

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300174
 研究課題名（和文） 高密度培養法を用いた組織モデル（血管、皮膚）の試作と移植に関する研究
 研究課題名（英文） Generating transplantable artificial tissues composed of collagen fibrils and cells using a newly designed bioreactor
 研究代表者
 安達 栄治郎（ADACHI EIJIRO）
 北里大学・医療系研究科・教授
 研究者番号：30110430

研究成果の概要（和文）：溶液中のコラーゲンは 24 時間以内に細線維となって沈澱する。そのコラーゲン細線維を生分解性のポリ乳酸織布上に集積するとゲル状構造が出来る。その過程に培養細胞を共存させると細胞がちりばめられた 1 グラム以上の人工組織を作り出すことが出来る。生体細胞や万能細胞など多種の細胞と細胞成長因子をゲル内に組み込むことにより皮膚と血管の構造を再構成した。この結果は再生医療に新たな治療法をもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：We have designed a new device to form artificial tissues from culture medium supplemented with collagen I and various cells less than 24 hours. Moreover, we stack up 3 different tissue layers in the same bioreactor by supplementing newly prepared culture medium containing various extracellular matrices, such as collagen and proteoglycans, and different types of cells. Embedded cells restore their specific functions of original tissues, i.e. up-regulation of smooth muscle type myosin the tissues. Using this technique, we can supply artificial tissues applicable to clinical use with relative ease.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 2008 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009 年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：高密度培養法、コラーゲン、人工皮膚、表皮細胞、人工血管、平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）本申請では細胞を培養皿から 3 次元の細胞外マトリックス内に配置することにより細胞の機能発現を促すことを目指した。

この当時は ES 細胞や iPS 細胞など様々な機能や組織に分化できる万能細胞に再生医療への応用が期待されていた。これらの万能細胞にアザチオプリンやレチノイン酸など

の薬剤や上皮成長因子(EGF)などのサイトカインを作用させて目的とする細胞あるいは組織に分化誘導する手法の開発に期待が掛けられていた。しかしこれらの手法では分化誘導できる細胞数に限りがあり、また細胞活性化の結果腫瘍性細胞に変化することが明らかとなった。これらの諸問題に遺伝子工学的なアプローチから解決していこうとして

いた。細胞外マトリックスは様々な薬剤やサイトカインと比べてマイルドな細胞活性促進あるいは抑制作用であること、また会合して構造体となって機能する。これらの理由により再構成細胞外マトリックス内に細胞を組み込んで行った本研究は独創的な内容を持っていた。

(2) 代表研究者はコラーゲン分子種の傾斜構造を明らかにした。例えば血管壁は組織学的に外膜、中膜、内膜と呼ばれる三層構造を基本とし、各層を構成する細胞と細胞外マトリックスには違いがある。このように傾斜構造内には様々な細胞に適した細胞外微小環境が提供されている。すなわち細胞外空間においても細胞外マトリックス成分の一定の秩序だった分布がある。その細胞機能に及ぼす効果の解析が緒に就いた時代であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究計画は細胞が本来の機能を発現するにふさわしい環境を *in vitro* において実現することにより、組織内における細胞本来の機能を解明し、移植医療への応用を目指すことを目的とした。

(2) 上記の目的達成のため、本研究計画の基盤技術である細胞外マトリックスの再構成と細胞の組み込みを同時に行う高密度培養法を改良して少なくとも3層の異なる人工組織の積層化技術を開発した。

①人工血管のモデル組織として結合組織、平滑筋、結合組織の3層からなる血管壁構造の再構成を目指した。血管のような円筒形をなしていないとは言え、平滑筋細胞は培養により脱分化して線維芽細胞特別のつかない細胞となってしまう。これをマトリックス構造によって再分化出来ないか検索した。

②人工皮膚は従来の方法では線維芽細胞による収縮コラーゲングル (10-20mg/cm³) 上に表皮細胞を播種する。本研究では高密度培養法により 30mg/cm³ 以上の高密度コラーゲングルを作成できる。この高密度コラーゲングル上に表皮細胞を播種して重層化表皮層の再構成を目指した。

(3) さらに本研究計画発展のシーズとしてコラーゲン細線維の高密度コラーゲングルの高機能化を目指す。そのためサイトカインや細胞機能性物質の持続的作用を目指して、高密度ゲルへの固相化、徐放化による人工組織の可能性を検索した。

3. 研究の方法

(1) 人工血管壁モデル組織作成のため、高密度培養装置(図1)を用いた。同装置全体を37°Cのインキュベーター内に格納し、培養液ビン内にI型コラーゲン(0.5mg/ml)、線維芽細胞(1.0×10⁷cells)を含む培養液(DMEM: 50ml)を3時間還流することによりリアクタ



