

特集：免疫の場：リンパ器官の形成・連携・再構築

免疫組織の人工的構築—人工リンパ節構築の試み

渡 邊 武

“Creation and revelation: two different routes to advancement in the biomedical sciences”

—Joseph L. Goldstein (Nature Medicine 13 : 1151, 2007)

近年、免疫学研究は急速な発展を遂げ、多くの特筆すべき成果が次々と発表されてきた。免疫系に関わる膨大な数の反応、細胞、分子が見いだされ、その分子機序が詳細に解析され解明されてきた。今もその勢いは衰えることはなく、さらに発展し続けることは明白である。近年の免疫学研究の発展は、こうした卓越した「発見」revelation (discovery) と「解析」analysis によってもたらされたものである。一方、免疫学分野では感染症に対する優れた「ワクチン」の開発、あるいは近年の「モノクローナル抗体」の作製法の確立と応用など、画期的な「発明」invention もなされてきた。これらの「発明」は医学生物学研究あるいは疾患の予防、治療という臨床医学領域に大きなインパクトを与えたのみならず、免疫学研究そのものの発展にも大きく寄与している。しかし、他の医学生物学領域と比較して、免疫学の領域では creation (invention) という面での研究がまだ充分でないように思われる。生命科学領域では近年「Build life to understand it」(Nature 468 : 889, 2010) という一つの流れがあり、免疫学領域においても「rebuild, alter, and understand」(Michael Reth) という概念のもとに免疫系に新たな機能、可能性を付加する inventive な研究がこれから強く求められるのではと私達は考えている。

はじめに

リンパ節は身体の要所要所に分布しており、リンパ球が抗原提示細胞から抗原情報を受け取り抗原特異的な獲得免疫反応を惹起する場所である。身体の局所に侵入あるいは発生した病原微生物やがん細胞を特異的に認識して免疫反応を誘導し、それらを排除する機能を有する。すなわち、リンパ節は生体を防御する重要な組織である。さらに免疫系は一度その脅威に遭遇するとその抗原を長期にわたって

記憶し、2度目の同じ脅威に対して速やかにかつ強力に二次免疫反応を惹起してそれを排除することが知られているが、この免疫メモリーの形成と二次免疫反応の場の中心がリンパ節などの二次免疫組織である。リンパ節の3次元構造は複雑かつ巧妙に構築されており、しかも反応に応じて細胞動態が時空間的にダイナミックに変化する。

このような二次免疫組織の魅力ある構造あるいはその機能を mimic 出来るような人工の装置を作りたいと考え、筆者らは世界で初めて、自然のリンパ節と類似の構造を持ち、かつ強力な免疫機能を発揮できる移植可能な人工のリンパ節の構築に成功した。我々の試みはまだかなり未熟なものであるが、近い将来、ヒト免疫系の修復、強化、再生など臨床应用到直接的に発展する可能性もあるのではと期待している。そして人工的に再構築されたリンパ節などの免疫組織(臓器)が新たな免疫賦活装置として重症感染症、免疫不全症、がん、あるいは自己免疫病などの治療に応用

京都大学大学院医学研究科 AKプロジェクト (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町)

Synthesis of functional lymphoid tissues—A trial to construct artificial lymph nodes

Takeshi Watanabe (Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

される日がくることを夢みている。また、人工的に再構築された免疫組織はリンパ組織・臓器の分化、構築、機能の解明に新たな研究ツールを提供することが期待される。

1. 二次リンパ組織構造の特徴

リンパ節などの二次免疫組織は高度に組織化された時空間的4次元構造をとることにより、リンパ球が抗原および抗原提示細胞と相互作用して効率良く抗原特異的な免疫反応を惹起することが出来る。その3次元立体構造はB細胞濾胞領域とT細胞領域の明確な分離など複雑かつ巧妙に構築されており、さらにT細胞、B細胞はリンパ節内のそれぞれの領域内を常にかなりの高速で動き回っており、そのことにより、特定のT細胞、B細胞クローンが抗原提示細胞を仲介として出会い免疫反応を効率良く引き起こすことが可能となる。また、免疫反応に応じてリンパ節内の各部位での細胞組成、活性化状態も時空間的にダイナミックに変化する。多くの免疫細胞は常に全身の組織、臓器を循環しており、リンパ球はリンパ節からリンパ管、血液循環を通じて全身を巡り再びリンパ節にもどり、樹状細胞は感染局所からその抗原を担って輸入リンパ管を通じてリンパ節に入ってくる。リンパ節を人工的に再構築する場合、その3次元構造が類似し、かつ強力な二次免疫反応

