

研究成果報告書概要

<総括>

最終年度に至るまでにインテリジェント表面開発グループでは培養基材の精緻化および大量生産を実現するとともに多様なサイズと任意形状のシート作製可能な高機能培養皿の作製と大量生産の技術が確立した。また、さらにマイクロパターン化細胞シート作製可能な培養皿作製の基盤技術を確立し、当初の培養皿から非常に高機能な温度応答性培養皿へと発展を遂げ、次世代医療への応用が期待される成果を得た。

上皮組織開発グループでは大阪大学眼科グループと角膜組織の臨床応用を行うとともに治験のための確認申請に向けて GMP (Good manufacturing practice: 製造管理及び品質管理規則) 省令に準拠した CPC (Cell processing center) 内での組織製造工程の整備が行われた。さらには、CPC を利用したヒト口腔粘膜上皮細胞シートの臨床応用に可能なレベルでの作製が行われ、今後の臨床への細胞シート工学応用に向けた基盤が確立した。また膀胱上皮、歯根膜細胞などの細胞シートを作製し、それぞれ疾病モデルへの移植することで、細胞シート工学の各種治療への有効性を確認した。

心筋組織開発グループでは細胞シートマニピュレーターを開発し種々の細胞シートの積層化を実現し、心筋組織のみならず、同様な厚みを有する構造の平滑筋組織などの再生研究を行った。また、マニピュレーターの支持体の検討などを行い、各種細胞シートや使用目的に適したアプローチの確立を行った。心筋に関してはラット心筋細胞シートの多段階移植を行うことで in vivo において厚さ 1mm の自律拍動する血管付き心筋組織の再生に成功した。また in vitro での厚い組織の再生において課題となっている組織への血管網の導入法に関しても精力的な研究を展開し、ラット内皮細胞と心筋細胞の共培養シートを作製することで in vitro でも血管内皮細胞の網状構造が構築されうるといふ新知見を得、さらに共培養した内皮細胞が in vivo において自ら血管構成細胞として血管新生に寄与することが確認された。これらの結果は、血管内皮細胞共培養シートがより虚血改善・組織再生効果が高いことを示唆するものであり、今後種々の組織再生ならびに臨床応用に有用であると推察された。また、in vitro における治療効果の高い心筋グラフト形成を目的に、伸展培養装置を開発、その伸展により細胞の配向とグラフトの拍動力の向上が示唆される結果を得た。また、血管構造を模倣したパターン化血管内皮細胞の他組織細胞シートとの積層化により、in vitro における血管構築技術の基盤

を構築することができた。

以下に構想時の計画内容（下線）に沿った研究成果をまとめるが概ね研究計画は達成されているとともに、組織再生技術に関してはそれ以上の研究成果が得られたものと判断する。

<各年の成果概要>

1 年目

インテリジェント培養皿の高機能化

細胞シートの作製・脱着の加速化：培養皿表面への温度応答性高分子グラフト時にその溶液濃度を変化させることにより細胞の接着・増殖・脱着速度を制御することが可能となった。さらに細胞成長因子を温度応答性表面に固定化することにより短期間で細胞シート作製を実現した。

共培養のためのパターン化：異なる温度で細胞の脱着・接着性が変化する2つの温度応答性高分子を金属製のマスクを用いて培養皿上にパターン化した。この表面を用い培養温度を変化させて細胞を接着させることで内皮-肝共培養パターン化細胞シートの作製を実現した。

無血清培養のための表面開発：細胞接着因子（RGD）を温度応答性表面に固定化することにより無血清培養による血管内皮細胞シートの回収が可能となった。

グラフト表面の解析技術の確立：UV エキシマレーザーによるアブレーション法と表面構造の解析装置（TOF-SIMS, AFM）

を組み合わせることによりナノオーダーのグラフトゲル厚の測定を可能とし温度応答性培養皿の高分子厚が約 20nm であ

ることを明らかにした。

細胞シートによる組織再生技術の開発

再生角膜組織の臨床応用：角膜上皮細胞シートの代替として培養自己口腔粘膜上皮細胞シート移植による角膜再生を新たに臨床応用するとともに治験に向けてCPCを整備し運用を開始した。

