

**平成30年度日中韓フォーサイト事業
最終年度 実施報告書（平成25年度採択課題用）**

（※本報告書は、前年度までの実績報告書とともに事後評価資料として使用します。）

1. 拠点機関

日本側拠点機関：	東京女子医科大学
中国側拠点機関：	天津医科大学
韓国側拠点機関：	梨花女子大学校

2. 研究交流課題名

（和文）：難治性疾患の再生治療におけるナノバイオマテリアルと送達技術戦略

（英文）：Nano-Biomaterials and Delivery Strategies in Regenerative Medicine for Intractable Diseases

研究交流課題に係るウェブサイト：<http://twins.twmu.ac.jp/a3foresight/>

3. 採択期間

平成25年8月1日～平成30年7月31日

(6年度目)

4. 実施体制

日本側実施組織

拠点機関：東京女子医科大学

実施組織代表者（所属部局・職名・氏名）：学長・吉岡俊正

研究代表者（所属部局・職名・氏名）：医学部・教授・大和雅之

協力機関：早稲田大学・国立循環器病研究センター・東海大学・長崎大学・岡山大学・
北海道大学・九州大学・北九州市立大学・慶應義塾大学

事務組織：東京女子医科大学 研究支援部 教育研究資金課

相手国側実施組織（拠点機関名・協力機関名は、和英併記願います。）

（1）中国側実施組織：中国国家自然科学基金委員会

拠点機関：（英文）Tianjin Medical University

（和文）天津医科大学

研究代表者（所属部局・職名・氏名）：（英文）School of Pharmacy・Professor・Victor C.
YANG

協力機関：（英文）Fudan University, Tianjin University, Chinese Academy of Sciences
（和文）復旦大学、天津大学、中国科学院

(2) 韓国側実施組織：韓国研究財団

拠点機関：(英文) Ewha Womans University

(和文) 梨花女子大学校

研究代表者(所属部局・職名・氏名)：(英文) Department of Pharmacy・Professor・Seung
Jin LEE

協力機関：(英文) Kyung Hee University, KIST・Korea Institute of Radiological and
Medical Sciences, Ajou University, The University of Suwon, Samsung
Medical Center

(和文) 慶熙大学校、韓国科学技術研究院、亜洲大学校、水原大学校、三星医
療院

5. 研究交流目標

5-1. 平成30年度研究交流目標

<研究協力体制の構築>

最終年度では日本を中心に中韓と協働し、成長因子あるいは薬物を徐放する細胞シート開発を進め、移植に適した血管網構造を有する心筋・肝細胞シート組織、薬物放出型の間葉系幹細胞シートの開発を進める。

日韓間での共同研究については、初代心筋細胞・肝細胞への mRNA トランスフェクションおよび新規非ウイルスベクターの開発に関して、韓国側の若手を含む研究者との交流を引き続き実施する。心筋細胞、肝細胞への遺伝子導入研究では *in vitro* 評価の結果をもとに、mRNA をトランスフェクションした細胞シート組織の小動物への移植も検証する。さらに、血管新生因子放出型のスキファールドや細胞シートを利用した新しい虚血性心疾患治療や肝細胞シート移植のための新しい血管網組織構築を目指す。

日中間の国際的な共同研究では、平成29年度に技術移転した温度応答性培養皿を用いた細胞シート技術をもとに遂行する。現在、中国側拠点では細胞シート関連研究を実施するための設備整備を進めている。日本側で確立した細胞シートに関するノウハウ等の情報を提供しながら、必要に応じて二国間における短期間(数日~1週間)での人的な交流を実施する。とくに中国側で開発する長期徐放型の薬物微粒子を導入した細胞シートの構築と評価法について議論し、がん細胞シート移植により作製した担がん動物モデル等を用いて、薬物徐放能を付加した間葉系細胞シートや中国側で開発したナノサイズの DDS 製剤の薬理効果の有用性を検証する。

平成30年度は日中韓の三カ国が参加する国際セミナーは開催せず、共同研究実施のための研究者交流を実施する予定である。

<学術的観点>

効率的な組織再生を実現するには、酸素運搬や老廃物除去等を行うための血管網を移植組織内に形成し、これを宿主側組織と連結させることがきわめて重要となる。この

ような観点から、生体外環境において生体組織が長期にわたりその機能を維持するために必要な血管網構築技術開発に加えて、立体組織内での血管網形成メカニズムも探求する。初代培養細胞に対するトランスフェクション効率が低いという問題点があきらかになってきており、この点を克服するためのデリバリー技術を駆使し、*in vitro* での三次元細胞シート組織内血管網の構築、および *in vivo* での移植細胞シート組織の安定生着を目指す。

一方、細胞シート移植法は標的部位への容易な生着が可能であるため、細胞シートに薬物徐放能を付加することで、これを移植した疾患部周辺において局所的な薬物作用を実現する新しい薬物放出プラットフォームとして適用が期待できる。このような背景のもと、中国側技術の一つである長期薬物徐放担体を細胞内に導入した間葉系細胞シートの構築を検討するとともに、組織生着性と薬物徐放能の評価を実施する。

<若手研究者育成>

引き続き、日中韓での共同研究推進のため若手研究者を含めた三か国間における人的交流を含めた研究交流を通じ、若手研究者の研究教育活動を行う。韓国側からは日本側への学生派遣の検討がなされている。また、日本側から中国側に訪問する計画も伝えており、相互訪問を通じ、日本側や相手国側の学生の教育や研究者育成を実施する。

<その他（社会貢献や独自の目的等）>

平成 29 年度に本事業で開発した技術を企業に紹介したように、成果の社会還元を見据えた活動を引き続き実施する。具体的には本学の大学院博士課程に所属する社会人や東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設（TWIns）のメディカルイノベーションラボラトリーに参画する企業、または先端生命医科学研究所が主体的に運営するバイオメディカル・カリキュラムに参加する社会人等に研究紹介を継続して行う。

5-2. 全期間を通じた研究交流目標

再生医療は今後の発展および産業化が期待されている先端医療分野のひとつであり、特に心臓、肝臓、軟骨等の再生を目的とした技術開発が各国の研究機関において精力的に進められている。さらに近年の幹細胞技術の躍進に伴い、細胞を用いた医療技術はその可能性を大きく広げている。一方、細胞を用いた再生治療の多くは、細胞懸濁液を患部に直接注入する方法をとっているが、移植細胞が患部に十分に生着しないこと、さらに血中に細胞を注入した場合、肺塞栓等のリスクが発生することが問題である。

このような中、東京女子医科大学岡野・大和らが確立した細胞シート技術は、現在最も有望な細胞移植および再生治療技術として注目されている。温度応答性培養皿を用いて作製されるシート状の細胞組織（細胞シート）はこれまでの細胞治療とは異なり、生化学的物性を維持した状態の細胞を移植できるため、細胞移植効率およびその治療効果

を飛躍的に向上させることができ、これまでに角膜、心筋、食道、歯根膜、軟骨の臨床応用に成功している。そこで本事業では、細胞シート再生治療技術をベースにして、丸ごとの心臓や肝臓、神経の再生など、現在の再生治療では完全に克服できていない難治性疾患を対象とした次世代型再生治療に取り組む。具体的には、細胞シート/生体材料/生理活性分子の最適な組み合わせにより、治療効果を最大限に発揮するシステムの構築を目指す。天津医科大学の YANG 教授は様々な生理活性分子のデリバリーシステムを構築しており、梨花女子大学の LEE 教授らの作製するスキャフォールドを利用すれば、標的部位に効率よく作用するデリバリーシステムを構築できると期待される。各研究機関で培った技術はいずれも再生医療技術を向上させるために大きな役割を果たすと考えられることから、本事業を通じて 3 カ国の技術を結集させることができれば、世界の再生医療研究に新しい方法論を提案することも可能である。細胞シートとスキャフォールドを組み合わせた新しいタイプの細胞/高分子材料に対して緻密に制御されたドラッグデリバリーシステムを組み込み、これらの相乗効果によってのみ実現できる難治性疾患の治療技術確立を目指す。

5-3. 研究交流目標に対する達成度とその理由

研究交流目標は十分に達成された

研究交流目標は概ね達成された

研究交流目標はある程度達成された

研究交流目標はほとんど達成されなかった

【理由】

日中韓の学生、ポスドク、助教等の若手研究者、講師、准教授クラスの中堅研究者や教授クラスのシニア研究者が本事業で開催した国際シンポジウム、セミナー等に一同に会し議論しあうことで、アジアのバイオマテリアル拠点にふさわしい国際的な人的ネットワークを広く形成することができた。また、シンポジウム、セミナー、ディスカッションでの発表や国際共同研究のような場で、異なる文化、研究分野を有する研究者と議論や共同作業を経験させることで、国際的なコミュニケーション能力や国際感覚を鍛錬させることができた。その結果、本拠点で活躍した学生、研究者の様々なキャリアパスに繋がった。また、日中韓の中堅研究者同士で国際共同研究の推進、運営を担わせたことで、本拠点の次世代を担う人材の育成ができた。

