

再生医療本格化へ向けた口腔粘膜上皮細胞シート作成



村上 大輔

早稲田大学大学院 理工学研究科 生命理工学専攻

再生医療本格化の時代を向かえるにあたり、再生医療を広く普及させ、標準的な治療法として確立する上で、培養工程における異種由来成分の使用は、克服されるべき大きな課題である。典型的な重層扁平上皮細胞の培養条件としては、マウス **3T3** フィーダーレイヤーや **FBS** 等を使用する方法が定着している。そこで、上皮再生医療に有用な細胞ソースである口腔粘膜上皮細胞を用いて、異種由来成分を使用しない新規培養条件を開発し、移植に供する重層化細胞シートを作成することを目的とした。

イヌおよびヒト正常口腔粘膜組織より単離した上皮細胞を用いて、種々の培養条件を最適化し、底面に小孔を有する温度応答性カルチャーインサートを培養基材として用いると、フィーダーレイヤーを培養系から除去しても、重層扁平上皮様の組織類似構造を作製できることが明らかになった。この温度応答性カルチャーインサートを使用し、さらに **FBS** の代替として自己血清を用いることで、異種由来成分を含まない培養条件下で重層化口腔粘膜上皮細胞シートの作成に成功した。作成した細胞シートは、上皮幹/前駆細胞が維持されていることが示され、十分ヒト臨床応用に供し得ると考えられる。

1. 背景・目的：再生医療はすでに臨床研究として合計数千例が施行されており、今後もさらなる発展が期待されている。特に、皮膚や角膜等の上皮組織の再生医療の歴史は古く、**1975** 年に初めて **Green** らによって報告されたヒト表皮細胞の培養法の開発を皮切りに、患者の自己由来培養上皮片移植の臨床研究が、米国や欧州を中心に活発になされてきた。この培養法は、マウス由来線維芽細胞株である **3T3** 細胞を放射線照射しフィーダーレイヤーとして用いることにより、種々の上皮細胞で増殖・分化が促進され、培養系でも重層扁平

上皮様の組織類似構造を再構築できる。本研究においても、**3T3** フィーダーレイヤー法で作成した培養上皮細胞シートを用いて、様々な上皮組織を再構築する新規再生医療研究に取り組んできた。特に、両眼性の角膜上皮疲弊症患者に対して、自家口腔粘膜上皮細胞をソースに作製した培養上皮細胞シートを異所的に移植する臨床研究が良好な成績を収め、注目を集めた。また、消化器領域においても、早期食道がんの **ESD** 後に残る広範囲の潰瘍に対する新治療として、口腔粘膜上皮細胞シートを異所的に移植する新規再生医療技

術の開発が検討されてきた。イヌのモデルにおいてその有用性が示され、国内初となる食道再生医療臨床研究を近日予定している。

2. 結果・考察：3T3 フィーダーレイヤーは1975年の原報以降、様々な上皮細胞の培養に用いられてきたが、アメリカFDAは、この方法で作製した組織工学製品をたとえ患者自身の細胞を用いても異種として分類している。日本でも厚労省により3T3 フィーダーレイヤーを利用する上皮系の再生医療に関する指針があり、これに基づく安全管理が必要である。また、通常の培養ではFBSを用いているが、狂牛病のヒトへの感染の危険性の認識から、ヒト臨床応用には、狂牛病が発生していないオセアニア地域産のFBSが用いられている。血清を採取したウシについては各ロット毎に個体にまでさかのぼることができるトレーサビリティの担保もきわめて重要視されている。このような安全性への配慮に尽力しているものの、やはりFBSは将来的には培地から除かれるべきであると考えられている。再生医療本格化の時代を向かえるにあたって、再生医療を広く普及させ、標準的な治療法として確立するためには、培養工程における絶対的な安全性の担保が必要である。このような背景のもと我々は、ヒト臨床応用に向けて、マウス3T3フィーダーレイヤーやFBS等の異種由来成分を必要としない重層扁平上皮細胞の新規培養条件を開発することが急務であると考えた。そこで、口腔内から比較的低侵襲的に採取でき、非常に増殖能力が高いことから上皮再生医療に有用な細胞ソースとして期待される口腔粘膜上皮細胞を用いて、異種由

