の医療産業の振興が経済施策の一つとして挙げられ，産業界からも大きな関心を寄せられている。再生医療の実用化には，幹細胞研究や治療技術など医学生物学的な研究に加え，幹細胞操作に関わる機器やデバイス，品質管理などに向けた計測機器など幅広い技術開発が必要であり，民間企業も参加した産業化が不可欠であると考えられている。

現在の再生医療では，疾患や傷害，加齢によって損傷した組織や器官の修復のため，生体内に存在する幹細胞を傷害部位へ移入する「幹細胞移入療法」が開発され，第一世代の再生医療として実用化，あるいは臨床応用化研究が進められている。最近になり，細胞を二次元的に組織化した細胞シートが日本初の再生医療製品となり，重度熱傷に対する再生表皮が承認販売された。さらに，心筋や食道上皮細胞，角膜上皮細胞を組織化したシートが第二世代再生医療として開発が期待されている。一方，再生医療の大きな目標は，機能不全に陥った器官を，幹細胞により再生した器官と置換する「器官再生医療」である⁽¹⁾。器官再生に向けた研究開発では，幹細胞とその足場となる担体を組み合わせた人工臓器の開発が長らく試みられてきたものの⁽²⁾，細胞の持続的な生存や器官機能の発現維持，高効率な機能発現レベルに到達できないなど，困難な課題克服に向けて研究開発が続けられている。一方，最近になって，胎児期に器官ができる仕組みを利用して器官を再び発生させる器

官再生治療のコンセプトが実証され，器官再生のさきがけとして期待されている^{(3)~(9)}。

本稿では，私たちが進めている歯や毛包，分泌腺などの器官の再生をモデルに，発生の仕組みを利用した器官再生研究の進展と今後の研究課題について解説するとともに，再生医療の実現に向けた産業化について考察したい。

2. 器官ができる仕組み

ほとんどすべての器官は，胎児期の上皮性幹細胞と間葉性幹細胞の上皮・間葉相互作用によって誘導される器官原基（器官のもととなるタネのような原基）から発生する⁽¹⁰⁾。外胚葉性器官である歯や毛包，外分泌腺である唾液腺や涙腺は，それぞれの器官の発生予定域の上皮細胞が肥厚することで始まる（図1）。このとき，どの器官が誘導されるかは，発生初期のポディプランによって決定され，場所ごとにどの器官になるか運命決定された幹細胞が誘導されるため，それぞれの場所で決まった器官が決まった数だけ誘導される。歯の器官原基である歯胚は，上皮性幹細胞が神経堤細胞由来の間葉性幹細胞側に陥入して間葉性幹細胞を密集させ（Bud stage；蕾状期），その後，上皮性幹細胞が間葉性幹細胞を包み込むようになり（Cap stage；帽状期），歯胚が形成される（図1（a））。その後，上皮性幹細胞からエナメル芽細胞が，間葉性幹細胞は象牙芽細胞や歯周組織であるセメント芽細胞，歯根膜細胞，歯槽骨へと分化し，歯根成長により口腔内に萌出して対合歯と咬合して完成する。一方，毛包発生においても基本的な発生様式は同様であり，表皮基底細胞が間葉細胞側に陥入し（図1（b）），間葉細胞の集塊である真皮細胞集塊を包み込むようになる。真皮細胞集塊を包み込んだ上皮下端部は毛母の原基を形成し，側面の上皮は隆起してバルジ領域と皮脂腺の原基となる。また真皮細胞集塊は毛乳頭を形成して毛母の分化を誘導して内毛根鞘と毛幹を形成する⁽¹¹⁾。外分泌腺においては唾液腺，涙腺のいずれも上皮性幹細胞が間葉組織に陥入して分岐を繰り返す，導管と腺房を形成する。腺房周囲を筋上皮細胞が取り囲み，外分泌腺を形成する（図1（c））。これらの発生はすべて上皮・間葉相互作用によって進行し，わずか2種類の幹細胞から複数種の細胞が誘導され，組織を形成し，三次元的な立体器官が完成する。

3. 器官発生の仕組みを利用した
器官再生

組織工学による人工臓器開発と並行して，これらの器官発生の研究をもとに，上皮性幹細胞と間葉性幹細胞から器官原基を再生し，生体へ移植して発生させて器官再生を実現する戦略が提案され，すでに30年以上にわたり研究が進められてきた⁽¹²⁾。なかでも器官原基再生のための三次元的な細胞操作技術開発に多くの時間が費やされた⁽¹¹⁾⁽⁹⁾。

3.1 立体的な器官原基を再構築する試み

細胞の足場として非生体材料や生分解性の担体を細胞の足場として用いる方法は，三次元的な組織を形成する技術として骨や軟骨の再生治療への応用が期待されてい

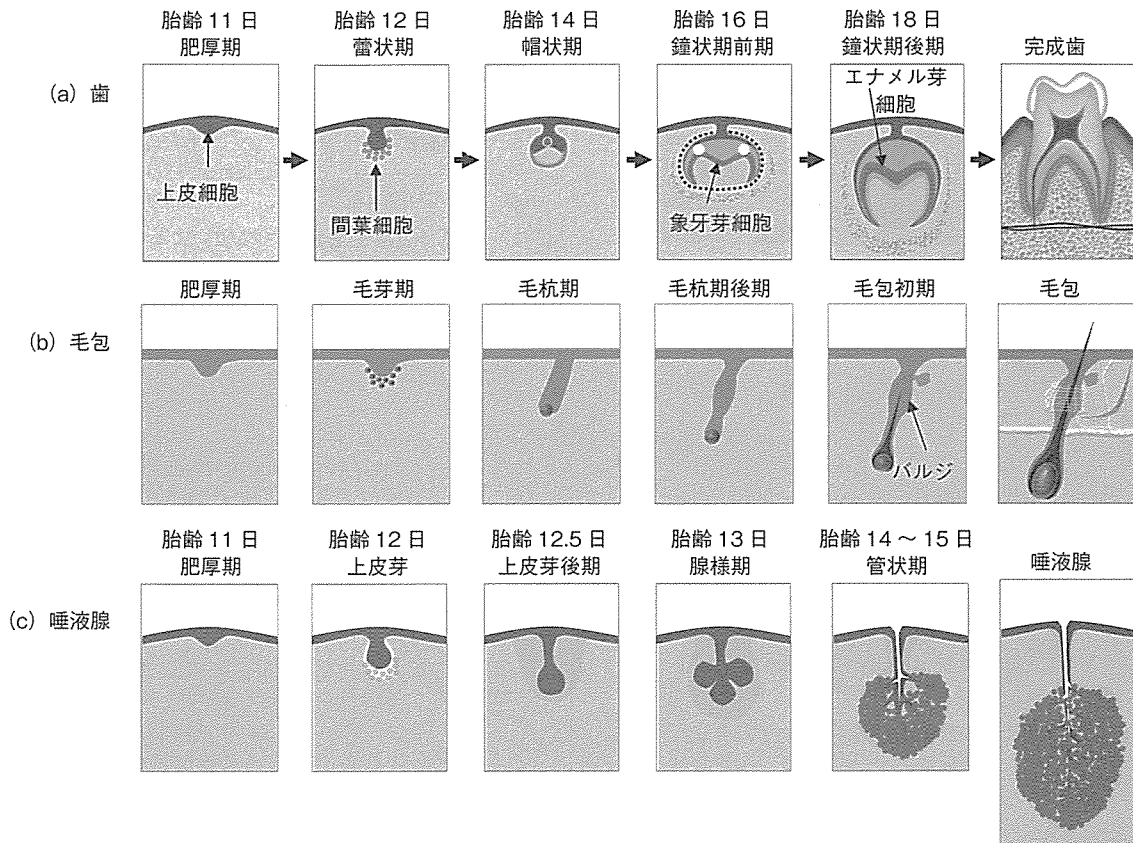


図1 歯や毛包、唾液腺の発生過程

る⁽¹⁾⁽¹³⁾。しかしながら担体による組織工学は、器官原基のように未分化な幹細胞が直接的な反応をしながら発生が進行する場合には、担体がこの相互作用の障害となるため、適正な組織構造を有する器官を形成させることが困難であった⁽¹⁾。

生体内では細胞は互いに接着し、組織化して存在しているため、細胞を高密度に凝集させて塊をつくり、器官形成における細胞間相互作用を再現しようとする試みも進められた。細胞凝集法は、遠心操作による細胞凝集体の形成や、培養液のドロップの中で細胞凝集を形成させるハンギングドロップ法、低付着性培養シャーレの中で細胞を自己凝集させる方法などが開発された。これらの方法は歯胚や毛包の再生で試みられ、上皮性幹細胞と間葉性幹細胞を混合して細胞凝集させると、幹細胞が互いに分離して凝集して自己組織化し、器官発生することが報告された。しかしながら、その誘導は偶発的であり、安定した技術にまで完成されていなかった⁽¹⁴⁾。

3.2 器官原基法の開発

私たちは、器官原基を再生する新しい技術として、上皮性幹細胞と間葉性幹細胞を三次元的な細胞操作技術により高細胞密度で区画化して再配置する「器官原基法」を開発した⁽³⁾(図2)。この方法は、上皮性幹細胞と間葉性幹細胞の懸濁液を、遠心操作により沈殿させて高細胞密度の状態とし、コラーゲン溶液中でこれらの幹細胞を区画化して配置することが特徴である。コラーゲンは細胞の足場ではなく、単一化した細胞が分散することなく、外部から固定化するためのものである。その後、この再生器官原基を器官培養すると、数時間で細胞は互いに接着して上皮・間葉相互作用が始まり、再生器官原基は正常に器官発生を進行させ、再生歯や再生毛包が発生する(図2)。器官原基法の開発は、幅広い器官再生の研究に道を拓いた。

4. 機能的な器官再生の実証

再生した器官原基を生体の器官喪失部位へ同所的に移植して、生着し、機能するかどうか、長らく、そのコンセプトの実証が期待されてきた⁽¹⁾。私たちは、再生器官原基か

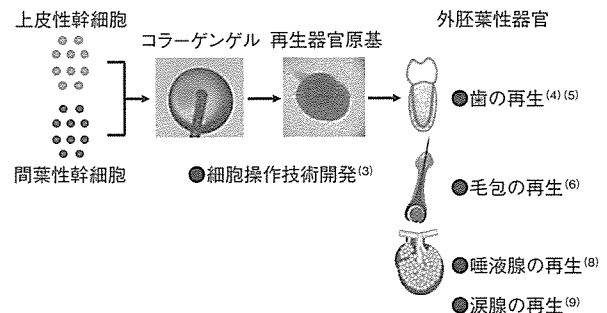


図2 再生器官原基移植による機能的な器官再生

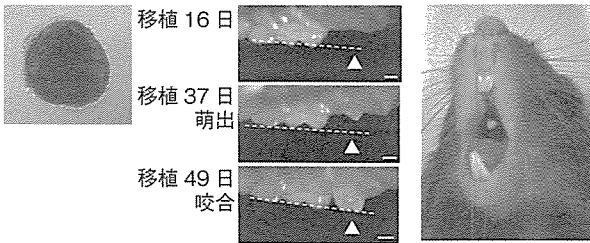
らの器官再生の実現可能性を実証するため、さまざまな再生器官原基を生体へ移植し、器官発生と機能回復について解析を進めてきた(図2)^{(4)~(9)}。

4.1 機能的な歯の再生

口腔機能は咀嚼や発音、審美性に重要な役割を果たしており、歯や咀嚼筋、顎関節が協調して機能することにより成立している。歯の再生治療では、再生した歯が食べ物を咀嚼し、機械的外力に応答する歯根膜機能、外部からの侵害刺激を中枢に伝達しうる神経機能を有することが期待される⁽⁴⁾。

再生歯胚(図3(a))をマウス第一臼歯の抜歯窩に移植すると、移植後37日目に再生歯が萌出し、49日目には対合歯との咬合を成立させて成長が停止した(図3(b))。萌出した再生歯は、エナメル質や象牙質、歯髓、歯根膜、歯槽骨の組織が天然歯と同等であるとともに、硬組織は天然歯と同等の硬度を有しており、マウスが生存中、脱落することも過剰な伸長をすることもなかった(図3(c))⁽⁴⁾。

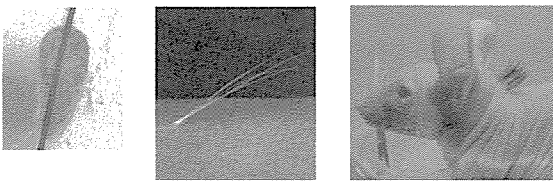
歯根膜は、機械的外力に対する緩衝能に加えて、外部からの圧力や牽引に応答して歯槽骨のリモデリング能を有することから、歯科矯正治療における歯の移動に重要な役割を果たしている。再生歯胚移植によって萌出した再生歯に



(a) 再生歯胚 (b) 再生歯の萌出の経過 (c) 同所的な歯の再生

図3 再生歯胚移植による機能的な歯の再生

- (a) 器官原基法で再生した歯胚
- (b) 白歯の喪失部位へ再生歯胚を移植した後の萌出過程
- (c) GFP マウスから採取した歯胚幹細胞から再生した歯胚を移植して萌出した再生歯 (口腔内の上顎で光る歯)



(a) 再生毛包原基 (b) 再生毛幹の萌出 (c) 同所的な毛包と毛幹再生

図4 再生毛包原基移植による機能的な毛の再生

- (a) 器官原基法で再生した毛包原基
- (b) ノードマウスの皮内へ再生毛包原基を移植して37日後の再生毛幹
- (c) ノードマウスの皮内へ再生毛包原基を任意の数で移植して再生した毛幹

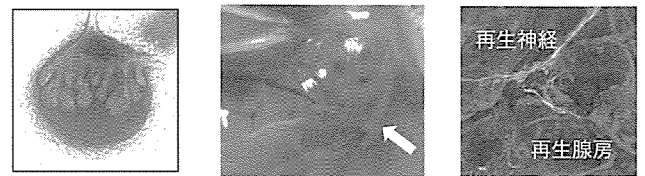
機械的外力を加えると、骨のリモデリングを介して再生歯が天然歯と同様に移動したことから、再生歯は歯根膜を介した歯の生理的機能を再生していることが示された⁽⁴⁾。

一方、歯には知覚性の三叉神経が侵入しており、歯の正常な機能発現と保護に重要である。再生歯の歯髄と歯根膜には、交感神経や知覚神経などの神経線維が侵入し、歯を削ったり、矯正の圧力に対する痛みを中枢神経系に伝達することが判明し、再生歯は神経機能も再生できる可能性が示された⁽⁴⁾。

4.2 機能的な毛包の再生

毛は、紫外線や外部からの傷害を防御するとともに、保温などの機能発現に関与し、成体の恒常性維持に寄与している。ヒトの場合には、男性型脱毛症や先天性の毛包形成不全、癬痕性脱毛などに対する新しい治療技術として、毛髪(毛包)再生が古くから期待されてきた。歯を含めて他の器官原基が胎児期にのみ誘導されるのに対して、毛包は一定期間ごとに毛包を作り直すヘアサイクルを有しており、成体になっても毛包を作り直すことができる上皮性幹細胞と間葉性幹細胞が毛包の中に蓄えられているため、器官再生の中で最も臨床応用の可能性が高いと考えられている⁽¹⁵⁾。毛包の再生には、毛の喪失部位に適した毛幹を、適正な密度で形成でき、その再生毛包は毛周期を有して永続的に毛包を再形成することが必要である。さらに再生毛包は、色素細胞による毛色形成に加え、立毛筋および神経線維が接続することにより立毛応答や感覚器として機能を回復するような、機能的な毛包再生が期待される。

私たちは、成体マウス頬ひげ毛包より取得した上皮幹細胞領域(バルジ)細胞と培養毛乳頭細胞より頬ひげ毛包原基(図4(a))を再生し、その機能的な再生を解析した⁽⁶⁾。再生頬ひげ原基をノードマウス背部皮膚内に移植すると、移植後3週間後には、約70%の頻度で正常な組織構造を有する再生頬ひげが発毛し(図4(b))、300日以上にわたり永続的なヘアサイクルを再現した。また再生体毛には、適切な位置に立毛筋が接続し、再生毛包および立毛筋に神経線維が接続した。毛包の再生部位にアセチルコリンを投与すると、再生毛の立毛が観察されたことから、再生毛包移植による再生技術は、立毛筋および神経などの周辺組織



(a) 再生唾液腺原基 (b) 再生唾液腺 (c) 神経組織の解析

図5 再生毛包原基移植による機能的な毛の再生

- (a) 器官原基法で再生した唾液腺原基. 器官培養, 3日目
- (b) 生体内で発生した再生唾液腺. 色素を注入し, 導管, 腺房に着色した
- (c) 再生唾液腺の組織構造, 糸状に見えるのは神経線維, リングに見えるものが筋上皮細胞

との接続を伴う機能的な再生が可能であることが示された。再生毛包原基から再生する毛包数は細胞操作により制御可能であり⁽⁹⁾、任意の数の再生毛包原基を移植することにより天然と同じ密度で再生することができることから、臨床応用への実現可能な再生技術になる可能性が示された(図4(c))。

4.3 機能的な外分泌腺の再生

私たちは、再生器官原基移植による器官再生の適用拡大に向けて、外分泌腺である唾液腺や涙腺の器官再生研究を行った⁽⁸⁾⁽⁹⁾。唾液腺や涙腺の分泌機能の低下はドライマウスやドライアイを惹起するため、幹細胞移入や器官再生による新たな治療法の開発が進められている。

胎児から採取した唾液腺並びに涙腺、ハーダー腺の上皮性幹細胞と間葉性幹細胞を用いて、器官原基法により再生唾液腺・涙腺・ハーダー腺原基をそれぞれ再構成したところ、器官培養において、正常な器官発生と同等の上皮組織の陥入と分泌腺特有の分岐構造が認められた(図5(a))⁽⁸⁾⁽⁹⁾。これらの再生分泌腺原基を、それぞれの外分泌器官を外科的に切除した欠損マウスに、導管接続可能な移植法により移植すると、レシピエントの導管上皮と再生分泌腺上皮の連結が確認されると共に、生体内で発生した再生唾液腺(図5(b))は天然の唾液腺と同様の腺房組織へと発生した。再生涙腺においても同様に涙腺の腺房組織が形成された。これらの再生分泌腺には神経が侵入し(図5(c))、唾液腺ではクエン酸刺激により、涙腺ではメントールを用いた冷温刺激によって再生分泌液の産生が認められ、それぞれの器官が存在する部位から求心性神経路を経て中枢に到達し、さらに遠心性神経路によりそれぞれの器官から分泌が誘導されたことから、生体の反応をも再生する機能的な外分泌腺の再生が実証された⁽⁸⁾⁽⁹⁾。

5. 器官再生医療に必要な技術開発

これまでの研究により、器官再生に向けて、幹細胞を三次元的に精密操作して組織化することによって立体的な器官の再生が可能であることが実証された。これを再生医療につなげていくためには、細胞操作だけでなく、機器やデバイスなど幅広い技術が必要である。

5.1 三次元的な組織の解析技術

生体外において、立体的な器官を製造し、医療へ応用するためには、その内部構造を解析し、製造物の品質管理をどうしていくかが大きな課題である。これまでの医学・生物学研究において、組織の内部構造の解析は、組織を切断して組織化学的に解析する方法や造影剤を用いた解析、硬組織ではX線などによる透過性の違いによって解析してきた。さらに最近では、蛍光物質や蛍光タンパク質などの材料開発や⁽¹⁶⁾、さまざまな波長域のレーザーを搭載した共焦点レーザー顕微鏡など画像解析機器の開発が進展し、組織を破壊することなく、より深部を解析することが可能となってきた⁽¹⁷⁾。顕微鏡開発では、顕微鏡の多光子共焦点レーザー顕微鏡により高感度化を図るとともに、組織のより深部まで測定することが可能となりつつある。さらにレーザーシート状に幅広い角度から組織に当てることによって短時間で効率よく解析するLight-sheetレーザー顕微鏡なども開

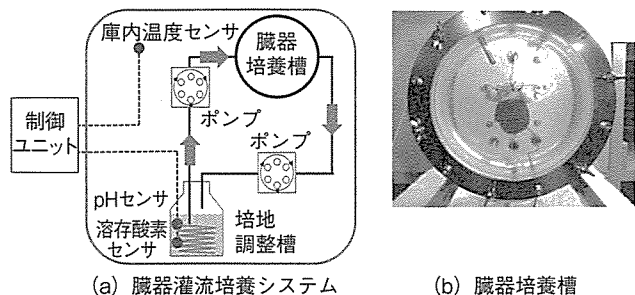


図6 開発中の臓器灌流培養システム

- (a) 灌流培養システムの回路の概略
- (b) 臓器に負担をかけないため、臓器は液体中で浮遊させて培養する。

発され、光の毒性を最低限に抑えながら多量のデータを扱うことが可能となり、画像解析システムは大きな発展を遂げつつある^{(18)~(20)}。

再生器官原基、あるいは将来の器官再生医療システムを確立するには、器官原基の発生過程における内部構造の評価や、再生製造物としての品質管理に向けて、生化学的な機能評価に加え、非破壊的に内部構造を評価することが必要である。今後、さらに三次元的に大きな製造物に対応しうる画像解析機器とその解析システムは重要な開発課題である。

5.2 生体外における立体的な器官の維持と育成

器官再生医療の実現に向け、生体外で器官、臓器を培養し、器官の維持や育成を可能とするシステムの開発が期待されている。しかしながら、生体内のような高細胞密度の三次元的な器官や組織の構造を維持した状態で、生体外で維持するような培養技術開発は達成されていない。

私たちの体は、三次元的な細胞の空間配置により機能的な器官が作られており、この器官機能と恒常性を生涯にわたり維持している。この細胞の配置には、生体内における三次元的な血管網が、ガス交換や物質運搬など、重要な役割を果たしている。そのため立体的な器官を維持、育成するためには、生体内の仕組みを応用した培養技術の開発が必要だと考えられている。私たちは、器官機能を維持するには、生体の血液循環の仕組みを再現することが最も効果的と考え、生体内諸器官の機能を代替する仕組みを組み込んだ「三次元臓器灌流培養システム」の開発を進めている(図6)。この技術開発は、生体外における摘出臓器の長期保存のための医療用機器として、移植用臓器の不足を改善し、より多くの患者が臓器移植を受けられる技術へと発展させる可能性も秘めている。さらに再生臓器を生体外で製造するために必要な技術となることが期待される。こうした機器開発は、再生医療の実現化に不可欠であるとともに、日本の医療産業の育成に向けて重要な課題であると考えられる。その課題解決に向けて、医学・生物学における研究者と機械工学系の研究者が連携して、医療ニーズに対応した研究開発が期待される。

6. 今後の課題と展望

器官原基再生のコンセプトが提唱されてから、30年余りにわたり進められてきた再生器官原基移植による器官再生治療の技術開発は最近の研究により大きな進展を遂げ、歯のみならず毛包や分泌腺の機能的な再生の実証により、その実現可能性が示された。今後、器官原基からの器官再生を实用化レベルに到達させるには、器官を誘導できる上皮性、並びに間葉性幹細胞が必要である。器官誘導は胎児期に起こるため、毛包を除いてほとんどの器官では器官誘導能のある幹細胞は知られておらず、細胞サイズは大きな課題である。免疫学的な拒絶反応を回避するには、患者本人に由来する細胞を用いて器官を再生することが必要であり、器官誘導能のある幹細胞サイズの探索研究や、多能性のiPS細胞やES細胞を利用した研究開発も期待される⁽¹²⁾。

また、生体外で三次元的な組織や器官を培養する技術開発は十分ではなく、三次元的な培養システムの開発も器官

再生には必要な技術開発である。そのためには三次元的な立体器官を保持するための機能性材料や三次元的な血管網による培養技術の開発も期待される。今後、三次元的な器官再生の実現には細胞操作技術や培養技術、培養関連の機器など幅広い基盤技術の研究開発が期待される。

(原稿受付 2013年10月30日)

●文 献

- (1) Ikeda, E., ほか, Growing Bioengineered Teeth from Single Cells: Potential for Dental Regenerative Medicine, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **8** (2008), 735-744.
- (2) Copeland, J.G., ほか, Cardiac Replacement with a Total Artificial Heart as a Bridge to Transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **351** (2004), 859-867.
- (3) Nakao, K., ほか, The Development of a Bioengineered Organ Germ Method, *Nat. Methods.*, **4** (2007), 227-230.
- (4) Ikeda, E., ほか, Fully Functional Bioengineered Tooth Replacement as an Organ Replacement Therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (2009), 13475-13480.
- (5) Oshima, M., ほか, Functional Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth Unit as a Mature Organ Replacement Regenerative Therapy, *PLoS ONE*, **6-7** (2011), e21531.
- (6) Toyoshima, K., ほか, Fully Functional Hair Follicle Regeneration through the Rearrangement of Stem Cells and Their Niches, *Nat. Commun.*, **3** (2012), 784.
- (7) Asakawa, K., ほか, Hair Organ Regeneration via the Bioengineered Hair Follicular Unit Transplantation, *Sci. Rep.*, **2** (2012), 424.
- (8) Ogawa, M., ほか, Functional Salivary Gland Regeneration by Transplantation of a Bioengineered Organ Germ, *Nat. Commun.*, **4** (2013), 2498.
- (9) Hirayama, M., ほか, Functional Lacrimal Gland Regeneration by Transplantation of a Bioengineered Organ Germ, *Nat. Commun.*, **4** (2013), 2497.
- (10) Michos, O., Kidney Development: from Ureteric Bud Formation to Branching Morphogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19** (2009), 484-490.
- (11) Hardy, M.H., The Secret Life of the Hair Follicle, *Trends Genet.*, **8** (1992), 55-61.
- (12) Yen, A.H., ほか, Stem Cells and Tooth Tissue Engineering, *Cell Tissue Res.*, **331** (2008), 359-372.
- (13) Atala, A., Tissue Engineering, Stem Cells and Cloning: Current Concepts and Changing Trends, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **5** (2005), 879-892.
- (14) Hu, B., ほか, Tissue Engineering of Tooth Crown, Root, and Periodontium, *Tissue Eng.*, **12** (2006), 2069-2075.
- (15) Oshima, H., ほか, Morphogenesis and Renewal of Hair Follicles from Adult Multipotent Stem Cells, *Cell*, **104** (2001), 233-245.
- (16) Fernández-Suárez, M., ほか, Fluorescent Probes for Super-resolution Imaging in Living Cells, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9** (2008), 929-943.
- (17) Megason, S., ほか, Digitizing Life at the Level of the Cell: High-performance Laser-scanning Microscopy and Image Analysis for in Toto Imaging of Development, *Mech. Dev.*, **120** (2003), 1407-1420.
- (18) Keller, P., ほか, Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy, *Science*, **322** (2008), 1065-1069.
- (19) Truong, T., ほか, Deep and Fast Live Imaging with Two-photon Scanned Light-sheet Microscopy, *Nat. Methods*, **8** (2011), 757-760.
- (20) Eliceiri, K., ほか, Biological Imaging Software Tools, *Nat. Methods*, **9** (2012), 697-710.

