

201406027A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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26年度 総括研究報告書

研究代表者 大和 雅之

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- 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
(東京女子医科大学先端生命医科学研究所 教授)

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 ----- 7
岩田隆紀
(東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 准教授)
2. 上皮細胞を用いた研究 ----- 11
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)

III. 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 17

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

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

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、本学で細胞シートのヒト臨床研究を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開発をおこなう。同種細胞ソースは大きなバッチが組め、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ため、同種細胞ソースの検討は極めて重要である。同種細胞を用いた細胞ソースとして、食道では健常ドナー由来皮膚（たとえば割礼包皮）由来表皮細胞、後者は健常ドナー抜去歯あるいは脂肪由来間葉系幹細胞を想定し、研究期間内にヒト臨床研究の開始を目指す。

研究分担者

岩田隆紀 東京女子医科大学 准教授

金井信雄 東京女子医科大学 特任助教

A. 研究目的

本研究では、平成 24 年度「iPS 細胞等の臨床研究安全基盤整備支援事業」を発展させ、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う。上記臨床研究では、培養自家細胞シートが極めて有効に食道および歯周組織の再生を促すことが明らかになった。食道はスウェーデンカロリンスカ研究所など国内外でヒト臨床 30 例が完了して

いる。歯周組織は本学において全 10 例の臨床研究が完了している。それぞれブタおよびイヌを用いた大動物実験で、細胞ソースを同種に変更しても、移植条件の最適化により、自家に遜色ない組織再生が得られている。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、再生医療の普及のためには、同種細胞ソースの検討は極めて重要である。細胞ソースは、食道では健常ドナー由来皮膚（たとえば割礼包皮や多指症の余剰指）由来表皮細胞、後者は健常ドナー抜去歯あるいは脂肪由来間葉系幹細胞を想定している。

B. 研究方法

上皮細胞シートおよび間葉系幹細胞シートの凍結融解や継代培養の条件を確立、さらに動物成分を含まない新規培養法の開発を

進める。

(倫理面への配慮)

臨床試験に関しては、「ヘルシンキ宣言 (2008年10月修正)」および「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改正)」および「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成22年11月1日全部改訂)」を遵守して実施した。また本研究期間中に「人を対象とする医学系研究に関する指針(平成26年12月)」が公表されており、平成27年4月施行以降は本倫理指針を遵守して研究を遂行していく。

C. 研究結果

【歯根由来間葉系幹細胞を用いた系】

ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞を採取し、三回継代時に市販の凍結融解液(セルバンカー®)の血清有り・血清無しの両方にて細胞を凍結した。1ヶ月後と12ヶ月後に融解したところ、両凍結液ならびに短期凍結・長期凍結の四群間の細胞生存率には有意差は見られなかった。現在N数を増やし、サンプル間での個人差等を検討している。凍結融解後に一回～五回継代したサンプルにおいて、その細胞生存率・増殖能・多分化能ならびに現在自家細胞移植で実施されている出荷時試験を実施したところ、骨芽細胞分化能は1年凍結したものでは有意に高かったが、それ以外の項目では有意差が見られなかった。また、次世代シーケンサーを用いて両群の網羅的遺伝子解析の結果から細胞の老朽化を反映する候補遺伝子を見出した。現在N数を増やし、サンプル間での個人差等を検討している。

大型動物(イヌ)を用いた他家間葉系幹細胞シートの移植に関しては、術後八週間にお

いて、著名な副作用は観察されず、有効性・安全性を確認できた。現在論文を投稿中である。

D. 考察

実際の臨床応用を想定し、凍結後12ヶ月保存などの時間のかかる作業を本研究費を用いて推敲することが出来た。12ヶ月程度であれば細胞は十分に保存可能であり、少なくともin vitroの評価系実験においては遜色のない細胞特性を継代数8代程度までは確認することが出来た。

【上皮細胞を用いた系】

大型動物(NIBS系ミニブタ)を用いた他家表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、炎症の軽減と狭窄防止効果が認められた。また移植後2週間で移植された他家表皮細胞はFISH解析等でほぼ消失しており、安全性が示唆された。

ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの凍結融解条件の研究では、これまでに行ってきた臨床研究と同様にフィーダーレイヤーを用いずに作製した細胞シートは、凍結処理により基底細胞間の結合が脆弱になっている事が観察された。一方で、フィーダーレイヤーと共培養した上皮細胞シートでは、凍結処理後も凍結保存していない細胞シート同様に基底細胞間の結合が維持されている事が確認された。

無血清培地で上皮細胞シートを作製する研究では、ラット上皮細胞シートの作製においては、無血清培地の条件でも、IL-1RAの添加およびレチノイン酸を添加することにより、血清有の条件と同等に細胞シート

の作製に成功した。学内倫理委員会の承認を経て、ボランティアドナー組織由来のヒト細胞における培養条件開発を進めている。大型動物（NIBS系ミニブタ）を用いた他家表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、炎症の軽減と狭窄防止効果が認められた。また移植後2週間で移植された他家表皮細胞はFISH解析等でほぼ消失しており、安全性が示唆された。

ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの凍結融解条件の研究では、これまでに行ってきた臨床研究と同様にフィーダーレイヤーを用いずに作製した細胞シートは、凍結処理により基底細胞間の結合が脆弱になっている事が観察された。一方で、フィーダーレイヤーと共培養した上皮細胞シートでは、凍結処理後も凍結保存していない細胞シート同様に基底細胞間の結合が維持されている事が確認された。

無血清培地で上皮細胞シートを作製する研究では、ラット上皮細胞シートの作製においては、無血清培地の条件でも、IL-1RAの添加およびレチノイン酸を添加することにより、血清有の条件と同等に細胞シートの作製に成功した。学内倫理委員会の承認を経て、ボランティアドナー組織由来のヒト細胞における培養条件開発を進めている。

D. 考察

歯根膜由来間葉系幹細胞ならびに上皮細胞による同種細胞利用の新規再生治療を早期に開始するため、上記の非臨床研究を推進した。今後はこれまでの非臨床研究を進めながら学内倫理委員会、ヒト幹細胞臨床

研究を実施するに当たっての審査に必要な各種前臨床データを取得するために以下の研究をおこなう予定である。まずインフォームド・コンセントを得たドナー由来の組織から単離した細胞をバンク化し、臨床応用に供するための種々の検査をおこなうと共に、取得したデータの解析から、今後、どの検査項目が必須であるかを確定する。次に、ドナー由来細胞から移植に供する細胞シートを作製する条件を確立する。最適化した培養条件で作製した細胞シートのキャラクタライゼーション（種々の性状観察）をおこない、出荷規格を確立する。最後に、臨床用細胞培養用クリーンルーム内でコールドラン（患者への移植はおこなわず、免疫不全小動物への移植のみおこなう）を数例おこない、申請書類の作成を研究開始から5年以内に完了する。更にはこれらの知見を元に上皮細胞並びに間葉系幹細胞の凍結融解法、有効利用法を開示していくとともに、全国の研究者に対して開かれたシステム構築を目指す方策を厚生労働省と相談を進めていく。

E. 結論

これまで本学での開発した「自己培養間葉系幹細胞シートによる歯周再生」ならびに「自己培養上皮細胞シートによる食道再生」のヒト臨床研究の経験から、同種細胞利用による新規再生治療を開発するため、ヒト臨床研究で使用した細胞を凍結保存するだけでなく、動物実験ならびにヒト細胞を利用した非臨床研究を更に推進していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

1. Suphanantachat S, Iwata T, Ishihara J, Yamato M, Okano T, Izumi Y. A role for c-Kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 35(11):3618-3626. 2014.
2. Takagi R, Kobayashi S, Yamato M, Owaki T, Kasai Y, Hosoi T, Sakai Y, Kanetaka K, Minamizato T, Minematsu A, Kondo M, Kanai N, Yamaguchi N, Nagai K, Miyazaki Y, Kohno S, Yamamoto M, Nakao K, Eguchi S, Okano T. How to prevent contamination with *Candida albicans* during the fabrication of transplantable oral mucosal epithelial cell sheets. *Regenerative therapy*, e-pub, 2015.
3. Maeda M, Kanai N, Yamato M, Kobayashi S, Hosoi T, Takagi R, Ohki T, Muragaki Y, Yamato M, Okano T. Endoscopic cell sheet transplantation device developed by using a 3D printer and its feasibility evaluation in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*. e-pub, 2015.
4. 岩田隆紀, 鷺尾薫, 大和雅之, 安藤智博, 石川烈, 岡野光夫. セルシートエンジニアリング: 歯周組織再生, 最新医学, 69(7月増刊号):1525-1533. 2014.
5. 岩田隆紀, 鷺尾薫, 大和雅之, 安藤智博, 石川烈, 岡野光夫. セルシートエンジニアリング: 歯周組織再生, 最新医学, 69(7月増刊号):1525-1533. 2014.
6. 金井信雄, 大和雅之, 山本雅一, 岡野光夫, 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 卷 3 月増刊、178-185、2014 年

