

## 脈管疾患における再生医療のための基盤技術

田畑 泰彦

**要 旨:** 近年、生体組織の再生誘導を介した欠損組織の再生修復が可能となってきた。この再生医療には、細胞に加えて、生体組織の再生誘導に適した環境(場)の設定が不可欠である。そのための医工学技術、方法論が生体組織工学である。本稿では、生体組織工学の基盤技術を概説するとともに、それらの基盤技術を用いた脈管疾患における再生医療の現状と展望について述べる。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 131-138)

Key words: Controlled release, Drug delivery, Growth factor, Tissue engineering, Tissue regeneration

### 再生医療における再生医学と生体組織工学

今から約14年ほど前、移植臓器の不足のために命を落としていく肝不全の子供を目の前にして、米国ハーバード大学医学部附属病院の小児肝臓外科医と材料工学者とがアイデアを出し合って、肝細胞を生体吸収性高分子からなる三次元スポンジ材料内で培養し、得られた肝細胞の増殖塊を治療に利用できないかと考えた。これが再生医療の始まりである。肝細胞の増殖とともに材料は吸収され消失し、最終的には材料の残存がない肝臓様構造体を作るという発想である。用いられる細胞が患者由来のものであれば免疫拒絶反応もなく、材料が消失するため異物反応もなく、理想的な治療法となる。このアイデアが実現できたのは、生体内や生体成分に触れて用いられる生体材料に関する長年の研究開発をもとに、細胞の増殖のために仮の足場として働く三次元の生体吸収性の高分子材料が利用できたからである。

ヒトを含む哺乳動物とイモリとはどちらも生き物であり、生命を維持するための基本的メカニズムは同じはずである。事実、近年の再生現象に関する細胞の基礎生物医学研究の進歩により、哺乳動物の生体組織や臓器の中にも増殖・分化能力の高い幹細胞や前駆細胞の存在すること、さらに、細胞の増殖・分化に、細胞とその周辺環境(場)との相互作用が重要であることがわかってきている<sup>1-4)</sup>。これらの研究成果は、生体組

織・臓器の再生誘導を実現するためには、細胞を単に生体内へ投与するだけではなく、細胞が増殖・分化しやすい場を設定することが不可欠であることを示している。もし、初期の環境を適切に与え、自己修復の自然カスケードを発動させることができれば、自己組織・臓器の再生は誘導されると考えられる。この発想こそが再生医療の基本であり、前述のように、その始まりは、細胞による生体組織(tissue)の再生誘導を手助けするための場を作り与える工学(engineering)であった。tissue engineeringは生体組織工学、再生医学などと訳されている。しかしながら、この言葉から「生体組織を再生修復させるための医学」という最終目的がわかりにくいため、日本では明確な表現法として、「再生医学」という名前がつけられた。再生現象にかかわる基礎生物医学(つまり再生医学)が発展し、再生のメカニズムが解明されることが大切であるのはいうまでもない。しかしながら、再生医学と再生医療とは大きく異なる。再生医学の進歩が直接、患者の治療(つまり再生医療)にはつながらないことも多く、幹細胞に関する基礎生物医学の研究成果を医療に還元するためには、生体組織工学との密な連携が必要である。

本稿では、再生医療のための基盤技術を概説するとともに、それらの基盤技術を用いた脈管疾患における再生医療の現状と展望について述べる。

### 再生医療を実現するための 生体組織工学の基盤技術

再生医療は、生体組織の再生と臓器機能の代替とが行われる場所により、生体外と生体内とに分けられる<sup>5,6)</sup>。これまでの生物医学の基礎的知見および細胞培養技術では、前述の再生の場の構築に限界がある。そこで、現在ではほとんどの生体組織の再生誘導が、再生に必要な物質が自動的に供給される可能性のある生体内アプローチによって研究されている<sup>5,6)</sup>。生体組織工学では、生体材料がさまざまな役割で利用され、種々の基盤技術が必要となる(Fig. 1)。生体材料の1つ目の役割は、生体組織の再生誘導のための足場である<sup>5,7,8)</sup>。生体組織の欠損では、細胞だけではなく、その周辺環境までもなくなってしまっている。そのため、細胞とともにそれを立体的に配置させ、増殖・分化を促進するための足場(人工細胞外マトリクス)を欠

