

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25242041

研究課題名(和文)次世代器官再生医療のための基盤技術の開発

研究課題名(英文)Development of technologies for next-generation regenerative therapies

研究代表者

辻 孝(Tsuji, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：50339131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、次世代器官再生医療のための基盤技術の開発を目的とし、1)本研究グループが開発した器官原基法を用いることにより機能的な唾液腺・涙腺の再生が可能であることを明らかとし、再生器官原基移植による分泌腺再生医療の実現可能性を実証した。また、2) 器官再生に向けた細胞シーズの開発研究として、iPS細胞から毛包を有する皮膚器官系の再生が可能であることを実証した。さらに3) 器官再生医療の臨床応用に適用可能な機能性糖鎖ならびに自己組織化ペプチドを利用した新規機能性ゲル材料の基盤技術開発を達成した。以上の成果より、臨床応用化に向けた基盤技術と、幅広い器官再生医療の応用可能性を実証した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed at the development of fundamental technology for the next generation of organ regenerative medicine. 1) We successfully demonstrated to regenerate of secretory glands including salivary and lacrimal glands by the transplantation of their bioengineered germs, which were reconstituted by using "Organ Germ Methods". 2) To identify the cell seeds for organ regeneration, we demonstrated the possibility for the development of the functional bioengineered 3D integumentary organ system and the realization of organ replacement therapy by using iPS cells. 3) We further achieved the fundamental technology developments of new functional gel materials using the functional sugar chain and self-assembling peptides, for the application to clinical application for organ regenerative medicine. These results indicated that we successfully developed the fundamental technology for clinical application of the wide variety of organ regenerative therapies.

研究分野：複合領域

キーワード：再生医工学 再生医療 口腔器官 毛包 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

次世代再生医療として、機能不全に陥った器官を、三次元的に再生した器官と置き換える「器官再生医療」が期待されている。これまでに、人工透析や補助心臓など物理学的機能を有する人工臓器は実用化されたものの、細胞と足場材料によるハイブリッド型人工臓器の開発には困難な課題が残されており、未だ実用化段階には至っていない。本研究グループは、三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」を開発し、歯や毛包などの幅広い器官再生の研究を進めてきた。本技術を発展させ、分泌腺をはじめとした様々な器官の再生を可能とすると共に、臨床応用化に向けた基盤技術の開発が期待される。

2. 研究の目的

(1) 器官原基法による再生対象器官の拡大に向けて、分泌腺である唾液腺および涙腺の再生を実証する。また、再生した分泌腺の機能を解析することにより、分泌腺再生治療の実現可能性を明らかとする。

(2) 成体から採取可能な幹細胞を用いた器官再生治療に向けて、器官を再誘導可能な成体由来細胞シーズの探索を行い、器官原基法により器官形成能を評価する。一方、患者本人から作りだせる多能性 iPS 細胞は、免疫拒絶や多量な細胞を確保できる点で魅力的な細胞シーズであることから、iPS 細胞から器官を誘導する技術の開発を進める。

(3) 器官再生医療の臨床応用を目指した材料開発に向けて、幅広い種類の器官に適応可能な細胞の足場材料や、免疫抗原とならない新規機能性材料の開発が期待されている。本研究グループが保有している糖鎖工学の基盤技術を用いて、器官再生医療の臨床応用に適用可能な機能性糖鎖ならびに糖ペプチドを利用した新規機能性材料を開発する。

3. 研究の方法

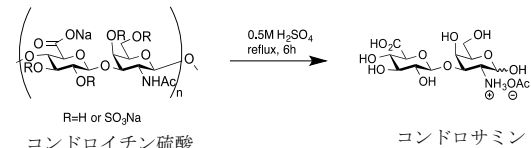
(1) 分泌腺の再生治療モデルの実証に向けて、①胎児分泌腺原基から取得した細胞を用いて器官原基法により再生唾液腺・涙腺原基を作製し、②成体マウスへの再生分泌腺移植モデルの開発と移植部位で生着した再生分泌腺の組織学的な評価を行った。さらに、③再生分泌腺の神経調節による分泌機能および分泌液の解析と、④ドライシンドロームに対する機能回復効果を解析した。

(2) 器官再生医療の実用化のための成体細胞シーズの探索に向けて、①成体動物やヒトから毛包を採取し、上皮性及び間葉性細胞の培

養技術を確立し、再生毛包原基を作製することにより器官誘導能を評価した。また、iPS 細胞から器官を誘導する技術開発に向けて、②iPS 細胞から皮膚器官系を誘導可能な生体内移植モデルを構築し、③再生皮膚器官系をマウス皮下に移植することにより、再生皮膚の組織構造ならびに機能評価を行った。

