

201335015A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

**(再生医療関係研究分野)**

ヒト幹細胞アーカイブを活用する同種細胞を用いた  
新規再生医療技術の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大和 雅之

平成26(2014)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告		
1. ヒト幹細胞アーカイブを活用する同種細胞を用いた 新規再生医療技術の開発	-----	1
大和 雅之		
2. 健康管理情報	-----	3
II. 分担研究報告		
1. 歯根膜由来間葉系幹細胞を用いた研究	-----	6
岩田 隆紀		
2. 食道再生に関する研究	-----	8
金井 信雄		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	10

ヒト幹細胞アーカイブを活用する同種細胞を用いた新規再生医療技術の開発  
（課題番号：H25-実用化（再生）-指定-015）

「ヒト幹細胞アーカイブを活用する同種細胞を用いた新規再生医療技術の開発  
に関する研究」

研究代表者 大和 雅之（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授）

研究要旨：本研究では、同種細胞を用いた再生医療の実現を目指す。具体的には、すでに自家細胞を用いて作製した細胞シートのヒト臨床研究を本学でおこなってきた食道および歯周組織を対象に、細胞ソースを同種組織に変更するための前臨床研究、および同種細胞の特徴を活かして同種細胞シートの凍結保存に関する研究をおこなっている。

#### A. 研究目的

我々は学内外の共同研究により、これまでに皮膚、角膜、心筋、食道、歯周組織、膝関節軟骨で培養自家細胞シートのヒト臨床応用に成功している。しかし、これらはすべて自家細胞を用いたものである。同種細胞ソースは大きなバッチが組めるため、凍結可能であれば出荷前に徹底した検査が可能であり、また大きなロットを組むことで、大幅なコスト削減も期待できる。よって、本研究では、再生医療本格化のために、同種細胞ソースの検討をおこなう。

#### B. 研究方法

健常ボランティアドナー由来同種細胞をバンク化する際の運用技術の構築を行った。このバンクを用いて一度に大きなロットを組んで培養細胞シートを作製し、凍結保存に供する。ロットの一部は、細胞シートの性状解析を行っている。

（倫理面への配慮）

動物を用いた研究、ヒト組織を用いた研究、臨床研究すべてにおいて、それぞれ法令にしたがい設置された東京女子医科大学倫理委員会による審査、あるいは、関連ガイドラインに従って実施した。

#### C. 研究結果

培養細胞シートの凍結・融解法に関しては、条件を最適化することにより、移植に供しうるクオリティを有したまま培養ヒト軟骨細胞シートの凍結・融解が可能となっている。しかし、軟骨細胞シートに比べ、本研究で対象としている表皮細胞シート、間葉系幹細胞シートは厚みに乏しく脆弱であるため、軟骨細胞シートと同じ凍結・融解条件ではシートの破壊が起きるものと想定され、別途、最適化が必要である。

#### D. 考察

大きなロットを組むことおよび凍結保存をおこなうことの2つの理由から、これまでおこなってきた自家細胞を用いた凍結をとまなわない場合に比して、さらに詳細な性状解析が可能となり、より安全な再生医療が実現できるものと期待される。細胞シートの凍結・融解条件の確立は必須であると考えられる。

#### E. 結論

同種細胞ソースの検討、凍結・融解条件の検討は、再生医療本格化のために、極めて重要である。

F. 健康危険情報

次頁に記載した。

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他



#### **グレードA 情報：重要情報**

- 本邦においてなんらかの健康への影響がある可能性があり、緊急性が高く、科学的根拠が明確である場合。
- 本邦においてなんらかの健康への影響がある可能性があり、緊急性が高く、科学的根拠は明確ではないが重大な健康問題となると予測される場合。
- 本邦においてなんらかの健康への影響がある可能性があり、緊急性が高く、国外の関係機関\*が重大な健康問題として警告している場合。