国際共同研究では中韓の研究グループと相互的な人的交流を通じ、中国、韓国が有する薬物送達技術、mRNA 送達技術やスキャフォールド技術を細胞シート技術と融合させ、血管組織の誘導・構築の加速化を目的に成長因子徐放型ファイバーマットを併用した移植方法や目的とする成長因子を短期間で分泌させる細胞シート作製を実証した。また、薬物放出型の細胞シート作製やこれを利用した癌治療への応用にも取り組んだ。これらの研究を通じ、細胞シートを利用した新規な治療方法の可能性も見出すにいった。これらの成果は研究交流を通じ日中韓 3 カ国の技術を融合させることで達成され、難治性

疾患の治療に有用な技術になり得ると期待できる。

6. 研究交流成果

6-1. 平成30年度研究交流成果

<研究協力体制の構築>

最終年度では日本を中心に中韓と協働し、成長因子あるいは薬物を徐放する細胞シート開発を進め、移植に適した血管網構造を有する心筋・肝細胞シート組織、薬物放出型の間葉系幹細胞シートの開発を進めた。また、最終年度は国際セミナーを開催しないため、日本から中韓のそれぞれの研究室を訪問しディスカッションや報告会を行った。

日韓間の共同研究では、Hyukjin LEE 准教授（梨花女子大学（韓国））と共同で初代心筋・肝細胞シートへの VEGF-mRNA（血管内皮成長因子（VEGF）をコードした mRNA）送達技術を開発し、VEGF を分泌する移植可能な細胞シート組織の作製を実施し、血管新生・誘導が期待できうる VEGF 分泌型の初代心筋細胞シートの作製に成功した。秋山義勝講師（東京女子医科大学）が平成 30 年 5 月 18 日～5 月 19 日の期間で梨花女子大学の Hyukjin LEE 准教授の研究室を訪問し研究ディスカッションを行い、日本側の研究進捗状況と最終の研究計画を説明した。

日中間の共同研究では、長期薬物徐放担体と高い組織生着性が示す細胞シートを併用した次世代型の細胞シート治療技術に関して検討を進めた。中国側拠点である天津医科大学においては、分子インプリンティング法によりプロドラッグ（生体内反応で薬効を示す薬物前駆体）を徐放する微粒子製剤を開発した。平成 30 年 7 月 4 日～6 日の期間で中山正道講師と秋山義勝講師（東京女子医科大学）が天津医科大学（中国）の Zhao-Sheng LI 教授、Yan-Ping HUANG 教授らの研究室を訪問し、研究ディスカッションを行った。その中で、学生や若手研究者から中国側が担当する微粒子作製技術の進捗状況について説明を受けながら、研究指導、議論を行った。日本側からは新しい温度応答性細胞培養表面の作製方法に関する進捗や、その表面で作製した細胞シートの特徴について説明した。その際、中国側拠点において細胞シートを用いた実験を遂行予定であったが、温度応答性培養皿の作製に必要な装置導入が中国国内において困難であったために、細胞シート関連研究を実施するための設備整備が遅延している旨の報告を受け、装置導入に必要な情報を日本側から提供することとした。また、Huining He（天津医科大学（中国））教授らの研究室も訪問し、薬物徐放型細胞シートやナノサイズの DDS 製剤の薬理評価を実施するためのがん細胞シート移植動物モデルの作製法とその利用法について議論した。

これら日韓、日中の国際共同研究は本研究プロジェクトが終了した後も継続していくことで各国の研究者と合意している。

<学術的観点>

日韓間での共同研究については、mRNA 送達した心筋細胞から十分量の VEGF を分泌するかどうかを検証した。これまでの知見をもとに、本年度は VEGF をコードする mRNA の

構成塩基種を変化させ、心筋細胞からの VEGF 分泌挙動を評価した。合成した mRNA 内のピリミジン塩基がメチル化されたウラシル残基のアナログものと、メチル化されていないウラシル残基のアナログを利用し 2 種類の mRNA を合成し、市販の遺伝子キャリアを使い、それぞれ初代心筋細胞にトランスフェクションさせた。トランスフェクション 24 時間後に、培地中の VEGF 濃度を測定した結果、mRNA をトランスフェクションさせない場合では 0~0.2 ng/ml の VEGF 濃度であったのに対し、ウラシル残基のアナログを含む mRNA では 0.2~1.0 ng/ml の VEGF 濃度であった。また、メチル化されたウラシル塩基のアナログを利用した場合、培地中の VEGF 濃度は最大で 30 ng/ml であった。培地中の VEGF 濃度の経時変化を調べた所、72 時間より後では VEGF 濃度の大きな増加が確認できなかったことから、トランスフェクション後、72 時間程度でトランスフェクションした mRNA が分解され消失することが示唆された。細胞シートの特性を利用することで移植場所や VEGF 分泌量や期間が制御可能な、新しい細胞シートが作製できたと考えている。mRNA は細胞質内で目的タンパク質を発現した後に分解され、また、細胞核内の染色体への遺伝子挿入が極めて低いことから細胞の遺伝子変異の可能性が低い、安全性の高い遺伝子導入手法であると考えている。

また、初代肝細胞に適した非ウイルスベクター、およびエレクトロポレーション装置を用いた物理的トランスフェクション手法の選定を行うため、eGFP をコードしたプラスミド DNA のトランスフェクションを行った。導入効率は数%と依然低いものの、エレクトロポレーションを用いた場合が最もよくトランスフェクションできることがわかった。以上のことから、mRNA 導入効率は低いものの、初代細胞シート組織自身が VEGF を分泌する手法を開発することができた。特に肝細胞は高い代謝活性を有するため、肝細胞シート単独で皮下移植するだけでは、ほとんど生着しないことがわかっている。肝細胞シートを効果的に生着させる VEGF-mRNA 送達を併用する事で、効果的な肝細胞シート移植が実現し、難治性疾患である血友病など新たな治療法の開発へと発展する事が期待できる。また、生体外で 3 次元心筋細胞組織を構築し、生体移植後に生着させるために、3 次元組織内での有効な血管新生誘導技術が必要不可欠である。VEGF-mRNA 送達による 3 次元心筋細胞シート組織内での VEGF 発現は、新しい血管新生誘導技術として期待される。

日中間での共同研究については、長期薬物徐放型の微粒子と細胞シートを併用する DDS 技術に関して検討を進めた。天津医科大学が展開する分子インプリンティング法を利用した長期徐放型の薬物担持体の作製法よりプロドラッグを徐放する微粒子製剤を開発した。また、温度応答性培養皿の最適化により間葉系細胞やがん細胞シートを作製が可能となっている。将来的には、患部周辺に薬物徐放型微粒子を導入したシート化細胞を移植することで、局所的な薬物作用が可能な細胞型 DDS 治療の構築が考えられる。

<若手研究者育成>

日本側から梨花女子大学校や天津医科大学に訪問し共同研究の進捗報告会を活用して、相手国の学生やポスドク等の研究ディスカッションを行った。さらに、その中で相

手国の若手研究者が従事する研究についても意見交換を行い、各国の技術融合に基づく継続的な共同研究を積極的に立案・議論を行い、若手研究者への研究教育活動を行った。また、若手研究者育成の観点から本拠点でシニア研究者と若手研究者との研究ディスカッション（隔月で開催）や、学生（1名）の学会参加・発表も行った。

<その他（社会貢献や独自の目的等）>

平成29年度に本事業で開発した技術を企業に紹介したように、成果の社会還元を見据えた活動を引き続き実施した。具体的には本学の大学院博士課程に所属する社会人や東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設（TWIns）のメディカルイノベーションラボラトリーに参画する企業、または先端生命医科学研究所が主体的に運営するバイオメディカル・カリキュラムに参加する社会人等に研究紹介を継続して行った。

本事業経費外として、梨花女子大学校やペンシルベニア大学から本学を訪問する医学部生や看護学部生に対して、研究および施設紹介を積極的に実施した（それぞれ、5月に見学会を実施。清水達也教授、中山正道講師および秋山義勝講師が担当）。これ以外にも、テルモサイエンスカフェにおいて中高生向けの再生医療講義や実習を開催し、現在の再生医療事情についてわかりやすく説明した（7月に開催。清水達也教授、中山正道講師、小林純講師、高橋宏信講師、秋山義勝講師が担当）。

