

iPS細胞の新たな足場 —脱細胞化肝臓骨格—

慶應義塾大学医学部外科学(一般・消化器)

八木 洋, 日比 泰造, 阿部 雄太, 北郷 実, 篠田 昌宏, 板野 理, 北川 雄光

Hiroshi YAGI, Taizo HIBI, Yuta ABE, Minoru KITAGO, Masahiro SHINODA, Osamu ITANO,

Yuko KITAGAWA



1. はじめに

iPS (induced pluripotent stem) 細胞の出現は再生医療への期待を大きく膨らませ、臓器不全に対する代替臓器開発の実現化を強くイメージさせる。しかしながら、多様な細胞組成、複雑な構造・機能の再現を必要とする臓器単位での再生の実現化は極めて困難であり、網膜や脊髄・神経などと異なり、現時点で臨床試験段階に達している技術は示されていない。臓器単位の再生を目指した基礎的技術の中で最も進んでいるといわれているのが、肝臓を標的としたものである。実際には、肝臓は肝細胞・胆管上皮細胞・血管内皮細胞・星状細胞・類洞内皮細胞・Kupffer細胞など様々な細胞から構成され、また肝小葉・門脈周囲のグリソン構造・類洞・細胆管・中心静脈など独特の複雑な立体構造を持つうえ、タンパク合成・胆汁産生・薬物代謝・栄養蓄積など多様な機能を有する一見最も再生の困難な臓器といえる。しかしながらその実、運動能を必要としないため、機能を単純化し肝細胞のみを移植したり人工臓器に充填する手法を用いても、一定の臨床的意義を持つことがすでに示されている。また、肝再生医療の対象となる数多く疾患の中には、時間的に緩徐に年単位で進行するものも多く見られ、また比較的均一な細胞集団の単位で機能を発現し、体内では強い増殖能を有する。そのうえ免疫学的にも比較的寛容であるため、特にiPS細胞由来肝細胞を用いた再生医療への応用と実現性は非常に高い臓器であるといえる。一方で、大量の細胞を手に入れることができても、その生着の場が体内になければ機能発現は困難であり、そこには

一定の血流と適切な立体構造が必須である。生体由来の脱細胞化肝臓骨格は大量のiPS細胞の機能を保ちながら、生体内に生着できる場を確保し、持続的な血流維持に寄与することで、肝再生医療の可能性を大きく広げる技術であると考えられる。本稿では、iPS細胞の足場としての脱細胞化肝臓骨格の可能性について、最新の知見をもとに議論する。

2. 脱細胞化肝臓骨格とは

組織・臓器脱細胞化の基本的手法は、生体から摘出した組織・臓器から界面活性剤の還流を主体とした種々の方法を用いて細胞をすべて取り除き、残った細胞外マトリックス (extra cellular matrix: ECM) 骨格を利用するものである。同様の手法はすでに国内外で製品化され、細胞を充填しない医療製品として、ヒトの皮膚を用いた脱細胞化組織 (Alloderm®) やブタ心臓弁を用いた脱細胞化 (Hancock®) など種々の臓器・動物由来で作製され、例えば熱傷の後の皮膚欠損や弁膜症治療などで一定の効果を示している。この脱細胞化技術を臓器単位で初めて実施したのが、Ottら²⁾であり、彼らはラットの心臓に対して経血管的に界面活性剤を持続還流して、細胞を洗い流したうえで、その骨格に別のラットの心筋細胞を充填し、電氣的洞調律の一部を再現したと報告した。同グループは続けて、ラットの肺を用いた脱細胞化を成功させ、肺胞上皮細胞を再充填した後、これを片肺移植することで一部酸素化の改善が得られたと報告している。さらに、ラット腎臓でも再細胞化して移植後尿の産生があったことを報告した。これらの報告は、臓器のECM骨格のみならずそれに細胞を再充填することで、臓器機能の一部を再生できる可能性を示唆したものであり、臓器単位での再生を一気に加速するインパクトは大きく、これを機に多くの研究報告がなされた。同時に、単純な組織ではすでに臨床応用の報告がなされている。

■ 著者連絡先

慶應義塾大学医学部外科学(一般・消化器)

(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35)

E-mail: h_yagi@a3.keio.jp

Macchiariniら³⁾は気管軟化症による気管支狭窄に苦しむ患者に対し、死体ドナーから採取した気管支を脱細胞処理し、その気管支骨格に患者の間葉系幹細胞由来の軟骨細胞および気管上皮細胞を生着させ、狭窄部位への移植を行った。現在すでに5年の追跡報告がなされており、免疫抑制剤の使用なく良好な気管開存が示されている。脱細胞化骨格を用いたこれらの報告は、脱細胞化骨格自体が低免疫原性であるのみならず、一定期間後に臓器骨格が生体内で適切に吸収再構築を果たす可能性と、それによる長期的な構造維持への期待を抱かせる結果となっている。

