

15 - 24 がん患者QOL向上のための再生医学を用いた 複合組織再建技術の開発に関する研究

主任研究者 東京大学医学部附属病院 高戸 毅

研究成果の要旨

本申請は、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する治療技術を開発することを目的とする。平成 16 年度及び 15 年度の研究で、組織再生のための三要素である細胞・足場・シグナルのそれぞれについて、

細胞に関しては、ヒト胚性幹細胞の樹立と操作法の確立、ヒト間葉系幹細胞の分離と増殖・分化の最適化、ヒト体細胞（骨・軟骨・皮膚）の分離と増殖・分化の最適化

足場に関しては、間葉系への細胞シート法応用、リン酸カルシウム・アテロコラーゲン・PLL A の 3 次元造形法開発

シグナルに関しては、細胞種を選ばず骨・軟骨誘導するシグナルの同定、軟骨の脱分化を抑制する培養法の開発、生体内で安定に機能するプラスミドナノキャリアの開発

これらの成果を組み合わせ、小動物における複合組織欠損モデルに移植

を行い、小動物における複合組織欠損モデルをある程度治療することに成功し、今後の大動物実験を経て、臨床研究につながる道筋をつけることに成功した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
高戸 毅	東京大学医学部附属病院 教授	顎・顔面の複合組織欠損モデルの作製と、再生組織の移植
中村 耕三	東京大学医学部附属病院 教授	体幹・四肢の複合組織欠損モデルの作製と、再生組織の移植
鄭 雄一	東京大学医学部附属病院 助教授	幹細胞増殖・分化プロトコルの樹立と複合組織 3 次元培養
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科 教授	ナノミセルを用いた遺伝子導入法の開発
中辻 憲夫	京都大学再生医科学研究所 教授	再生医療細胞源としての ES 細胞の作製と操作法
岡野 光夫	東京女子医科大学 教授	複合組織 3 次元培養のための新規担体の開発
田畑 雅士	先端生命医科学研究所 教授 国立病院機構都城病院 歯科部長	骨髄間葉系幹細胞から分化させた骨芽細胞とハイドロキシアパタイト生分解性高分子ゲルによる顎骨再建

総括研究報告

1 研究目的

がん切除後に伴い、皮膚・神経・筋肉・骨・軟骨などの複合組織の欠損が生じ、がん患者の QOL を著しく低下させている。このような組織欠損を補うために、自己組織

を移植する様々な技術が開発されてきた。マイクロサージャリーを用いて血行を温存した複合組織移植術により、大きく複雑な組織欠損も修復可能になってきた。さらに

人工関節、人工骨頭、人工血管など多岐にわたる体内埋め込み型デバイスも開発・使用されている。しかし、自家組織移植では、十分な組織量が得られないことが多く、組織採取部に新たな組織欠損や瘢痕を残すこととなり、機能的・形態的にもまだ満足のいく結果が得られていない。他家組織移植は、ドナーの慢性的不足や免疫学的問題など多くの問題を抱えている。人工組織の完成度は高いものの、長期使用によるゆるみ、感染、異物反応など依然として未解決な問題を残している。このため自己への侵襲が可及的に小さく、免疫学的に問題なく、形態的・機能的にも優れた組織修復法の開発が望まれる。本申請は、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する安全かつ安心な治療技術を開発することを目的とする。

2 研究成果

胚性幹細胞（ES細胞）を細胞移植治療に利用する上で霊長類ES細胞の効率的かつ安定した作成方法の確立、ならびにES細胞に対する遺伝子操作技術の確立は重要である。我々はカニクイザル胚盤胞から極めて効率の良いES細胞株の樹立方法を開発すると同時に、サルES細胞へのエレクトロポレーション方による遺伝子導入システムを用いて遺伝子改変技術の開発研究を行った。つぎに、サルES細胞株樹立のために最適化した方法を用いて、ヒトES細胞株の樹立を行い、3株の樹立に成功した。未分化マーカー分子の発現、染色体構成、細胞分化能の解析を行ったところ、未分化ES細胞特異的マーカーを発現し、正常2倍体の核型を保持するとともに、多能性をもつことを確認できた。これらの結果により、標準的なヒトES細胞株であると考え、KhES-1、KhES-2 および KhES-3 と命名した。このようなカニクイザルとヒトES細胞株の樹立と特性解析研究を行う中で、樹立培養方法の詳細な最適化を行い、凍結保存方法についても条件の改良を行った結果、安定して凍結融解を行うことが可能になった。

