

# 特集 I

## TWInsプロジェクト紹介

# 先端融合領域イノベーション 創出拠点形成プログラム 「再生医療本格化のための 最先端技術融合拠点」

東京女子医科大学 先端生命医学研究所

金井 信雄、小林 純

Nobuo Kanai, Jun Kobayashi

## 1. はじめに

細胞シートティッシュエンジニアリングセンター(CSTEC)は、細胞シートによる組織工学、再生治療の実現を通してイノベーションを起こすことを目的とした研究拠点であり、平成18年度から開始した文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「再生医療本格化のための最先端技術融合拠点」の支援の下で実施されてきた10年プロジェクトである。また、本プロジェクトは企業とのマッチングファンドであり、協働機関である大日本印刷株式会社、株式会社セルシード、株式会社日立製作所からも継続的な支援をいただいている。現在、プロジェクト10年目を迎えており、プロジェクト全体の成果を総括するための総仕上げの時期を迎えている。これまでの10年間の成果を年表形式でわかりやすくまとめるとともに、成果報告書を作成するためのタスクフォースを立ち上げて議論を開始しているところである。過去10年間を振り返ると、数多くの研究者が携わり、膨大な数の論文、成果

発表がなされた。それだけでなく、基礎から臨床まで幅広い研究が展開されたということに改めて実感する。その総括は来年に譲るとして、本稿では、現在進行中である研究の中から、次世代温度応答性培養基材と、食道再生に関する研究開発について報告する。

## 2. 新規基材グループの活動状況

東京女子医科大学が開発した温度応答性培養皿の作製技術をもとに、株式会社セルシードが平成20年9月から商品名「UpCell®」のグローバル販売を開始している。この第一世代型温度応答性培養皿を利用して作製した単層あるいは数層の細胞シートは、角膜上皮、心筋、食道、歯根膜、軟骨、中耳疾患の再生治療を実現してきた。次世代の組織工学的再生治療として、細胞成分に富み、複雑な構造をもつ肝臓、心臓のような組織・臓器の治療が注目されている。本プロジェクト新規基材グループは、細胞外マトリックス(ECM)の模倣、さらに細胞の配向性が制御された単層細胞シート作

製のための次世代型温度応答性培養基材を開発し、これらを積層化して機能的な3次元組織を構築するため技術を開発してきた(図1)。

例えば、組織工学的手法による肝細胞組織再生は、血友病など肝疾患の治療のみならず、薬物スクリーニングのための生体外組織モデルとしての応用が期待される。しかし、いったん肝臓から肝細胞を取り出すと、培養時間の経過とともにその生存率や機能が著しく低下するという問題点がある。肝機能維持のためには、ECMや細胞間接着、増殖因子などの生体内細胞周囲環境を培養系で再現することが必要と考えられる。そこで、上記の視点から肝細胞機能維持のための次世代型温度応答性培養基材を設計した。具体的には、ヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様増殖因子(HB-EGF)をアフィニティー結合したヘパリン機能化温度応答性細胞培養基材を作製した。EGFやHB-EGFなど増殖因子が培地中に含まれない場

合、肝細胞は機能維持できず培養時間の経過ともなって肝細胞の接着細胞数が減少した。一方、HB-EGF結合ヘパリン温度応答性培養表面を用いると、ECMや細胞膜表面のプロテオグリカンが増殖因子の安定性や活性を向上させるのと同様に、播種した肝細胞は培養4日後でも接着が維持された。また、温度を45分間20℃に低下することにより、肝細胞シートを回収することができた。さらに、肝細胞の代表的な機能であるアルブミン産生能は、HB-EGF結合ヘパリン温度応答性培養表面上で有意に亢進した。このことから、HB-EGF結合ヘパリン固定化温度応答性培養表面を用いることによって、肝細胞シートの機能維持を促すことが期待される。よって、機能維持および低温処理による肝細胞シートの脱着の両方を可能とする結合ヘパリン固定化温度応答性培養表面を開発することに成功した。