MEMS 技術を応用した再生工学

Regenerative Engineering Based on MEMS Technologies

須藤 亮

Ryo SUDO

◎2005年慶應義塾大学大学院博士課程修了，博士（工学）。2005年同大学助手。2006年マサチューセッツ工科大学ポスドク研究員。2009年慶應義塾大学専任講師を経て，2012年より現職

◎研究・専門テーマは，組織工学，生体工学，BioMEMS

◎正員，慶應義塾大学准教授 理工学部システムデザイン工学科
(〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1/
E-mail : sudo@sd.keio.ac.jp)



1. はじめに

MEMSとはMicro Electro Mechanical Systemsの頭文字であり，微細加工技術を利用して集積化したデバイスのことである。もともとはマイクロエレクトロニクスの分野で発展を遂げ，マイクロマシン技術と融合した微細加工技術であるが，細胞培養表面のマイクロパターン加工に用いられることでMEMS技術が細胞培養に応用されるようになった。たとえば，細胞をさまざまな大きさの円形領域に限定して培養したり，ネットワーク状やストライプ状にデザインされた領域で培養したりするような二次元培養への応用から始まった⁽¹⁾。また，MEMS技術を利用して透明なシリコンゴムの表面に微細加工を施し，カバーガラスに貼り付けることで液体を流すことのできる微小な空間（マイクロ流路）が生まれる。このマイクロ流路に細胞を流し込むことで微小空間での培養が可能となった⁽²⁾。さらに，マイクロ流路にハイドロゲルを組み合わせた三次元培養への応用も行われている⁽³⁾。これらのMEMS技術を応用した培養法は，従来から医学・生物学の分野で行われてきた二次元培養に比べると画期的な方法であり，近年急速に発展している。実際，学術文献データベースWeb of Scienceにおいて“microfluidic”というキーワードに関連の発表論文数を調べてみると，2000年以降に急激に増加していることがわかる（図1）。

バイオエンジニアリングの分野では，MEMS技術を利用した新しい培養手法を用いて細胞機能の解明や組織再生に関する研究が近年活発に進められている。たとえば，血管・神経・肝臓・腎臓・膵臓・肺・小腸など，さまざまな臓器に由来する細胞の培養が試みられているが，本稿では，

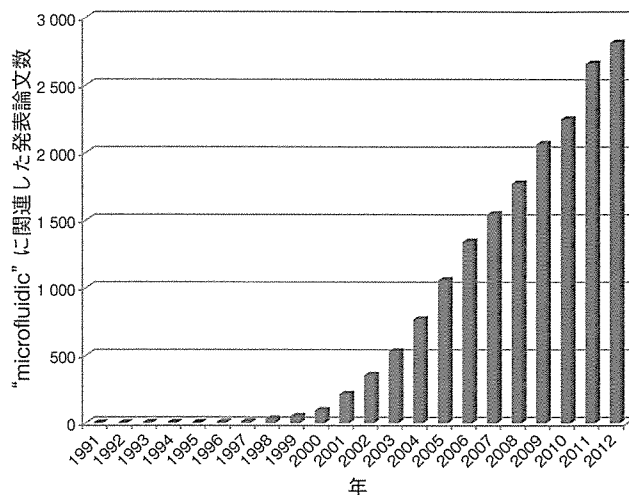


図1 “microfluidic”に関連した発表論文数の推移

筆者らが行ってきた肝臓や毛細血管の再生に関する研究事例を中心として，MEMS技術を応用した再生工学について紹介する。

2. マイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスとは，MEMS技術を利用して作製したマイクロ流路を有するデバイスのことである。とくに，マイクロ流路パターンの微細加工が施されたシリコンゴムにプラズマを照射してカバーガラスと貼り合わせたタイプのものが細胞培養によく用いられている（図2）。このようなマイクロ流体デバイスはソフトリソグラフィと呼ばれる方法で作製され，流路の大きさは細胞のサイズが5~20 μm 程度であることを考慮して，数十~数百 μm 程度のものが用いられることが多い。筆者らが使用しているマイクロ流体デバイスでは，カバーガラスとシリコンゴムをプラズマ接着した後にコラーゲンゲルを注入することでマイクロ流路が形成され，その高さは150 μm ，幅が500 μm 程度の大きさである（図2）⁽⁴⁾。

マイクロ流体デバイスを用いると，従来から細胞培養のために広く用いられてきた培養皿や培養フラスコに比べて，微小培養環境をコントロールしやすくなる。従来の培養法では，細胞が二次元平面上で培養され，培養液が満たされた静置環境で培養が行われていた。これに対して生体内の環境では，細胞は単なる二次元構造を形成しているだけでなく，管構造やシート構造の組合せによる秩序だった三次元構造を形成している。また，生体組織中の細胞は，静置環境におかれているのではなく，血流などに起因する

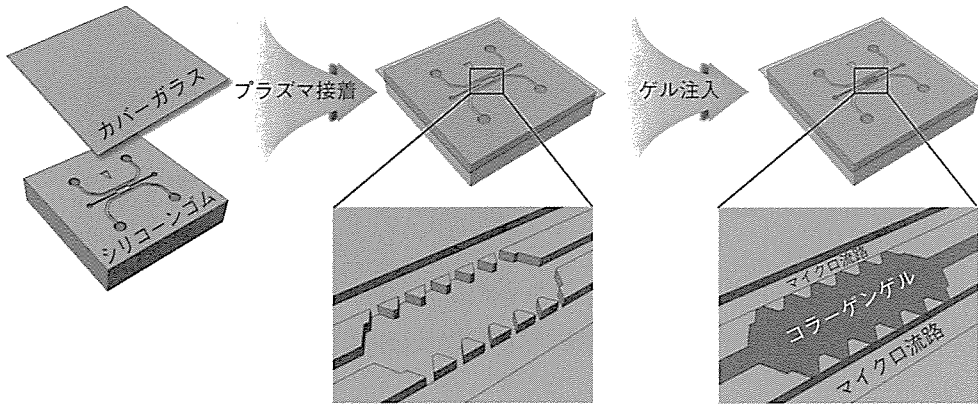


図2 マイクロ流体デバイス

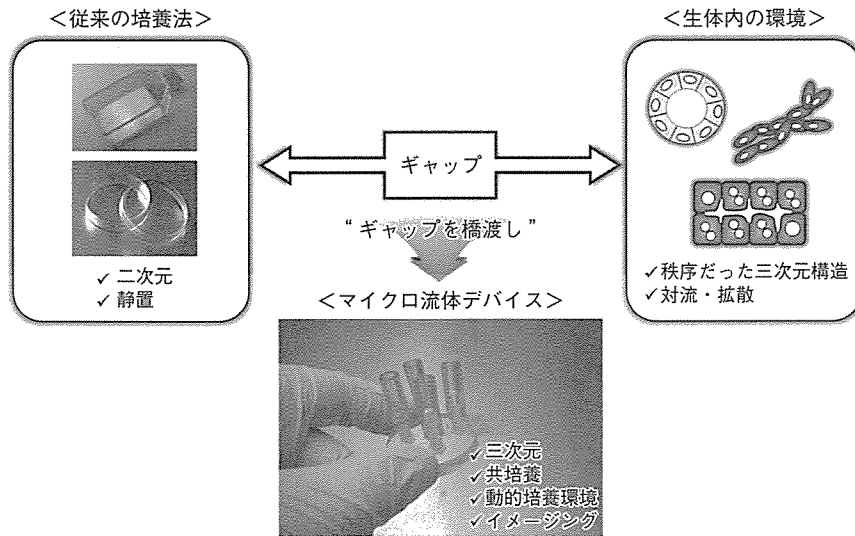


図3 マイクロ流体デバイスによる生理的微小培養環境の再現

動的な環境下にさらされている。したがって、従来の培養法と生体内の環境には大きなギャップがあり、生体外の培養において細胞の機能や形態形成のポテンシャルを引き出すためには、より生理的な環境を作り出す必要があった。MEMS 技術を用いたマイクロ流体デバイスは、工学的なアプローチにより、このギャップを橋渡しする新しい培養ツールとして期待されている (図 3)。

マイクロ流体デバイスを用いることによって微小培養環境をコントロールしやすくなるが、たとえば以下のような点において優れている。

(1) イメージングが容易である。

マイクロ流体デバイスを用いてさまざまなタイプの細胞の三次元培養が行われているが、カバーガラスを介して細胞に近接して観察ができるためタイムラプスイメージングなどのライブセルイメージングを行いやすい。たとえば、血管形成を観察する場合には、血管内皮細胞がコラーゲンゲルの中を三次元的に移動していく様子を観察する必要がある。通常の培養皿を用いた培養法の場合には細胞を固定・染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて z 軸方向の連続画像 (z-stack) を取得しなければならない。とくに、血管の深さ方向への分布を観察するためには、z-stack 画像から三次元再構築し、疑似的に断面を表示させる必要がある。一方で、マイクロ流体デバイスを用いると、マイクロ流路とコラーゲンゲルの位置関係のデザインを工夫することで

血管が伸びていく様子を位相差顕微鏡で直接観察することができる。

(2) 細胞配置を時間的・空間的にコントロールできる。

細胞という部品を組み立てて、まとまった組織を構築していくためには、細胞の配置や組合せを時々刻々と変化させる必要がある。すなわち、細胞のもつポテンシャルを最大限に発揮させるための環境が必要となる。マイクロ流体デバイスを用いると、マイクロ流路の数やそのデザインを工夫することで、異なるタイプの細胞をごく近傍に配置して培養したり、まず一つ目のタイプの細胞を培養してから二つ目のタイプの細胞を追加したりすることができる。

(3) 液性因子の蓄積効果が強化される。

マイクロ流体デバイスで細胞を培養すると、培養皿や培養フラスコなどで培養する場合に比べて、必要となる培養液の量が極めて少ない。そのため、細胞が分泌した増殖因子などの液性因子が培養液中に蓄積し、分泌した細胞自身にシグナルを伝える自己分泌の効果が強められる。また、ある細胞が分泌した液性因子が拡散によって近傍にいる別の細胞に届くことによってシグナルが伝わる傍分泌の効果も強められる。したがって、これまでの培養法では見られなかった細胞間相互作用が、マイクロ流体デバイスでの培養によって初めて見えてくることがある。

(4) 間質流を負荷することができる。

筆者らが使用しているマイクロ流体デバイスには二つの

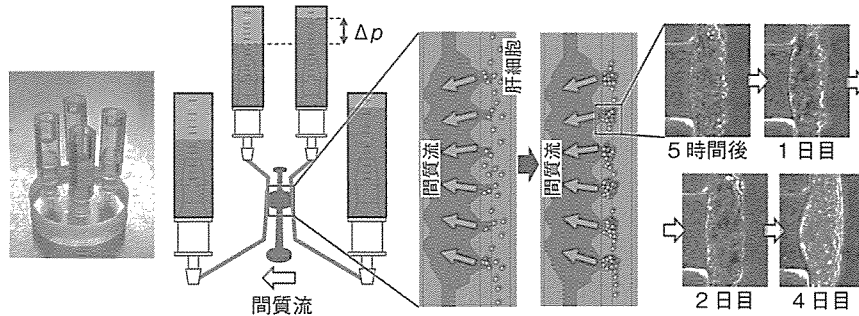


図4 間質流制御による三次元肝組織の構築

マイクロ流路の間がハイドロゲルでつながれた構造になっている。そのため、流路の出口にチューブを接続し、培養液の液面差をつけることで二つのマイクロ流路間に圧力差をつくり、これによりゲルを透過する流れ（間質流）を生じさせることができる（図4）。間質流は、血管形成に影響を与える生体力学的因子の一つである。

3. マイクロ流体デバイスによる再生工学

3.1 肝臓の再生

肝臓は合成・代謝・解毒などを担う生命維持に不可欠な臓器であるが、肝臓の機能が損なわれた場合の最終的な治療法は現在のところ肝移植しかない。とくに、心臓や腎臓が埋込み型のポンプや人工透析などで機能を代替できるのに対して、肝臓の機能は人工物で代替させることができない。したがって、肝移植のドナー不足を解消するためには、肝細胞から肝組織を再構築する必要がある。こういった背景から、肝臓再生を目指した研究が行われている。

筆者はバイオエンジニアリングの観点から肝臓の再生現象に興味を持ち、肝臓に関する組織工学の研究を始めた。当初は、肝細胞の自己組織化能力を発揮するような共培養や、多孔性薄膜を用いた三次元培養を行い、ある程度の肝組織が再生されることがわかった⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾。ところが、培養皿を用いた培養では、いったん細胞を播種すると培養液の組成を変える程度の調節しかできず、基本的には静置培養の中で細胞の自己組織性に任せて顕微鏡で見守ることしかできない。そのような中で、なんとかもっと積極的に組織再生を“エンジニアリング”できるような手法がないものかと感じていた。そのような中でマイクロ流体デバイスに出会ったのである。

マイクロ流体デバイスで肝細胞を培養する場合、マイクロ流路から肝細胞を流し込んで流路表面で培養することができる。ただし、それだけでは二次元培養になってしまうのでなんらかの工夫をする必要がある。たとえば、マイクロピラを並べることで肝細胞を流れの中で堰き止め、三次元培養することができる⁽⁸⁾。このような方法でも肝細胞は三次元組織を形成し、機能も維持されるが、筆者らの手法ではマイクロピラの代わりにコラーゲンゲルをマイクロ流路の中に組み込み、間質流のもとで培養することによって肝細胞の三次元組織を形成した（図4）⁽⁹⁾。マイクロ流体デバイスを用いて間質流を発生させ、その中で肝細胞を培養することで、肝細胞同士の接着が促進され、播種直後か

ら1日流れをかけると、その後は間質流がなくても三次元組織形成が進むことを見出した。培養開始直後には一つ一つの肝細胞の輪郭が見えていたが、培養4日目になると互いに融合し滑らかな表面の三次元組織が形成される（図4）。このようにして肝細胞を培養すると、長期間培養が可能になり、肝細胞の機能も維持される。

肝臓の再生を目指して肝細胞の三次元培養を行ってきたが、実際に肝細胞が何層にも重なった三次元組織を構築できるようになると、次の課題が見えてきた。それは、血管の再生である。なぜならば、細胞を二次元で培養しているときは細胞が培養液に直接接しているために酸素や栄養を容易に受け取ることができる。ところが、三次元培養で分厚い組織を構築できるようになると、組織内部の細胞は組織表面からの拡散によって酸素と栄養を受け取ることになる。生体組織における拡散輸送の限界は200 μm程度であると言われており、それ以上分厚い組織を再生しようとすると、組織内部に血管を導入することが必要になってくる。実際、肝臓の微細構造を見てみると、肝細胞索と呼ばれる肝細胞の領域と類洞と呼ばれる肝臓特有の毛細血管構造が交互に並んだ構造になっており、血管網が細かく張り巡らされている。そこで、次のステップとして毛細血管網の再生にも取り組んでいる。

3.2 血管の再生

マイクロ流体デバイスでは、血管内皮細胞が毛細血管網を構築するプロセスを容易に観察することができる。血管形成は、再生医療やがんの生物学において非常に重要な現象であり、国内外のグループによって活発に研究されている。近年、マイクロ流体デバイスを用いた血管新生モデルも報告されるようになった。肝細胞の培養では、マイクロ流路の中で無数の肝細胞を積み重ねて三次元組織を構築したが、血管内皮細胞を培養する場合にはマイクロ流路の内壁を一面に覆うように培養する。マイクロ流路に流し込まれた血管内皮細胞は流路内壁に接着して単層構造を形成する。筆者らの用いているマイクロ流体デバイスでは流路壁面の一部がコラーゲンゲルになっているため、コラーゲンゲルに接着した血管内皮細胞は、培養液に血管内皮増殖因子のような血管形成を刺激する因子が含まれているとコラーゲンゲルの中に潜り込み血管の芽（スプラウト）を形成する。さらに、血管はゲル内部に伸長し、最終的には毛細血管様の三次元ネットワーク構造を形成する⁽¹⁰⁾。このモデルでは、血管内皮細胞に内壁を一面に覆われたマイクロ流路を既存血管とみなすことができ、コラーゲンゲル内部に形成される血管が新生血管となる。このモデルで血管形

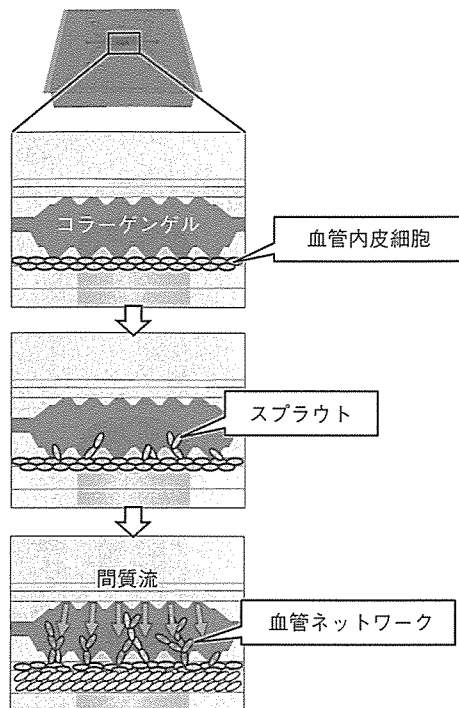


図5 血管ネットワークの再構築

成に対する間質流の影響を調べることもできる (図5)。

筆者らの最近の研究では再生毛細血管の安定化に取り組んでいる。血管内皮細胞のみで培養を行うと血管ネットワークを形成するものの、ある日突然細胞が死んでしまうような現象が起こる。生体内では新しく血管が形成されると、ペリサイトと呼ばれる細胞が血管を外側から包み込むことで新生血管を安定化することが知られている。ところが、ペリサイトについては不明な点も多く実験動物から分離することも難しい。そこで、ペリサイトに分化することが知られている間葉系幹細胞との共培養を行っている⁽¹¹⁾。間葉系幹細胞を加える場所や時間、播種濃度などを最適化する必要があるが、間葉系幹細胞から分化したペリサイトが、血管ネットワークを外側から包み込むような毛細血管構造を生体外で再現できるようになってきた。こうしてできた血管は、内径 $10 \mu\text{m}$ 以下で、内腔の連続した毛細血管ネットワークを構築する。今後さらに研究を進め、前述した肝細胞の三次元組織との融合を図ることで「血の通った臓器」の再生を目指したい。

4. おわりに

MEMS 技術を応用したデバイスを医学・生物学における研究に応用することで、エンジニアがライフサイエンスの研究の場で活躍する機会が増えている。従来の還元論的な考え方に基づく分子生物学的な手法によって細胞機能や細胞内シグナル伝達など、さまざまなメカニズムが明らかにされてきた。これらの研究成果によって組織再生に関する研究も大きく発展を遂げてきたが、細胞から組織を再生する組織工学の研究においては構成論的なアプローチも重要となる。すなわち、細胞を部品として見立て、これらの部品をどのような組合せで、どのような順序・タイミングで、さらにはどのような場で、組み合わせていくと組織・臓器を完成させることができるのかという点についても考

えなくてはならない。すなわち、組織を壊して理解するのではなく、創って理解することも必要である。このように組織を創って理解するための細胞培養プラットフォームとしてマイクロ流体デバイスの利用価値がある。

マイクロ流体デバイスのような新しい培養ツールを用いることで、再生工学における新しい展開も始まっている。肝臓や血管などのような個別の組織・臓器を再生させるだけでなく、これらをマイクロ流路でつなぐことで、多臓器ネットワークのモデルをチップ上で再現する *Organs on a chip* あるいは *Human on a chip* という新しい研究領域として発展しようとしている。すなわち、ヒトの体内の細胞動態について臓器間相互作用も含めて再現しようという試みである。ヒト由来の細胞を用いてこのようなデバイスを構築することが可能になると、再生医療のみならず、創薬研究や病態メカニズムの解明にも役立てることができ、動物実験を代替することも期待されている。最近、アメリカのハーバード大学や MIT のグループを中心にこのような研究が活発に推進されているが、日本においても再生工学の新しい展開として発展していくことを願っている。

(原稿受付 2013 年 10 月 24 日)

●文献

- (1) Bhatia, SN., Balis, UJ., Yarmush, ML. and Toner, M., Effect of Cell-cell Interactions in Preservation of Cellular Phenotype: Cocultivation of Hepatocytes and Nonparenchymal Cells, *FASEB J.*, **13-14** (1999), 1883-1900.
- (2) Inamdar, NK. and Borenstein, JT., Microfluidic Cell Culture Models for Tissue Engineering, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22-5** (2011), 681-689.
- (3) Chung, S., Sudo, R., Vickerman, V., Zervantonakis, IK. and Kamm, RD., Microfluidic Platforms for Studies of Angiogenesis, Cell Migration, and Cell-cell Interactions, *Ann. Biomed. Eng.*, **38-3** (2010), 1164-1177.
- (4) Shin, Y., Han, S., Jeon, JS., Yamamoto, K., Zervantonakis, IK., Sudo, R., Kamm, RD. and Chung, S., Microfluidic Assay for Simultaneous Culture of Multiple Cell Types on Surfaces or within Hydrogels, *Nat. Protoc.*, **7-7** (2012), 1247-1259.
- (5) Sudo, R., Ikeda, S., Sugimoto, S., Harada, K., Hirata, K., Tanishita, K., Mochizuki, Y. and Mitaka, T., Bile Canalicular Formation in Hepatic Organoid Reconstructed by Rat Small Hepatocytes and Nonparenchymal Cells, *J. Cell Physiol.*, **199-2** (2004), 252-261.
- (6) Sudo, R., Kohara, H., Mitaka, T., Ikeda, M. and Tanishita, K., Coordinated Movement of Bile Canalicular Networks Reconstructed by Rat Small Hepatocytes, *Ann. Biomed. Eng.*, **33-5** (2005), 696-708.
- (7) Sudo, R., Mitaka, T., Ikeda, M. and Tanishita, K., Reconstruction of 3D Stacked-up Structures by Rat Small Hepatocytes on Microporous Membranes, *FASEB J.*, **19-12** (2005), 1695-1697.
- (8) Toh, YC., Zhang, C., Zhang, J., Khong, YM., Chang, S., Samper, VD., van, Noort, D., Huttmacher, DW. and Yu, H., A Novel 3D Mammalian Cell Perfusion-culture System in Microfluidic Channels, *Lab Chip.*, **7-3** (2007), 302-309.
- (9) Sudo, R., Chung, S., Zervantonakis, IK., Vickerman, V., Toshimitsu, Y., Griffith, LG. and Kamm, RD., Transport-mediated Angiogenesis in 3D Epithelial Coculture, *FASEB J.*, **23-7** (2009), 2155-2164.
- (10) Chung, S., Sudo, R., Zervantonakis, IK., Rimchala, T. and Kamm, RD., Surface-treatment-induced Three-dimensional Capillary Morphogenesis in a Microfluidic Platform., *Adv. Mater.*, **21-47** (2009), 4863-4867.
- (11) Yamamoto, K., Tanimura, K., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., Chung, S., Kamm, RD., Ikeda, M., Tanishita, K. and Sudo, R., The Stabilization Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Formation of Microvascular Networks in a Microfluidic Device, *J. Biomech. Sci. Eng.*, **8-2** (2013), 114-128.

