

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」を進展させ、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。それぞれプ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 巻 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 (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 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. 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

発行：2014年9月

4. 鷲尾薫, 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.