来成分を使用しない新規培養条件を開発し、移植に供する重層化細胞シートを作成することを目的とした。

表皮細胞同様に、イヌの正常口腔粘膜組織より単離した上皮細胞においても3T3フィーダーレイヤー法で培養することによって、重層扁平上皮様の組織類似構造を再構築できる(Figure 1a)。しかし、フィーダーレイヤーを培養系から除去すると、コンフルエントまで増殖するものの、フィーダーレイヤー法と同様な重層化は起こらない(Figure 1b)。そこで、イヌの口腔粘膜上皮細胞を用いて、初期細胞播種密度や培養基材、培養表面のコーティング等の様々な培養条件を検討することで、フィーダーレイヤーを使用せずに重層化した細胞シートを作成することを試みた。種々の検討の中で、培養表面に0.4ミクロンの小孔を有するカルチャーインサートを用いて培養することで、フィーダーレイヤーを培養系から除去しても、上皮細胞の重層化が促されることがわかった。そこで、初期細胞播種密度を最適化し、温度応答性高分子を培養表面に固定化した温度応答性カルチャーインサート上で培養することで、フィーダーレイヤーを使用せずに重層化した上皮細胞シートを作製することに成功した(Figure 1c)。さらにこのカルチャーインサート法を用いて、組織採取をおこなう個体から採血し作成したイヌ自己由来血清をFBSの代替として用いた培養条件を確立した他、無血清条件下でも同様の重層化した組織様構造を作製することに成功した(Figure 1d,e)。しかし、無血清条件下で培養した細胞シートは、通常細胞シート

底面に観察される細胞外マトリックス (ECM) の沈着が顕著に少ないこと、また温度応答性インサートからの脱着後に観察される細胞シートの収縮が観察されないなど、血清存在下で作製した細胞シートと完全に同等ではないことが明らかになった (Figure 2)。

これらイヌの実験で得られた知見をもとに、臨床応用を想定して、小さなヒト口腔粘膜組織片から上皮細胞を単離し、異種由来成分を使用せずに細胞シートを培養・作製が可能か検討した。東京女子医科大学倫理委員会からの承認を得て、健常ボランティアドナーから直径 5 mm もしくは 6 mm の生検トレパンにて口腔粘膜組織の採取をおこない、自己血清 (HS) 調整の為に、約 100 mL の採血をおこなった。上皮細胞を単離する際の酵素処理時間を短くするなど種々の条件を改良し、カルチャーインサート法を用いることで、イヌ細胞と同様にフィーダーレイヤーを使用しなくとも重層化構造を有したヒト口腔粘膜上皮細胞シート作成が可能であった (Figure 3a-h)。また、細胞形態およびコロニー形成能を FBS および HS 添加培地で比較・検討した結果、大きな相違はみとめられなかった。むしろ多くのドナーで、HS 添加培養の方がよりコロニーサイズが大きくなる傾向にあり、FBS の代替として HS が有用であることが示された。温度応答性カルチャーインサートおよび HS を用いた改良型新規培養条件が確定した後、すべてのドナー (n=7) の口腔粘膜組織小片から重層化上皮細胞シートを作成することに成功した。免疫組織学的検討から、このように作成した上皮細胞シート中には、p63 陽性

の上皮幹/前駆細胞が維持されていることが示され (Figure 3 i & j)、十分ヒト臨床研究に供する上皮細胞シートであると考えられる。このカルチャーインサート培養の特徴として、インサート下層の培養液は上層よりも早く培地が酸性に傾き色に変化する。これは、上皮細胞が主にインサート下層の培養液と代謝等のやり取りを行っていることを示唆している。本来、生体の最外層に位置する上皮組織には、血管の豊富な下層の結合組織から栄養分が供給され、上皮細胞の出す老廃物は下層側へと排出されると考えられる。通常の平面培養では、重層化した後に基底細胞へ培地中に含まれる栄養分や増殖因子を提供することは、物理的に困難である。さらに、重層化上皮細胞シートの免疫染色の結果から、表層にはタイトジャンクションを構成するタンパク質を、さらに基底細胞層においてのみ EGF 受容体の発現を認めた。このことは、細胞生物学的にも、平面培養が重層化した上皮細胞シートの培養において非効率的であることを示唆している。つまり、カルチャーインサートを用いることで、下層から基底細胞へ培地成分を供給出来たことが、細胞シートの重層化を促進した大きな理由であると考察できる。

主要論文

D. Murakami, M. Yamato, K. Nishida, T. Ohki, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki, T. Okano, "Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells" *Journal of Artificial Organs*. 9:185-91 (2006).

