

2 組織培養

竹澤俊明*

2.1 はじめに

組織片の培養技術に起源を発する組織培養は、時代の変遷に伴い器官の培養技術、細胞の培養技術、そして組織あるいは器官を甦らせるための培養技術へと発展してきた¹⁾。広義には細胞培養および器官培養も組織培養に含めて扱う慣習があるのは、この背景が所以である。ここでは、培養技術の発展経緯、および生体内の組織構成細胞と生体外の培養細胞との相違点について概説する。さらに、特に再生医療の基盤技術としても重要な組織あるいは器官を甦らせるための培養技術について、甦らせる手法を「再構築 (reconstruction)」, 「再生 (regeneration)」, および「再構成 (reconstitution)」の3つの異なるカテゴリーに分けて述べる。

2.2 培養技術の発展経緯

組織培養は、1907年に胚発生に興味を抱いていた Harrison が²⁾, カバーガラス上に取り出したカエルの胚組織片に成熟カエルより得た新鮮なリンパ液を滴下して凝固させた後に、スライドガラス上に反転してカバーガラスの周囲をパラフィンで封じることで1週間以上の胚組織片の生存を可能として、凝固リンパ液内に外移植した胚組織片から神経繊維の成長を観察したことに始まる (この実験の成功は、保温する必要のない変温動物を用いたことと、哺乳動物より組織再生能に優れている下等脊椎動物を選択したことにあると考えられる。Harrison が37歳の時の報告であるが、この研究構想には敬服する)^{2~4)}。その後、1910年に Burrows は、Harrison の技術を恒温動物に応用したいと考え鶏胚組織片を凝固血漿内に外移植した後、組織片から間質性細胞の遊走とその増殖を14日間に渡り観察した⁵⁾。

器官培養については、1926年に Strangeways らが鶏胚の肢芽と眼球を培養したことに始まるが^{6,7)}, 1959年に Trowell は成熟ラットの器官は良好であっても約1週間の生存維持が限界と結論づけた⁸⁾。その後、1980年に Krumdieck らが外傷を与えないように器官を等張液中で迅速に再現性よく数百ミクロンの厚さにスライスする装置を開発したことから⁹⁾, 器官、特に肝臓のスライス培養法が薬理学や毒性学の分野に応用された¹⁰⁾。しかし、スライスした器官の内部構成細胞への栄養物質および酸素の供給、あるいは老廃物を含む代謝物の除去に関する拡散効率の改善には限界があり、長時間にわたる培養は依然として難しい。

一方、細胞培養については、マウスのL細胞 (世界で最古の細胞株)^{11,12)} および HeLa 細胞

* Toshiaki Takezawa (独)農業生物資源研究所 遺伝子組換え家畜研究センター 主任研究員

(最古のヒト由来細胞株)¹³⁾の培養手法の確立が基盤となって発展した。具体的には、いずれの細胞株も凝固血漿内に外移植した組織片から遊走した細胞に由来するが、1953年に Scherer らはトリプシンによる HeLa 細胞の継代培養法を確立し¹⁴⁾、1955年に Eagle は透析血清を 15% 添加した合成培養液を用いて L 細胞と HeLa 細胞の成長維持に成功した^{15,16)}。その後、1959年に Eagle が基礎培養液 MEM (minimum essential medium) を完成したことで細胞培養の技術は飛躍的に普及して¹⁷⁾、1960年代には様々な組織から分離された細胞が培養されて多くの細胞株が樹立された。当時、細胞は培養液を注いだ容器の底面上で二次元的に静置培養されたが、1970年前後にはマイクロビーズ担体上に細胞を付着させて攪拌培養する技術¹⁸⁾、および限外濾過膜製ホロファイバー (中空糸) 担体を多数束ねて詰めたカラム型培養容器内で細胞を灌流培養する技術¹⁹⁾が開発されて三次元の高密度細胞培養の幕開けとなり、当初これらの三次元培養技術は生理活性物質を分泌する機能細胞の大量培養に応用された。また、この頃より初代培養細胞の機能や形態を維持するために、細胞を単にガラスやプラスチック上で培養するのではなく、生体内の細胞環境を模倣して細胞外マトリックス成分上で培養する研究が展開した。1986年に Kleinman らは、マウス腫瘍組織の抽出物より基底膜様構造を再構成することに成功して、培養担体に活用した (商品名: マトリゲル)²⁰⁾。このマトリゲルは、細胞の分化機能や形態形成を誘導する培養担体として現在でも広く利用されている。