事例紹介

組織無細胞化技術による再生医療

Regenerative Medicine by Tissue-decellularization Technology

岩崎 清隆

Kiyotaka IWASAKI



◎2002年早稲田大学大学院理工学研究科機械工学専攻博士課程修了, 博士(工学), 2001年理工学部機械工学科助手, 大学院生命理工学専攻助手, 2004年先端科学・健康医療融合研究機構講師, 2004年Harvard Medical School Brigham and Women's Hospital Research Scientist, 2007年早稲田大学高等研究所准教授等を経て, 2013年より現職

◎研究・専門テーマは, 体内で自己化する無細胞化組織の開発研究, 循環器系医療機器の耐久性, 血液適合性の生体代替評価法の開発

◎正員, 早稲田大学准教授 理工学術院先進理工学研究科 共同先端生命医科学専攻
(〒164-8480 東京都新宿区若松町 2-2 TWIns 早稲田大学先端生命医科学センター 03C204/
E-mail: iwasaki@waseda.jp)

1. はじめに

わが国は世界より一歩先に超高齢化社会に突入し, 生涯アクティブに生きることへの国民の関心が高まる中で, 医療に貢献する機械工学, 産業創出への期待はますます高まっている。政府も, 日本再興戦略のいわゆる「三本の矢」の第三の矢の中で医療産業を成長戦略として位置づけている。医療製品・医療技術を実用化するために必須の「薬事法」は, 名称が示すように医薬品を主体として作られており, 医薬品等という形で医療機器に適用されてきた。「薬事法の一部を改正する法律」が2013年11月20日に成立し, 「医薬品, 医療機器等の品質, 有効性及び安全性等に関する法律」と明確に医療機器が位置づけられる。医療機器は独立した章となり, 医療機器の特性を踏まえた内容になる。体性幹細胞等を用いた臨床研究や, 今後予測されるiPS細胞やES細胞を用いた技術の臨床応用にも対応するため, 「再生医療等の安全性の確保に関する法律」も2013年11月20日に同じく成立し, 医療産業を取り巻く法的整備も準備されつつある。

われわれは医療の現実を直視し, 機械工学を基盤として, 医療の現場が抱える課題を解決するための医工学研究を推進している⁽¹⁾⁽²⁾。革新性のある医療機器であるほど, 既存の評価試験法では安全性と有効性に関わる評価が不十分であることが多く, 実用化への障壁となる。生体のモデリング・シミュレーション技術を発展させ, とくに動物, ヒトによる評価が困難で科学的評価法の開発が期待されている

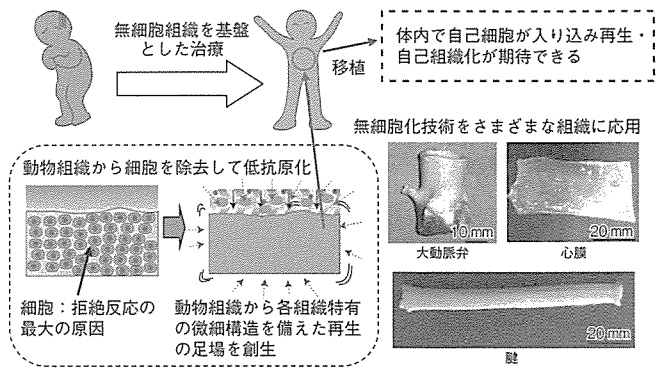


図1 組織無細胞化技術による再生医療

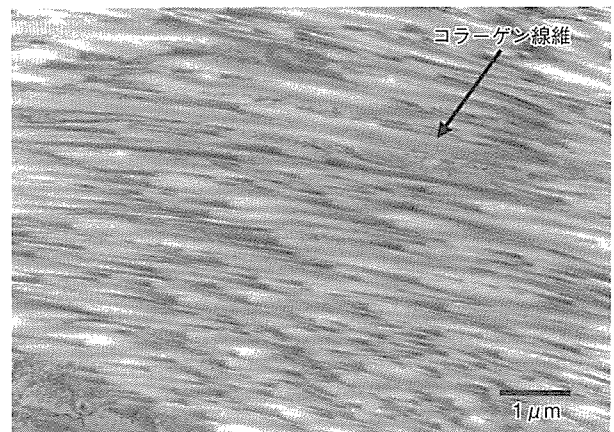


図2 ウシ側副靭帯の透過型電子顕微鏡像
コラーゲン線維が荷重が作用する方向に沿って配列。

耐久性評価試験法および血液適合性試験法の開発に注力している。同時に, 革新的医療機器の開発に取り組んでいる。本稿では, 組織無細胞化技術による再生医療という, 生体内の自己治癒能力を引き出す究極の医療機器開発への取り組みを紹介する。

2. 脱細胞化組織とは

われわれは, 動物由来組織から拒絶反応の原因となる細胞成分を除去し, 残った各組織固有の微細構造を維持した組織を再建治療組織として応用する研究を推進している(図1)。この無細胞化した組織は, 移植後に体内で自己細胞が入り込み, 細胞が組織成分を作り出すため, 自己組織化する再生促進型移植組織となり得る。血管, 弁, 靭帯, 腱, 神経等, 各組織には固有の三次元構造があり, コラーゲンや弾性線維等の生体高分子で構成され, 機能面等から適した構造になっている(図2)。

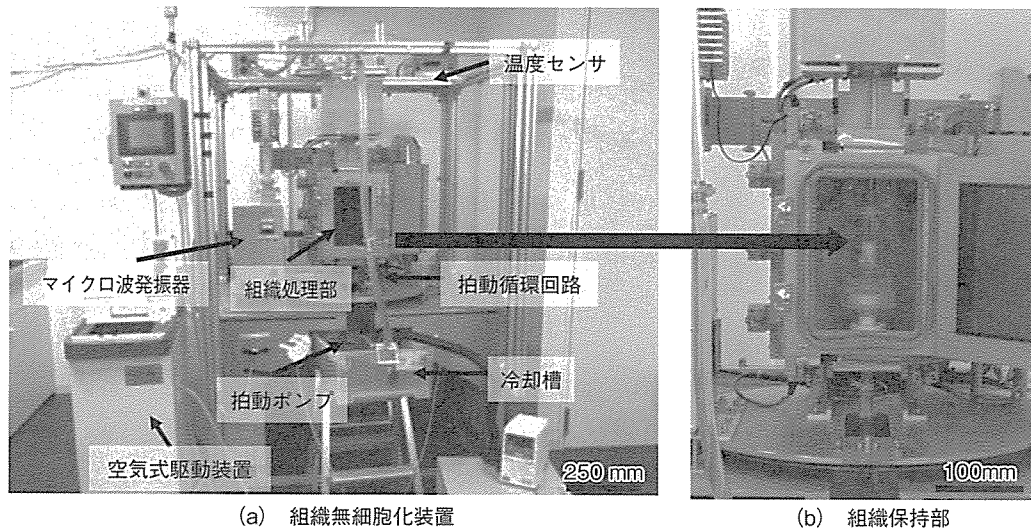


図3 マイクロ波照射と界面活性剤の拍動循環を複合的に作用させて細胞を除去する組織無細胞化装置

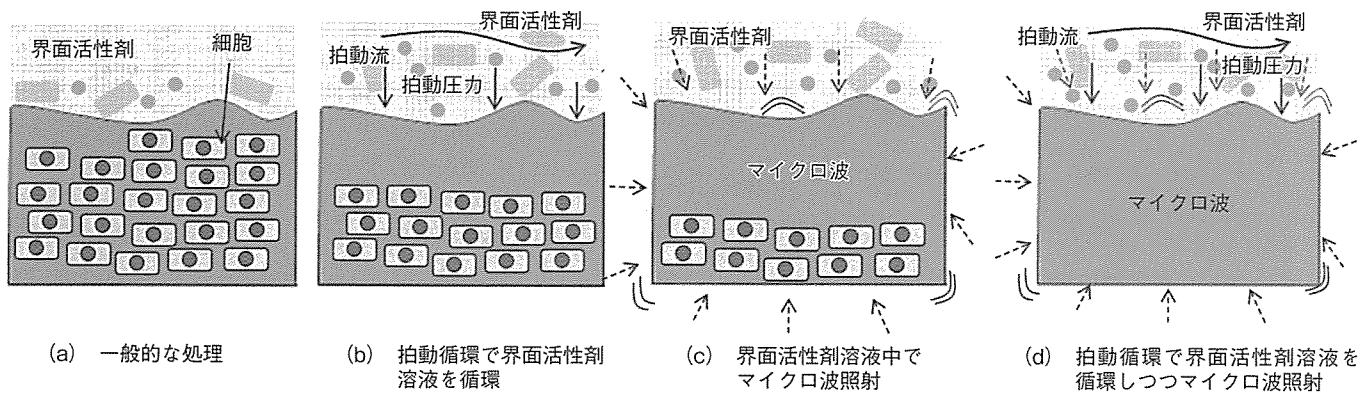


図4 界面活性剤溶液の拍動循環とマイクロ波照射による組織無細胞化処理の概念図

ヒトのドナー組織や、ブタ、ウシ、ウマの動物由来の小腸粘膜下組織、心膜、表皮、膀胱等を脱細胞化した組織は、これまで欧米で100万例以上の患者の外科手術で再建材料として使用されている⁽³⁾。現在、治療が十分にない厚い組織、臓器をターゲットとした研究が注目されている⁽⁴⁾。動物由来の無細胞化組織を治療応用する実用化を目指した技術開発研究における最大の課題は、拒絶反応の原因となる細胞成分を完全除去し、かつ、組織を損傷せずコラーゲン・弾性線維等の組織骨格を保持するという、相反する2点を両立させることである。脱細胞化研究は、界面活性剤、酵素、高浸透圧溶液等を用いて国内外で行われているが、薬剤処理の濃度を上げると細胞の除去率は向上するが組織骨格を損傷してしまうため、製品化されているものはいずれも厚さ数百 μm 程度の薄い組織に限定されている⁽⁵⁾。

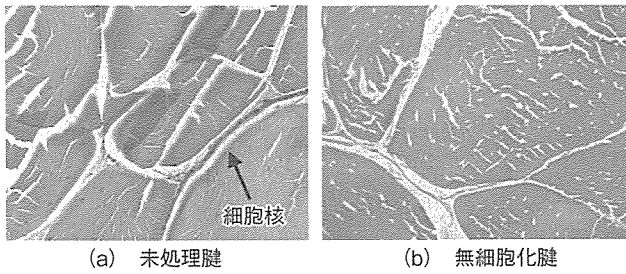
3. 組織無細胞化技術

われわれは、厚さ4mm以上に及ぶ組織から、屋台骨の組織構造を損傷せずに細胞を特異的に除去する組織無細胞化技術を開発した⁽⁶⁾。具体的には、①水分子の共振現象に着目してマイクロ波(24.5GHz)を照射しながら、②拍動血流・血圧で細胞膜を溶解する界面活性剤を循環させて処理する、二つの動的作用で複合的に処理する無細胞化処理

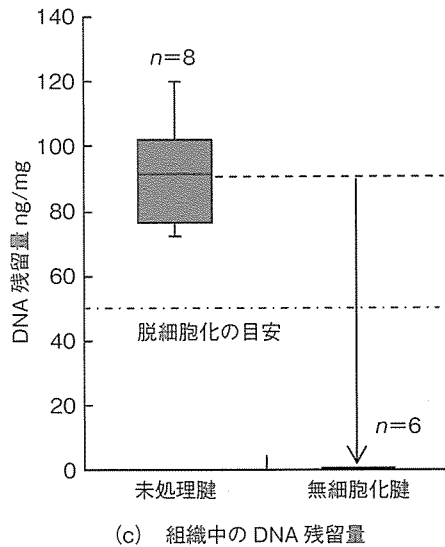
技術である(図3)。マイクロ波の照射は、水分子の振動エネルギーを活用すること、界面活性剤の拍動循環は、生体内の拍動血流・血圧循環環境が組織内への物質輸送と老廃物の除去の点で優れているという仮説から行ったものである(図4)。マイクロ波を連続照射すると電子レンジでお弁当を温めすぎた経験があるようにカチカチのホルモン焼き(!?)ができてしまうため、生体高分子が熱で変性しないように37℃以下で処理するよう循環液の温度をモニタリングし、マイクロ波のオン・オフを自動制御している。これまでに、ブタの大動脈弁(大動脈基部厚さ約3mm)やウシ腱(幅約10mm、厚さ約4mm)等の厚い組織から、弾性率や破断強度を保持したまま細胞核を除去することに成功している。組織内のDNA残留量を一般的な脱細胞化手法の1/100以下にできるため、「無細胞化」と呼んでいる(図5)。

4. ブタ大動脈弁の動物実験

心臓弁が閉鎖不全や狭窄等が原因で著しく機能しなくなった場合には、人工弁置換術によって機能改善が図られる。人工弁置換術は、日本では年間10000例、アメリカでは年間約60000例程度行われている。現在ある機械弁では、一生の抗凝固療法が必要である。グルタールアル



(a) 未処理腱 (b) 無細胞化腱



(c) 組織中の DNA 残留量

図5 本無細胞化処理技術で組織中の DNA 残留量を pg/mg オーダまで除去

デハイドで化学固定処理された生体弁では、石灰化や変性が課題であり、耐久性が十数年と限界がある⁽⁷⁾。

ブタ大動脈弁を手術と同様に清潔操作で採取して、あらかじめ滅菌した回路に組み込んで無細胞化処理した大動脈弁を異なるブタの下行大動脈に移植して機能を検証する実験を東邦大学心臓血管外科の尾崎重之教授と行ってきた(図6)。ドナー組織を無細胞化処理して患者に移植することに相当するものである。血液循環系の中で平均血圧 100 mmHg 程度と高い圧力負荷の作用する大動脈環境で、瘤化や狭窄の問題なく 1 年間機能することを明らかにした。移植されたブタ自身の細胞が無細胞化組織に入り込み、血液接触面は血管内皮細胞という生体内で本来備わっている細胞で覆われることが判明した。臨床製品の生体弁での課題である石灰化を抑制できるという知見も得られている。

5. 組織滅菌技術

動物由来の無細胞化組織の実用化には滅菌が不可欠である。医療機器の滅菌で一般的なガンマ線滅菌では、生体組織を著しく損傷し、強度低下を引き起こすことがわかっている。これまでに、水との結合に着目して組織前処理法について工夫し、凍結乾燥してエチレンオキシドガス滅菌すると変化してしまう組織の破断強度や粘弾性特性といった力学特性を未処理組織と同等に保持できる組織前処理条件について検討を重ねてきた。凍結乾燥後に低温でエチレンオキシドガス滅菌を行い、使用前に再水和させることで、幅 4 mm のウシ腱について強度保持を実現している。

6. 実用化を目指した前十字靭帯再建用無細胞化腱の開発

膝前十字靭帯再建術は、国内で年間 15 000 件程度、アメリカで年間 190 000 件程度行われている確立した治療である。合成繊維を用いた人工靭帯では治療復帰後に断裂することが課題であり、国内では健全な自家腱を腿部等から採取して使用する侵襲の高い治療が行われている。アメリカでは、屍体から摘出したアログラフト(同種組織)が FDA に承認されているが、安定供給が難しい。複数の靭帯が損傷する複合靭帯損傷では採取できる腱が足りず治療手段がない場合があり、生体組織特有の粘弾性と強度を有する人工靭帯の開発が望まれている。われわれは、東京女子医科大学整形外科の加藤義治教授、伊藤匡史助教と共同で、前十字靭帯再建用の無細胞化腱の評価研究を行っている。前述の組織前処理法で凍結乾燥・滅菌して再水和した無細胞化ウシ腱を用いてラット前十字靭帯再建実験を行ったところ、ラットとウシという全くスケールの異なる異種動物間での組織移植でも拒絶反応が起こらず、1 年間機能することを確認した。無細胞化ウシ腱組織内にラットの細胞が入り込み、約半年間で異物に対して一般的に生じる炎症反応も消滅する知見を得つつある。2013 年 1 月に滅菌済み無細胞化ウシ腱を用いてヒジジの前十字靭帯を再建する第 1 例目の大動物実験を行い、6 箇月間拒絶なく歩行等機能するパイロットデータを取得している(図7)。

7. 安全性試験法の開発

ウシやブタ等の動物組織をヒトへそのまま応用すると、数分から数時間で超急性拒絶反応が起こる。したがって、動物由来組織を利用した無細胞化組織の実用化を目指した開発研究の中で、患者に使用するいわゆる First in Human 試験の前に安全性を検証する評価方法の開発が極めて重要となる。血液性状を体外で維持するには空気非接触の閉鎖システムとすることが重要であるが、閉鎖系では二酸化炭素と乳酸が蓄積して pH が酸性に傾き、また酸素が供給されず血液性状を生理的範囲に維持できない。われわれは、閉鎖実験システムでありながら、外側から酸素を血中に取り込み、外側に二酸化炭素を排出して、pH を生理的範囲に維持できる新規培養系を開発し、超急性免疫反応評価を試みている。健康ボランティアから採血した血液を用い(早稲田大学「人を対象とする研究に関わる倫理委員会」の承認を得て実施)、無細胞化処理して滅菌処理したウシ心膜に対するヒト血液の超急性免疫反応を、臨床で使用されており安全性が確認されているグルタールアルデヒド溶液で処理されたウシ心膜製品および、ポジティブコントロールとして無細胞化処理を未実施のウシ心膜を抗生物質で洗浄した組織と比較評価した。免疫反応を示す血液の補体活性は、グルタールアルデヒド処理されたウシ心膜製品と比較して、滅菌済み無細胞化ウシ心膜では同程度以下に抑制されることが明らかとなった。また、無細胞化処理を未実施の抗生物質で洗浄した組織は補体活性が顕著に上昇することを確認した。このように、新規医療技術に対応した非臨床評価法の開発は、実用化を目指した医療技術開発には

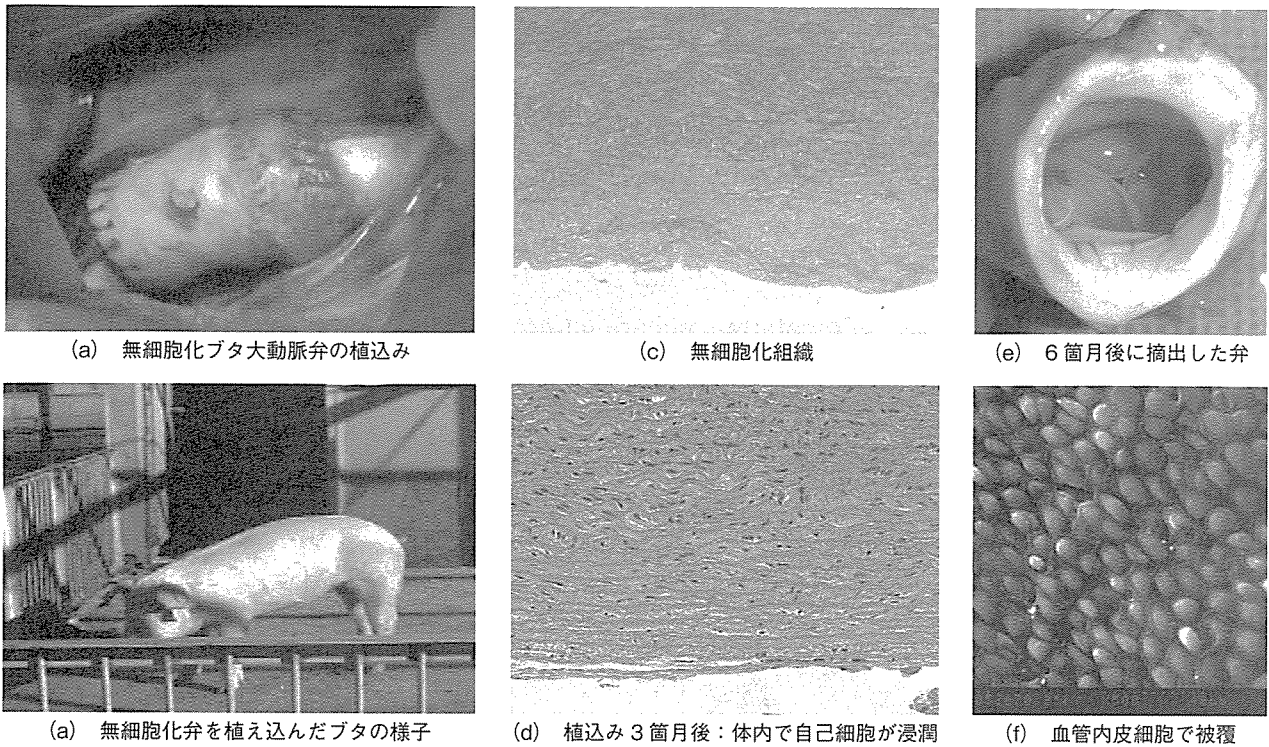


図6 無細胞化処理したブタ大動脈弁を同種ブタの下降大動脈に植え込み、機能すること及び細胞浸潤することを確認

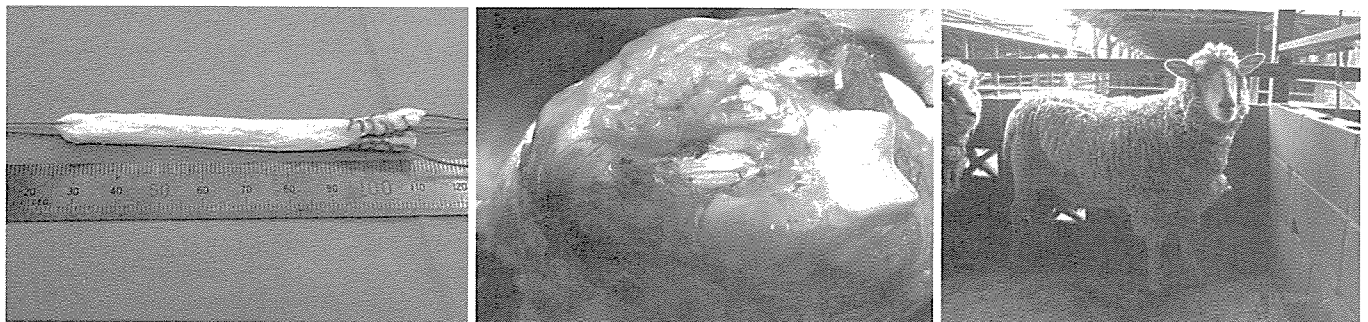


図7 滅菌済み無細胞化ウシ腱を用いたヒツジ前十字靭帯の再建実験により6箇月間機能することを実証

極めて重要である。

8. おわりに

厚い組織から細胞成分を除去する組織無細胞化技術と、その動物実験による評価、実用化研究で鍵となる安全性の新規評価法について紹介した。本無細胞化腱が実用化されれば、前十字靭帯再建術において自己の腱を採取する必要性がなくなり、治療の侵襲が低減され、美容の面からも人にやさしい治療となる。治療手段のなかった複合靭帯損傷の治療や、広く整形外科領域の靭帯再建治療に展開が期待できる。将来的には、iPS細胞治療の疾患ごとの足場材料としても適用が期待できる。今後、長期大動物実験により、移植した組織の強度や再生能の評価を行っていく。

本研究は、(独)医薬基盤研究所保健医療分野における基礎研究推進事業(H20~H22)、早稲田大学高等研究所テニユアトラックプログラム(若手研究者の自立的な研究環境整備促進プログラムH19~H23)、(独)科学技術振興機構A-STEP(H23)、文部科学省科学費基盤研究B(No.24300166, H24)の御支援を得て行った。ここに関係者諸

氏に厚くお礼申し上げる。

(原稿受付 2013年12月2日)

●文献

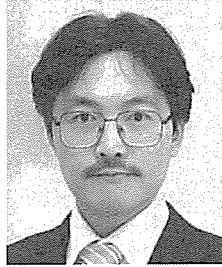
- (1) 岩崎清隆・梅津光生, 一般社団法人日本医工ものづくりコンセンサス監修, 理工学の立場からの医工学人材育成, 医工学を知る, (2013), 30-35, (株)アドスリー.
- (2) 岩崎清隆・梅津光生, 冠動脈ステントの疲労破壊: 破損耐久性の可視化, 可視化情報, **33**-131 (2013), 139-144.
- (3) Gilbert, TW., Sellaro, TL. and Badylak, SF., Decellularization of Tissues and Organs, *Biomaterials*, **27**-19 (2006), 3675-3683.
- (4) Ott, HC., Matthiesen, TS., Goh, SK., Black, LD., Kren, SM., Netoff, TI. and Taylor, DA., Perfusion Decellularized Matrix: Using Nature's Platform to Engineer a Bioartificial Heart, *Nat. Med.*, **14**-2 (2008), 213-221.
- (5) Badylak, SF., The Extracellular Matrix as a Biologic Scaffold Material, *Biomaterials*, **28**-25 (2007), 3587-3593.
- (6) Iwasaki, K., Ozaki, S., Kawai, T., Yamaguchi, S., Eto, M., Ohba, Y. and Umezumi, M., Innovative Bioreactor Technologies Produced a Completely Decellularized and Pre-endothelialized Functional Aortic Valve, *Proc. of the 12th Int. Conf. on Biomedical Engineering*, (2005-12), 1A2-07.
- (7) 岩崎清隆, 心臓弁の再生-体内で自己細胞により再生・自己化を誘導する無細胞化心臓弁の創生-, 再生医療技術の最前線, (2007), 160-166, CMC出版.

