

バイオアクティブバイオマテリアルと組織工学・再生医療

著者	柿木 佐知朗
雑誌名	理工学と技術 : 関西大学理工学会誌 = Engineering & technology
巻	22
ページ	45-49
発行年	2015-11-20
その他のタイトル	Bioactive biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine
URL	http://hdl.handle.net/10112/9482

バイオアクティブバイオマテリアルと組織工学・再生医療

柿木 佐知朗*

Bioactive biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine

Sachiro Kakinoki

1. はじめに

バイオマテリアルは、血球、血液成分、細胞、組織や臓器などの生体成分と接触する材料の総称であり、様々な医療用デバイスの構成素材として広く利用されている。2014年の日本人(女性)の平均寿命は86.8歳で、40年前と比較するとおよそ10年も延長された。その間の医療デバイスの進歩を振り返ると、狭心症(心臓の冠動脈が梗塞)の治療に用いられるバルーンカテーテルやステント、体腔内治療に使われる内視鏡、人工透析装置(人工腎臓)や埋め込み型の補助人工心臓などが次々と開発され、過去には困難であった疾病の治療を成し遂げてきた。これら医療デバイスによる先端医療の目覚ましい発展を支えてきたのは、紛れもないバイオマテリアルである。そして近年は、幹細胞研究の飛躍的な進展と、平成25年11月の「再生医療等安全性確保法」ならびに「薬事法改正法」の施行を受けて、組織工学ならび再生医療の研究開発が活発になっている。幹細胞が種々の生体組織や臓器の源になることには間違いがないが、幹細胞単体では機能できず、適切な系統への分化(異なる形態の細胞に変化)を誘導できる細胞外環境が必要になる。その足場として、従来のバイオマテリアルには無い、生物学的な機能を持った“バイオアクティブバイオマテリアル”が盛んに研究されている。

2. 組織工学と再生医療

最初に、組織工学と再生医療について概説する。組

織や臓器を失った際、バイオマテリアルを使って自然治癒を促進したり細胞を移植したりすることで、ドラゴンボールのピッコロ大魔王の腕のごとく再生させようとする治療法が、組織工学による再生医療(再生治療)である。バイオマテリアルを使った欠損組織の再生は、1960年代から歯周組織の再建を目的とした Guided tissue regeneration (GTR) や、1980年代に欠損した末梢神経の再生するための人工神経(チューブ)の研究に始まる。1993年に J. Vacanti ハーバード大学教授と R. Langer マサチューセッツ工科大学教授らがヌードマウスの皮下に軟骨組織を作製し、ティッシュエンジニアリング(組織工学)の概念を提唱して以降は、この呼び名が広く普及している⁽¹⁾。Vacantiらは、軟骨組織を播種したグリコール酸-乳酸共重合体の多孔質足場をヌードマウスの皮下に移植することで、マウスの皮下にヒト耳介軟骨(のような形の軟骨組織)を作製した⁽²⁾。厳密には、細胞を用いず足場材料のみで組織再生を誘導するアプローチを GTR、足場材料と細胞とを組み合わせたアプローチを組織工学と区別できるが、いずれの場合も細胞や組織の機能をコントロールできる足場、“バイオアクティブバイオマテリアル”が重要な役割を担っている。

3. バイオアクティブバイオマテリアル

初めて読む人は舌を噛みそうになるであろう“バイオアクティブバイオマテリアル”とは、生物活性を持つバイオマテリアルのことである。生物活性とは生体における生理的な機能のことなので、バイオアクティブバイオマテリアルは、生体内外で生理的に機能する材料を意味する。ドラえもん のヒミツ道具「ごきげんボカボカシール」は、体に貼ると感情のエネルギーを

熱エネルギーに変換できる優秀なバイオアクティブバイオマテリアルと言える。冗談はともかく、組織工学や再生医療では、幹細胞や自己細胞の生理的な機能のコントロールが要求され、それを可能とする場としてバイオアクティブバイオマテリアルが有効となりうる。

