

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上田 実

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備 ----- 1
上田 実

II. 分担研究報告

1. 自動培養装置および安全性評価機能を備えた細胞供給システムの開発 ----- 13
各務 秀明
2. 画像処理技術を用いた培養細胞の評価法の開発 ----- 18
紀ノ岡 正博
3. 情報処理理論を用いた細胞培養の効率化 ----- 21
本多 裕之
4. 間葉系幹細胞の分化に関する分子生物学的、細胞生物学的評価 ----- 25
木全 弘治
5. 自動培養装置の開発・リスク低減密閉系培養容器の開発 ----- 30
鈴木 力

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 33

再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備

主任研究者 上田 実 名古屋大学大学院医学系研究科頭頸部・感覚器外科学講座 教授

研究要旨

培養細胞を用いた初めての臨床例が報告されて以来約20年が経過し、臓器移植や人工材料による治療に代わる新たな医療として、培養細胞を用いた再生治療には大きな期待が寄せられている。治療対象や症例数はますます広がる傾向にあり、一部はすでに臨床研究から実用化の段階に達しているが、その反面安全性や製品の品質管理に関する基礎研究は必ずしも十分とはいえない。本研究では、再生医療の実用化に必要なとされる培養細胞の安全性・品質の確保と培養過程の効率性に関して、「新しい培養技術や評価法の確立」と「自動化・効率化」の大きく2つの研究目標を設置し、基盤技術の確立を目指すものである。新しい培養技術や評価法の確立としては、最も実用性の高い細胞であるヒト線維芽細胞をモデルとして用いた無血清培養や自己血清培地での個体差の影響を検討し(①)、2次元・3次元と高度化する培養法の評価法として上皮細胞と軟骨細胞とモデルとした新しい評価技術を準静的評価法や糖合成酵素活性の研究から導き出した(②、③)。また自動化・効率化のための研究としては、自動培養装置の改良や閉鎖系培養システムの新規開発(④)と共に、情報処理理論を導入した品質管理予測モデルや効率化のためのソフトウェアの開発(⑤)を行い、ハード・ソフトの両面からの基盤技術のプラットフォームを確立した。これらの研究から得られた個々の成果から、再生医療を強力にサポートするための新しい知見や異分野の研究融合によるシステムティックな技術開発が行われたと考えられる。

分担研究者

各務 秀明 東京大学医科学研究所・幹細胞組織医工学
助教授

紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究科・化学工学
領域 助教授

本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学
専攻生物プロセス工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授

鈴木 力 株式会社日立メディコ技術研究所 主任技
師

は均一にすることができない。われわれが臨床で経験する細胞培養の過程でも、増殖能や、形態に個体差が見られることがあるが、これらの変化をどの程度許容できるのか、あるいはどのように評価すべきなのかといった報告はない。したがって、増殖能や形態に見られる差位と細胞生物学的な特徴、そして治療効果とを科学的根拠に立脚して結びつける研究の必要性が痛感される。このため、本研究では実用化を目指しながらも、培養細胞の品質確保を行う技術開発を目指した研究性の高い基礎的研究を行う。

しかし、現在の再生医療の臨床現場では、安全性確保の問題と共に、高額な施設や管理のための膨大な労力という現実的なコストの問題が生じている。このような問題から現在の再生医療は高額な医療とならざるを得ず、ごく一部のわずかな患者のための医療となってしまうことが懸念される。しかしながら、疾患によっては再生医療以外に治療方法がないといった場合は充分想定されるため、より多くの患者が再生医療の恩恵を受けられるインフラ整備を推進するための実用的な研究も同時に必要である。本研究では、安全性確保を検討しながらも、効率性・効果的な実用的な培養方法の開発を行うことで、医学的、および工学的基盤に基づいた基礎的研究成果を再生医療に応用し、治療コストの削減方法を提案する。

本研究を通じて、安全性や品質管理において現時点で

A. 研究目的

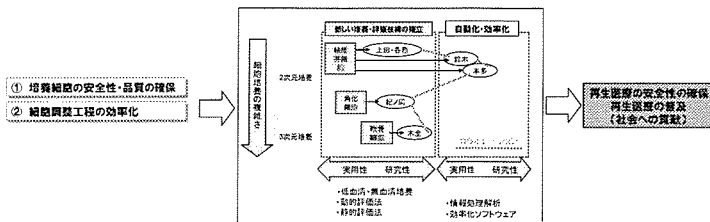
本研究の目的は、再生医療に必要なとされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術を確立することである。

再生医療の対象患者はますます増加しており、対象疾患もいわゆるlife threatening diseasesから日常的な疾患まで拡大されつつある。したがって、細胞を用いた治療に問題が発生した場合には、これまで以上の大きなインパクトを与えることが予想され、感染防止など再生医療の安全性の確保は、まさに待つことのできない課題と考えられる。

一方、臨床応用が進められる中で新たに理解されてきた問題もある。実際の臨床で対象となる患者はさまざまな背景を持ち、採取可能な細胞や組織も動物実験ほどに

最良の手段が提供されることは、今後の再生医療あるいは細胞治療に対し、科学的な根拠と具体的な装置・手法を提案するきっかけとなることが期待される。このため本研究において各分野で得られる成果をバランス良く統合し、システムティックな基板技術として確立することで、はじめて再生医療が多くの国民の健康に奉仕するものになるものになると考えている。

本研究の研究遂行スキームを下に図示する。



B. 研究方法

①無血清培養・自己血清培養の検討とシステム化

これまで、無血清培地の利用は患者からの採血という負担を減らす観点から重要と考えられて来ていたが、多くの無血清培地は動物由来の成分を含んでいた。安全性を考慮する場合、動物由来成分を全く含まない無血清培地の臨床現場への導入が望まれているが、その細胞に対する影響や安全性はまだ不明瞭な点が多かった。このため実際の臨床研究で用いられており、また間葉系細胞として汎用性のあるヒト由来線維芽細胞を用いて、無血清培地の増殖・活性への影響を検討した。また、実用化を目指し研究が進められている間葉系幹細胞(MSC)においても、培養に自己血清を利用した場合のキャラクターの変化や安定性、個体差のばらつきへの影響などの基礎的検討を行った。

②準静的細胞診断技術の開発

再生医療において培養細胞の機能や安全性を評価する手法(非破壊)は非常に重要である。この場合、細胞の連続的な動きを数値化する動的評価と、動きの中の1タイムポイントを数値化する静的評価は、最も現実的な評価法と言える。本研究課題では、新たに培養表面にD-グルコースデンドリマーで変化を導入し、その表面に曝すことで一時的な観察であるが動的な細胞の挙動を見ることができ「準静的」な評価方法を考案し、培養面と細胞の形態との相関から、培養細胞の分化度を評価する新しい技術を2次元培養細胞である上皮細胞をモデルに寿命を評価できないか検討した。

③静的細胞評価指標の発見

再生医療においては、様々な培養組織の評価が重要であるが、培養形態が高度に複雑化する3次元培養でしか機能を得られないような細胞の場合、動的・準静的な評価では不可能な場合が生じる。このような場合には伝統的な一部のサンプル回収による静的評価が重要ではあるが、目的外の細胞への分化や分化の成熟度を定量的に評価できるような指標は非常に少なく、分子生物学的、細胞生物学的、組織学的検証の中から新しい指標マーカーを探索する基礎検討が必要となる。このため、本研究課題では、基礎検証を深く行うことができていた軟骨細胞をモデルとし、間葉系細胞から軟骨細胞に分化する段階を定量化できる可能性のある、骨格糖鎖に関与する生合成酵素(CSS1、CSS2、CSS3、CSGalNAcT-2、CSGalNAcT-1、CSGlcAT)の挙動と機構解明を行った。

④細胞培養の自動化と効率化

現在の細胞調整工程は全て、人の手作業に依存しており、このため取り違いや、コンタミネーションのリスク、コスト増加、人材確保の困難など、再生医療の実用化に大きく歯止めをかける問題となっている。このため、培養工程の自動化は、将来的により多くの患者に再生医療の恩恵を譲与するためには必要不可欠の取り組みである。このため、本研究課題では、細胞培養を自動化するための自動培養装置の開発を行った。同時に、本研究では自動培養装置が臨床現場に導入されるまでの橋渡しのデバイスとして様々なコンタミネーションのリスクを低減し作業を簡便化するため、閉鎖系培養バッグ開発のための初期検討を行った。

⑤情報処理技術を用いた細胞の品質管理

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養・調整されているが、技術者の勘や経験に依存しているため産業化の障害となっている。このような勘に相当する条件を数値化・モデル化することは、工業生産の現場では日常的に行われており、作業の効率化・安全性向上に大きく貢献するものである。本研究課題では生産体制を最適化するための効率化のため、知識情報処理技術を用いた細胞工程のモデル化を行った。知識情報処理では、人間の感覚を自動的に数値に置き換え、制御系へと伝達できるルールとして表現できるため、細胞の品質(増殖率、活性)を予測できるモデルを構築できるかの検証を行った。