損部に与えなければ、三次元の生体組織の再生誘導は実現されない(Fig. 1A)。足場材料には、細胞親和性、生体吸収性、多孔性などの性質が必要であり、これらを兼ね備えた三次元構造物を作るための材料加工技術が不可欠である。

2番目の役割はタンパク質や細胞の侵入阻止のための隔離である。欠損部をそのままにしておくと、増殖力の旺盛な線維芽細胞がその空間に侵入し、線維性組織で欠損部は充填されてしまう。再生すべき場所が線維性組織で占拠されてしまうと、もはや望む組織再生は不可能となる。そこで、再生誘導の場を確保するためにFig. 1Bのような隔離膜を用いる。再生誘導の邪魔をするタンパク質、細胞は遮断するが、組織再生に必要な細胞の増殖・分化のための栄養や酸素は透過するような性質をもつ膜の作製技術が必要である。

周辺組織の再生能力が低い場合には、足場材料や隔離膜だけでは生体組織の再生誘導は期待できない。そ

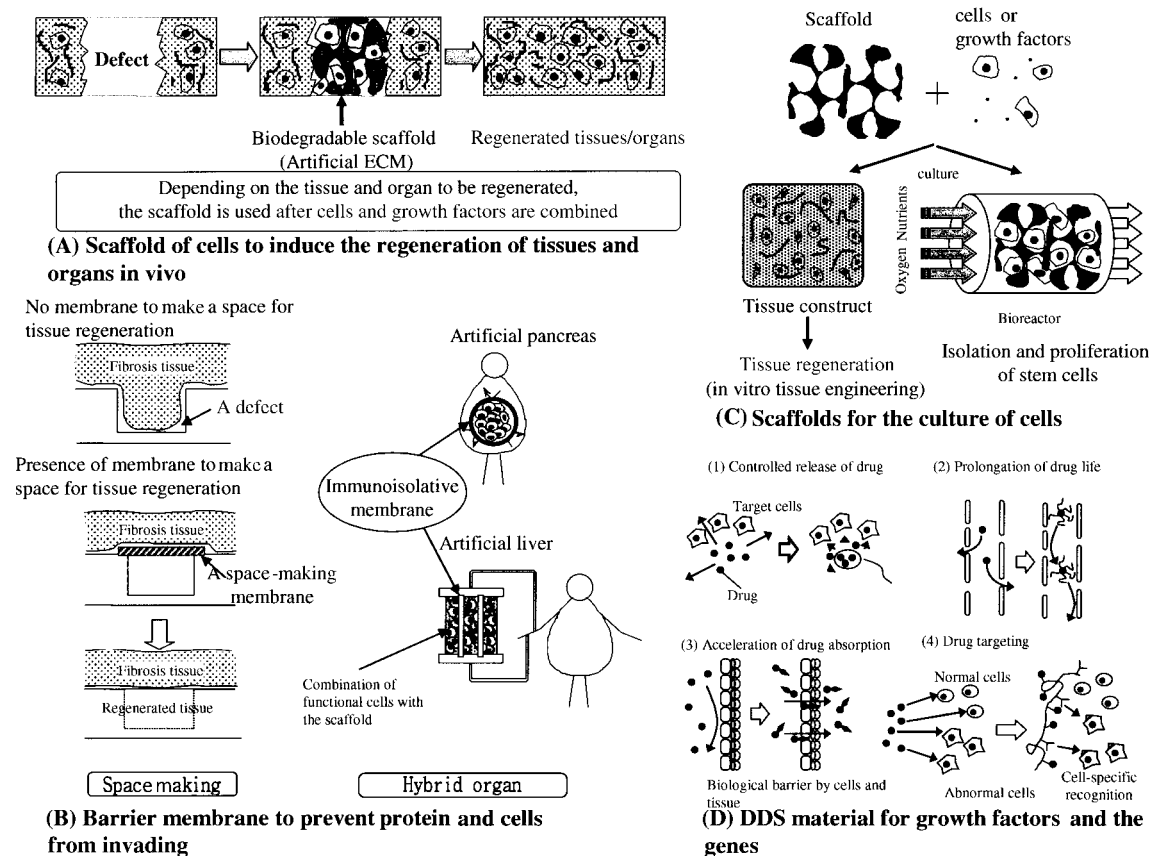


Figure 1 Biomaterials and basic technologies necessary for tissue engineering.

