

(TWInsプロジェクト紹介<特集III>)プロジェクトの
活動推進状況日中韓フォーサイト事業「難治性疾患
の再生治療におけるナノバイオマテリアルと送達技
術戦略」の活動報告

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-11-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 秋山, 義勝 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.20780/00031728

プロジェクトの活動推進状況

日中韓フォーサイト事業

「難治性疾患の再生治療における ナノバイオマテリアルと 送達技術戦略」の活動報告

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

秋山 義勝

Yoshikatsu Akiyama

1. はじめに

再生医療は今後の発展および産業化が期待されている先端医療分野のひとつであり、特に心臓、肝臓、軟骨等の再生を目的とした技術開発が各国の研究機関において精力的に進められている。さらに近年の幹細胞技術の躍進に伴い、細胞を用いた医療技術はその可能性を大きく広げている。一方、細胞を用いた再生治療の多くは、細胞懸濁液を患部に直接注入する方法をとっているが、移植細胞が患部に十分に生着しないこと、さらに血中に細胞を注入した場合、肺塞栓等のリスクが発生することが問題である。

このような中、東京女子医科大学 岡野光夫特任教授(前 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長)、大和雅之教授、清水達也教授(現 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長)らが確立した細胞シート技術は、現在最も有望な細胞移植および再生治療技術として注目されている。温度応答性培養皿を用いて作製されるシート状の細胞組織(細胞シート)はこれまでの

細胞治療とは異なり、生化学的物性を維持した状態の細胞を移植できるため、細胞移植効率およびその治療効果を飛躍的に向上させることができ、これまでに角膜、心筋、食道、歯根膜、軟骨の臨床応用に成功している。本事業では、このような成果を基に細胞シート再生治療技術をベースにして、細胞シート/生体材料/生理活性分子の最適な組み合わせにより、難治性疾患を対象とした次世代型再生治療システムの構築を目指している。天津医科大学(中国)のVictor C. Yang教授が構築した生理活性分子のデリバリーシステムと、梨花女子大学校校(韓国)のSeung Jin Lee教授らが作製したスキャフォールド技術を利用すれば、標的部位に効率よく作用するデリバリーシステムを構築できると期待される。各研究機関で培った技術はいずれも再生医療技術を向上させるために大きな役割を果たすと考えられる。本事業を通じて3カ国の技術を結集させ、細胞シートとスキャフォールドを組み合わせた新しいタイプの細胞/高分子材料に対して緻密に制御されたドラッグデリバリーシステムを組み込み、これらの相乗効果によってのみ実現できる難治性疾患の治療技術確

立を目指すとともに、実践的な共同研究課題を通じた人材交流を通じ、地域共通の課題解決に資する研究及び優秀な若手研究者の育成のためのアジア地域の国際的なバイオマテリアル拠点形成を目的としている。

2. 各国の研究体制とこれまでの交流活動について

本事業の実施期間は平成25年8月～平成30年8月であり、日中韓の拠点機関を中心に進められる。日本側は東京女子医科大学の大和雅之教授(拠点責任者)が拠点リーダーとなり国内10カ所の大学・研究機関が協力機関として、韓国側は梨花女子大学校(拠点責任者: Seung Jin Lee教授)を中心に、他15カ所の大学・研究機関が、中国側は天津医科大学(拠点責任者: Victor C. Yang教授)を中心に、他3カ所の大学が協力機関として参画し、日中韓の三カ国で約80名の教員・研究者・学生が参加している国際的な共同研究プログラムとなっている(平成28年12月現在)(表1)。

これまで実施した研究者交流について紹介したい。本事業の開始にあたり、三カ国でのキックオフミーティングを平成26年2月26日に韓国(ソウル)で開催し、日中韓の参加メンバーが初めて一