(3) 新規機能性材料の開発に向けて、①コーゲンゲルと同程度の力学的強度を有し、細胞を封入するのに適したゲル素材として、ヒアルロン酸 (HA) および自己組織化ペプチド (SAP) に着目し、新規機能性材料の開発を進めた。HA を透析により脱塩したのち水に溶解させた HA 溶液と、SAP 溶液を水で希釈した溶液を混和させ、動的粘弾性をレオメーター (Anton Paar, MCR302/F) を用いて測定することで、ゲル物性を評価した。また、②再生用ゲルに加える電荷をもつ糖鎖の調製として、コンドロイチン硫酸の酸加水分解反応による糖鎖調製を実施した。得られた糖鎖 (コンドロサミン) は、2 糖で、分子内にアミノ基とカルボキシ基を有する。このアミノ基とカルボキシ基をもつ 2 糖が、別の同じ 2 糖と電荷を介して引き合うことでゲルの強度が向上するかについて検討した。

糖鎖調製は、報告されている方法を参考に実



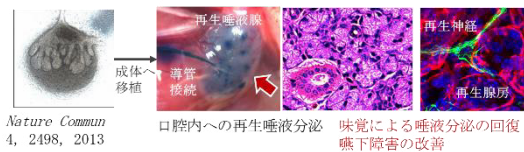
施した (引用文献①)。

4. 研究成果

(1) 分泌腺再生治療の実証に向けて、①器官原基法を用いることにより、唾液腺や涙腺原基を再生可能であることを実証した。②再生した分泌腺原基を、レシピエントの導管と接続する移植技術を開発することにより、再生原基は移植部位で生着し、組織学的に天然組織と同等な構造を有し、再生唾液や涙液が目的部位に分泌可能な再生唾液腺であることが判明した (図 1)。③再生唾液腺は、口腔への味覚刺激によって再生唾液の分泌が促進されることが明らかとなった。また、再生涙腺においても、副交感神経刺激薬や眼表面への冷感刺激によって涙の分泌が促進されたことから、再生分泌腺に対して中枢を介した唾液や涙の分泌制御が行われていることが実証された。④再生唾液腺の移植により、ドライマウスの症状である細菌の繁殖抑制や口腔内の保湿、嚥下障害の改善など、機能的な回復が

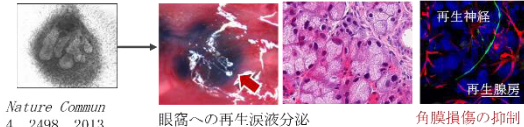
認められることが判明した。また再生涙腺の移植により、ドライアイによる眼表面の損傷が改善されたことから、これら分泌腺の器官再生医療が分泌腺機能障害の根本的な治療法になりうることが実証された。

●唾液腺の再生:



Nature Commun
4, 2498, 2013

●涙腺・ハーダー腺の再生:

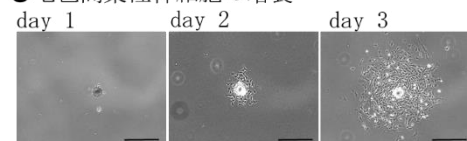


Nature Commun
4, 2498, 2013

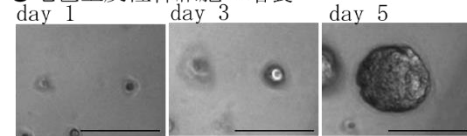
図1 機能的な唾液腺・涙腺の再生

(2) 器官再生治療の実用化のための成体細胞シーズの探索に向けて、①成体マウスから毛包を採取し、毛包の間葉細胞である毛乳頭組織を培養ディッシュ上に播種することにより、毛包形成能を保持したまま増殖可能な培養系を開発した。さらにバルジ領域の毛包上皮性幹細胞をマトリゲル中で三次元培養することにより、毛包形成能を保持したまま増殖可能な培養条件を検討した。これらの成果から、毛包再生治療の実現可能性が示された。