誘導能を有するだけでなく、これらの時空間的動態もまた再現されなければならない。

2. 二次、三次リンパ組織の形成

われわれの体内で形成される末梢リンパ組織には、胎生期に発生してくるリンパ節、脾臓、腸管パイエル板のような二次リンパ組織¹⁾と、生後に炎症、感染症などに伴って形成される三次リンパ組織がある²⁾。いずれの場合にも、リンパ組織形成を誘導する造血系細胞由来の「インデューサー細胞 (LTi)」とリンパ組織形成の場となるストローマ細胞「オルガナイザー細胞 (LTo)」との相互作用により形成されてくる^{3~6)}。胎生期後期に二次リンパ組織に関わるLToが特定部位の血管周囲あるいはリンパ管系の一定の局所に出現する。造血幹細胞から分化したLTiはケモカインCXCL13に対する受容体CXCR5を発現しており、LToが産生分泌するCXCL13によってLTo周囲に遊走してくる。LTiの存在、機能はヒトにおいても同定されている⁸⁾。LToはその細胞表面にLTβR (リンフォトキシンβ受容体)を発現しており^{7,9)}、LTiが発現しているリンフォトキシン (LTα1β2)によって刺激を受けてCXCL13を分泌しさらにLTiの遊走が引き起こされる。こうしてLToとLTiの細胞塊であるリンパ節原基が形成される (図1、

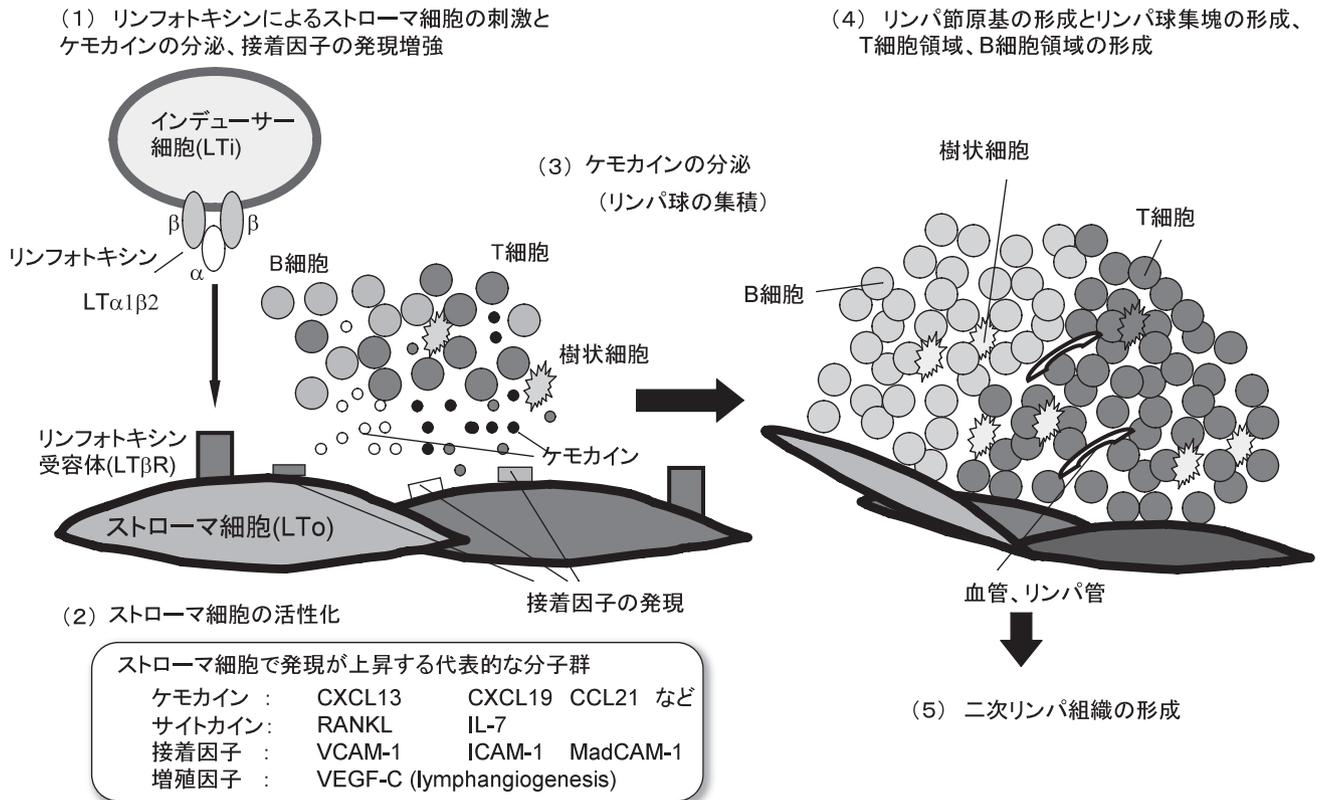


図1 リンフォトキシンとその受容体などを介する、リンパ組織インデューサー (LTi) とリンパ組織ストローマ細胞-オルガナイザー (LTo) の相互作用が二次リンパ節の形成に必要な。