名古屋大学では、培養皮膚、骨再生など170例以上の臨床応用が行われており、東京大学医科学研究所附属病院でも、間葉系幹細胞を用いた骨再生研究が進められて

いる。これまでに問題となる合併症や危険性に関する報告はないが、すでに治療を終了した症例の追跡調査により、細胞を用いた治療の長期的な安全性に関する情報を得る。

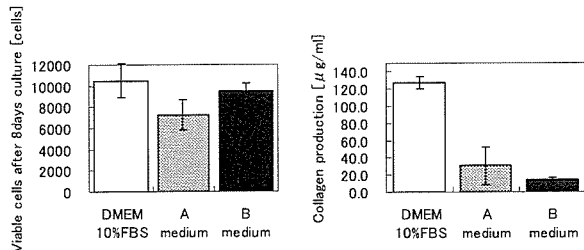
(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、治療（手術時）に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会および東京大学医科学研究所倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究結果

①無血清培養・自己血清培養の検討とシステム化

今回、2種類の無血清培地（A: Cascade社、B: 細胞化学研究所）を、培地のみの条件でヒト線維芽細胞の増殖と活性を比較すると、図1に示すように7日後の増殖はほとんど変わらないが、活性としてコラーゲン産生能を比較すると、血清を用いた通常培地の4分の1以下まで低下していることが明らかとなった。



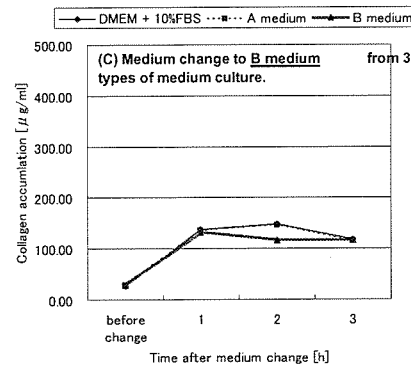
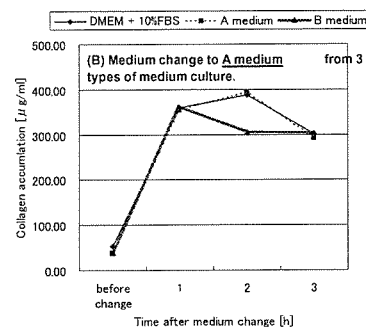
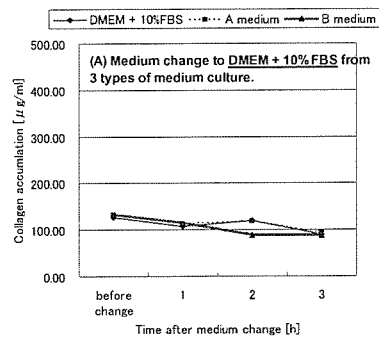
(図1) 無血清培地のみでの血清入り培地との比較。

左図：細胞増殖の比較、右図：コラーゲン産生の比較

さらに、2種類の無血清培地での8日間培養後、通常のコラーゲン濃度の培地と、新たに無血清培地へと培地を変化させたときの1時間おきのコラーゲン活性の変化を追うと(図2)、DMEM培地で一定時間培養した細胞は、血清入りの培地・無血清培地のどちらに培地を切り替えても、濃度がほぼ一定になるように培地中のコラーゲンが生産・代謝される(図2A)が、一端無血清培地で一定時間培養した細胞は、どの培地に切り替わっても十分なコラーゲン産生能の回復が得られにくいことが明らかとなった(図2B、2C)。

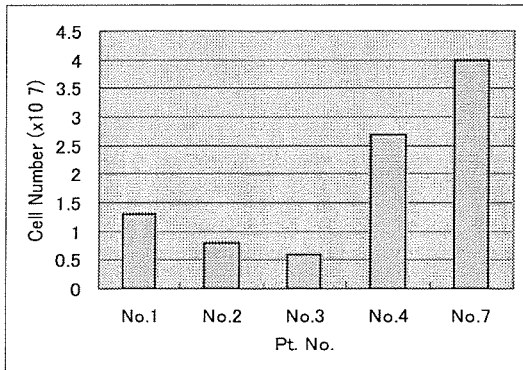
即ち、無血清培地は臨床上患者からの採血の負担を小さくするためにも重要な検討事項であるが、細胞の増殖面ではほぼ遜色ない結果が得られるようになったものの、

分化を含めた細胞の機能の維持という面では、不十分な可能性がある。今後無血清培地の添加因子についても詳細に検討することで、細胞の増殖の細胞外マトリクス生成などの分化とのバランスを取ることが重要と考えられ、無血清培地の細胞の安定性評価の指標を今後検討する必要性があると考えられた。

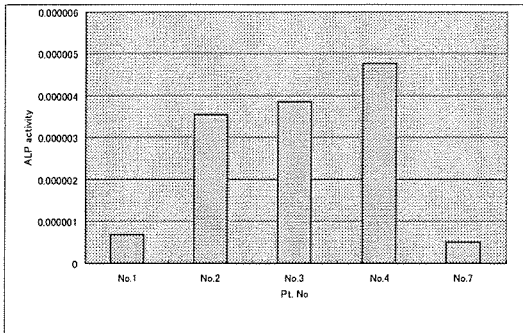


(図2) 通常のコラーゲン濃度の培地と無血清培地(A,B)の比較。8日間3種類の培地で培養した細胞を、全組み合わせで培地交換を行い、コラーゲンの生産能を計測した。

一方、自己血清による培養として、東京大学医科学研究所において、6名の患者由来の間葉系幹細胞の培養を行ったところ、細胞数、ALP活性共に固体間においてかなりのばらつきが見られた(図3、図4)。これには細胞の増殖速度や分化誘導の容易さに個体差があることが原因と考えている。実際には、プロトコルの徹底的な検証を行えば、どの血清においても一定の細胞数を得られる可能性が高いが、臨床研究では細胞増殖を予測しながら手術日程を考えなくてはならないため、今後は研究課題⑤のような予測モデルとの連携を検討することが重要であろう。

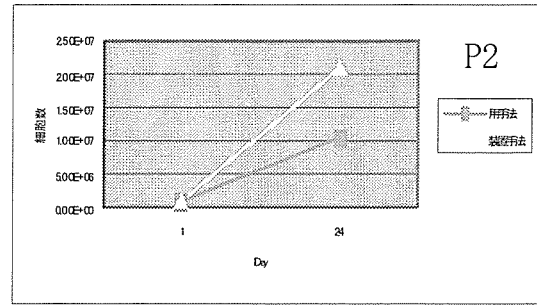
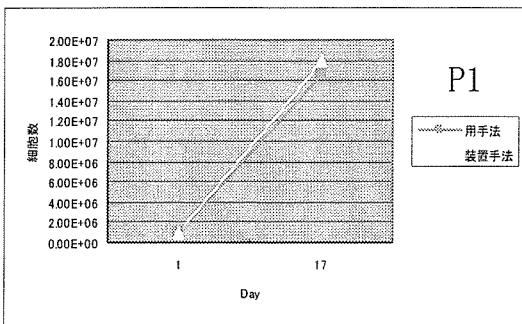
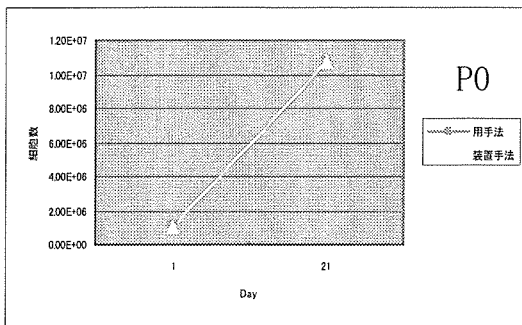


(図3) 自己血清による間葉系幹細胞の培養により得られた細胞数（培養期間は4～6週）。



(図4) 自己血清による間葉系幹細胞の培養。ALP活性の比較。

次に、参考機となる自動培養装置を用いて、ヒト由来間葉系幹細胞を用いて、動作確認を行った（図5）。



(図5) 自動培養装置によるMSCの培養評価

本研究では、β版である第3世代の自動培養装置を用いて、ヒト細胞(MSC)を用いて細胞増殖、およびコンタミネーションなどの確認を行った。市場投入に近いβ版は従来の試作器に比べて小型であり、操作も容易になっている。この自動培養装置を用いて、MSCであっても培養操作の初めから細胞回収時まで人手を要しない細胞培養が可能であることが示された。得られた細胞の性状については今後詳細な検討を行う予定である。

