

移植材としての筋芽細胞シートを評価するには

紀ノ岡正博

はじめに

細胞や遺伝子などを用いて従来の薬物治療や臓器移植医療では治療できなかった組織・臓器の損傷ならびに難病の根本的な修復・再生を行う「再生医療」は、これまでの医療概念を根底から変革しつつあり、難治病の治療を進める上で今や必須の課題である。現在、再生医療は現実の医療として、米国を中心に産業化の段階に入っており、再生医療の経済的価値の認識とともにその競争が生じている。

一方、2006年におけるマウス人工多能性幹(iPS)細胞の創出以来、幹細胞研究が一層活性化され、現在では、その多様な分化能により、これまで増殖が困難であった細胞種の幹細胞からの大量分化が見込まれている。この技術は、たとえば、iPS細胞由来の網膜色素上皮細胞、心筋細胞、膵島細胞、肝細胞などを用い、組織化を伴った再生医療への展開が期待されている。経済産業省のレポート¹⁾によると、国内の再生医療全般の市場規模は、2012年で約90億円と報告されている。保険診療下による再生医療製品は2品の承認に留まっている状況にあって、先述の市場の多くは保険外診療下でのがん免疫細胞療法、美容医療としての線維芽細胞輸注療法と歯髄再生治療に由来している。2020年にかけては、現在上市されている自家培養表皮および自家培養軟骨(軟骨損傷)のほか、現在確認申請提出以上のステージにある自家骨格筋芽細胞(重症心筋梗塞)、同種骨髄由来間葉系幹細胞(GVHD)の上市に向けた取組みが加速していくと考えられている。一方、世界で再生医療製品は、自家/同種培養皮膚や自家/同種培養角膜上皮を含む51品目(2012年12月時点)が承認されている。それらは、日本での上市や普及に向けた開発が進められており、再生医療の対象領域は拡大していくと予測される。

再生医療の事業環境変化としては、2013年11月に二つの法律(「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(新法)」「薬事法等の一部を改正する法律(改正薬事法)」)が成立したことがあげられる。これにより、今後、幅広い疾患に対して再生医療が行われると予想される。その結果、現行の開発パイプラインにあがっている製品による市場形成だけでなく、iPS細胞の活用などを含めた

新たな市場開拓や、糖尿病などの慢性疾患を中心とした医療費の削減、さらには海外市場の獲得も含めた再生医療の経済効果が期待される。

再生医療の発端は、1975年、Greenらにより表皮を構成する角化細胞の培養技術²⁾と1979年の角化細胞を重層化させた表皮シート作製技術³⁾開発である。1983年には本技術を基にして、熱傷患者への創傷治癒を目指した表皮シート移植治療が米国にて成し遂げられた。一方、足場(スキャフォード)を利用し立体的構造を有する組織を形成させる技術「組織工学」が、1980年代後半から展開した。その結果再生医療は、種々の疾患や傷害に対し、従来の薬剤投与や人工素材を用いた機能代替による対症療法に代わって、細胞の増殖・分化・代謝などの潜在能力を利用し、患者自身もしくは提供者(ドナー)の細胞を増殖・分化・組織化させて移植し、疾患を根治させる療法として展開が期待されてきた⁴⁾。さらに、1990年代に入ると、岡野らにより、立体的な足場を利用せずに板状の細胞シートを積層し、立体構造を有する培養組織の構築を目指した細胞シート工学技術が開発され、新たな展開が提案された⁵⁾。この細胞シート工学は、2003年に西田らが角膜上皮細胞シートを疾患部位(角膜)へ移植をしたことをはじめとし、種々の治療展開が期待されている⁶⁾。現在では、細胞シートによる血管誘導技術開発とともに、より複雑で大型の構造を有する組織再構築に対する研究が進められている^{7,8)}。