模式図)。さらに LTo はリンフォトキシン (LT α β 2) 刺激によって CCL19, CCL21, CXCL13, CCL12 などのケモカインを分泌し、細胞膜上で VCAM-1, ICAM-1 などの接着因子の発現が高まる^{7,9)}。このことにより、リンパ節原基に T 細胞, B 細胞, 樹状細胞などの免疫細胞が集積してリンパ組織が形成される。また、リンパ組織に特化したストローマ細胞である FDC (follicular dendritic cells), および FRC (fibroblastic reticular cells) のネットワークが形成されてくる。前者は B 細胞濾胞領域に分布しケモカインの分泌あるいは Fc 受容体を介して B 細胞の運動, 活性化 (クラススイッチ), 選択 (親和性の亢進) に重要な役割をはたす。後者は主として T 細胞領域に分布し, CCL19, CCL21 などのケモカインを分泌し, さらに T 細胞の運動と抗原提示細胞との遭遇のためのガイドレールとしても重要な働きをされると考えられている。また, FRC は ER-TR7 抗原陽性の細胞外マトリックスを分泌し中空の管空構造を形成する (conduit)。この中空の細い管の中は抗原分子を含んだリンパ液が流れている (リンパ節の構築についての詳細は本特集の片貝らの総説を参照されたい)。一方, 生後においても, 炎症反応, 感染症などにより造血幹細胞由来の LTi 様の細胞が活性化されると同様の反応で炎症局所に分布する LTo ストローマ細胞が活性化される。また, 炎症などにより局所的リンフォトキシンが産生されると (B 細胞, NK 細胞などはリンフォトキシンを産生する), 局所の LTo 様細胞が活性化される。こうして三次リンパ組織が形成される^{2,10,11)}。

3. リンパ組織再構築の研究

生体内で一次リンパ組織である胸腺組織を再生しようという試みは, マウス胸腺ストローマ細胞¹²⁾あるいはヒト皮膚由来線維芽細胞¹³⁾を生体適合材料である 3 次元マトリックスに吸着させて作製したスキャホールド内で骨髓造血幹細胞から T 細胞を分化させる系で報告されている。しかし, その後, これらの報告は再現されていない。組織工学的手法を用いて脾臓を再生しようという試みはマウス, ラットの系でドイツの Pabst らの研究グループを中心に行われてきた^{14~16)}。脾臓あるいはリンパ節の一部あるいは全体を Syngeneic hosts に移植するとはじめは生着するがやがてネクロシスに陥る。しかし, 胎児あるいは新生児のマウス脾臓を成仔マウスに移植すると正常脾臓様の組織が再生されてくることはすでに 1992 年に報告されている¹⁴⁾。また, 新生児マウスの脾臓の細胞成分をスキャホールド (生体適合性ポリマー) に組み込んで作製した「tissue-engineered spleen (TES)」を成仔マウスに移植することで感染免疫能を発揮出来る白脾臓組織が構築されてくる¹⁶⁾。生後 3 日目のラット腸管からの細胞塊をコラーゲンでコートしたポリグリコール酸繊維のポリマーチューブに詰め込

んで成仔ラットの大網に移植すると小腸構造が再生され, 移植 20 週後に再生腸管周囲に T 細胞, B 細胞, NK 細胞, マクロファージを含む腸管リンパ組織が再生されてくることが報告されている¹⁷⁾。これらの報告は新生児期のリンパ組織の非リンパ球系の細胞群を生体適合性スキャホールドに付着させて移植することで二次リンパ組織を再生出来ることを示している。

4. リンパ節の人工的構築

我々は, 自然の二次リンパ節と同様の組織構造をもち, 効率良く B 細胞, T 細胞, 樹状細胞などの免疫細胞が集積する「人工リンパ節」を作製するため, ストローマ細胞, 3 次元構造骨格 (スキャホールド) としての生体適合性高分子材料, いくつかのサイトカインの組み合わせなどを検討した。そして生体適合性高分子材料を工夫することにより, マウスにおいて, T 細胞と B 細胞が明確に区別される領域 (濾胞 (ろほう) 形成) に分かれた構造を有する, 自然のリンパ節と類似した免疫組織の構築に成功した¹⁸⁾ (図 2)。スキャホールドとしてはコラーゲンスポンジを利用した (現在は他の基材も利用している)。ストローマ細胞としては LT β R (リンフォトキシン β 受容体) を発現しており, リンフォトキシン刺激でリンパ球遊走に関わる種々のケモカインを分泌するとともに VCAM-1 などの接着因子を発現しているマウス胸腺由来の付着性細胞株 (TEL-2 細胞) を用いた。さらに抗原刺激を行う目的で骨髓由来樹状細胞を TEL-2 細胞に加えてコラーゲンスポンジに含ませ, マウスの腎臓皮膜下に移植した。2-3 週間後にコラーゲンスポンジを基盤として二次リンパ節様組織が構築された。