バイオアクティブバイオマテリアルは、1990年代に提唱された概念で、生体内外で細胞や組織の生理的機能を能動的に制御するためのバイオマテリアルとして研究されてきた⁽³⁾。その研究開発の基本戦略は、人工材料による生体分子の模倣である。生体機能の恒常性は様々な生体分子によるものであり、特に細胞外環境にフォーカスすると、タンパク質がその中心的な役割を担っている。コラーゲンなどの細胞外マトリクス(ECM)とサイトカインやケモカインなどの増殖因子は、細胞の分化、増殖や遊走、生体組織の再生を緻密に制御しており、バイオアクティブバイオマテリアルに最も要求される機能を備えた生体分子である。しかし、ECMおよび増殖因子が織りなす多様な機能やナノ構造を、人工的に完全に模倣することは困難である。タンパク質の生理的機能は、全アミノ酸が関与している訳ではなく、数個のアミノ酸配列でなる活性部位によって発現している。既に、多くのECMタンパク質から細胞の接着や増殖に関与する活性アミノ酸配列が同定されており、ペプチドとして化学的に修飾することで人工材料のバイオアクティブ化に利用されている(表1)。ペプチドを使う利点は、合成が比較的容易であることに加えて、動物由来材料(例えば、ブタ由来のコラーゲンなど)の利用を回避することで生物学的な危険性を排除できることである。本稿では、このようなペプチドを使ったバイオアクティブバイオマテリアルについて紹介する。

(1) バイオアクティブな人工材料

従来の人工材料でなるバイオマテリアルは、基本的に能動的かつ特異的に生理的機能を発現しない。人工

血管素材である延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)上に血栓が付着しにくいのは、ePTFEの非特異的なタンパク質吸着性が極めて低いことによるもので、血栓を溶かす(線溶)するような能動的な生理活性によるものではない。切り傷を縫合した際の抜糸を思い出してもらおうと、人工材料には細胞や組織が接着しにくいことが想像できるであろう。人工材料を組織工学の足場として利用するには、細胞を接着する特性(細胞接着性)が必須であることは言うまでもない。そのため、細胞膜上のインテグリンと特異的に相互作用するフィブロネクチン由来 Arg-Gly-Asp(RGD)ペプチドの固定化によって、人工材料の表面に細胞接着性を付与する研究が広くなされてきた⁽⁴⁾。

筆者らは、生体分解吸収性のポリ乳酸上にペプチドを固定化した、末梢神経再生誘導チューブの研究を進めてきた。ポリ乳酸は、生体内に埋入されると乳酸に加水分解され、その後代謝される生体分解吸収性の脂肪族ポリエステルである。加工性にも優れており、外科用の縫合糸や骨固定材として臨床で利用されている。ポリ乳酸でなるチューブを、外科的接合の困難な重篤な末梢神経欠損部に移植される自家神経の代わりとして使おうという試みである。しかし、ポリ乳酸は生理的機能を持たないため、そのチューブを移植しても神経は再生されない。末梢神経の再生機序には不明な点も多いが、軸索が伸長し、その周囲をシュワン細胞でなるミエリン鞘によって覆われることで、有髄神経が再生されると考えられている。この軸索が伸長する過程において、ECMタンパク質の一種であるラミニンが高発現していることも知られている。そこで、筆者らは神経誘導チューブへの応用を志向し、Nomizuらによって同定されたラミニン α 鎖由来のAG73(Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr)⁽⁵⁾のポリ乳酸表面への固定化を検討した。ポリ乳酸は反応性官能基を持たないため、何らかの化学的な処理によってペプチドを固定化している研究報告が多い。しかし、それではポリ乳酸やペプチドの物

表1 細胞接着性アミノ酸配列の例

アミノ酸配列 (一文字表記)	起源	機能
RGD	フィブロネクチン、ビトロネクチン	細胞接着
REDV	フィブロネクチン	血管内皮細胞の接着
LDV	フィブロネクチン	血管内皮細胞の接着
YIGSR	ラミニン	細胞接着
LRAHAVDVNG	N-カドヘリン	細胞-細胞間の接着
KRSR	ヘパリン結合ドメイン	骨芽細胞の接着
GFOGER	コラーゲン	細胞接着
WRTQIDSPLNGK	VCAM-1	血管内皮細胞の接着