再生医療用途では、患者自身の細胞を原料とし、移植する自家培養細胞移植を対象とすることが多い。その場合、患者自身の細胞・組織を取り出し(細胞採取)、体外にて、馴化させ(初代培養)、増幅(大量培養)、組織化(分化培養)を経て移植材(いわゆる再生医療製品)を形成し、患者への提供(移植)を行うこととなる。

再生医療製品の一連の製造工程を分類すると、細胞培養加工施設(製造施設)における工程管理および品質管理、製造施設外の外工程(搬送・病院での移植前処理などの工程を含む工程)の三つに分けられる。この一貫した工程からなる製造・治療技術に対して産業化が期待されているが、これらの工程では、再生医療製品の製造・治療に固有の種々の技術構築が要求されている。特に、再生医療製品に対する薬効評価手法が未熟で、品質として

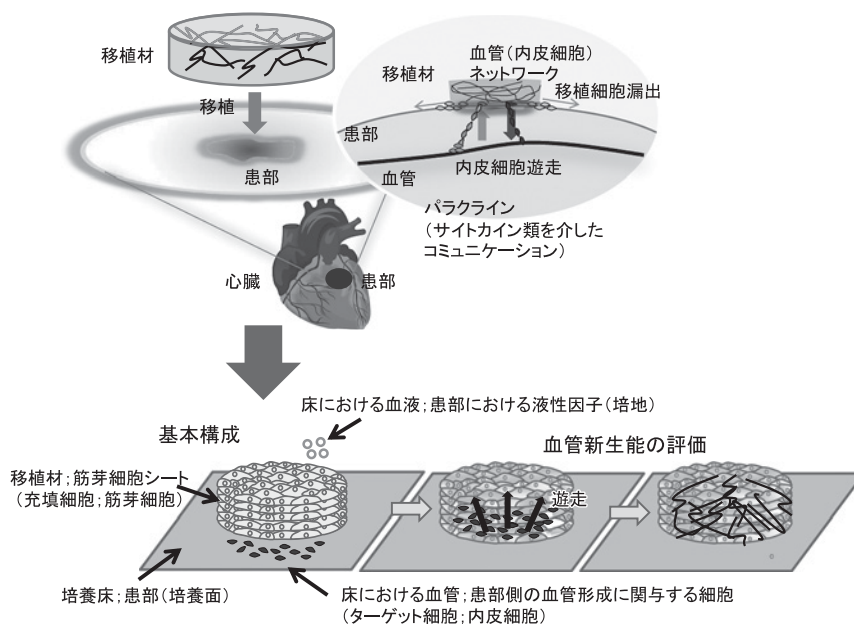


図1. 積層筋芽細胞シートを用いた培養フォーマット

の薬効が曖昧となっていることが産業化を妨げており、品質評価手法の構築が急務である。そこで本項では、品質管理における製造された培養細胞・組織の薬効についての技術構築の取組みを、筋芽細胞シートの移植例を通して紹介する。

積層シート作製ツールとその積層方法

患者の骨格筋から筋芽細胞を単離し、増幅、シート形成した後、拡張型心筋症などの心疾患へ移植する再生医療が注目されている。本治療は、2007年の澤らにより、世界で初めて実施され⁹⁾、現在では企業治験段階にある。

移植材としての筋芽細胞シートの薬効は、図1に示すように、移植後、血管新生を促進するサイトカイン群が移植材から分泌され、いわゆる、そのパラクライン効果により、血管新生が促進され、疾患部における血流改善を経て、結果、心機能が回復すると考えられている。よって、筋芽細胞シート移植の治癒効果とは、内皮細胞の遊走性が促進されること、健全部(移植床側)から患部や移植材へと初期ネットワークが形成されるといった、一連の内皮細胞挙動が重要と考えられる。そこで我々は、筋芽細胞と血管内皮細胞のコミュニケーション(パラクライン)を解析可能なテンプレートを対象とし、患部での環境を模倣したバイオアッセイ系、つまり、移植材(充填細胞)と被移植部位(床)とのコミュニケーション(パラクライン)を考慮した培養フォーマットとその解析手法としての解析フォーマットを構築した¹⁰⁻¹⁴⁾。