我々が作製した人工リンパ節様組織では, 1) T 細胞や B 細胞と共に樹状細胞も存在する。2) T 細胞領域と B 細胞領域が明確に区別され, 濾胞 (ろほう) が形成されている。3) 抗原刺激により胚中心の存在が認められ, 正常リンパ組織の胚中心 B 細胞同様, 活発に増殖する B 細胞の存在が確認された。4) 抗原刺激により最終分化段階の抗体産生細胞となった B 細胞 (形質細胞) も多数出現する。さらに, 濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell : FDC) も認められ, 形成された B 細胞領域が単なる B 細胞の集合体ではなく, 正常リンパ組織の濾胞と同様の免疫機能を果たす組織構造を保持している。5) 高内皮細静脈 HEV (high endothelial venule) が形成され, 毛細血管網が発達している。6) リンパ組織周囲に毛細リンパ管が形成されてくる。7) リンパ節の構造を支持している 2 種類の細胞ネットワーク, B 細胞濾胞の明領域に存在する濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell, FDC) ネットワークと, T 細胞領域, 髄質に精緻に張り巡らされた線維芽細胞 (fibroblastic reticular cell, FRC) ネットワークが共に形成されて

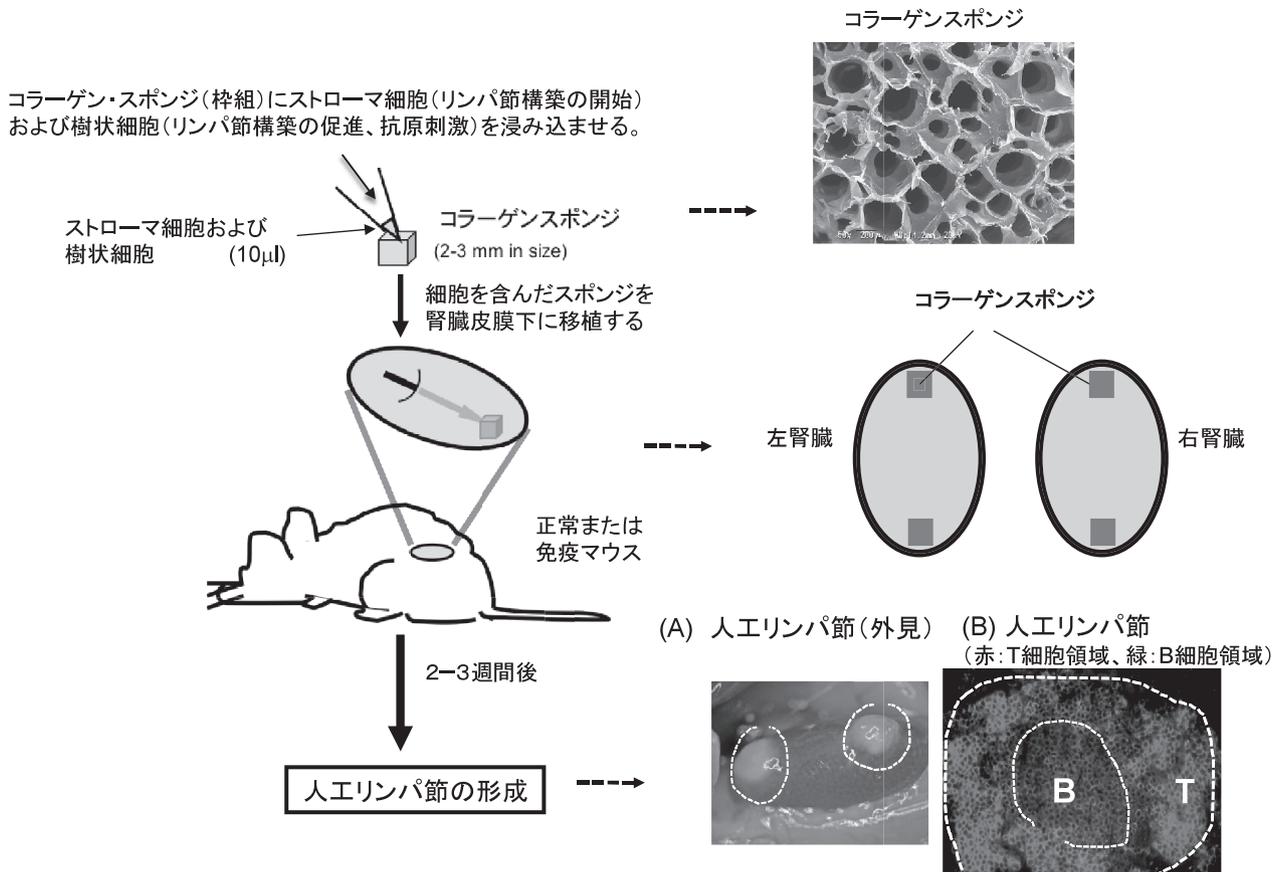


図2 人工リンパ節の構築 (参考文献 18, 19)

2-3mm角のコラーゲンスポンジにストローマ細胞 (TEL-2 細胞) と抗原 (ハプテンを結合させた卵白アルブミン, NP-OVA) をパルスした骨髄由来のマウス樹状細胞とを吸着させる. このコラーゲンスポンジをマウス腎臓皮膜下に移植する. 2-3週間後に人工リンパ節が腎臓皮膜下に形成される (A).