6-2. 全期間にわたる研究交流成果

（1）研究協力体制の構築状況

①日本側拠点機関の実施体制（拠点機関としての役割・国内の協力機関との協力体制等）

日本側拠点機関がではPIの大和雅之のもと講師クラスの中堅研究者（秋山義勝、中山正道、小林純、長瀬健一（現 慶應義塾大学 准教授））が共同研究課題項目に当たり、随時、国内協働機関を訪問し研究ディスカッションの開催や技術的な指導を受けたり、国内協働機関の研究者をセミナーに招聘する等、協働機関と連携しながら国際共同研究活動を行った。若手研究者育成では、月2回に頻度で開催される学会発表形式での若手研究者発表会を通じ発表や研究指導を行った。

また、シニア研究者が中心となって開催する拠点運営会議（月1回開催）において、これらの活動の進捗状況を共有し、セミナーの開催や国際共同研究推進等のスケジュール調整に活用した。

②相手国拠点機関との協力体制（各国の役割分担・ネットワーク構築状況等）

国際共同研究テーマの内容をもとに相手国別に日本側拠点の中堅研究者に中心的な研究推進の役割を担わせ（韓国：秋山義勝、小林純、長瀬健一、中国：中山正道、秋山義勝）、国際共同研究推進や国際セミナー開催企画やこれらのスケジュール調整等を通じ相手国のシニア研究者（Seung Jin LEE 教授（韓国側拠点のPI、梨花女子大学校）、Victor C. YANG

教授（中国側拠点の PI、天津医科大学）や中堅研究者（Hyukjin LEE 准教授（韓国、梨花女子大学）、Huining HE 教授（中国、天津医科大学）、Yan-Ping HUANG 教授（中国、天津医科大学））と研究者交流を行うような場を多くつくり、広く、密な研究者ネットワークの構築を行った。その結果、各国の中堅研究者同士が中心となり若手研究者を取り込んだ共同研究ディスカッションが開催され、研究者交流を国際的に活性化させるだけでなく、本拠点の次世代の国際的研究交流の継続にもつながった。

日韓の国際共同研究では韓国側で開発した成長因子徐放型のファイバーマットや mRNA 送達技術と日本側の細胞シート技術と融合させ、血管組織誘導・構築を目的に研究を行った。本共同研究において韓国側は徐放型ファイバーマットの最適化や細胞シートにトランスフェクションさせるための mRNA 設計やトランスフェクション条件の検討を行い、これらの知見をもとに日本側で VEGF 徐放型ファイバーマットと心筋細胞シートのラット皮下への移植と血管新生誘導能の評価、また、心筋細胞シートや肝細胞シートへの成長因子がコードされた mRNA やプラスミド DNA のトランスフェクション効率やその後のタンパク質発現等について評価した。研究進捗状況の共有のためセミナー開催時におけるディスカッションや Skype 会議、相互の研究室訪問を継続した。実際の共同研究推進にあたり、韓国から日本に延べ 4 名の学生（Bo-Kyeong JUN, Minjeong KIM, Hyo Kyoung KWON, Mi Li KIM）が細胞シートの培養および作製方法や mRNA 送達技術のテクノロジートランスファーのため日本側の拠点に 1～2 週間の期間で短期滞在した。一方、日本側から Hyukjin LEE 准教授の研究室に中堅研究者 1 名（秋山義勝講師）が短期滞在（6 泊）し、実際の心筋細胞を利用し、目的遺伝子の導入実験を共同で行うとともに若手研究者とのディスカッションも行った。これら共同研究を通じた交流以外にも、日韓の若手研究者の教育を目的に研究ディスカッションを開催した（計 4 回（内：梨花女子大学（平成 27 年 7 月の 1 回開催（日韓）、東京女子医科大学（平成 26 年 4 月、平成 27 年 8 月、平成 29 年 7 月の 3 回開催））。韓国側の学生（延べ 15 人）が日本側の拠点を訪問した際、学会形式での研究発表会や日本側拠点に所属する若手研究者が韓国の若手研究者向けの細胞シート実習等を通じ、日韓のシニア研究者だけでなく学生、ポスドク等の若手研究者を含めた人的交流を通じ日韓の人的なネットワークを構築するに至った。

日中の国際共同研究では平成 27 年 5 月に本事業で開催した国際ミーティング（復旦大学、中国）、平成 28 年 10 月での Forum on A3 Foresight Program 等を活用しながら、天津医科大学の Zhao-Sheng LI 教授および Yan-Ping HUANG 教授との議論を進め、平成 29 年 3 月に日本側の中堅研究者（中山正道講師、秋山義勝講師）が Zhao-Sheng LI 教授および Yan-Ping HUANG 教授らの研究室を訪問して学生、若手研究者を交えながら議論し、研究の役割分担や中国から日本への学生派遣等、研究活動内容について踏み込んだ議論を行った。さらに平成 29 年 3 月に Victor C. YANG が本拠点を訪問し学生の派遣を決定し、平成 29 年 7 月に天津医科大学から Xiaolin WANG および Meihong CHAI の学生 2 名（薬学修士課程）を東京女子医科大学に派遣し、温度応答性細胞培養表面の作製とこれを使用して培養した間葉系幹細胞シートおよびがん細胞シートの作製に関する共同研究を開始した。

中国側（天津医科大学の Zhao-Sheng LI 教授および Yan-Ping HUANG 教授）で開発した長期徐放型の薬物担持微粒子と日本側が有する細胞シート技術を併用した新しい薬物徐放型の細胞プラットフォームの開発を行った。また、中国の拠点である天津医科大学で細胞シートの作製を支援するために日本側が新しく開発した温度応答性細胞培養表面の作製技術に関して天津医科大学に技術移転を実施した。

③日本側拠点機関の事務支援体制（拠点機関全体としての事務運営・支援体制）

当事業に係る物品調達、学内研究者の出張手続、中韓研究者の招聘手続等をサポートする事務スタッフを配置している。また、委託費の使用については、法人本部に所属している研究支援部教育研究資金課の事務担当職員により、経費が学内規程及び当事業の取扱い手引に定められたルールに沿って使用されているかの確認を取る体制となっている。実施計画書や交流状況報告書等の書類も研究支援部教育研究資金課を通じて日本学術振興会に提出することとしており、研究者サイドと法人事務局サイドで情報を共有し、当事業の実施について互いに協力する体制が整備されている。

（2）学術的観点

R-1 細胞シート作製のための最適なプロトコル探索（平成 25 年度～平成 26 年度）
種々の温度応答性細胞培養表面を用いて、筋芽細胞、繊維芽細胞、肝細胞、血管内皮細胞、癌細胞等の培養条件および細胞シート作製のためのプロトコルを作成することができた。温度応答性細胞培養表面から培養細胞をシート状で回収するためには、温度応答性細胞培養表面の固定化ポリマー量や膜厚の制御が重要であることを確認した。リビングラジカル重合による固定化高分子の精密な分子量、分子鎖密度が制御された表面による細胞培養および培養細胞のシート化の比較、評価から固定化高分子の分子鎖密度の最適化も必要であることがわかった。また、細胞の膜貫通型レセプターと増殖因子の特異的な相互作用や生理的な機能に着目し、増殖因子を固定化した温度応答性細胞培養表面の開発も行った。増殖因子を固定化した温度応答性細胞培養表面では少量の増殖因子で短期間、効率的に細胞シートが作製できることを見出した。北海道大学との共同研究で、培養肝細胞シートの物理的特性評価（具体的には硬さ／柔らかさの測定）を行い、肝細胞機能と物理的特性の相関もあきらかになった。これらの研究を通じ、様々な細胞シートの培養および作製について様々な知見を得た。これらの情報はセミナー等を通じ、研究プロジェクト推進のために中韓の研究グループらと共有した。

R-2 血管網が付与された生体組織構造の作製（平成 25 年度～平成 26 年度）

バイオリアクターによる血管網形成技術の確立し、心筋細胞シートの複数回の積層化によって厚い組織を構築するだけでなく、作製した組織の長期的な機能維持ができた。これまでの結果から、灌流用培地に含まれる増殖因子成分がバイオリアクター血管網と心筋細胞シート組織との接続に大きな影響を与えることがわかった。心筋組織をはじめとする実

質細胞組織が長期に生着し、その機能を発揮するには、血管網を有する三次元組織構造の構築はきわめて重要であり、今後の難治性疾患の治療のための基盤技術を確認するに至った。

R-3 タンパク/遺伝子デリバリー技術を併用する細胞シート治療の検討（平成 27 年度～平成 28 年度）

血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を *in vivo* で徐放する粒子を担持したマイクロファイバーマットを積層化心筋細胞シートと共に移植することで、心筋細胞シートのみの移植では実現できなかった、移植心筋組織への血管網誘導の加速化を *in vivo* で実証した。具体的には、VEGF 徐放型マイクロファイバーとともに積層化心筋細胞シートをラット皮下に移植することで、移植した積層化心筋細胞シートに血管網が導入されていることを確認した。VEGF を徐放しないマイクロファイバーマットの移植実験との比較から、VEGF 徐放型ファイバーマットが優位に血管網を誘導することを確認した。これらの結果から、VEGF 徐放型ファイバーマットが移植心筋細胞シートへの血管網誘導に有用であることを示した。本研究成果は日韓の研究者の連名で学会発表、論文発表を行った（論文 1 報、学会発表（国際学会：4 件、国内学会：7 件））。

