

温度応答性細胞培養器材 UpCell® を利用した 細胞シート工学によって Tissue Engineering の未来を開拓する

＝骨髄由来細胞シートを利用した下部尿路症状の新規治療の開発＝

信州大学 医学部 泌尿器科学教室
医学博士

助教 **今村 哲也**

下部尿路症状*に対する標準治療は、薬物療法であるが、薬物に対して抵抗性を示す下部尿路症状は、治療に難渋し患者の生活の質を著しく低下させる。したがって、新規治療開発は患者の生活の質の向上の為にも急務な研究課題である。（*膀胱と尿道・尿路の機能が低下して生じる排尿トラブル）

現在、間葉系幹細胞を用いて、Tissue Engineering 手法を駆使して下部尿路の再生医療研究を進めており、その一つが、UpCell® を利用した細胞シート工学の応用【骨髄由来細胞シートのパッチ移植】である。

温度応答性細胞培養器材 UpCell® を利用した細胞シートとの出会い

UpCell® を利用した細胞シートを用いた膀胱再生医療研究に着手した背景には、骨髄由来細胞を直接注入移植する研究の考察がある。凍結傷害を与えたマウス膀胱や、放射線照射による傷害を与えたラットの膀胱萎縮モデルに、細胞を直接注入移植する方法を試みて、一部平滑筋の再生など、一定の効果を確認した。しかし、移植細胞の消失、もしくは生着率が低く、また、細胞活性の低下や移植によるレシピエント組織での傷害の拡大の懸念を有する課題が残った。このことから、直接移植方法よりも、効果的な移植細胞のデリバリシステムの必要性を痛感した。

そこで、UpCell® を利用し作成した細胞シートを膀胱の外側からパッチ移植をするという手法を考案した。特に、温度応答性ポリマーを底面に固定化した細胞培養器材 UpCell® は、37℃から 20～25℃に温度を下げるだけで容器に付着した細胞シートの細胞外マトリックスを壊さずに回収できる為、細胞活性の高い、良質な細胞シートが利用可能で、最適な培養器材として選択した。

UpCell® を利用した細胞シートによる膀胱再生

UpCell® を用いて作製した骨髄由来間葉系幹細胞シートを放射線照射したラット膀胱に、パッチ移植をすると機能的な膀胱が再生し、その再生機序は、細胞シートを形成している骨髄由来幹細胞のパラクリン効果であることを明らかにした。(1)

本稿では、UpCell® を用いた骨髄由来幹細胞シートの作製方法と膀胱へのパッチ移植の方法について紹介する。

参考文献

1. Imamura, Ogawa, Minagawa, Yokoyama, Nakazawa, Nishizawa, and Ishizuka: Engineered bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured rat urinary bladder. *Tissue Engineering Part A* 21: 1600-1610, 2015 DOI: 10.1089/ten.TEA.2014.0592

UpCell® を用いた骨髄由来幹細胞シートの作製方法

① 骨髄由来細胞の採取と初代培養及び、UpCell® への継代

- ① ラットの大腿骨から採取した骨髄由来細胞を 10cm collagen-coated dish で培養する。
- ② 細胞をカウントして UpCell® の dish 径に細胞数を合わせて（下記の表参照）、十分に温め 37℃ に保温した培地で適宜、希釈して細胞数を調整する。
- ③ 本研究では、12 well UpCell® (CS3013) : 1 well に対して、 2.0×10^5 cells /1ml を播種している。細胞懸濁液を播種後、培地を 2ml 追加添加して、細胞を dish に満遍なく広げるために、数分おきに UpCell® を前後左右に振る。
- ④ 培地交換では、37℃ に十分に培地を温め、短時間で交換し、シートが剥がれないように注意する。 ← **ここがポイント**

UpCell® に播種する細胞数（ラット骨髄由来細胞の場合）

UpCell® 6 well dish (1 well = 35mm 径; CS3014) : 4.0×10^5 cells (基準)
 UpCell® 12 well dish (1 well = 20mm 径; CS3013) : 2.0×10^5 cells
 UpCell® 24 well dish (1 well = 10mm 径; CS3012) : 1.0×10^5 cells
 UpCell® 6 cm dish (CS3016) : $8.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$ cells

② 骨髄由来細胞シートの作製

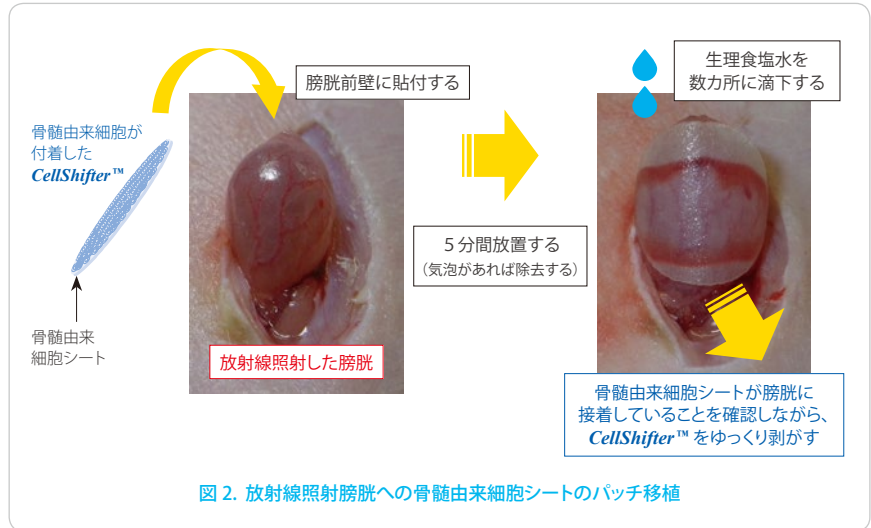
- ⑤ 細胞がオーバーコンフルエントに達するまで培養する。（細胞同士が密着して、UpCell® の底が完全に細胞で覆われる状態で培養すると良い）
- ⑥ 培養している培地を全量除去する。
- ⑦ ピンセットで UpCell® の縁に接着している細胞を切り離す。
- ⑧ 20℃ に設定したプレート上に静置する。（もしくは、クリーンベンチ内が 20℃ 前後の場合、そのまま静置も可）。
- ⑨ この間に、UpCell® の dish 径に合わせた CellShifter™ を少量（100-500µl）の培地、もしくは生理食塩水で膨潤しておく。本研究においては、12 穴マルチウェル用（17mm）細胞シート回収用支持体 CellShifter™ (CSD004) を使用した。
- ⑩ UpCell® の縁から細胞が剥がれ始めたのを目視で確認できた時、UpCell® を 20℃ に設定したプレート（もしくは、20℃ 前後のクリーンベンチ内）に静置したままで、膨潤した CellShifter™ を重ねる。
- ⑪ 20℃ に設定したプレート（もしくは、20℃ 前後のクリーンベンチ内）上で、約 20 分間 CellShifter™ を重ねたまま静置する。このとき、気泡がある場合は、ピンセットで優しく気泡を押し出すと良い。
- ⑫ CellShifter™ の端からゆっくりめくり、CellShifter™ に付着しているシート状の細胞を回収する。