形成された組織はリンパ球の集合体であり, T細胞, B細胞, 樹状細胞, B細胞濾胞内のFDC (濾胞性樹状細胞) など二次リンパ節の細胞群を全てが含まれている. T細胞領域とB細胞濾胞領域は明確に区別されて分布している (B). さらに, HEV (高内皮細胞静脈) をはじめとして血管構造, リンパ管構造も再現されている. 形成された人工リンパ節には, コラーゲンスポンジに最初に吸着させたストローマ細胞, 樹状細胞は含まれていない.

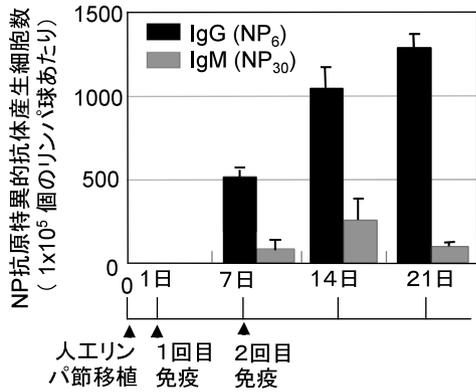
いる. 我々の構築した人工リンパ節ではT細胞, B細胞などの人工リンパ節内への流入に先立って, FRC構造, FDCネットワーク構造が形成されてくることがわかり, リンパ節の構造を支えるこれら二つの重要なネットワークを基盤として免疫細胞の集積とT細胞領域, B細胞濾胞の棲み分けが行われ, 人工リンパ組織が構築されてくると考えられた.

5. 人工リンパ節の免疫機能

人工リンパ節を他の個体に移植し, 抗原刺激すると非常に強い2次免疫反応が人工リンパ節内に誘導された¹⁹⁾. あらかじめ抗原で感作したマウスで作製した人工リンパ節をマウスから取り出し, 抗原非感作の (naïve) マウスに移植し, 同じ抗原で刺激すると速やかに強い二次免疫反応が移植した人工リンパ節内で引き起こされ, 抗原特異的な高親和性のIgGクラスの抗体が大量にnaïveマウスの血清中

に出現してくる (図3-A, 図5-A). また, 同様に作製した人工リンパ節を免疫能力の無い免疫不全 (SCIDマウス) 個体に移植して抗原刺激すると, 正常個体に移植した時よりもさらに10~50倍高い抗原特異的抗体産生が人工リンパ節およびSCIDマウスの脾臓において誘導される (図3-B, 図5-B). これは, 人工リンパ節で活性化されたB細胞の一部が, 免疫細胞が存在しないSCIDマウスの脾臓 (および骨髄, リンパ節) に移動し, そこで抗原刺激を受けて爆発的に増殖した結果と考えられた. このようなSCIDマウスでは抗原特異的で高親和性のIgG抗体が大量に出現してくる¹⁹⁾. このような結果は, 我々の人工リンパ節様組織は, 免疫不全症あるいは重症感染症やがんに対して人工リンパ節内および宿主のリンパ組織において有効かつ強力な免疫反応を引き起こしうることを示唆している. このようなマウスの脾細胞を用いて骨髄腫細胞株と細胞融合を行うと従来法よりもはるかに効率良く沢山の抗原特異

A. 人工リンパ節内の抗原特異的高親和性IgG抗体産生細胞数



B. 人工リンパ節を移植した免疫不全マウスの脾臓での抗原特異的高親和性IgG抗体産生細胞数

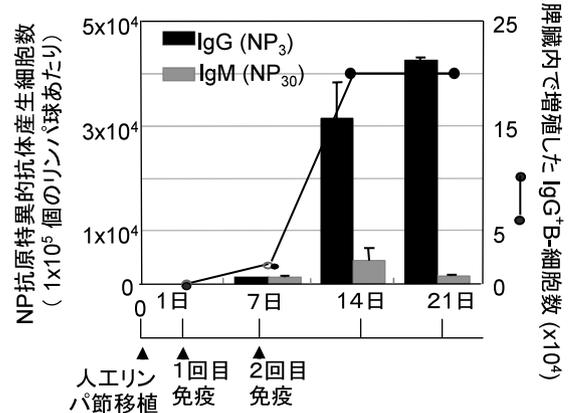
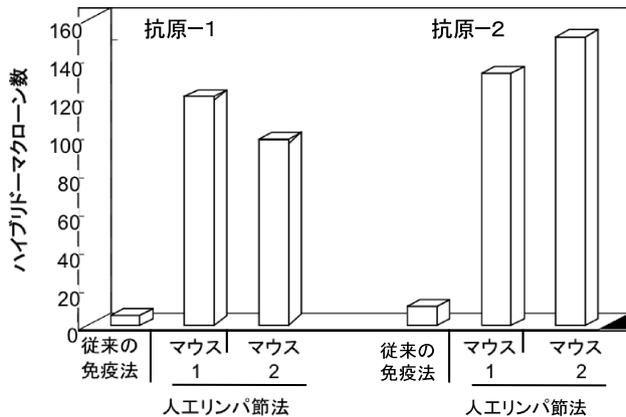