一方、Hyukjin LEE 准教授（韓国、梨花女子大学）と共同で、心筋組織に VEGF 発現能を付与するための遺伝子デリバリー技術について議論し、韓国側で mRNA を基盤とした VEGF 発現のための遺伝子設計（VEGF-mRNA）と作製の検討がなされた。その後、VEGF-mRNA のトランスフェクション技術を日本側に技術移転すべく、梨花女子大学から 2 名の学生（Minjeong KIM、Hyo Kyoung KWON）が東京女子医科大学に 1～2 週間滞在し、初代培養細胞への遺伝子導入実験を共同で実施し、その有用性を確認した。その後、日本から 1 名のシニア研究者が韓国の Hyukjin LEE 准教授の研究室の 1 週間程度滞在し、心筋細胞へのトランスフェクション実験を行い、最適化を試みた。初代肝細胞への eGFP-mRNA 送達の実験条件検討に関しては北九州市立大学と共同で行った。

これらの共同研究や議論を通して、細胞シート移植部位での局所的な成長因子放出あるいは分泌が実現できれば効率的な新生血管の誘導方法として期待できる。また、mRNA の細胞質内での迅速なタンパク質発現や迅速な mRNA の分解、さらには染色体への遺伝子挿入の可能性の低い特性があることから、mRNA 送達技術は成長因子の分泌時間が制御可能かつ安全性の高い遺伝子導入方法であることが期待できる。

R-4 難治性疾患治療を指向した次世代型細胞シートの創出（平成 28 年度～平成 30 年度）

天津医科大学が展開する技術の一つである長期徐放型の薬物担持体を導入したシート化細胞を薬物プラットフォームとする新しい DDS 治療について検討した。天津医科大学において、分子インプリンティングを利用してプロドラッグを徐放する微粒子を設計した。微粒子を導入する細胞として間葉系幹細胞に着目し、天津医科大学と共同で表面光開始重合または物理的高分子コーティングを利用した培養皿作製法と細胞シート作製のための最適化を実施し、歯周組織由来間葉系幹細胞シートが作製できることを確認した。生体組織に移

植・生着可能な細胞シートに薬物徐放能を付加することで標的部位において局所的な薬物作用を実現し、組織欠損部位における組織再生の促進や病変部における直接的な薬物治療への応用が考えられる。一方、がん細胞シートを標的部位に貼付することで、従来の細胞注入移植法と比較して効率良く、*in vivo* 皮下移植がんおよび同所移植肝がんモデルを作製できる技術を確認した。本手法で作製した担がんモデルを用いて、中国側で構築したナノサイズの抗腫瘍型 DDS を効率的に評価できることが期待された。

R-5 タンパク/遺伝子デリバリー技術と細胞シート工学を融合した新規治療方法の開発 (平成 29 年度～平成 30 年度)

研究交流で得られた成果として、培養初代心筋・肝細胞への eGFP-mRNA トランスフェクション効率と細胞生存率評価を行ったところ、培養細胞へのトランスフェクションと比較して、eGFP 発現量が極めて低いことがわかった。また、mRNA 送達した心筋細胞シート組織から十分量の VEGF を分泌するかどうかを検証した。平成 30 年度は VEGF をコードする mRNA の構成塩基種を変化させ、これを新生児仔ラットの心臓から採取した心筋細胞にトランスフェクションさせ、心筋細胞からの VEGF 分泌挙動を評価した。mRNA としてピリミジン残基がメチル化されたウラシル塩基のアナログとウラシル塩基のアナログの 2 種類の mRNA を合成し、市販の遺伝子キャリアを使い、それぞれ初代心筋細胞 (12 well タイプの細胞培養基材で培養) に目的の mRNA をトランスフェクションさせた。培地中の VEGF 濃度を測定した。mRNA をトランスフェクションさせない場合では 0~0.2 ng/ml の VEGF 濃度であったのに対し、ウラシル塩基のアナログを含む mRNA では 0.2~1.0 ng/ml の VEGF 濃度であった。また、メチル化されたウラシル塩基のアナログを利用した場合、培地中の VEGF 濃度は最大で 30 ng/ml でありトランスフェクション後 72 時間では 50~60 ng の VEGF が分泌された。培地中の VEGF 濃度の経時変化を調べた所、72 時間より後では VEGF 濃度の大きな増加が確認できなかったことから、トランスフェクション後、72 時間程度でトランスフェクションした mRNA が分解され消失することが示唆された。細胞シートの特性を利用することで移植場所や VEGF 分泌量や期間が制御可能な、新しい細胞シートが作製できたと考えている。mRNA は細胞質内で目的タンパク質を発現した後に分解され、また、細胞核内の染色体への遺伝子挿入が極めて低いことから細胞の遺伝子変異の可能性が低い、安全性の高い遺伝子導入手法であると考えている。先行して開発した VEGF 徐放型のファイバーマットと細胞シートを併用した皮下移植実験では、ファイバーマットから 100 ng 程度の VEGF 量の徐放によって血管新生が誘導される。今回、作製した VEGF 放出型心筋細胞シートを積層化し皮下移植すれば、血管新生を誘導するに足る VEGF 量が分泌されると考えている。

さらに、初代肝細胞に適した非ウイルスベクター、およびエレクトロポレーション装置を用いた物理的トランスフェクション手法の選定を行うため、eGFP をコードしたプラスミド DNA のトランスフェクションを行った。導入効率は数%と依然低いものの、エレクトロポレーションを用いた場合が最もよくトランスフェクションできることがわかった。また、細

胞シート組織移植後の生存率検出のための MRI 造影剤導入方法を検証するため、エレクトロポレーションによる蛍光標識デキストラン分子の導入を行ったところ、低電圧（50 V 程度）で短時間パルスのエレクトロポレーションをかけたときのみ、細胞生存率を維持することができた。

以上のことから、mRNA 導入効率は低いものの、初代細胞シート組織自身が VEGF を分泌する手法を開発することができた。特に肝細胞は高い代謝活性を有するため、肝細胞シート単独で皮下移植するだけでは、ほとんど生着しないことがわかっている。肝細胞シートを効果的に生着させる VEGF-mRNA 送達を併用する事で、効果的な肝細胞シート移植が実現し、難治性疾患である血友病など新たな治療法の開発へと発展する事が期待できる。また、生体外で 3 次元心筋細胞組織を構築し、生体移植後に生着させるために、3 次元組織内での有効な血管新生誘導技術が必要不可欠である。VEGF-mRNA 送達による 3 次元心筋細胞シート組織内での VEGF 発現は、新しい血管新生誘導技術として期待される。さらに、生体に移植した細胞シート組織が安定に生着しているかどうかは、これまでは遺伝子組み換え動物から採取した特殊な細胞の利用、あるいは組織切片の免疫染色等で確認されてきた。MRI 造影剤を用いた細胞シート組織移植後の観察が可能となれば、あらゆる細胞組織に適応可能な、きわめて有効な生体評価手法を確立することが期待される。

（3）若手研究者育成

学生から助教・講師までの若手および中堅研究者には、本事業のセミナーおよび研究交流において研究発表の機会を積極的に設け、個々の研究領域だけでなく異分野にも目を向け、これを自分に取り込み事の大切さを念頭に指導した。具体的には、延べ 26 名の若手および中堅のシニア研究者が研究成果発表を行った。これらの国際交流を通して、国際学会での研究発表や海外研究機関などのキャリアパスに必要な国際的なセンスを実践的な環境で体験、学習する場を提供することができた。その結果、本事業の国際交流活動に参加していた若手研究者は、国内外問わず、バイオマテリアル・再生医療に関連する分野で研究者およびスタートアップ創業者として活躍している。

<国内外で活躍する若手研究者一覧（内部昇進も含む）>

- ・長瀬健一 講師 現在 慶應義塾大学薬学部准教授
- ・高橋宏信 助教 現在 東京女子医科大学先端生命医科学研究所講師
- ・岩宮貴紘 博士課程大学院生 現在 株式会社メトセラ代表取締役／慶應義塾大学先端生命科学研究所特任助教
- ・葛西善行 研究生 現在 東京慈恵会医科大学医学部助教
- ・高木亮 博士研究員 現在 東京女子医科大学先端生命医科学研究所助教
- ・菊地鉄太郎 博士研究員 現在 東京女子医科大学先端生命医科学研究所助教
- ・秋元淳博士 研究員 現在 国立研究開発法人理化学研究所基礎科学特別研究員
- ・近藤誠 研究生 現在 ユタ大学薬学部博士研究員