ここで、次に利用されるのが細胞あるいは細胞増殖因子である。再生医学の近年の進歩によって、増殖・分化能力の高い幹細胞の存在がわかってきているが、それらの細胞を医療応用するために必要な技術は、細胞の分離、培養法である。しかし、これまでの細胞培養法では効率よく細胞を増やすことは難しい場合が多い。そこで、生体内環境を模倣することにより、細胞を効率よく増やすことを目指した足場材料および細胞培養技術、装置(バイオリアクタ)などの研究開発が必要である( Fig. 1C )。また、無血清培養法および細胞の分化度の評価技術などの開発研究も急がれる。

細胞の増殖・分化を促す働きをもつ細胞増殖因子、あるいはその遺伝子を用いる場合にも工夫が必要となる。例えば、それらの生理活性物質は生体内寿命が短く不安定であるため、単に水に溶かして必要な部位に投与するだけでは、その組織再生効果はほとんど期待できない。そこで、再生の場において生理活性物質の濃度を必要な期間にわたって有効値に保たなければならない。これを可能にするのがdrug delivery system (DDS)である<sup>9)</sup>( Fig. 1D )。この徐放システムは細胞あるいは足場材料と組み合わせても用いられる( Fig. 1A )。DDSには4つの目的があり、薬物として細胞増

殖因子あるいは遺伝子を用いる。

### 生体組織工学をベースとした再生医療の実際

足場材料あるいは隔離膜を用いた、さまざまな生体組織の再生誘導が試みられている<sup>10)</sup>。ここでは、DDS技術を利用した再生医療について述べる。例えば、生体吸収性ハイドロゲルキャリアを用いて、生物活性をもつ細胞増殖因子を再生の場で持続的に放出(徐放)させる( Fig. 2 )。このような細胞増殖因子の徐放化技術を利用することにより、種々の生体組織の再生誘導が可能となっている<sup>9)</sup>( Table )。また、basic fibroblast growth factor( bFGF )の徐放化を利用した組織の器質化促進による脳動脈瘤のカテーテル治療も始まっている<sup>11)</sup>。

再生医療の中で血管を新生誘導する技術は必要不可欠である。その理由は、すみずみまで血流がいきわたっているためにヒトの体がうまく働いていることを考えれば当然である。血管新生誘導には2つの目的がある。1つ目は虚血疾患の治療であり、もう1つは、移植細胞や組織への酸素、栄養の供給のためである。血管新生促進作用をもつbFGFを利用して虚血疾患の血管誘導治療が可能である。例えば、イヌの心臓の左前下行枝分岐部を結紮した1週間後、下行枝の両側心筋