事例
紹介メカノバイオマテリアル
—細胞のメカノバイオリジを操作する材料—

Mechanobio-Materials ~ Biomaterials Manipulating Cell Mechanobiology ~

木戸秋 悟

Satoru KIDOAKI



◎1986年東京工業大学工学部附属工業高等学校電子科卒業, 1993年名古屋大学理学部化学科卒業, 1998年名古屋大学大学院人間情報学研究所博士課程修了, 博士(学術)取得, 1998~2000年国立循環器病センター研究所生体工学部流動研究員, 2000~2001年京都大学理学部物理学第一分野JST-CREST博士研究員, 2001~2006年九州大学医学部医用工学分野助教, 2006年より現職
◎研究・専門テーマは, 医用生物物理学, 細胞操作メカノバイオマテリアル
◎九州大学教授 先導物質化学研究所医用生物物理化学分野 (〒819-0395 福岡市西区元岡 744 CE11-115 号室 / E-mail: kidoaki@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp)

1. はじめに

「細胞を操作する」という表現がある。操作するという言葉は、操って動かすことや、自分の都合のよいように手を加えることを意味し、対応する英語は manipulate (巧みに扱う・操る) である。そこで「細胞を操作する」とは正確に定義するならば、細胞を、望む挙動・機能や状態を発現するよう巧みに扱うこと、となるであろう。このような意味において細胞を操作するということは、生体医工学、組織工学の大きな目標であるとともに、最も基盤となる技術の一つである。

細胞を操作するために、細胞に働きかけ、細胞を動かし、細胞を働かせる従来のバイオテクノロジーの多くのアプローチは、さまざまな生理活性を持つ生体分子を用いることにある。それらの分子の機能を模倣した合成分子や、相互作用の様式を制御する分子複合系の設計などの、概括して「製剤」のアプローチが、細胞操作の第一の手段である。これに対し、生体での組織による細胞操作は、そのような生化学的液性因子ばかりでなく、細胞外マトリックスや流れの場といった周囲環境の物理的・機械的な因子によっても重要な制御を受けている。生体中での細胞操作は、それらの因子の複合的・共奏的・協同的な関与のもとで行われており、まさに「操作」と呼ぶにふさわしいが、現状のバイオテクノロジーにおいては生体が行っている細胞操作のごく一部のみを模倣しているに過ぎず、とくに後者に挙げた細胞周囲の「場」の因子の活用をさらに確立していくことは、生体医工学の原理的な重要課題の一つであると言える。

このような「場」の細胞生物学とも呼ぶべき研究領域が、

生体材料の開発研究との強い関わりを踏まえて、近年次第に盛んとなりつつある。筆者らの研究室では、細胞の周囲環境の「場」の効果の中でも、とくに機械力学的条件に関わる問題を集中的に研究している。本稿では、細胞が生着し、活動する際の周囲の力学的環境を「培養力学場」と呼ぶ。培養力学場には二次元培養基材表面ばかりでなく、三次元細胞外マトリックスも含む。培養力学場が細胞の挙動や機能をどのように変調し制御するかを調べるためには、系統的によく設計された培養力学場を有する生体材料が必要となる。そのような材料、すなわち、細胞のメカノバイオリジを系統的に操作するバイオマテリアル-メカノバイオリジが創製できれば、高度な細胞操作が可能となるばかりでなく、細胞メカノバイオリジの基礎的理解を拡充するうえでも大いに有益と思われる。それらは、生体が行っている組織形成と組織再生のメカニズムに関して、組織の機械力学的特性の役割の理解をも包含する再生医工学の確立のために原理的な重要性を有しており、メカノバイオリジの開発は再生医療の根源的な基礎に関わる課題の一つでもある。本稿では、細胞の運動および分化の方向を操作するメカノバイオリジの創製に向けたわれわれの取り組みを紹介する。

2. メカノタクシスの制御

細胞運動は生体における生体組織のさまざまな生理的・病理学的挙動の本質的な基礎をなしているが(炎症反応、創傷治癒、形態形成、癌転移等)、そのような生物学的動的過程の適切な制御は、高機能生体材料設計のための重要な基盤の一つであり、細胞運動を制御する材料表面設計が細胞運動メカニズムの解明とともに求められている。この課題に関連し筆者らはとくに、材料力学場勾配によって誘導される細胞の機械的走性-メカノタクシス(mechanotaxis)-を制御する基材表面設計に取り組んでいる。

細胞は基質の硬さを検知し、そのシグナルを細胞内で処理して運動方向を調節する。たとえば、接着系細胞は培養基材の表面弾性勾配に対して特徴的な硬領域指向性運動を示す。Loらは、架橋剤濃度を調節して弾性率を変えたPAAmゲルを隣接させ、30kPaと14kPaの硬軟隣接境界を作製して線維芽細胞の運動を観察したところ、30kPaの硬領域へと細胞が侵入し、14kPaの軟領域には再び戻らないことを見出し、これをDurotaxisと名づけた⁽¹⁾。細胞の走性を示す術語の接頭語としては、通常、走性を駆動する要因を冠し、方向性自体を織り込んだduroという接頭語はやや特殊であるため、本稿ではより一般的な術語としてメカノタクシスの使用に統一する。

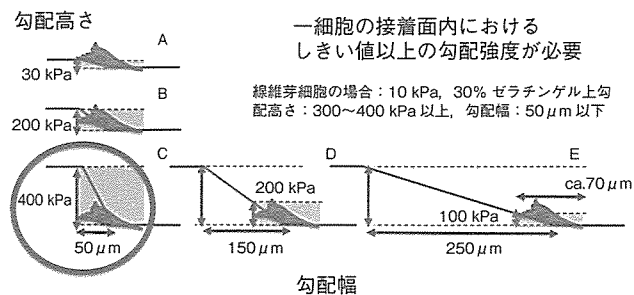


図1 線維芽細胞のメカノタクシスを誘導する弾性勾配強度条件

メカノタクシスの活用は、材料表面設計による細胞の局在操作を可能とするため、その制御技術の確立が望まれるところである。しかし、その誘導と制御に関する系統的な知見はまだ限られている。その理由として、この現象を再現性よく調べることがかなり難しいことによる。メカノタクシスを系統的に研究するためには、弾性率可変の細胞接着性のハイドロゲル材料が必要であり、その材料に対して次の三つの要求が満たされなくてはならない。①表面の接着因子密度は表面弾性率に依存せずほぼ一定であること。表面の接着因子密度が異なれば、硬軟各領域における細胞接着タンパク質の吸着量の差を単に感じたハプトタクシス挙動と区別がつかない。②ゲル表面のトポグラフィを硬軟領域間でスムーズに連結し、その再現性を保証すること。ゲルは架橋度が異なれば膨潤度も変わるため、この問題に何らかの対策を講じなければ、硬軟各領域のゲルの膨潤度の差に起因して表面トポグラフィの山谷が細胞運動に影響してしまう。そして、③微視的表面弾性率の二次元分布を細胞分解能の急峻さを持つ境界で区切って作製可能であること。メカノタクシスは発見当初より、硬軟領域の隣接した弾性境界で起こることが示唆されていたが、これは細胞分解能での弾性勾配強度の系統的設計が必要となることを意味していた。

これらの課題に対して、筆者らは表面弾性率可変の細胞接着性ハイドロゲルである光硬化性スチレン化ゼラチンゲルの表面弾性マイクロパターンングを確立し、メカノタクシスを誘導し制御する弾性境界の勾配強度条件を明らかにしてきた。線維芽細胞のメカノタクシスの誘起には、細胞全体の接着界面内で一定程度以上の勾配強度が必要であり、ゼラチンゲルの場合、40%ゼラチンマトリックスでは数kPaの軟領域からは40kPa/50 μm、20kPaの軟領域からは100~200kPa/50 μm⁽²⁾、30%ゼラチンマトリックスでは10kPaの軟領域からは300~400kPa/50 μmの急峻な弾性率勾配が必要である(図1)⁽³⁾。一方、血管平滑筋細胞は1~4kPa/100 μmの勾配強度でメカノタクシスを起こすとの報告もあり⁽⁴⁾、弾性勾配強度条件には細胞種依存性がある。このような違いは、細胞のかたちの顕著な違いによるものと考えられる。弾性基材上での細胞接着界面には、弾性特性依存性の接着斑の成長と牽引力分布が誘導され、その分布は細胞のかたちの決定とともに、細胞運動の方向性に影響を及ぼす。線維芽細胞は大きな葉状仮足を有する非対称性の高い不定形であるのに対し、血管平滑筋細胞は紡錘形状で仮足は貧弱でありもともと動きの活発な細胞ではない。メカノタクシスは弾性勾配場において、細胞全体の接着界面内に非対称な接着斑分布と接着牽引力分布が強制的に生成されることがトリガーとなって起こる極性運動であ

り⁽³⁾、その接着斑分布の差異が細胞種依存性の弾性勾配感受性の差異を導くものと考えられる。そして、このような細胞種依存性は組織構築の際の異種細胞の局在にも影響を与え得るため、材料の微視的力学場設計は細胞局在制御の基礎としても重要である。弾性勾配を有するゲルの作製についてはこれまでに、マイクロ流路加工により作製したグラジエントメーカーを用いて架橋剤の濃度勾配を与えて形成させる技術⁽⁵⁾⁽⁶⁾や、連続光リソグラフィによる手法⁽⁷⁾が報告されており、近年では三次元の力学場設計への取り組みも進展しつつある⁽⁸⁾。力学場設計による細胞運動制御が重要となる材料構築への応用例としては、神経再生足場等が挙げられる。神経組織の発生は周囲力学場条件に強く依存した調節を受ける。たとえば中枢神経系ではグリア細胞の形成する軟らかい組織特性に依存した軸索の成長が、抹消神経系では顕著に硬い組織も含む周辺環境に依存した樹状突起の成長が、それぞれ優位に起こる⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾。再生足場の力学場設計は効果的な神経組織再生のための重要な設計要因の一つとしても注目されている。

3. 細胞運動の整流化材料

上述のようにメカノタクシス誘導条件の基礎が明らかとなり、表面条件駆動型の細胞運動制御法の新たなカテゴリとしての活用に道が拓かれつつある。一方メカノタクシスは、細胞一体が感じ得る急峻な弾性境界が存在しないと起こらず、他の走行性のように緩慢で長距離にわたる勾配を利用しないため、“局所的な走行性”であると言える。これは生体組織においては必ずしも一般的な現象ではなく、むしろ特殊な走行性であると考えられる。細胞運動メカニズムの力学的研究のうえでは基礎的に極めて興味深い現象である一方で、このように局所的にしか誘導できない走行性が果たして材料設計上の有用な現象足り得るであろうか？ 筆者は、細胞メカノタクシスをよく制御し得る弾性マイクロパターンングの設計次第で、細胞運動を長距離にわたって制御する新しい細胞機能操作材料の構築が可能となると考えている。たとえば、図1に示すように、メカノタクシスの誘導には一定のしきい値の弾性勾配強度が必要であることを踏まえ、急峻な勾配と緩慢な勾配を対抗させて組み合わせた非対称弾性勾配ゲルによれば、細胞運動整流化が可能であることに気づく。すなわち、実際、図2のような鋸型の弾性勾配場を導入すれば、細胞は各弾性境界において常に硬領域への移動選択圧が負荷された状態となり、一方向の長距離ベクトル運動を誘起できるものと期待される。

光硬化性ゼラチンの弾性マイクロパターンング技術により、鋸歯型の繰返し単位長を100 μmおよび120 μm、軟領域100kPa条件下、硬領域ピークを100~500kPaのパラメータ範囲で調整した異なる非対称弾性勾配ゲルを作製した。ここで非対称度は繰返し単位内において、1:2の場所を硬領域ピークとするよう設計した。これらの非対称弾性勾配ゲル上にマウス線維芽細胞(NIH-3T3)を 1.25×10^5 cells/cm²で播種し、15 minおきのタイムラプス観察を30h行ったところ、単位長120 μmかつ硬領域ピーク100kPaの非対称弾性勾配ゲルにおいて細胞運動の右方偏向が確認され、細胞運動の整流効果が見られた。それに対して、硬領域300kPa、500 kPaの非対称弾性勾配ゲル上において細胞

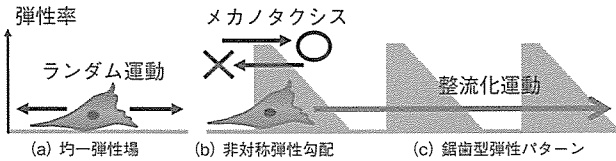


図2 メカノタクシスの特性を応用した、非対称弾性勾配場における細胞の長距離整流化運動の誘導

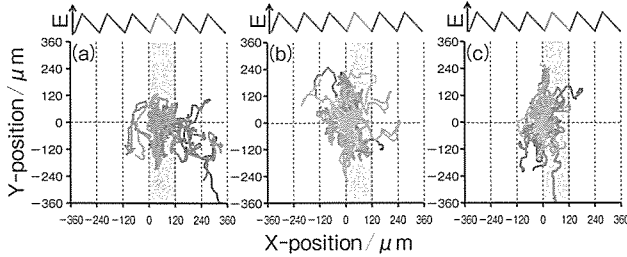


図3 異なる条件の鋸型ユニットを持つ非対称弾性勾配ゲル上での細胞運動の軌跡

ユニット長 $120\mu\text{m}$ の場合、硬領域ピーク値 100kPa (a), 300kPa (b), 500kPa (c). 運動の始点を $0\sim 120\mu\text{m}$ の第一バンドの原点に平行移動して表示した.

は Y 軸方向に強い運動を示した (図3). 細胞運動を整流化する非対称弾性勾配ゲルの硬領域ピークは 100kPa 程度が最適であることが示唆された. 一方, 硬領域 300kPa , 500kPa の非対称弾性勾配ゲル上では, 勾配強度が急峻な弾性勾配および緩慢な弾性勾配の両側において十分に高くメカノタクシスが誘起され, 細胞が硬領域ピークにトラップされやすくなり整流化に不利となったものと考えられる.

整流化効率をさらに向上させ, より長距離の細胞運動を駆動するためには, 硬領域ピークはできるだけ高く, そして細胞が弾性境界により短時間で到達できるように歯型の単位長は短く設定することが求められる. しかし, 上のような Y 軸方向でのトラップがその阻害要因となる. この Y 軸方向でのトラップを排除する設計として, 非対称鋸型パターンに対して垂直方向に軟レーンを配置することを考えた. このようにすれば, Y 軸方向での運動が抑制される. このコンセプトで設計したゲル上での細胞運動の結果を図4に示す. 繰返し単位長 $90\mu\text{m}$, 硬領域ピーク 500kPa の鋸型非対称弾性勾配パターンニングゲルに対して, $20\mu\text{m}$ 幅の垂直軟レーンを追加したところ, 細胞運動の整流化効率は顕著に向上し, 30h の観察時間中 $500\mu\text{m}$ まで及ぶ長距離運動が駆動された. 非対称勾配パターンニングゲルが, メカノタクシスを利用した細胞運動の長距離整流化に有効であることが明らかとなった⁽¹¹⁾. またこのような非対称弾性勾配条件ではマウス線維芽細胞の運動が整流化されるのに対して, ヒト間葉系幹細胞の運動は整流化されず, 接着パターン内にトラップされることが示された. このような非対称弾性勾配ゲルは, 他種細胞間の運動性の差を検出することが可能であり, 細胞分離用マトリックスといった医学応用も期待される.

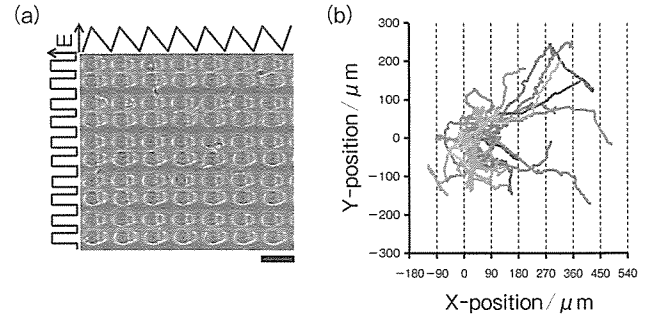


図4 直交軟領域を組み込んだ非対称弾性勾配ゲル上での細胞運動の長距離整流化

ユニット長 $90\mu\text{m}$, 硬領域ピーク値 500kPa . (a) ゲル表面の位相差顕微鏡写真. スケールバー $100\mu\text{m}$. (b) 細胞運動の軌跡. 運動の始点を $0\sim 90\mu\text{m}$ の第一バンドの原点に平行移動して表示した.

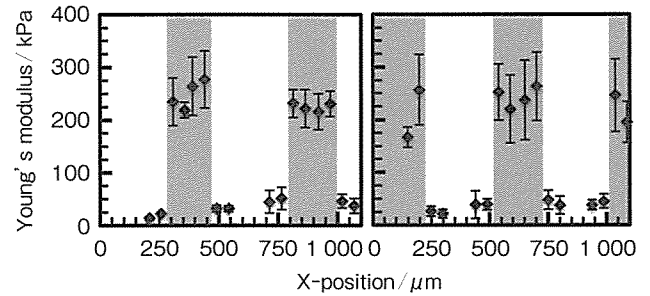
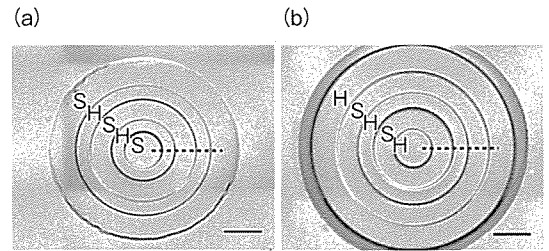


図5 異なる曲率の弾性境界を同心円状にパターンニングしたゼラチンゲル

スケールバー $250\mu\text{m}$. (a) と (b) において, 中心を軟・硬に変えてパターンニングすることで, 硬領域に対する凹境界および凸境界を形成した.

4. 弾性境界の曲率設計

メカノタクシスを誘導する弾性勾配条件は明らかとなりつつある一方, それらのこれまでに決められた条件は弾性勾配の変化軸に対して垂直な, 直線状の弾性境界におけるものに限られている. しかしながら, 実際の生体内においては, そのような状況はまれであり, 細胞周囲環境の弾性分布はさまざまな空間周波数を持つ不均一な特性を示す. そしてとくに, 生体器官の多くは一般にさまざまな曲率を有する曲がった組織の組合せにより構築されている. このような生体内での現実的な弾性分布や非線形の構造特性を踏まえて, メカノタクシスの制御条件を確立することは, その基礎的理解とともに材料設計への応用の上でも重要である. そこで, 弾性境界の曲率条件がメカノタクシスの誘導効率に与える影響についても評価を行っている.

自作の PC 描画像縮小投影光リソグラフィ装置を用い, 弾性境界の形状を変化させたマイクロ弾性パターンニングゲルを作製した. 半径 $100, 250, 500, 750\mu\text{m}$ の異なる曲率

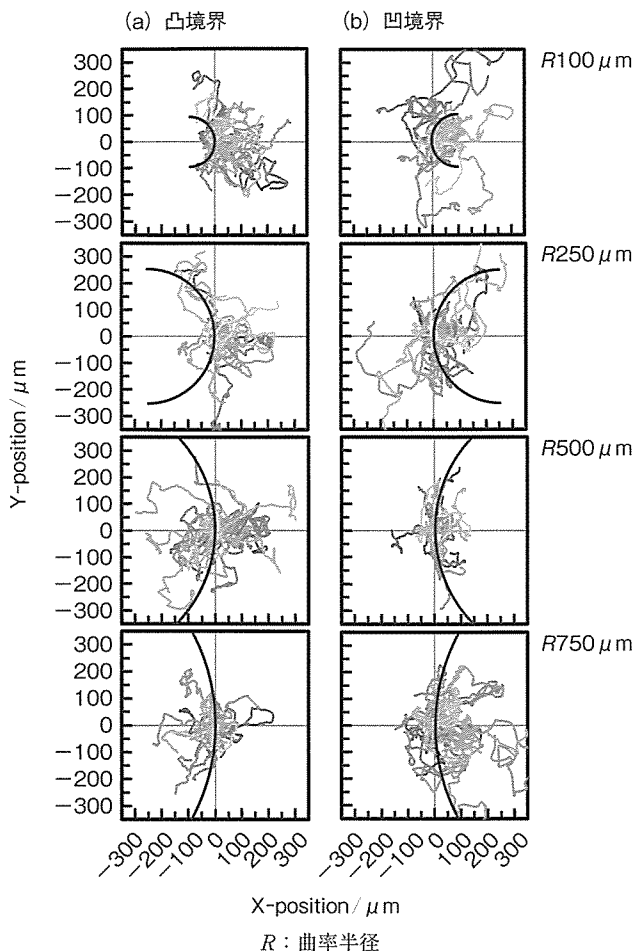


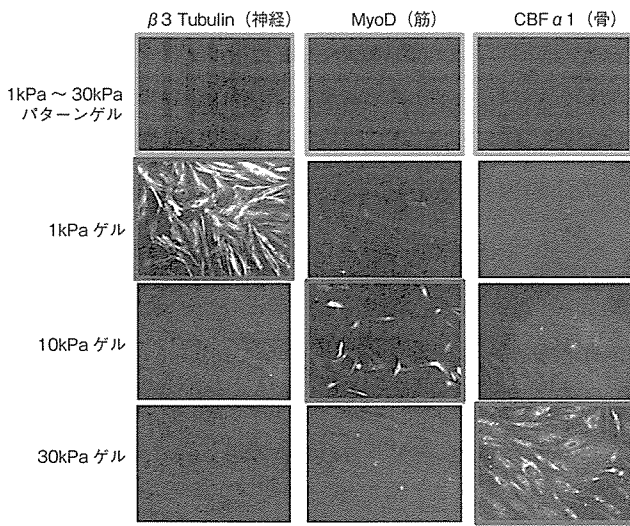
図6 異なる曲率の弾性境界近傍における線維芽細胞の運動軌跡

の円形パターンングゲルを作製し (図5: 硬領域: 300kPa, 軟領域: 10kPa), これらのゲル上に3T3線維芽細胞を 1.5×10^3 cells/cm² の密度で播種し, 8時間インキュベータ内で培養した後, 15分間隔で24時間のタイムラプス観察を行った. 細胞の運動軌跡は弾性境界と相互作用を起こした細胞について12時間分の軌跡を解析した (図6). その結果, 硬領域に対して凸の境界については曲率半径が大きい場合 (500, 750 μm), 弾性勾配強度がメカノタクシス誘起条件を十分に満たしているにもかかわらず, 硬領域指向性運動は誘起されなかった. しかし, 曲率半径が250 μm以下になると硬領域指向性が誘起され, 半径100 μmの弾性境界において最もその誘起効率が高くなった. 一方, 硬領域に向かう凹境界については曲率半径750 μmの弾性境界においては硬領域指向性が誘起されたが, 500 μmでは偏向運動は消失し, 100 μmの条件においては逆に軟領域指向性運動が顕著となった. このような観察から, メカノタクシスには他の走性と同様に, 指向性の正負が存在し, 特定の曲率条件の弾性境界においては負のメカノタクシスが現れ得ることがわかった. このような弾性境界形状条件に依存したメカノタクシス特性の変化には, 細胞自体の形状と境界形状の相互作用の問題や, 曲がった弾性境界近傍におけるゲルの内部応力分布が, 単純な直線境界とは異なっていることなどが関与している. 実際の生体組織中でのメカノタクシスは, このような弾性勾配パターンの多様性を反映した挙動を示しているものと推測される.

