

Green博士の再生医療

井家 益和

Howard Green博士は、1925年9月生まれ、日本なら大正14年生まれの88歳である(図1)。彼はHarvard Medical SchoolのCell Biology部門の教授であり、Gordon講堂に向かって右側にある研究棟の見晴らしの良い最上階角部屋に教授室を構える。Harvard大学の中でも数少ない永年教授のひとりである。米寿は日本では数え年が一般的だが、米国在住だからと無理矢理な理由をつけ、満88歳となる9月にお祝いをした。「米」と「88」のKanji anagramの説明には多少の興味を示したものの、USAを米国と略称する下りは蛇足だったかもしれない。ちなみに、野球のある日は道路が混むため、Boston Red Soxにはまったく興味がないとのこと。

Green博士は、再生医療の父である。

今から約40年も遡る1970年代、彼はMIT時代に若きRheinwaldとともにヒト表皮細胞の培養に成功した^{1,2)}。その後Harvard大学に移り、重症熱傷患者の皮膚から分離した表皮細胞を培養して細胞シートを作製し、その患者に移植した臨床成果を1981年に報告した³⁾。これが組織工学の手法を用いた再生医療による治療の世界初の症例である。この移植用の患者由来の表皮細胞シートがGreen型自家培養表皮であり、1988年には米国で「Epicel[®]」として製品化された。組織工学が提唱されたのが1993年⁴⁾、再生医療という用語が登場したのが1990年代後半と言われる。しかし、組織工学による再生医療は、その遙か以前から実現していたのである。



図1. Green博士(左)と筆者(教授室にて)

日本では、われわれが製品化したGreen型自家培養表皮が国内初の再生医療製品として2007年に薬事承認された⁵⁾。この製品「ジェイス[®]」は世界から約20年遅れて登場したものの、2009年からは保険収載されており、公的保険制度で広く使用できる世界でも稀有な製品である。

1990年代に入ると皮膚に関連した再生医療が大きく発展し、表皮細胞だけではなく線維芽細胞や足場材料を用いた製品が次々と開発された。表皮細胞における幹細胞の概念や、線維芽細胞を培養する足場材料の研究から、再生医療全体の技術基盤が形成されたと考えて差し支えない。世界の再生医療は、Green型培養表皮の臨床使用を軸に、皮膚から始まり発展したのである。

本稿では、Green博士が人類にもたらした再生医療の基本技術である培養表皮の理解を深めたい。

分野と定義

最初に、組織工学や再生医療の概念を明確にしたい。

組織工学とは「生命機能の再生、維持、修復を可能にする臓器・組織の代替品を開発することを目的とした工学・生物学・医学の学際的な研究分野」と、提唱者のLangerとVacantiが明確に定義している⁴⁾。一方、再生医療は「機能障害や機能不全に陥った組織や臓器を組織工学的手法により再生させる医療技術」と、一般的に理解されている。しかし、その定義は厳密ではなく、組織再生を促す増殖因子などの生理活性物質や、組織再生のための細胞の足場を提供する生分解性材料も広義の再生医療に含めることがある。

本邦では、再生医療に関するガイドラインとして「ヒト細胞加工医薬品などの品質及び安全性の確保に関する指針」が2012年9月に示された⁶⁾。その中でヒト細胞・組織の加工とは「疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化などを目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組合せ又は遺伝子工学的改変など」と定義されている。ヒト細胞・組織を用いることが前提であり、「組織の分離、組織の細切、細胞の分離、

特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、γ線などによる滅菌、冷凍、解凍など」は加工には含まれない。

細胞は生体の構造と機能の基本単位である。その細胞がパターン化して集合した構造体が組織であり、比較的単純な機能を有する。臓器は複数の組織から構成され、総合的な機能を担う。

これらのことから、再生医療は「組織工学を基礎として、ヒトの細胞や組織を加工することにより作り上げた機能的な細胞や組織・臓器を用いて、治療や修復・再建を行う医療技術」と定義したい。

構造と機能

皮膚の再生医療を理解するために、皮膚の構造と機能を解説する。

宇宙空間では、生命維持のために全身を覆う宇宙服が必要である。それと同様に地球上では皮膚が必要であり、ヒトの体表全面を例外なく覆っている。外傷や熱傷によって皮膚が広範囲に欠損すると、体温維持や水分保持といった生体のホメオスタシスに重大な支障をきたす上、敗血症などの感染症によって生命予後が不良となる。