図1. 高密度培養装置全体像

ー内に配置したPLAシート上に血管外膜組織を作成した(図2)。

次いで0.1%Matrigel添加培養液(10μg/mlの基底膜成分を含む)を1時間還流した後、増殖のための継代培養により脱分化した平

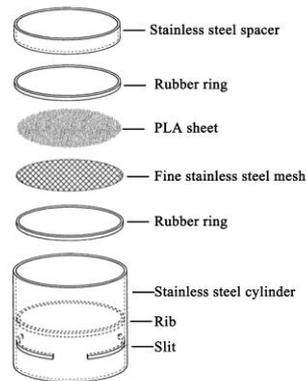


図2. バイオリアクター模式図

滑筋細胞(2×10⁷ cells)を播種した。第3層として内膜に相当する結合組織をI型コラーゲンと線維芽細胞を含む培養液を還流した。作成した血管壁モデルについて形態学的、生化学的に解析し、平滑筋細胞の再分化程度を検索した。

(2) 人工皮膚モデルは以下の2方法により作成した。

①収縮コラーゲングルによる皮膚の試作

酢酸抽出I型コラーゲン(1mg/ml)、5%牛胎仔血清、線維芽細胞(1.0×10⁶)を含む培養液(DMEM: 35ml)を調整した。同培養液を培養皿(直径6cm)に10ml分注し、37°Cにて3日培養して約1/100まで収縮した直径1.5cmほどの高密度コラーゲングル(10mg/cm³)を作成した。同ゲル上に直径12mmのガラス製円筒を置き、円筒内に表皮細胞の基底膜に模した層を作成するためIV型コラーゲン溶液(100μg/ml)を100-400μl注入した。次いで同ガラス製円筒内に培養表皮細胞(1.0×10⁴)を播種して14日間培養した。

②高密度培養法による皮膚モデルの試作

人工皮膚モデル組織作成のため、高密度培養装置を用いた。同装置全体を37°Cのインキュベーター内に格納し、レーザーボトール内にI型コラーゲン(0.5mg/ml)、線維芽細胞(1.0×10⁷cells)を含む培養液(DMEM: 50ml)

を還流することにより人工真皮組織を作成した。本実験には人工組織をポリ乳酸シート (PLA sheet) 上に集積した。

同ゲルを培養皿に移しゲル上に直径 12mm のガラス製円筒を置き、ガラス筒内に細菌性コラーゲナーゼのコラーゲン結合ドメインと上皮細胞成長因子の融合たんぱく質 (CBD-EGF ; 0.95 μ g/ml) を含む培養液 0.4ml を分注した。30 分後同ガラス円筒内に培養表皮細胞 (1.0×10^4) を播種して 14 日間培養した (図 4)。

作成した人工皮膚モデルは形態学的、生化学的に解析した。



図 3. 表皮細胞の播種法

4. 研究成果

(1) 人工血管壁モデル組織の試作

閉鎖型循環式高密度培養装置を用いて血



図 4. 再構成した血管壁モデルの組織像
管壁モデルの作製を試みた。

この装置を用い、線維芽細胞と I 型コラーゲンを含む溶液を循環し、血管壁外膜に相当するコラーゲン線維層を形成した。次いで平滑筋細胞とマトリゲルを含む溶液を循環し、コラーゲン線維層の上に血管壁中膜に相当する構造を形成した。最後に線維芽細胞と I 型コラーゲンを含む溶液を循環し、血管壁の 3 層構造に相当する結合組織-

平滑筋層-結合組織の積層型人工組織を作成することができた (図 4)。

この人工血管壁において培養平滑筋細胞が再分化したかどうか α -smooth muscle actin の発現を蛍光免疫染色したところ中膜に相当するレイヤーに特異蛍光を観察することができた (図 5)。