② 準静的細胞診断技術の開発

ヒト上皮細胞の数回の継代培養において、準静的評価を行い、累積分裂回数に対する細胞形態（円形度）の変化を観察したところ、累積回数の増加に伴い、伸展可能な細胞が減少し、その結果円形度が上昇し、細胞増殖速度の減少と細胞形態変化相関づけることができた。

さらに、準静的評価を行うためのD-グルコース提示面の特性解明を、0、100%D-glucose提示培養面におけるヒト乳腺上皮細胞の円形度を測定することで行った。

様々な濃度(0、50、100%)のD-グルコースを結合させた面上で培養した細胞は様々な形態を示すことが確認され、さらに、培地中のインスリンの有無やブロッキングの有無によって、伸展された細胞の形態から丸く維持された細胞形態まで円形度が変化することがわかった。以上より、D-グルコース提示面上の細胞は、接着としては、インテグリンを介した機構、形態変化は、GLUTを介した機構であることが解明された。また、形態変化の程度は、細胞側のGLUT量と培養面上のD-グルコース提示量との量的バランスにより変化する“Receptor saturation model”に従うことがわかった。

即ち、培養中の細胞運動の推進力は細胞骨格形成に起因しており、累積分裂回数の増加（細胞寿命）と伴に骨格形成能力が低下し、その結果、円形度変化が見られなくなった可能性がある。このような、骨格形成能は、準静的な評価法（グルコース提示面）において始めて明かに可視化することができる評価基準であり、培養容器の一部分をグルコース提示面などにより、準静的な局面を通常培養の状態に持ち込み、細胞の品質評価が行える可能性が示唆されたものである。

③ 静的細胞評価指標の発見

われわれはMSCから軟骨細胞への分化評価の指標とし

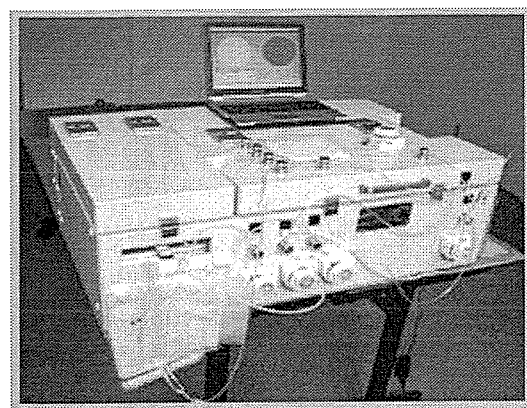
て、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いてCS糖鎖骨格の合成に関与する糖転移酵素群の発現を検討したところ、胎生14.5日のマウス軟骨組織においてCSS-1、CSS-2、CSGlcAT、CSGalNAcT-1の4種類の酵素の発現がアグリカンコアタンパク質の発現と一致して成長板の前肥大軟骨細胞層中心に認められた。次に、リアルタイムRT-PCRを用いて軟骨分化系細胞株のATDCにおける酵素群の発現を調べたところ、分化に伴ってCSGlcATとCSGalNAcT-1の発現の顕著な亢進がみられた。さらに他の軟骨分化能を持つマウス培養細胞を用いた場合も同様な結果を得た。そこで、これらの酵素をラットの軟骨細胞株 (LTC) に各々強制発現させ検討したところ、コンドロイチン硫酸鎖合成能がそれぞれ2倍、5倍に増加していることが確認できた。強制発現させた軟骨細胞の作るaggrecanについて、塩化セシウム密度勾配遠心法による分子密度の検討と、ゲル濾過による分子サイズの比較、さらにaggrecanに結合しているコンドロイチン硫酸鎖自体の分子サイズの比較検討し、CSGlcATとCSGalNAcT-1の遺伝子導入による発現亢進により結合コンドロイチン硫酸鎖本数が約2.2倍程に多くついた分子 (super aggrecan) が作られることを明らかにした。

即ち、軟骨特有の性質の発揮は、これらの酵素活性の発現が鍵を握っているということであり、この発見は、これらの酵素の活性を測定することによって、軟骨として機能の評価ができる新たな有用なマーカーの発見でもあると言える。

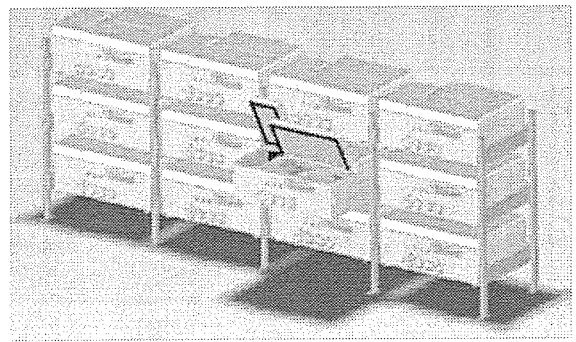
④細胞培養の自動化と効率化

本研究では、H18年度まで開発を行っていた弐号機における、臨床現場の問題点として省スペース化と、並列運用を可能にする機器構造への改良を行った。

結果、今回の改良品として開発した第3世代自動培養装置は(90x65x45cm) (図6) と縦に省スペース化を実現し、約4平米に12台を積載し、並列運転することが可能となった (図7)。このような省スペース化は、現実の細胞調整室内では非常に重要であり、本研究の成果より、現状の多くの施設であっても多検体の培養を可能とする機器開発ができたと考えられる。



(図6) 第3世代自動培養装置の仕様

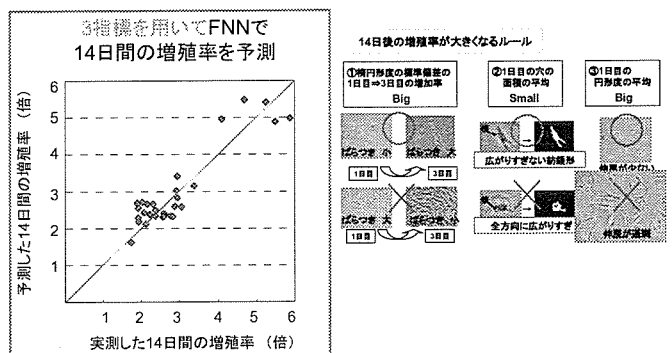


(図7) 自動培養装置の並列運用イメージ

⑤情報処理技術を用いた細胞の品質管理

本研究では、われわれは新たに知識情報処理技術であるFuzzy Neural Networkを解析ソフトとして用いる品質管理システム (Bioinformatic Quality Control : Informatic QC) を確立し、臨床用細胞の初期培養画像から(1日目と3日目)、画像解析によって人の感覚を代替するような有用な指標の組み合わせを探索し、品質管理の1つとして14日後の「生産性」の予測を行うモデルを構築した。

(図8)



(図8) FNNで選ばれた指標の組み合わせと予測精度

図8に示すように、これまで多くの作業者が14日後の取得細胞数を予想するのに用いていた指標よりも、Fuzzy Neural Network (FNN) によって180項目の中から選ばれた3つの指標の組み合わせを用いた方が、連続値としての増殖率を遙かによく予測できることがわかった。

本研究のように数値モデルを用いた予測を培養初期から行うことで、細胞不足の場合には継代や増殖因子の添加を行うなどの制御が可能となる。このため、本研究で得た解析方法は、自動培養装置の制御ソフトウェアと成り得る可能性を示唆するものである。

そのほか、情報処理技術により、培養工程を効率的に管理するシステムプログラムの改良とGUI化を行い、イントラネットによって医師が常に作業現場を確認・承認できる体制を作り上げた。

D. 考察

H18年の研究では、臨床研究数の蓄積によって、より現実的な「臨床現場におけるニーズと問題点」が明らかとなり、各研究課題へとフィードバックされた。このことより、無血清培地・自己血清培地の有用性・危険性の検討や、臨床サンプルにおける個体差とこれを受け止める自動化システムの試行が行われ、問題点がさらに明らかとなった。特に現実問題としての自己血清培養におけるバラツキは、個々の患者間の差の原因なのか、細胞間の差が原因なのか、血清間の性質の差なのかが明かでないため、一定の品質の細胞を取得することの困難さが再確認された。このため、今後さらに培養条件の検討による安定性の確保が課題となろう。

また、本年度は、各研究課題におけるデータの蓄積により、科学的根拠のある新規評価技術の提案や、新規評価マーカーの発見が行われた。「準静的評価法」は2次元培養向きの細胞で、「糖転移酵素を指標とした分化評価法」は3次元培養向きの細胞で、その科学的立証が行われ、有用性が示された。このことによって、目標であった様々な再生医療用の細胞への評価技術の確立は、達成されつつあるようと考えられる。今後は、これらの各成果を、別の研究班が導入し、装置やモデルなどでさらに指標の有用性を確認する、分野融合の方向性が課題となると思われる。