5. 幹細胞の分化フラストレーション

病気やけがなどにより自己治癒不能な状態に陥った組織や臓器の再生・置換・代替を目指す再生医工学の取り組みにおいて, ES細胞や間葉系幹細胞, とくに最近ではiPS細胞などの未分化能・万能性・多能性を有する幹細胞の応用に大きな期待が寄せられている. 生体において細胞の機能制御は一般に, 細胞外の微視的環境条件 (足場条件および生理活性物質分布条件等) によって実現されているが, 幹細胞の移動・分化・増殖・生着の制御に関する細胞外微視的環境の基礎的理解とその知見の人工材料設計への応用, すなわち“人工幹細胞ニッチ”の設計原理の開拓は再生医工学における重要な研究焦点の一つである. とくに, 幹細胞の分化制御には液性因子としてのサイトカインの働きばかりでなく, 固相因子としての細胞外環境の力学場条件が重要な役割を果たしている可能性が近年相次いで報告され, 人工幹細胞ニッチの力学場条件の理解の確立が急務となりつつある.

培養力学場条件は細胞運動方向の制御ばかりでなく, 幹細胞の分化系統決定にも重要な影響を与える^{(12)~(14)}. EnglerとDischerらは, 架橋度を変えて異なる弾性率を調整し, 最表面にコラーゲンをコーティングして細胞接着性を持たせたポリアクリルアミドゲルの上で間葉系幹細胞(MSC)を培養したところ, 分化誘導因子非存在下においてマトリックスの硬さのみに依存して神経 (~1kPa), 筋 (8~17kPa), 骨 (25~40kPa) のそれぞれの原細胞への系統決定が誘導されることを報告している⁽¹²⁾. このような現象は同一培養液条件下, 異なる硬さの基材上での1週間ほどの培養で起こった. 分化誘導因子のみを用いた場合にかかる数週間程度の培養に比べても顕著に短期間で系統決定がなされることから, 幹細胞の機能操作に対するメカノシグナルの寄与の重要性が強く示唆される. Blebbistatinにより非筋ミオシンIIを阻害するとこのような系統決定は見られなくなることから, 細胞-基材間の接着装置により細胞骨格系全体に負荷される細胞内部応力と, 分化系統決定に関わる細胞内シグナル伝達経路のクロストークが示唆されている. 一方, Winnerらは0.25kPa程度の柔らかいゲル上でMSCを培養すると, その細胞周期が静止期に止まり, 休眠状態に保持されることを報告している⁽¹⁵⁾. 0.25kPaのほか, 7.5kPaおよびガラス基板 (~GPa) で培養ののち脂肪細胞への分化誘導を行うと, 0.25kPaゲル上での休眠培養後のMSCが顕著に高い分化誘導効率を呈し, ごく軟らかい周囲環境が幹細胞の分化能の保持に関与する可能性が示唆された. 通常MSCは生体内では通常はほとんど分裂増殖せず, 幹細胞ニッチと呼ばれる周囲環境に包まれてその性質を温存していると考えられているが, Winnerらの知見はMSCの幹細胞性の保持に最適な培養力学場条件が存在する可能性を示しており, 幹細胞ニッチのバイオミメティクスにおけるメカノバイオロジーの重要性を暗示している. 以上のような幹細胞のメカノバイオロジー応答は, 接着斑および細胞骨格系によって細胞内に負荷されるメカニカルなシグナルであると考えられているが, その詳細は未開拓の課題である. 接着斑レベルでのシグナル入力に関連して, ナノピットを施した弾性基材上でのMSC培養のDalbyらによる報告は示唆に富む. 彼らはサイズスケールの接着斑分布と相互作用の起こりやすい直



スケールバー100 μ m

図7 最上段：1kPa~30kPaのストライプパターンニングゲル上で1週間培養したMSCの分化マーカーの観察。2段~4段目：一弾性率を有するコントロールゲル上での分化マーカーの観察。最上段に見られるように、コントロールで認められた三方向の分化マーカーが同時に抑制された。

径120nm深さ100nmのナノピットを平均300nm間隔で配置したパターン化シリコン基板上でMSCを培養すると、その間隔が規則正しいときには幹細胞性保持⁽¹⁶⁾、平均間隔300nmから ± 50 nmで乱雑に配置の摂動を与えた不規則パターンになると骨分化促進⁽¹⁷⁾という制御が起こることを見出した。ピットサイズは同一でも、その配置の乱雑さのみが異なるだけで未分化保持と分化が切り替わり、細胞の運命が大きく変動する。

培養力学場設計に基づく幹細胞操作として、筆者らは幹細胞の分化系統決定をブロックし得る培養力学場構築に挑戦している。この課題に対して、筆者らは幹細胞の分化フラストレーションの誘導という独自の作業仮説の検証に取り組んでいる。分化フラストレーションとは、硬・軟領域を微細パターン化したゲル上で間葉系幹細胞MSCを培養し、硬軟領域間の非定住培養を強制的に経験させると、その過程で短時間のうちに異なる弾性場から振動するメカニカルシグナル入力を受けることになり、Discherらの示した特定の弾性場上での1週間の定住培養で見られる特定の系統への分化誘導が抑制され、未分化状態が維持される現象を指す。幹細胞が特定の弾性場上で一定期間培養後に特定の系統への“分化欲求”が満たされないように仕組まれた状況という意味で分化フラストレーションと名づけた。この仮説を検証するため、50 μ m幅の硬軟ストライプパターン（硬領域：50kPa、軟領域：5kPa）を作製し、このうえでのMSCの運動を1週間にわたり調べたところ、およそ2~3時間ほどの周期の硬軟領域間の非定住運動が誘導されることを確認できた。その後、MSCの幹細胞性を評価したところ、各種幹細胞マーカーの正常な発現および神経・筋・骨分化マーカーの明確な発現抑制が見られ、通常のプラスチックシャーレ上での培養に比べ、より良質の未分化状態を維持していることが明らかとなった（図7）。この仮説の証明にはさらなる詳細な検証を要し、現在、当研究室にて推進中である。このように培養力学場設計による幹細胞のメカノバイオロジーの制御は幹細胞操作材料の

構築において大きな可能性を有しており、今後のさらなる発展が期待される。

（受稿受付 2013年10月15日）

●文献

- (1) Lo, C.-M., Wang, H.B., Dembo, M. and Wang, Y.L., Cell Movement is Guided by the Rigidity of the Substrate, *Biophys. J.*, **79** (2000), 141-152.
- (2) Kidoaki, S. and Matsuda, T., Microelastic Gradient Gelatinous Gels to Induce Cellular Mechanotaxis, *J. Biotechnol.*, **133** (2008), 225-230.
- (3) Kawano, T. and Kidoaki, S., Elasticity Boundary Conditions Required for Cell Mechanotaxis on Microelastically-patterned Gels, *Biomaterials*, **32** (2011), 2725-2733.
- (4) Isenberg, B.C., Dimilla, P.A., Walker, M., Kim, S. and Wong, J.Y., Vascular Smooth Muscle Cell Durotaxis Depends on Substrate Stiffness Gradient Strength, *Biophys. J.*, **97** (2009), 1313-1322.
- (5) Burdick, J.A., Khademhosseini, A. and Langer, R., Fabrication of Gradient Hydrogels Using a Microfluidics/ Photopolymerization Process, *Langmuir*, **20** (2004), 5153-5156.
- (6) Zaari, N., Rajagopalan, P., Kim, S.K., Engler, A.J. and Wong, J.Y., Photopolymerization in Microfluidic Gradient Generators: Microscale Control of Substrate Compliance to Manipulate Cell Response., *Adv. Mater.*, **16** (2004), 2133-2137.
- (7) Wong, J.Y., Velasco, A., Rajagopalan, P. and Pham, Q., Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-compliant Hydrogels, *Langmuir*, **19** (2003), 1908-1913.
- (8) Lu, H.F., Narayanan, K., Lim, S.X., Gao, S., Leong, M.F. and Wan, A.C., A 3D Microfibrous Scaffold for Long-term Human Pluripotent Stem Cell Self-renewal under Chemically Defined Conditions, *Biomaterials*, **33** (2012), 2419-2430.
- (9) Flanagan, L.A., Ju, Y.E. and Janmey, P.A., Neurite Branching on Deformable Substrates, *Neuroreport*, **13** (2002), 2411-2415.
- (10) Georges, P.C., Miller, W.J. and Janmey, P.A., Matrices with Compliance Comparable to that of Brain Tissue Select Neuronal over Glial Growth in Mixed Cortical Cultures, *Biophys. J.*, **90** (2006), 3012-3018.
- (11) Kidoaki, S. and Sakashita, H., Rectified Cell Migration on Saw-like Micro-elastically Patterned Hydrogels with Asymmetric Gradient Ratchet Teeth., *PLOS One*, **8** (2013), e78067.
- (12) Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. and Discher, D.E., Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell*, **126** (2006), 677-689.
- (13) MacBeth, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K. and Chen, C.S., Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment, *Dev. Cell*, **6** (2004), 483-495.
- (14) Yim, E.K., Pang, S.W. and Leong, K.W., Synthetic Nanostructures Inducing Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Neuronal Lineage, *Exp. Cell Res.*, **313** (2007), 1820-1829.
- (15) Winer, J.P., Janmey, P.A., McComick, M.E. and Funaki, M., Bone Marrow-derived Human Mesenchymal Stem Cells Become Quiescent on Soft Substrates but Remain Responsive to Chemical or Mechanical Stimuli, *Tissue engineering*, **15** (2009), 147-154.
- (16) McMurray, R.J., Gadegaard, N., Tsimbouri, P.M., Burgess, K.V., McNamara, L.E., Tare, R., Murawski, K., Kingham, E., Oreffo, R.O. and Dalby, M.J., Nanoscale Surfaces for the Long-term Maintenance of Mesenchymal Stem Cell Phenotype and Multipotency, *Nature Mater.*, **10** (2011), 637-644.
- (17) Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P., Wilkinson, C.D. and Oreffo, R.O., The Control of Human Mesenchymal Cell Differentiation Using Nanoscale Symmetry and Disorder, *Nature Mater.*, **6** (2007), 997-1003.

事例
紹介

ボトムアップ形成術による高次元組織構造の作製

Fabrication of Hierarchic Tissue Structures Using Bottom-Up Approach

松永 行子

Yukiko T. MATSUNAGA



◎2001年宇都宮大学応用化学科卒業，2003年早稲田大学大学院理工学研究科修士課程修了，2007年筑波大学大学院数理物質科学研究科博士課程修了，2007年東京女子医科大学博士研究員，2007年より東京大学生産技術研究所特任助教，2010年より現職，2010年よりJST さきがけ研究者併任
◎研究・専門テーマは，組織工学，バイオマテリアル，マイクロ加工
◎東京大学生産技術研究所マイクロナノメカトロニクス国際研究センター特任講師，JST さきがけ研究者併任
(〒153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1 An701/
E-mail : mat@iis.u-tokyo.ac.jp)

1. はじめに

再生医療や，薬剤・化粧品などの毒性・効能試験，創薬研究における薬物代替法において，生体により近い機能を有する三次元組織の構築が求められている。組織が担う機能を再現するためには，複数種の細胞および細胞外マトリックスから構成されるマイクロスケールの階層構造を模倣して生体に限りなく近いものを組み立てる技術が重要と考えられ⁽¹⁾，近年，半導体加工技術などのマイクロ加工法を利用して組織の緻密な構造を再構築しようとする研究が活発に行われている。たとえば，インクジェットプリンタを用いて細胞を任意の位置に配置，さらには三次元的に積み重ねて立体組織を構築する技術⁽²⁾⁽³⁾や，マイクロサイズの細胞凝集体（マイクロ組織ユニット）を積木細工のように積み重ねることで，組織の階層構造を再構築するボトムアップ組織工学が提案され^{(4)~(6)}，さまざまな組織構造の模倣が試みられている。

本稿では，組織工学手法の変遷について概説し，従来のトップダウン法から新規のボトムアップ法による組織構築法について紹介する。さらに，マイクロ流体技術を用いた，細胞の足場となるマイクロサイズのゲル（コラーゲンゲル，アルギン酸ゲルなど）の調製方法，およびマイクロゲルによる細胞のマイクロ組織ユニット作製技術と高次構造化について，筆者らの取り組みを中心に紹介する。

2. ボトムアップ組織工学

1993年，Science誌においてLangerとVacantiらが，生体内吸収性ポリマーなどの細胞足場と細胞，および細胞成長因子とを組み合わせる立体的な組織を構築する組織工学を提唱して以来⁽⁷⁾，膀胱，角膜，軟骨など，生体内のさまざまな組織・臓器の構築に関する研究が盛んに行われてきた。それから，20年以上が経ち，現在，組織工学手法は2種類のトップダウンおよびボトムアップ手法に大別される（図1）。

伝統的なトップダウン手法による組織工学では，再構築したい組織の「かたち」に生体内吸収性ポリマーを成形し，これに細胞を播種する。たとえば，耳の軟骨組織を再構築するために，生理条件下で次第に分解されるポリ乳酸（PLA）やポリグリコール酸（PGA）などの生体内吸収性ポリマーを立体的な耳の方に成形し，このポリマー上に軟骨細胞を播種する。細胞は足場上で増殖し，生体内吸収性ポリマーは時間とともに分解され，最終的に細胞と細胞が産生した細胞外マトリックス成分（コラーゲン，ラミニンなど）のみからなる耳の形状をした三次元軟骨組織が作製されるというわけである。本法は，これまで二次元状にしか培養ができなかった細胞を，高分子技術を用いてマクロスケールで三次元的に構築しようとする試みであり，これにより，細胞の増殖・分化状態を制御するための高分子（生体材料，医用高分子）技術の研究がさらに加速したことはいうまでもない。しかし，トップダウン手法では，細胞に対して，足場となる高分子の体積が大きくなり，細胞の増殖と高分子の分解速度が一致しないため，細胞密度が低い組織しか形成できず，さらに，複数種の細胞が階層的に配向した組織構造を作製することができないなどの問題が生じた。このように「かたち」だけでなく「機能」への要求性が高まる背景から，ボトムアップ的に組織を構築する手法が検討されるようになった。

ボトムアップ手法といえば，原子や分子を一つ一つ正確に組み合わせることで新しい機能を持った材料を作製するナノテクノロジー分野でよく使用される用語である。本分野で使用する「ボトムアップ」は，従来の「トップダウン」に対して，広義には，細胞あるいは細胞より少し大きいサイズの集合体をユニットとして考え，これらを組み立て高次の機能を有する組織を構築することを表す。具体的には，図1に示すように，ボトムアップ組織工学とは，細胞あるいはマイクロサイズのハイドロゲルから，ピース⁽⁶⁾，シー

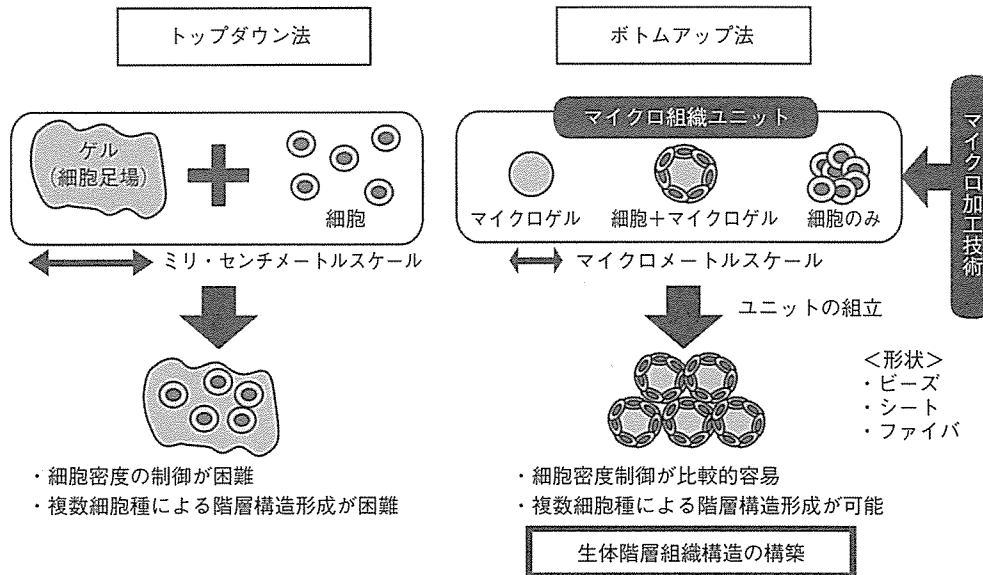


図1 高次元組織構築へ向けたボトムアップ組織構築法

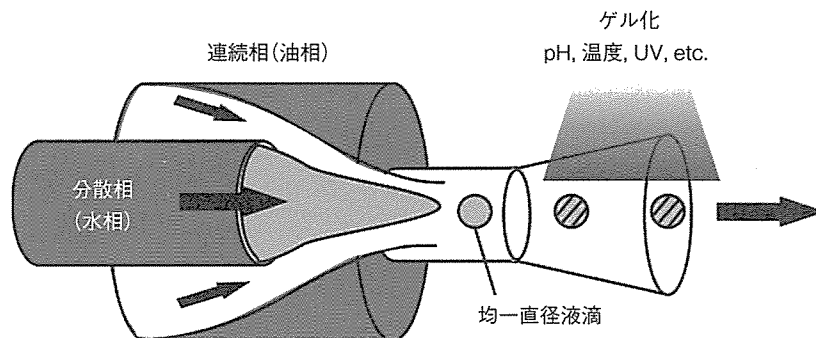


図2 同軸焦点型マイクロ流路デバイスを用いた均一直径液滴形成によるマイクロゲルの作製

ト⁽⁴⁾、ファイバ⁽⁸⁾状の「マイクロ組織ユニット」を作製し、これらを配置、組み合わせることにより組織を構築する手法論を指す。インクジェットプリンティングなどのように細胞とゲルを組み合わせる直接三次元立体組織を構築しようとする手法もボトムアップ組織工学のカテゴリに入る。

ボトムアップ組織工学の始まりは正確には定義されていないが、Mironov らの細胞の凝集塊（スフェロイド）をディスペンサで二次元および三次元に配置し、立体構造を作製する手法⁽²⁾、および Okano らの二次元に培養した培養細胞層を剥離・回収することにより細胞シートとして積層化し三次元組織を構築する手法⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾が代表例として挙げられるだろう。ボトムアップ組織工学の詳細例については、総説を参考にされたい⁽⁵⁾。次章では、マイクロ流体技術によるマイクロサイズのハイドロゲルの形成とマイクロ組織ユニットの作製、さらに階層構造形成に関する筆者らの試みを紹介する。

3. マイクロ流路技術による組織形成

3.1 マイクロビーズ形成

生体組織は、マイクロオーダーで細胞、細胞外マトリックスが階層構造を構成しており、細胞と細胞外マトリックスからなるマイクロ組織ユニットを形成できれば、化学的

にも構造的にも、より生体に近い組織の構築が可能となる。移植および動物実験代替法へと利用可能な緻密な階層構造を形成するうえで要求される項目は、①大量生産性、②高速性、③操作性、が挙げられる。トロント大学の Sefton, McGuigan らは、ロッド状のコラーゲンゲルを大量に作製し、その中に細胞を内包して立体組織を構築する手法を提案した⁽¹¹⁾。これに対し、筆者らは安定に均一直径の液滴を生成できるマイクロ流路を用いた液滴形成プロセス⁽¹²⁾⁽¹³⁾に注目し、ペプチドゲル、コラーゲンゲルなどの細胞の足場となる材料で微粒子を作製することに着想した。考案した同軸焦点型マイクロ流路デバイス⁽¹⁴⁾は、図2に示すように内側の水溶液（分散相）の流れと外側のオイル（連続相）の流れとを出口細孔部位で接触させるという構造を有している。高速で流れる外側のオイルが細孔部位で水溶液を引きちぎり、水溶液は界面張力により丸くなろうとし、液滴を形成するという仕組みである。

ハイドロゲルビーズを作製するためには、水の代わりに、プレゲル溶液を流し、液滴形成後に pH, 熱, 光などの外部刺激により液滴をゲル化させればよい。コラーゲン溶液、およびペプチドゲル（ピュラマトリックスTM）を用いてマイクロゲルビーズを作製した⁽⁶⁾⁽¹⁵⁾。コラーゲンゲルビーズを作製する場合は、分散相をコラーゲン溶液、連続相を2%大豆レシチン入りコーンオイルとし、形成したコラー

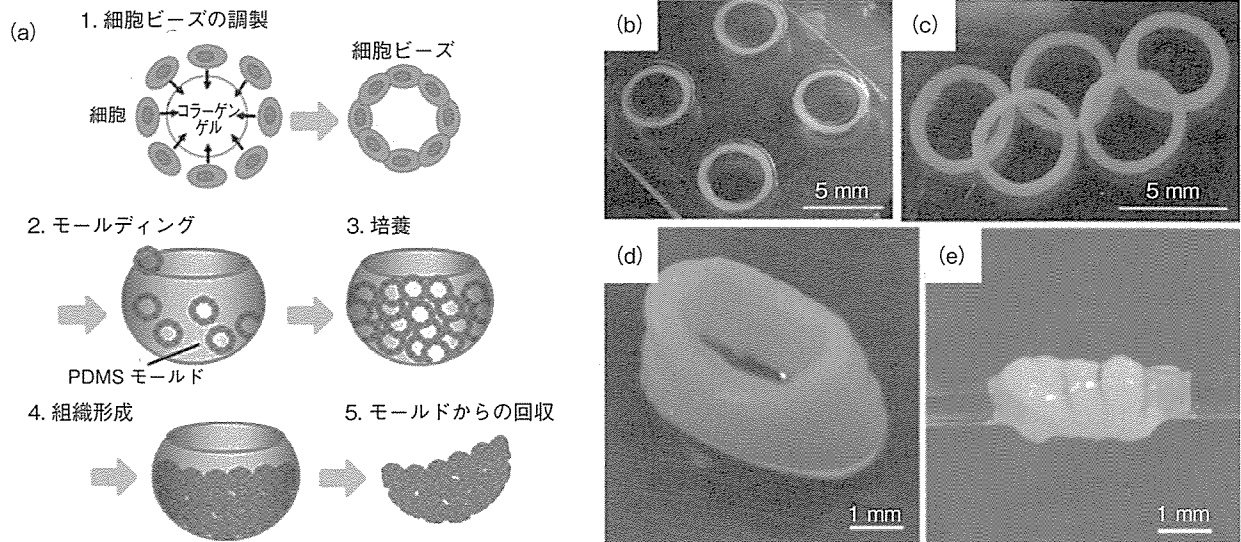


図3 細胞ビーズのモルディングによる階層化三次元組織の構築

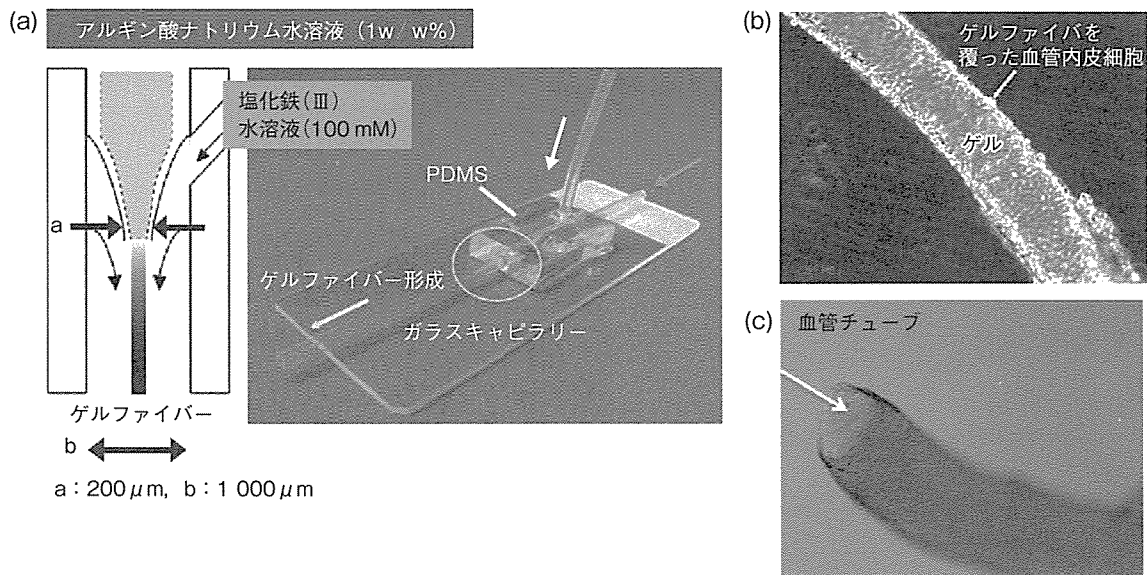


図4 マイクロゲルファイバによるチューブ状組織の構築

ゲン液滴を37°Cで45分間処理することで、コラーゲンゲルビーズを得た〔図3 (b), (c)〕。連続相と分散相の流量比を変化させることで、生成するゲルビーズの大きさを50~300 μmの範囲で調節することが可能である。