#### **グレードB 情報：情報提供・経過注視**

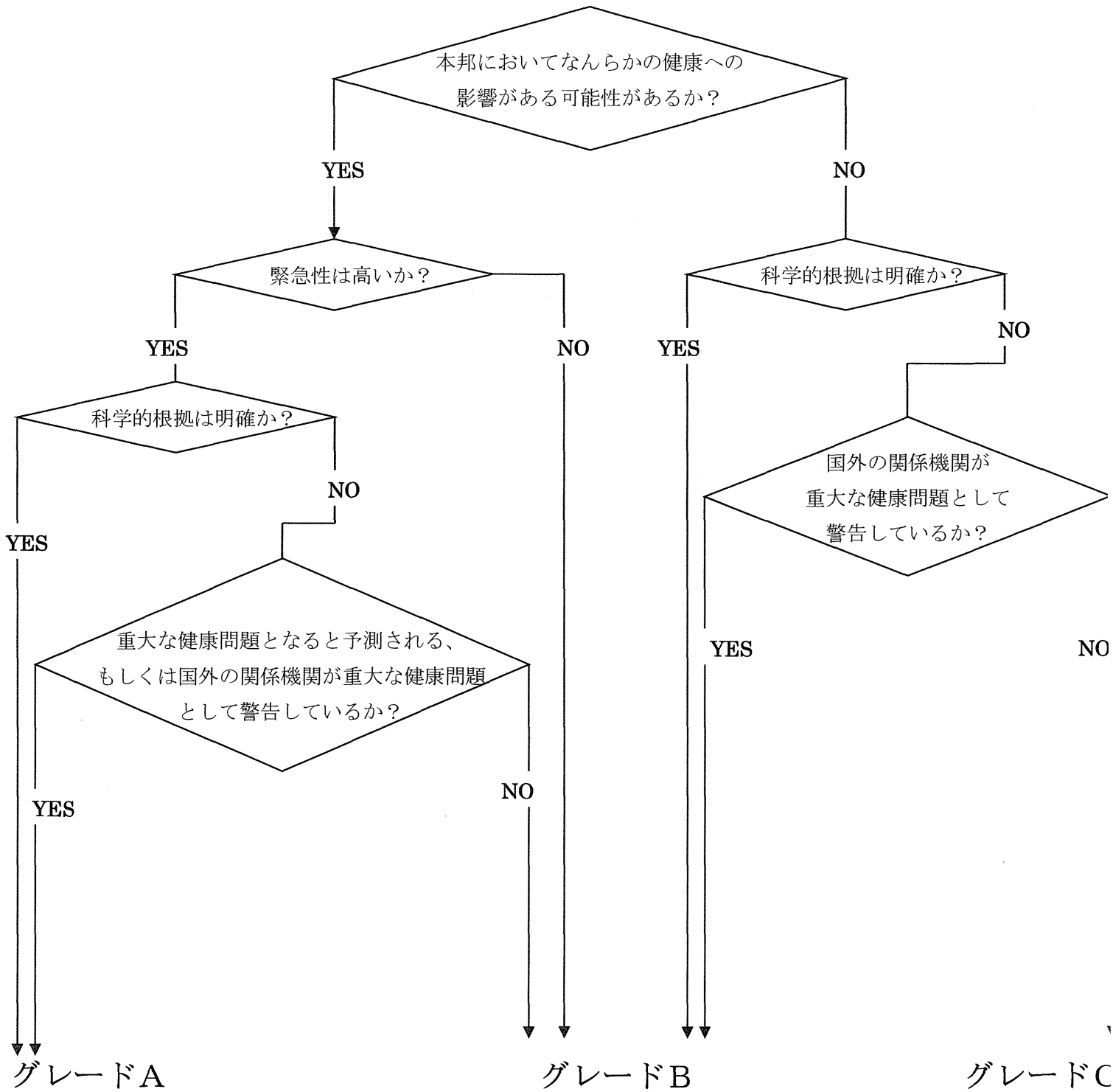
- 本邦においてなんらかの健康への影響がある可能性があるが、緊急性が低い場合。
- 本邦において健康への影響がある可能性は低い、国外の関係機関\*が重大な健康問題として警告している場合。
- 本邦において健康への影響がある可能性は低い、科学的根拠が明確である場合。

#### **グレードC 情報：参考情報**

- 本邦において健康への影響がある可能性は低く、科学的根拠も明確ではない場合。
- 既知の情報である場合。
- 国内対策が既に行われている場合。

\* 国外の関係機関とは、世界保健機関、米国食品医薬品庁、米国防疫センター等を指す。

(グレード分類 参考フロー図)



ヒト幹細胞アーカイブを活用する同種細胞を用いた新規再生医療技術の開発  
（課題番号：H25-実用化（再生）-指定-015）

「歯根膜由来間葉系幹細胞を用いた研究」

研究分担者 岩田 隆紀（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 特任講師）

研究要旨：細胞治療を多くの患者に届けるには、可能であれば他家移植を導入し、低コスト化を計る必要がある。そこで本研究では歯根膜由来間葉系幹細胞を用いて他家移植の安全性・有効性を確認し、細胞の規格標準化と凍結保存の可能性を検討した。