本年度の製品開発としては、第3世代の自動培養装置を含め、細胞調整工程管理ソフトウェアなどが特許化されるだけでなく、商品としての販売への道筋が立った。自動培養装置はまだハードだけの存在であるが、本年度に確立された情報処理によるInformatic QCは、特に準静的評価法などと相互に機能向上を行える余地があると考えられる。

E. 結論

H18年度の本研究では、再生医療を実用化するための基盤技術として、「臨床現場のニーズと課題」が明らかとなり、「培養条件」「評価技術」「低コスト・効率化製品」の雛形が形成されたと考えられる。このため、今後は各研究課題で得られた成果を相互に結びつけ、より総合的な、再生医療において安全性・品質の確保と培養過程の効率性を得るためのシステムを構築することを課題とする。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Tatebe, R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda: Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiolog

ical study for Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit, *Cytherapy* vol.7 (6), 520-530, 2006

M. Murata, M. Momose, K. Okuda, Y. Ninagawa, M. Ueda, H. Yoshie: Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 19, Involucrin and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets, *Journal of the International Academy of Periodontology*, 8 (1) 33-38, 2006

A. Ito, E. Hibino, C. Kobayashi, H. Terasaki, H. Kagami, M. Ueda, T. Kobayashi, H. Honda: Construction and Delivery of Tissue-Engineered Human Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets, Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force, *Tissue Engineering*, 11, 3/4, 489-496, 2006

M. Ohya, Y. Yamada, K. Wada, K. Watanabe, R. Ozawa, H. Hibi, M. Ueda: Bone Regeneration Method Using Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) Complexes for sinus Floor Elevation in Rabbits, *Dentistry in Japan*, 42, 61-64, 2006

J. Mase, H. Mizuno, K. Okada, K. Sakai, D. Mizuno, K. Usami, H. Kagami, M. Ueda: Cryopreservation of cultured periosteum: Effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential, *Cryobiology* 52, 182-192, 2006

H. Hibi, Y. Yamada, M. Ueda, Y. Endo: Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material, *Int J. Oral Maxillofac Surg*, 35, 551-555, 2006

Y. Yamada, A. Fujimoto, A. Ito, R. Yoshimi, M. Ueda: Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hD PSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy, *Biomaterials* 27, 3766-3781, 2006

M. Ueda, Y. Yamada, M. Ohya, H. Hibi: Use of Tissue-Engineered Bone Cells for Sinus Augmentation with Simultaneous Implant Placement, *Qu*

intessence books 'The Sinus Bone Graft' (Edited by Ole Jensen) 341-348, 2006

H.Hibi, Y.Yamada, H.Kagami, M.Ueda: Distract ion Osteogenesis Assisted by Tissue Engineer ing in an Irradiated Mandible: A Case Report, The International Journal of Oral & Maxillo facial Implants, 141-147, 2006

Y.Yamada, M.Ueda, H.Hibi, S.Baba: A Novel Ap proach to Periodontal Tissue Regeneration wi th Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Using Tissue Engineering Technology: A Clinical Case Report The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, vol.26(4), 363-370, 20 06

H.Mizuno, K.Hata, K.Kojima, L.J.Bonassar, C. A.Vacanti, M.Ueda: A Novel Approach to Regen erating Periodontal Tissue by Grafting Autol ogous Cultured Periosteum, Tissue Engineerin g, vol.12(5),1227-1235, 2006

Narita, Y.Fukuhira, H.Kagami, E.Kitazono, H. Kaneko, Y.Sumii, A.Usui, M.Ueda, Y.Ueda: Deve lopment of a Novel Temporary Epicardial Paci ng Wire With Biodegradable Film, Annals of T horacic Surgery, Vol.82(4), 1489-1493, 2006

K.Ito, Y.Yamada, T.Naiki, M.Ueda: Simultane ous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineer ed bone with fibrin glue, mesenchymal stem c ells and platelet-rich plasma., Clin.Oral. Im plant Res. 17, 579-586, 2006

M.Ohya, Y.Yamada, R.Ozawa, K.Ito, M.Takahash i, M.Ueda: Sinus floor elevation applied tis sue-engineered bone, Comparative study betwe en mesenchymal stem cells/platelet-rich plas ma(PRP) and autogenous bone with PRP complex es in rabbits, Clin.Oral. Implant Res. 17, 57 9-586, 2006

Y.Murase, Y.Narita, H.Kagami, K.Miyamoto, Y. Ueda, M.Ueda, T.murohara: Evaluation of Comp liance and Stiffness of Decellularized Tissu es as Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts Using Intravascular Ultrasound, ASAIO, 450-455, 2006

H.Agata, I.Asahina, Y.Yamazaki, M.Uchida, Y. Shinohara, M.J.Honda, H.Kagami, M.Ueda: Effe ctive Bone Engineering with Periosteum-deriv ed Cells, J. Dent Res 86(1), 79-83, 2007

D. Agata, H.Kagami, H.Mizuno, J.Mase, K.Usami, M.Ueda: Bone regeneration of dental impla nt dehiscence defects using cultured periost eum membrane, Clinical Oral Implants Researc h, 2007 (Accepted)

2. 学会発表:

上田実:「再生医療とアンチエイジング」日本再生医療学会シンポジウム1「再生医療そのニーズを聴く」 2006.3.8 岡山

Minoru Ueda:「Tissue Engineering and Anti-a ging therapy」1st congress of ICOI Korea-KSO I 2006.3.12 Korea

Minoru Ueda:「Anti-aging Therapy using Cell & Implant」Astra World Congress Parallel Se ssion 2006.4.8 New York

Minoru Ueda:「Tissue Engineering and Anti-ag ing therapy」IADR Plenty Lecture 2006.6.2 8 Australia

上田実:「Tissue Engineering and its Commerci alization」中華牙医学会 2006.8.25 台湾

上田実:「再生医学と歯科医療の将来」国際歯科 麻醉学会 2006.10.5 横浜

上田実:「歯科における大学発ベンチャーを考え る」日本口腔外科学会シンポジウム1 2006.1 0.12 福岡

Minoru Ueda:「Tissue Engineering and Implan t」Australia New Zealand Oral Maxillofacial Surgery Society 2006.10.19 Australia

上田実:「熱傷治療における再生医療の役割」日 本熱傷学会近畿地方会 2007.1.20 大阪

Minoru Ueda:「Tissue Engineering and Anti-a ging Therapy」国際シンポジウムBMMP 2006.1. 25 名古屋

Minoru Ueda:「Tissue Engineering and Anti-a ging Therapy」Finnish Dental Society APOLLON

<分担研究者>

(各務 秀明)

1. 論文発表:

Hideki O, Kagami H, Okada K, Ito Y, Sekiya I, Waguri Y, Ogikubo O, Ueda M, Otsuka T. Fate of transplanted nail matrix cells and potential of hard keratin production in vivo. *Journal of Dermatological Science*, 2006 in press.

Kagami H, Songlin Wang*, Bo Hai. Restoring the function of salivary glands. *Oral Diseases*, in press.

Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda M, Kagami H, Ueda M. Effective Bone Engineering using Periosteum-Derived Cells. *J Dent Res*, in press.

Ozeki M, Narita Y, Kagami H, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Ueda M, Goto H. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J Biomed Mater Res A*, 2006 in press.

Honda MJ, Sumita Y, Shinohara Y, Kagami H, Ueda M. Mini Review, Tooth-tissue engineering, Inflammation and Regeneration 26:169-174, 2006.

Murase Y, Narita Y, Kagami H, Miyamoto K, Ueda Y, Ueda M, Murohara T. Evaluation of Compliance and Stiffness of Decellularized Tissue as Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts Using Intravascular Ultrasound. *ASAIO Journal*, 52(4):450-5, 2006.

Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 21: 141-147, 2006.

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone*, 39(1):125-33, 2006 Jul, Epub 2006.

Ohno K, Hattori T, Kagami H, and Ueda M. Effects of Preceding Sialadenitis on Development of Autoimmunity against Salivary Gland. *Oral Diseases*, 13:158-162, 2006.

Mase J, Mizuno H, Okada K, Sakai K, Mizuno D, Usami K, Kagami H, Ueda M. Cryopreservation of cultured periosteum: Effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *Cryobiology*, 52:182-192, 2006.

Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K, Ono Y, Oshima S, Ueda M. Constructing a Tissue-Engineered Ureter Using a Decellularized Matrix with Cultured Uroepithelial Cells and Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells. *Tissue Eng* 12:509-518, 2006.

Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagar a H, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3238-3248, 2006.

Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 64(2):283-9.