●毛包間葉性幹細胞の培養



●毛包上皮性幹細胞の培養

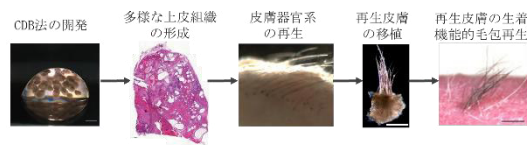


Scale bars, 100 μ m

図2 成体毛包由来幹細胞の培養

一方、iPS細胞から上皮・間葉相互作用による外胚葉性器官を誘導するため、②iPS細胞から胚様体(EB)を形成し、上皮性組織を多数、誘導可能なClustering-dependent embryoid body (CDB)移植法を開発することに成功した。さらに、この胚葉体に、毛包成長に重要なWnt10bを作用させることにより、成熟した毛包や皮脂腺を含む皮膚器官系を誘導可能であることを明らかとした。さらに、③再生毛包を含む再生皮膚器官系をヌードマウスの皮下に移植することにより、天然皮膚と同等の組織構造を有する再生皮膚が生着することを示した(図3)。再生皮膚より萌出している再生毛は、天然毛と同じ毛種、毛包間距離、毛周期を有していることを実証し、この誘導は皮膚領域の誘導であることを

示した。これらの成果から、iPS細胞から皮膚器官系の完全な再生が可能であることを実証すると共に、複雑な構造を有する皮膚器官系の再生医療の実現可能性が示された。



●再生皮膚器官系の組織解析

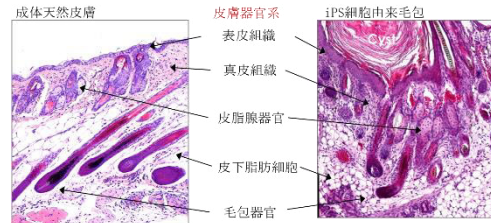


図3 iPS細胞からの皮膚器官系の再生

(3) 再生医療に向けた機能性材料開発として、HAの最終濃度が0.13%と一定で、SAPを0~1.25%まで変えた混合物を作成し、動的粘弾性測定により貯蔵弾性率ならびに損失弾性率の周波数依存特性を測定した(図4)。

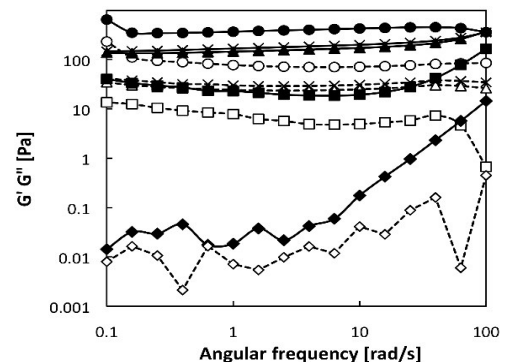


図4 Log-log plot for frequency dependency of mixture of HA and SAP. Concentration of SAP was 1.25% (circle), 0.50% (triangle), 0.25% (cross), 0.05% (square) and 0% (diamond). Concentration of HA was 0.13%. Filled symbols represents storage modulus (G'); open and dotted symbols represents loss modulus (G'').

HA貯蔵弾性率および損失弾性率は、HA単独では周波数依存的に上昇し、ゲル化していないことが示された。一方、ここに終濃度0.05%以上となるようSAPを添加することにより周波数依存特性は示さなくなり、ゲル化が起きたことが判明した。SAPのみでは、0.5%以上の濃度がゲル化には必要であったことから、SAPがHAと相互作用しつつ架橋構造が形成されたことが示唆された。0.24%コラーゲンIからなるハイドロゲルは、貯蔵弾性率 G' が40 Pa、損失弾性率 G'' が3.2 Paであったものの、HA 0.13%, SAP 0.05%の混合物では G' が19 Pa、 G'' が4.9 Paの物性のゲルが得られた。

また、SAP濃度を0.5%に固定し、HA濃度を0~0.5%に変えて同様の解析をおこなった(図5)。その結果、両者が混在している場合、周波数0.1 - 100 rad/sの領域ではほぼ水平な弾性率が得られ、各周波数に弾性率は依存しておらず、ゲルとしての挙動を示した。しかしながら、ゲル強度が高いゲルが得られることから、SAPの割合は下げることが望ましいと考えられた。

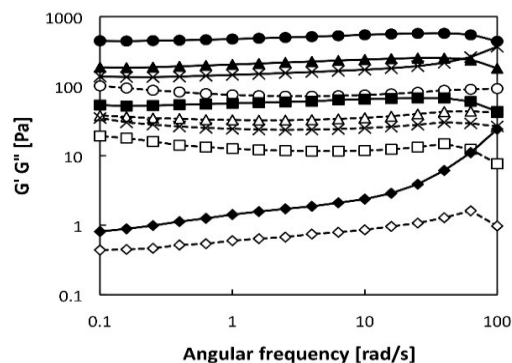


図5 Log-log plot for frequency dependency of mixture of HA and SAP. Concentration of SAP was 0.5%. Concentration of HA was 0.5% (circle), 0.25% (triangle), 0.13% (cross), 0.05% (square) and 0% (diamond). Filled symbols represents storage modulus (G'); open and dotted symbols represents loss modulus (G'').