同に会した。本研究プログラムの実質的なリーダーであるVictor C Yang教授を中心に本研究プログラムの意義とプロジェクト五カ年の進捗報告会や国際シンポジウム開催時期について確認した。具体的には、年1回の国際シンポジウム(これまでの開催数は3回)と年2回のA3 one-day meeting(これまで5回の会合を開催)を日中韓が持ち回りで企画、開催することとなった。A3 one-day meetingでは各国の若手研究者、学生の研究発表だけでなく、主催国の協力機関等のシニア研究者からの先端研究を分かりやすく紹介していただいた。研究者交流の人的交流を重ねることで、日中韓の先端研究だけではなく、文化背景についても触れることができ各国の学生にとっては、国際感覚を養う上では刺激的なプログラムであると感じている(図1)。

開催した3回の国際シンポジウムでは(第1回開催 韓国(梨花女子大学校)(平成26年2月27日)、第2回開催 日本(東京女子医科大学)(平成26年10月8日～9日(岡野光夫先生の退任記念国際シンポジウムとして開催した。本シンポジウムの様子を「バイオマテリアル」(2015, 33(1), 93)の「TOPICS」でご紹介しております)、第3回開催 中国(天津医科大学)(平成27年10月14日～16日)、各国の事業参加者の協力の下、Sung

表1 日中韓フォーサイトプログラム(事業名: 難治性疾患の再生治療におけるナノバイオマテリアルと送達技術戦略)の日中韓の研究協力機関

日本側協力機関
早稲田大学、国立循環器病研究センター、東海大学、長崎大学、岡山大学、北海道大学、九州大学、北九州市立大学、理化学研究所、慶応大学
韓国側協力機関
延世大学校、仁済大学校、浦項工科大学校、慶熙大学校、韓国科学技術研究院、韓国原子力医学院、漢陽大学校、成均館大学校、ソウル大学校、仁荷大学校、順天大学校、忠南大学校、亜洲大学校、水原大学校、峨山医療センター
中国側協力機関
復旦大学、天津大学、中国科学院



図1 日中韓フォーサイトプログラムでの研究交流活動の様子。上段左) JSPS A3 Foresight International Symposium on “Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine” で日本側の拠点責任者として講演する大和雅之教授(平成26年10月8日(東京女子医科大学にて開催)、上段右) 上海で開催したA3 one-day meetingでの集合写真(平成27年5月11日(復旦大学(上海)にて開催))、中段左) 韓国と日本の学生を交えた東京女子医科大学での共同研究ディスカッションの様子。左からMi Li Kimさん(梨花女子大学校 博士課程学生)、南雲悠平君(慶応大学 修士課程学生)、長瀬健一 講師(東京女子医科大学) (平成28年7月31日)、下段) Hyukjin Lee助教(梨花女子大学校、一番左)と研究室メンバーとの梨花女子大学校で行った共同研究ディスカッション。中央は筆者(平成28年10月8日)。

Wan Kim教授(ユタ大学)、Allan Hoffman教授(ワシントン大学)、Robert S. Langer教授(マサチューセッツ工科大学)、片岡一則教授(東京大学)などの先生方を招聘し、また、多くの方々にご参加いただいたこともあり、これまで開催したシンポジウムはどれも盛況であった。

これら国際シンポジウムやA3 one-day meeting以外にも、研究者交流も実施している。距離的にも近い日韓の間での若手研究者や学生等の学生の研究発表を中心とした研究者交流が東京女子医科大学および梨花女子大学校(韓国)で頻繁に行われてきた(図1)。このような交流を通じ、平成27年度以降から日本の細胞シート技術と韓国のスキャフォールド技術、遺伝子トランスフェクシ

ン技術を融合し、細胞シート内への血管新生を目的とした共同研究が開始された。日韓の学生や教員スタッフの短期滞在等を通じた一体的な共同研究が推進されている。一方、日中においても共同テーマ設定が整い、研究実施のための準備がなされている。

3. 共同研究内容について

本事業における国際共同研究について、簡単ではあるが最近の研究成果とともに紹介したい。現在、韓国の梨花女子大学校のSeung Jin Lee教授のグループとHyukjin Lee助教のグループで血管