他の単層細胞シートを用いた動物実験：失明原因の第1位となっている黄斑変性症に対する網膜色素上皮細胞シート移植、気胸に対する細胞シート移植による閉鎖術、膀胱上皮細胞シートを用いた膀胱再建術の開発を目的にそれぞれの細胞シート回収条件を最適化するとともに小動物あるいは大動物への移植手技を確立した。

心筋再生組織の作製及び移植実験：重層化心筋細胞シートの移植実験を行い自律拍動する心筋グラフトが1年の長期にわたり生体内で生存することが明らかになった。また心筋細胞の代替として筋芽細胞シートを用いた心筋パッチの大動物への移植実験を開始した。

2 年目

インテリジェント培養皿の大量作製と物理科学的解析

グラフト固定化法の改良と大量作製：大

	3 年目
<p>量生産の実現を目的にグラフト固定化時に従来用いていたアルコール系溶媒を水系とし固定化時の条件を最適化した。これにより培養皿の大量作製が可能となった（数百枚／日→数千枚／日）。</p>	<p><u>インテリジェント培養皿の大量作製と国内施設への供給</u></p>
<p><u>グラフト表面の解析技術の確立</u>：前年度確立した手法を基盤として新たに作製された培養皿の性能評価を行った。</p>	<p><u>大量作製と国内施設への供給</u>：前年度に確立した水系溶媒を用いたグラフト法により大量生産した温度応答性培養皿を学内ならびに国内共同研究先に供給が可能となった。また同時に温度応答性培養皿の最適な使用法の技術移転も同時に行った。これにより共同研究先での研究が加速し多くの成果を得た。</p>
<p><u>パターン化</u>：前年度に達成したパターン化細胞シートの機能評価を行ったところ異なる細胞が接触する近傍で細胞の機能が向上することが明らかとなった。また新たに液晶プロジェクターを用いた手法により数十マイクロオーダーのパターンの作製が可能となった。</p>	<p><u>重層化細胞シートによる組織再生技術の開発</u></p>
<p><u>マイクロパターン化細胞シートによる組織再生技術の開発</u></p>	<p><u>心筋組織再生技術の開発</u>：重層化心筋細胞シートを種々のバイオリアクターを用いて組織培養することで、より高機能な組織の再生が可能となった。またラット内皮細胞と心筋細胞の共培養細胞シートに関してその培養条件や血管網新生のメカニズムに関しより詳細な解析を行った。</p>
<p><u>大きな組織の再生</u>：in vivo においては重層化細胞シートを血管網新生を待って繰り返し移植するという手技により 1mm 厚の心筋組織の再生が可能になった。一方、in vitro においても環流培養装置を用い酸素・栄養の透過性を向上させることでより厚い組織の再生が可能となった。</p>	<p><u>細胞シート間コミュニケーションの解析</u>：積層した心筋細胞シート間には積層化後 1 時間以内にコネキシンを介したギャップジャンクションが形成され電氣的に結合することが明らかになった。これにより細胞シートの積層化により速やかに同期して拍動する 3 次元心筋組織の構築が可能であることが明らかになった。</p>
<p><u>共培養シートの作製と移植</u>：ラット内皮細胞と心筋細胞の共培養シートにおいて in vitro で内皮細胞の網目構造が再生された。さらにこの重層化細胞シートの移植によりシートの内皮細胞由来の毛細血管網が構築され、内皮細胞含有率の制御、パターン化により in vivo での血管新生制御が可能であることが示唆された。</p>	<p><u>細胞シートマニピュレーターの開発</u>：細胞シートの移動や積層化に際しては細胞種に応じてピペット操作や高分子膜を用いて行ってきたが、技術的な熟練を要した。特に細胞シートの積層化においては</p>