脱細胞化骨格がこれまでの技術と比較して有する構造・機能上の特徴は、大きく分けて次の3つと考えられる。

1つ目は、現在発展の著しい微細構造の再生による毛細血管構造から、血管吻合に耐えうる大血管構造まで、生体の連続構造を再現することが可能である点である。臨床的には、一定の組織構造を生体に移植する場合、毛細血管の再生のみでは組織が壊死を呈し、脱落することが知られており、実質臓器に至っては安定的な血流維持が必須である。肝臓においては類洞に至る複雑な構造が重要な役割を果たしているが、細胞自体がその構造を支持している独特の構造を持つ類洞自体は脱細胞化骨格でも残すことは困難である。

2つ目は、組織再生領域においてこれまで困難であった、脈管を含む立体構造の再現である。現在の組織再生技術は、網膜や消化管粘膜などの薄い構造にほぼ限られている。これは、最小単位から徐々にサイズを拡大する従来法の限界であるといえる。脱細胞化は臓器の三次元骨格がすでに存在する状態から微細構造への連続性を再現するいわばトップダウン方式の組織再生であり、これまでの手法とは大きく異なる。三次元構造そのものが、幹細胞や細胞の再生能に大きな影響を与えることが明らかにされており⁴⁾、生体由来の複雑な大スケールの構造がすでに担保されていることで、積層化や三次元化を繰り返すことなく立体構造を構築できる。

3つ目の特徴は、単一の構成物質から作製されることの多い人工素材や腫瘍由来のタンパク質などからなるマトリックスとは異なり、臓器特異的ともいわれる生体組織由来の数多くの異なるECM成分が脱細胞化後も保たれることで、細胞・生体適合性が非常に高いことである。実際に我々の研究成果から、脱細胞化した肝臓の構成タンパク質の網羅的解析によって、ECM関連タンパク質を含む100以上のタンパク質の残存が確認されている^{5),6)}。残存する数多くのECM成分と共に一部で残存が確認されている成長因子などが及ぼす影響についての詳細な検討はなされてい

ないが、単一あるいは数種類の構成要素からなる骨格素材を用いた三次元構造の再現と比較して、生体・臓器特異的な細胞局在や機能要素に近い環境を提供可能であると言える。

3. 肝臓の脱細胞化/再細胞化の実際

1) 脱細胞化：decellularization

脱細胞化の手法は種々報告されているが、大きく分けると次の2つの方法に分類される。①機械的刺激による細胞膜破壊：高圧・凍結融解法、エレクトロポレーション法、浸透圧変化。②薬剤による洗浄・細胞破壊：界面活性剤、酸/アルカリ、酵素、アルコールなど⁷⁾。実際には、これらの組み合わせによって実施されるが、いずれにしても効率よく細胞を破壊し、抗原性のある細胞断片が限りなく残存せずに脱細胞化され、しかもECMの構成成分である線維性タンパクおよびグリコサミノグリカンが可能な限り残存する最善の手法が開発されてきた。どの手法をどのような組み合わせで用いるべきかについてはまだ議論の余地があり確定した方法はないが、脱細胞化を行う対象となる組織・臓器によっても、至適な手法が異なると考えられている。肝臓においては、Soto-Gutierrezらが①のうち凍結・融解法を用いた後、②の中からTrypsinとTrytonX100および酢酸を組み合わせたプロトコルを採用し、他のいくつかの手法と比較して脱細胞化の効率および残存タンパク質の双方の面で最適であることを示している⁶⁾。ただし、我々が同じ手法をブタ肝臓で採用した結果では、脱細胞化自体が不十分であった。このことから、臓器の相違のみならず対象となる組織サイズや動物種によっても、使用薬剤の濃度調整やpHを含めた至適プロトコルを適宜導き出さなければならないと考えられる。

臨床的に種々の細胞を体外で充填する「再細胞化」を行い、培養およびその後の組織移植を安全に実施するため、脱細胞化組織の無菌状態の維持あるいは滅菌(殺菌)方法の確立は大変重要な課題である。脱細胞化後の組織の性質・形状を損なうことなく、効率的に滅菌処理を行う手法の開発は必須であるが、現段階では、組織・臓器採取から運搬・脱細胞化に至る周辺機器を滅菌化し、抗菌薬・抗真菌薬や酸の使用によって、可能な限り清潔な操作を実施することで、細菌汚染の機会を極力減少させる処置がなされている。しかしながら、薬剤や培地の交換・細胞の注入などの工程が介入することによって、細菌汚染の機会が伴うことは避けられない。また使用する動物側の管理も重要な課題である。これに対して我々は、GLP(good laboratory practice)基準施設で摘出したブタ臓器を、一旦閉鎖チャン