図3 人工リンパ節は抗原特異的に高い免疫反応を誘導する (参考文献 19, 21)

人工リンパ節内には CD4 陽性のエフェクター・ヘルパー T 細胞が選択的に濃縮されてくる。人工リンパ節の構築に用いたレシピエントマウスのリンパ節と比較して非常に高密度にエフェクター・ヘルパー T 細胞 (CD4⁺, CD44^{hi}, CD62L^{lo}) が濃縮されてくる。そのため、人工リンパ節内に抗原特異的な抗体産生細胞が濃縮されてくる。

(A) 人工リンパ節内で効率よく二次免疫反応が誘導されてくる。クラススイッチ, 体細胞突然変異, 親和性の亢進, 抗原に対する高親和性抗体産生性 B 細胞クローンの選択的増殖が 2 回目の抗原刺激後速やかに誘導されてくる。(B) 抗原 (NP-OVA) で感作したマウスで人工リンパ節を作製し, これを免疫不全マウス (SCID マウス) の腎皮膜下に移植する。ついで抗原で 2 回静注にて免疫する。人工リンパ節内のみならず, SCID マウスの脾臓, 骨髄, リンパ節で抗原特異的で IgG クラスの高親和性抗体産生細胞が爆発的に増加する。その結果, 血清中には膨大な量の抗原特異的な IgG クラスの抗体が出現する。

A. 抗原特異的超高親和性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローン数(1個の脾臓を用いた細胞融合当たり)



B. 人工リンパ節法による超高親和性モノクローナル抗体の効率的な産生

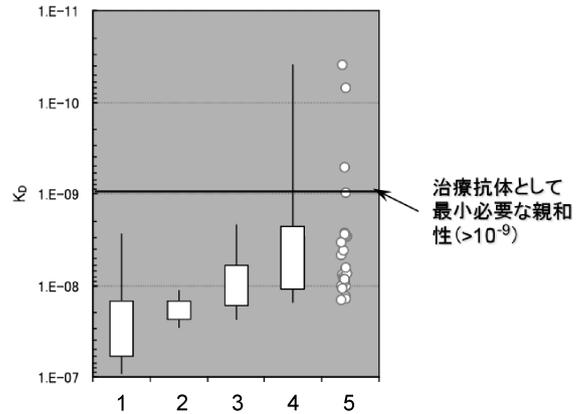


図4 人工リンパ節法を用いると効率良く抗原特異的なモノクローナル産生性ハイブリドーマを確立することができる (参考文献 21)

(A) 人工リンパ節法を用いると, 抗原特異的モノクローナル抗体産生性のハイブリドーマを効率的に得ることが出来る。

(B) 人工リンパ節法を用いることにより超高親和性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を比較的容易に得ることができる。