7. 金井信雄, 岡野光夫. 組織工学(細胞シート)～細胞シート技術が切り拓く再生医療の実用化～, 日本移植学会 50 周年記念誌, 297-302, 2014 年
8. 金井信雄. 細胞シートを利用した食道再生治療. 先進医療 NAVIGATOR II (再生医療・がん領域の実用化への TOPICS) , 94-96, 2014 年

2. 学会発表

1. Onizuka S, Iwata T, Yamada A, Yamato M, Okano T, Izumi Y., Functional analysis of ZBTB16 during the osteoblastic differentiation of hPDL-MSCs. 92nd General Session & Exhibition of the IADR, Cape Town, South Africa, 2014/06/27
2. Kanai N, Isomoto H, Yamaguchi N, Fukuda H, Nakao K, Kobayashi S, Kanetaka K, Sakai Y, Eguchi S, Ohki T, Yamato M, Okano T. Prevention of post-ESD esophageal stricture using endoscopic transplantation of tissue-engineered analogous oral mucosal epithelial cell sheets in the end of round trip transportation between Tokyo and Nagasaki, UEGW2014, Vienna, Republic of Austria, 2014/10/21
3. Kobayashi S, Kanai N, Hosoi T, Yamato M, Okano T, Eguchi S. The analysis of esophageal mucosal healing and strictures after endoscopic submucosal dissection using allogeneic epidermal cell sheets in a porcine model. EMBO/EMBL Symposium Epithelia. Germany, 2014/8/29

4. 鷺尾薫, 黒田ほづえ, 岩田隆紀, 安藤智博, 大和雅之, 岡野光夫. ヒト歯根膜細胞シートにおける細胞凍結の影響, 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014/07/02
5. 山田梓, 岩田隆紀, 小田茂, 和泉雄一, ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における secreted frizzled-related proteins (SFRPs) の作用, 第57回春季日本歯周病学会学術大会, 2014/05/23
6. 金井信雄. シンポジウム「気管食道科から発信する新規医療」細胞シートによる食道再生治療の普及を目指して, 第66回日本気管食道科学会, 高知市, 日本, 2014年11月13日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願

1. 治療物質の運搬用器具、発明者(東京女子医科大学:前田真法、金井信雄、大和雅之、岡野光夫)、出願番号:特許 2014-046921

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- 日本歯周病学会学術賞受賞

著書 : Iwata T, Washio K, Yoshida T, Ishikawa I, Ando T, Yamato M, Okano T. Cell Sheet Engineering for Periodontal Regeneration, *New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine-Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine*, Intech, Rijeka, Croatia, 1-17. 2014.

発行 : 2014年9月

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

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 准教授

研究要旨

間葉系幹細胞はその多分化能のみならず、血管新生促進作用や抗炎症性、免疫調節機能など様々な効能を持ち、また免疫原性が低いことから、様々な疾患に臨床応用され、また他家移植での安全性も確立されつつある。そこで、本研究では間葉系幹細胞を他家で利用する際に必須であると考えられる凍結融解法の決定と、融解後の間葉系幹細胞の機能特性を評価することにより、継代が与える影響を解析した。また、凍結融解した間葉系幹細胞を大型動物に他家移植するトランスレーショナルリサーチを実践し、その安全性と有効性を確認した。