また、肝臓は複数の細胞種からなり、マイクロ

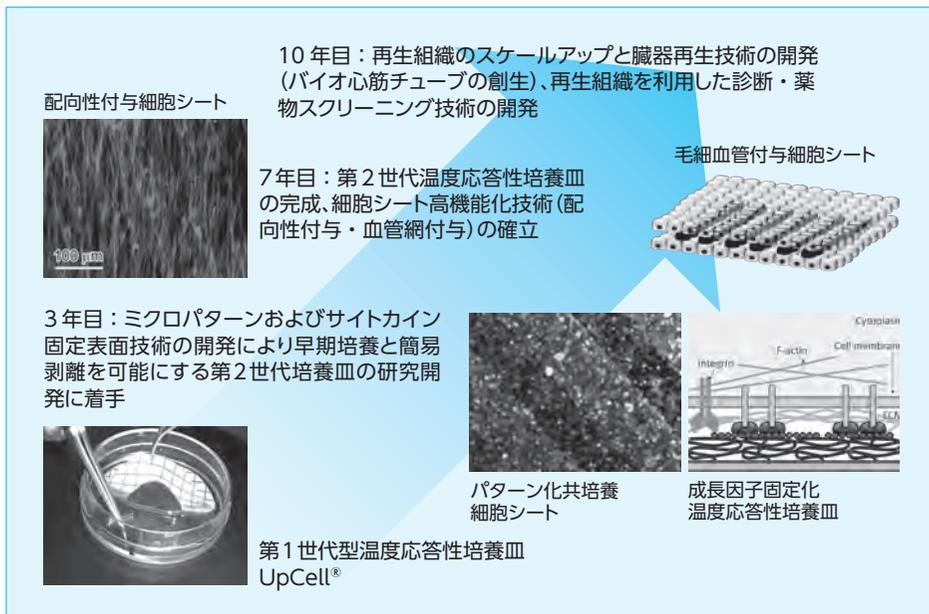


図1 新規基材グループの達成目標

メートルスケールで精密に配列されている。微細加工技術を駆使して、温度応答性培養基材上に2次元的な細胞外マトリックス、あるいは相転移温度の異なる温度応答性高分子のマイクロパターンを形成し、肝細胞／非実質細胞マイクロパターンを培養することができる。非実質細胞との共培養でアルブミン再生能などの肝機能が向上した。さらに、温度を20℃に低下させることで、肝／非実質細胞共培養パターン化シートとして回収が可能である。将来的には、機能維持され、2次元配列された肝細胞シートを積層化し、より機能的な立体肝組織構築が期待される。

さらに、配向性を制御した筋組織構築などにも取り組んでいる。心筋組織や筋肉など、生体内においていくつかの生体組織は特異な配向性を有している。このような組織特有の配向性を組織工学的手法により再現することができれば、より高度な再生治療の実現が期待される。そこで、配向組織を細胞シート工学により作製することを目的とし、培養基材表面微細加工による細胞シートへの配向性付与に関する研究に取り組んでいる。表面開始型可逆的付加開裂連鎖移動重合法(RAFT重合法)によって調製される温度応答性高分子ブラシは、そのブラシ末端に反応性基を有しており、さらなる重合反応で異種の高分子をグラフトすることができる。そこで、PIPAAmブラシ末端から親水性高分子poly(*N*-acryloylmorpholine) (PACMo)をさらにグラフトさせ、PIPAAm-*b*-PACMo共重合体からなるブラシ表面を作製した。50μm間隔でストライプ状PIPAAm/PIPAAm-*b*-PACMoの表面化学的なマイクロパターン表面を作製したところ、細胞はストライプパターン状のPIPAAmに接着し、その後に親水性高分子領域に接着した。このような、細胞の時間差的な接着の違いを利用することで、配向性を有する筋芽細胞シートを作製することに成功した。さらに、低温培養(20℃)によ