- ・ 亀石統子 研究生 現在 ユタ大学薬学部博士研究員
- ・ 石原純 研究生 現在 シカゴ大学 Institute for Molecular Engineering 博士研究員

また、本事業を通して、以下 10 件の若手研究者の受賞があった。

<若手研究者の受賞一覧>

- ・ 利根川純一 第 66 回高分子学会年次大会優秀ポスター賞「高分子プリンティング法によるパターン化温度応答性表面の作製と細胞接着挙動の解析」(2017 年 5 月 31 日)
- ・ 宿輪理紗 Best Poster Award, The 2nd International Symposium on Bio-Therapeutics Delivery, “Thermally Modulated Cell Separation System using Micro/Nano-Imprinted Substrates Grafted with Thermoresponsive Polymer” (2017 年 6 月 9 日)
- ・ 高橋宏信 日本バイオマテリアル学会科学奨励賞「3次元組織の配向制御技術の開発と生体模倣組織構築への応用」(2016 年 11 月 21 日)
- ・ 南雲悠平 第 65 回高分子討論会 高分子学会優秀ポスター賞「VEGF 含有ナノ粒子担持ファイバーを用いた in vivo での心筋細胞シートへの血管網導入」(2016 年 9 月 16 日)
- ・ 宿輪理紗 第 65 回高分子討論会 高分子学会優秀ポスター賞「ナノインプリント微細構造を有する温度応答性表面の創製と細胞分離への応用」(2016 年 9 月 16 日)
- ・ 小林 純 Best Young Investigator Oral Presentation Award, The Top 20% of The Competitors, The 5th Asian Biomaterials Congress (ABMC5), “Design of heparin-functionalized thermoresponsive cell culture surfaces for creation of hepatic tissues” (2015 年 5 月 6-9 日)
- ・ 長瀬健一 Best Young Investigator Poster Award, The Top 20% of The Competitors, The 5th Asian Biomaterials Congress (ABMC5), “Bioseparation using Thermoresponsive Polymer Brush” (2015 年 5 月 6-9 日)
- ・ 長瀬健一 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 日本バイオマテリアル学会科学奨励賞「精密重合法によるナノ・バイオインターフェイスの設計とその応用」(2014 年 11 月 17-18 日)
- ・ 長瀬健一 IUMRS-ICA 2014 Young Scientist Awards BRONZE AWARDS, “Thermoresponsive Proteins and Cells Separation Materials Possessing Precisely Designed Polymer Brushes” (2014 年 8 月 24-30 日)
- ・ 高橋宏信 一般社団法人未踏科学技術協会インテリジェント材料・システム研究会 高木賞「筋芽細胞シートの配向制御能を利用した生体模倣性を有する三次元組織の作製技術」(2014 年 1 月 14 日)

(4) 日中韓における継続的な研究交流拠点の構築

日本における研究代表者および参加研究者の多くは、東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設（通称 TWIns）での研究教育、あるいは共同研究を実施して

いるため、TWIns を中心とした継続的な日中韓の研究交流を予定している。具体的には、韓国梨花女子大学校 Hyukjin Lee 准教授との mRNA 送達に関する共同研究、天津医科大学の Zhao-Sheng LI および Yan-Ping HUANG 両教授との共同研究では、中国側で開発したさまざまな長期徐放型の薬物担持微粒子を細胞シートに導入することで、これを疾患部位へ移植する新しい DDS 技術、同大学の Victor YANG および Huining He 教授の研究グループが開発するナノ DDS 製剤の抗腫瘍効果評価系として、効率的な同所がんモデルの作製が可能ながん細胞シート移植法の研究テーマは、事業終了後も協働で行う。また、本事業を通して交流を行ってきた Il Keun Kwon 教授（韓国、慶熙大学校）と、エレクトロスピンングで作製したスキャフォールドに関する共同研究を開始するための話し合いを行っている。

これら共同研究を継続するために、相手国の研究予算や日本の科研費国際共同研究加速基金等への競争的外部資金への申請を準備している。

（５）社会貢献や独自の目的等

日中韓フォーサイト事業の目的と特徴および研究成果を広く発信することを目的に、本事業のための専用のホームページを開設した (<http://twins.twmu.ac.jp/a3foresight/>)。開設したホームページを活用し、随時、研究成果、進捗状況、セミナー、シンポジウム等の状況の報告を行ってきた。特に平成 26 年度に開催した国際シンポジウムでは、宣伝媒体として大きな役割を果たした。大学関係者のみならず多くの企業関係者も参加し、日中韓プログラムの研究が産業界から注目を集めていることが伺えた。中韓、オランダ、アメリカの海外研究者を含め参加者数は 268 名であった。日本バイオマテリアル学会の依頼で同学会誌の「バイオマテリアル」に「オピニオン」として開催したシンポジウムの開催の様子や本研究プログラムの紹介記事を寄稿した。

一方、本拠点では歴史ある社会人向けの医学講座「バイオメディカル・カリキュラム」を開設しており、同講座に参加する社会人研究者とも議論し、本研究プログラムを認知させることができたと考えている。さらに、同講座の卒業生を支援する財団からの依頼で、本研究プログラムの成果および活動内容を寄稿する機会を得ることもできた。また、得られた研究成果を社会に還元するため、産業界との人材ネットワークの構築も試みた。また、本学と共同研究体制にあるメディカルイノベーションラボラトリーに在籍する企業をはじめとした産業界との人材ネットワークの構築を図り、再生医療を支える新しい技術開発を目指した。

本事業外であるが、公益財団法人テルモ生命科学芸術財団が主催するサイエンスカフェにおいて、本拠点機関に所属するスタッフが高校生を対象に温度応答性細胞培養表面の特徴や作製した細胞シートの医療応用について紹介し、好評を得た他、国内、米国、中国、韓国、インドをはじめとする他機関より本学を訪問する医学・看護関係者に対して、研究および施設紹介を積極的に実施した。

（６）予期しなかった成果

日中間の研究者交流を通じて、中国側拠点において本事業開始時には参画していなかつ

た研究者らとネットワーク形成することができた。これにより、中国側拠点メンバーとして新たに参画してもらい、長期徐放型の薬物担持微粒子を細胞内導入した次世代細胞シート治療技術に関する共同研究をスタートさせるに至った。

(7) 今後の課題・問題点及び展望

細胞シート自体が治療効果をより促進するための遺伝子発現能の付加、あるいは細胞シート移植部位での局所的な薬物作用を実現させることが可能となれば、移植細胞シートへの新生血管の誘導や長期的な機能維持に大きく貢献でき、新しい難治性疾患の治療へとつながることが期待できる。生体組織の構造や機能は複数種の成長因子の分泌によって誘導される。日韓間で開発した技術をさらに発展させることで、正常な構造と機能を有する組織構築を目指した、時空間制御のもと成長因子を分泌する細胞シート作製への応用も可能であると考えられる。また、細胞シート移植部位での局所的な薬物作用を実現させるため、中国側拠点との研究交流活動を通じた情報交換により、DDS 機能を有する細胞シート治療を提案した。この国際共同研究を推進するために、日本側拠点が有する温度応答性培養皿の作製技術や細胞シート関連プロトコルを中国側に技術移転させた。しかし、日本国内で使用している温度応答性培養皿作製のための装置が、中国国内において入手困難であり共同研究を円滑に進めるのに問題があった。今後、日中間で情報共有をより活発化し、共同研究が効率良く遂行できるようにサポートをする。

プロジェクト終了後の拠点活動維持に向けて、共同で競争的外部資金を獲得する事に各国で合意している。すでに応募申請完了のものも含め、数件準備段階にある。研究予算の点が必要な課題ではあるが、各国の中堅クラス研究者を中心に拠点ネットワークを維持しながら、予算獲得に向けた活動を行う。