作製したゲル (HA 0.13%、SAP 1.25%; $G' = 47$ Pa、 $G'' = 9.6$ Pa) を水または培地中に浸漬して観察したところ、水中では1時間後にゲルが溶解した。一方、培地中では形状は維持されたものの、その大きさはやや小さくなったことから(図6)、HA分子が静電相互作用の弱まりとともに分散したためと考えられる。

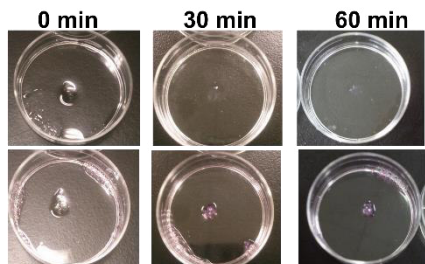


図6 Immersion test. Gels were immersed in water (upper panels) or medium (lower panels).

以上の結果より、力学的強度の観点からはコラーゲンゲルと類似したハイドロゲルを作製することができた。しかしながら、ゲルの安定性上昇に向けて、高分子量HAの利用および側鎖修飾型の多糖の添加により安定化を図ることが今後の課題と考えられる。

さらに、②得られたコンドロサミンは、ESI-質量分析装置、核磁気共鳴装置で分析し、その構造を確認すると共に、コンドロサミンを再生医療用ゲル作製用として提供した。

<引用文献>

①Jean-Claude Jacquinet, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 2574-2578

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計46件)

- ① Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima KE, Ishida K, Ogawa M, Sakakibara K, Asakawa K, Kashiwakura A, Oshima M, Minamide R, Sato A, Yoshitake T, Takeda A, Egusa H, Tsuji T., Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model., *Science Advances*, 査読有, 2016;2(4):e1500887. Doi: 10.1126/sciadv.1500887.
- ② Suwa Y, Nam K, Ozeki K, Kimura T, Kishida A, Masuzawa T., Thermal denaturation behavior of collagen fibrils in wet and dry environment., *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 査読有, 2016;104(3):538-45. doi: 10.1002/jbm.b.33418.
- ③ T. Kawasaki, T. Nakaji-Hirabayashi, K. Masuyama, S. Fujita, H. Kitano, Complex film of chitosan and carboxymethyl cellulose nanofibers, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 査読有, 139, 2016, pp. 95-99 Doi:10.1016/j.colsurfb.2015.11.056
- ③ Okawa H, Kayashima H, Sasaki J, Miura J, Kamano Y, Kosaka Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H., Scaffold-Free Fabrication of Osteoinductive Cellular Constructs Using Mouse Gingiva-Derived Induced Pluripotent Stem Cells., *Stem Cells Int.*, 査読有, 2016;2016:6240794. Doi: 10.1155/2016/6240794.
- ④ Matsushashi A, Nam K, Kimura T, Kishida A., Fabrication of fibrillized collagen microspheres with the microstructure resembling an extracellular matrix., *Soft Matter.*, 査読有, 2015;11(14):2844-51. Doi: 10.1039/c4sm01982b.
- ⑤ Yamamoto N, Oshima M, Tanaka C, Ogawa M, Nakajima K, Ishida K, Moriyama K, Tsuji T., Functional tooth restoration utilising split germs through re-regionalisation of the tooth-forming field. *Sci Rep.*, 査読有, 2015;5:18393. Doi: 10.1038/srep18393.
- ⑥ Matsumoto T, Egusa H, Kato K, Tsuji T., Biodental engineering., *Jurnal of Oral Biosciences*, 査読無, 2015;57(2): 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2015.01.002>
- ⑦ Oshima M, Inoue K, Nakajima K, Tachikawa T, Yamazaki H, Isoobe T,

Sugawara A, Ogawa M, Tanaka C, Saito M, Kasugai S, Takano-Yamamoto T, Inoue T, Tezuka K, Kuboki T, Yamaguchi A, Tsuji T., Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy., Sci Rep., 査読有, 2014;4:6044. Doi: 10.1038/srep06044.

⑧ Ogawa M, Yamashita K, Niikura M, Nakajima K, Toyoshima KE, Oshima M, Tsuji T., Saliva secretion in engrafted mouse bioengineered salivary glands using taste stimulation. J Prosthodont Res., 査読有, 2014;58(1):17-25. DOI: 10.1016/j.jpor.2013.12.001.

⑨ Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Ikeda K, Shimmura S, Kawakita T, Tsubota K, Tsuji T., Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. Nat Commun., 査読有, 2013;4:2497. DOI: 10.1038/ncomms3497.