培養フォーマットは、骨格筋筋芽細胞(充填細胞)からなる移植材としての「細胞シート(充填細胞の板状集塊)」、患部を模倣した移植先の床としての「培養面」、床に存在する血管を模倣した培養面上の「内皮細胞(ターゲット細胞)」、床における血液などの培養環境を模倣した「培地」の4要素からなる。さらに、定量的画像解析(解析フォーマット)と合わせて、充填細胞とターゲット細胞のクロストーク解析を可能とする。

これまで、1) 充填細胞の挙動として、シート内の細胞が流動していること、分子拡散とのアナロジーにて見かけの拡散係数を算出することで、2) 内皮細胞の遊走性は、筋芽細胞の流動性の2倍以上となること、つまり、充填細胞内にて内皮細胞が積極的に遊走していることを明らかとした。一方、培養経過とともに、内皮細胞同士の連結が観察され、ネットワーク形成がなされることが導き出され、さらに内皮細胞ネットワークにおける先端数当たりの長さを評価パラメータとして用いることで、内皮ネットワーク形成能の解析を可能とした¹⁴⁾。

培養フォーマットは、図2に示すように、スタンプを含む種々の治具により、以下の手順で形成される。まず、ゼラチンスタンプ作製として、シリコン製シートを下に敷いた型枠にゼラチン溶液を流し込む。次にスタンプを配置しゼラチンを固定化、型抜き台を用いて型抜き、ゼラチンスタンプを形成する。さらに、積層細胞シート形成のために、あらかじめ生細胞用蛍光色素(赤色)で染色した筋芽細胞を24ウェル温度応答性培養皿(UpCell,

細胞シート作製セット



スタンプ、スタンプホルダー、スタンプモールド、シリコンゴムシート、スタンプ押し出し器、37°Cウォームプレート、24ウェル用7タ、35 mmディッシュ用7タ、滅菌用タッパーウェア、テフロンリング、ピンセット

シート積層・転写

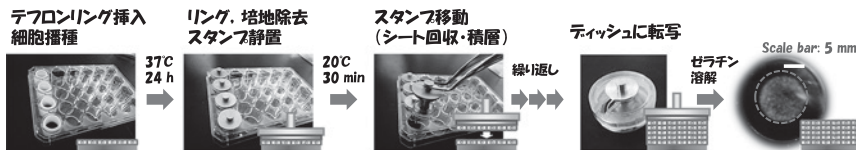


図2. 細胞積層シート作製ツールと手順

セルシード) 内に播種し培養する。ここで、各ウェルには播種前にテフロンリングをはめ込むことで、細胞のウェル壁面への接着を防ぐ。培地を取り除き、ウェルからテフロンリングを外し、作製されたゼラチンスタンプをウェル上に置き、20°Cの低温インキュベータにて、静置する。スタンプをゆっくりと引き揚げ細胞シートをウェル底面から回収する。引き揚げたスタンプを別のウェルに移し、繰り返すことで、積層化させる。スタンプ底面にある積層細胞シートは直径35 mmのディッシュ上に転写用ふたを用いて重ねる。ここで、必要に応じて、生細胞蛍光染色（緑色）された内皮細胞をあらかじめ播種し培養する。積層細胞シートは20°Cにて放置させて、細胞シートの培養面への接着を促進させた後、あらかじめ37°Cに温められた培地を添加し、ホットプレート上（37°C）に静置させてゼラチンを溶解させる。最後に溶解したゼラチンを含む溶液を除去し、新鮮培地を添加し培養を開始する。継時的に観察を行い内皮細胞の挙動解析を行う。

細胞シート移植材の薬効評価系

培養組織の品質評価には、動物個体への移植実験を実施するが、*in vivo*系評価では困難な細胞レベルでの動態評価、解析能の限界を補い *in vivo* および *in vitro* 系の解析ギャップを埋める動物代替法が注目されている。