より簡便かつ精度の高い操作技術が必要となった。これを解決するためスタンプ型の細胞シートマニピュレーターを開発し、その形状や積層化条件に関する最適化を行った。この細胞シートマニピュレーターにより種々の細胞シートの安定した積層化が可能となった。

4 年目

高機能化インテリジェント培養皿の大量作製と国内他施設への供給

高機能化インテリジェント培養皿の大量

作製： 従来の方法では一定の形状の培養皿のみの作製であったが、2年目に開発した水系溶媒への変更を起点とし条件の最適化を重ね、直径35, 60, 100mm培養皿と、さらにはマルチプレート（6穴、12穴、24穴、96穴）などの多岐にわたるサイズの温度応答性培養皿の大量作製が可能となった。また、細胞種や条件による培養皿への接着性や細胞間接着の強度の違いにも対応できるように、グラフトする温度応答性高分子の濃度の違う培養皿の大量作製も自在にできるようになった。さらに、温度応答性高分子をグラフトした後に、マスクを使用することで細胞非接着性の高分子をマスク以外の部位にグラフトし、任意の形状の細胞シートを回収可能なパターン培養皿の作製も可能となった。このようにして作製された培養皿の学内ならびに国内の様々な施設への供給が行われた。

マイクロパターン化細胞シートの重層化

による組織再生技術の開発

生体の血管構造のように幅数 μm のライン状にパターン化した温度応答性高分子上に血管内皮細胞を培養すると、温度を低下させるだけでストライプ状に増殖した血管内皮細胞を得ることができた。そこで、このパターン化した内皮細胞と細胞シートを細胞シートマニピュレーターにより積層化することで、血管内皮細胞の形状を維持した3次元組織の構築が可能となった。この技術は in vitro において血管網を伴った組織の再生を実現するための基盤技術となるものである。

5 年目

インテリジェント培養皿の大量作製と海外他施設への供給

大量作製と国内施設への供給： 既に確

立した手法により、温度応答性培養皿の国外の施設への供給が可能となった。さらに、細胞シート作製技術の獲得と、さらなる発展研究の為にイギリス、イタリア、アメリカなどの各国より研究者が訪れ、国際的な研究活動を行った。それぞれの研究者が確実に技術を持ち帰ることで、結果的に国際的なインテリジェント培養皿の供給をなし得た。

細胞シートによる組織再生技術の開発

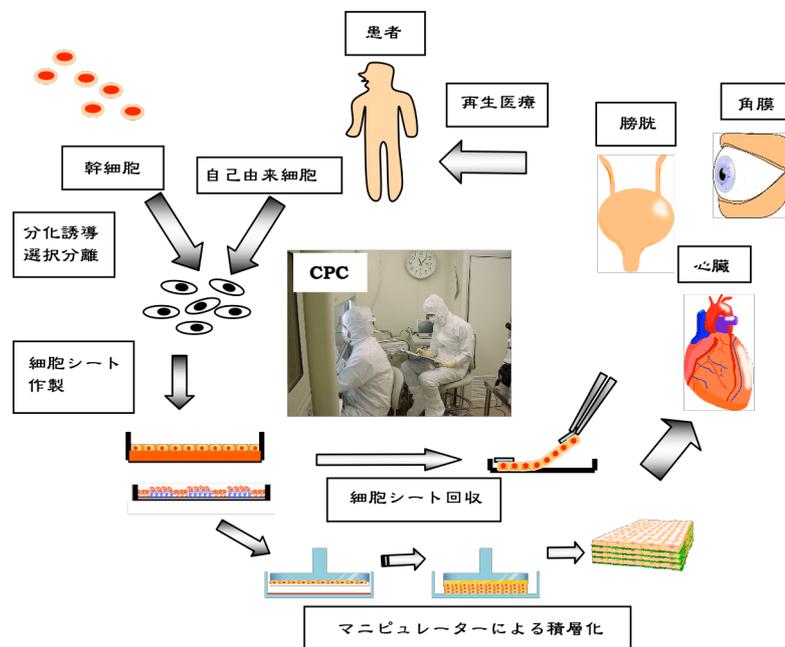
開発された種々の温度応答性培養皿ならびに細胞シートマニピュレーション法を用い様々の組織の再生研究を行い、研究成果を得た。その成果の一部は臨床応用可能な段階に到達した。以下に主要な研