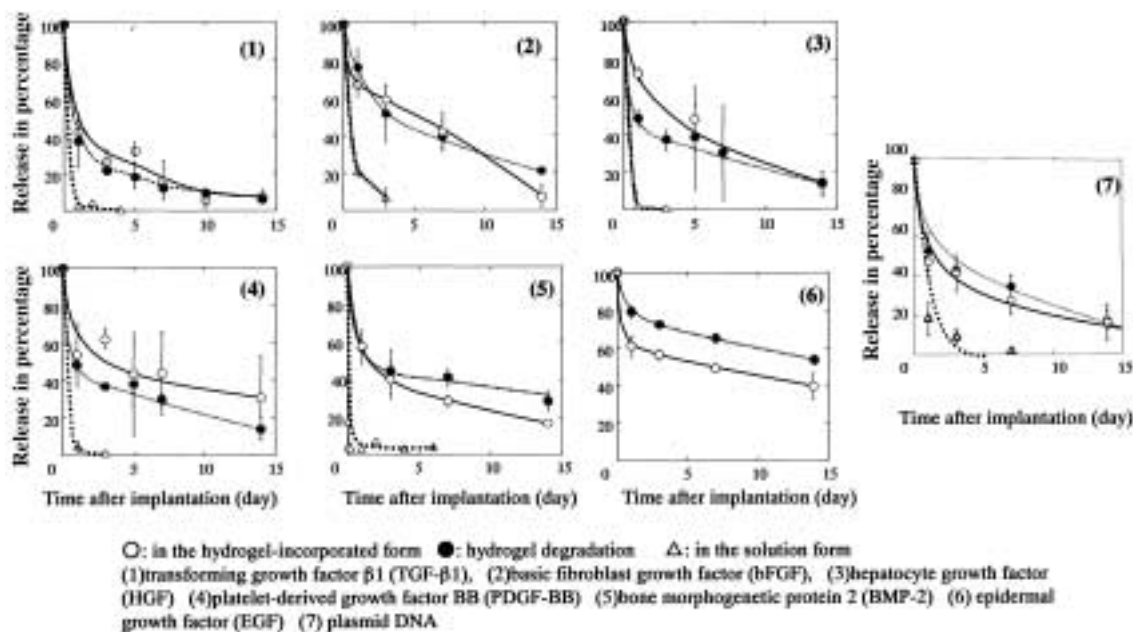


Figure 2 In vivo release profiles of growth factors and plasmid DNA from biodegradable hydrogel of various gelatins.

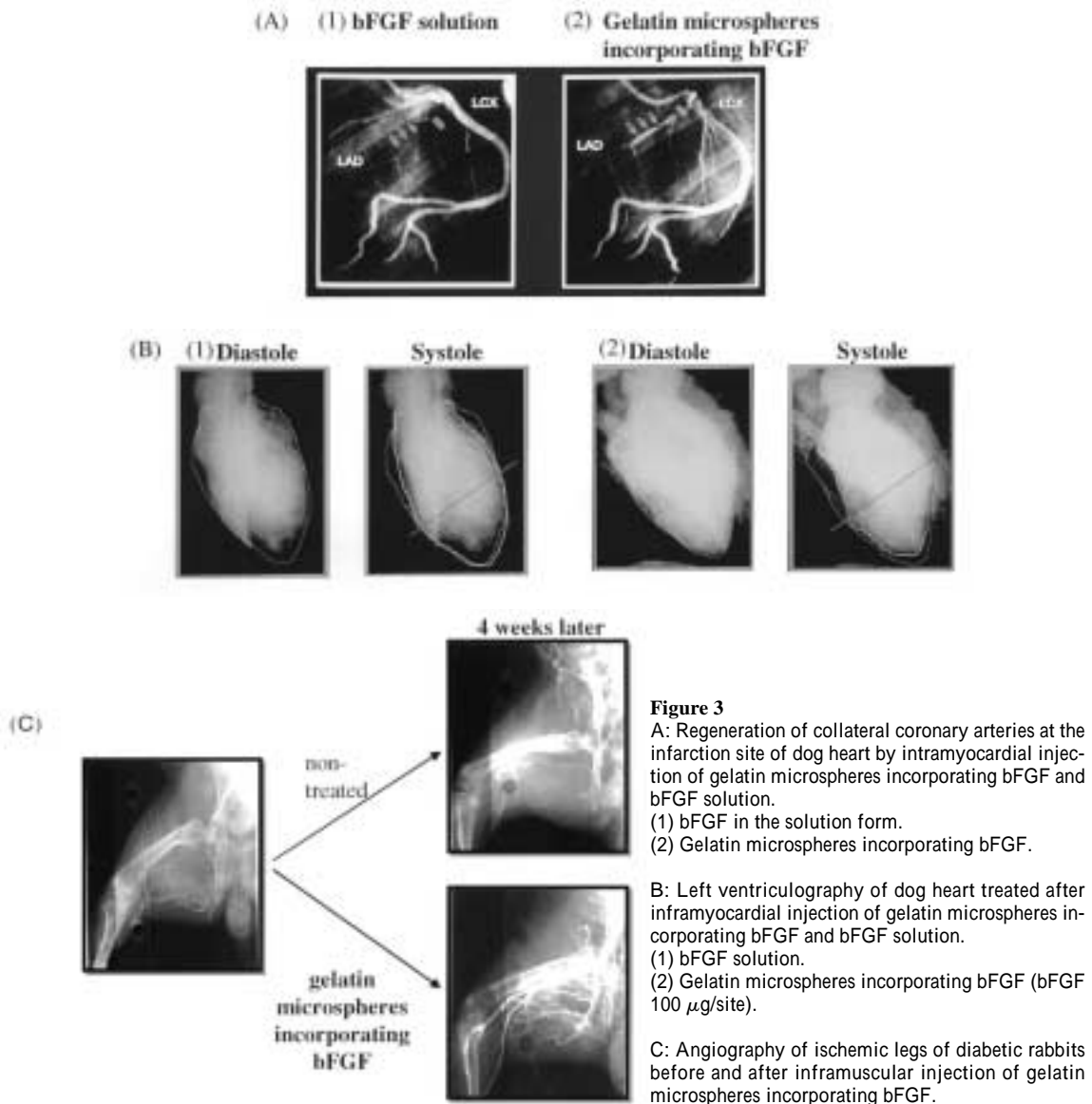
**Table** Regeneration induction of several body tissues and organs by making use of biodegradable hydrogels for the controlled release of bioactive growth factor