3.2 コラーゲンビーズを利用した細胞ビーズユニットの作製と三次元組織構築

得られたビーズを培養液中へ分散させ、マウス3T3線維芽細胞を播種・培養すると、3T3は2時間以内でコラーゲンゲルビーズの表層に接着し、その後、伸展、増殖し、コラーゲンゲルビーズ内へ遊走することを確認した。ゲルビーズを用いることで、線維芽細胞、血管内皮細胞、肝細胞、膵β細胞など、細胞種を選ばずに2時間以内でビーズ化し、細胞ビーズとして得ることができる。

作製した細胞ビーズをマイクロピペットを用いて成型加工したシリコン製モールド内に流し込み、ミリメートル厚の再構成組織の構築を試みた。コンセプトを図3 (a)に示す。モールド内で集積化させた細胞ビーズは、ビーズの

表層に位置する細胞同士が結合することで、個々のビーズが一体化し、モルディング後数時間で型どおりの三次元立体組織を再構成できた〔図3 (b), (c)〕。さらに、再構成24時間後の組織切片を観察すると、組織内部で壊死は見られず、どの部位も均一な細胞密度であった。これに対し、コラーゲンを含まない直径100 μmのスフェロイドで形成した組織においては、組織内部で壊死することを確認した。さらに、本ビーズは自動ディスペンサロボットを用いて任意に配置することができ、異種のビーズを用いて複雑な階層構造を容易に作製可能であった。本法は、高速で、細胞密度が均一な厚みのある組織を簡便に作製し得る手法であることが実証された。

4. 血管様中空構造を有する細胞チューブの形成

マイクロ組織ユニットによるボトムアップ的な組織構築

法は、初期のユニットの空間配置制御は可能であるが、再構築後の内部の組織構造は組み立て後の環境に依存する。そのため、再構築後の三次元組織中の細胞の挙動を制御できれば、より精密な組織構造設計が可能となる。三次元組織中の細胞の挙動を制御する手法の一つとして、たとえば、三次元組織中に血管のような管状構造体で空間をつくり、外部から培養液などの栄養分および成長因子などを送液することが考えられる。そこで、筆者らは血管に見られるようなチューブ状の構造に着目し、チューブ状のマイクロ組織ユニットの作製について検討した。

本研究で用いた細胞チューブの作製コンセプトは次のとおりである。図4(a)に示す二重管で構成される同軸フロー型マイクロ流路デバイスを用いてマイクロゲルファイバを作製し、ゲルファイバ上に細胞を接着させる。細胞がゲル表面を覆うまで増殖させたら内部のゲルを解離させ除去することで、中空状のマイクロ組織ユニットを得る。ここで用いるアルギン酸ナトリウム水溶液は、カルシウムなどの二価のイオンと瞬時に反応してイオン架橋によりアルギン酸カルシウムゲルを形成することから、流れ場でのゲル形成に適している。しかし、アルギン酸カルシウムゲルは操作性、生体適合性に優れているものの、細胞接着性を有しておらず、細胞接着能を獲得するためには、コラーゲンとの複合化や、アルギン酸分子に細胞接着活性を有するRGDペプチド等をあらかじめ修飾する必要がある。これに対し、Machidaらにより、アルギン酸を鉄(III)イオンで架橋することで、アルギン酸ゲルに高い細胞接着・増殖性を付与できることが示されており⁽¹⁶⁾、本研究では鉄アルギン酸ゲルファイバの形成に着想した。

市販のガラス管を用いて同軸フロー型マイクロ流路デバイス(内管:内径300 μ m,外管:内径1000 μ m)を作製した〔図4(a)〕。内管にアルギン酸ナトリウム水溶液、外管にFeCl₃水溶液をそれぞれ送液することで、均一直径のマイクロゲルファイバを作製した。作製したマイクロゲルファイバにヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)を播種したところ、鉄アルギン酸ゲル表面へは市販のポリスチレン培養皿と同等の良好な接着・増殖性を示した〔図4(b)〕。なお、鉄アルギン酸ゲル内部への細胞の侵入は観察されなかった。鉄イオンのキレート剤として知られるデフェロキサミン(DFO)を添加すると、鉄アルギン酸ゲルが解離し、細胞成分のみで構成される中空構造を有するマイクロ組織ユニットを得ることができた〔図4(c)〕⁽¹⁷⁾。これらのユニットをゲルの解離前にコラーゲンゲルなどに埋め込み、その後、ゲルを解離することで、三次元組織構造体内に中空の血管様構造を得ることができる。

以上の結果から、本ゲル材料で作製したマイクロ組織ユニットは、精密組織構造設計のための新しいツールとして有用と考えられる。

5. おわりに

ボトムアップ組織工学について概説し、マイクロ流路デバイスを用いた細胞ビーズ、細胞チューブの作製手法とこれらのマイクロ組織ユニットによる、三次元立体組織構築方法について最近の研究結果を説明した。本研究成果は、

創薬支援や有効な再生医療の実現に向けた基盤技術になるものと確信している。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、細胞ビーズについては、東京大学生産技術研究所、竹内昌治研究室の皆さま、細胞チューブについては、早稲田大学の町田郁子博士、立花美紗氏に心より感謝いたします。

(原稿受付 2013年11月5日)

●文献

- (1) Griffith, L.G. and Swartz, M.A., Capturing Complex 3D Tissue Physiology in Vitro, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7** (2006), 211-224.
- (2) Mironov, V., Visconti, R.P., Kasyanov, V., Forgacs, G., Drake, C.J. and Markwald, R.R., Organ Printing: Tissue Spheroids as Building Blocks, *Biomaterials*, **30** (2009), 2164-2174.
- (3) Nakamura, M., Iwanaga, S., Henmi, C., Arai, K. and Nishiyama, Y., Biomaterials and Biomaterials for Future Developments of Bioprinting and Biofabrication, *Biofabrication*, **2** (2010), 014110.
- (4) Yang, J., Yamato, M., Sekine, H., Sekiya, S., Tsuda, Y., Ohashi, K., Shimizu, T. and Okano, T., Tissue Engineering Using Laminar Cellular Assemblies, *Adv Mater.*, **21** (2009), 3404-3409.
- (5) Nichol, J.W. and Khademhosseini, A., Modular Tissue Engineering: Engineering Biological Tissues from the Bottom Up, *Soft Matter*, **5** (2009), 1312-1319.
- (6) Matsunaga, Y.T., Morimoto, Y. and Takeuchi, S., *Adv Mater.*, **23** (2011) H90-H94. Equal contribution.
- (7) Langer, R. and Vacanti, J.P., Tissue Engineering., *Science*, **260** (1993), 920-926.
- (8) Onoe, H., Okitsu, T., Itou, A., Kato-Negishi, M., Gojo, R., Kiriya, D., Sato, K., Miura, S., Iwanaga, S., Kuribayashi-Shigetomi, K., Matsunaga, Y.T., Shimoyama, Y. and Takeuchi, S., Metre-long Cell-laden Microfibres Exhibit Tissue Morphologies and Functions, *Nat. Mater.*, **12** (2013), 584-590.
- (9) Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezumi, M. and Okano, T., Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces, *Circ Res.*, **90** (2002), e40.
- (10) Tsuda, Y., Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., Sasagawa, T., Sekiya, S., Kobayashi, J., Chen, G. and Okano, T., Cellular Control of Tissue Architectures Using a Three-dimensional Tissue Fabrication Technique, *Biomaterials*, **28** (2007), 4939-4946.
- (11) McGuigan, A.P. and Sefton, M.V., Vascularized Organoid Engineered by Modular Assembly Enables Blood Perfusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103** (2006), 11461-11466.
- (12) Utada, A.S., Lenceau, E., Link, D.R., Kaplan, P.D., Stone, H.A., and Weitz, D.A., Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device, *Science*, **308** (2005), 537-541.
- (13) Takeuchi, S., Garstecki, P., Weibel, D.B. and Whitesides, G.M., An Axisymmetric Flow-focusing Microfluidic Device, *Adv. Mater.*, **17** (2005), 1067-1072.
- (14) Morimoto, Y., Tan, W.H. and Takeuchi, S., Three-dimensional Axisymmetric Flow-focusing Device Using Stereolithography, *Biomed. Microdevices*, **11-2** (2009), 369-377.
- (15) Tsuda, Y., Morimoto, Y. and Takeuchi, S., Monodisperse Cell-encapsulating Peptide Microgel Beads for 3D Cell Culture, *Langmuir*, **26** (2010), 2645-2649.
- (16) Machida-Sano, I., Matsuda, Y. and Namiki, H., In Vitro Adhesion of Human Dermal Fibroblasts on Iron Cross-linked Alginate Films, *Biomed. Mater.*, **4** (2009), 025008.
- (17) Matsunaga, Y.T., Vascularized Tissue Formation Using Microfluidic System, *IEEE EMBC Short Papers*, (2013), No. 2718.

事例
紹介

バイオプリンティング ーバイオファブリケーション技術の基本コンセプトー

Basic Concepts of Bioprinting and Biofabrication for Tissue Engineering

中村 真人

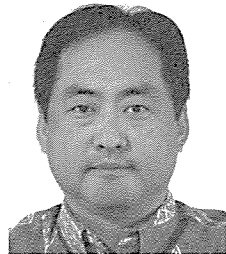
Makoto NAKAMURA



◎1986年神戸大学医学部医学科卒業、同年4月金沢大学医学部小児科学教室入局（同大学付属病院等で臨床医として勤務、専門科目：小児循環器）、1993年10月より黒部市民病院に勤務、1996年5月国立循環器病センター研究所人工臓器部医学修練士、同研究員を経て、1999年10月より東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教授、2005年4月（財）神奈川科学技術アカデミー「バイオプリンティング」プロジェクト・リーダー、2007年4月東京医科歯科大学生体材料工学研究所准教授、2008年5月より現職
◎研究・専門テーマは、再生医工学・人工臓器
◎富山大学教授 大学院理工学研究部（工学）（〒930-8555 富山市五福3190 富山大学工学部生命工学科 / E-mail : maknaka@eng.u-toyama.ac.jp）

瀧浦 晃基

Koki TAKIURA



◎1991年東京大学工学部航空学科（宇宙工学コース）卒業、1996年東京大学大学院・工学系研究科・航空宇宙工学専攻博士課程、単位取得退学、1996年4月～1997年9月国立循環器病センター研究所人工臓器部、流動研究員、1998年1月～1999年8月 University of Miami 留学、2000年2月～9月京セラ（株）勤務、2003年9月東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻博士課程修了、博士（工学）取得、2004年4月東北大学・先進医工学研究機構、科学技術振興研究員、同年5月同助教授、2005年4月（財）神奈川科学技術アカデミー研究員（非常勤）、2006年4月山形大学助教授、2007年4月同准教授、2008年4月～2009年3月（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）、プログラムオフィサー、2009年10月より現職
◎研究・専門テーマは、機械工学・生体工学
◎国立天文台ハワイ観測所研究員（Subaru Telescope, 650 North A'ohoku Place, Hilo, Hawaii 96720, USA / E-mail : takiura@subaru.naoj.org）

1. はじめに「バイオプリンティングーバイオファブリケーション」の研究の原点

内科治療に反応しない重症臓器不全の患者では、移植医療が唯一の救命の道となる。心臓の場合は心移植である。しかし、移植医療には健康な臓器が必要である。心臓の場合は誰かが死なねば臓器は得られない、ゆえに脳死患者から受けるしかない。ドナー不足も重い問題ではあるが、もし、移植を代替する方法が確立されれば、移植医療の代わりにもっともっと多くの患者を救命治療できることは明らかである。

このモチベーションから、筆者は科学の力で臓器を作る

時代を目指して研究を始めた。1996年から、人工心臓の開発・研究に携わり、移植医療と人工臓器、生体医工学分野を学んできた。機械式人工心臓の研究開発に注力する一方で、同時に細胞から臓器を作る Tissue Engineering の研究にも関心を持ち、情報収集と問題点を概観してきた。

Tissue Engineering は、組織工学あるいは再生医工学と邦訳されるが、外科医・麻酔医の Vacanti 兄弟とバイオマテリアル研究者の Langer らが有名な耳ネズミを作り、1993年発刊の Science 誌にそのコンセプトを発表し、世界的に広がった研究分野である。科学の力で組織や臓器を作り医療に役立てようとのモチベーションから、細胞と細胞が接着する足場材料を用いて臓器を作るアプローチを示した。この足場をスキヤフォールドと言い、Scaffold Based Tissue Engineering とか、Scaffold Based Tissue Regeneration と呼ばれている。2003年、2013年と早くも20年が経過したものの、いまだにその方法が組織工学の基本であり主流である。

この足場材料を用いる手法にはいくつかの問題点がある⁽¹⁾。基本的に先に作られた三次元の足場材に後から細胞を播く方法に基づいているため、①足場材の表面にしか細胞は付かず内部まで細胞の分布を構成できない、②多種の細胞での構築が必要な臓器の場合も一緒に播くか時間差をつけて播くしか方法がなく、多種細胞での構成は全く制御できない、③組織によっては細胞の密度や構造が異なるが、そのような構造の異質性を制御できない、④細胞の増殖や分化、遊走を制御する生理活性物質である増殖因子を配置したり濃度勾配を作ったりできない、⑤内部深くまで毛細血管を呼び込むすべがない。毛細血管が誘導できなければ内部の細胞は生きられないため、大きな組織を作るには限界がある。

これらの課題を踏まえて、それらを解決する新しいアプローチを考案した。それが「バイオプリンティングーバイオファブリケーション」の研究である。私の取り組みがきっかけになったのか、単に時代や技術の流れで必然であったのか、今、バイオプリンティングーバイオファブリケーションの取り組みは、世界で大きなうねりとなって進み始めている。本稿では、筆者らがこの研究を考え始め、取り組んできた基本コンセプトを紹介する。日本機械学会の研究者、技術者諸氏の力で、応用発展させ、飛躍させていただけたら本望である。

2. 顕微鏡のような組織構造をいかに作るか？ 細胞をいかに並べて三次元の組織をいかに作るか？

2.1 顕微鏡レベルの組織構造

組織や臓器を細胞から作ろうとするなら、顕微鏡像の大きさと構成されている組織構造が細胞を部品として作れなくてはならない、と考えた。それは、組織というのは、単に細胞が密に集まった細胞の塊ではなく、顕微鏡でなければ見えない特徴的なミクロの構造があり、この構造こそが臓器が臓器の機能を発現するための要だからである。

医学部に入り専門課程に進むと、基礎科目として解剖学、生理学、生化学とともに組織学（Histology）や病理学（Pathology）を学ぶ。組織学ではそれぞれの臓器の正常組織の肉眼的な解剖（マクロ所見）と顕微鏡像（ミクロ所見）

を、病理学の場合は病的組織の両所見を学ぶ。それらを通して、生体組織、臓器、病的組織の特徴を学び、その生理機能や病気発現のメカニズムを理解していくわけである。このような背景から、組織を作るということは、当然、顕微鏡レベルのミクロ構造を作らねばならないと考えたのである。

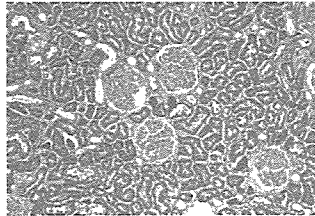


図1 腎臓の組織の顕微鏡像 (腎皮質)

たとえば、腎臓にはネフロンと呼ばれる単位構造がある。このネフロンは、輸入細動脈、輸出細動脈、糸球体毛細血管とボーマン嚢(のう)と呼ばれる袋状の構造体から成る腎小体と、ヘンレのループとも言われる近位・遠位尿細管という組織から構成されるが、尿を作るにはこのようなミクロ構造がなくてはならない(図1)⁽²⁾。糖尿病性腎症を始め多くの腎臓病ではこのネフロンが一つずつあるいは集団的に傷害され、異常物質が沈着したりして変性瘢痕化して失われていく。一つの腎臓にこのようなネフロンが100万個あると言われるが、これが失われていき、十分な尿を作る機能が失われて腎不全に至るわけである。つまり、単に細胞があっても、このような顕微鏡像にあるような構造がなければ、組織機能は果たせないのである。いかにしてこのようなミクロの構造を作るべきか?

2.2 コンピュータと機械による細胞操作技術

医学生物の研究分野では昔から、細胞培養する際、医者や研究者や技師たちは手作業でピペットを使って細胞を吸い込み、細胞を播いている。これは最新の研究分野である組織工学、再生医療においても例外ではない。しかし、顕微鏡レベルのミクロ構造を作ろうとしたとき、人の直の手作業で細胞を播いている限りは絶対にその実現は不可能である。ミクロの構造を作るためには、ミクロの操作を実現する機械の手が必要と考えた。一方、半導体技術、MEMS技術、レーザやイオンビーム加工などの微細加工技術では、 μm からサブ μm オーダーでの精密加工が可能になっている。さらにナノテクノロジーの研究では、IBMの研究所の研究者たちは1個1個の原子を操作して「IBM」の文字を描くことまでも実現した。このようなレベルの技術力をもってすれば、細胞を μm オーダーで正確に配置する機械の手の実現も不可能ではないと考えた。

筆者が人工心臓研究に従事していたころ、血液ポンプ作製は作業員が金型にポリウレタン樹脂を、ディッピングし乾燥する、を繰り返して手作業で作る方法が行われていた。そこへ新しく、CAD-CAM-CAE (Computer aided Design-Manufacturing-Engineering) で開発するロータリ式血液ポンプが導入され、コンピュータと機械によるものづくりへの時代の変化を目の当たりに経験した。照らし合わせて考えると、上記のマイクロナノ加工技術や操作技術も、コンピュータ制御の機械が開発されたからこそ可能になったということがわかる。つまり、新しい装置を開発すればきっと実現できるという確信と、組織工学もやがてコンピュータと機械による時代へ間違いなく移行するという時代観が、筆者の研究を後押しした。

そこで、個々の細胞、細胞外マトリクスを μm オーダーで配置操作を行い、三次元組織構築する機械の手となる技術の開発を目指した。すなわち、 μm オーダーのCAM (Computer Aided Manufacturing) 技術である。自分では Tissue CAD-M CAM 法と呼んだ。

個々の細胞をコンピュータで操作する技術を想定し、細胞マニピュレーション技術を調べた。細胞マニピュレーションは、マイクロピペットが体外受精の際に受精卵を把持するときに使われていた。光で操作する Optical Tweezers、電磁波で細胞をトラップする方法もあった。半導体回路のマイクロ抵抗やマイクロコンデンサをマウントする装置もあった。これらを結びつければきっと可能になると考えたが、問題はスピードであった。細胞マニピュレーション技術では、顕微鏡を見ながら、1個1個の細胞をつまみ、

移動して並べることは可能ではあるものの、手慣れたとしても、たった1個の細胞を数十 μm 移動させるだけで数十秒以上は必要である。

そこで着目したのが、インクジェットプリンタの技術である。当時のインクジェットプリンタは(2001年購入)、数ピコリットルのインク滴を十数 μm の精度で制御し印刷する性能を持っていた。プリントアウトした印刷物を顕微鏡で見ると、シアン、マゼンタ、イエローの直径25から45 μm のカラードットが印刷されていた(図2)。その精度とともに、これらすべてのドットがインクの色、場所、密度、配合がすべてコンピュータ制御で打ち出されていることに思いをはせると、インクジェットプリンタの技術に甚だ驚愕した。インクの代わりに細胞や細胞外マトリクスで印刷できれば、多種細胞を高精度に、しかも高速に配置しての組織構築が行える。そのスピードは1個1個つまんで並べるのとは桁違いである。つまり、顕微鏡写真をもとにプリントアウトすると、プリンタが、細胞と細胞外マトリクスを操作して、 μm オーダーの顕微鏡サイズの細かさで細胞を配置できることになる。このようにしてプリントアウトした二次元画像(二次元のミクロ構造)を順次積層すれば、複雑な三次元組織構築も可能になる。この発想からインクジェット式バイオプリンティング-バイオフィアブリケーションへの歩みがスタートした。

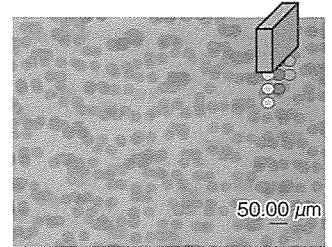


図2 インクジェット画像の顕微鏡像

3. インクジェットがもたらしたバイオプリンティング-バイオフィアブリケーションのコンセプト

インクジェットを組織工学に用いる利点を表1にあげる⁽³⁾⁽⁴⁾。インクジェットで細胞を印刷するという話は聞いたことがなかったし、コンピュータ上で組織をデザインし、細胞自体を配置しながら直接組織を構築しようとする組織工学の手法も世界にも例がなく、前代未聞の技術へのチャレンジであった。本当にできるかどうかとも全くわからなかったが、多種の細胞を内部までぎっしり構造を作って構築する方法はほかには考えられない、と思って動き出した。前例があろうがなかろうが、自分で実際に行い確かめるしかない。

インクジェットを用いたことで、組織工学において、主として以下の四つの技術的なコンセプトの実現を目指している、と言うことができる(図3)。

3.1 機械化

それまで人の手で行われていた細胞播種という細胞を播く作業を機械化することになる。機械化することによって、人の手をはるかに超える作業が可能になる。たとえば、どんな達人の手であっても、 μm サイズで細胞を並べるのは機械を使わねば至難の業である。しかもそれを1秒間に1000個並べてほしいと言われたら、それはもうとんでもなく不可能な話である。しかし、インクジェットでは、プリンタヘッドにはインクジェットノズルが何十から何百もあり、すべてのノズルがコンピュータ制御で吐出・非吐出が調節されている。ミクロの機械の手が多数集積していると言ってしまう。そして、それら一つ一つのノズルにおいてインク滴を吹き出す回数はkHzオーダーと言われる。1秒間に1000個の単位である。高速に大量にインク滴の吐出を制御している。その結果、A4用紙1枚分の印刷をすれば、約1億個のドットが現に印刷されている。また、何枚印刷しても同じ絵がプリントされる。機械の手を導入することで、超微細、超高速、超大量、超再現性を実現することが期待できるのである。文献(5)にもまとめたので参照されたい。

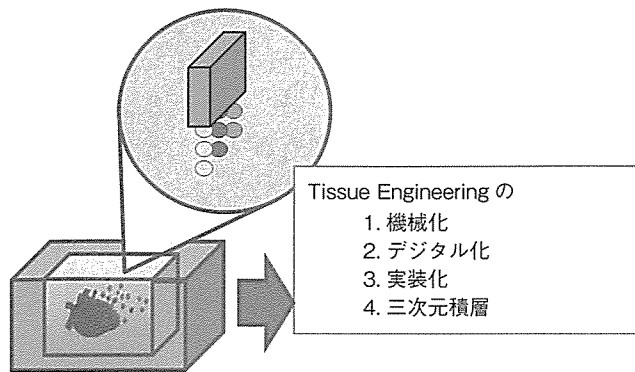


図3 インクジェットの導入で推進するコンセプト

3.2 デジタル化 : Computer Aided Tissue Engineering, Digital Tissue Engineering

インクジェットプリンタはコンピュータからのデータを出力する出力装置である。DTP (Desk Top Publishing) とも呼ばれるが、今や、印刷は、デジタルデータを送って版なしのデジタル印刷で出力する方式が主流になりつつある。インクジェットプリンタの進歩と普及がそれを促進したと言える。同様に、組織工学の領域にインクジェット技術を導入することによって、デジタル印刷、デジタルものづくりの概念を導入し推進することができる。すなわち、コンピュータ上での設計 (CAD) とその出力としての構築 (CAM) がつながり、生体組織をコンピュータでデザインして作るというコンセプトである。

デジタル化はさまざまな分野で世の中を大きく革新してきたのはここで改めて紹介するまでもないが、組織工学の領域においても同様の革新性がある。読者諸氏、思う存分想像していただいて、革新に取り組んでいただきたい。