究成果を記載する。

循環器領域：重症心不全に対する細胞シート移植に関しては小動物・大動物において有効性が示されたことから臨床応用に向けた培養皿の作成、移植法の最適化を行った。これらの成果をもとに、共同研究先の大阪大学心臓外科のグループでは拡張型心筋症を対象とした骨格筋芽細胞シート移植の臨床応用を開始した。また、開発された細胞シートマニピュレーターを用いることにより安定した心筋細胞シートの積層化が可能となり、細胞密度の高い拍動心筋組織の作成も可能となった。

消化器領域：初年度に整備したCPCを用いて、表層性食道癌への内視鏡的粘膜切

除術および内視鏡的粘膜下層切開剥離術による、術後の人工潰瘍面の創傷治癒促進を目的として、移植可能な口腔粘膜上皮細胞由来細胞シートの作成の為の検討実験を行なった。ヒト口腔粘膜上皮細胞は、第1314号及びGMP省令に基づいて採取、シート作製を行った。既に、CPC内においてヒト口腔粘膜上皮細胞の培養を行い、経内視鏡的に移植可能な培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製が実現し、イヌ食道人工潰瘍モデルを用いた移植による前臨床実験を行った。今後、安全性試験等、移植に至るまでの全ての項目を含むコールド・ランを行なった後に、臨床研究に移る予定である



<優れた成果があがった点>

まず、本プロジェクトにおいて発展した「細胞シート工学」が角膜再生医療ならびに心筋再生医療に臨床応用されたことは極めて優れた成果といえる。前者に関しては自己口腔粘膜上皮細胞シートを用いており、既に長期的な有効性も示されている。これは移植医療における細胞ソース、免疫の問題をクリアーする画期的な治療法として注目され、その成果は New England Journal of Medicine (Nishida et al. 2004;35 1(12):1187-96) に報告された。後者の心筋再生医療に関しては重症心不全患者への自己筋芽細胞シートを用いた移植が臨床応用されその有効性を評価予定であるが、他の細胞ソースとして脂肪由来間葉系幹細胞シートの不全心筋への移植の有効性が動物実験で示されており (Miyahara et al. Nat Med. 2006;12(4):459-65)、今後、重症心不全患者への細胞シート移植医療が新たな治療法として普及することが期待されている。

また基礎研究として細胞シート積層化による肉厚の拍動心筋組織の再生、細胞シートによる食道癌粘膜除去術後潰瘍面の創傷治癒促進、細胞シートによる肺気漏閉鎖、パターン化細胞シート積層化による3次元組織の構築といった世界に類をみない技術開発を展開し、それぞれ関連の学会で発表するとともに、その詳細は関連学術雑誌に掲載されている。

これらの研究成果は添付書類に示すように多数の国内外の新聞・業界紙・報道番組で紹介されており、日本発の独創的な技術革新であることを示している。さらに研究代表者は「細胞シート工学」の創始者として第2回江崎玲於奈賞を受賞するに至った。

このように本プロジェクトにおいて「細胞シート工学」「細胞シート移植医療」という再生医療における新領域を創成し、臨床においてその有効性を示すという極めて優れた研究成果を実現した。

<問題点>

動物実験においてそれぞれの組織・臓器への細胞シート移植の有効性が示されるに至り、組織再構築技術・移植法だけでなく臨床応用可能な細胞ソースの開発も必要となってきた。十分量の幹細胞が採取可能な組織・臓器や代替の細胞ソースがある場合は速やかな臨床応用が可能であるが、そういった細胞が未確立な組織・臓器に関してはそれぞれに応じた細胞ソースを確立することが急務となっている。これに関しては当研究所でも細胞ソースの開発研究を開始するとともにそれぞれの組織の幹細胞研究に精通した研究機関との共同研究を開始しているが、今後さらなる研究の進展を要する。