皮膚は、0.2 mm程度の薄い最外層を形成する「表皮」、線維芽細胞が産生する弾性繊維からなり毛細血管や神経終末が存在する「真皮」、および脂肪細胞を含む「脂肪組織」の3層からなる。表皮には血管はなく、真皮上部まで侵入している毛細血管から酸素や栄養が拡散によって供給されている。また、皮膚には毛包や脂腺・汗腺といった付属器があり、真皮から表皮に突き抜けている。

表皮が欠損し、真皮の血管が露出して出血に至ると「創」になる。誰もが自らの皮膚の速やかな治癒能力を

経験している通り、創が発生すると直ちに修復され創閉鎖に至る。その過程が「創傷治癒」であり、治癒速度は表皮を構成する表皮細胞の増殖能力に依存する。表皮細胞の増殖は、表皮幹細胞から分裂した娘細胞である transient amplifying cell (以下TA細胞)が原動力である。表皮も何層かに区別され、表皮と真皮を隔てる基底膜上の基底層でTA細胞が分裂・増殖し、有棘層から顆粒層、角質層へと体外に向かって移動する(図2)。角質層では、最終分化として脱核とケラチン線維を内包する「角化」が起こり、物理的・化学的に強固な殻を形成する。角質層は最終的に垢として体外に落屑するが、基底層から角質層に至る表皮細胞の代謝回転(以下turn over)が30~45日間である。表皮細胞は「表皮角化細胞」の用語が正確であるが、角化した細胞を角化細胞と呼ぶこともあるため、細胞増殖を維持した未分化な細胞が重要である培養表皮では、表皮細胞と表記する。

表皮幹細胞は分化方向が決まった体性幹細胞であり、毛包bulge領域から表皮基底層に供給される経路が知られている⁷⁾。近年、表皮幹細胞の中でも、バルジ領域に近い毛包脂腺附着部に存在するネスチン陽性細胞が多分化能を有する報告もあり大変興味深い⁸⁾。

したがって、真皮と毛包下部が残存しているような浅い皮膚欠損創の場合には、保存的治療を行っても毛包から供給される表皮幹細胞によって速やかに創閉鎖して治癒に至る。しかし、真皮深部から脂肪や筋膜にまで及ぶ深い皮膚欠損創の場合には、毛包が残存しないため周囲からの治癒を待つしかない。周囲からの治癒伸展を待たない程に広い面積の創では、自身の皮膚を薄く採取して移植する自家植皮による皮膚再建が試みられる。さらに創が広範囲にわたる場合、自家植皮のために採取できる健全皮膚が不足するため、十分に再建できず死に至ることも少なくない。そのような場合にGreen型培養表皮を用いると、数cm²の皮膚小片から全身を覆う面積の細胞シートを提供することが可能であり、患者の救命が期待できる。

製品と分類

皮膚の創閉鎖を目指す医療材料は数多くあるため、その分類や用語に関して混同して用いられることが少なくない。以下に解説する。

創傷治癒を目的とする医療用具には、皮膚の機能を再現するために用いる「代用皮膚(skin substitute)」がある。代用皮膚には、創の保護や感染防止などを目的とした「創

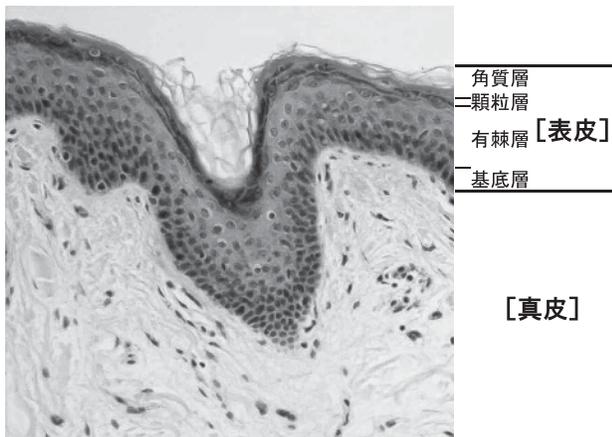


図2. 皮膚の構造(組織学像)

傷被覆材 (wound dressing)」と、積極的な皮膚の再生を目指す「人工皮膚 (artificial skin)」がある。人工皮膚は細胞の有無によって「組織構築誘導型テンプレート (tissue reorganization template)」と、「培養皮膚 (cultured skin)」に分けられる。組織構築誘導型テンプレートには、細胞増殖の足場となるコラーゲンのみから構成される「人工真皮 (artificial dermis)」と、屍体皮膚を無細胞化した「同種真皮マトリックス (acellular dermal matrix)」があり、いずれもヒト細胞は使用していない。