2. 学会発表:

各務秀明 口腔・顎顔面領域における再生と分化「口腔・顎顔面領域における組織再生—唾液腺と歯周組織の再生—」第111回日本解剖学会総会・全国学術集会、神奈川、2006年3月

加藤竜司、岡田邦彦、各務秀明、上田 実「再生医療実用化に向けた線維芽細胞自動培養装置の開発」日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月

各務秀明 「再生医療における産学連携—われわれの経験から学んだこと—」第60回日本口腔外科学会総会、名古屋、2006年5月

各務秀明 「再生医療の新たな方向性—審美的アプローチについて—」第5回再生医療セミナー、名古屋、2006年5月

加藤竜司、各務秀明、上田実「再生医療実用化に向けたCPC管理支援システムの開発」BIOEXPO 2006、横浜、2006年05月

Kagami H. Symposium IV: Clinical application of tissue engineering and regenerative medicine in dentistry

1st National Tissue Engineering and Regenerative Medicine Scientific Meeting 2006, 30 August 2006. At Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur.

各務秀明 「顎口腔領域の組織再生研究と今後の展望 第1部 細胞分化と可塑性—組織再生」 体性幹細胞の分化誘導と再生医療への応用、第48回歯科基礎医学会、神奈川、2006年9月

各務秀明 (座長講演) 再生療法：21世紀の展望と展開 歯科領域における再生療法研究の現状と可能性 第5回日本国際歯科大会、2006年10月

(紀ノ岡正博)

1. 論文発表

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Response of Human Epithelial Cells on Culture Surfaces with Varied Roughnesses Prepared by Immobilizing Dendrimers with/without D-Glucose Display", J. Biosci. Bioeng., Vol. 103, No. 2, pp. 192-199 (2007).

2. 学会発表

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Design for EGF Stimulation on D-glucose-displayed surface", Regenerative World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, (Oral presentation; Kim), Pittsburgh (April. 25-27, 2006).

紀ノ岡正博, 金 美海, 川瀬雅也, 田谷正仁: グルコース提示型培養面を用いたEGF刺激伝達面の設計, 第9回日本細胞工学会, 京都 (2006.9)

金 美海, 紀ノ岡正博, 川瀬雅也, 八木清仁, 田谷正仁: グルコース提示型培養面における細胞伸展機構の解明, 第58回日本生物工学会大会, 大阪 (2006.9)

紀ノ岡正博, 金 美海, 川瀬雅也, 八木清仁, 田谷正仁: グルコース提示を介したEGF刺激伝達面上における上皮シート形成, 第58回日本生物工学会大会, 大阪 (2006.9)

(本多裕之)

1. 論文発表

Yasuyuki Tomita, Hiroyuki Asano, Hideo Izawa, Mitsuhiro Yokota, Takeshi Kobayashi and Hiro

yuki Honda: "Classification Method for Predicting the Development of Myocardial Infarction by Using the Interaction between Genetic and Environmental Factors", IPSJ Digital Courier, Vol. 2, pp. 691-709. (2006)

Hiro Takahashi, Hiroyuki Honda: Prediction of peptide binding to MHC class II molecules using boosted fuzzy classifier with sweep operator method, Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2), 137-141 (2006)

Mina Okochi, Mari Nakanishi, Ryuji Kato, Takeshi Kobayashi, Hiroyuki Honda: High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence, FEBS Letters, 580, 885-889 (2006)

Kazunori Shimizu, Akira Ito and Hiroyuki Honda: Enhanced cell-seeding into 3-D porous scaffolds use of magnetic nanoparticles, Journal of Biomedical Materials Research Part B, 77(2), 265-272 (2006)

2. 学会発表

山本 若菜, 加藤 竜司, 蛭沢 克己, 各務 秀明, 上田 実, 本多 裕之, 「細胞治療用細胞生産のための細胞形態の情報解析、化学工学会第72回、京都、2007年3月

R. Kato, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda. Application of bioinformatic prediction for supporting high-throughput experiments in proteome, The 4th International Forum on Post-Genome Technologies (4th IFPT), HangZhou, China, September, 2006

R. Kato, C. Kaga, Y. Tomita, M. Kunimatsu, H. Honda. Application of bioinformatic prediction for supporting high-throughput experiments in proteome, International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Engineering Meeting, Yokohama, Japan, November, 2006

(木全弘治)

1. 論文発表

(国際論文)

K. Sakai, K. Kimata, T. Sato, M. Gotoh, H. Narimatsu, K. Shinomiya, H. Watanabe. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 p

lays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. *J Biol Chem* 2006;282:4102-4161.

K. Matumoto, N. Kamiya, K. Suwan, F. Atumi, K. Shimizu, T. Shinomura, Y. Yamada, K. Kimata, H. Watanabe. Versican/Pg-M aggregates in cartilage: identification and characterization. *J Biol Chem* 2006;281:18257-18263.

N. Kamiya, H. Watanabe, H. Habuchi, H. Takagi, T. Shinomura, K. Shimizu, K. Kimata. Versican/Pg-M Regulates Chondrogenesis as an Extracellular Matrix Molecule Crucial for Mesenchymal Condensation. *J Biol Chem* 2006;281:2390-400.

A. Sakai, N. Akifusa, N. Itano, K. Kimata, T. Kawamura, T. Koseki, T. Takehara, T. Nishihara. Potential role of high molecular weight hyaluronan in the anti-Candida activity of human oral epithelial cells. *Medical Mycology* 2007;45:73-79.

N. Sugiura, S. Shimokata, H. Watanabe, K. Kimata. MS analysis of chondroitin polymerization: effects of Mn²⁺ ions on the stability of UDP-sugars and chondroitin synthesis. *Analytical Biochemistry* 2007:in press.

T. Minamisawa, K. Suzuki, H. Maeda, S. Shimokata, N. Sugiura, K. Kimata. Characterization of isomeric unsulfated glycosaminoglycan oligosaccharides by mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2007;55:1-6.

L. Zhuo, A. Kanamori, R. Kannagi, N. Itano, J. Wu, M. Hamaguchi, N. Ishiguro, K. Kimata. SHAP Potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J Biol Chem* 2006;281:20303-20314.

Y. Inoue, M. Yoneda, J. Zhao, O. Miyaishi, A. Ohno-Jinno, T. Kataoka, Z. Isogai, K. Kimata, M. Iwaki, M. Zako. Molecular cloning and characterization of chick sparcan. *J Biol Chem* 2006;281:10381-10388.

(国内論文)

羽瀨弘子, 羽瀨脩躬, 木全弘治. ヘパラン硫酸プロテオグリカンと形態形成. *THE LUNG perspectives* 2007;15:75-81.

渡邊裕規, 渡辺秀人, 木全弘治. 連載 軟骨代謝の研究—基礎と臨床—最近の進歩<10>

基礎—軟骨におけるプロテオグリカンの役割

CLINICAL CALCIUM 第16巻6号. 医療ジャーナル社 2006:146-149.

3. 著書 (単行本) (2006-2007)

坂井顕一郎, 木全弘治, 渡辺秀人. 細胞接着と細胞増殖を制御するプロテオグリカン. 再生医療の基礎シリーズ2 再生医療のための細胞生物学. コロナ社, 2007:49-75.

K. Kimata, O. Habuchi, H. Habuchi, E. Watanabe. Knockout mice and proteoglycans (Chapter 3.11). *Comprehensive Glycoscience—From Chemistry to Systems Biology*. Elsevier, 2006: in press.

H. Habuchi, O. Habuchi, K. Uchimura, K. Kimata, T. Muramatsu. Determination of substrate specificity of sulfotransferases and glycosyltransferases (proteoglycans). *Methods in Enzymology. Glycomics*. Academic Press, 2006: 225-242. vol 416).

2. 学会発表

坂井顕一郎, 木全弘治, 佐藤隆, 後藤雅式, 成松久, 四宮謙一, 渡辺秀人. Analysis of glycosyltransferases involved in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

渡邊裕規, 塩生真史, 木全弘治, 木村友厚, 渡辺秀人. Splicing Factor 3b binds BMPRII and negatively regulates osteochondral differentiation. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

スワン ケイティサック, 幡野その子, 渡辺秀人, 木全弘治. Analysis of fibroblasts whose versican/Pg-M lacks the A subdomain. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

柿崎育子, 板野直樹, 木全弘治, 花田勝美, 今淳, 山口真範, 高橋照, 高垣啓一. Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. 第38回日本結合組織学会学術大会. 前橋, 2006. 5-11, 12.