再生組織の臨床応用に関しては医師主導の臨床研究であっても第1314号及びGMP省令に遵守することが必要となっており、現時点では以前に比べ臨床応用に至る障壁が大きいことが新たな問題となっている。当研究所においては本プロジェクトで整備した

CPC 施設を利用することで対応可能ではあるが、多くの患者を速やかに救うため、より迅速な審査体制の整備が期待される。

＜評価体制＞

施設内自己評価としてはインテリジェント表面開発グループ、上皮組織開発グループ、心筋組織開発グループのそれぞれのグループごとの討論に加え、グループ代表者レベル、教職員レベル、大学院生レベル、研究者全員での横断的な討論を定期的に行っており各研究者の研究成果の評価ならびにそれに対する指導を多面的に行っている。また月に一度教職員ならびに関係事務担当者で会議を行い、予算の使用状況の把握や予算の適切配分を含めた研究室全体の運営を討論し決定している。

また、学内においては各施設のビジョンを再確認し中長期を見据えた計画と当該年度に達成すべき目標を明確にし、組織内で共有化してゆくことを目的に目標管理制度（期初の事業計画立案、期中及び期末（事業報告）の達成度レビュー）が導入されており、本研究施設からも随時プロジェクトの進捗を報告し評価を受けている。

一方、外部評価としては公開シンポジウムを開催して、外部の著明な研究者を招聘し講演していただくとともに本プロジェクトの研究に関して討論し客観的な評価をいただく機会としてきた。また海外からの招聘研究者や視察団に対しても教職員から研究内容全般の説明を行うとともに若手研究者との個別討議を企画することで第三者の立場から評価していただいた。

＜研究期間終了後の展望＞

本プロジェクト研究期間において「細胞シート工学」「細胞シート移植医療」といった再生医療における新領域を創成することが達成され、角膜、心筋に関してはその研究成果に基づいた臨床応用も実現した。細胞シートを用いた再生医療は今後もさらに発展し、多くの患者が救われるものと確信しており引き続き細胞シート関連の研究を続ける方針である。具体的には基礎研究として様々のパターン化共培養細胞シートの作製およびその積層化を行いより複雑な組織の再生を目指す。また種々の工学的技術を導入したバイオリクターを用い積層化細胞シートの組織培養系を確立しより生体に近い高機能な組織の作製を試みる。さらに組織内への十分な血管網構築を可能とする手法を開発することにより、再生組織のスケールアップを可能とし組織再生から臓器再生へと再生医療を発展させることを目標とする。臨床応用に関しては角膜・心筋に加え食道粘膜・歯周・肺・軟骨などいくつかの再生組織に関して数年以内に臨床研究の形で行われるようになるものと予測され、数多くの患者を救うものと期待される。このように研究期間終了後も細胞シートを用いた基礎研究ならびに臨床応用を目指した研究を行うため当該研究施設（特にCPC部分）ならびに装置・設備を利用していく方針である。

＜研究成果の副次的効果＞

前記したように細胞シートを用いた技術は世界的な注目を集めており、本プロジェクト遂行中、国内外の多くの研究施設から細胞シートを利用した共同研究の依頼があった。当研究施設では当初計画していなかった新たな組織・臓器に対する細胞シートの利用法が考案され数多くの共同研究が始まっている。また再生医療のみならず担癌動物モデルの作製や in vitro 組織モデルの作製に細胞シートを用いる研究も始まっており薬剤スクリーニングの領域での活用の可能性もある。温度応答性培養皿や細胞シートマニピュレーション法など細胞シート関連の特許に関しては研究成果の事業化を目的として設立されたベンチャー企業である株式会社セルシードにライセンス化されており、本プロジェクトの研究成果も特許化されている。今後角膜、食道粘膜、心筋、歯周を含む種々の組織・臓器の再生に用いる細胞シートに関して確認申請、治験を行うことでそれらの製品化・実用化が可能になると推察される。さらに日本のみならず世界での細胞シート移植医療に対する期待が高まっており世界的な規模での普及が期待される。