たとえば、従来の組織工学では、組織の設計と言っても、細胞を播く足場材の外形を鋳型で作る程度でしかなかった。それが、この概念を推し進めることで、コンピュータの計算能力を存分に活用した細胞組織の設計に進歩させることができる。近い将来、細胞や組織間の反応の高度な信号解析、理論解析やシミュレーション、予測までもができるようになるだろう。すなわち CAE の導入である。また、デジタル化、Digital Tissue Engineering と表現すると、バーチャル上ですべて計算して細胞培養をシミュレーションする *in silico Biology* というような学問領域を思い出しがちだが、CAM 装置があれば、それに基づいた組織を実際に作れるようになる。バーチャルの世界を現実の世界につなげることができる。また、生命現象をシステムととらえて統合的に理解するシステムバイオロジーという研究領域があるが、CAM 装置があれば、現象論的理論バイオロジー

が生体組織や臓器作りのためのシステムバイオエンジニアリングへ進化するだろう。そうなってくると、これまでの組織工学とまるっきり異なるアプローチが生まれ、間違いなく組織工学や再生医療の高度化、効率化、最適化が進むだろう。

3.3 実装化 : On Demand Direct Tissue Engineering

インクジェットプリンタは、適材適所、カラーインクのドットをあるべき場所に直接滴下して描画する。本アプローチでは、そのインクとして生きた細胞を始め、生体を構成する材料を用いる。したがって、インクジェットによってそれら材料を直接あるべき場所に配置実装することが可能になる。そしてできるのは、絵でも模型でもなく生きた細胞と生体材料が配された生きた組織体である。昨今、さまざまな 3D プリンタが世の中をにぎわしているが、ほとんどは、模型作りの域を出ない。生きた組織作りを目指す以上、生きた細胞が実装できねば意味がない。それを実現する装置が要る。

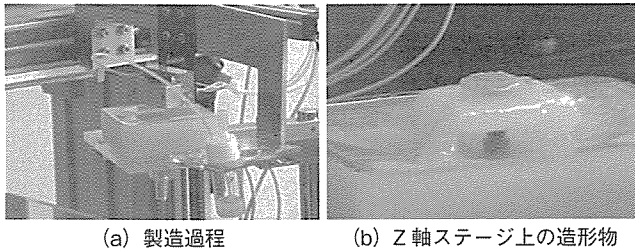
3.4 三次元積層造形 : Layer by Layer 3D Printing, Bottom-up Manufacturing, Additive Manufacturing

インクジェット印刷はあくまで文字や画像を紙上にプリントするために開発されたものである。顕微鏡画像をもとにして配置することを目指すうんぬんとはいうものの、実際は、生体組織は二次元ではなく三次元構造をしている。したがって、二次元の画像を描くことができたとしても、三次元化という大きな問題が残る。そこで、筆者は、「重ね塗り」という手法を目指した。つまり積層造形のアプローチである。立体構造物を作る場合、切削装置で削って作る方法 (Subtractive Manufacturing) や型に詰めて作る方法 (Molding) があるが、精巧な外形は作れても、内部構造を作ることはできない。組織工学でもあとから細胞を播種するだけでは内部構造は作れない。それに対して、生体組織はほとんどすべて、細胞が構成するマイクロ構造が内部にぎっしり詰まっている。しかもその内部の構造こそが細胞を超える組織機能の要である。そこで、内部までしっかりと構造を作るために、1層、1層構造を作りながら、それらを積み重ねて三次元構造を作る方法を選択したのである。

インクジェットによる細胞の吐出実験を開始して、生きた細胞が生きたままで打ち出せることを確認したものの、そのままでは重ね塗りはできない。なぜなら、細胞は乾くと死んでしまうので濡れた環境に打ち出さねばならず、濡れた場所に打ち出すと滲んで流れてしまうからである。このままでは積層による三次元化は不可能である。そこで、細胞の乾燥を防ぐことと三次元化を同時に解決する方法として、インクジェットの液滴をゲル化させることを試みた。アルギン酸 Na と塩化 Ca のゲル化反応を用いた。これは人工イクラの作り方でもある。またアルギン酸ゲルは組織

表1 インクジェットの特徴と、組織工学・再生医療への応用の利点^③

インクジェットの特徴	組織工学、再生医療への応用の利点
(1) 写真画質の高精細印刷 ・ μm のインク吐出位置の制御が可能。 ・ ごく微量のインク滴の量の制御が可能。	・ 細胞や生理活性物質の μm での局在位置制御が可能。 ・ ピコリットレベルでの液滴量の制御が可能。
(2) カラー印刷が容易、複数インクによる高画質化。	・ 多種の細胞、多種の生理活性物質などが、独立して配置しながら吐出できる。
(3) 高速印刷 : ノズルの集積により、毎秒数千~数万滴以上のインク滴の吐出能力がある。 大量の液滴の配置を個々に操作可能。	・ 億を超える大量の細胞の操作であっても操作するのは現実性がある。 ・ 高速な生体組織作りが可能になる。
(4) 確立されたコンピュータとの接続。	・ コンピュータと機械による組織工学、再生医療への応用・発展が可能。
(5) 印刷の対象を選ばない。紙、立体物、ゲル、液体への吐出が可能。	・ 培養ディッシュや培養用ディスク、シート、三次元 Scaffold、ゲル、液体への吐出が可能。手術創への吐出も可能。
(6) 非接触での吐出が可能。	・ 2液反応性ゲル化材料、その他2液反応性材料が使える。対象物への摩擦や擦過傷害防止。手術創への吐出も可能。雑菌の混入防止。
(7) 熱をかけずに常温で印刷が可能。 (サーマル式は除く)	・ 細胞を生きたままほとんどダメージなく打ち出せる。 ・ 細胞プリンティングが可能。生きた細胞によるダイレクト組織工学・再生医療。 ・ タンパク質や生理活性物質も打ち出せる。
(8) インクジェット液滴のゲル化。	・ 水溶液中でもにじまない印刷が可能。 ・ 細胞の乾燥防止。細胞へのダメージ縮小。 ・ 三次元積層造形が可能。



(a) 製造過程 (b) Z軸ステージ上の造形物
図4 3D Bioprinter 2号機での構造物の作製

工学ではよく用いられる生体親和性の材料でもあった。実験で塩化Ca溶液中に打ち出すと、インクジェットの液滴は瞬時にそのままゲル化し、見事マイクロサイズの人工イクラができた。しかも作られたマイクロのイクラはほぼ同じサイズで、ここでもインクジェット技術の高さを知ることができた。液滴と同時に吐出された細胞は、ゲル内に封じ込められ、乾燥から逃れることができた。そして細胞分裂することも観察できた。液滴のゲル化技術を用いてラインを引くと、吐出されたゲル同士が融合し、ゲルのファイバとなった。今度はファイバを交差させると立体交差し、その交差を繰り返すとどんどん積層もできるようになった。こうして生きた細胞を乾燥させずに生きたまま三次元積層することができ、細胞が乾燥しないように液体中に作れるという独自の3Dプリンタ方式を見出した。ラピッドプロトタイプング技術では、今日の3Dプリンタのブームで強調されている積層造形(Additive Manufacturing)のコンセプトであるが、バイオファブリケーションにおいては、まさにそれを自前で進んできたようなものである。

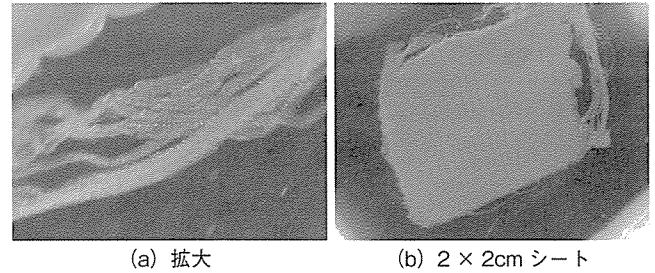
われわれの3Dバイオプリンタは、神奈川科学技術アカデミーバイオプリンティングプロジェクトで実験機ではあるが本格的な1号機が開発された^{(6)~(8)}。さらに富山大学へ移ってから、その財産を継承して、多くの画像を読み込んで積層する2号機へと進化させた。2号機には手作りだがZ軸ステージを加え、1層1層沈降していくシステムにバージョンアップした(図4)。その結果、造形能力は確実にアップして、今まで作れなかった複雑な構造物の造形ができるようになってきた^{(5)~(9)~(11)}。現在、3号機、4号機とバージョンアップの構想を発展させている。研究が進み、成果が出たらぜひまた発表していきたい。

3.5 ファブリケーションのデジタル化

インクジェットはドットで画像を表現している。それと同様に、本法では、インク液滴が瞬間的にゲル化してゲルビーズ化してそれが融合しつつ三次元立体物を形成する。したがって、ゲルビーズは三次元積層造形の基本要素単位であり、この基本要素単位を積み上げて立体構成することになる。インクジェットの液滴サイズが極めて低分散であることは、インクジェットがこの造形法にとっても有利な技術であることがわかる⁽¹²⁾。

さらに、アナログ写真がデジタル写真に、アナログビデオがデジタルビデオに移行し始めた頃、いかに画像のギザギザ(ジャギー)を失くすかの研究がなされてきた。同様に、ゲルビーズ積層の作り方もある種のデジタル的、離散的なものづくりになる。加えていろいろな要素、因子も多々関わってくるので、工学的基礎研究としても未開でかつ新領域を築くともいえるほどの広がりを持つアプローチとも考えられる。

図5は、アルギン酸ゲル(蛍光色素を添加)で作製した2×2cmのシートである。作製物をあちこち操作しているうちに周辺部がほどけてきたが、その部位を拡大したのが図5(a)である。アルギン酸ゲルビーズのドットが連結し融合したゲルファイバでシートが構成されているのがわかる。ただしゲルファイバを形成しているゲルビーズの形状は変形し、ゲルファイバ同士の接着性も長軸方向、短軸方向で差がありそうである。液滴の大きさ、作製時の吐出周波数とヘッドのスピード、ゲル化のスピードが関与すると考えられる。



(a) 拡大 (b) 2×2cmシート
図5 3D Bioprinterで作製したシートの積層(撮影協力 Hylox 社)

いずれにせよ、世の中の3Dプリンタは大流行だが、バイオプリンティング-バイオファブリケーションにおいては、装置も技術も学問自体も、まだ手作り実験を始めたばかりの段階なので、工学的に詰めていけばきっと製造能力と質の向上につながると期待できる。そして学問的にも、3Dプリンタで世界的に広がっている三次元構築法、Digital Fabrication, Additive Manufacturingの一分野を築くことができるのではないかと考える。

4. まとめ

再生医療、組織工学では、薄い組織から分厚い三次元の組織へ、単純な組織から複雑なマイクロの構造を持つ組織へ、単種類の細胞組織から多種細胞で構成される組織へ、そして血管のない組織から血管豊富な組織へと対象が進む。このとき、組織の工学的設計、製作、細胞配置操作、三次元構築は、人間の手ではなく機械の手で行われるようになるのは、火を見るよりも明らかであり、それを可能にする技術開発は避けて通れない。ならば、現在の日本の技術力のアドバンテージを活かして、先駆けて細胞から組織、さらに臓器を作る技術開発を進め、欧米にも突出して世界に貢献することが望まれる。再生医療学会、Biofabrication学会の動向からすると、欧米・中国、韓国を含めて、世界はもう動き出している。スピード勝負に後れを取らないよう、祈願したい。

(受稿受付 2013年10月28日)

●文献

- (1) <http://www.tissueeng.net/>, (2002)
- (2) 神戸学院大学, 組織学カレントスライドデータベース, http://db.kobegakuin.ac.jp/kaibo/his_pp/index.html
- (3) 中村真人・西山勇一・逸見千寿香・山口久美子・望月修一・瀧浦晃基・中川英元, 再生医学シリーズ [30] インクジェット式 Direct Tissue Engineering, *Organ Biology*, 14-1 (2007), 29-39.
- (4) 中村真人・西山勇一・逸見千寿香・岩永進太郎・山口久美子・望月修一・瀧浦晃基・中川英元, コンピュータ支援バイオプリンティング・バイオファブリケーション, 再生医療, 7-2 (2008), 105-113.
- (5) 岩田博夫・松岡厚子・岸田晶夫 [監修], 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, (2012), 146-156, シーエムシー出版.
- (6) Ringers, B.R., Spargo, B.J. and Wu, P. editors, *Cell and Organ Printing*, (2010), 23-34, Springer.
- (7) Nishiyama, Y., Nakamura, M., Henmi, C., Yamaguchi, K., Mochizuki, S., Nakagawa, H. and Takiura, K., Fabrication of 3d Cell Supporting Structures With Multi-Materials Using The Bio-Printer, *Proc. of MSEC2007*, (2007-10), MSEC2007-31064.
- (8) 中村真人, 中村「バイオプリンティングプロジェクト」研究概要集, (2008), (財) 神奈川科学技術アカデミー
- (9) Arai, K., Iwanaga, S., Toda, H., Genci, C., Nishiyama, Y. and Nakamura, M., Three-Dimensional Inkjet Biofabrication Based on Designed images, *Biofabrication*, 3-3 (2011), 034113.
- (10) 伊藤紘造・荒井健一・沖野賢志・岩永進太郎・戸田英樹・ゲンツィチャビ・中村真人, 人工生体組織の設計と製作技術の研究, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE, MEとバイオサイバネティクス, 111-57 (2011), 5-8.
- (11) 荒井健一・中村真人, バイオプリンティングによる組織形成, 未来材料, 12-11 (2012), 6-12.
- (12) Nakamura, M., ほか, Ink Jet Three-Dimensional Digital Fabrication for Biological Tissue Manufacturing: Analysis of Alginate Microgel Beads Produced by Ink Jet Droplets for Three Dimensional Tissue Fabrication, *J. of Imaging Science and Technology*, 52-6 (2008), 060201-6.

事例
紹介CPSW (セルプロセッシングワーク
ステーション) システム

CPWS (Cell Processing Work Station) System

山本 宏

Hiroshi YAMAMOTO



◎1986年熊本大学工学部機械工学科卒業、同年三洋電機(株)入社、研究開発本部配属、2008年京都大学大学院工学研究科博士後期課程修了博士(工学)、現在、パナソニックヘルスケア(株)において、細胞治療・再生医療に用いる培養装置やバイオハザード対策用キャビネットなどの開発に従事

◎研究・専門テーマは、細胞治療・再生医療を支援する機器・システムの開発

◎正員、パナソニックヘルスケア(株)メディカルシステムビジネスユニットバイオメディカ統括グループシステム設計グループ再生医療システムチームチームリーダー(参事)

(〒370-0596 群馬県邑楽郡大泉町坂田1-1-1/E-mail: yamamoto.hiroshi3@jp.panasonic.com)

谷本 和仁

Kazuhiro TANIMOTO



◎1984年金沢大学工学部機械工学科卒業、1986年澁谷工業(株)入社、プラントエンジニアリング部門・製薬設備部門にて、製薬業界関連のエンジニアリング及び設備設計を担当・所掌、2009年4月再生医療部門を兼務、再生医療関連のエンジニアリング及び設備設計を担当・所掌、現在に至る

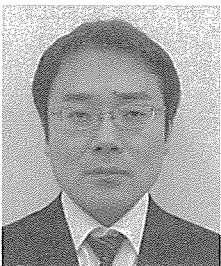
◎研究・専門テーマは、アイソレータを利用した製造施設の実例、幹細胞医療の実用化技術と産業展望

Aseptic Processing Guidelines in Japan (Authors) ISPE 無菌COP, Containment COP, PDAの各団体に所属

◎澁谷工業(株)RPシステム森本工場プラント生産統轄本部製薬設備技術本部製薬設備技術部再生医療システム本部技術部主管技師(〒920-0177 石川県金沢市北陽台2-1/E-mail: k-tanimoto@shibuya.co.jp)

千葉 創一

Souichi CHIBA



◎2000年東京電機大学工学部精密機械工学科卒業、同年トミー工業(株)入社、現在、遠心機やオートクレーブなどの特注製品開発に従事

◎研究・専門テーマは、遠心機やオートクレーブなどの開発

◎トミー工業(株)開発本部第3設計部総合機器設計課主任

(〒351-0101 埼玉県和光市白子1-33-2/E-mail: chiba566@tomys.co.jp)

1. はじめに—普及が期待される再生医療・細胞治療

ヒト細胞を培養して増殖させ、これを組織に再生して移植する再生医療や、がん免疫治療に代表される細胞治療が、難病に対する新しい治療法として注目を集めている。とくに、iPS細胞は倫理的問題が少なく、患者本人からも容易に樹立できることから、再生医療・細胞治療への応用展開が期待されている。

細胞の培養・保存などの操作は、細胞の安全性や品質を担保して行う必要があり、GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠して行うことが望ましい。このGMPに準拠した細胞操作を支援するための施設・機械装置・システムの開発が再生医療・細胞治療の普及のために必要な要素技術の一つとなっている。

2. CPWSシステムの構成

細胞の培養・保存など細胞を操作する際の安全性を担保する方法の一つとして、細胞加工施設であるCPC (Cell Processing Center: 細胞を扱うための専用クリーンルーム) を用いた細胞操作が一般的に行われている。CPCはクリーンルーム内の空気制御とバイオハザード対策用キャビネットのクリーン作業エリアを組み合わせることで細胞操作のための無菌環境を作り出す施設である。

このCPCは世界的に使用されているが、高額な初期投資(施設建設費: 約1億円)、広い設置面積(約100m²)、高額なランニングコスト(年間約2000万円)が必要なことが普及の妨げとなっている。そこで、過酸化水素除染によりチャンバ内の無菌環境を実現するアイソレータに、細胞培養のために必要となるCO₂インキュベータ、細胞観察用顕微鏡、遠心分離機、を無菌的に接続することで、細胞操作のための無菌環境を小型の装置で実現するCPWS (セルプロセッシングワークステーション) システムを提案した。このCPWSシステムに、細胞培養プロセス情報を管理する工程管理システムを統合することにより、細胞培養トータルシステムを提供することができる。

CPWSシステムの構成を図1に示す。ワークエリアはグローブボックス構造であるため、最大の汚染源である作業者を隔離でき、内部は過酸化水素で除染され無菌環境を実現する。ワークエリア内はHEPA (High Efficiency Particulate Air) フィルタによりクラス100以下の清浄度が維持さ

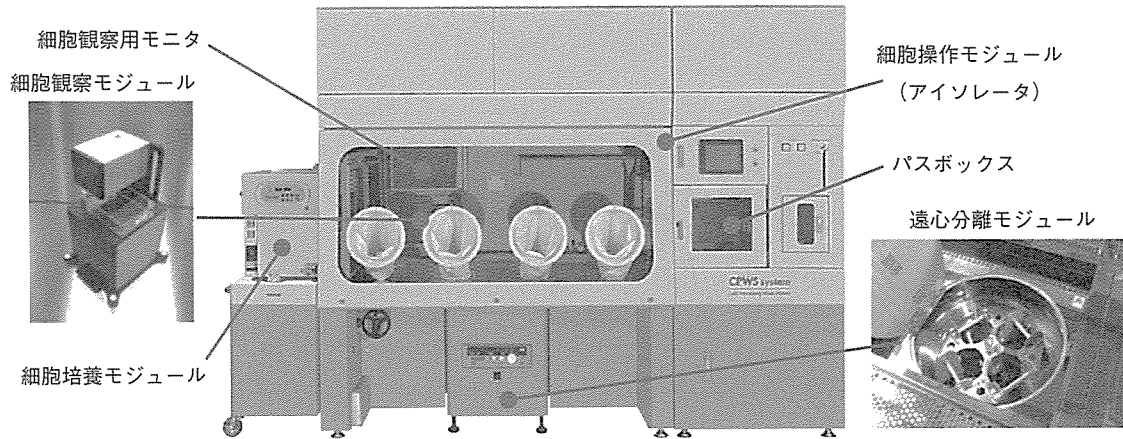


図1 CPWS システム

れており、着脱式の細胞培養モジュール、遠心分離モジュール、細胞観察モジュールを備えている。細胞培養に必要な器材は過酸化水素による除染機能を備えたパスボックスを経由して無菌的に出し入れすることができる。細胞の培養状態は細胞観察モジュールを用いて画像を撮影し、細胞観察用モニターを通して確認することができる。またこのモニターを通して工程管理システムからの指図内容を確認することもできる。

細胞操作モジュール（アイソレータ）の開発は澁谷工業（株）が担当し、遠心分離モジュールの開発はトミー工業（株）が担当している。細胞培養モジュール、細胞観察モジュール、およびシステム全体の設計はパナソニックヘルスケア（株）が担当している。

2.1 細胞培養モジュール

CPWS に連結して細胞培養を行うための CO₂ インキュベータである。着脱式であるため、複数の細胞培養モジュールを使用することで多くの検体の培養を行うことができる。専用のキャスタ付架台に設置することにより、スムーズに移動させることができる。CPWS の全体除染を行う際に、細胞培養モジュールの扉を開けて内部まで過酸化水素を侵入させることで除染を行う。

2.2 遠心分離モジュール

細胞調整に必要となる遠心分離機を CPWS の作業台下に接続して設置することができるため、細胞を CPWS の外に取り出すことなく、無菌環境下において遠心分離作業を行うことができる。CPWS の全体除染を行う際に、遠心分離機の蓋を開けて内部まで過酸化水素を侵入させることで除染を行う。

2.3 細胞観察モジュール

ほぼ透明に近い接着系細胞の培養状態を観察するための位相差顕微鏡である。過酸化水素に耐えられる構造とするために、対物レンズなどの光学系部品を過酸化水素耐性のある筐体内に収納している。そのため、CPWS 内部に設置して過酸化水素除染を行うことができる。細胞観察画像の一例を図 2 に示す。

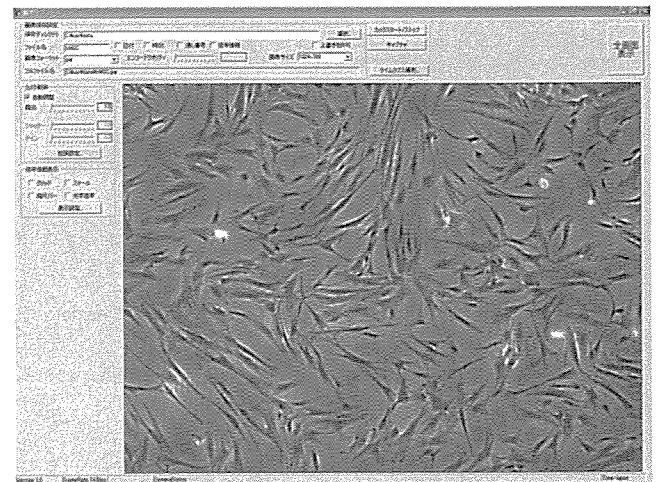


図2 細胞観察モジュールによる細胞観察画像

3. 除染パターン

細胞を操作するための無菌環境を実現する過酸化水素除染は、次の (1)~(4) のプロセスで実施する。

(1) 始業前点検

過酸化水素除染を開始する前に、各機器が正常に動作することを確認する。

(2) リークチェック

過酸化水素の漏れが発生しないように、ワークエリア内を加圧してリーク箇所が存在しないことを確認する。

(3) 過酸化水素散布

過酸化水素蒸気をワークエリア内に散布して除染を行う。

(4) エアレーション

エアの吸入・排気によりワークエリア内にエアを循環させ、散布した過酸化水素を除去する。排気側には、白金触媒を設置して過酸化水素を無害化している。

過酸化水素除染は、使用状況により複数のパターンで行うことができる。(図 3)

[全体除染]

CPWS システムの使用前に、細胞操作モジュール、細胞培養モジュール、遠心分離モジュール、パスボックス、の全体を過酸化水素除染する。作業エリア全体を無菌状態に

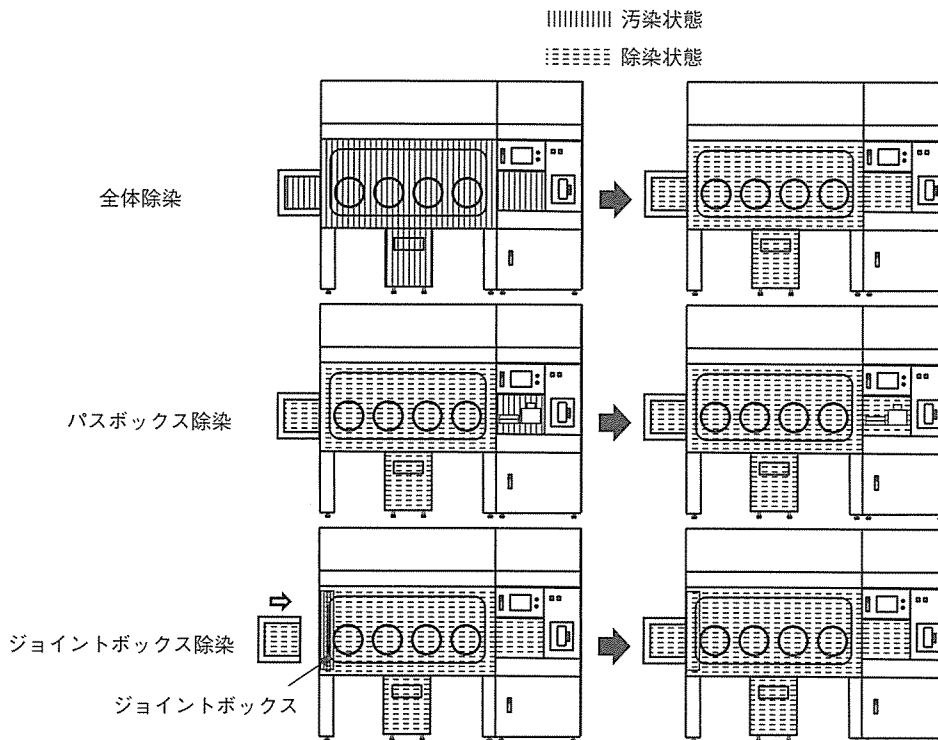


図3 除染パターン

することで、細胞操作のための準備を行う。

[パスボックス除染]