これまで内皮細胞の遊走現象については、主に2次元培養面上で培養された細胞を対象とした解析が行われて

ゼラチンスタンプ作製

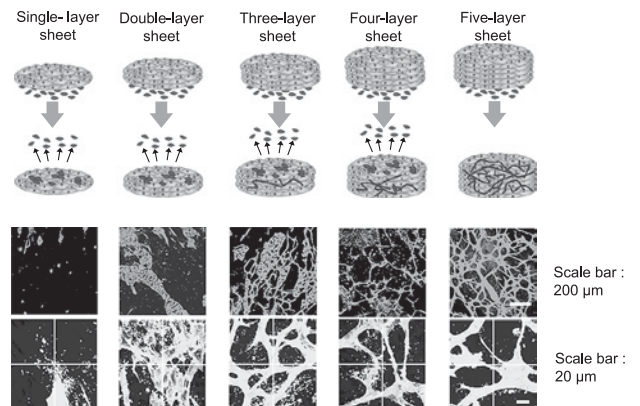
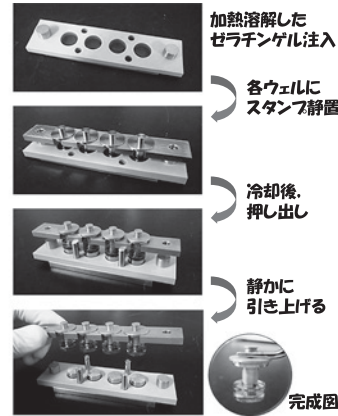


図3. 種々の層数の筋芽細胞シート内における内皮細胞の挙動

きたが、3次元組織を対象として細胞遊走を定量的に解析した例はほとんどない。そこで、底面には血管内皮細胞（ターゲット細胞）を Cell Tracker Green™（緑色）で、充填細胞として骨格筋筋芽細胞を Cell Tracker Orange™（赤色）で染色し、培養フォーマット内でHUVECの継時的挙動を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した^{11,12)}。

筋芽細胞シートの層数に対する内皮細胞ネットワークの形成を検討した。図3に示すように、培養96 hにおいて、水平方向の観察結果から、単層の筋芽細胞シートにおいては、内皮細胞は筋芽細胞シート内に見えなくなった。また、2, 3層のシートにおいては、内皮細胞が島状に集まり、さらに、4, 5層のシートでは、徐々に島状から網目状へと変化することがわかった。また、シート作

製時（培養開始時）に最下層のみで存在していた内皮細胞はシートの上方に移動し、単層シートでは、細胞シート内における活発な遊走およびシートから抜け出ていく様子が観察された。さらに、2層シート以上では、抜け出ることなく、島状として上層に留まり、4、5層のシートでは、その中層にて内皮細胞が網目状のネットワークを形成することがわかった¹²⁾。また、本培養フォーマットでのネットワーク形成現象に対して、解析フォーマット（画像処理・解析手法）にて、平面的に、総ネットワーク長さ、全先端数、ネットワーク度での評価を試みた結果は、観察結果をよく反映しており、画像解析による解析フォーマットの有効性が明らかとなった¹¹⁾。

まとめ

我々は、筋芽細胞シート内の血管新生を模擬した培養フォーマットを構築し、解析フォーマットによる定量的な解析を行うことができた。今後、個々の患者由来の細胞群を鑑み、筋芽細胞シート内の線維芽細胞の混在などによる血管内皮細胞のネットワーク形成能の違いなどの評価などに活用して行く予定である。

また、積層細胞シートは、独立した細胞の集合体に、細胞間コミュニケーションを有し機能発現に至る過程を表現できるいわゆるミニマムティッシュと考えられ、アッセイ系評価のための培養フォーマットとして有望である。多くのバイオアッセイ技術は、平面もしくはゲルなどの立体足場にて細胞を対象としたもので、組織を対象としたものは依然未熟で、発生学的に類似した生物現象を模擬した新しい培養系が望まれている。