培養皮膚は、ヒト細胞が培養され組み込まれており、表皮細胞をシート化した「培養表皮 (cultured epidermis)」、線維芽細胞を足場材料に培養した「培養真皮 (cultured dermis)」、表皮細胞と線維芽細胞の両方を足場材料に培養した「複合型培養皮膚 (cultured composite skin)」の3つに分類される。さらに、それぞれに対して患者自身の細胞を組み込む自家移植 (autograft) と、他人の細胞を培養する同種移植 (allograft) が想定できる。

Green博士が最初に臨床使用したのは自家培養表皮 (autologous cultured epidermis) であり、それ以外にも世界中でさまざまな人工皮膚が製品開発されている^{9,10)}。

製法と特性

ヒト表皮細胞の培養を可能にしたGreen法は、3T3細胞を支持細胞層 (以下 feeder layer; 成長因子や接着分子を供給することにより目的細胞の増殖促進や分化調整を行うために共培養させる細胞) として用いてウシ胎児血清含有培地で培養することが特徴である。

Green博士の初期の業績の一つに、Todaroとともに1960年代に報告した3T3細胞の樹立がある¹¹⁾。マウス胚から分離した細胞を 3×10^5 個で播種して3日ごとに継代する培養法から3T3 (3 days, transfer, inoculum 3×10^5

cells/50 mm dish) 細胞と名づけられた。この細胞は線維芽細胞の特徴を有し、短期間で継代を繰り返して適当な細胞密度を維持することにより、正常な性質や機能を維持しながら、ほぼ無限に分裂することができる株化細胞である。細胞生物学の研究者なら馴染みであろう。

Green博士は、自身の奇形腫の研究のなかで、放射線を照射した3T3細胞とヒト表皮細胞を共培養すると、ヒト表皮細胞が選択的に増殖することを見いだした。3T3細胞に60 Gyを照射すると、細胞増殖能が剥奪されるが、細胞接着能などの細胞活性は維持され、これが表皮細胞の増殖環境を提供すると考えられている。また、3T3細胞が密接して存在することで、混入するヒト線維芽細胞の増殖が抑制される効果もある。3T3細胞には多くの株が存在するが、feeder layerとしてヒト表皮細胞の培養にもっとも適しているのは3T3-J2という特別な株であり、市販されていない。われわれは、Green博士から直接分譲された3T3-J2細胞の培養中のフラスコを航空機で持ち帰り、日本のガイドラインに従ったマスターセルバンクを構築した。

また、ウシ胎児血清含有培地を用いることで、適切な細胞分化と細胞増殖能が持続することもGreen法の利点である。1990年代にウシ血清の使用を避けるために、いくつかの無血清培地が開発された。それらは表皮細胞の分化や線維芽細胞の増殖を抑制するために、低カルシウム培地であった。しかし、細胞シートを形成させるには細胞を分化させる必要があり、培地のカルシウム濃度を上げたり血清を添加しなければならないが、その途端に細胞増殖が停止してしまう。一方、Green法では、高カルシウム濃度の血清添加培地中でも、表皮細胞の分化の進行と高い細胞増殖能が維持されている。表皮細胞は播種直後から重層化した小さなコロニーを形成し、細胞

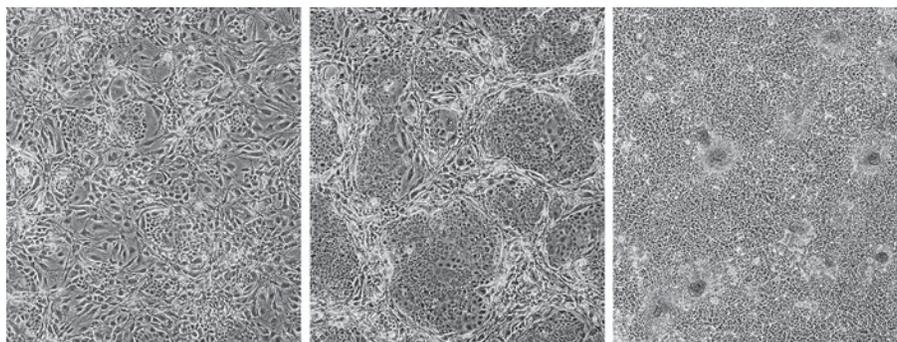


図3. 3T3-J2細胞のfeeder layerの中で増殖する表皮細胞の経過。[小さな表皮細胞のコロニー(左)が拡大し(中)、連結して細胞シートを形成する(右)].