さらに安定して医療応用可能なヒトES細胞を増殖維持するために、LIF添加なしで未分化性を維持多能性制御機構の解析が必要であることから、マウスES細胞においてLIFのレセプターからSTAT3を経由したシグナル伝達系がサルES細胞ではどのように機能しているかについて詳細な解析を行った。その結果、サルES細胞では、LIF刺激に伴う内在性STAT3のリン酸化、核内への移行および転写活性化はいずれもドミナントネガティブSTAT3強制発現によって阻害されているにもかかわらず、その強制発現株は分化することなく長期間増殖・維持することが可能であった。さらにこれら強制発現株の分化能を胚様体形成により調べたところ、内胚葉・外胚葉・中胚葉の三胚葉への細胞分化が認められ、STAT3シグナルを阻害してもなお多分化能を有することが確認された。

以上の結果から、マウスES細胞と異なり霊長類ES細胞ではLIF-STAT3シグナル伝達経路は機能しているにもかかわらず未分化維持に必須な役割を担っており、支

持細胞に起因する他のSTAT3非依存的な機構で未分化維持が調節されていることが示された。

骨芽細胞・軟骨細胞特異的に発現するマーカー遺伝子（COL1-GFP、COL2-GFP）を用いた正確・簡便・非侵襲的な骨芽細胞分化モニタリングシステムを新たに開発し、このシステムを用いて細胞種を問わず短期間で骨芽細胞・軟骨細胞分化を誘導するシグナルを系統的・網羅的に検索した。骨芽細胞・軟骨細胞への分化に深く関与することが指摘されている数種のシグナル（BMP、IGF、Hh、Sox等）を活性化あるいは抑制する遺伝子を発現するアデノウィルスベクターを組み合わせ、COL1-GFP・COL2-GFP ES細胞に導入し、骨芽細胞・軟骨細胞分化をGFP蛍光を指標に判定したところ、1週間以内にGFP陽性細胞を認める組合せをそれぞれ同定した。これらの組合せはマウスES細胞・骨髄間葉系幹細胞・ヒト線維芽細胞に対して、マウス初代骨芽細胞・軟骨細胞と同程度の骨芽細胞・軟骨細胞分化マーカーの著しい発現上昇と基質の産生を1週間前後で誘導した。いずれの細胞種においても、単独シグナルの導入では期間内の分化誘導を認めなかった。さらにHeLa細胞などの非中胚葉系細胞株においても、この組合せは速やかに骨芽細胞・軟骨細胞分化マーカーを誘導した。以上より、細胞種を問わず短期間で骨芽細胞・軟骨細胞への分化誘導をするシグナルの組合せを同定した。さらに、この組合せのうち最小のユニットを同定し、骨分化ではAlk6 + Runx2、軟骨分化ではSox9 + Sox5/Sox6のどちらかであることを見いだした。また、足場担体の3次元造形に関しては、3次元プリンター（DIC0社製Z406；日立造船社製EOSINT P380）を用いて、健側の骨軟骨画像データから患側の欠損を補填する形状のハイドロキシアパタイトあるいは生分解性プラスチックでできた担体の作製に成功し、ビーグル犬による移植実験を施行中である。

温度に応じて水との親和性を大きく変化させる温度応答性高分子を培養皿表面に共有結合的に固定化することにより温度応答性培養皿を開発した。この表面は、37℃では市販の培養皿と同程度の弱い疎水性を示し様々な細胞が接着・伸展するが、温度を32℃以下に下げると高度の親水性を示し、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を必要とすることなく細胞を脱着させることができる。コンフルエントな細胞層を形成させた後に低温処理すると、全細胞を細胞・細胞間接着により連結した一枚の細胞シートとして脱着・回収をすることができる。

生分解性高分子製細胞担体を作製し、小動物（ラット）への移植実験により評価すると共に、温度応答性培養皿を用いて作製した骨膜細胞シート中の細胞外マトリックスを新規細胞担体として用いる可能性について体系的な検討を行った。生分解性高分子性細胞担体としてはポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体、フィブリンゲルを評価した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体は合成直後の状態では非常に疎水性が高く細胞接着性、組織親和性が非常に低いため、ア

ルカリ処理により表面の親水化をおこなった。これらはラット背部ないし腹部皮下に移植し、移植部位の炎症など異物反応を組織学的に評価した。また、培養骨膜細胞シートを安定して作製という培養条件を最適化し、生化学的、組織学的に評価すると共に、ラット頭頂骨骨欠損部位に移植した。培養骨膜細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用い、低温処理（20℃）により回収した。