て細胞シートを回収することができ、ゼラチンをコートした細胞シートマニピュレーターを用いると配向性を維持したまま積層化することができる。配向筋芽細胞シートを積層化した三次元組織内において、筋芽細胞がその配向性を自発的に再構築することを発見した。さらに、同様の手法を用いることにより、骨格筋筋芽細胞の配向方向を制御することができる。異方性筋芽細胞シートを通常の筋芽細胞シート上に積層すると、ランダムに伸展していた下層の筋芽細胞は最上層の配向性に沿って再配列することを見出した。このような挙動は支持体により構築された三次元組織内においては確認されず、細胞と細胞外マトリックスのみから成るフレキシブルな三次元組織に配向性を付与することによって初めて観察される。生体内の骨格筋組織は筋繊維が同一方向に配向した構造を持っており、力学的特性を発揮するために重要な要素となっている。細胞が構造を自己制御できるフレキシブルな組織を構築することで、生体を模倣した複雑な挙動を示す三次元組織として機能することが示唆された。また、配向筋芽細胞シート間に血管内皮細胞や神経細胞の懸濁液を播種して積層化すると、筋芽細胞の方向に沿って血管内皮細胞と神経細胞が配向するので、より生体に近い骨格筋組織の構築につながると考えられる。したがって、細胞シートの積層化による組織構築技術は、複雑な三次元組織の機能解明にとって有効な手段となると期待できる。

### 3. 食道再生グループの 開発状況

2014年11月、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(略称：医薬品医療機器等法、以下：薬機法)及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(略称：

再生医療等安全性確保法、以下：再生医療新法）が施行され、これまで医薬品の開発においては欧米に比べ後進国と言われていたが、再生医療等製品においては世界中のアカデミアや製薬企業からも注目される新制度が整備されるにいたっている。食道再生グループでは、これまで細胞シート製造管理、品質安全、そして細胞シート移植デバイス開発など一連の細胞シート技術開発を進めてきており、薬機法のもと再生医療等製品としての自己口腔粘膜細胞シートによる食道再生治療を日本だけでなく世界中の患者さんに届けることを目標にCSTECでの活動を行ってきた。

基礎研究を進め、食道再生治療のFirst in Humanであるヒト臨床研究（単群探索的試験）は2008～2010年に10症例施行された。この臨床研究の対象は早期食道がんで、内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）により広範囲切除に及び、術後に狭窄のリスクがある患者で、すべての細胞シートの

製造が当研究所で設定した出荷試験をクリアするとともに、経内視鏡的移植に成功した。欧州での展開としてバレット食道の内視鏡治療後の粘膜再生を目的としたホスピタルエグザンプションが2012～2014年にスウェーデンカロリンスカ研究所で10症例行われた。ほぼ同時期に国内では患者口腔粘膜組織、患者血清、細胞シートを空輸しての食道再生治療のヒト臨床研究が2013～2014年に長崎大学と共同で10症例施行された。これは長崎大学で口腔組織と血清を採取し、東京女子医大のセルプロセッシングセンター（CPC）に輸送し16日間培養して細胞シートを作製、再び長崎へと輸送し、長崎大学で食道広範囲ESD後に移植する研究で、1000km以上離れた施設においても、組織工学製品（細胞シート）を輸送する影響により安全性が損なわれることがなかった。今後、これら開発された技術を結集して国内外の拠点機関とネットワークを形成し、世界の患者に向けた