A. 研究目的

東京女子医科大学では、今年度までに 2 つの臨床研究（「自己ヒト歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再建」と「早期食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後食道潰瘍への自家口腔粘膜上皮細胞シート移植の臨床研究」）が実施され、その安全性と有効性が確認されつつある。さらなる適応症の拡大のためには、現在自己細胞で実施されている臨床研究を他家細胞に切り替えることが出来れば、自家細胞のコストの問題を解決出来るものと考えられる。そこで本研究ではインフォームドコンセントのうちに、口腔外科外来で容易に入手可能な抜去歯より歯根膜組織を採取し、間葉系幹細胞を抽出した。本細胞を用いて間葉系幹細胞の凍結融解条件並びに継代数による特性変化を検索することで他家間葉系幹細胞移植の礎となるデータの蓄積を目指した。

B. 研究方法

凍結融解した細胞の臨床応用を目標に、インフォームドコンセントの得られた患者よりヒト歯根膜由来間葉系幹細胞を採取し、三回継代時に市販の凍結融解液（セルバンカー®）の血清有り・血清無しの両方にて細胞を凍結し、1 ヶ月後と 12 ヶ月後に融解し、その細胞増殖、多分化能、継代による特性変化を解析した。

また、凍結融解後二回継代したサンプル（計五回継代）、ならびに七回継代したサンプル（計十回継代）よりトータル RNA を採取し、次世代シーケンサーを用いて両群の網羅的遺伝子解析を実施した。

また大型動物（イヌ）に間葉系幹細胞シートを他家移植し、その有効性ならびに安全性を解析した。

（倫理面への配慮）

臨床試験に関しては、「ヘルシンキ宣言（2008 年 10 月修正）」および「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日改正）」

を遵守し、本学倫理委員会の承認後に研究を開始した。開始時に試験担当医師は被験者本人に対し、試験内容を十分に説明し、本試験への参加について文書により被験者本人の自由意思によって同意を取得した。

C. 研究結果

ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞を採取し、三回継代時に市販の凍結融解液（セルバンカー®）の血清有り・血清無しの方にて細胞を凍結した。1ヶ月後と12ヶ月後に融解したところ、両凍結液ならびに短期凍結・長期凍結の四群間の細胞生存率には有意差は見られなかった。現在N数を増やし、サンプル間での個人差等を検討している。凍結融解後に一回～五回継代したサンプルにおいて、その細胞生存率・増殖能・多分化能ならびに現在自家細胞移植で実施されている出荷時試験を実施したところ、骨芽細胞分化能は1年凍結したものでは有意に高かったが、それ以外の項目では有意差が見られなかった。また、次世代シーケンサーを用いて両群の網羅的遺伝子解析の結果から細胞の老朽化を反映する候補遺伝子を見出した。現在N数を増やし、サンプル間での個人差等を検討している。

大型動物（イヌ）を用いた他家間葉系幹細胞シートの移植に関しては、術後八週間において、著名な副作用は観察されず、有効性・安全性を確認できた。現在論文を投稿中である。

D. 考察

実際の臨床応用を想定し、凍結後12ヶ月保存などの時間のかかる作業を本研究費によって遂行することが出来た。12ヶ月程度

であれば細胞は十分に保存可能であり、少なくとも *in vitro* の評価系実験においては遜色のない細胞特性を継代数8代程度までは確認することが出来た。

E. 結論

間葉系幹細胞は凍結融解や継代に伴ってその劣化が進むと考えられており、薬として考えた場合、その品質と有効性を担保しうるマーカーなどの選定が必須である。本年度の研究では凍結融解や継代が品質に与える影響を確認し、有効性を担保する候補遺伝子の絞り込みを進めることが出来た。来年度以降は個々の遺伝子の機能解析を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

- (1) Suphanantachat S, Iwata T*, Ishihara J, Yamato M, Okano T*, Izumi Y. A role for c-Kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 35(11):3618-3626. 2014.
- (2) 岩田隆紀, 鷺尾薫, 大和雅之, 安藤智博, 石川烈, 岡野光夫. セルシートエンジニアリング：歯周組織再生, *最新医学*, 69(7月増刊号):1525-1533. 2014
- (3) 岩田隆紀, 大和雅之, 岡野光夫. 細胞シートによる再生医療実現プロジェクト, *病院*, 73(7):551-555. 2014

