

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04281

研究課題名(和文)効果的な細胞移植を実現するための細胞シート高速積層法の開発

研究課題名(英文)Development of high-speed cell sheet stacking method to achieve high transplantation efficiency

研究代表者

坂口 勝久(Sakaguchi, Katsuhisa)

早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付)

研究者番号：70468867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞シートを高速に多層化することで立体的組織を構築し、大量の細胞・組織を生体に移植する方法を開発した。現在、細胞シートは角膜、心臓等の疾患に対して臨床応用まで到達している。しかしながら、移植には酸素・栄養の供給が拡散で補える組織の量・厚みに限界があり適応疾患には限定的である。そこで、移植組織を高速に作成し再構築組織内の血管網が数十時間でホスト側の血管と結合させることで効果的な細胞移植治療を目指した。結果、10層細胞シートを積層構築する際に、各細胞シート間へ血管新生を促すフィブリンゲルを挟み込み、ホスト側と血管網との結合を促進させて細胞移植効率を大幅に向上させる手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞シートを大量に移植が可能となり長期的に生着すること確立できれば、将来的に様々な応用が考えられる。従来では数層の上皮および、間葉系細胞シートしか実現していない。本研究成果では10層もの心筋細胞シートが移植が可能になった。これは、欠損した組織を補完する治療ができる可能性を示しており、心筋梗塞または拡張型心筋症によって欠損した心筋細胞を本技術によって補完できる。したがって、本提案技術は未だに確立していない欠損部位に対する組織移植治療が実現できる技術になり、次世代細胞・組織治療法になる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a method for constructing a three-dimensional tissue by multi-layering cell sheets at high speed and transplanting a large amount of cells into a living body. Recently, cell sheets have reached clinical application for diseases such as cornea and heart. However, transplantation has a limit in the amount and thickness of tissue that can be supplemented by diffusion of oxygen and nutrient supply. Therefore, we designed an effective cell transplantation therapy by creating transplanted tissue at high speed and connecting the vascular network in the reconstructed tissue with the blood vessels on the host side. As a result, we established a method to significantly improve cell transplantation efficiency by sandwiching fibrin gel that promotes angiogenesis between each cell sheet when laminating and constructing 10-la

研究分野：生体医工学・組織工学・再生医療

キーワード：再生医療 組織工学 細胞シート 心筋細胞 心不全治療 立体組織 フィブリン iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

組織工学を用いた再生組織を移植治療する技術が様々な手法で追求されている。生体分解性の支持体を用いた手法や、スフェロイド・シート・オルガノイドを構築して移植する技術が生み出されてきた。現在では、骨、軟骨、皮膚など血管密度が低い組織に関しては各国多様な施設で臨床応用が行われている。このような状況の中、研究室では温度に応答して細胞接着・脱着を制御できる培養皿を用いて細胞をシート状に形成し、その細胞シートを移植する細胞治療の研究を行ってきた。細胞シートは、高い密度の細胞を高効率で移植出来る技術である。ルシフェラーゼ陽性のラット心筋細胞注入移植と心筋細胞シート移植をラットの心部に行い、移植後2週間の心筋細胞残存量を測定したところ、優位に細胞シートが生存することを示している (Sekine H et al., Tissue Engineering, 2011)。しかしながら、酸素・栄養の拡散供給によって補える移植組織の量・厚みには限界があり、細胞シートで3層以下、厚みでは0.06 mmと極限られたものとなっている (Shimizu T et al., FASEB, 2006)。細胞シートに血管網を付与する技術はすでに確立しており、血管内皮細胞を混合させることや間質系細胞を共培養することや培養液を工夫することで構築できる。従って、この細胞シート内の血管網と移植先の宿主側の血管網を如何にして短時間で結合させるかが、ブレークスルーの鍵となる。この課題を克服することで、今まで細胞移植例が少ない高機能で高代謝な細胞 (心筋細胞、肝細胞、腎細胞) を大量に移植可能とすることになり、新たな再生医療・細胞治療を見出す可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では血管網付き細胞シートを短時間で積層して立体組織を構築し、血管網付きの細胞シート間に宿主側の血管が早急に結合するようなタンパク質を塗布することで、厚い立体組織を移植可能にする技術の確立することが目的となる。研究項目としては、①細胞シートの積層化の短時間化、②細胞シート血管網と宿主血管との繋がりを促進させる素材の考案、③心筋細胞や肝細胞など多層化させた組織の生体への移植効率を向上させることである。