## A. 研究目的

私共は歯周病で失われた歯周組織の再生を成し遂げるために、患者自身の歯を抜去し、自己歯根膜細胞をシート状に加工し、欠損部位に移植してきた。小動物・大動物にてその有効性を確認したので現在臨床研究を実施している。その中で問題となったのは抜去可能な歯を持っていない患者は本治療を享受できないことと、患者間で細胞特性に個人差が大きいことであった。近年の報告では他家間葉系幹細胞を用いても免疫拒絶が起きにくく、また、移植片対宿主病においては他家間葉系幹細胞は免疫調整機能を発揮し、病状を改善することが知られてきた。そこで間葉系幹細胞の一種である歯根膜細胞を用いた他家細胞移植の有効性・安全性を検討するとともに、細胞を凍結保存するプロトコールを見出すことが本研究の目的である。

## B. 研究方法

1) 大型動物（ビーグル犬）の歯周欠損モデルを用いて、自己移植と他家移植の有効性及び安全性を比較検討した。具体的には、8頭の動物を用いて4頭は自己歯根膜細胞を、残りの4頭は他家歯根膜細胞を移植し、8週後に屠殺し、組織学的な評価を実施した。また、経時的に末梢血を採取し、免疫拒絶と相関のある炎症性タンパクをELISAにて定量した。

2) ヒト歯根膜細胞の凍結保存による性質の変

化を調査する目的で、2種類の細胞凍結保存液（セルバンカー1（血清入り）もしくはセルバンカー3（無血清））にて細胞を凍結保存し、保存後1ヶ月後、12ヶ月後に細胞を起こして品質管理試験を実施した。具体的には、継代を2回した細胞を凍結し、起こした後に継代を6回実施した。各継代時に、生細胞数・コロニー形成能・骨芽細胞分化能・脂肪細胞分化能などの基本的な細胞特性試験を実施するとともに、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製し、出荷試験に準じた検査を実施した。さらには凍結した細胞としていない細胞からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現の差を確認した。

動物を用いた実験並びにヒト細胞を用いた実験に関してはそれぞれ東京女子医科大学の動物実験倫理委員会、臨床研究倫理委員会の承認を得た後に実施した。

## C. 研究結果

1) 大型動物を用いた歯根膜細胞シートの移植実験においては、自己・他家共に歯周組織の再生が確認され、他家移植においては免疫拒絶を示すような肉眼的所見は観察されなかった。また、末梢血中のCRP, CD30, IFN- $\gamma$ , IL-10をELISAで測定したところ、両群において差は見られなかった。

2) ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の凍結融解後の細胞特性試験においては、1ヶ月、12ヶ月凍結共に継代7回までは良好に増殖したが、継代8代



では細胞増殖が低下する傾向にあった。細胞生存率・ALP 活性・分化能などには凍結期間や継代数による変化は観察されなかった。細胞凍結液による変化は観察されなかった。

#### D. 考察

1) 大型動物を用いた他家間葉系幹細胞移植による歯周組織の再生は自家移植と同等であり、著明な副作用は観察されなかったことから、ヒト臨床への移行が可能であることが示唆された。

2) 他家移植において凍結融解した細胞を用いることが必須となる。そこで本研究では2回継代した細胞を短期(1ヶ月)と長期(12ヶ月)の凍結保存を実施し、融解後の細胞特性を調査したところ、融解後5回の継代間に細胞特性の変化は観察されなかった。継代を重ねると間葉系幹細胞はその多分化能が減弱することが報告されているが、5回程度以内の継代であれば移植に供することが可能であることが示唆された。

#### E. 結論

大動物実験において他家歯根膜由来間葉系幹細胞は歯周組織の再生を促進し、有害な事象が観察されなかったことから、臨床応用可能な細胞ソースであることが示唆された。ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞は12ヶ月程度の凍結期間の後に融解しても、総継代数7回程度までは細胞特性を損なわず増殖可能であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

● Iwata et al., Tissue Engineering in Periodontal Tissue. Anat Rec (Hoboken). 297(1):16-25. 2014.