その結果、ラット皮下に移植した、生分解性高分子性細胞担体はいずれも、分解にともなう強い炎症反応を惹起した。このような炎症反応は極少数の幹細胞を播種して移植するような系では、強い炎症反応により移植した幹細胞が障害を受けることが懸念される。現在、炎症にともなう移植した細胞に対する細胞障害を定量的に計量化する実験を、引き続き展開している。アルカリ処理により、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および両者の共重合体の表面を大きく親水化できることが明らかになったが、同時に表面の分解性も著しく増加し、より強い炎症反応が生じることが分かった。今後、アルカリ処理条件の最適化が必要である。

ラット頭頂骨骨膜より採取した骨膜細胞を酵素処理し初代培養に供した後、継代した2代目培養骨膜細胞を温度応答性培養皿に播種すると、コンフルエント到達後、低温処理のみで培養骨膜シートとして回収できる条件を確立した。細胞シート中に含まれる培養骨膜細胞をアルカリフォスファターゼ(ALP)染色すると、多数のALP陽性細胞が確認された。この観察は、本細胞シート内には骨芽細胞の分解時に必要なニッチとしての条件を最低限有する細胞外マトリックス環境が培養の間に構築されていることを強く示唆している。ラットへの移植実験からは、本細胞シートは、生分解性高分子性担体のような強い炎症反応などの異物反応を惹起しない（少なくともきわめて軽微である）ことが明らかになっており、本細胞シートを新規幹細胞担体として活用しうる可能性を強く示唆した。

天然の遺伝子ベクターであるウイルスに匹敵する人工遺伝子ベクターシステム構築を目指し、ナノミセル型遺伝子ベクターの従来の基本設計に対し、細胞内還元環境応答機能、細胞内ミクロ環境応答機能、標的認識機能をインテリジェント機能として付与することに注力し、新規カチオン性ブロック共重合体の分子設計・合成、これら高分子とレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドDNA(pDNA)からなるナノミセル型遺伝子ベクターの特性解析、培養細胞系での遺伝子発現、細胞内動態による一連の評価を行った。また、本システムのin vivoにおける機能の本格的な評価を行った。

ポリエチレングリコール-ポリ(L-リジン)(PEG-PLL)ブロック共重合体に対し、PLL側鎖アミノ基の一部をスルフィド基(SH基)で置き換えジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に反応して内包pDNAを制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターを構築したところ、架橋高分子ナノミセル型遺伝子ベクターは、細胞外では内

包pDNAを安定に保持する一方、細胞内還元環境下では架橋の解離に伴うpDNAの放出制御を通じて、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターに比較して一桁以上高い発現効率を実現した。さらにナノミセル型遺伝子ベクターを構成するブロック共重合体の連鎖長ならびにジスルフィド架橋導入率と構造安定性、遺伝子発現能との間の構造-機能相関を明らかにするための系統的な研究を行い、ナノミセル型遺伝子ベクター内において有効なDNA凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかにし、DNA凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間の相関も見出した。培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターのin vivo機能評価においては、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に様にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。これらの結果を受け、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出した。

一方、ナノミセル型遺伝子ベクターの応用に向けては、凍結乾燥製剤化が望まれるが、架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められなかった。さらに架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロッティング法により評価した結果、架橋導入率の上昇に伴うpDNAの血中安定性の向上が確認された。さらに適用可能な投与方法を拡げる目的で、ナノミセル型遺伝子ベクターの気管内投与を行い、肺における遺伝子発現を評価した。その結果、ナノミセル型遺伝子ベクターは、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターや市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンと比較して、顕著に高い遺伝子発現を導くことに成功した。

特定の細胞内で効率良く遺伝子を発現するナノミセル型遺伝子ベクターの構築には、上記の細胞内環境応答性と共に、細胞内への侵入経路であるエンドソーム小胞から細胞質への移行効率向上が重要である。本研究では、ブロック共重合体への移行促進セグメント導入という方法でこの問題にアプローチした。その結果、側鎖構造単位に高pKa(～9)と低pKa(～7)の2種類のアミノ基を有する系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。これらの側鎖に2種類のアミノ基を有するブロック共重合体の中でも、ジエチレントリアミン(DET)を導入したブロック共重合体(PEG-DET)が、細胞毒性を示すことなく極めて効率的な遺伝子導入を示すことを明らかにした。PEG-DETは種々の初代培養細胞(骨芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞)に対して細胞毒性を示すことなく高効率の遺伝子発現を導いた。

上記の知見に基づいて、さらに、経静脈全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与するpKaの低いポリカチオン、DNAを効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有するA-B-C型トリブロック共重合体を新規に合成し

たところ、培養細胞実験において従来の PEG-PLL の 50 倍以上の遺伝子導入効率を実現した。さらに固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスに対し、3 層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与した結果、腫瘍部位での選択的かつ効率的遺伝子導入が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例である。