Materials	Growth factors	Animals	Effects	Objectives
Acidic gelatin (PI 5.0)	bFGF	Mouse, Rat, and Dog	Angiogenesis	Transplantation of Langerhans islands for diabetes therapy
		Rat	Angiogenesis	Transplantation of hepatocytes for therapy of enzyme deficiency disease
		Rat	Angiogenesis	Transplantation of renal epithelial cells
		Rat and Dog	Angiogenesis	Transplantation of cardiomyocytes
		Rat and Guinea pig	Angiogenesis	Promoted repairing of skin dermal layer
		Rat and Pig	Angiogenesis	Treatment of cardiac infarction
		Rabbit	Angiogenesis	Treatment of lower limb ischemia
		Rat, Dog, and Monkey	Osteogenesis and Angiogenesis	Repairing sternum and connective tissue
		Rat, Rabbit, and Monkey	Osteogenesis	Repairing of skull bone
		Rat, Rabbit, Dog, and Monkey	Osteogenesis	Repairing of long bone
		Mouse	Adipogenesis	Repairing of breast and soft tissue reconstruction
		Mouse	Angiogenesis and activation of hair follicle tissue	Promotion of hair growth
		Dog	Periodontium repair	Repairing of periodontium
		Dog	Peripheral nerve repair	Nerve repairing
		Dog	Osteogenesis	Treatment of dilated cardiomyopathy
TGF- $\beta$ 1	HGF	Rabbit and Monkey	Osteogenesis	Repairing of skull, long, and mandibular bone
		Goat	Chondrogenesis	Repairing of tracheal cartilages
		Mouse	Angiogenesis and activation of hair follicle tissue	Promotion of hair growth
bFGF/TGF- $\beta$ 1	CTGF	Rabbit	Osteogenesis	Repairing of skull bone
		Rabbit	Chondrogenesis	Repairing of articular cartilage
		Rat, Dog, and Monkey	Osteogenesis	Repairing of skull and mandibular bone
Basic gelatin (PI 9.0)	BMP-2	Dog	Chondrogenesis	Repairing of tracheal cartilage
		Rabbit	Osteogenesis	Repairing of skull bone
Collagen	TGF- $\beta$ 1 VEGF	Pig	Angiogenesis	Treatment of myocardial infarction
		Rabbit	Angiogenesis	Promotion of engraftment of soft tissue grafts
		Rabbit	Osteogenesis	Osteogenesis for spinal fusion
		Mouse	Angiogenesis and activation of hair follicle tissue	Promotion of hair growth

bFGF: basic fibroblast growth factors, TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor  $\beta$ 1, HGF: hepatocyte growth factors, BMP-2: bone morphogenetic protein 2, CTGF: connective tissue growth factors, VEGF: vascular endothelial growth factors, PI: isoelectric point

内へbFGF含浸ゼラチンハイドロゲル粒子を投与した。**Fig. 3A, B**はbFGF投与の1週間後の冠状動脈と左室造影の結果である。ゼラチンハイドロゲル粒子を用いてbFGFを徐放することによって、前下行枝に血流の再開が見られ、心筋内で血管新生が誘起されるとともに、前壁から心尖部の心筋運動の改善も認められた。一方、bFGFの水溶液の投与では、そのような変化は見られなかった。加えて、これらの血管新生誘導は、下肢虚血疾患の治療にも有効であった(**Fig. 3C**)。bFGFの徐