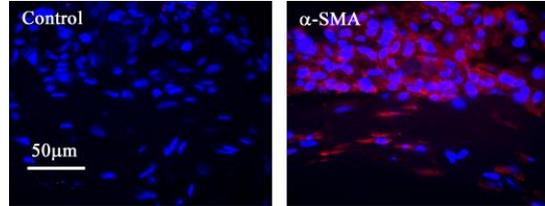


図 5. 平滑筋型アクチンの発現

(2) 人工皮膚モデルの試作

① 収縮コラーゲンゲルによる皮膚の試作

酢酸抽出法によって精製した I 型コラーゲンは 37°C、中性溶液中では 30-60 分で細線維となりゲル状物質を形成する。そのコラーゲン濃度は 1.0m g/cm³ であるが、ゲル中に包埋した線維芽細胞により 3 日間で約 10 倍に濃縮される (ゲルは収縮する)。表皮組織の下層にある基底膜を再構成することによってより実物に近い皮膚を再構成できないか検討した。豚レンズ包より 0.5M 酢酸にて抽出・精製した IV 型コラーゲン (1.8mg/ml) を用いた。IV 型コラーゲン溶液 400 μ l をコラーゲンゲル上に配置した径 12mm のガラスリング内に分注することにより、収縮コラーゲンゲル上に IV 型コラーゲンが沈着していた。IV 型コラーゲンを添加した収縮ゲル上では表皮細胞層約 60 μ m で、コントロールのそれの約 2 倍であった (図 6)。

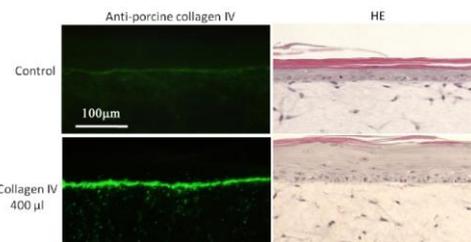


図 6. 人工皮膚の免疫蛍光像と組織像
IV 型コラーゲンに特異的な蛍光が表皮真皮境界部に観察される。IV 型コラーゲンを加えた場合表皮層はほぼ 2 倍の厚さとなっている。

これらの結果から本申請の最初の目的は達成されたが、動物移植モデルは研究期間中に成果を得ることはできなかった。血管壁モデルは円筒形の高密度培養装置を用いて血管として再構成し、マウス大動脈への移植を試みる。

一方、高密度培養法を用いて再構成したヒトスキルス胃癌をマウス皮下への移植術を施したところ、生着した(図7)。

本研究支援事業終了後も皮膚モデル組織の移植を試みていく予定である。

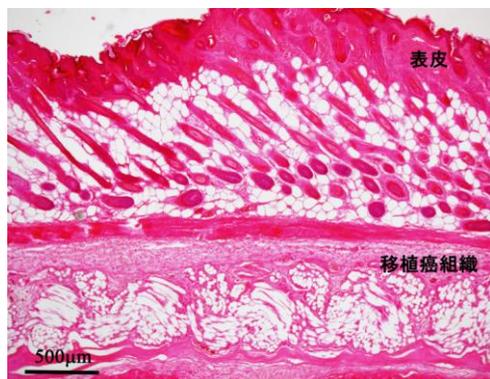


図7. ノードマウス皮下に移植した再構成スキルス胃がん組織

線維芽細胞とスキルス癌細胞をPLAシート上のコラーゲンゲル内に封入してマウス背部皮下に移植したところ生着した。

(3) サイトカイン固相化高密度コラーゲンゲルの開発

本研究期間中にサイトカインの固相化技術を着想し実験を行った。北里大学の松下はクロストリジウム属細菌の分泌するコラーゲナーゼのコラーゲン結合ドメインとEGFの融合蛋白質(CBD-EGF)を作成した(図8)。



図8. 細菌性コラーゲナーゼのコラーゲン結合ドメインと上皮細胞成長因子融合タンパク質の概念図

CBD-EGFを用いて表皮細胞の分化・増殖を誘導して重層化表皮の誘導ができるかどうか検討した。真皮層に相当する人工結合組織の表面を、CBD-EGF (0.95 μg/ml)とヒト表皮細胞(HFO, 4x 10⁵個)を含む培養液(0.4 ml)で覆