組織あるいは器官を甦らせるための培養技術については、E. Bell らが 1979年に真皮由来の線維芽細胞をコラーゲンゲル内に三次元的に包埋培養して、細胞の自己組織化によるゲル収縮を誘導することで真皮様組織を再構築する培養技術を確立し²¹⁾、1981年には真皮様組織の上に表皮角化細胞を重層培養することで再構築皮膚を作製することに成功した²²⁾。さらに、1990年前後より細胞外マトリックス成分のみならず生体分解性の合成高分子などのバイオマテリアルも培養細胞より組織を再構築する足場として使用されるようになり、1993年に Langer と Vacanti は培養細胞とその足場から組織を再構築する「組織工学」の学際的研究を提唱した²³⁾。その後 2000年に Takezawa らは、血液を培養液に、また細胞外マトリックスを培養担体に置換する連続的灌流操作で生体内の器官を培養系のオルガノイド (器官様構造体) に変換する「器官工学」の技術を確立した²⁴⁾。

2.3 生体内の組織構成細胞と生体外の培養細胞との相違点

生体内の細胞は、血球や腹水がん細胞などの浮遊細胞 (接着非依存性細胞) のほかは、細胞外マトリックスに接着して多細胞性の組織を構成している接着依存性細胞である。接着依存性細胞は細胞の足場 (scaffold) となる固相分子群に支えられ、栄養の供給と老廃物の除去を担う液相分子群により新陳代謝されて成長が可能となる。つまり、細胞の足場となる固相の役割は、生体

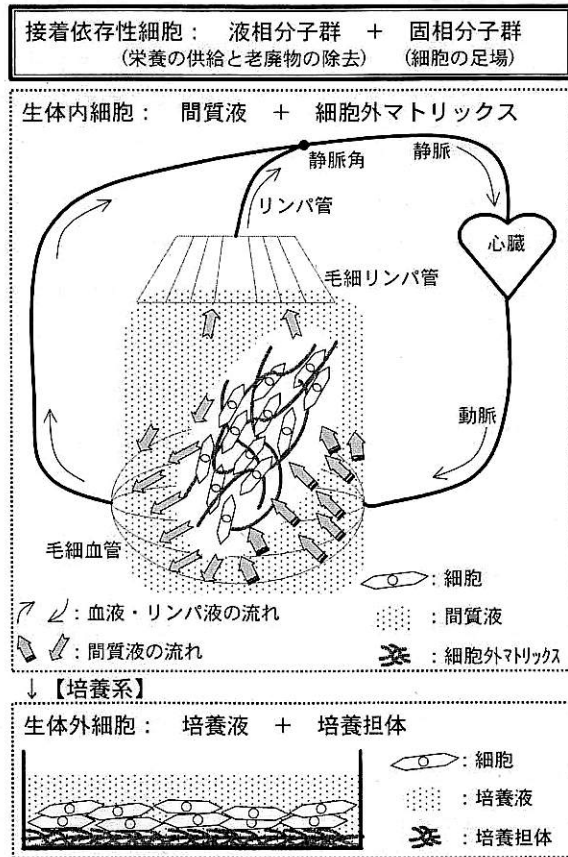


図1 生体内細胞と生体外細胞の相違点

内の組織では細胞外マトリックス，生体外の培養系では培養担体が果たす。一方，栄養を供給して老廃物を除去する液相の役割は，生体内の組織では間質液，生体外の培養系では培養液が果たす。ここで，間質液とは毛細血管壁より漏出した血漿成分で，体組織の細胞を囲む細胞外液である。細胞外液は血管内では血漿と呼ばれ，成人では1日にその約20Lが血管より漏出して間質液になる。その約16~18Lは毛細血管へ再吸収されて血液に戻り，残りの約2~4Lは毛細リンパ管に吸収されてリンパ液（リンパ管内の細胞外液）になってリンパ管を通った後に静脈角より血液中に戻される（図1）。なお，生体内の組織では，幹細胞から成熟分化した組織特異的な機能細胞に至るまでの細胞系譜が絶えず保持されている。一方，生体外の培養系では分化した機能細胞のみならず未分化な幹細胞や前駆細胞を様々な組織から分離して培養する技術が確立されてきたが，細胞系譜を維持し続けられる培養技術は未だ開発されていない。