2. 学会発表

- (1) 鷺尾薫, 黒田ほづえ, 岩田隆紀, 安藤智博, 大和雅之, 岡野光夫., 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014/07/02
- (2) Onizuka S, Iwata T, Yamada A, Yamato M, Okano T, Izumi Y., Functional analysis of ZBTB16 during the osteoblastic differentiation of hPDL-MSCs. 92nd General Session & Exhibition of the IADR, Cape Town, South Africa, 2014/06/27
- (3) 山田梓, 岩田隆紀, 小田茂, 和泉雄一., ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における secreted frizzled-related proteins (SFRPs) の作用, 第57回春季日本歯周病学会学術大会, 2014/05/23

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- 日本歯周病学会学術賞受賞

著書：Iwata T, Washio K, Yoshida T, Ishikawa I, Ando T, Yamato M, Okano T. Cell Sheet Engineering for Periodontal Regeneration, *New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine-Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine*, Intech, Rijeka, Croatia, 1-17. 2014.

発行：2014年9月

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

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

本学では食道表在がんにおける広範囲内視鏡的粘膜切除に伴う課題を解決するため、これまで自己上皮細胞を用いた細胞シート食道再生治療の開発を行い、ヒト臨床を国内外で30症例行ってきた。自己細胞を利用した治療においてはPMDAと相談を重ね、今後は治験へ移行を計画しているが、同種上皮細胞を用いた細胞シートによる食道再生治療を開発するため、動物実験による非臨床研究を推進し、研究期間内に特定認定再生医療等委員会への申請準備を進め早期のヒト臨床研究の開始を目指す。

A. 研究目的

食道表在がんにおける広範囲内視鏡的粘膜切除に伴う課題を解決するため、これまで自己上皮細胞を用いた細胞シート食道再生治療の開発を進め、ヒト臨床を国内外で30症例行ってきた。さらにこの系の細胞シート再生治療を低コストで多くの患者に提供していけるように、同種上皮細胞を用いた細胞シートによる食道再生治療を開発する。

B. 研究方法

食道への他家表皮細胞シートによる食道再生治療の有効性と免疫拒絶の評価研究は、大動物（ミニブタ）を用いておこなった（東京女子医科大学動物実験 14-69 承認）。

ヒト上皮細胞の凍結融解条件の確立研究は、ヒト口腔粘膜上皮細胞シートを作製、凍結し、組織学的解析を行った。

安定して他家表皮細胞シートを作製するため、牛胎児血清（FBS）を使用しない無血

清培地での表皮細胞シートの培養条件の開発研究は小動物からヒト上皮細胞を使用して行った。

（倫理面への配慮）

動物実験に際し、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準じて施行し、本研究の動物実験は学内の承認をもって施行された（14-69）。

C. 研究結果

大型動物（NIBS系ミニブタ）を用いた他家表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、炎症の軽減と狭窄防止効果が認められた。また移植後2週間で移植された他家表皮細胞はFISH解析等でほぼ消失しており、安全性が示唆された。

ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの凍結融解条件の研究では、これまでに行ってきた臨

床研究と同様にフィーダーレイヤーを用いずに作製した細胞シートは、凍結処理により基底細胞間の結合が脆弱になっている事が観察された。一方で、フィーダーレイヤーと共培養した上皮細胞シートでは、凍結処理後も凍結保存していない細胞シート同様に基底細胞間の結合が維持されている事が確認された。

無血清培地で上皮細胞シートを作製する研究では、ラット上皮細胞シートの作製においては、無血清培地の条件でも、IL-1RAの添加およびレチノイン酸を添加することにより、血清有の条件と同等に細胞シートの作製に成功した。学内倫理委員会の承認を経て、ボランティアドナー組織由来のヒト細胞における培養条件開発を進めている。

D. 考察

小動物、大動物さらにヒト細胞を用いた非臨床研究の方向性は、同種細胞による再生治療の実現に向けて、自己細胞を利用したプライマリーの培養条件だけでなく、細胞保存の条件検討、培養方法の検討、出荷品質規格および移植方法にまで及んでいる。さらに研究を推進するためには、安定してヒト細胞を入手し条件検討をしていく必要があるため、他の幹細胞アーカイブ施設と連携していくことも検討している。

E. 結論

新法に則した他家上皮細胞シートを用いた臨床研究の準備を進める。再生医療関連法律の改定にともない、特定細胞加工物の製造許可、特定認定再生医療等委員会などの周辺環境の整備を学内で整えると共に、ヒト上皮細胞を扱った研究を進めるため、