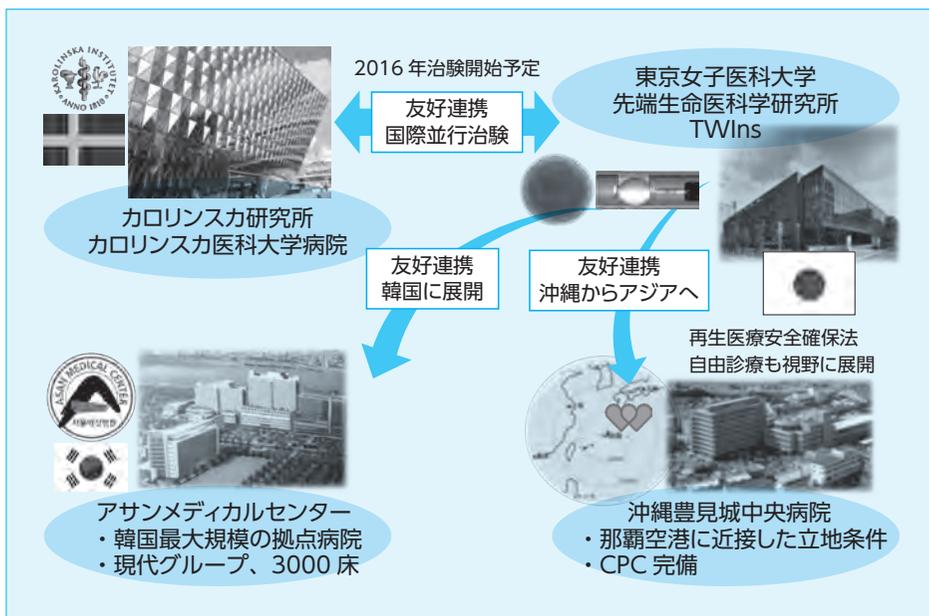


図2 世界の患者に向けた食道再生治療ネットワーク

食道再生治療の普及を目指している。(図2)

ばらばらな細胞を利用した再生治療の移植方法は、一般的に細胞懸濁液を注射器などで患部に注入するといった方法が選択される。しかし組織工学によって作り出された細胞シートではこのような移植方法を選択することが困難である。それだけでなく、培養皿から回収された細胞シートの移植に至るまでの取り扱いにおいても、慣れや高度な技術が要求され、これまではハンドリング操作は十分確立されていなかった。

前述の国内外のヒト臨床研究の結果では、安全性だけでなく有効性も認められていたことから、今後は企業治験への移行を想定しており、薬事承認後の普及のためには担当する医師の力量を問わず、誰でも移植可能な移植器具の開発が必須であった。医工連携拠点である本研究所では、これまで種々の細胞シート移植器具の開発を行ってきており、大動物での移植実験を経て、安定して細胞シート移植が可能な移植器具の開発に成功した。この移植器具は細胞シート食道再生の企業治験実施において、細胞シート製品のコンビネーション製品として申請を予定しており、国内民間企業10社の協力を得て製造される見込みである。そして移植器具だけでなく、細胞シートの取扱いに関する周辺器具の開発も行っており、培養皿から移植器具までのハンドリング操作を容易とした周辺器具も開発されている。

「自己上皮細胞シート製品を用いた食道再生治療」の今後の展開として、株式会社セルシードに技術移転を行い薬機法の下で早期の治験開始を目指し、PMDAと薬事戦略相談を進めている。ま

たスウェーデンでも同製品をもちいたパレット食道再生治療の治験開始を2016年中に目指し、欧州規制当局とも相談を進めている。さらに再生医療新法の下で先天性食道閉鎖症術後の再狭窄予防を目的とした「自己上皮細胞シート」を用いたFirst in manのヒト臨床研究も成育医療研究センターと連携して準備を進めている。新制度の施行により再生医療が迅速かつ円滑に実施できる環境は整いつつあり、その有効性および安全性を最新の科学的知見に基づき予測・評価および判断していくことで細胞シート技術を土台とした新規組織工学製品が数多く創出されていくことを期待している。

## 4. おわりに

上述のように、本拠点は、基礎、工学研究者と医師らの技術とアイデアを結集させ、細胞シート再生医療の実現に向かって我が国のみならずグローバルに展開することを実現してきた。前臨床段階であった食道、歯根膜細胞シート再生治療は、この10年間で臨床研究を開始するまでに至り、協働機関との共同研究によって製品化目前までに迫っている。また、臨床研究の推進のみならず、新規基材や心臓、肝臓、脾臓、子宮組織、腎臓など新しい組織再生治療を実現するための次世代の基礎研究技術も続々と開発してきた。今後も本拠点を益々強化、発展させ、イノベーションを生み出すべく研究教育活動を持続していくことがきわめて重要であると考えます。