放化によりあらかじめ血管誘導( prevascularization )した部位への膵ランゲルハンス島を異種移植したところ、3カ月以上にわたって血糖値は正常化していた<sup>12)</sup>。また、このprevascularization技術によって、生体内での肝細胞<sup>13)</sup>あるいは腎尿細管上皮細胞の機能維持<sup>14)</sup>ならびに心筋細胞移植による慢性心筋梗塞の治療効果<sup>15)</sup>などが認められている。心臓バイパス手術では、高い開存性から両側内胸動脈をグラフト血管として使用する。しかしながら、これにより、胸骨およびその周辺軟組



**Figure 3**  
 A: Regeneration of collateral coronary arteries at the infarction site of dog heart by intramyocardial injection of gelatin microspheres incorporating bFGF and bFGF solution.  
 (1) bFGF in the solution form.  
 (2) Gelatin microspheres incorporating bFGF.  
 B: Left ventriculography of dog heart treated after intramyocardial injection of gelatin microspheres incorporating bFGF and bFGF solution.  
 (1) bFGF solution.  
 (2) Gelatin microspheres incorporating bFGF (bFGF 100  $\mu$ g/site).  
 C: Angiography of ischemic legs of diabetic rabbits before and after intramuscular injection of gelatin microspheres incorporating bFGF.

織の治癒が遅延することが、臨床上問題となっている。そこで、bFGF含浸ゼラチンハイドロゲルによって骨と血管とを同時に再生させ、骨とその周辺軟組織の治癒を促進させることが可能となった<sup>16)</sup>。これらの新生血管誘導法については、大学倫理委員会の許可を得ることができ、近々にも患者への適用が始まろうとしている。

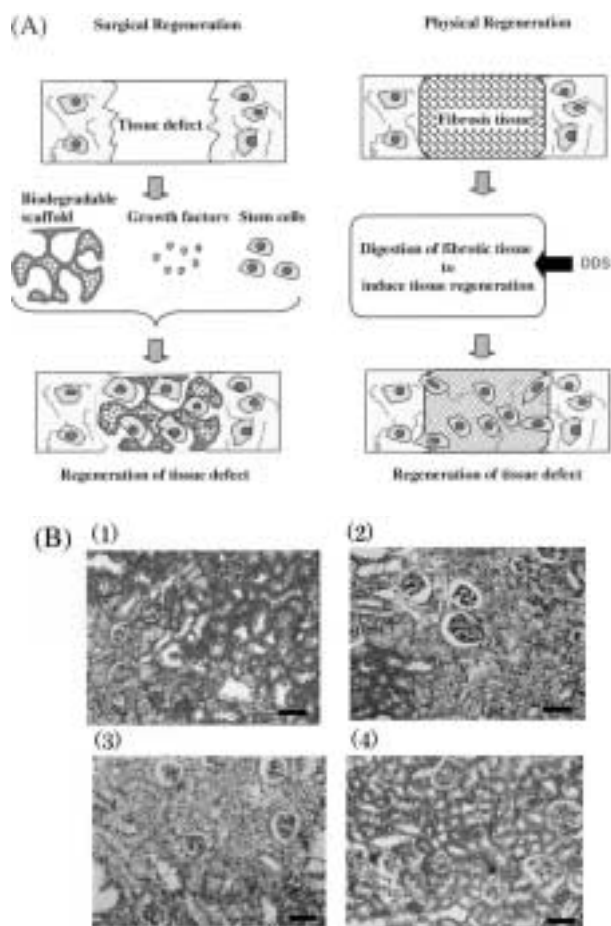
近年、遺伝子による生体組織の再生誘導が試みられている。アデノウイルスベクターを用いた難治性循環

器疾患に対する遺伝子治療が米国で進められているが、ウイルスに由来する抗原性、毒性の問題を避けることができない。そこで、プラスミドDNAの利用が考えられ、vascular endothelial growth factor( VEGF )あるいはhepatocyte growth factor( HGF )のプラスミドDNAを用いた血管新生治療法の臨床試験が行われている<sup>17)</sup>。また、bone morphogenetic protein( BMP )あるいはパラサイロイドホルモンのプラスミドDNAを用いた骨の再生も試みられている<sup>18)</sup>。しかしながら、遺伝子発現がウイ