7. 平成 30 年度及び全期間にわたる研究交流実績状況

7-1 共同研究

整理番号	R-1	研究開始年度	平成 25 年度	研究終了年度	平成 26 年度
研究課題名	<p>(和文) 細胞シート作製のための最適なプロトコール探索</p> <p>(英文) Investigation of optimized protocols for cell sheet fabrication</p>				
日本側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(和文) 大和 雅之・東京女子医科大学・教授・1-1</p> <p>(英文) Masayuki YAMATO・Tokyo Women's Medical University, Professor・1-1</p>				
相手国側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(英文) Korea: Seung Jin LEE・Department of Pharmacy, Ewha Womans University・Professor・3-1</p> <p>China: Victor C. YANG・Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University・Professor・2-1</p>				
30年度の研 究交流活動 及び得られ た成果	平成 26 年度に終了のため、該当事項なし				
全期間にわた る研究交流活 動および得ら れた成果の概 要	<p>平成 25 年度は、2014 年 2 月 26 日、27 日にキックオフミーティングをソウルで開催し、中国・韓国の研究代表者および研究協力者と顔合わせと交流を行った。研究交流活動の計画を議論し、今後 3 カ国間で開催するミーティングおよびシンポジウムの時期や研究者の交換留学の進め方、各国の窓口となる担当者を決定した。また、日本において国際シンポジウムを開催することを日本側から提案し、3 国間で合意した。</p> <p>平成 26 年度には、前年度に議論、合意した研究交流活動に基づき、細胞シート作製のプロトコール確立を行った。具体的には、温度応答性細胞培養表面のポリマー固定化量が表面の親水性・疎水性に影響を与えるという知見を基に、温度応答性細胞培養表面の固定化高分子量を変化させながら、対象とする細胞種に適した培養表面のスクリーニングを行った。固定化高分子量の変化だけでは細胞シートの作製が困難な場合には、親・疎水性成分を温度応答性細胞培養表面に導入することや、ナノレベルで精密に表面設計が可能な高分子重合法により作製された温度応答性細胞培養表面による細胞シート作製についても検討した。また、これと並行しながら細胞培養条件の最適化についても検討を行い、様々な細胞種から細胞シートが作製できる技術を蓄積した。</p>				

研究交流で得られた成果としては、まず3カ国間での研究体制について情報交換を行い、お互いの研究環境や研究体制を理解したうえで研究交流を進められるようになった。また、メールベースでは議論、合意が難しかった年間活動計画についても話し合うことができ、今後の研究活動を進める上で必要な課題、マイルストーンがクリアになった。また、種々の温度応答性細胞培養表面を用いて、筋芽細胞、繊維芽細胞、肝細胞、血管内皮細胞、癌細胞等の培養条件および細胞シート作製のためのプロトコルを作成することができた。温度応答性細胞培養表面から培養細胞をシート状で回収するためには、温度応答性細胞培養表面の固定化ポリマー量や膜厚の制御が重要であることを確認した。リビングラジカル重合による固定化高分子の精密な分子量、分子鎖密度が制御された表面による細胞培養および培養細胞のシート化の比較、評価から固定化高分子の分子鎖密度の最適化も必要であることがわかった。また、細胞の膜貫通型レセプターと増殖因子の特異的な相互作用や生理的な機能に着目し、増殖因子を固定化した温度応答性細胞培養表面の開発も行った。増殖因子を固定化した温度応答性細胞培養表面では少量の増殖因子で短期間、効率的に細胞シートが作製できることを見出した。北海道大学との共同研究で、培養肝細胞シートの物理的特性評価（具体的には硬さ／柔らかさの測定）を行い、肝細胞機能と物理的特性の相関も明らかになった。

整理番号	R-2	研究開始年度	平成 26 年度	研究終了年度	平成 27 年度
研究課題名	<p>(和文) 血管網が付与された生体組織構造の作製</p> <p>(英文)) Fabrication of tissues containing vascular network with cell-sheets technology</p>				
日本側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(和文) 大和 雅之・東京女子医科大学・教授・1-1</p> <p>(英文) Masayuki YAMATO・Tokyo Women's Medical University, Professor・1-1</p>				
相手国側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(英文) Korea: Seung Jin LEE・Department of Pharmacy, Ewha Womans University・Professor・3-1</p> <p>China: Victor C. YANG・Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University・Professor・2-1</p>				
30年度の研 究交流活動 及び得られ た成果	平成 27 年度に終了のため、該当事項なし				
全期間にわた る研究交流活 動および得ら れた成果の概 要	<p>平成 26 年 4 月 26 日～4 月 27 日の期間、韓国梨花女子大学校 Seung Jin LEE 教授、亜洲大学校 Ki Dong PARK 教授、延世大学校 Jong Chul PARK 教授らが東京女子医科大学を訪問し、東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設 (TWIns) の見学を行うとともに、今後の共同研究計画について意見交換を行った。</p> <p>平成 27 年 7 月 21 日に梨花女子大学校薬学部との共同研究推進のためのディスカッションをソウルで行った。本ディスカッションが契機となり、血管新生因子を徐放するスキャフォールドや mRNA を併用し、細胞シート移植を効率的に行う新手法の開発を開始することになった。</p> <p>本共同研究において、バイオリアクターによる血管網形成技術を確立し、心筋細胞シートの複数回の積層化によって厚い組織を構築するだけでなく、作製した組織の長期的な機能維持ができた。これまでの結果から、灌流用培地に含まれる増殖因子成分がバイオリアクター血管網と心筋細胞シート組織との接続に大きな影響を与えることがわかった。心筋組織をはじめとする実質細胞組織が長期に生着し、その機能を発揮するには、血管網を有する三次元組織構造の構築はきわめて重要であり、今後の難治性疾患の治療のための基盤技術を確立するに至った。</p>				

整理番号	R-3	研究開始年度	平成 27 年度	研究終了年度	平成 28 年度
研究課題名	<p>(和文) タンパク/遺伝子デリバリー技術を併用する細胞シート治療の検討</p> <p>(英文) Development of cell sheet-based therapy combined with protein/gene delivery technology</p>				
日本側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(和文) 大和 雅之・東京女子医科大学・教授・1-1</p> <p>(英文) Masayuki YAMATO・Tokyo Women's Medical University, Professor・1-1</p>				
相手国側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(英文) Korea: Seung Jin LEE・Department of Pharmacy, Ewha Womans University・Professor・3-1</p> <p>China: Victor C. YANG・Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University・Professor・2-1</p>				
30年度の研 究交流活動 及び得られ た成果	平成 28 年度に終了のため、該当事項なし				
全期間にわた る研究交流活 動および得ら れた成果の概 要	<p>東京女子医科大学の細胞シート技術、韓国梨花女子大学校 Seung Jin LEE 教授のタンパク質徐放スキャフォールド技術を組み合わせ、<i>in vivo</i>での機能的な組織の構築を行う共同研究を平成 27 年度から開始した。A3 ミーティングでのディスカッション、およびメールでのディスカッションを行い、組織構築に最適なスキャフォールドの条件、細胞シート移植の条件を検討し、これらの議論をもとに Seung Jin LEE 教授のグループで血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を徐放する粒子を担持したマイクロファイバーマットを開発し、これを用いて積層化心筋細胞シートと共に移植した。その結果、マイクロファイバーとともに積層化心筋細胞シートをラット皮下に移植することで、移植した積層化心筋細胞シート内に血管網が導入されることを確認した。VEGF を徐放しないマイクロファイバーマットの移植実験との比較から、VEGF 徐放型ファイバーマットが優位に血管網を誘導することを確認した。これらの結果から、VEGF 徐放型ファイバーマットが移植心筋細胞シートへの血管網誘導に有用であることを示した。本研究成果は日韓の研究者の連名で学会発表、論文発表を行った (論文 1 報、学会発表 (国際学会: 4 件、国内学会: 7 件))。</p> <p>一方、韓国梨花女子大学校 Hyukjin LEE 准教授と共同で、心筋組織に VEGF 発現能を付与するための遺伝子デリバリー技術について議論し、韓国側で mRNA を基盤とした VEGF 発現のための遺伝子設計 (VEGF-</p>				

mRNA) と作製の検討がなされた。その後、VEGF-mRNA のトランスフェクション技術を日本側に技術移転すべく、梨花女子大学から 2 名の学生 (Minjeong KIM、Hyo Kyoung KWON) が東京女子医科大学に 1～2 週間滞在し、初代培養細胞への遺伝子導入実験を共同で実施し、その有用性を確認した。その後、日本から 1 名の中堅研究者が韓国の Hyukjin LEE 准教授の研究室に 1 週間程度滞在し、心筋細胞へのトランスフェクション実験を行い、最適化を試みた。初代肝細胞への eGFP mRNA 送達の条件検討に関しては北九州市立大学と共同で行った。

その後、韓国側とは 1 カ月程度の頻度でメール、Skype 会議等を利用して進捗情報を共有した。

中国側で開発された細胞透過性ペプチド (CPP) 修飾型のナノキャリアを用いて、VEGF 等の治療促進が期待される特定遺伝子を導入した細胞シートの作製に関する共同研究に関する議論を行った。

これらの共同研究を通して、細胞シート自体が治療効果をより促進するための遺伝子発現能の付加、あるいは細胞シート移植部位での局所的な薬物作用を実現させることが可能となれば、移植細胞シートへの新生血管の誘導や長期的な機能維持に大きく貢献できることが示された。

上記の研究交流成果以外にも、細胞シート移植の技術を習得するために、韓国梨花女子大学から修士課程の学生 (Mi Li KIM) が、漢陽大学から学生 (Bo-kyeong JUNG) が東京女子医科大学に一週間滞在した。また、滞在期間中にシニア研究者が細胞シート工学の特徴について教育した。