倫理審査の準備を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

1. Maeda M, Kanai N, Yamato M, Kobayashi S, Hosoi T, Takagi R, Ohki T, Muragaki Y, Yamato M, Okano T. Endoscopic cell sheet transplantation device developed by using a 3D printer and its feasibility evaluation in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*. e-pub, 2015.
2. Takagi R, Kobayashi S, Yamato M, et al. How to prevent contamination with *Candida albicans* during the fabrication of transplantable oral mucosal epithelial cell sheets. *Regenerative therapy*, e-pub, 2015.
3. 金井信雄, 大和雅之, 山本雅一, 岡野光夫, 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巻3月増刊、178-185、2014年
4. 金井信雄. 細胞シートを利用した食道再生治療. 先進医療 NAVIGATOR II (再生医療・がん領域の実用化への TOPICS) , 94-96, 2014年
5. 金井信雄, 岡野光夫, 組織工学(細胞シート)～細胞シート技術が切り拓く再生医療の実用化～、日本移植学会50周年記念誌、297-302、2014年

2. 学会発表

1. Kobayashi S, Kanai N, Hosoi T, Yamato M, Okano T, Eguchi S. The analysis of esophageal mucosal healing and strictures after endoscopic submucosal dissection using allogeneic epidermal cell sheets in a porcine model. EMBO/EMBL Symposium Epithelia. Germany, 2014/8/29
2. Isomoto H, Yamagushi N, Fukuda H, Nakao K, Kobayashi S, Kanetaka K, Sakai Y, Eguchi S, Kanai N, Ohki T, Yamato M, Okano T. Prevention of post-ESD esophageal stricture using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in the end of round trip transportation between Tokyo and Nagasaki, UEGW2014, Vienna, Republic of Austria, 2014/10/21
3. シンポジウム 1 「気管食道科から発信する新規医療」細胞シートによる食道再生治療の普及を目指して、第 66 回日本気管食道科学会、高知市、日本、2014 年 11 月 13 日

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願
2. 治療物質の運搬用器具、発明者（東京女子医科大学：前田真法、金井信雄、大和雅之、岡野光夫）、出願番号：特許 2014-046921
2. 実用新案登録
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

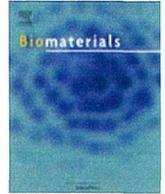
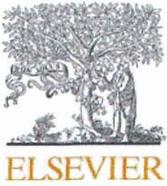
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suphanantachat S, Iwata T, Ishihara J, Yamato M, Okano T, Izumi Y	A role for c-Kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells	Biomaterials	35(11)	3618-3626	2014
Takagi R, Kobayashi S, Yamato M, Owaki T, Kasai Y, Hosoi T, Sakai Y, Kanetaka K, Minamizato T, Minematsu A, Kondo M, Kanai N, Yamaguchi N, Nagai K, Miyazaki Y, Kohno S, Yamamoto M, Nakao K, Eguchi S, Okano T	How to prevent contamination with <i>Candida albicans</i> during the fabrication of transplantable oral mucosal epithelial cell sheets	Regenerative therapy		1-4	2015
Maeda M, Kanai N, Yamato M, Kobayashi S, Hosoi T, Takagi R, Ohkita T, Muragaki Y, Yamamoto M, Okano T	Endoscopic cell sheet transplantation device developed by using a 3D printer and its feasibility evaluation in a porcine model	Gastrointestinal Endoscopy	In press	In press	2015
岩田隆紀, 鷺尾薫, 大和雅之, 安藤智博, 石川烈, 岡野光夫	セルシートエンジニアリング：歯周組織再生	最新医学	69(7月増刊号)	1525-1533	2014
金井信雄, 大和雅之, 山本雅一, 岡野光夫	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(3月増刊号)	178-185	2014
岩田隆紀, 大和雅之, 岡野光夫	細胞シートによる再生医療実現プロジェクト	病院	73(7)	551-555	2014

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
金井信雄, 岡野光夫	組織工学(細胞シート)～細胞シート技術が切り拓く再生医療の実用化～	日本移植学会50周年編集委員	日本移植学会50周年記念誌	日本移植学会	日本	2014	297-302
金井信雄	細胞シートを利用した食道再生治療	先進医療フォーラム	先進医療NAVIGATORⅡ(再生医療・がん領域の実用化へのTOPICS)	日本医学出版	日本	2014	94-96
Iwata T, W ashio K, Y oshida T, I shikawa I, Ando T, Y amato M, Okano T.	Cell Sheet Engineering for Periodontal Regeneration	Hideharu Hi bi and Mino ru Ueda	New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine -Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine	Intech	Rijeka, Croatia	2014	1-17