ルスベクターに比べてきわめて低く、発現レベルを高める工夫が必要となる。種々の試みが報告されている中で、ハイドロゲルからプラスミドDNAの徐放化 (Fig. 2) がDNAの発現効率を高めることもわかってきている<sup>19,20)</sup>。fibroblast growth factor (FGF) プラスミドDNA含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをウサギの下肢虚血モデルに筋肉内投与したところ、38日後において、通常の血管造影上の有意な血管新生とこれに伴う血流量の増加が見られた。プラスミドDNA含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲル投与群とプラスミドDNA水溶液投与群との両群の比較において、新生血管の血管拡張物質に対する反応性に有意な差が認められた<sup>20)</sup>。遺伝子治療にもDDS技術が応用されることで、より高い治療効率が期待される。

また、生体内の欠損部に外科的に再生の場を作り再生を誘導するアプローチとは異なり、線維化組織を消化分解することで、臓器内に再生誘導の場を確保し、難治性慢性疾患の治療を行うという「内科的再生医療」の試みも始まっている。「外科的再生」と「内科的再生」のいずれも、生体の潜在的な再生能力を引き出すためにきっかけを与えるという点で共通するが、後者はDDSの技術を活用することで、患者本来の組織を病的なものから再生可能な組織へと是正し、より侵襲の少ない組織再生治療の実現が期待できると考えられる (Fig. 4A)。線維性コラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のプラスミドDNAを含浸したゼラチンハイドロゲル粒子を糖尿病性腎症モデルマウスの腎皮膜下に投与した。その結果、腎組織中のヒドロキシプロリン量は減少し、腎機能を示す血中尿素窒素にも改善が認められた。また、組織学的にMMP-1プラスミド徐放群における腎臓の線維化病域の縮小も確認された<sup>21)</sup> (Fig. 4B)。また、HGFを徐放することによって、肝硬変の進行の抑制も報告されている<sup>22)</sup>。

今後は、このような遺伝子治療に加えて、遺伝子改変した細胞を用いた細胞移植再生治療も行われるであろう。このためには、ウイルスベクターを利用しない遺伝子導入技術の開発研究が不可欠であり、遺伝子に対するDDSも重要となるであろう<sup>9)</sup>。例えば、プラス



**Figure 4**  
 A: Surgical regeneration and physical regeneration.  
 B: Renal histological sections of mice pre-administrated with gelatin microspheres incorporating pCMV-MMP or other agents into the renal subcapsule 28 days after STZ injection (50  $\mu$ g pCMV-MMP/site). Masson Trichrome's staining (Bar; 50  $\mu$ m).  
 (1) PBS  
 (2) Gelatin microspheres.  
 (3) Free pCMV-MMP.  
 (4) Gelatin microspheres incorporating pCMV-MMP.

ミドDNAを幹細胞内で徐放化することによって、ウイルスベクターに匹敵する遺伝子発現が達成され、遺伝子改変された幹細胞を用いた細胞移植治療効果の増強に成功している<sup>23)</sup>。

### おわりに

現在の医療は生物医学だけではなく、多くの研究領域の研究成果の上に成り立っていることは言うまでもない。治療学の1つである再生医療も同じである。再

生医療の目的は、新しい治療法の確立であり、発生・分化の解明ではない。生物学としての発生・分化の解明も重要であるが、今日の疾病の治療は病因の解明を待って行われるのではなく、むしろそのような例はわずかである。ごく少しの組織を除いては、その再生誘導に細胞だけではなく生体材料が必要である。生物医学と生体組織工学との両研究分野が車の両輪のごとく機能して初めて再生医療が実現されることを忘れてはならない。