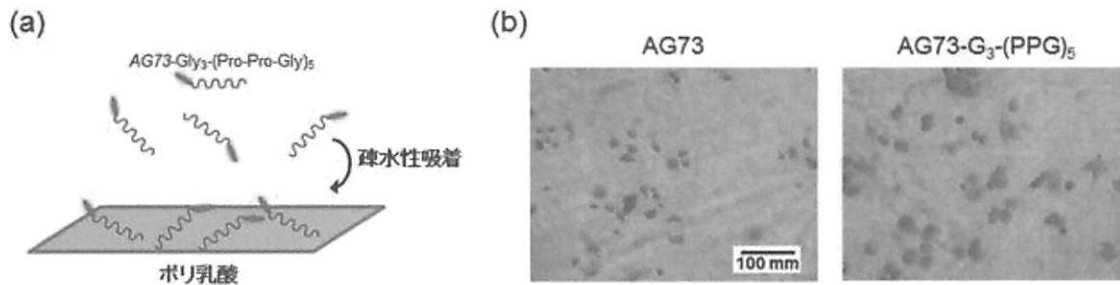


図1 疎水性リンカーを利用したポリ乳酸フィルムへのペプチドの吸着固定
 (a) AG73-Gly₃-(Pro-Pro-Gly)₅ の吸着現象
 (b) AG73-Gly₃-(Pro-Pro-Gly)₅ 吸着ポリ乳酸フィルム上での PC12 細胞の挙動

性や生理活性を損ないかねない。そこで著者らは、2つの方法を検討した。1つは、疎水性のコラーゲン様繰り返しアミノ酸配列 ((Pro-Pro-Gly)₅) を吸着リンカーとした方法である⁽⁶⁾。ポリ L-乳酸 (PLLA) の表面は疎水性であるため、疎水性分子は吸着する。AG73-Gly₃-(Pro-Pro-Gly)₅ というペプチドを Fmoc 固相法で合成し、PLLA 上に AG73 を吸着固定することを試みた (図 1 (a))。PLLA フィルム上に AG73 ペプチドもしくは AG73-G₃-(PPG)₅ を吸着させ、純水もしくは 1.0M 塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。フィルム上に神経幹細胞のモデル細胞としてラット副腎褐色細胞腫 (PC12細胞) を播種し、接着数および神経突起数を評価したところ、AG73-G₃-(PPG)₅ を吸着させた界面ではいずれで洗浄したフィルム上でも PC12

細胞の接着数および突起伸長性が大きかった (図 1 (b))。つまり、AG73-G₃-(PPG)₅ は AG73 のみと比較して、PLLA フィルム上に強固に吸着することが分かった。しかし、その活性の差は顕著ではない上に、物理的吸着では生体内で長期間安定に維持することは困難と予測される。

そこで2つ目のアプローチとして、筆者らはオリゴ D-乳酸 /AG73 結合体 (ODLA-AG73) をプローブとした PLLA マイクロファイバーの生理的機能化を検討した⁽⁷⁾⁻⁽⁸⁾。この方法は、ODLA-AG73 と PLLA とを混合し、急速に脱溶媒することによって均一なステレオコンプレックスを形成させることで、結果として PLLA マイクロファイバー上に AG73 を固定化するのである (図 2 (a))。Fmoc 固相法で AG73 を逐次伸