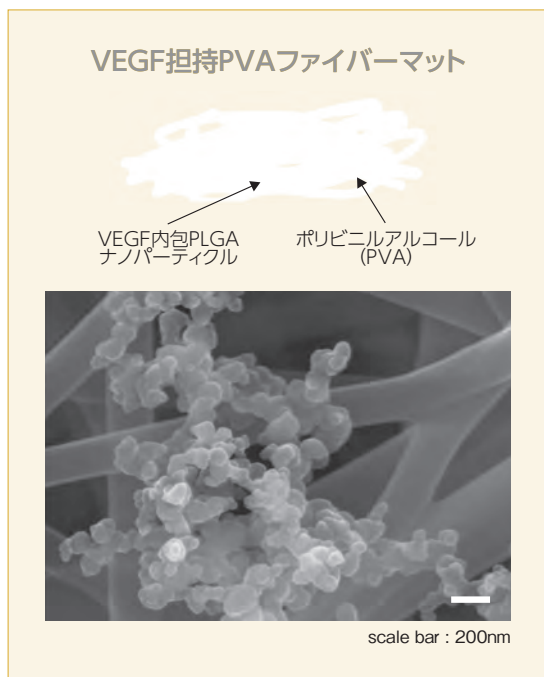


図2 VEGF 担持 PVA ファイバーマットの模式図(上段)と SEM 像(下段)

新生に関する共同研究を行っている。血管新生技術は心筋梗塞治療や *in vitro* での厚い組織作製への応用に期待されている。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は血管新生に関与する生理活性物質として知られている。Seung Jin Lee 教授らのグループとは、彼らが開発した VEGF 担持型のポリビニルアルコール (PVA) 製のファイバー状スキャフォールドを使い、移植心筋細胞シート組織内への毛細血管網形成の加速化について研究、評価を行っている。

VEGF 担持型ポリビニルアルコール (PVA) のファイバー状スキャフォールドは2段階の方法で作製される。最初に、エレクトロスピンニング法で PVA ファイバーを作製し、次に作製したファイバー上にエレクトロスプレー法により VEGF が内包されたポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノパーティクルを蒸着することで目的

のスキャフォールドが作製される (図2)。スキャフォールドをリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) に浸すと、浸漬後3時間で40%程度の担持 VEGF が、24時間では約66%、3日目では約83%の VEGF が放出され、その後も持続的に VEGF が放出する。通常、ラットに移植した6層程度の積層化心筋細胞シート組織は、移植後1~2日でネクロシスを起こすことが我々のグループの研究結果からわかっている。心筋細胞シートには心筋細胞以外にも血管内皮細胞や繊維芽細胞も含まれており、VEGF 担持 PVA ファイバーマットからの持続的な VEGF 放出は、血管形成を促進させ移植組織のネクロシスの抑制が期待できる。

実験評価系として、ラット大臀部を切開し、その皮下に6層積層化した心筋細胞シート組織を移植し、さらにその上に VEGF 担持 PVA ファイバーマットを乗せて皮膚を閉じ、二週間後の移植組織への血管形成能を調べた。比較として VEGF 担持 PVA ファイバーマットを移植していない群 (積層化心筋細胞シートのみ移植群) と移植前の積層化心筋細胞シート組織についても評価を行った (図3)。

VEGF 担持 PVA ファイバーマットと共に移植した積層化細胞シート群は移植前の積層化心筋細胞シート組織と同等な組織の厚みであったのに対し、積層化心筋細胞シート組織のみを移植した群は積層化組織の厚みより顕著に薄い値を示した。また、移植心筋細胞シート組織の蛍光免疫染色像から平均血管断面積を VEGF 担持 PVA ファイバーマットの有無群で比較した所、VEGF 担持 PVA ファイバーマット有の群が高い値を示した。これらの結果により、VEGF 担持 PVA ファイバーマット有の群では血管新生が促進され、厚い心筋組織が生着しているのに対し、VEGF 担持 PVA ファイバーマット無の群ではネクロシスによって移植組織の厚みが減少したものと考えら