図 1. 骨髄由来細胞シートの作製

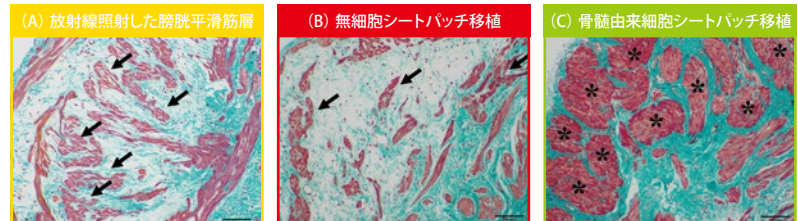
③ 放射線照射傷害膀胱への骨髄由来細胞シートのパッチ移植

- ① 麻酔をかけたラットの下腹部を正中切開して、放射線を照射した膀胱（参考文献 1）を露出させる。
- ② 膀胱の前壁に **CellShifter™** に付着している骨髄由来細胞シートを、細胞側が膀胱に接する様に貼付する。このとき、気泡がある場合は、ピンセット等で優しく気泡を押し出すと良い。
- ③ 5 分間放置した後、**CellShifter™** 側から約 500 μ l から 1ml の生理食塩水を数カ所に滴下する。
- ④ 骨髄由来細胞シートが膀胱に接着していることを確認しながら、**CellShifter™** をゆっくり剥がす。
- ⑤ 膀胱を基の位置に戻して、閉腹する。



骨髄由来細胞シートの有用性と今後の新規細胞シートの開発へ

UpCell® で作製した骨髄由来細胞シートのパッチ移植は、何からかの傷害を受けて生じた膀胱機能障害に対して、有効な治療法となる可能性を示した。傷害を受けた膀胱組織に対する治療効果の機序としては、骨髄由来細胞シートからのパラクリン効果と考えられる。UpCell® で作製した骨髄由来細胞シートは、培養を経て細胞活性が最も良い状態で移植まで移行できる。この点において、培養細胞を酵素処理などで回収した細胞をそのまま、ターゲット臓器組織に直接注入移植法では、認められない最大の利点であると考えられる。



- (A) 放射線照射した膀胱では、平滑筋層が消失する。
- (B) 無細胞シートをパッチ移植した対照群では、平滑筋層の再生が認められなかった。
- (C) 骨髄由来細胞シートをパッチ移植すると平滑筋層の再生が認められた。(*)

現在、細胞シートの有用性を十分に発揮させるとともに、泌尿器科領域での実用化技術への課題である『強度』を克服するために、最新の技術を効率的に導入して、効果的に組み合わせた様々な形の新規細胞シートを開発している。今後、下部尿路再生医療研究、実臨床に向けたトランスレーショナルリサーチ分野にてご紹介できると考えている。

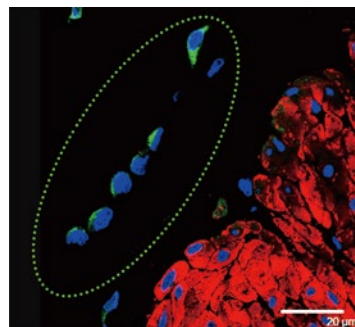


図 4. 移植 4 週間後の骨髄由来細胞シートの着生

【謝辞】

今村氏は、当社セルシードが主催した、第1回細胞シート工学イノベーションフォーラム（2019年7月19日）にて、最優秀ポスター賞を受賞しました。氏は、泌尿器科分野において、間葉系幹細胞を用いた Tissue Engineering 手法での再生医療研究に取り組んでおられます。今回、ご寄稿を頂きました。

参考文献

1. Imamura, Ogawa, Minagawa, Yokoyama, Nakazawa, Nishizawa, and Ishizuka: Engineered bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured rat urinary bladder. *Tissue Engineering Part A* 21: 1600-1610, 2015 DOI: 10.1089/ten.TEA.2014.0592

信州大学 医学部 泌尿器科学教室

医学博士

助教 **今村 哲也**（2017年4月より現職）

研究分野再生医学 排尿機能学

現在の研究課題下部尿路医学

所属学会

日本泌尿器科学会、日本排尿機能学会、日本再生医療学会、
日本人工臓器学会、日本獣医再生医療学会



販売代理店

販売代理店