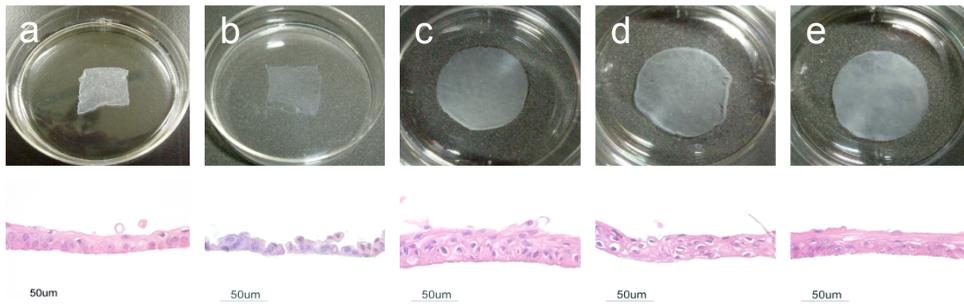


Figure 1 イヌ口腔粘膜上皮細胞を用いた異種由来成分を含まない培養条件の検討
 正常イヌ口腔粘膜組織より単離した上皮細胞を、温度応答性培養表面で約2週間培養した後、低温処理によって細胞シートとして回収した。回収直後の細胞シートの外観（上段）およびホルマリン固定パラフィン切片による細胞シート横断面のHE染色像（下段）にて、作成した細胞シートの強度および重層化を比較した。すべての培養条件下において、初期播種密度は $5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ とし、血清以外の培地成分は同一とした。下に、検討した温度応答性培養基材および培養条件を示した。
 a. 温度応答性培養皿（平面培養）、フィーダーレイヤー(+), FBS (+)
 b. 温度応答性培養皿（平面培養）、フィーダーレイヤー(-), FBS (+)
 c. 温度応答性カルチャーインサート、フィーダーレイヤー(-), FBS (+)
 d. 温度応答性カルチャーインサート、フィーダーレイヤー(-), 自己血清 (+)
 e. 温度応答性カルチャーインサート、フィーダーレイヤー(-), FBS (-)

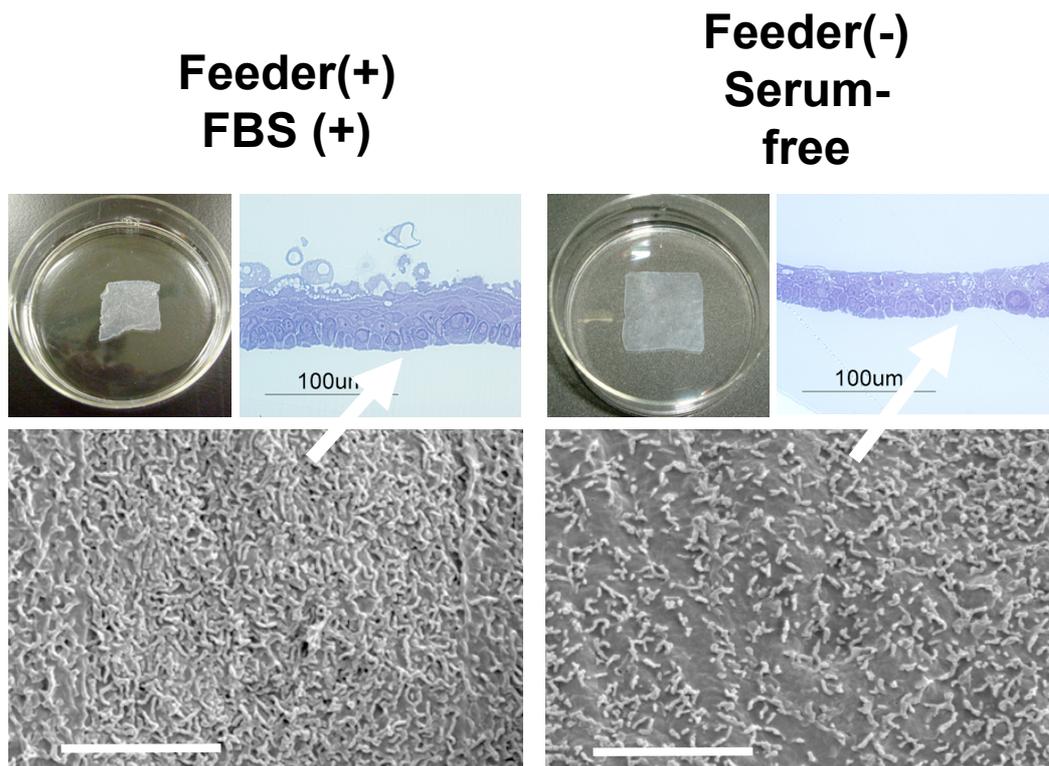


Figure 2 培地への血清添加の有無における細胞シートの変化
 正常イヌ口腔粘膜組織より単離した上皮細胞を、温度応答性培養皿にて約2週間培養した後、低温処理によって細胞シートとして回収した。培地への血清（FBS）添加の有無を除くすべての培養条件は同一とし、作成した細胞シートの回収直後の外観（上段右）、横断面のTB染色像（上段左）および細胞シート下面のSEM像について比較・検討した。