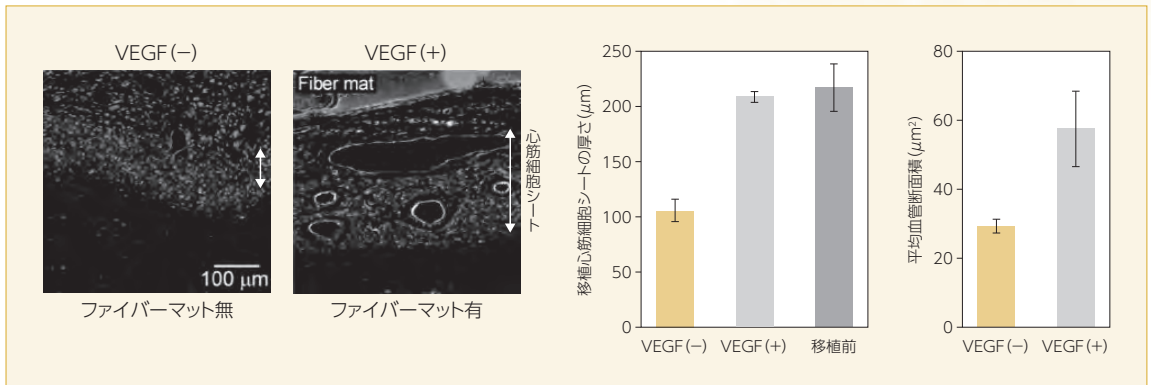


図3 ラット大臀部に移植した積層化心筋細胞シート(6層)の厚みと移植組織中における血管断面積。左側の蛍光染色イメージ VEGF(-) (積層化心筋細胞シートのみを移植)、VEGF(+) (VEGFを担持したファイバーマットと共に積層化心筋細胞シートを移植)、Control(積層化心筋細胞シートを通常の培養皿で6日間培養)した時の積層化心筋細胞シートの厚み。右側の棒グラフ) 移植した積層化心筋細胞シート組織切片中での血管断面の総面積。サンプルコードは上段に準ずる。

れる。これらの結果から、VEGF担持PVAファイバーマットが血管新生において有用であることが示された。

一方、Hyukjin Lee助教とは、彼らが改良して作製したin vitro transcription mRNA (IVT-mRNA)を用いて、ラット心筋細胞やラット肝細胞等の初代培養細胞へのVEGF遺伝子の導入に挑戦している。DNAを利用した遺伝子導入と比べ、mRNAを利用した場合、1)細胞質中でタンパク質が翻訳されるので、遺伝子導入後、すぐに目的タンパク質が発現し、2)一定期間後、細胞質中でmRNAが分解される。また、3)目的タンパク質をコードする遺伝子の細胞核内への局在化が極めて少ない、点が特徴として挙げられ、新しい遺伝子治療としてIVT-mRNAは注目を集めている(例えばNature Reviews Drug Discovery 2014 (10), p759-780を参照)。詳細は割愛するが、IVT-mRNAの特殊な塩基、塩基配列やその3次元構造により、IVT-mRNAは細胞質内で酵素などの分解を受けにくく、短期間ではあるが、安定に存在し、目的タンパク質をコードした遺伝子が速やかに翻訳される。

新生児ラットから採取した心筋細胞を12 well形状の温度応答性細胞培養表面に播種し細胞がコンフルエント状(細胞シート状)になるまで培養した。その後GFPやVEGFをコードしたIVR-mRNAでトランスフェクションを行い、継続して培養を行った。トランスフェクション24時間後には、心筋細胞シート全体からGFPタンパク質由来する蛍光発色が確認できた(図4)。また、VEGFの分泌量をELISAで測定した所、トランスフェクション4時間および48時間後では、VEGFの分泌は確認できなかったが、24時間後において最も高いVEGF分泌量を示した(図4)。その際、遺伝子キャリアーとしてLipofectamine2000を使用した方が、より効率的なVEGF発現能を示した。これらの結果は、作製したIVT-mRNAは初代培養細胞の細胞内にも取り込まれ、細胞質内で目的タンパク質を発現、分泌し、さらに時間とともに分解されていることを示している。上述したように、短期間でVEGFを分泌する細胞シートは、移植後のネクロシスを抑制し、厚い組織内への効率的な血管新生を誘導させることが期待できる。今回、作製した心筋細胞シートには線維芽細胞、血管内