3. 研究の方法

細胞シートを積層する方法として、スタンプ形状のデバイスの底面にゼラチンゲルを固定し、細胞シートを接着させて重ねて行く方法を使用した (図 1A)。細胞シートと細胞シート間にはきわめて少ない量の接着タンパクもしくは細胞外マトリックスを塗布し (図 1B)、さらに荷重をかけて圧着し (図 1C)、短時間 (数分間) で細胞シート同士を接着させて剥がす (図 1D)。この接着タンパクには血管新生を促進させる機能を付与もしくは有するものとしてフィブリンゲルを選択した。この B から D の工程を繰り返す積層技術で、15層 (約 1 mm) の組織を 1~2 時間で作製可能となった。また、ラミニン、サイトカイン含有の接着タンパクを使用することで、接着を加速させる以外に移植後の血管新生を促進させることが出来る。これにより、より新鮮な組織そして血管新生を促進させる組織の構築により、従来方法の移植限界 3層を超える多くの細胞シートの移植可能とした。

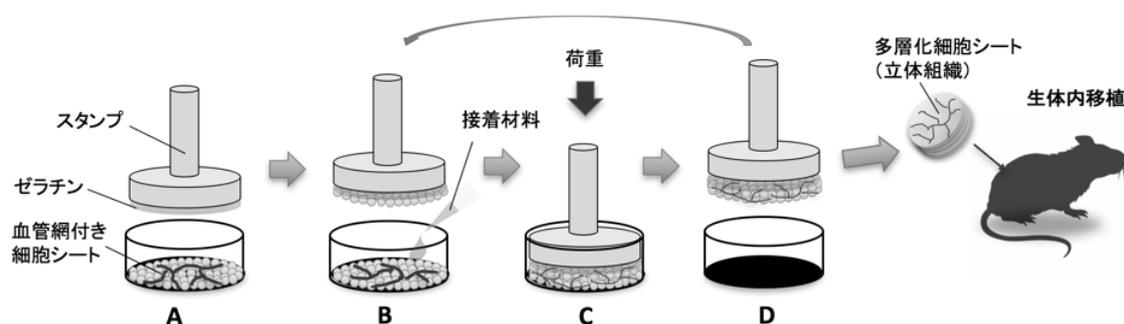


図1 生体接着剤を用いたスタンプ積層法

4. 研究成果

(1) フィブリンゲル接着剤による高速積層化細胞シート

フィブリン接着剤を用いて、ラット心筋細胞シート、ヒト心筋細胞シートおよび、ヒト肝細胞シート的高速積層化が可能かどうかの検討を行なった。ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞とヒト皮膚線維芽細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞を共培養することで、血管網付きの細胞シートを作成できる。この細胞シートを本研究で開発したフィブリン接着剤を用いた積層法で15層の組織を構築することを可能とした。約 10 g/cm² の荷重をかけることで1層の積層に約 5分で可能とし、15層の立体組織を構築するのに約 2時間で作成した。ヒト心筋細胞のみの細胞シート 5層、心

筋細胞・線維芽細胞・血管内皮細胞の共培養細胞シート5層、10層、15層の厚みを図2に示す。

さらに、ヒト肝細胞 HepG2 の細胞シートを作成し、同様に15層の立体組織の構築にも成功した。通常肝細胞の重層化には極性があるため時間を要して困難であったが、本研究の開発した積層方法で可能となった。次に、この手法で構築した組織の細胞生存率を確認した。その結果、構築した組織内の細胞の生存率は90%以上あり、積層方法による損傷はほとんど無いことが確認できた。

(2) 多層化立体細胞シートの移植

多層化したヒト心筋細胞シートをヌードラット背部へ移植した。その結果、心筋細胞だけの細胞シート5層と比較して、線維芽細胞および血管内皮細胞との共培養心筋細胞シート5層は、約10倍の組織が生着する結果となった。さらに、10層でも生着量が向上し多量の細胞・組織移植が可能となったことがわかった。しかしながら、15層においては10層に比べて生着量が下がる結果を得た。図3は、各条件の心筋細胞の生着断面積を定量化した結果を示す。