2.4 再構築の概念に基づいた培養技術

組織を再構築する培養技術の基盤概念は、組織特異的な機能細胞を適当な培養担体上に播種して、目的とする形態と機能を備えた多細胞性集合体を形成するための三次元培養を施すことである。ここで、2種類以上の機能細胞を用いて2種類以上の組織を組み合わせることで、オルガノイドを設計することも可能となる²⁵⁾。機能細胞は組織を構成している大多数の成熟分化した細胞であるので、様々な組織から比較的容易に調製できる。しかしながら、線維芽細胞様の細胞は初代培養後の継代培養による増殖が可能であるが、初代培養した上皮細胞様の細胞は経時的に組織特異的な機能を失う傾向にあって継代培養による増殖は期待できないことが多い。代表的な三次元培養の技術としては、スフェロイド培養法^{26~29)}、ゲル培養法^{20~22,30~32)}、通液培養法^{19,29,33,34)}、生体組織構造を利用した培養法^{35~37)}、および生体分解性の合成高分子の鑄型を利用した培養法^{23,38~40)}が開発されてきた。

2.5 再生の概念に基づいた培養技術

組織を再生する培養技術の基盤概念は、未分化な幹細胞あるいは前駆細胞を適当な培養担体上に播種して機能細胞に分化誘導しながら、目的とする形態と機能を備えた多細胞性集合体を形成するための三次元培養を施すことである。幹細胞は、胞胚の内細胞塊 (inner cell mass ; ICM) より調製できる胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; ES cells) と、成体の各成熟組織より調製できる体性幹細胞 (somatic stem cells) に大別できる。ここで発生学的に考えると、胚性幹細胞は絨毛以外の胎児および成体のあらゆる細胞を産生することが可能な多能性幹細胞である⁴¹⁾。また、代表的な体性幹細胞は、骨髄中の間充織幹細胞 (mesenchymal stem cells ; MSCs) と造血幹細胞 (hematopoietic stem cells ; HSCs) であり結合組織の細胞に分化することが可能である⁴²⁾。しかしながら、最近の研究では、体性幹細胞は所属する成熟組織の生い立ち、すなわち発生学的な内胚葉、中胚葉、あるいは外胚葉の枠組みを超えてほかの胚葉に由来する機能細胞に分化する可塑性 (plasticity) を有することが分かってきた⁴³⁾。また、機能細胞へ分化誘導する幹細胞あるいは前駆細胞のソースとしては、低侵襲で多数調製できる脂肪や皮膚が注目されるようになった^{44,45)}。さらに、上皮間充織変換 (epithelial mesenchymal transition ; EMT) のように分化形質を発現した細胞が全く異なる機能細胞へと分化する分化転換 (transdifferentiation) の現象も注目され始めた⁴⁶⁾。

2.6 再構成の概念に基づいた培養技術

器官をオルガノイドに再構成する培養技術の基盤概念は、器官の全体あるいは一部分に対して、血管内の血液を培養液に、また接着依存性細胞の細胞外マトリックスを培養担体に変換する灌流

操作を行うことで培養バージョンのオルガノイドを作製した後に、引き続きオルガノイドに三次元培養を施すことである。具体的には、ラット肝臓に対して連続的三段階灌流を施すことで、大多数の肝細胞を分離することなく肝臓のオルガノイドを作製できる。肝臓の門脈より、①血液を除去する平衡塩類溶液、②細胞外マトリックスを消化するコラゲナーゼ/ディスパーゼ溶液、③多細胞性構造を再構成して培養液を供給する培養担体となるI型コラーゲン含有培養液を用いて連続的な三段階の灌流操作を施す。その後、灌流した肝臓をラットより摘出して、導入したコラーゲンを完全にゲル化させるために37℃で2時間培養することで、肝臓のオルガノイドは作製できる²⁴⁾。

2.7 おわりに

組織培養の技術は誕生から1世紀が経ち、再生医療の基盤技術として利用できるまでに発展した。細胞は生体内より生体外の培養系に取り出すことで、間質液と細胞外マトリックスを介したホメオスタシス制御から開放されて、培養液と培養担体を介した人工的な刺激により様々な細胞挙動の誘導が可能となる。しかしながら、今日までに細胞系譜を維持できる培養技術は開発されていない。今後、経時的に変化する部域特異的な間質液と細胞外マトリックスを模倣できるような培養液と培養担体は、いかにして開発できるだろうか。将来の組織培養では、細胞系譜を維持できる培養技術を創出することが大きな焦点になると予想される。