細胞操作に必要となる機材を搬入するために、パスボックス内に機材を設置して過酸化水素除染を行う。細胞操作モジュール内を無菌状態にして細胞を操作している状態でも機材を搬入することができる。

[ジョイントボックス除染]

細胞操作モジュール内を無菌状態にして細胞を操作している状態で、細胞培養モジュールを取り外し、別の細胞培養モジュールを接続してジョイントボックスを除染する。この機能により、複数の細胞培養モジュールを着脱しながら使用することが可能となる。

4. CPWS システムの導入効果

CPWS システムはイニシャルコスト、ランニングコスト、設置面積を大幅に低減できる簡易型の GMP 準拠セルプロセッシング設備であり、装置自体のサイズも 2m² (設置延べ面積 50m²) の簡易的な装置で、簡単な細胞培養無菌工程であれば十分対応できる。このため熟練したサニテーション技術、ガウニング技術が不要となり、無菌無塵衣費用 (年間 400~500 万円程度) などのランニングコストが大幅に削減される。また、施設もグレード D レベルのクリーンルーム程度の簡単なもので十分となり、建設コストなどの初期投資や電気代などのランニングコストの大幅な削減が期待できる。

5. 販売実績

パナソニック ヘルスケアは CPC の販売において、主に国内の大学を中心として約 100 施設を手掛けている。また、澁谷工業のアイソレータは製薬企業を中心に累計約 450 台の納入実績がある。また、(株) トミー工業から販売している遠心分離機は大学を中心として毎年約 6000 台の納入実績がある。これらの事業実績を背景として CPC に代わる細胞加工装置として CPWS システムをユーザーに提案してきた。その結果、国内で約 100 台、アメリカにおいて 4 台の販売実績を上げている。

6. まとめ

細胞操作のための無菌環境を小型の装置で実現する CPWS システムを提案した。細胞培養環境に GMP 準拠の考え方が導入されて約 10 年が経過しており、その間に薬事承認を受けた再生医療が開始され、免疫療法などの細胞治療も普及しつつある。

今後は、細胞培養の有効性・安全性を効率的に担保するためのさらに改良された機器・システムを提案し、再生医療・細胞治療の普及に貢献していきたい。

(受稿受付 2013 年 10 月 22 日)

事例
紹介

培養皮膚, 培養軟骨の産業化

Challenges for New Era : Industrialization of Tissue Engineered Medical Products

菅原 桂

Katsura SUGAWARA

◎北海道大学大学院農学部修士課程(農芸化学専攻)修了. 1987年協和発酵工業(株)入社, 1997年同社退職. 国立岡崎共同研究機構基礎生物学研究所にて総合研究大学院大学博士後期課程入学. 2001年に博士(理学)取得後, (株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングに入社. 2013年1月より現職

◎研究・専門テーマは, 軟骨再生医療

◎(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング 研究開発部長, 自家培養軟骨ジャックプロダクトマネージャー
(〒443-0022 愛知県蒲郡市三谷北通 6-209-1 / E-mail : katsura_sugawara@jpte.co.jp)



1. はじめに

近年, 再生医療という言葉がテレビや新聞雑誌でも取り上げられるようになり, さらに2012年には山中伸弥博士がノーベル生理学・医学賞を受賞したことで, iPS細胞⁽¹⁾という学術用語が世に広く知られることになった. 再生医療は, 1993年にR. LangerとJ.P. Vacantiが「ティッシュ・エンジニアリング(組織工学)」という概念を提唱したことに始まる⁽²⁾. これは, 細胞・増殖因子・スキャホールド(担体)を適切に組み合わせて培養したのちに体に移植することで, 生体の自己修復能を補い, 治癒に導くという考えである. この技術によって, あらゆる組織や臓器を造ることができるようになり, 従来の医療では治すことが難しかった病気やケガを治療できるという期待が広がった. そして1990年代後半には再生医療ブームが起こって「21世紀は再生医療の時代」と言われるようになった.

しかし, 2013年現在, わが国において製造販売承認を取得した製品は, (株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング(J-TEC)(以下, 当社)の自家培養表皮ジェイスと自家培養軟骨ジャックの2品目のみで, 企業治験を行っている開発品はテルモ(株)の骨格筋芽細胞シートと, 日本ケミカルリサーチ(株)の同種間葉系幹細胞の2品目である⁽³⁾. つまり, わが国においてはiPS細胞を始めとする基礎研究で世界をリードしているものの, 再生医療の実用化・産業化についてはなかなか進まない状況が続いている. このような状況下, わが国でも再生医療製品を早くに患者へ届けるべく, 法改正も含めてさまざまな動きが始まっているところである.

本稿では, 世界における再生医療の産業化の状況を概観するとともに, 当社での自家培養表皮, 自家培養軟骨の開発経験も踏まえながら, 今後の技術的課題や, 再生医療と工学の接点についても言及したい.

2. 世界における再生医療産業化の現状

諸外国において産業化が進んでいるのは培養皮膚と培養軟骨である. 培養皮膚には, 表皮細胞を用いて作製する培養表皮(Epicel, Holoderm, ジェイス), 線維芽細胞で作製する培養真皮(Dermagraft), 表皮細胞と線維芽細胞で作製する培養皮膚(Aprigraf, OrCel)等が製品化されている⁽⁴⁾. このなかでEpicel, Holoderm, ジェイスは患者自身の細胞で作られる自家製品であり, Dermagraft, Aprigraf, OrCelはドナーからの細胞で作られる同種製品である(表1). 同種培養皮膚は作り置きができるため, 熱傷などの緊急対応に有用である. 培養軟骨は, 軟骨欠損患者の関節軟骨から健康軟骨を少量採取し, 平面培養で増殖させたのちに細胞を回収し, 軟骨欠損部に注入する自家培養軟骨細胞移植術が1994年に報告され⁽⁵⁾, アメリカGenzyme Biosurgery社(現Sanofi Biosurgery社)がCarticelとして1997年に上市した. ベルギーのTiGenix NV社は, この製造方法に加え, 原材料である軟骨細胞の品質管理方法を独自に確立し, ChondroCelectという製品名で2009年にヨーロッパEMAの承認を取得している. アメリカでの培養軟骨製品は現在でもCarticelの1品目のみであるが, ヨーロッパではChondroCelectの承認に先だって, CaReS, BioSeed-C, Hyalograft Cなどの製品が施設限定の承認で使用されている. これらの製品は, 軟骨細胞をコラーゲン, 生体吸収性ポリマー, ヒアルロン酸などのスキャホールドに播種したものである. Carticel, ChondroCelectのように, 細胞懸濁液の状態で適用する製品が第一世代の培養軟骨と呼ばれるのに対し, スキャホールドを用いた製品は第二世代の培養軟骨と呼ばれる(表2).

米欧のほかに注目すべきは韓国である. 韓国は国策として再生医療を推進しており, 既承認品として培養皮膚が7品目(Hyalograft 3D, LSK Autograft, AutoCel, Keraheal, Cure-skin, Holoderm, Kaloderm), 培養軟骨が1品目(Chondron)ある. また, 新生児臍帯血由来の同種間葉系幹細胞を軟骨欠損治療に用いるCARTISTEM(Medipost社)は世界初の同種幹細胞医薬品である. このほか韓国では30品目以上が治験実施中とのことである.

3. わが国における再生医療産業化の現状

日本において再生医療による治療を実施するスキームとしては, 医師の責任下で実施される自由診療と, 大学病院等で行われる臨床研究, そして薬事法下で企業が承認を得

表1 世界で製品化されている主な培養皮膚

国名	製品名	企業名	概要
アメリカ	Apligraf	Organogenesis	同種/複合型
アメリカ	OrCel	Forticel Bioscience	同種/複合型
アメリカ	Dermagraft	Shire	同種/真皮
アメリカ	Epicel	Sanofi Biosurgery	自家/表皮
ドイツ	Epidex	Euroderm	自家/表皮
イギリス	VAVELTA	Intercytex	同種/線維芽細胞
イギリス	TransCyte	Shire	同種/真皮
イギリス	Cryoskin	Altrica	同種/表皮
イギリス	ReCell Spray-on Skin	Avita Medical	自家/表皮細胞
日本	ジェイス	J-TEC	自家/表皮
韓国	Hyalograft 3D	Hanson Biotech	自家/真皮
韓国	LSK Autograft	Hanson Biotech	自家/表皮
韓国	AutoCel	MCTT	自家/表皮
韓国	Keraheal	MCTT	自家/表皮細胞
韓国	CureSkin	S. Biomedics	自家/線維芽細胞
韓国	Holoderm	Tego Science	自家/表皮
韓国	Kaloderm	Tego Science	同種/複合型

複合型：複合型培養皮膚，真皮：培養真皮，表皮：培養表皮，表皮細胞：表皮細胞懸濁液，線維芽細胞：線維芽細胞懸濁液

表2 世界で製品化されている主な培養軟骨

国名	製品名	企業名	概要
アメリカ	Carticel	Sanofi Biosurgery	自家/第一世代
ヨーロッパ	ChondroCelect	TiGenix NV	自家/第一世代
ヨーロッパ	MACI	Sanofi Biosurgery	自家/第二世代
イタリア	Hyalograft C	Anika Therapeutics	自家/第二世代
ドイツ	CaReS	Arthro Kinetics	自家/第二世代
ドイツ	Bioseed-C	BioTissue Technologies	自家/第二世代
ドイツ	Chondrotransplant	co.don	自家/第一世代
ドイツ	Chondrosphere	co.don	自家/第一世代
日本	ジャック	J-TEC	自家/第二世代
韓国	Chondron	Sewon Cellontech	自家/第一世代
韓国	CARTISTEM	Medipost	同種/幹細胞

第一世代は軟骨細胞を細胞懸濁液の状態で移植するもので、第二世代は軟骨細胞をスキャホールドに播種して培養した状態で移植するものをいう。

て製造販売を行う形態がある。臨床研究はわが国独自の制度であるが、再生医療における基礎研究の成果を臨床に進めるには有用な仕組みである。幹細胞を用いて臨床研究を実施するには、当該研究が「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に適合していることを、各医療機関の倫理審査委員会の承認を受けたのちに、厚生労働大臣から許可を得る必要がある。2013年7月末現在、この指針に適合した臨床研究は84件である⁽⁹⁾。この活発な状況を見ると、日本では再生医療の基礎研究と臨床研究が非常に盛んに行われていることがわかるが、その出口として、企業への技術移転や治験を経て製造販売に至る事例は非常に限られていると言わざるを得ない。

自家培養軟骨ジャックは、広島大学大学院整形外科学講座の越智らが1996年から島根医科大学（当時）において臨床研究を実施していた自家培養軟骨移植術⁽⁶⁾を、当社設立の1999年に技術移転を受けて、薬事法下での規制要求事項に合うよう、原材料の選定、製造工程の標準化、品質管理方法の確立などを行ったものである（図1）。2001年に治験前確認申請を行い、2004年に治験を開始し、2007年に治験を終了⁽⁷⁾したのち、2009年に製造販売承認申請を行って3年後の2012年7月に製造販売承認を取得した。技術移転から承認取得まで約13年を要したが、開発に当たっては、患者自身の細胞を用いるため個人差が避けられない自家製品において、どのような製品規格を設定するのが適切かという点で非常に難渋した⁽⁸⁾。また、自家製品は究極のオーダーメイド製品であり、今のところ、ほとんどの製造工程が人の手に委ねられるため、労力やコストの低

減が大きな課題として残されている。しかし、幸い自家培養軟骨ジャックは2013年4月に保険収載され、現在は一般の医療として外傷性軟骨欠損症および離断性骨軟骨炎の治療に用いられている。このように再生医療の実用化には多くの年月が費やされているが、わが国でも再生医療の進んだ技術を早期に国民に提供すべく、「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律」が2013年4月に成立し、さらには薬事法改正案、再生医療等の安全性の確保等に関する法律案が国会で審議されているところである。従来の医薬品や医療機器と特性がまったく異なる再生医療製品を早期に承認するため、規制制度の整備が進められていることは歓迎すべきことであり、今後の進展に注目したい。

4. 再生医療の技術的課題

あらゆる組織や臓器を造ることができると期待されている再生医療であるが、現状で実用化に至っている製品が主に皮膚と軟骨に限られている理由は、いずれも血管系の構築を必要としないためである。表皮は厚さ約200 μmの組織で、栄養は真皮の毛細血管からの拡散で供給されている。また、関節軟骨は厚さ約2~3mmの組織で、主に関節液からの拡散によって栄養が供給されている。このため培養皮膚や培養軟骨では積極的な栄養供給を考慮する必要はないが、他の栄養要求性の高い細胞を用いて構造体を作製する場合、直径が数百 μmを超えると中心が貧栄養状態となって壊死が生じると言われており、血管系の構築による

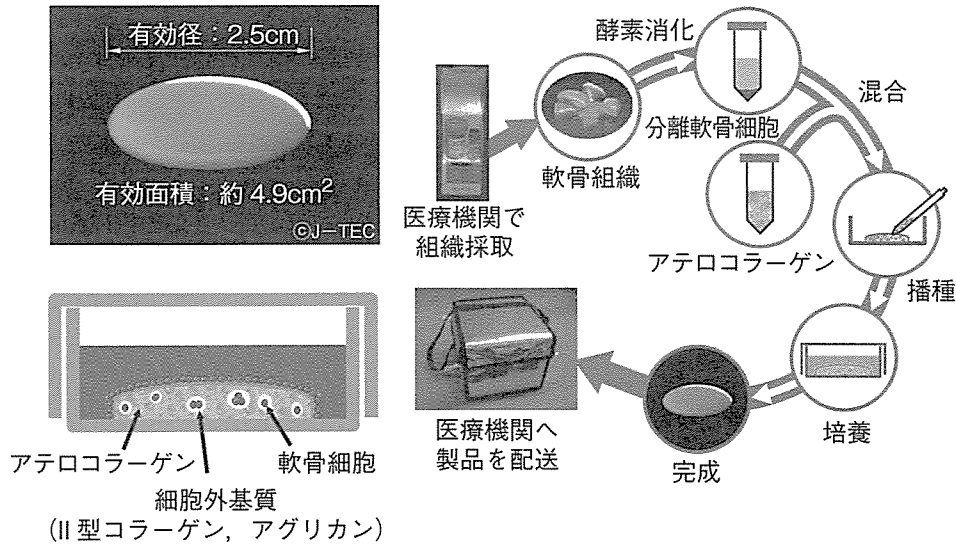


図1 自家培養軟骨ジャック®の概要と製造方法

栄養供給が必須となる。構造体の中に血管系を構築するための技術として、細胞シートを積層して三次元化する際に血管内皮細胞をパターン化して入れ込む方法⁽⁹⁾、3Dバイオプリンティング法⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾などの研究が進んでいる。また、装置を用いてより完成度の高い再生医療製品を作製する事例として、アメリカ Histogenic 社が開発している NeoCart がある。これは、患者自身の軟骨細胞を I 型コラーゲンの三次元スキャホールドに播種し、細胞組織体外自動培養装置内で、温度やガス濃度を適切に保つと同時に、歩行や運動などにより細胞が体内で受ける圧力と同様な静水圧をかけながら培養液を供給するという方法⁽¹²⁾である。NeoCart は 2003 年からアメリカで治験が実施されている⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾。

このように、複数種の細胞を用いて構造体をデザインしたり、より完成度の高い製品を作るには、これまでの手工業的な培養技術だけでは限界があり、細胞生物学と機械工学やプロセス工学を融合して新しい技術を産み出すことが重要になる⁽¹⁵⁾。

5. おわりに—今後の展望

再生医療の実用化には、培養技術以外に多くの要素技術が必要であり、わが国でも周辺技術に対する関心が高まっている。産業界の動きとして、2011 年に再生医療に関心のある企業が集まり、「再生医療イノベーションフォーラム (FIRM)」が設立された。その中には、規制制度を議論するワーキンググループや医療経済を研究するワーキンググループのほかに、再生医療の周辺ビジネスについて議論するサポーターインダストリーワーキンググループが設置されている。そこでは再生医療をサポートするための製品やサービスを提供する周辺産業の普及を推し進めるために必要なバリューチェーンを構築することを目的に、それらを構成する設備・装置、器材・材料、培地・試薬、輸送等が満たすべき基準が検討されている。再生医療の実用化が、これらの関連産業も巻き込んで大きく発展することを願っている。

(受稿受付 2013 年 10 月 15 日)

●文献

- (1) Takahashi, K., ほか, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, **126** (2006), 663-676.
- (2) Langer, R., ほか, Tissue Engineering, *Science*, **260** (1993), 920-926.
- (3) <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsc/html/index.html>
- (4) 相羽教代・島賢一郎, 世界の再生医療製品, *再生医療*, **9-4** (2010), 42-46.
- (5) Brittberg, M., ほか, Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation, *N. Eng. J. Med.*, **331-14** (1994), 889-895.
- (6) Ochi, M., ほか, Transplantation of Cartilage-like Tissue Made by Tissue Engineering in the Treatment of Cartilage Defects of the Knee, *J. Bone Joint Surg. Br.*, **84-B** (2002), 571-578.
- (7) Tohyama, H., ほか, Atelocollagen-associated Autologous Chondrocyte Implantation for the Repair of Chondral Defects of the Knee: A Prospective Multicenter Clinical Trial in Japan, *J. Orthop. Sci.*, **14** (2009), 579-588.
- (8) 菅原 桂, 自家培養軟骨ジャック®の開発, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **44-9** (2013), 710-715.
- (9) Muraoka, M., ほか, Control of the Formation of Vascular Networks in 3D Tissue Engineered Constructs, *Biomaterials*, **34-3** (2013), 696-703.
- (10) Chang, C.C., ほか, Direct-write Bioprinting Three-dimensional Biohybrid Systems for Future Regenerative Therapies, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **98-1** (2011), 160-170.
- (11) Cui, X., ほか, Thermal Inkjet Printing in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, **6-2** (2012), 149-155.
- (12) Watanabe, S., ほか, Hydrostatic Pressure/perfusion Culture System Designed and Validated for Engineering Tissue, *J. Biosci. Bioeng.*, **100-1** (2005), 105-111.
- (13) Crawford, D.C., ほか, An Autologous Cartilage Tissue Implant NeoCart for Treatment of Grade III Chondral Injury to the Distal Femur: Prospective Clinical Safety Trial at 2 years, *Am. J. Sports Med.*, **37-7** (2009), 1334-43.
- (14) Crawford, D.C., ほか, NeoCart, an Autologous Cartilage Tissue Implant, Compared with Microfracture for Treatment of Distal Femoral Cartilage Lesions: An FDA Phase-II Prospective, Randomized Clinical Trial after Two Years, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **94-11** (2012), 979-989.
- (15) Guillotin, B., ほか, Cell Patterning Technologies for Organotypic Tissue Fabrication, *Trend. Biotech.*, **29-4** (2011), 183-190.

日本機械学会誌

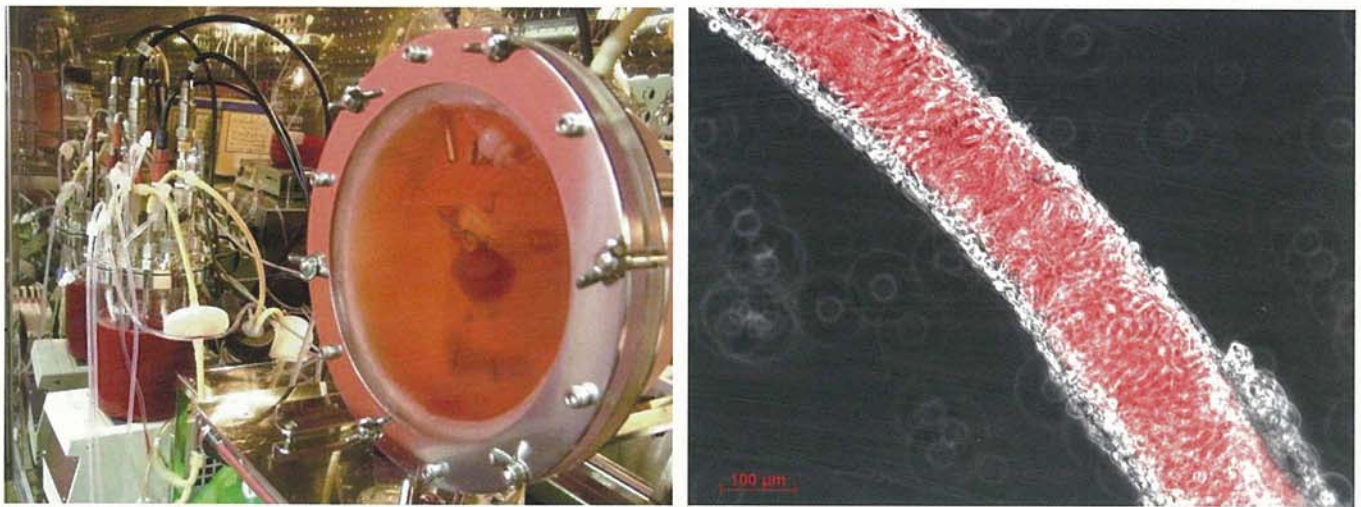
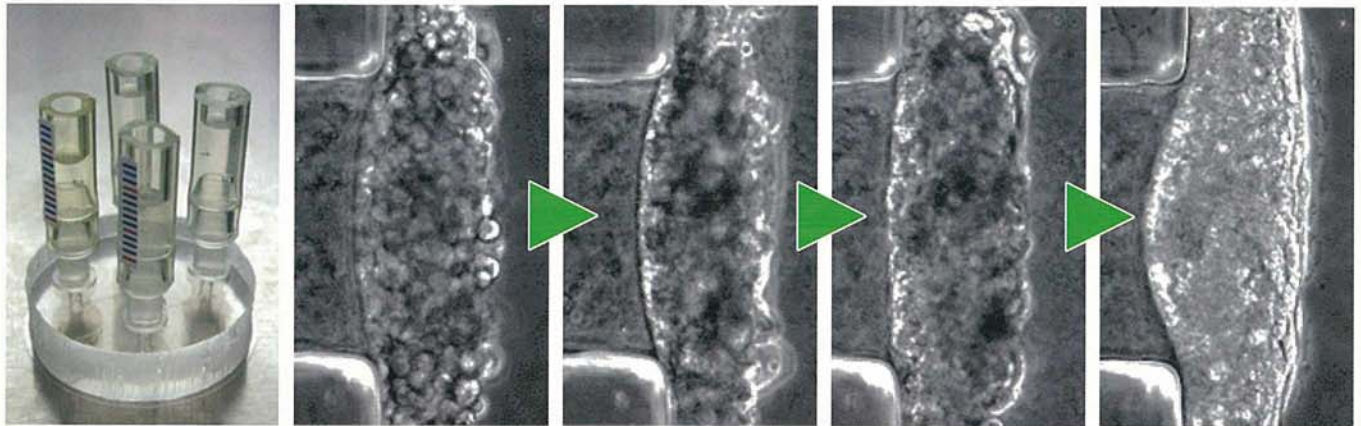
ISSN 0021-4728



Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers

機械技術者の情報誌

<http://www.jsme.or.jp/>



新春座談会

課題解決型イノベーション推進の時代における日本機械学会の役割

会長 **矢部 彰** × 副会長 **勝田正文** × 副会長 **須藤 亮** × 副会長 **宮木正彦** × 筆頭副会長 **久保司郎**

〔(独)産業技術総合研究所 理事〕(早稲田大学 理工学術院 教授)〔(株)東芝 取締役 代表執行役副社長〕〔(株)デンソー 取締役 副社長〕(摂南大学 理工学部教授/大阪大学 (司会者))

特集

再生医療に挑戦する機械工学

- 会長新年挨拶
- 永年会員該当者のお知らせ／部門だより（熱工学部門）
- 新学術誌創刊のお知らせ
- 新連載講座「ブレークスルーの原点」

2014

1 Vol.117
No.1142