- A. Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R. Kannagi, T. Mori, Y. Okahata. Preparation of hyaluronan synthase 2 by baculovirus-infected insect cells expression system. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- T. Kobayashi, H. Habuchi, K. Tamura, H. Ide, K. Kimata. Essential role of heparan sulfate O-sulfotransferases in chick limb bud patterning and development. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- N. Sugaya, H. Habuchi, S. Ashikari-hada, N. Nagai, K. Kimata. Different regulation of FGFs signaling in fibroblast producing little-6-O-sulfated heparan sulfate (HS). Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- N. Masukane, Y. Yamaguchi, H. Yagi, N. Sugiura, K. Kimata, K. Kato. NMR and HPLC analyses of substrate recognition by K4 chondroitin polymerase. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- N. Nagai, S. Kitazume, H. Toyoda, Y. hashimoto, H. Habuchi, K. Kimata. Regulation of 6-O-sulfation of heparan sulfate by β -secretase activity and HS6ST3. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- S. Ohtake, K. Kimata, O. Habuchi. Sulfation of a highly sulfated nonreducing terminal sequence in chondroitin sulfate. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- T. Mori, A. Fujishima, N. Sugiura, K. Kimata, Y. Okahata. Direct monitoring of carbohydrate elongations by chondroitin polymerase on a 27-MHz quartz-crystal microbalance. Extracellular glycomatrix in health and disease (グライコマトリックス国際会議). The hyogo prefectural awaji yumebutai international conference center (淡路夢舞台国際会議場), 2006. 6. 15-6. 17.
- A. Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R. Kannagi, T. Mori, Y. Okahata. Effect of phospholipid for stabilization of hyaluronan synthase 2 expressed by baculovirus-infected insect cells. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物会議。第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議、第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会)。京都 国立京都国際会館, 2006. 6. 18-6. 23.
- T. Kobayashi, H. Habuchi, K. Tamura, H. Ide, K. Kimata. Chick limb buds development requires appropriate O-sulfation patterns of heparan sulfate. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress in conjunction with 79th annual meeting of the Japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of Japan "life: molecular integration & biological diversity" (第20回国際生化学、分子生物会議。第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議。第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会)。京都 国立京都国際会館, 2006. 6. 18-6. 23.

S. Hatano, K. Kimata, N. Hiraiwa, M. Kusakabe, E. Adachi, Z. Isogai, T. Shinomura, H. Watanabe. VE RSICAN/PG-M is essential for mic cardiovascular and dermal development. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congree in conjunction with 79th annual meeting of the japanese biochemical society and 29th annual meeting of the molecular biology society of japan "life: meiccular integration & biological diversity"

(第20回国際生化学、分子生物会議。第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議。第79回日本生化学会大会・第29回日本分子生物学会年会)。京都 国立京都国際会館, 2006. 6. 18-6. 23.

芦刈-羽田智子, 羽瀧弘子, 菅谷典子, 木全弘治. 2-O-硫酸化ヘパラン硫酸8糖によるFGF2活性の特異的阻害. 第26回日本糖質学会年会. 仙台, 2006. 8. 23-25.

南澤俊和, 鈴木喜義, 前田浩, 下方郷嗣, 芦刈-羽田智子, 杉浦信夫, 木全弘治, 平林淳. グリコサミノグリカン・オリゴ糖鎖のMSフラグメンテーション挙動. 第26回日本糖質学会年会. 仙台, 2006. 8. 23-25.

幡野その子, Keittisak Suwan, 渡辺秀人, 木全弘治. サブドメイン欠失バーシカン/PG-Mによる細胞の不死化およびがん化. 第65回日本癌学会学術総会: 横浜, 2006. 9. 28-30.

(鈴木力)

1. 論文発表: なし

2. 学会発表:

R. Kato, K. Okada, T. Suzuki, Y. Komori, H. Tachikui, D. Iejima, H. Kagami, M. Ueda: Development of Fully-Automated Cell Culture System Adopted to Adhesive Cells for Clinical Usage, 8th Tissue Engineering Society International (TESI), Shanghai, China, October, 2005.

Ryuji Kato, Wakana Yamamoto, Yasuyuki Tomita, Masahiro Nakatochi, Yasuyuki Tomita, Mina Okochi, Hiroyuki Honda, Hideaki Kagami, Katsumi Ebisawa, Minoru Ueda, Development of morphological process-control analysis for the automation of processes in regenerative medicine, Biochemical Engineering XV, Quebec, Canada 2007. June

加藤竜司、岡田邦彦、各務秀明、上田実
再生医療実用化に向けた線維芽細胞自動培養装置
の開発, 再生医療学会, 東京, 2006年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

特願2005-190374 2005/6/29

皮膚組織改善材及びその利用

上記のPCT: PCT/JP2006/308317 2006/6/28

特願2006-226332 2006/8/23 培養スケジュール管理装置及び培養スケジュール管理プログラム

特願2006-008521 2006/1/17 自動培養装置

特願2006-279476 2006/10/13 自動培養装置

特願2006-139069 血管再生材料

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

自動培養装置および安全性評価機能を備えた細胞供給システムの開発

分担研究者 各務 秀明 東京大学医科学研究所幹細胞組織医工学 助教授

研究要旨

培養細胞を用いた再生治療には大きな期待が寄せられているが、その反面安全性や製品の品質管理に関する基礎研究は必ずしも十分とはいえない。本研究では、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術の確立の一環として、無血清培地および自己血清培地を用いた培養システムの開発と、自動培養システムの開発を行うものである。第1の課題である安全性については、培養過程における感染と、培養細胞自体の安全性、安定性の問題が重要である。特に近年動物由来の成分を用いる危険性が指摘されており、本研究課題では無血清培地あるいは自己血清を用いた培養方法の確立を目指す。一方、現在行われている細胞の培養、管理には熟練と労力、そして特殊な施設が必要とされる。本研究では、自動培養装置を応用した培養システムの構築により、安全性の確保と効率的な培養の両立をはかり、治療コストの削減を達成する。平成18年度には、第1に協力企業との連携のもと、動物由来成分を用いない無血清培地を用いて、FBSによる通常培地との比較を行った。第2に臨床研究にて、ヒト自己血清を用いた間葉系幹細胞の培養を行い、増殖能およびALP活性について検討を行った。第3に自動培養装置の参考機を用いて細胞増殖効率の検討を開始した。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療に必要とされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術を確立することである。

再生医療の対象患者はますます増加しており、対象疾患もいわゆるlife threatening diseasesから日常的な疾患まで拡大されつつある。したがって、細胞を用いた治療に問題が発生した場合には、これまで以上の大きなインパクトを与えることが予想され、感染防止やがん化の検出など再生医療の安全性の確保は、まさに待つことのできない課題と考えられる。本研究では、安全性確保のひとつの方法として、血清に関する検討を行う。細胞培養には通常牛由来の血清が用いられている。しかしながら、近年BSEなど動物由来の血清の利用に対する懸念があり、BSEの発症のない地域から血清を調達するなどの工夫がなされているが、完全に危険を除去できるわけではないために改善が望まれている。そのための方法としては、血清を用いない培地である無血清培地、特に動物由来の製剤をまったく用いない培地も開発されている。しかしながら、安定性や安全性の検証が十分ではないために、現在実際の臨床にはあまり使われていない。本研究課題では、これら無血清培地の可能性について検証を行う。一方、動物由来の材料を避ける方法の一つとして、自己血清を用いた細胞培養が行われている。この方法では、動物由来のウイルスなどの感染の可能性は否定できるが、血清の成分にばらつきが予想されるために、どの程度安定して培養することができるかが問題である。本研究課題では、自己血清によるヒト細胞の培養を行い、

牛血清との比較を行うことで自己血清による培養の安定性を検討する。

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによるコンタミネーションなどの問題がある。また、技術者の勘にたよる部分が多く、産業化の障害となっている。将来細胞による治療が普及するためには、手作業によるコストの上昇を抑える工夫とヒューマンエラーをいかに抑えるかが重要である。これまでにわれわれは自動培養装置を用いた細胞供給システムの開発に取り組んで着たが、実際に自動培養装置を用いたヒト細胞の実績は少なく、その品質や安全性管理に関する基礎的データが不足していた。本研究課題では、自動培養装置のプロトタイプを作成し、この装置を用いたヒト細胞の培養と培養された細胞に関する検討、および自動培養装置を組み込んだ培養システムの構築を目指すものとする。

B. 研究方法

1) 無血清培地、および自己血清を用いた培養法の検討

無血清培地(市販されている培地2種類 A: Cascade社、B: 細胞化学研究所)、血清 (FBS) の添加有無、など各種条件での患者由来ヒト線維芽細胞の増殖および活性としてのコラーゲン産生能を比較した。細胞増殖はCASY (自動細胞計測器) を用いて粒子数及び平均粒径を測定し、Sirol Collagen Assay kitを用いて可溶性画分におけるコラーゲン蓄積量を測定した。