文 献

- 1) 関口清俊編, 再生医療のための細胞生物学, コロナ社, p. 183 (印刷中)
- 2) R. G. Harrison, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 4, 140 (1907)
- 3) H. Harris, "The cells of the body: A history of somatic cell genetics", p. 31, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995)
- 4) R. I. Freshney, "Culture of animal cells: a manual of basic technique, Fourth Edition", p. 1, Wiley-Liss (2000)
- 5) M. T. Burrows, *J. Am. Med. Assoc.*, 55, 2057 (1910)
- 6) T. S. P. Strangeways and H. B. Fell, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 99, 340 (1926)
- 7) T. S. P. Strangeways and H. B. Fell, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 100, 273 (1926)
- 8) O. A. Trowell, *Exp. Cell Res.*, 16, 118 (1959)
- 9) C. L. Krumdieck *et al.*, *Anal. Biochem.*, 104, 118 (1980)
- 10) A. R. Parrish *et al.*, *Life Sci.*, 57, 1887 (1995)

- 11) W. R. Earle, *J. Natl. Cancer Inst.*, 3, 555 (1943)
- 12) W. R. Earle, *J. Natl. Cancer Inst.*, 4, 165 (1943)
- 13) G. O. Gey *et al.*, *Cancer Res.*, 12, 264 (1952)
- 14) W. F. Scherer *et al.*, *J. Exp. Med.*, 97, 695 (1953)
- 15) H. Eagle, *J. Biol. Chem.*, 214, 839 (1955)
- 16) H. Eagle, *J. Exp. Med.*, 102, 37 (1955)
- 17) H. Eagle, *Science*, 130, 432 (1959)
- 18) A. L. van Wezel, *Nature*, 216, 64 (1967)
- 19) R. A. Knazek *et al.*, *Science*, 178, 65 (1972)
- 20) H. K. Kleinman *et al.*, *Biochem.*, 25, 312 (1986)
- 21) E. Bell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1274 (1979)
- 22) E. Bell *et al.*, *Science*, 211, 1052 (1981)
- 23) R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920 (1993)
- 24) T. Takezawa *et al.*, *Tissue Eng.*, 6, 641 (2000)
- 25) T. Takezawa, *Biomaterials*, 24, 2267 (2003)
- 26) N. Koide *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 186, 227 (1990)
- 27) T. Takezawa *et al.*, *J. Cell Sci.*, 101, 495 (1992)
- 28) B. R. Unsworth and P. I. Lelkes, *Nature Med.*, 8, 901 (1998)
- 29) K. Nakazawa *et al.*, *Int. J. Artif. Organs*, 25, 51 (2002)
- 30) F. Berthiaume *et al.*, *FASEB J.*, 10, 1471 (1996)
- 31) H. He and T. Matsuda, *Tissue Eng.*, 8, 213 (2002)
- 32) T. Takezawa *et al.*, *Cell Transplant.*, 13, 463 (2004)
- 33) T. Takezawa *et al.*, *Tissue Eng.*, 3, 329 (1997)
- 34) H. D. Humes *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 17, 451 (1999)
- 35) S. A. Livesey *et al.*, *Transplantation*, 60, 1 (1995)
- 36) S. Badylak *et al.*, *Biomaterials*, 20, 2257 (1999)
- 37) T. Takezawa *et al.*, *FASEB J.*, 16, 1847 (2002)
- 38) D. Ferber, *Science*, 284, 422 (1999)
- 39) L. E. Niklason *et al.*, *Science*, 284, 489 (1999)
- 40) F. Oberpenning *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 17, 149 (1999)
- 41) M. J. Evans and M. H. Kaufman, *Nature*, 292, 154 (1981)
- 42) A. I. Caplan and S. P. Bruder, *Trends Mol. Med.*, 7, 259 (2001)
- 43) J. E. Dennis and P. Charbord, *Stem Cells*, 20, 205 (2002)
- 44) A. Joannides *et al.*, *Lancet*, 364, 172 (2004)
- 45) K. Timper *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341, 1135 (2006)
- 46) J. van Tuyn *et al.*, *Stem Cells*, in press (2006)