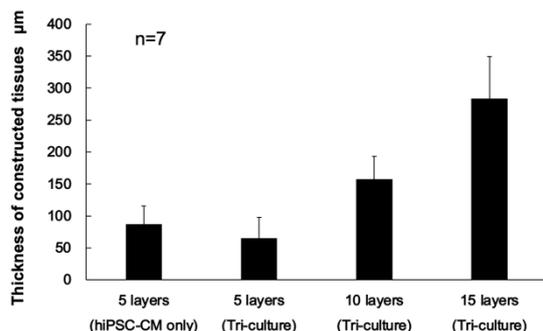


図2 多層化細胞シートの厚み

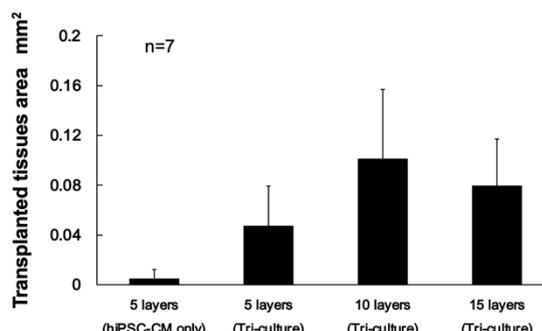


図3 多層化細胞シートの移植生着量

(3) 心筋梗塞モデルラットへの多層化心筋細胞シートの移植

心筋細胞シート10層を心筋梗塞モデルラットに移植し、心機能をエコーにて評価した。最初に、心筋梗塞を施したラットの左室の駆出率 (Ejection Fraction: EF) は、梗塞してから4週間後には40%以下まで減少する。この心筋梗塞部に10層の心筋シートを貼り付けると、2週間後には50%まで回復することを確認した。また、左室の内径短縮率 (Fractional Shortening: FS) は20%まで減少し、約30%まで回復した。図4は移植後の新機能を示す。生着した多層化細胞シートは、切片観察から残存していることも確認できた。これらの結果より、フィブリンを用いて積層した細胞シートは移植効率が著しく増加し、様々な再生医療の方法効率性を向上させる可能性を示した。

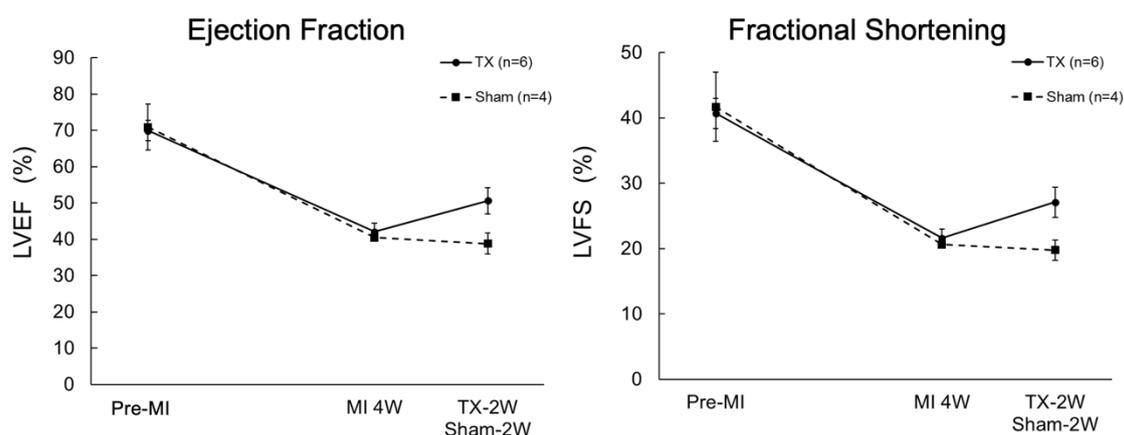


図4 移植前後の心機能

以上の結果から、フィブリン接着剤を用いることで数時間内で多層化細胞シートが容易に作成できた。また、多層化細胞シートを移植することで極めて高い移植効率を示すことがわかった。この方法は、細胞シートに限らず、あらゆる組織工学技術に応用でき、今後の再生医療分野に貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田原滉大、坂口勝久、本間順、松浦勝久、岩崎清隆、清水達也、梅津光生
2. 発表標題 細胞シート高速積層技術を用いて構築した立体心筋組織の心筋高速モデルへの移植
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 2020年度関東ブロック発表会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Kodai Tahara, Katsuhisa Sakaguchi, Jun Homma, Katsuhisa Matsuura, Kiyotaka Iwasaki, Tatsuya Shimizu
2. 発表標題 Transplantation of layered cell sheet into myocardial infarction model rat
3. 学会等名 TERMIS-AP (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 田原滉大、坂口勝久、本間順、松浦勝久、岩崎清隆、清水達也
2. 発表標題 多層化細胞シートの心筋梗塞モデルラットへの移植
3. 学会等名 第2回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 田原滉大、坂口勝久、本間順、松浦勝久、岩崎清隆、清水達也
2. 発表標題 細胞シート高速積層技術を用いて構築した 立体心筋組織の移植
3. 学会等名 第37回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清水 達也 (Shimizu Tatsuya) (40318100)	東京女子医科大学・先端生命医科学研究所・教授 (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------