種々の幾何を有する集塊の調製は、球状や板状での集塊が考えられる。図4に示すように、球状集塊は、その形成手段は簡易であるものの、集塊に厚み（数百 μm オーダー）があり、集塊内での血管ネットワークなど複雑な（無秩序な）模様を解析する際、3次元解析が必須となる。一方、積層細胞シートなどの板状集塊は、秩序をもつ培養フォーマットであり、組織の厚みが数十 μm 程度と薄く、内部での細胞挙動は3次元であるものの、解析的には厚み方向（Z方向）と平面方向（XY方向）の1+2次元と次元を低くして解釈できるため、定量観察に強みを有していると考えられる。魅力ある評価テンプレートの構築には、培養フォーマットと解析フォーマットを合わせて構築する必要がある。今回提案した技術は、解析する観察ツールを設計する上で、3次元座標軸で観察できる共焦点走査型レーザー顕微鏡を、安価な平面観察機器である蛍光顕微鏡へとダウングレード可能であ

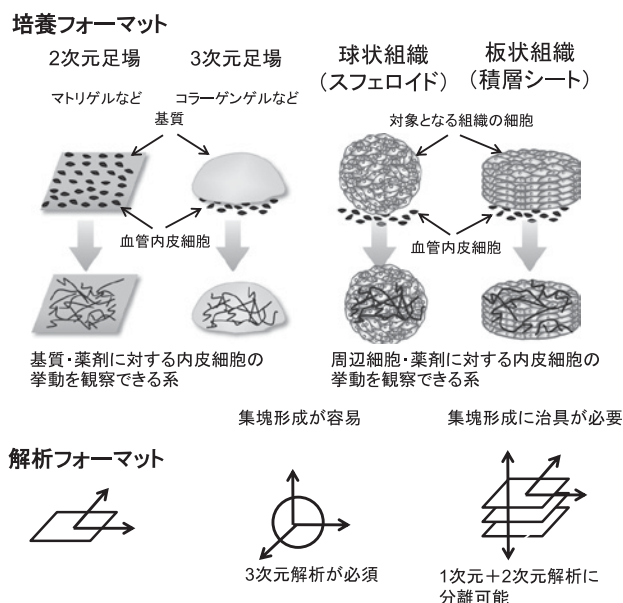


図4. 種々の培養フォーマットと解析フォーマットの特徴

ることを意味している。その結果、現状の平面観察が主体である安価なハイスループットシステムへの実装が可能とし、本評価テンプレートの汎用性が期待できる。

謝 辞

本研究は、総合科学技術会議により制度設計された最先端研究開発支援プログラムにより、日本学術振興会を通して助成された。また、一部は、科学技術振興機構（JST）の再生医療実現拠点ネットワークプログラム、疾患・組織別実用化研究拠点（拠点A）「iPS細胞を用いた心筋再生治療創成拠点」により支援された。

文 献

- 1) 経済産業省：http://www.meti.go.jp/press/2012/02/20130222004/20130222004-2.pdf
- 2) Rheinwald, J. and Green, H.: *Cell*, **6**, 317 (1975).
- 3) Green, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5665 (1979).
- 4) Langer, R. and Vacanti, J. P.: *Science*, **260**, 920 (1993).
- 5) Okano, T. et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243 (1993).
- 6) Nishida, K. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1187 (2004).
- 7) Haraguchi, Y. et al.: *Nat. Protoc.*, **7**, 850 (2012).
- 8) Sakaguchi, K. et al.: *Sci. Rep.*, **3**, 1316 (2013).
- 9) Sawa, Y. et al.: *Surg. Today*, **42**, 181 (2012).
- 10) 紀ノ岡正博：細胞工学, **32**, 2 (2013).
- 11) Nagamori, E. et al.: *Biomaterials*, **34**, 662 (2013).
- 12) Ngo, T. X. et al.: *Biotechnol. Lett.*, **35**, 1001 (2013).
- 13) Kino-oka, M. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 128 (2012).
- 14) Nagamori, E. et al.: *Curr. Nanosci.*, **10**, 173 (2014).