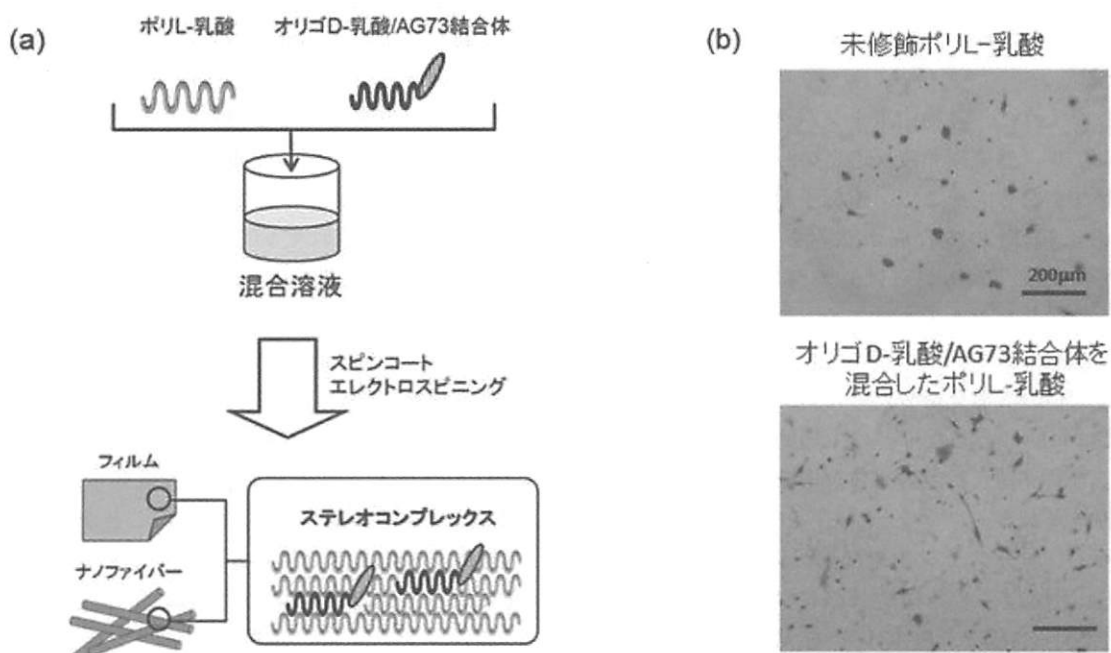


図2 オリゴ D-乳酸 /AG73 結合体によるポリ乳酸へのペプチドの固定
 (a) オリゴ D-乳酸 /AG73 結合体とポリ乳酸の相互作用
 (b) オリゴ D-乳酸 /AG73 結合体を混合したポリ L-乳酸フィルム上での PC12 細胞の挙動

長後、あらかじめ脱水縮合したODLA（分子量700～1750）を樹脂上で縮合させてODLA-AG73を得た。PLLAとODLA-AG73を質量比97：3で混合して10%-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液とし、フィルムやマイクロファイバー（電解紡糸法）を作製した。その上にPC12細胞を播種し、接着性および神経突起伸長活性を評価したところ、ODLA-AG73を混合することによってPC12細胞の接着および突起伸長が亢進された（図2（b））。前述した物理吸着による方法と比較して、未修飾PLLAとの差は明確であり、安定かつ充分量のペプチドが導入されていることが推察された。さらに、ODLA-AG73混合PLLAマイクロファイバー神経誘導チューブを作製し、ラットの坐骨神経欠損（10mm）に移植したところ、24週後にはチューブの一部は分解されており、チューブ内部でGFAP（glial fibrillary acidic protein）およびニューロフィラメント陽性の機能神経組織の再生が認められた。

ECMタンパク質と同様に、増殖因子の活性アミノ酸配列も多く同定されており、バイオマテリアルへの複合化も検討されている⁽⁹⁾。しかし、組織工学に有用な機能を持つ線維芽細胞増殖因子や血管内皮細胞増殖因子などは、細胞側のレセプターの二量化が下流シグナルの活性化に必須であり、活性アミノ酸配列のみではアンタゴニストとして機能してしまう場合が多い。そのため、ECMタンパク質由来の活性アミノ酸配列と比較して、バイオマテリアルへの応用研究は立ち遅れているのが現状である。

(2) バイオアクティブな人工タンパク質やポリペプチド

前述したように、動物由来タンパク質そのものの利用は、ウイルス感染や免疫反応といった生物学的な危険性が懸念される。そこで、遺伝子組み換え技術を利用した人工ECMの生合成が試みられてきた。D.W. Urry⁽¹⁰⁾やD.A. Tirell⁽¹¹⁾らは、エラスチンの繰り返し配列を骨格とした人工エラスチンの生合成に成功している。動物由来タンパク質の生理的機能は単一ではない（複数種の機能を持つ）のに対し、このような人工ECMは目的に応じた単一の生理的機能を組み込むことができ、移植した際の生体反応をコントロールしやすい特長がある。