パー内に封入した後に、一度も外気に露出することなく一連の手技を完遂できるシステムを開発中である〔AMED (Japan Agency for Medical Research and Development) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (技術開発個別課題) 「幹細胞パッケージングを用いた臓器再生技術と新規移植医療の開発」〕。脱細胞化骨格を用いた技術が製品化に至るために、滅菌処理方法の定型化を行うことが必須である。

2) 再細胞化 : recellularization

臓器再生と代替機能の再現のためには一定数の細胞を体外で充填し、安定的に生着させることが必須である。この「再細胞化」の手法については、脱細胞化の手法以上に多くの技術要素を最適化しなくてはならない。具体的には、使用する細胞種、次に述べるようにiPS細胞を用いた場合にはその分化度、各種脈管を含めた選択肢の中から細胞の注入ルート・注入時圧・還流速度・注入順序および注入後の品質評価法などが列挙される。これらの要素技術を1つひとつ最適化して確立することが、本技術の臨床応用へ向けた最重要課題の1つである。どのような組織・臓器であっても、それを構成する細胞は少なくとも複数種類が秩序だてて生着しており、しかも臓器機能を発現可能な一定数以上の細胞が生着した構造を作成しなくてはならない。細胞の大きさ、必要数、接着程度、細胞強度などは細胞の種類によってそれぞれ異なるため、機能発現に必要と考えられる最低限の細胞種それぞれに合わせた骨格への生着方法の確立が必須である。

我々が研究を重ねたラット肝臓の最近の知見によって、肝細胞を間質内に均等に充分充填することは、移植後の血液還流とその凝固阻止においても非常に重要であることがわかっている。肝臓では胆管細胞を胆管から、血管内皮細胞を門脈と肝静脈から (将来的には肝動脈からも)、肝細胞および間葉系幹細胞などの非間質細胞を肝静脈から逆行性に、それぞれ特定の順序・一定の注入圧以下で注入後持続還流を行うことで、安定した細胞充填が得られることが示されている。ただし、体外で骨格内のすべてのスペースを埋めることは不可能と考えられるため、初期の移植手術後のストレスに耐えうる分だけの細胞を脱細胞化骨格内に充填し血流が維持されれば、一定の細胞が移植後の体内で骨格内に遊走し、また充填された細胞自身が自己増殖することで、より成熟した臓器構造に発展することが期待される⁸⁾ (図1)。

4. iPS細胞を用いた再細胞化

近年、これまで以上に再生医学研究が脚光を浴びるよう

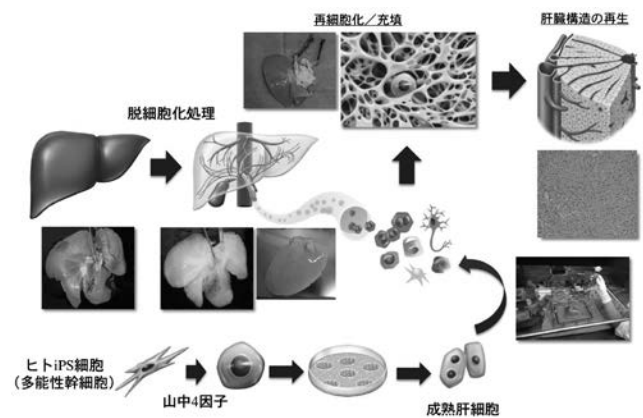


図1 脱細胞化/再細胞化の工程と実際
イラスト素材：医療イラスト制作事務所ダビンチ

になったのは、他でもないiPS細胞技術の創出によると考えられる。胎児由来であるES細胞と比較して倫理的問題をクリアし易いiPS細胞の開発は、日本発の画期的技術として再生医療の可能性を大幅に広げたといえる⁹⁾。中でも臓器再生医療への応用を考えた場合、患者やドナーの皮膚などの細胞をわずかに採取することによって樹立することが可能なiPS細胞を使用することで、ドナーの負担をほとんど考えることなく必要とする大量の細胞を入手できる技術は、これまでの医療を根本的に変える新しい治療法として大きな期待が寄せられている。