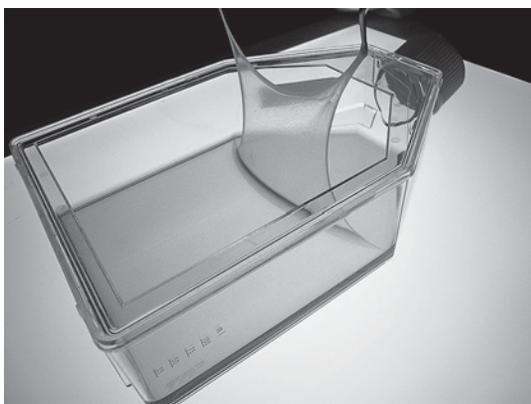


図4. 培養フラスコから剥離した表皮細胞シート

増殖によってコロニーが拡大して連結し1枚の細胞シートが形成される(図3)。これは、培養フラスコの中で創傷治癒過程を再現していると言っても過言ではなく、Green法によって培養中も表皮幹細胞が適切に維持されていることの証明でもある。

さらに血清添加培地中で形成された細胞シートは、表皮細胞間にデスマソーム結合が発達してつながりが強固となる。そして*Bacillus polymyxa*が産生する中性プロテアーゼであるディスパーゼを用いて、フラスコ培養面と表皮細胞の間のヘミデスマソーム結合を選択的に消化することによって、1枚の細胞シートとして剥離することができる。表皮細胞シートは厚さ10数 μm と非常に薄いものの、ピンセットで摘むことが可能な弾力性を備えている(図4)。このような細胞シートが得られれば、ヒトに移植したくなるのも理解できる。

自家と同種

培養表皮の作製において、患者自身の皮膚由来であれば自家培養表皮、他人の皮膚由来であれば同種培養表皮である。自家培養表皮は「生着」を目的とし、同種培養表皮は「治癒促進」を目的とする。以下に解説する。

Green型培養表皮の細胞シートは重層化しており、培養フラスコに接着していた面に細胞増殖が旺盛な基底層が形成されている。基底層の細胞には表皮幹細胞が維持されている。培養表皮の移植では、基底層側を創と密着させるように静置し、通常、縫合しない。創面に接触した表皮幹細胞は増殖を開始し、自家培養表皮であれば、表皮細胞のturn overに従って皮膚を形成し、免疫拒絶されることなく創閉鎖に至る。これが生着である。英語で生着は、接ぎ木する意味もある“take”を用いる。自家

培養表皮は、生着して永久的に自身の皮膚として機能することが、有効性の本質である。

生着して創を閉鎖するのは、重層化した細胞シート全体ではなく、基底層に存在する表皮幹細胞が主体である。自家培養表皮は細胞シート移植というより、幹細胞移植である。したがって、移植する表皮細胞シートは、実際の表皮のように厚く重層化している必要はなく、表皮幹細胞を運搬するキャリアの役割を果たす最低限の厚みでよい。臨床現場から、もっと厚くて扱いやすい本物の皮膚に類似した培養表皮を作製できないかと要望されることもある。実際に、シート化した細胞の培養期間を延長したり、気液界面培養を追加したりすることによって角質層を含む厚めの表皮細胞シートを作製することは可能である。しかしその場合、細胞分化が著しく進行し、表皮幹細胞や細胞増殖能の消失を招くため、臨床的有効性が担保されない。すなわち、自家培養表皮は細胞培養の質がもっとも重要であり、表皮細胞におけるstemness(幹細胞らしさ)を常に意識した適切な培養系を維持する必要がある。

自家培養表皮は生着による皮膚再建が見込めるため、熱傷の治療をはじめ、潰瘍や巨大色素性母斑、瘢痕や刺青への治療効果が報告されている¹²⁻¹⁴。また、患者由来のメラニン細胞も含まれることから尋常性白斑や白皮症の皮膚の色調を改善する治療も試みられている^{15,16}。

一方、同種培養表皮は、他人の細胞であるため生着することはない。重症熱傷患者では受傷直後から免疫寛容の状態が続くことがあり、同種培養表皮でも生着したように見える場合があるが、数か月以内には本人の細胞に置き換わり、移植された細胞は消失する^{17,18}。同種培養表皮の有効性の本質は、表皮細胞が産生するサイトカインなどの生理活性物質による創傷治癒促進作用である。そのため、同種表皮細胞の供給源としては、細胞増殖能や生理活性物質の産生能を期待して新生児皮膚が汎用される。米国では宗教上、男児の割礼が一般的に行われているため、包皮が医療廃棄物として入手できる背景がある。もちろん、商業利用についてのインフォームドコンセントを得ることも可能であり、米国において同種細胞製品の開発が進んでいる理由の一つとなっている。