整理番号	R-4	研究開始年度	平成 28 年度	研究終了年度	平成 30 年度
研究課題名	<p>(和文) 難治性疾患治療を指向した次世代型細胞シートの創出</p> <p>(英文) Creation of advanced cell-sheet therapy for intractable disease</p>				
日本側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(和文) 大和 雅之・東京女子医科大学・教授・1-1</p> <p>(英文) Masayuki YAMATO・Tokyo Women's Medical University, Professor・1-1</p>				
相手国側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(英文) Korea: Seung Jin LEE・Department of Pharmacy, Ewha Womans University・Professor・3-1</p> <p>China: Victor C. YANG・Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University・Professor・2-1</p>				
30年度の研究 交流活動及び得 られた成果	<p>長期薬物徐放型の微粒子と細胞シートを併用する DDS 技術に関して検討を進めた。天津医科大学（中国）の Zhao-Sheng LI および Yan-Ping HUANG 両教授らのグループによりプロドラッグを徐放する薬物封入体を分子インプリンティング法により開発した。一方、平成 29 年度に日本側で確立した細胞シートの作製に必要な温度応答性培養皿を中国側拠点で作製するための技術移転は完了した。しかし、日本国内で使用している温度応答性培養皿作製のための装置が、中国国内において入手困難であった。このため、電子メールベースで情報共有を行うとともに、進捗状況の確認を随時行った。また、日本側より 2 名の研究者を 2 日間派遣し、中国側における細胞シート実験のための技術的サポートを行った。また同派遣時に、がん細胞シート移植動物モデルを用いて、天津医科大学の Victor C. YANG および Huining HE 両教授らのグループが検討するナノ抗腫瘍型 DDS を評価するための実験系について意見交換を行い、乳腺近傍に同所移植した <i>in vivo</i> 乳がんモデルを用いる系について議論した。</p>				
全期間にわたる 研究交流活動お よび得られた成 果の概要	<p>中国側で開発されている分子インプリンティング技術等を利用した薬物封入体は、初期薬物バーストを抑えつつ長期徐放が可能である。高い組織生着性を有する細胞シートに人工的に薬物徐放能を付加させることが可能となれば、標的組織で局所的に薬物作用させることが可能となる。平成 28 年度に日中で議論した共同研究計画をもとに、平成 29 年度には天津医科大学より受け入れた若手研究者 2 名（55 日間滞在）との共同研究により、微粒子を導入する間葉系幹細胞のシート化を実現する温度応答性表面の最適化を行った。平成 29～30 年度には、天津医科大学において細胞シートに導入するためのプロドラッ</p>				

	<p>グ徐放微粒子を開発した。一方、中国国内における細胞シート研究実施のために、平成 30 年度に日本から研究者 2 名を 2 日間派遣し、温度応答性培養皿の作製に関する技術支援を継続的に行った。微粒子製剤を細胞内に導入した細胞シートにより、局所的な薬物治療が実現する細胞プラットフォーム型 DDS の治療概念が提案できる。薬物放出能を有する細胞シート移植治療は副作用を低減した治癒効果が期待できる新しい細胞医薬品の概念として意義深いと考えられる。</p> <p>中国側の研究グループとはセミナーやメールを利用して隔月で情報交換を行った。</p>
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

整理番号	R-5	研究開始年度	平成 29 年度	研究終了年度	平成 30 年度
研究課題名	<p>(和文) タンパク/遺伝子デリバリー技術と細胞シート工学を融合した新規治療方法の開発</p> <p>(英文) Development of new medical treatment by using cell sheet engineering combined with protein/gene delivery technology</p>				
日本側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(和文) 大和 雅之・東京女子医科大学・教授・1-1</p> <p>(英文) Masayuki YAMATO・Tokyo Women's Medical University, Professor・1-1</p>				
相手国側代表者 氏名・所属・職 名・研究者番号	<p>(英文) Korea: Seung Jin LEE・Department of Pharmacy, Ewha Womans University・Professor・3-1</p> <p>China: Victor C. YANG・Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, School of Pharmacy, Tianjin Medical University・Professor・2-1</p>				
30年度の研 究交流活動 及び得られ た成果	<p>梨花女子大学校（韓国）Hyukjin LEE 准教授と共同で、初代心筋・肝細胞シートへの VEGF mRNA 送達技術を開発し、VEGF を分泌する移植可能な細胞シート組織の作製を実施した。秋山義勝講師（東京女子医科大学）が平成 30 年 5 月 18 日～5 月 19 日の期間で韓国の梨花女子大学校の Hyukjin LEE 准教授の研究室を訪問し、日本側の研究進捗状況と最終の研究計画を説明した。</p> <p>本年度、初代心筋細胞を用いた系では VEGF をコードする mRNA (VEGF-mRNA) の構成塩基種を変化させ、これを新生児仔ラットの心臓から採取した心筋細胞にトランスフェクションさせ、心筋細胞からの VEGF 分泌挙動を評価した。具体的には VEGF をコードする mRNA の構成塩基種を変化させ、これを新生児仔ラットの心臓から採取した心筋細胞にトランスフェクションさせ、心筋細胞からの VEGF 分泌挙動を評価した。mRNA としてピリミジン塩基がメチル化されたウラシル残基のアナログと非メチル化ウラシル残基のアナログの 2 種類の mRNA を合成し、市販の遺伝子キャリアを使い、それぞれ初代心筋細胞 (12 well タイプの細胞培養基材で培養) に目的の mRNA をトランスフェクションさせた。培地中の VEGF 濃度を測定した。mRNA をトランスフェクションさせない場合では 0～0.2 ng/ml の VEGF 濃度であったのに対し、ウラシル塩基のアナログを含む mRNA では 0.2～1.0ng/ml の VEGF 濃度であった。また、メチル化されたウラシル残基のアナログを利用した場合、培地中の VEGF 濃度は最大で 30ng/ml でありトランスフェクション後 72 時間では 50～60ng の VEGF が分泌された。培地中の VEGF 濃度の経時変化を調べた所、72 時間より後では VEGF</p>				

	<p>濃度の大きな増加が確認できなかったことから、トランスフェクション後、72 時間程度でトランスフェクションした mRNA が分解され消失することが示唆された。細胞シートの特性を利用することで移植場所や VEGF 分泌量や期間が制御可能な、新しい細胞シートが作製できたと考えている。mRNA は細胞質内で目的タンパク質を発現した後に分解され、また、細胞核内の染色体への遺伝子挿入が極めて低いことから細胞の遺伝子変異の可能性が低い、安全性の高い遺伝子導入手法であると考えている。また、初代肝細胞に適した非ウイルスベクター、およびエレクトロポレーション装置を用いた物理的トランスフェクション手法の選定を行うため、eGFP をコードしたプラスミド DNA のトランスフェクションを行った。導入効率は数%と依然低いものの、エレクトロポレーションを用いた場合が最もよくトランスフェクションできることがわかった。</p>
<p>全期間にわたる研究交流活動および得られた成果の概要</p>	<p>平成 29 年度は、韓国梨花女子大学校 Hyukjin LEE 准教授から技術供与を受けた手法を利用して、eGFP-mRNA を合成し、心筋・肝細胞シートに送達するための条件検討を実施した。その結果をもとに、LEE 准教授とのディスカッションを行った。また、細胞シート組織移植後の生存率検出のための MRI 造影剤開発のため、エレクトロポレーション法によるモデル分子（蛍光標識デキストラン）導入実験およびディスカッションを国立循環器病研究センター研究所生体医工学部山岡哲二部長と共同で実施した。</p> <p>平成 30 年度は、秋山義勝講師（東京女子医科大学）が平成 30 年 5 月 18 日～5 月 19 日の期間で韓国の梨花女子大学校の Hyukjin LEE 准教授の研究室を訪問し、日本側の研究進捗状況と最終の研究計画を説明した。</p> <p>研究交流で得られた成果として、培養初代心筋・肝細胞への eGFP mRNA トランスフェクション効率と細胞生存率評価を行ったところ、培養細胞へのトランスフェクションと比較して、eGFP 発現量が低いことがわかった。また、mRNA 送達した心筋細胞シート組織から十分量の VEGF を分泌するかどうかを検証した。その結果、VEGF-mRNA を構成する塩基種にメチル化されたウラシル塩基のアナログを取り込むことで、皮下移植した場合、血管新生を誘導するに足りうる VEGF 量が分泌されることを確認した。</p> <p>さらに、初代肝細胞に適した非ウイルスベクター、およびエレクトロポレーション装置を用いた物理的トランスフェクション手法の選定を行うため、eGFP をコードしたプラスミド DNA のトランスフェクションを行った。導入効率は数%と依然低いものの、エレクトロポレーシ</p>