皮細胞が混在している。今後FACS等を利用し、どの種類の細胞に効果的に遺伝子が導入されているのか等の研究を続けていきたい。

4. おわりに

他国の異分野技術の特徴を理解し、これらを融合して新しいテクノロジー、サイエンスを各国研究者と共同で創出する点において、興味を持つとともにやりがいを感じながら開始した。ほとんどが初めて出会う中韓の研究者とどのようにして研究テーマを設定すべきかを悩み考えた時もあった。価値観の違いも多少はでてくるが、中韓の研究者、特に中堅の研究者とFace to Faceで意見を出し合いながら時間をかけながら共同研究テーマ設定を進める事を重視した(本事業開始後にわかった点だが、同じ研究プロジェクトではあるが、各国の研究予算の運用ルールが異なっており、これを理解しながらプロジェクトを推進する点は良い経験となった)。

近年、日本と東南アジアのアセアン諸国やインド、最近では経済制裁が解除となったイランを含

むアジア全体の経済交流の活動圏が拡大している。また、昨年、来日したプーチン大統領のロシアとの経済開発協力の行方にも期待が寄せられる所である。経済交流には医療やサイエンス分野の交流も含まれる。少し長い目で見ると必要はあるが、古代のアレクサンドロス大王の統治がもたらしたヘレニズム文化のように、各国のテクノロジーが互いに交流することで、新たなテクノロジーが創出されるであろう。本事業を通じて得た研究交流活動の経験、成果は、近い将来、日中韓の三カ国だけではなく多くのアジア諸国を取り込んだ研究拠点の礎になると期待している。

謝辞

一部の資料につきまして、長瀬健一先生よりご提供いただきました。厚く御礼を申し上げます。日中韓フォーサイト事業「難治性疾患の再生治療におけるナノバイオマテリアルと送達技術戦略」は独立行政法人日本学術振興会のからの助成を得ております。

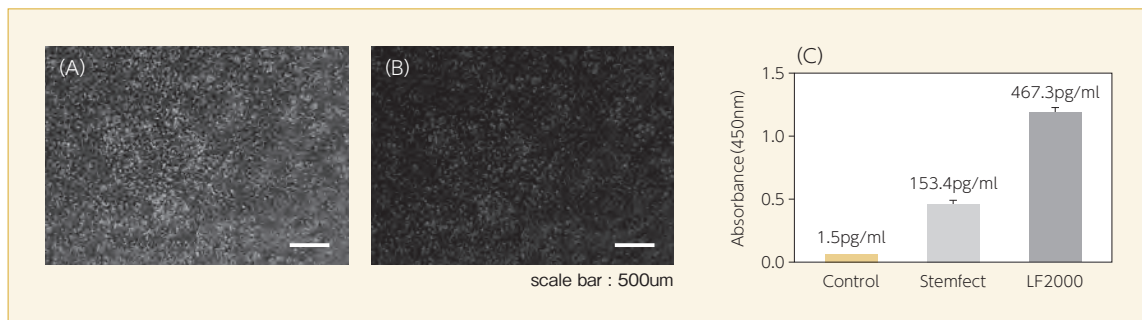


図4 温度応答性細胞培養表面上(12 wellタイプ)で作製した心筋細胞シートにGFPをコード(上段:(A),(B))、およびVEGFをコード(下段:(C))したIVT-mRNAをトランスフェクションした際の顕微鏡像とELISAによる分泌VEGF量の定量。トランスフェクション24時間後の(A)位相差顕微鏡像と(B)蛍光顕微鏡像。(C)遺伝子キャリアーの違いによる分泌VEGFへの影響。Control(トランスフェクション処理なし)、Stemfect(遺伝子キャリアーとしてStemfectを使用した場合)、LF2000(遺伝子キャリアーとしてLipofectamine2000を使用した場合)のVEGFのELISAによる定量。カッコ内の数値は定量してVEGF濃度を示す。