同種培養表皮は創傷治癒促進効果によって、II度熱傷や瘢痕、採皮創への治療が報告されている¹⁹。われわれのデータでは、症例によって大きな個体差が存在するもののGreen型培養表皮が創傷治癒に関するさまざまなサイトカインを産生することを確認している。同種培養表

皮は、生着することなく生物学的な創傷被覆材 (biological dressing) として機能するのである。

このように自家培養表皮と同種培養表皮は、期待される作用機序はまったく異なっている。仮に培養技術が未熟なために、表皮幹細胞が維持されない自家培養表皮しか作製できない場合には、移植しても生着することはないが、biological dressingとしての創傷治癒効果は発揮される。このことが、研究者の間でも自家培養表皮と同種培養表皮の有効性が混同される原因となっている。

展望と課題

Green博士が1980年代から切り開いた再生医療は、30年を経た今、21世紀の未来医療の旗手として期待されている。わが国でも、再生医療推進法の公布を起点として薬事法改正法や再生医療新法が成立し²⁰⁻²²⁾、再生医療が国策の重点項目として位置づけられている。

最後に強調したいのは、Green博士は歴史的な偉業を成し遂げた人物ではあるが、決して過去の人ではないということである。Green博士には世界中に多くの優秀な弟子がおり、皮膚の再生に留まらず、毛髪や角膜に関する画期的な研究成果を競っている。加えて、皮膚の再生医療は完成していると認識されがちな誤解も正したい。表皮幹細胞の分子生物学的機構は、いまだ十分には解明されたとは言い難い。今後、表皮幹細胞の多分化能を制御することによって、付属器を含む完全な皮膚の再生を目指す研究に挑戦することも意義深い。

Green博士がノーベル賞を受賞する可能性も囁かれているが、残念ながら達成していない。それは博士の業績

があまりに先進的であるため、再生医療が人類の健康に普遍的な貢献を果たすには至っていないからかもしれない。博士には卒寿のお祝いより先にGreat Prizeが相応しいと思うのだが。

文 献

- 1) Rheinwald, J. G. and Green, H.: *Cell*, **6**, 331 (1975).
- 2) Green, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5665 (1979).
- 3) O'Connor, N. E. *et al.*: *Lancet*, **317**, 75 (1981).
- 4) Langer, R. and Vacanti, J. P.: *Science*, **260**, 920 (1993).
- 5) 井家益和：香粧会誌, **34**, 126 (2010).
- 6) 厚生労働省医薬食品局長通知 (薬食発0907第2～6号) 平成24年9月7日。
- 7) Oshima, H. *et al.*: *Cell*, **104**, 233 (2001).
- 8) Amoh, Y. *et al.*: *J. Dermatol.*, **39**, 33 (2012).
- 9) 井家益和, 大須賀俊裕：人工臓器, **32**, 224 (2003).
- 10) 相羽教代, 畠賢一郎：再生医療, **9**, 454 (2010).
- 11) Todaro, G. J. and Green, H.: *J. Cell Biol.*, **17**, 299 (1963).
- 12) Ueda, M. *et al.*: *Mater. Sci. Eng.*, **C6**, 211 (1998).
- 13) Kumagai, N.: *Epithelial Cell Culture Protocols Methods In Molecular Medicine*, **188**, p. 185 (2002).
- 14) Sood, R. *et al.*: *J. Burn Care Res.*, **30**, 576 (2009).
- 15) Guerra, L. *et al.*: *Arch. Dermatol.*, **139**, 1303 (2003).
- 16) Matsuzaki, K. and Kumagai, N.: *Eur. J. Plast. Surg.*, **36**, 651 (2013).
- 17) Burt, A. M. *et al.*: *BMJ*, **298**, 915 (1989).
- 18) Brain, A. *et al.*: *BMJ*, **298**, 917 (1989).
- 19) Yanaga, H. *et al.*: *Burns*, **27**, 689 (2001).
- 20) 平成25年法律第13号：http://kanpou.npb.go.jp/20130510_old/20130510g00097/20130510g000970010f.html
- 21) 平成25年法律第84号：<http://kanpou.npb.go.jp/20131127/20131127g00255/20131127g002550015f.html>
- 22) 平成25年法律第85号：<http://kanpou.npb.go.jp/20131127/20131127g00255/20131127g002550052f.html>