い、24時間静置した。その後、通常の培養液に置換して14日間培養した。その結果図9にあるように重層化表皮層を持った人工皮膚を再構成することができた。

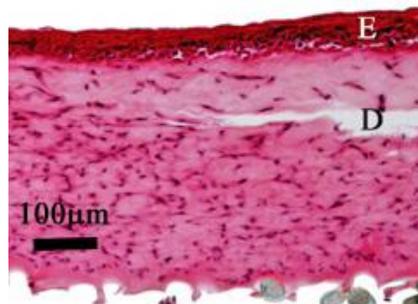


図9. 高密度培養装置を用いて作成した人工真皮上に CBD-EGF と表皮細胞を播種して作成した人工皮膚の組織像
E:表皮 D:真皮

これはCBD-EGFが高密度コラーゲンゲルを構成する細線維に結合し、持続的に培養表皮細胞を活性化したものと考えられる(図10)。

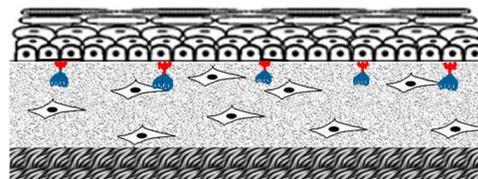


図10. CBD-EGFの局在(仮説)
CBD-EGFは真皮層上層のコラーゲン細線維に固相化されて持続的に細胞生理活性を発現していると考えられる。

(4) 人工組織への血管誘導技術開発

組織工学の発達により多様な人工組織を作成できるようになった。しかしながら人工組織の生着には血管網が誘導されることが最も重要である。そこで人工皮膚の生着促進を期待してコラーゲン結合型VEGF-A(CBD-VEGF-A)の作製を試みた。横紋筋肉腫細胞由来のcDNAを鋳型として、PCRによりマウスVEGF-A164断片を得た。これにCBDおよびHisタグをコードする断片を付加し、レトロウイルスベクター、pMCS-IGに挿入した(図11)。Cos-1細胞にDEAE-デキストラン法により遺伝子導入し、その培養上清よりCBD-VEGF-Aを分離・精製する。

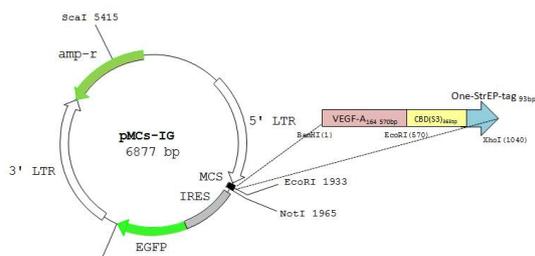


図11. CBD-VEGF-A発現用プラスミド

CBD-VEGF-A固相化コラーゲンゲルには血管誘導作用が認められた。これらの研究については本研究支援事業終了後も継続し、事業化を目指す。

(5) 人工肝組織の再構成

人工血管壁の再構成モデルは様々な組織に応用できることから、初代培養肝細胞あるいは肝前駆細胞を人工結合組織に組み込むことにより肝組織が再構成できるのではないかと考えた。実験手順は『(1)人工血管壁モデル組織の試作』で行った方法を踏襲した。その結果、図12に示すように湿重量約1gの人工組織を再構成することができた。

今後は①肝機能発現の変化を検索し、②iPS細胞などの多能性幹細胞を用いた高密度肝組織の再構成を試みる。

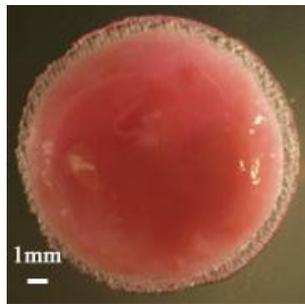


図 12. 高密度培養装置により再構成した肝組織
約 1g の組織が 24 時間以内に作成できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- ① Motoyama, H., Ogawa, S., Kubo, A., Miwa, S., Nakayama, J., Tagawa, Y., and Miyagawa, S.: *In vitro* reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 385, 2009, 123-128.
- ② Muta-Takada, K., Terada, T., Yamanishi, H., Ashida, Y., Inomata, S., Nishiyama, T., Amano, S.: Coenzyme Q(10) protects against oxidative stress-induced cell death and enhances the synthesis of basement membrane components in dermal and epidermal cells. *Biofactors*, 査読有, 35, 2009, 435-441.
- ③ Arai, K.Y., Sato, Y., Kondo, Y., Kudo, C., Tsuchiya, H., Nomura Y, Ishigami A, Nishiyama, T.: Effects of vitamin C deficiency on the skin of the senescence marker protein-30 (SMP30) knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 385, 2009, 478-83.
- ④ Okayasu, I., Yoshida, T., Mikami, T., Hana, K., Yokozawa, M., Araki, K., Mitsuhashi, J., Kikuchi, M., Adachi, E., and Sada, M: Mucosal remodeling in long-standing ulcerative colitis with colorectal neoplasia: Significant alterations of NCAM+ or α -SMA+ subepithelial myofibroblasts and interstitial cells. *Pathology International*, 査読有, 59, 2009, 701-711.
- ⑤ Tanaka, K., Ebihara, T., Kusubata, M., Adachi, E., Arai, M., Kawaguchi, N., Utsunomiya J., Miki, Y., Hiramoto, M., Shunji Hattori S., Irie, A.: Abnormal collagen deposition in fibromas from patient with juvenile hyaline fibromatosis. *J. Dermatol. Sci.*, 査読有, 55, 2009, 197-200.
- ⑥ Arai, K., Nagashima, Y., Takemoto T, Nishiyama T.: Mechanical strain increases expression of type XII collagen in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Struct. Funct.*, 査読有, 33, 2008, 203-210.
- ⑦ Ogura, Y., Matsunaga, Y., Nishiyama, T., Amano, S.: Plasmin induces degradation and dysfunction of laminin 332 (laminin 5) and impaired assembly of basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Br. J. Dermatol.*, 査読有, 159, 2008, 49-60.
- ⑧ Murayama, H., Takahashi, M., Takamoto, M., Shiba, Y., Ise, H., Koyama, J., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Ikeda, U.: Deficiency of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. *Cardiovasc. Res.*, 査読有, 80, 2008, 175-180.
- ⑨ Isoda, K., Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., and Yagi, K.: Hepatoprotective effect of vitamin B₁₂ on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 2008, 査読有, 31, 309-311.
- ⑩ Fujisaki, H., Adachi, E., and Hattori, S.: Keratinocyte differentiation and proliferation are regulated by adhesion to the three-dimensional meshwork structure of type IV collagen. *Connective Tissue Research*, 査読有,