### 文 献

- 1) 原田実根監修：現代医療の最前線(前篇)-再生医療と細胞療法-. 最新医学, 2003, **58**: 515-789.
- 2) 桜井靖久監修：現代医療の最前線(後篇)-人工臓器とメディカル・エンジニアリングの進歩-. 最新医学, 2003, **58**: 1249-1606.
- 3) Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT: Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*, 2003, **301**: 1547-1550.
- 4) Zhang J, Niu C, Ye L et al: Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, **425**: 836-841.
- 5) 田畑泰彦編：ここまで進んだ再生医療の実際. 羊土社, 東京, 2003.
- 6) 田畑泰彦：生体材料, 生体組織工学を基盤とした再生医療の最前線. 日本歯科評論, 2004, **64**: 167-181.
- 7) 田畑泰彦：再生医学の応用の現状と課題マトリックスとDDS特集再生医学と21世紀の医療; その進歩と課題. *Pharma Medica*, 2000, **18**: 69-74.
- 8) 田畑泰彦：スキャフォールド(Scaffold). *THE BONE*, 2003, **17**: 29-34.
- 9) 田畑泰彦編：遺伝子医学別冊ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法. メディカルドゥ, 大阪, 2003.
- 10) 田畑泰彦：再生医学と生体組織工学-その再生医療の役割-. 日本歯科医師会雑誌, 2002, **55**: 303-317.
- 11) Hatano T, Miyamoto S, Kawakami O et al: Acceleration of aneurysm healing by controlled release of basic fibroblast growth factor with the use of polyethylene terephthalate coils coated with gelatin hydrogel. *Neurosurgery*, 2003, **53**: 393-401.
- 12) Balamurugan AN, Gu Y, Tabata Y et al: Bioartificial pancreas transplantation at prevascularized intermuscular space: Effect of angiogenesis induction on islet survival. *Pancreas*, 2003, **26**: 279-285.
- 13) Ogawa K, Asonuma K, Inomata Y et al: The efficacy of prevascularization by basic FGF for hepatocyte transplantation using polymer devices in rats. *Cell Transplant*, 2001, **10**: 723-729.
- 14) Saito A, Kazama J, Iino N et al: Bioengineered implantation of megalin-expressing cells: a potential intracorporeal therapeutic model for uremic toxin protein clearance in renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14**: 2025-2032.
- 15) Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K et al: Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, **124**: 50-56.
- 16) Wakura A, Tabata Y, Tamura N et al: Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances healing of devascularized sternum in diabetic rats. *Circulation*, 2001, **104**: I-325-I-329.
- 17) 青木元邦：難治性循環器疾患の遺伝子治療. *Molecular Medicine*, 1999, **36**: 620-628.
- 18) Levy RJ, Goldstein SA, Bonadio J: Gene therapy for tissue repair and regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, **33**: 53-69.
- 19) Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K et al: Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J Control Release*, 2002, **80**: 333-343.
- 20) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N et al: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41**: 1056-1062.
- 21) Aoyama T, Yamamoto S, Kanematsu A et al: Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Eng*, 2003, **9**: 1289-1299.
- 22) Oe S, Fukunaka Y, Hirose T et al: A trial on regeneration therapy of rat liver cirrhosis by controlled release of hepatocyte growth factor. *J Control Release*, 2003, **88**: 193-200.
- 23) Nagaya N, Kangawa K, Kanda M et al: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2003, **108**: 889-895.

## Basic Technologies for Regenerative Medical Therapy in Vascular Diseases

Yasuhiko Tabata

Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

---

**Key words:** Controlled release, Drug delivery, Growth factor, Tissue engineering, Tissue regeneration

Tissue engineering (TE) is one of the biomedical technologies developed to assist regeneration of body tissues for treatment of large-size defects that are incapable of self-repair. TE may also help damaged organs to function properly by utilizing cells. Although there is no doubt that cells are important for the purpose, an artificially created site to induce repair of the defect is a key factor for successful tissue regeneration. This can be achieved only by processing artificial scaffolding materials into 3-dimensional structures for cell proliferation and differentiation as well as growth factors. Growth factors are often required to promote tissue regeneration. They also can facilitate angiogenesis which requires supplies of oxygen and nutrients for the survival of transplanted cells. However, one cannot always expect the biological effects of growth factors to be fully exerted because of poor in vivo stability, unless the drug delivery system (DDS) of growth factor is applied. This paper describes recent experimental data on tissue regeneration that emphasizes the role of DDS technology in tissue engineering, and briefly overviews biodegradable polymers used for this purpose.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 131–138)