2) 自動培養システムの開発

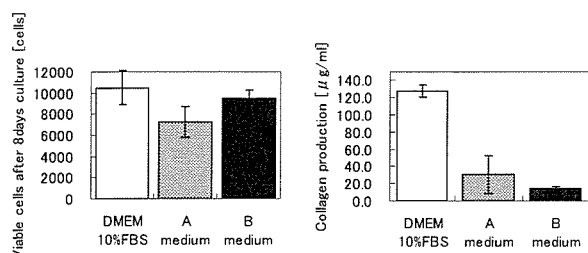
現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによるコンタミネーションなどの問題がある。また、技術者の勘にたよる部分が多く、産業化の障害となっている。鈴木らは、完全閉鎖系の自動培養装置の開発を行っており、動的評価システムや情報処理理論と組み合わせることにより、安全で効率的な細胞培養システムの構築を行う。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織採取を行う場合、治療時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

2種類の無血清培地 (A: Cascade社, B: 細胞化学研究所) を、培地のみの条件でヒト線維芽細胞の増殖と活性を比較すると、図1に示すように7日後の増殖はほとんど大差の無い増殖を示し、増殖能からは有用性が示唆された。



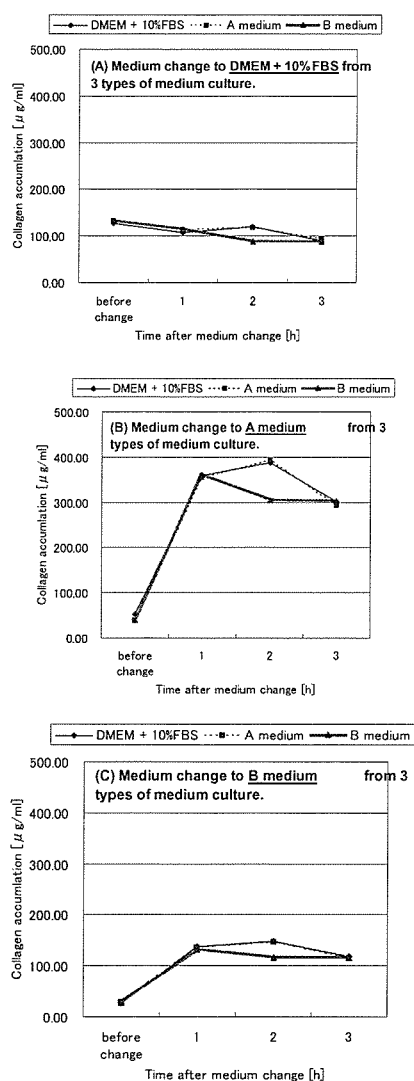
(図1) 無血清培地のみでの血清入り培地との比較。
左図：細胞増殖の比較、右図：コラーゲン産生の比較

しかしながら、その活性としてコラーゲン産生能を比較すると、増殖能こそ血清入りと同等を示してはいるが、活性は大きく小さくなり (4分の1以下)、生体内と同じような活性と増殖を両方維持するためには、現在の無血清培地では不十分である可能性が示唆された。

このため2種類の無血清培地での8日間培養後、通常血清濃度の培地と、新たに無血清培地へと培地を変化させたときの1時間おきのコラーゲン活性の変化を追った(図2)。結果、DMEM培地で一定時間培養した細胞は、血清入りの培地・無血清培地のどちらに培地を切り替えても、濃度がほぼ一定になるように培地中のコラーゲンが生産・代謝されている(図2A)。しかしながら、一端無血清培地で一定時間培養した細胞は、8日後のコラーゲン産生能が低い状態で培地が切り替わると、通常濃度(100-120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の濃度に達して平衡化するものと、極端に産生能が向上してしまう変化を示すものがあることが明らかとなった。また、可溶性コラーゲンの定量からは判断できないが、B培地に切り替えた場合の細胞はたった3時間後

の細胞であってもトリプシン処理後膜状に剥離し、他の培地で培養した場合の細胞がバラバラになった状態のものとは異なる性質を示した。

即ち、無血清培地は臨床上患者からの採血の負担を小さくするためにも重要な検討事項であるが、現時点での無血清培地では、細胞増殖と機能の維持の双方を満たしていない可能性がある。今後添加因子の検討のより、細胞増殖と分化度の維持のバランスを確保することが重要と考えられた。



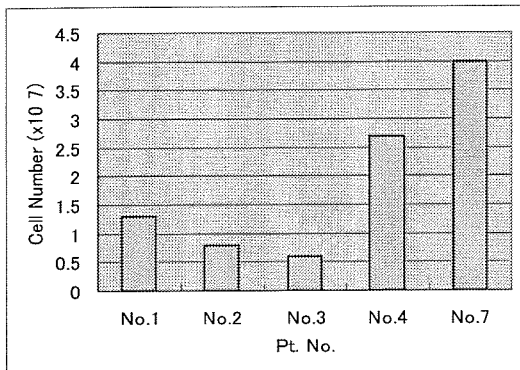
(図2) 通常血清濃度の培地と無血清培地(A, B)の比較。
8日間3種類の培地で培養した細胞を、全組み合わせで培地交換を行い、コラーゲンの生産能を計測した。

無血清の極端な細胞形質への影響から、低血清での培養効果も検討したところ、図3に示すように、低血清の培養の場合、増殖能は十分に10%血清と同等であるが、やはり活性的な観点からは、正常な状態と差が生じていることが明らかとなった。

Basal medium	Serum conc.	After 11 days culture	
		Cell number [cells]	Collagen production [$\mu\text{g/ml}$]
A medium	1%	5461.7	16.4
	10%	5135.0	74.5

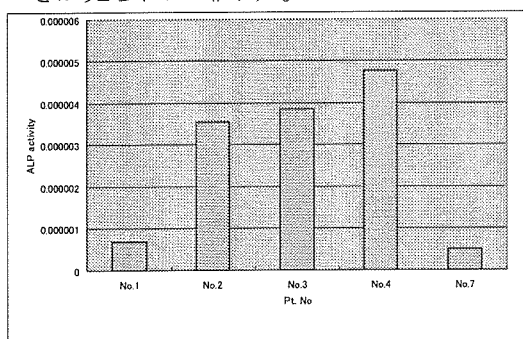
(図3) 低血清状態の無血清培地の細胞形質

一方、自己血清による培養として、東京大学医科学研究所において6名の患者由来の間葉系幹細胞の培養を行った。細胞数においては培養スケジュールによる差があるために、単純な比較はできないが、最終的に得られた細胞の増殖には、かなりのばらつきが見られた(図4)。



(図4) 自己血清による間葉系幹細胞の培養により得られた細胞数(培養期間は4-6週)。培養方法の差もあるものの、最終的に得られた細胞数には約8倍の差が見られた。

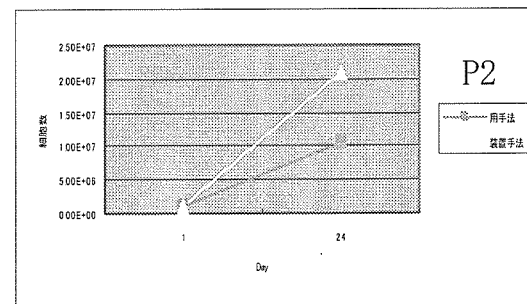
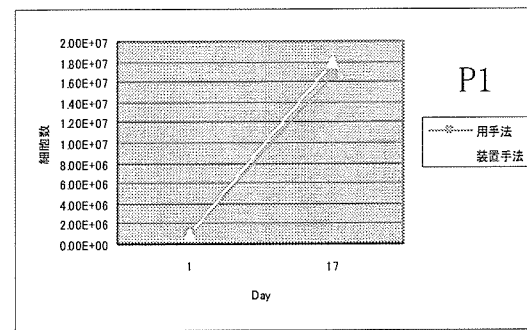
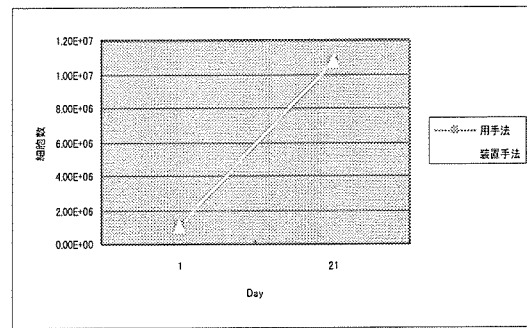
実際には、十分な時間をかけることで、どの血清においても一定の細胞数を得られる物と考えられる。しかしながら、臨床研究では細胞増殖を予測しながら手術日程を考えなくてはならない。その中で、継代後の細胞の増殖を予想することが難しく、細胞数のばらつきの原因になったと考えられる。また、ALP活性にもかなりのばらつきが見られた(図5)。



(図5) 自己血清による間葉系幹細胞の培養。ALP活性の比較。ALP活性には、細胞数同様最大8倍程度のばらつきが見られた。

患者から得られるもともとの細胞数や分画にばらつきがあるために、血清の影響のみを抽出することは困難であるが、FBSを用いた細胞培養と比較して、ALP活性にも個体差をもたらす原因として、自己血清の影響も考えられた。