縦軸は 1-5 の方法で得られた各モノクローナル抗体の抗原親和性を示す。

レーン 1: 抗原 (細胞膜貫通型タンパク抗原) のみを免疫したグループ。

レーン 2: 抗原とアジュバントとともに免疫したグループ。

レーン 3: 抗原をアジュバントとともに長期多数回免疫下グループ。

レーン 4: 人工リンパ節法を用いて作製したグループ。

レーン 5: 人工リンパ節法を用いて得られた各モノクローナル抗体の抗原に対する親和性。

(図4のAおよびBのデータは(株)医学生物学研究所研究開発部の小野健一郎博士, 八木香澄博士との共同研究によるデータである。両博士に感謝申し上げます)。

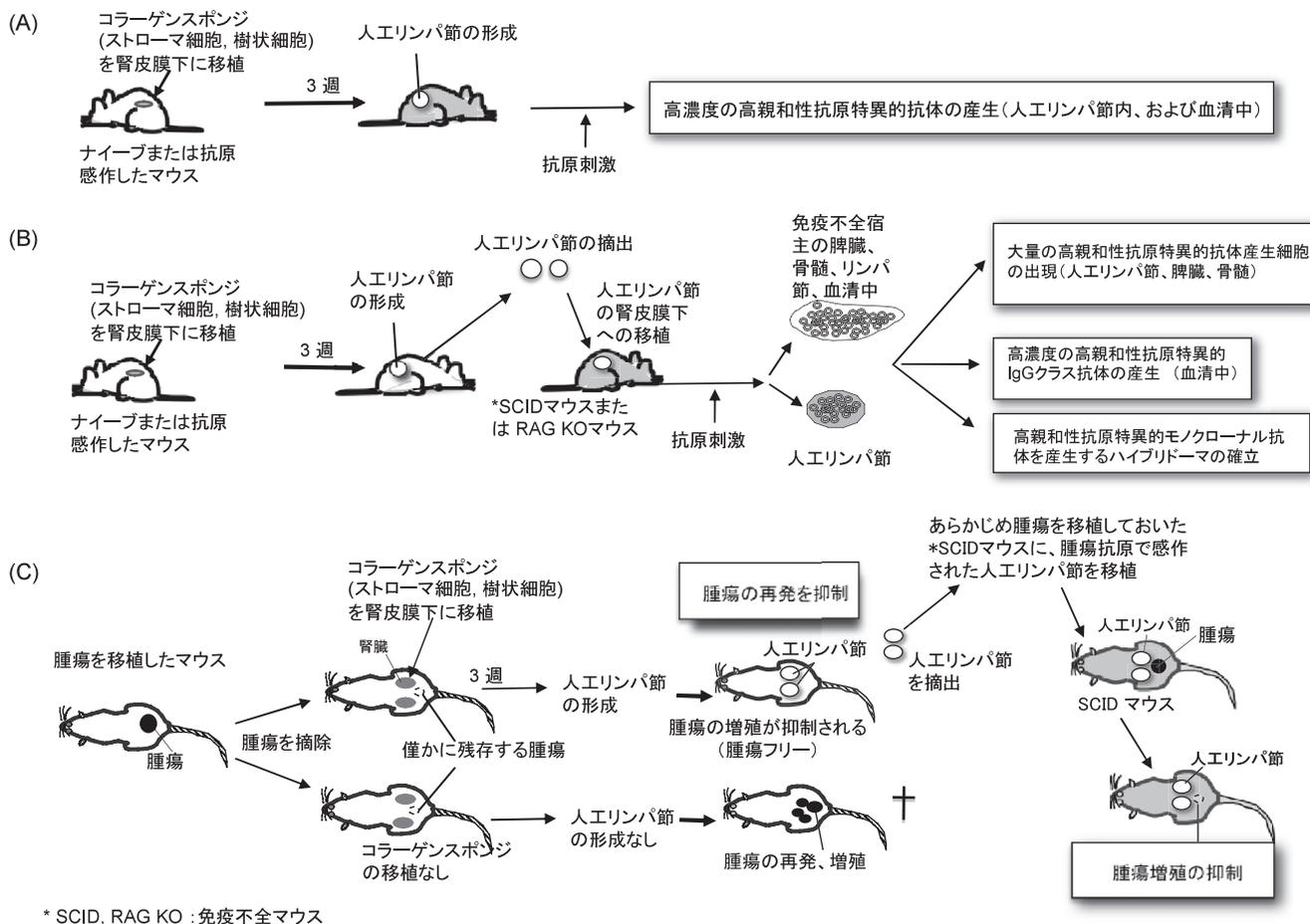


図5 人工リンパ節の形成と応用 (参考文献 21)

- (A) 我々の作製した人工リンパ組織内で強い免疫反応を誘導することが可能であり、また、ナイーブ、免疫不全、あるいは感染症などの他のマウスへの移植が容易に可能である。
- (B) 人工リンパ節を免疫不全マウス (SCIDマウス) に移植して抗原で免疫するとさらに強い免疫反応が誘導される。
- (C) 腫瘍を外科的に摘除したマウスに人工リンパ節を構築すると当該腫瘍にたいする抗腫瘍免疫能を有する人工リンパ組織を得ることが出来る。

的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を得ることが出来る (図4-A)。さらに特筆すべきことは、こうして得られるモノクローナル抗体の親和性が非常に高いことである (図4-B)。抗原特異的で非常に高い親和性のモノクローナル抗体の作製に適した方法と言える。さらに、人工リンパ節の高い免疫反応誘導能は抗体産生のみならず、細胞性免疫でも発揮されることが示唆された。がん細胞を移植した担がんマウスでがんが一定の大きさに達した時にがん組織を可能な限り外科的に除去した後に人工リンパ節を構築すると、人工リンパ節を構築しないマウスではがんの再発が生じるが、人工リンパ節を構築したマウスではしばしばがんの再発が抑制される。このようなマウスから形成された人工リンパ節を取り出し、予めがんを移植した免疫不全 (SCID) マウスにこの人工リンパ節を再移植すると SCID マウスでのがんの増殖が抑制された (図5-C)。このような強い免疫反応の誘導は、我々の作製した人工リンパ節内ではメモリー型 B 細胞、免疫記憶細胞 (メ

モリー細胞) 型のヘルパー T 細胞、あるいは濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{fh}) が選択的に濃縮されてくることと関連があると考えられた。そのため、人工リンパ節では抗原刺激を受けると速やかに強力な二次免疫反応を誘導出来ると考えられる。