- 49, 2008, 426-436.
- ⑪ Kihara, T., Imamura, Y., Takemura, Y., Mizuno, K., Adachi, E., and Hayashi, T.: Intercellular accumulation of type V collagen fibrils in accordance with cell aggregation. J. Biochem., 査読有, 144, 2008, 625-633.
- 他 10 篇 (すべて査読有)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① Satoshi Hosoya, Miho Tamai, Hironobu Iwashiro, Shiro Kikuchi, Masaki Ueno, Toshihiro Akaike, Yoh-ichi Tagawa, Masahiko Watanabe, Eijiro Adachi: Characterization of HepG2 cells accumulated on collagen gels populated with fibroblasts as hepatic tissue substitutes. July 19-24, 2009 New London, New Hampshire, Gordon Research Conference on Collagen (Collagen Gordon Conference: List of Posters p.1).
- ② Osamu Matsushita, Nozomu Nishi, Takaki koide, ST Leena Philominathan, Joshua Sakon, Robert C Gensure, Hironobu Iwashiro, and Eijiro Adachi: Substrate recognition of collagen-binding domains derived from bacterial collagenases. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium June 4- 7 2009, Yokosuka (Japan)
- ③ Hachiya Y, Ito K, Arai KY, Sasaki T, Adachi E, Hayashi T, Nishiyama T: Effects of reconstituted type IV collagen aggregates on epidermal structure and function in human skin equivalents 3th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, (Japan) Dec. 4-6, 2009
- 他 7 件 (国際学会)、20 件 (国内学会)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 積層型高密度培養人工組織の製造方法及び積層型培養人工組織
発明者: 安達栄治郎、松下治、岩城啓修、細谷智、西望
権利者: 学校法人北里研究所
種類: 特許
番号: 特願 2009-017475
出願年月日: 2009 年 1 月 29 日
国内外の別: 国内

名称: 人工皮膚
発明者: 入山俊介、海塩健一、常長誠、猪股慎二、安達栄治郎
権利者: 株式会社資生堂
種類: 特許
番号: 特願 2010-048159
出願年月日: 平成 22 年 3 月 4 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称: 高密度培養組織の製造方法及び高密度培養組織
発明者: 安達栄治郎、大橋しほ花、平井和弥
権利者: 学校法人北里学園
種類: 特許
番号: WO 2 0 0 6 / 0 8 8 0 2 9
取得年月日: 平成 1 7 年 2 月 1 5 日
国内外の別: 国外

名称: コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の測定方法
発明者: 渡邊昌彦、安達栄治郎、永田和宏、菊池史郎、小野里航、平井和弥
権利者: 学校法人北里学園
種類: 特許
番号: 特許公開 2 0 0 8 - 1 2 2 2 7 6
取得年月日: 平成 2 0 年 5 月 2 9 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

1. 細胞組織再生医学ホームページ
<http://morpholab.ahs.kitasato-u.ac.jp/dachilabHP/indexaj.html>
2. medicon サーバー
<http://medicon.ahs.kitasato-u.ac.jp/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
安達 栄治郎 (ADACHI EIJIRO)
北里大学・医療系研究科・教授
研究者番号: 30110430
 - (2) 研究分担者
西山 敏夫 (NISHIYAMA TOSHIO)
東京農工大学・農学部・教授
研究者番号: 60372455
田川 陽一 (TAGAWA YOH-ICHI)
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授
研究者番号: 70262079