筆者らも、エラスチン由来配列（Val-Pro-Gly-Ile-Gly）を30回反復させた構造骨格にAG73を組み込んだ人工ECM（AG73(VPGIG)₃₀）を大腸菌発現系で生合成する方法を確立した⁽¹²⁾。AG73(VPGIG)₃₀は、トロポエラスチンに特徴的な温度上昇によるコアセルベーション（凝集）するため、生理的環境下では溶解

しない。この凝集性を利用したPLLAフィルム上へのAG73(VPGIG)₃₀の吸着固定を検討した。冷却したAG73(VPGIG)₃₀水溶液にPLLAフィルムを浸漬後、37℃に昇温することで誘発されるAG73(VPGIG)₃₀の不溶化を利用してPLLAフィルム上に吸着させたところ、その表面でPC12細胞の接着および突起伸長が促進された。また、AG73(VPGIG)₃₀とPLLAとの混合溶液を電界紡糸したところ、相分離を起こすことなく均一に混合されたマイクロファイバーを作製することができた。AG73(VPGIG)₃₀混合PLLAマイクロファイバー上では、未混合のPLLAマイクロファイバーよりも顕著にPC12細胞の接着および突起伸長が促進された。この2つの方法によって機能化されたPLLAマイクロファイバー神経誘導チューブが、僅かながらに末梢神経再生を促進することもウサギを用いた*in vivo*実験で確認している。

バイオアクティブな人工ECMを設計する上で、分子量の大きな人工タンパク質は必須ではない。Zhangらのβ-sheet型自己凝集ハイドロゲル⁽¹³⁾は、正負両電荷をもったβシート形成性ペプチドの凝集性を利用したもので、ペプチド末端に生理活性アミノ酸配列を導入できる。このペプチドは、わずか1%の濃度で数kPa程度の高弾性ハイドロゲルを形成することから、生理的機能を基材に付与するプローブとしてではなく、バルク材料としても有効である。

(3) バイオアクティブな生体由来材料

バイオアクティブバイオマテリアルの基本戦略は、人工材料による生体分子の模倣であると前述した。大変な実験をして模倣するくらいなら、最初から生体由来分子や材料をそのまま使えばいいだろうと発想する方も居ると思う。その究極が臓器移植だが、ドナーや免疫の問題は容易に解決できるものではない。そこで近年多く研究されているのが、脱細胞化組織である⁽¹⁴⁾。脱細胞化組織とは、動物由来の臓器や組織から界面活性剤などによって細胞成分が取り除かれたECMテンプレートである（図3）。心臓弁膜症などの弁置換術に用いられている生体弁は、ウシ心膜もしくは心臓弁の脱細胞化組織である。生体弁は、耐久性はパイロライトカーボン製の機械弁よりも劣るものの、抗血栓性に極めて優れていることから、その利用も拡大しつつある。生体弁は徐々に分解もしくは石灰化によって硬化するが、それらは生体弁の細胞接着・浸潤性が乏しく自己組織と一体化できないことによる。ここで有効となる方法が、ペプチドによるバイオアクティブ化である。