次に、参考機となる自動培養装置を用いて、ヒト由来間葉系幹細胞を用いて、動作確認を行った(図6)。



(図6) 自動培養装置による細胞増殖と従来法の比較。自動培養装置により、初代培養からP2まで、手作業による培養操作と同等以上の細胞増殖が得られた。

ヒト細胞を用いて継代操作、および初代培養時の条件の設定を行い、培養操作の初めから細胞回収時まで、人手を要しない細胞培養が可能であることが示された。得られた細胞の性状については今後詳細な検討を行う予定である。

D. 考察

本研究では、第一に、ヒト線維芽細胞のための無血清培地を様々なヒト由来線維芽細胞で実際の培養効果を検討したが、より安全かつ実用的な培養を考える際、無血清培地の導入にはさらなる基礎培地成分と活性変化の関係を検討する必要性が感じられた。このため、非動物由来の培地成分の効果や活性への影響を、今後とも培地供給メーカーの協力のもと、より安全な培地を目指して検討していきたい。

自動培養装置を含めた培養操作の自動化は、安全性の確保とともにコスト削減のためにも必要な研究である。特に、安全性確保のための基準では作業員による確認作

業が多く、ヒューマンエラーやコストの増加につながる可能性がある。企業との共同研究のもと、ようやく市販される手前の段階である参考機に到達し、その機能評価を行っている段階である。今後培養細胞を安定して供給する上で、自動培養装置を用いた培養システムの構築は有用と考えられた。

E. 結論

培養細胞の安全で効率的な供給システムの開発は、再生医療の実用化を進める上で臨床的研究とともに車の両輪をなす重要な課題である。安全な培地、培養方法、評価方法のそれぞれについて、今後も研究を重ねることが重要である。初年度の研究では、自己血清、自動培養装置など研究課題のそれぞれについて一定の評価を行うことが可能であったが、平成18年度には培地について新たな検討を加えるとともに、臨床研究のデータによる情報の追加を行い、現在論文執筆中である。しかしながら、初代培養や細胞の機能の問題など、さらなる検討課題が明らかとなり、平成19年度に検討を行っていききたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Tatebe, R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda. Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytherapy* vol.7 (6), 520-530, 2006.

Y. Murase, Y. Narita, H. Kagami, K. Miyamoto, Y. Ueda, M. Ueda, T. Murohara. Evaluation of Compliance and Stiffness of Decellularized Tissues as Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts Using Intravascular Ultrasound. *ASAIO*, 450-455, 2006.

D. Mizuno, H. Kagami, H. Mizuno, J. Mase, K. Usami, M. Ueda. Bone regeneration of dental implant dehiscence defects using cultured periosteum membrane. *Clinical Oral Implants Research*, 2007, in press.

M. J. Honda, Y. Shinohara, Y. Sumita, A. Tonomura, H. Kagami, M. Ueda. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone*. 2006 in press

K. Ohno, T. Hattori, H. Kagami, and M. Ueda. Effect of Preceding Sialadenitis on Development of Autoimmunity against Salivary Gland. *Oral Diseases*, 13:158-162, 2006.

J. Mase, H. Mizuno, K. Okada, K. Sakai, D. Mizuno, K. Usami, H. Kagami, M. Ueda. Cryopreservation of cultured periosteum: effect of different cryoprotectants and pre-incubation protocols on cell viability and osteogenic potential. *Cryobiology*, 52:182-192, 2006.

H. Matsunuma, H. Kagami, Y. Narita, K-I Hata, Y. Ono, S. Ohshima, and M. Ueda. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Engineering*, 12:509-518, 2006.

2. 学会発表

各務秀明 口腔・顎顔面領域における再生と分化
「口腔・顎顔面領域における組織再生—唾液腺と歯周組織の再生—」第111回日本解剖学会総会・全国学術集会、神奈川、2006年3月

各務秀明 「再生医療における産学連携—われわれの経験から学んだこと—」第60回日本口腔外科学会総会、名古屋、2006年5月

各務秀明 「再生医療の新たな方向性—審美的アプローチについて—」第5回再生医療セミナー、名古屋、2006年5月

H. Kagami Symposium IV: Clinical application of tissue engineering and regenerative medicine in dentistry.
1st National Tissue Engineering and Regenerative Medicine Scientific Meeting 2006, 30, August 2006. At Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur.

各務秀明 「顎口腔領域の組織再生研究と今後の展望 第1部 細胞分化と可塑性—組織再生」体性幹細胞の分化誘導と再生医療への応用、第48回歯科基礎医学会、神奈川、2006年9月

各務秀明 再生療法：21世紀の展望と展開 歯科領域における再生療法研究の現状と可能性 第5回日本国際歯科大会、2006年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特願2005-190374 2005/6/29

皮膚組織改善材及びその利用

上記のPCT: PCT/JP2006/308317 2006/6/28

特願2006-226332 2006/8/23 培養スケジュール管

画像処理技術を用いた培養細胞の評価法の開発
—Glucose transporterを介する上皮細胞の形態変化のメカニズム—

分担研究者 紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究科 化学工学領域 助教授

研究要旨

本研究では、再生医療の実用化における細胞の品質管理において重要である「細胞評価技術」の確立を目指して研究を行った。現在の再生医療に用いる細胞の評価は、人の経験に基づいて経時的なポイントにおける細胞を顕微鏡観察により行われているが、このような作業は人の感覚に依存しすぎており安定した品質管理体制とは言えない。これまで、非襲撃的細胞評価基準の探索しており、本年度は、準静的観察を可能とするD-グルコース培養面の設計と細胞形態変化観察に基づく細胞活性の評価を行った。さらに、本培養面の接着・形態変化機構についてのメカニズム解明を行い、本培養面の有効性を証明した。

A. 研究目的

単層増殖時においては、培養容器底面からの細胞観察は、迅速かつ簡易で最も有効な培養状況の把握手段である。図1に示すように、静止画(snapshot)のようにある特定の時間において観察する方法(end-point observation)は、簡易かつ安価で一般的な顕微鏡などの装置で行うことができる(静的評価, static evaluation)。その結果、汎用性が高く、多くの研究や生産の現場で、日々熟練オペレータが、細胞形態を顕微鏡下で観察し、培養環境の状況把握に努めている。しかし、容器内全体での細胞形態の集団的観察となるため、いわゆる平衡論的な情報のみが取得可能である。一方、培養面への接着を伴う足場依存性細胞において、細胞運動は培養環境を把握する上で重要な評価要素である。個々の細胞の動画(movie)のような経時的観察(time-lapse observation)は、より高質な情報が得られ、速度論的な解析を行うことができるが、装置、操作が煩雑になり汎用性に乏しい(動的評価, dynamic evaluation)。また、培養面の修飾により、細胞の一部を強く培養面に固定することで、細胞の移動

は、若干制限されるものの、細胞の退縮が阻止されて伸展のみとなり、移動が時間積分され細胞形態が変化する。そこで、細胞を一時的に培養条件とは異なる状態に曝すことで評価する方法により、動的評価の特徴を兼ね備えた静的観察、“準静的評価”(‘quasi-static evaluation’)を実現した。

平成18年度は、準静的評価可能なD-グルコース提示面でのデータ取得・取得方法の指針構築、および形態変化のメカニズムの解明を行った。

B. 研究方法

1) データ取得・取得方法の指針構築

D-グルコース提示面上での画像観察手法の改良ならびにヒト細胞での観察データの取得・解析についての指針を構築することで、データの信頼性を目指した。

2) 準静的評価法

既存の細胞観察システムの性能を、ハード(画像取得装置)、ソフト(画像取得プログラミング)の改良により向上させ、より詳細な画像データの取得を目指す。また、準静的手法の汎用性を目指し、上皮細胞の寿命評価を形態変化(円弧度)測定により実施した。

3) D-グルコース提示面の特性解明

D-グルコース提示面上での培養の際に細胞側のグルコーストランスポータ(GLUT)を介するヒト上皮細胞に対する形態変化のメカニズムについて解明する。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者由来のヒト細胞を利用することが無いため、倫理的問題は生じないことが明かであった。

C. 研究結果

1) データ取得・取得方法

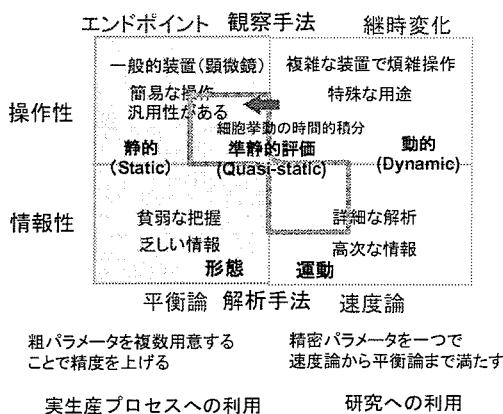


図1 細胞観察手法