しかしながら、現在の急速な発展をもってしても、幹細胞から臨床応用に耐え得るような成熟度の高い細胞を大量に得ることは未だに困難である。その原因の1つとして*in vitro*における適切な細胞周囲環境の欠落が考えられている。近年の研究によって、より生体に近い三次元立体構造や細胞間・ECM-細胞間相互作用を正しく制御することが、幹細胞をはじめとする様々な細胞の分化・成熟に大変重要な役割を担っていることが示されている^{10),11)}。従って、体外での培養環境を生体内に近づけるために、細胞が生体に近い形で成熟可能な微細構造を人工的に制御する手法を用いることが、これからの再生医療の発展に必須であるといえる。実際に幹細胞を成熟肝細胞へ分化誘導する場合、ECM-細胞間相互作用が重要な役割を果たすことが報告されており^{12),13)}、どのようなECMを使用するかについて多くの考察がなされている。しかしながら、本手法のように生体由来のECMを、立体構造を含めて丸ごと使用する試みはまだなされていない。また一方で、臨床的に臓器機能を補填可能な数の細胞を、生体内のどこに生着させるかについて、足場構造の存在が再生医療実現化に向けた大きな課題となっている。生体内で持続的に十分な血流が

維持されながら、適切な細胞周囲環境を保ち、大量の細胞を保持できる構造として脱細胞化臓器骨格はその一役を担うと考えられる。

このように、脱細胞化三次元ECM構造を幹細胞培養・細胞/臓器移植の基盤技術として応用することは、幹細胞が性質・局在ともに適切な変化を示すのに寄与し、引いてはこれからの再生医療の発展に大きな布石と成り得ると考えられる。iPS細胞をどのような分化度でいかなる細胞と共に充填すべきか、今後の長期的実験結果を待たなければならぬが、脱細胞化臓器骨格はこれまでにない臓器単位での再生医療を実現できる選択肢の1つとして大きな可能性を秘めているといえる。

5. おわりに

iPS細胞を用いた再生医療は臓器不全に対する従来の治療法を根本的に置き換える可能性を秘めているが、実際の臨床応用までに越えるべき課題は多い。その1つが大量の再生細胞を生体内のどこにどのように生着させ機能を与えるかであり、これを乗り越えるためには組織・臓器構造と細胞との相互関係の正しい理解が必須である。実際に肝臓においては、肝硬変の病態の根本をなすECMの病的変化に伴う細胞-ECM間相互作用の変性が、細胞自体の病的変性と合わせて臓器としての機能低下に強く関わっていることが示されている¹⁴⁾。実験的に線維化の強い肝炎の肝臓から肝細胞のみを分離した後、環境を可能な限り正常化できれば、細胞機能の低下は可逆的であることが示されている。これに対して、組織中に一定の割合で存在すると考えられている幹細胞¹⁵⁾が成熟細胞への分化はもとよりそれ自身が細胞機能制御の一部を担っているのであれば、その分化・増殖に強く寄与している臓器固有のECMが、臓器再生そのものに大きな役割を担う可能性が示唆される。生体由来のECMを効果的に用いながら臓器固有の立体構造を保った脱細胞化骨格を有効に活用し、そこにiPS細胞技術を応用させることは、今後の臓器再生医療実現化の基盤技術として発展する可能性が示唆される。

謝 辞

本研究は、「AMED再生医療実現拠点ネットワークプログラム(技術開発個別課題)」、神奈川県中小企業団体中央会「ものづくり・商業・サービス革新補助金」、リプロ

セル幹細胞実用化研究支援事業、文部科学省科学研究費若手研究B(研究課題番号15K19863)の委託事業として施行されている。

本稿のすべての著者に規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF: An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**: 3233-43, 2011
- 2) Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al: Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14**: 213-21, 2008
- 3) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al: Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* **372**: 2023-30, 2008
- 4) Rozario T, DeSimone DW: The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* **341**: 126-40, 2010
- 5) Gilbert TW, Stewart-Akers AM, Badylak SF: A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials. *Biomaterials* **28**: 147-50, 2007
- 6) Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, et al: A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods* **17**: 677-86, 2011
- 7) Badylak SF: The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* **28**: 3587-93, 2007
- 8) Kadota Y, Yagi H, Inomata K, et al: Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis* **10**: 268-77, 2014
- 9) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-72, 2007
- 10) Bissell MJ, Hall HG, Parry G: How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* **99**: 31-68, 1982
- 11) Nelson CM, Bissell MJ: Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 287-309, 2006
- 12) Snykers S, De Kock J, Rogiers V, et al: In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* **27**: 577-605, 2009
- 13) Peerani R, Zandstra PW: Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering. *J Clin Invest* **120**: 60-70, 2010
- 14) Liu L, Yannam GR, Nishikawa T, et al: The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* **55**: 1529-39, 2012
- 15) Dollé L, Best J, Mei J, et al: The quest for liver progenitor cells: a practical point of view. *J Hepatol* **52**: 117-29, 2010