ナノミセル型遺伝子ベクター表層へのリガンド分子装着のための分子設計を行った。まず α -末端に各種のバイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。リガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うが、既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新規合成経路を探索することによって、効率良くリガンド導入ブロック共重合体を合成する経路の構築に成功した。これにより、ブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することに成功した。

表層にラクトースを導入したナノミセル型遺伝子ベクターが、ラットより調製した初代培養肝実質細胞に対して、高い遺伝子発現効率を示すことを確認した。さらにインテグリンに対して特異的結合能を有する RGD ペプチドを表層に導入したナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して 10 倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。

顎顔面複合組織モデルに関しては、実験動物としては、マウス、ラットなどの小動物で骨あるいは軟骨の単独組織欠損を作製し、ついでそれらの技術を応用し、ウサギやイヌといった大型動物で複合組織欠損を作製した。第一に、マウスにおいて骨の単独欠損を作製した。マウス頭蓋骨にトレパンを用いて骨臨界欠損を作製した。次に、ラットにおいて軟骨欠損を作製した。ラット耳介を部分的に切除し、耳介再生の評価を行った。第二に、ウサギの耳介軟骨にパンチを用いた軟骨・皮下組織臨界欠損モデルを作製し、長期的な観察においても、自然治癒が起こらない事を確認した。第三に大動物であるイヌを用いて顎部に骨および歯牙欠損を作製し、顎骨および周囲軟部組織の再生および歯牙の誘導を評価する実験系を作製した。すなわち、ビーグル犬を用い、乳歯が萌出した直後に、乳歯を抜歯し、その抜歯窩に新生骨を再生させて、その部位での歯の萌出状況、周囲組織の変化を検討する実験系を確立した。また、自然治癒が起こらないような大きさの骨欠損を作製する顎裂欠損モデル作製をした。最後に、ビーグル犬の耳介を切除し、さらに周囲骨を欠損させる複合骨・軟骨複合欠損モデルを作製した。さらにこれらの実験手技の洗練に努めた他、欠損部位に再生骨・軟骨を移植し、再生部の生着および機能評価を試みた。マウスの頭蓋骨欠損モデルを作製し、ここに骨分化誘

導をかけた皮膚線維芽細胞シートを移植した。その結果、4 週間で骨が再生されてくることが確認された。

体幹・四肢に関しては、幾つかの体幹・四肢の複合組織欠損マウスモデルを作成した。第一のモデルは、脛骨骨折モデルであり、脛骨骨幹部中央で、micro saw を用いて骨切りし、23 G 針を脛骨近位に骨軸に平行に髓内へ刺入し、髓内釘挿入部を作成。23 G 針の内筒を髓内釘として、持針器などで把持しながら、脛骨近位より髓内へ挿入、骨折部を通り遠位骨片髓内へ挿入し、骨折部を固定する。第二のモデルは大腿骨骨折モデルである。骨幹部中央で骨切りし、23~26 G の針を骨折部の近位骨片髓腔より retrograde に近位方向へ髓内に刺入し、大腿骨近位(おそらく転子部)の皮質骨を貫通させる。retrograde に髓内釘を近位方向へ挿入し、一旦転子部の骨孔より先端を出してから、反対に(antegrade に)骨折部と遠位骨片髓腔へ刺入し、固定。第三のモデルは、長管骨骨幹部端部の骨欠損モデルである。歯科用バー(ドリル)にて円型の骨孔を脛骨近位に穿つ(径 1mm)。骨孔よりドリルを骨髓内に進め、海綿骨を掘削し、対側の皮質骨の手前まで骨欠損を作製する。閉創し、麻酔から回復後は特に制限なく飼育する。第四のモデルは、脛骨の臨界欠損モデルである。脛骨または大腿骨骨幹部中央 1/3 でマイクロソ - にて骨切りし、長さ 5mm の全周性の骨欠損を作製する。脛骨・大腿骨近位より髓内釘を挿入して、近位・遠位骨片を固定する。これらのモデルについて、自然経過をマクロ、放射線学的、組織学的に記載した。これらの手技を洗練するとともに、新たなモデルとして、ラット膝関節軟骨全層および半層欠損モデルを作製し、その自然経過をマクロ、放射線学的、組織学的に記載した。

3 倫理面への配慮

DNA 組み換え実験、動物実験に関しては各分担研究者の属する機関の組み換え DNA 実験規則および動物実験実施マニュアルに従って行う。ヒトの体性幹細胞を分離する実験に関しては、東京大学医学部附属病院で行う。倫理審査委員会に承認済みである(東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会承認番号 622-1)。ヒト胚性幹細胞を将来使用する場合には、「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に則り、倫理審査委員会の承認を得て行う。現在大臣確認を申請中である。