IV. 研究成果の刊行物・別刷



A role for c-Kit in the maintenance of undifferentiated human mesenchymal stromal cells



Supreda Suphanantachat^{a,b,d}, Takanori Iwata^{b,*}, Jun Ishihara^{b,c}, Masayuki Yamato^b, Teruo Okano^{b,*}, Yuichi Izumi^{a,d}

^a Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

^b Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University (TWMU), 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

^c Division of Cellular Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo (IMSUT), 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

^d Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases (GCOE Program), Tokyo Medical and Dental University, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2013

Accepted 10 January 2014

Available online 24 January 2014

Keywords:

Mesenchymal stromal cells

Periodontal ligament

c-Kit receptor

Stem cell factor

Growth factors

Cell differentiation

ABSTRACT

The multipotency of human mesenchymal stromal cells (hMSCs) and the feasibility of deriving these cells from periodontal ligament hold promise for stem cell-based tissue engineering. However, the regulation of adult hMSCs activity is not well understood. The present study investigated the c-Kit surface receptor and downstream gene expression in hMSCs. The c-Kit-positive population showed increased colony-forming ability rather than differentiation potential. The knockdown of c-Kit and/or stem cell factor (SCF) genes enhanced alkaline phosphatase activity and also upregulated osteoblast- and adipocyte-specific genes, including osteocalcin, runt-related transcription factor 2, osteopontin, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , and lipoprotein lipase. Stimulation with growth factors, including fibroblast growth factor-2, transforming growth factor- β 1, and enamel matrix derivative significantly suppressed the mRNA expression of c-Kit. These results support an emerging understanding of the roles of the c-Kit/SCF signal in maintaining the undifferentiated stage of hMSCs by inhibiting the expression of lineage-specific genes in hMSCs and regulating the effect of growth factors on the proliferation and differentiation of hMSCs. The modulation of c-Kit/SCF signaling might contribute to future regenerative approaches in controlling both the stemness and differentiation properties of hMSCs.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cells (PDL-MSCs) are considered to be a promising somatic stem cell source. Earlier evidence reveals that PDL-MSCs have the potential to differentiate into bone, cementum, and PDL fibers *in vivo*, and have both adipogenic and chondrogenic potential *in vitro* [1–6]. The heterogeneous cell population in PDL tissue suggests that the progenitor cells reside within the niche where stem cell homeostasis and activity is controlled [5,7]. However, the primitive population of human PDL-MSCs and the mechanisms that control cell stemness and differentiation have not been well identified. Although several surface receptors such as STRO-1, CD146,

and CD271 have been proposed as the candidate markers of human MSCs (hMSCs) [5,8–12], it is still controversial to use these markers as a standard stem cell marker for an isolation of hMSCs. This leads to the problems in research and therapeutic application of hMSCs. To understand the mechanism for controlling stemness of hMSCs and improving treatment modalities, it is crucial to identify the marker of stemness in hMSCs.

c-Kit (CD117) is a type-III receptor tyrosine kinase that transduces cell signaling events by binding its ligand, stem cell factor (SCF) [13]. Signaling events downstream of c-Kit regulate cell proliferation, differentiation, chemotaxis, cell adhesion, and apoptosis [14–17]. The c-Kit receptor has been regarded as a critical marker of hematopoietic stem cells (HSCs) due to its specific expression in the progenitor compartment of HSCs [18,19]. Nonetheless, approximately 1% of c-Kit-positive (c-Kit⁺) population is also found in stem cells derived from human mesodermal/mesenchymal tissues [20–22]. Furthermore, SCF is expressed in hMSCs and helps to support the growth and differentiation of HSCs [23]. However, the role of c-

* Corresponding authors. Tel.: +81 3 5367 9945x6201; fax: +81 3 5359 6046.

E-mail addresses: iwata.takanori@twmu.ac.jp (T. Iwata), okano.teruo@twmu.ac.jp (T. Okano).