A. Mahara, T. Yamaokaらは、脱細胞化ダチョウ

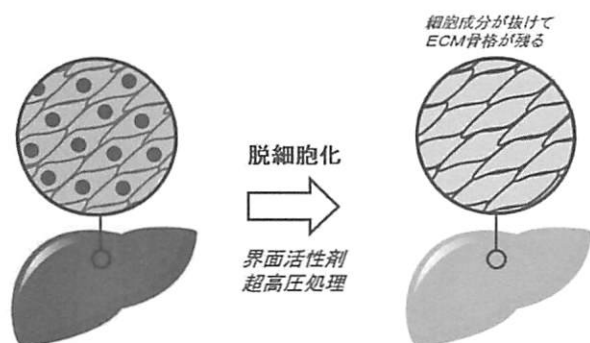


図3 脱細胞化組織

頸動脈に血管内皮細胞接着性ペプチドを固定化することによって、これまで不可能とされてきた4 mm以下の小口径人工血管の開発に成功している⁽¹⁵⁾。ダチョウ頸動脈が、長くかつ分岐がないという特徴を活かしたもので、超高压処理によって脱細胞化したダチョウ頸動脈（内径2 mm、長さ20cm）の内腔に、コラーゲン様配列とフィブロネクチン由来血管内皮細胞接着性配列とを組み合わせたペプチド（(Pro-Hyp-Gly)₇-Gly₃-Arg-Glu-Asp-Val）を脱細胞化組織中のコラーゲン線維と相互作用させることで固定化した。それをブタ大腿動脈へバイパス移植したところ、未修飾のものは早期に閉塞したのに対して、ペプチドを固定化したものは20日間にわたって開通していた。脱細胞化組織という生体組織に最も近いプラットフォームをバイオアクティブ化することで、非常に理想的な組織再生のための足場を作製できることを示した新しい知見と言える。

さらに近年は、ハーバード大学のH.C. Ottらの研究グループで、ラットの心臓⁽¹⁶⁾、肺⁽¹⁷⁾、膵臓や腎臓⁽¹⁸⁾を丸ごと脱細胞化処理し、その後、心筋、血管内皮や上皮細胞などを残存する血管網に還流培養することで、細胞が再配置されて組織の機能が再生することが示された。これらの結果も脱細胞化組織の大きな可能性を示すものであり、バイオアクティブ化技術を組み合わせることで相乗的な発展が期待される。

4. おわりに

バイオアクティブバイオマテリアルを、生理活性ペプチドにフォーカスを当てて紹介した。細胞移植治療の臨床試験が進み、再生医療研究の対象が組織欠損部の修復から大型臓器の再生（作製）にステージアップした時、バイオアクティブバイオマテリアルの細胞機

能をコントロールする足場としての本領が求められるであろう。バイオアクティビティ（生理活性）とバイオマテリアルの性能を相乗的に発揮できる技術と方法論を確立できるかどうか、組織工学・再生医療の将来を決めると言っても過言ではない。

本稿で紹介した研究の遂行に際し、御指導ならび御協力頂きました国立循環器病研究センター研究所生体医工学部の山岡哲二部長ならび馬原淳室長に深く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Langer, R. et al., Science 260, 920-926 (1993).
- (2) Cao, Y. et al., Plast. Reconstr. Surg. 100, 297-302 (1997).
- (3) Hubbell, J.A. Cur. Opi. Biotechnol. 10, 123-129 (1999).
- (4) Brandley BK et al., Develop. Biol. 135, 74-86 (1989).
- (5) Weeks, BS. et al., Exp. Cell Res. 243, 375-382 (1998).
- (6) Kakinoki, S et al., Acta Biomaterialia 6, 1925-1930 (2010).
- (7) Yamaoka, T et al., In Proceedings of International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, HI, USA, 15-20 December 2005; Program No. 482.
- (8) Kakinoki, S et al., Polymers 3, 820-832 (2011).
- (9) Leslie-Barbick, JE et al., Biomaterials 32, 5782-5789 (2011).
- (10) Urry, DW. et al., J. Protein Chem. 3, 403-436 (1984).
- (11) Creel, HS et al., Macromolecules 24, 1213-1214 (1991).
- (12) Kakinoki, S. et al., J. Mater. Chem. B 31, 5061-5067 (2014).
- (13) Kisiday, J et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9996-10001 (2002).
- (14) Crapo, PM et al., Biomaterials 32, 3233-3243 (2011).
- (15) Mahara A et al., Biomaterials 58, 54-62 (2015).
- (16) Ott, HC et al., Nat. Med. 14, 213-221 (2008).
- (17) Ott, HC et al., Nat. Med. 16, 927-933 (2010).
- (18) Song JJ et al., Nat. Med. 19, 646-651 (2013).