6. おわりに

まだ未完成ではあるが生体内で長期に維持され強力な免疫誘導能を有するリンパ節を人工的に構築することに我々は成功した。さらに開発と改良に力をそそぐとともに、将来は人工リンパ装置を試験管内で用いて有用な抗体、サイトカインなどを産生する系も確立していく予定である。また、抗原特異的キラー T 細胞のみに特化したリンパ組織、制御性 T 細胞のみに特化したようなリンパ組織の構築も目指したいと考えている。さらに人工免疫組織を用いて、免疫系細胞の分化、免疫反応の基礎的研究を行える系の確立も我々の目指すところである²⁰⁾。現在は動物種の如何に

関わらず応用しうる装置を開発すべく、ストローマ細胞などの細胞成分を用いないで免疫組織を構築する試みを進めている²¹⁾。種々の異なった免疫機能を発揮できる免疫組織、臓器の人工的再生構築は今後、免疫制御による新しい疾患治療法の開発につながる重要な挑戦であると考えている。

謝辞

本研究は九州大学生体防御医学研究所、理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター、京都大学医学研究科・創薬医学融合拠点（AKプロジェクト）において多くの方々の協力のもとに行ってきたものです。また、(株)医学生物学研究所研究開発部の小野健一郎博士、八木香澄博士には我々の人工リンパ節の応用についてご協力を頂きました。ご協力頂いた皆様に感謝いたします。

本文で紹介した研究は主に文部科学省科学研究費・特定領域研究（課題番号 15078101, 19059015）および理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センターの援助のもとに行ってきたものです。ご援助に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Fu, Y. & Chaplin, D. (1999) *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 399–433.
- 2) Aloisi, F. & Pujol-Borrell, R. (2006) *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 205–217.
- 3) Mebius, R. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 292–303.
- 4) Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., & Ruddle, N.H. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 344–353.
- 5) Randall, T.D., Carragher, D.M., & Rangel-Moreno, J. (2008) *Annu. Rev. Immunol.*, **26**, 627–650.
- 6) Ruddle, N.H. & Akirav, E.M. (2009) *J. Immunol.*, **183**, 2205–2212.
- 7) Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.W., Karin, M., Ware, C.F., & Green, D.R. (2002) *Immunity*, **17**, 525–535.
- 8) Cupedo, T., Crellin, N.K., Papazian, N., Rombouts, E.J., Weijer, K., Grogan, J.L., Fibbe, W.E., Cornelissen, J.J., & Spits, H. (2009) *Nat. Immunol.*, **10**, 66–74.
- 9) Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Goverse, G., Elewaut, D., Dewint, P., Ware, C.F., Hoorweg, K., Kraal, G., & Mebius, R. E. (2009) *J. Immunol.*, **182**, 5439–5445.
- 10) Thauinat, O., Field, A.C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.F., Mandet, C., Belair, M.F., Bruneval, P., Meilhac, O., Bellon, B., Joly, E., Michel, J.B., & Nicoletti, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 14723–14728.
- 11) Peduto, L., Dulauroy, S., Lochner, M., Spath, G.F., Morales, M.A., Cumano, A., & Eberl, G. (2009) *J. Immunol.*, **182**, 5789–5799.
- 12) Poznansky, M.C., Evans, R.H., Foxall, R.B., Olszak, I.T., Piascik, A.H., & Hartman, K.E. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 729–734.
- 13) Clark, R.A., Yamanaka, K., Bai, M., Dowgiert, R., & Kupper, T.S. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 3239–3249.
- 14) Willfuhr, K.U., Westermann, J., & Pabst, R. (1992) *J. Pediatr. Surg.*, **27**, 1207–1212.
- 15) Glanville, S.H., Bekiaris, V., Jenkinson, E.J., Lane, P.J., Anderson, G., & Withers, D.R. (2009) *Eur. J. Immunol.*, **39**, 280–289.
- 16) Grikscheit, T.C., Sala, F.G., Ogilvie, J., Bower, K.A., Ochoa, E.R., Alsberg, E., Mooney, D., & Vacanti, J.P. (2008) *J. Surg. Res.*, **149**, 214–218.
- 17) Perez, A., Grikscheit, T.C., Blumberg, R.S., Ashley, S.W., Vacanti, J.P. & Whang, E.E. (2002) *Transplantation*, **74**, 619–623.
- 18) Suematsu, S. & Watanabe, T. (2004) *Nature Biotechnology*, **22**, 1539–1545.
- 19) Okamoto, N., Nishimoto, S., Chihara, R., Shimizu, C., & Watanabe, T. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 997–1007.
- 20) Tan, J.K.H. & Watanabe, T. (2010) *Advances in Immunology*, **105**, 131–157.
- 21) Kobayashi, Y., Kato, K., & Watanabe, T. (2011) *Discovery Medicine*, **12**, 351–362.