⑩ Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T, Tsuji T., Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. Nat. commun., 査読有, 2013;4:2498. DOI: 10.1038/ncomms3498.

〔学会発表〕招待講演 (計 78 件)

① 辻孝, 上皮・間葉相互作用による器官形成と今後の課題, 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016.03.09, 大阪・大阪国際会議場

② 辻孝, 再生医療の最前線としての毛髪科学, 第 79 回皮膚科学会総会, 2016.03.17, 東京・京王プラザホテル

③ Takashi Tsuji, Hair Regeneration as a Future Organ Replacement Regenerative Therapy, 9th Hair Research, 2015.11.20, Miami (U.S.A.)

④ Takashi Tsuji, Tooth and Salivary Gland Regeneration as a Future Oral Treatment, 2015 中華牙醫學會第二十屆第一次會員大會暨第三十八次學術研討會暨全國牙科器材展, 2015.10.17, Taipei (Taiwan)

⑤ Takashi Tsuji, Tooth and Salivary Gland Regeneration as a Future Oral Treatment, Taiwan International Orthodontic Conference (TIOF), 2014.11.21, Taipei (Taiwan)

⑥ Takashi Tsuji, Functional Organ Development by bioengineered Organ Germs between Epithelial and Mesenchymal Stem

cells, CDB symposium, 2014.03.12, Kobe・RIKEN CDB

⑦ 辻孝, 器官再生による口腔機能回復を目指して—歯と唾液腺、涙腺の再生—, 第 58 回日本唾液腺学会学術集会, 2013 年 12 月 14 日, 東京・文教学院大学

〔図書〕 (計 8 件)

① 中村奈緒子, 岸田晶夫, シーエムシー出版, 再生医療用足場材料の開発と市場、第 I 編第 4 章 脱細胞化技術と足場材料への応用, 2016, 267

② Oshima M, Tsuji T., Wiley-Blackwell, Horizontal Alveolar Ridge Augmentation in Implant Dentistry, A Surgical Manual, 2015, 9

③ Hara ES, 大野充昭, 窪木拓男, 骨・関節・軟骨治療のための新製品開発と臨床ニーズ～治療薬, 診断薬, 診断装置, 健康食品～, 関節軟骨の再生を協力を誘導するステロイドホルモン, 2015, 7

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

名称: キヌレニンを用いた骨折治療法

発明者: 窪木拓男、大野充昭、他

権利者: 国立大学法人、岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-037932 号

出願年月日: 平成 27 年 11 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 皮膚附属器官を有する全層皮膚の製造方法

発明者: 辻孝、豊島公栄

権利者: 株式会社オーガンテクノロジーズ

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/075287

出願年月日: 平成 27 年 9 月 7 日

国内外の別: 国外

名称: ハイドロゲル繊維の製造方法及び当該製造方法により製造されたハイドロゲル繊維

発明者: 藤田 聡, 西本 昇平

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-104696

出願年月日: 平成 27 年 5 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: 骨再生剤

発明者: 江草宏

権利者: 国立大学法人、大阪大学

種類: 特許

番号：PCT/JP2014/078934
出願年月日：平成26年10月30日
国内外の別：国外

名称：皮膚附属器官を有する全層皮膚の製造方法

発明者：辻孝、豊島公栄
権利者：株式会社オーガンテクノロジーズ
種類：特許
番号：特願2014-182611号
出願年月日：平成26年9月8日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/org/topics/index.html>

6. 研究組織 (1)研究代表者
辻 孝 (TSUJI, Takashi)
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー
研究者番号：50339131

(2)研究分担者
窪木 拓男 (KUBOKI, Takuo)
岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・教授
研究者番号：00225195

大島 正充 (OSHIMA, Masamitsu)
岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・助教
研究者番号：00548307

江草 宏 (EGUSA, Hiroshi)
東北大学・歯学研究科（研究院）・教授
研究者番号：30379078

坪田 一男 (TSUBOTA, Kazuo)
慶応義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40163878

梶原 康宏 (KAGIHARA, Yasuhiro)
大阪大学・理学（系）研究科（研究院）・教授
研究者番号：50275020

藤田 聡 (FUJITA, Satoshi)
福井大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授
研究者番号：60504652

岸田 晶夫 (KISHIDA, Akio)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号：60224929

佐藤 明男 (SATO, Akio)
北里大学・医学部・特任教授
研究者番号：80255356

(3)連携研究者
武田 啓 (TAKEDA, Akira)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：20197297

豊島 公栄 (TOYOSHIMA Ko-ei)
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・客員研究員
研究者番号：00599243

(4)研究協力者
なし