

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のちに、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, 鷲尾薫, 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 (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

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