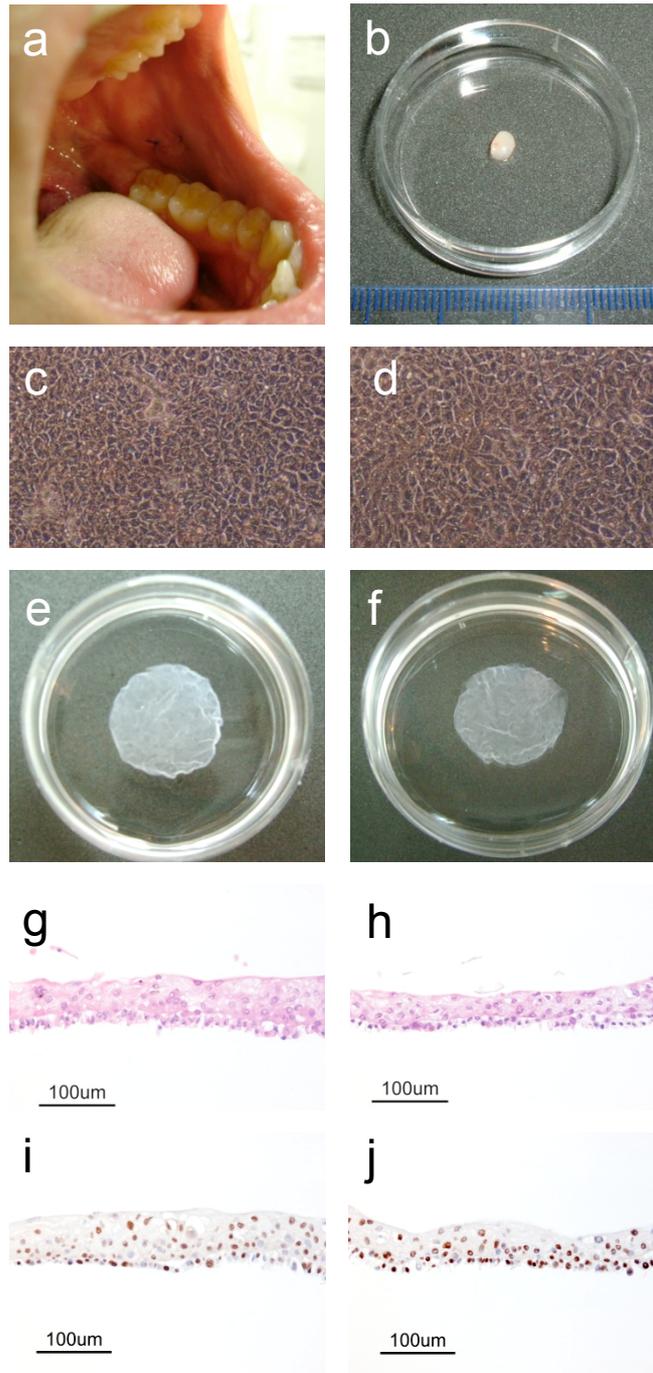


Figure 3 異種由来成分を含まない培養条件下におけるヒト口腔粘膜上皮細胞シート作成
 健常ボランティアドナーの口腔内 (a) より採取した直径5mm大の円形の口腔粘膜組織片 (b) より
 上皮細胞を単離し、温度応答性カルチャーインサートを用いて、約2週間培養した後、低温処理に
 よって細胞シートを回収した。カルチャーインサートを用いることで、マウス3T3フィーダーレイ
 ヤーを培養系から除去し、培地添加血清としてFBS (c,e,g,i) およびドナー由来自己血清 (HS)
 (d,f,h,j) を使用した2条件にて、ヒト口腔粘膜上皮細胞シート作成に成功した。それぞれの培養条
 件下における上皮細胞の位相差写真 (c,d)、回収直後の細胞シート外観 (e,f)、ホルマリン固定
 したパラフィン切片のHE染色像 (g,h)、およびp63の免疫染色像 (i,j) を示した。