オンを用いた場合が最もよくトランスフェクションできることがわかった。また、細胞シート組織移植後の生存率検出のための MRI 造影剤導入方法を検証するため、エレクトロポレーションによる蛍光標識デキストラン分子の導入を行ったところ、低電圧（50 V 程度）で短時間パルスのエレクトロポレーションをかけたときのみ、細胞生存率を維持することができた。

以上のことから、mRNA 導入効率は低いものの、初代細胞シート組織自身が VEGF を分泌する手法を開発することができた。特に肝細胞は高い代謝活性を有するため、肝細胞シート単独で皮下移植するだけでは、ほとんど生着しないことがわかっている。肝細胞シートを効果的に生着させる VEGF-mRNA 送達を併用する事で、効果的な肝細胞シート移植が実現し、難治性疾患である血友病など新たな治療法の開発へと発展する事が期待できる。また、生体外で 3 次元心筋細胞組織を構築し、生体移植後に生着させるために、3 次元組織内での有効な血管新生誘導技術が必要不可欠である。VEGF-mRNA 送達による 3D 心筋細胞シート組織内での VEGF 発現は、新しい血管新生誘導技術として期待される。さらに、生体に移植した細胞シート組織が安定に生着しているかどうかは、これまでは遺伝子組み換え動物から採取した特殊な細胞の利用、あるいは組織切片の免疫染色等で確認されてきた。MRI 造影剤を用いた細胞シート組織移植後の観察が可能となれば、あらゆる細胞組織に適応可能な、きわめて有効な生体評価手法を確立することが期待される。

7-2 セミナー

(1) 平成30年度セミナー実施状況

平成30年度はセミナーの開催は致しませんでした。

(2) 全期間において実施したセミナー件数

	平成 25 年度	平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度
国内開催	0	1	0	0	1	0
海外開催	1	0	1	1	2	0
合計	1	1	1	1	3	0

7-3 中間評価の指摘事項等を踏まえた対応

① 評価コメント（抜粋）：難治性疾患の治療技術の確立の目標について

対応：日韓では血管網構築によって治癒可能な疾患を対象とした研究テーマを実施している。特に心臓の虚血性心疾患や肝の肝線維化、血友病等の治療への応用を目指し進めてきた。日中での共同研究課題詳細ではがん治療等への応用を目指した。

② 評価コメント（抜粋）：日中間での共同研究推進

対応：平成 29 年 3 月に日本側のシニア研究者が Zhao-Sheng LI 教授および Yan-Ping HUANG 教授らの研究室を訪問して学生、若手研究者を交えながら議論し、研究の役割分担や中国から日本への学生派遣等、研究活動内容について踏み込んだ議論を行った。その結果、中国側で開発した長期徐放型の薬物担持微粒子を利用して、これを細胞内に導入した間葉系幹細胞シートを作製することとなった。平成 29 年 7 月に天津医科大学から Xiaolin WANG および Meihong CHAI の修士課程の学生 2 名（薬学修士課程）が東京女子医科大学に 2 カ月間滞在し、温度応答性細胞培養表面の作製とこれを使用して培養した間葉系幹細胞シートおよびがん細胞シートの作製に関する共同研究を開始した。

③ 評価コメント（抜粋）：中長期間における若手研究者交流

対応：共同研究を通じ日韓の若手研究者交流活動を推進した。短期的ではあるが、平成 28 年 6 月に漢陽大学校 Bo-Kyeong JUNG 氏が細胞シートの積層化、固定化、蛍光染色に関する技術を習得するために東京女子医科大学を訪問し 2 週間程度滞在した。平成 28 年 6、7 月に梨花女子大学校 Min-jeong KIM 氏と Hyokyong KWONG 氏が東京女子医科大学を訪問し、非ウイルスベクターによる核酸デリバリー技術による細胞への遺伝子導入技術供与および共同研究推進のため 1～2 週間程度滞在した。平成 28 年 7、8 月には梨花女子大学校 Mi Li KIM 氏が細胞シート移植実験の見学とディスカッションのた

め東京女子医科大学を訪問し1週間程度滞在した。細胞シート作成の習得や共同研究実施のために韓国側から学生が日本側に派遣された。また、平成 28 年 10 月には日本側から秋山義勝講師が短期滞在し、韓国の梨花女子大学校を訪問し、学生や若手研究者を指導しながら共同研究の推進のために1週間程滞在した。

- ④ 評価コメント（抜粋）：研究成果発表等や研究交流活動成果から発生した波及効果について

対応：日韓で実施している共同研究（PLGA ナノ粒子担持 PVA ファイバーを用いた心筋細胞シートへの血管網構築の促進に関する研究）は、学会発表や論文投稿できる段階まで進めることができた。また、本研究発表において日本側の参加メンバーである修士学生（南雲悠平、宿輪理沙、利根川純一）や若手研究者（高橋宏信）が学会等で受賞するケースもでており、当事業における国際共同研究の特徴が評価を受けたものと考えている。その一方で、東京女子医科大学の卒業生が起業し、本事業が産業創出に貢献した事例としてとらえている。

8. 研究交流実績総人数・人日数

8-1 平成30年度の相手国との交流実績

派遣 先 派遣元	四 半 期	日本	中国	韓国	フィンランド(第三国)	合計
日本	1		0 / 0 (0 / 0)	1 / 2 (0 / 0)	2 / 10 (0 / 0)	3 / 12 (0 / 0)
	2		2 / 6 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	2 / 6 (0 / 0)
	3		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	4		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	計		2 / 6 (0 / 0)	1 / 2 (0 / 0)	2 / 10 (0 / 0)	5 / 18 (0 / 0)
中国	1	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	2	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	3	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	4	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	計	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
韓国	1	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	2	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	3	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	4	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	計	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	1	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)
	2	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)
	3	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)
	4	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)
	計	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)		0 / 0 (0 / 0)
合計	1	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	1 / 2 (0 / 0)	2 / 10 (0 / 0)	3 / 12 (0 / 0)
	2	0 / 0 (0 / 0)	2 / 6 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	2 / 6 (0 / 0)
	3	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	4	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)
	計	0 / 0 (0 / 0)	2 / 6 (0 / 0)	1 / 2 (0 / 0)	2 / 10 (0 / 0)	5 / 18 (0 / 0)

※各国別に、研究者交流・共同研究・セミナーにて交流した人数・人日数を記載してください。(なお、記入の仕方の詳細については「記入上の注意」を参考にしてください。)

※日本側予算によらない交流についても、カッコ書きで記入してください。

※相手国以外の国へ派遣する場合、国名に続けて(第三国)と記入してください。

8-2 平成30年度の国内での交流実績

第1四半期	第2四半期	第3四半期	第4四半期	合計
7 / 23 (0 / 0)	1 / 2 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	0 / 0 (0 / 0)	8 / 25 (0 / 0)

8-3 全期間にわたる派遣・受入人数

年度	平成 25 年度	平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度
派遣人数	5 (0)	0 (0)	15 (0)	8 (0)	15 (0)	3 (0)
受入人数	0 (0)	24 (0)	27 (0)	4 (1)	23 (0)	0 (0)

※各年度の実施報告書の「相手国との交流実績」に記載の人数を転記してください。

※相手国側マッチングファンドなど本事業経費によらない交流については()で記載してください。

9. 経費使用総額

9-1. 平成30年度経費使用総額

(単位 円)

	経費内訳	金額	備考
研究交流経費	国内旅費	500,267	国内旅費、外国旅費の合計は、研究交流経費の50%以上であること。
	外国旅費	1,136,984	
	謝金	0	
	備品・消耗品購入費	1,279,587	
	その他の経費	162,020	
	不課税取引・非課税取引に係る消費税	88,442	※外国旅費および謝金以外に不課税・非課税取引の該当がある場合には、備考欄にその内容を記入してください。
	計	3,167,300	研究交流経費配分額以内であること。
業務委託手数料		316,730	研究交流経費の10%を上限とし、必要な額であること。また、消費税額は内額とする。
合計		3,484,030	

9-2 全期間にわたる経費使用額

(単位 円)

	平成25年度	平成26年度	平成27年度	平成28年度	平成29年度	平成30年度
国内旅費	1,577,740	3,336,225	2,235,351	2,284,272	2,966,369	500,267
外国旅費	1,892,160	1,434,736	2,292,389	1,554,357	1,436,503	1,136,984
謝金	0	680,000	0	0	0	0
備品・消耗品購入費	3,338,848	1,086,887	3,042,877	2,744,845	1,900,491	1,279,587
その他の経費	191,252	2,462,152	929,383	916,526	1,696,637	162,020
不課税取引・非課税取引に係る消費税	0	0	0	0	0	88,442
合計	7,000,000	9,000,000	8,500,000	7,500,000	8,000,000	3,167,300

※各年度の実施報告書「経費使用総額」を転記してください。

※「不課税取引・非課税取引に係る消費税」について、平成27年度以前の実施報告書では

「外国旅費・謝金等に係る消費税」の記載となっています。