##### 2. 学会発表

● Tsumanuma et al., Allogeneic transplantation of periodontal cell sheets in a canine horizontal defect. 25<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials. Madrid, Spain. 2013.

● 岩田隆紀、他。自己培養歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再生。第13回日本再生医療学会総会。京都。

● 岩田隆紀、他。細胞シート工学を用いた組織再生の現状と未来。第103回日本病理学会総会。広島。

#### H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

現在、間葉系幹細胞のサンプル数を増やすとともに、遺伝子発現の変化を解析中である。

ヒト幹細胞アーカイブを活用する同種細胞を用いた新規再生医療技術の開発  
（課題番号：H25-実用化（再生）-指定-015）

「上皮細胞を用いた研究」

研究分担者 金井 信雄（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 特任助教）

研究要旨 細胞治療を多くの患者に届けるために、他家上皮細胞シートを用いた食道再生治療の有効性・安全性を検討し、他家上皮細胞の凍結保存の可能性を検討する。

### A. 研究目的

私共は食道がん内視鏡切除後の合併症である狭窄を予防するために、患者自身の口腔粘膜細胞から培養細胞シートを作成し、欠損部位に移植することにより早期の上皮再生ならびに狭窄を防止する食道再生治療を開発し、ヒト臨床研究を進めている。自己細胞だけでなく他家細胞の利用でも治療効果が認められるなら、患者本人の生検などが不要になるだけでなく、大量生産による組織工学製品の開発が可能となる。今回、他家細胞移植の有効性・安全性を検討するとともに、細胞を凍結保存するプロトコールを見出すことが本研究の目的である。

### B. 研究方法

1) 大型動物（NIBS系ミニブタ）の食道を内視鏡的粘膜切除し狭窄モデルを作成し、他家上皮細胞（表皮細胞）シート移植による食道再生治療の有効性および安全性を検討した。

2) ヒト口腔粘膜細胞の凍結保存による性質の変化を調査する目的で、細胞凍結保存液にて細胞を凍結保存し、保存後に細胞を起こして品質管理試験を実施する。また保存後の細胞から温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製し、出荷試験に準じた検査を実施する。さらには凍結した細胞においてRNAを抽出し、次世代シーケンサーを

用いて遺伝子発現の差を確認した。

動物を用いた実験並びにヒト細胞を用いた実験に関してはそれぞれ東京女子医科大学の動物実験倫理委員会、臨床研究倫理委員会の承認を得た後に実施した。

### C. 研究結果

1) 大型動物を用いた他家上皮細胞シートの移植実験において、自家細胞と同様に多数の他家細胞シートを移植することによって食道粘膜の早期再生と狭窄防止効果が認められた。また移植後2週間において移植された他家上皮細胞はほぼ消失し、他家細胞移植による安全性が示唆された。  
2) ヒト口腔粘膜細胞の凍結融解後の細胞特性試験においては、サンプル数を増やして研究が進行している。

### D. 考察

1) 大型動物を用いた他家上皮細胞移植による食道再生治療は、大動物において治療効果が認められたことから、ヒト臨床に移行が可能であると示唆された。  
2) 他家上皮細胞利用によるヒト臨床研究を開始するため、ヒト上皮細胞から細胞シートを安定して作成するプロトコールを開発する必要があり、凍結保存による安全性の検討を、今後サンプルを

増やし研究をしていく必要があると思われた。

#### E. 結論

大動物実験において他家上皮細胞シートによる食道再生治療は効果が認められたことから、ヒト臨床においても応用可能と示唆された。ヒト上皮細胞利用による臨床研究を開始するためには、凍結細胞から細胞シートの作成のプロトコールの開発、ならびに凍結保存による研究を進めていく必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Kanai et al. Cell sheets engineering for esophageal regenerative medicine. *Annals of Translational Medicine*. 2(3). 28. 2014.
- 金井信雄、他。普及を目指した他家細胞シート移植による食道再生医療の試み。最新医学。69(178)。185。2013

##### 2. 学会発表

- Kanai et al. Development of novel endoscopic delivery devices for cell sheets transplantation, DDW2013, Orlando USA, 2013.
- Kanai et al. Esophageal regeneration with cell sheets following ESD: Development of endoscopic delivery devices for cell sheets. UEGW. Berlin, Germany. 2013.
- 金井信雄、他。食道再生、歯周組織再生に見る炎症の役割。第13回日本再生医療学会総会。京都。2014

#### H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

研究成果の刊行物・別刷

該当なし

