

京都大学	博士 (薬学)	氏名	草森 浩輔
論文題目	細胞間相互作用制御に基づく細胞治療システムの開発に関する研究		
(論文内容の要旨) 多細胞生物においては、高度に洗練された機能ユニットである細胞が織りなす細胞間情報伝達が生命活動の本質と考えられる。近年の ES 細胞や iPS 細胞の開発に代表されるように、細胞の分化誘導および培養技術の革新的発展を受けて、細胞をそのまま「クスリ」として利用する疾患治療ー細胞治療ーへの期待が急速に高まり、既に臨床試験・研究における有効性も示されている。しかしながら、そのいずれもが単発的な報告に留まり、また、効果が一時的であるために繰り返し投与が必要になるなど、治療法として確立されていないのが現状である。申請者は、細胞が非生理的環境で速やかに細胞死することで、生理活性を十分に発揮できないことが、細胞投与による治療効果が限定的な要因と考えた。そこで本研究では、生体投与後の細胞の生存期間を延長することによる細胞治療効果の増強を目的に、投与する細胞同士あるいは投与部位のホスト細胞との細胞間相互作用を制御することで、優れた効果を発揮する細胞治療システムの開発を試みた。 第一章 細胞接着を促進する合成低分子化合物 adhesamine 誘導体の利用による細胞治療効果の増強 体外から投与された細胞は、投与部位に生着することで治療効果を発揮するが、大半の細胞は免疫細胞による攻撃を受けて、あるいは生着できずに足場依存的アポトーシスを起こして死滅する。従って、投与された細胞の生着を促進することができれば、細胞治療効果を増強できることが期待される。近年、化合物ライブラリーのスクリーニングにより、培養ディッシュへの細胞の接着を促進する低分子化合物 adhesamine が見出された。さらに、インテグリンに高い親和性を有するアルギニンーグリシンーアスパラギン酸 (RGD) ペプチドを両端のカルボニル基に結合させた adhesamine 誘導体が開発され、これが adhesamine よりも高い細胞接着促進効果を有することが示された。そこで申請者は、これらの化合物を利用した細胞接着の促進による、移植細胞の生存率改善ならびに体内分布制御を試みた。マウス線維芽細胞あるいはマウス骨髄由来細胞を用いた検討から、adhesamine 誘導体は細胞同士の接着や培養プレートへの接着を向上し、マウス皮内移植後の細胞生存率を延長することが示された。そこで、マウス皮膚損傷モデルを作製し、adhesamine 誘導体を添加した骨髄由来細胞を損傷皮膚の近傍皮内に移植したところ、骨髄由来細胞単独投与と比較して損傷皮膚の有意に早い修復が認められた。 第二章 優れた細胞間相互作用を可能にする細胞スフェロイド作製法の開発 近年、細胞が本来有する機能を十分に発揮させる方法として、従来の平面的な細胞培養とは異なり、細胞塊 (細胞スフェロイド) を構築する三次元培養法が注目されている。これまでに、いくつかの細胞スフェロイド作製法が報告されてきたが、簡便で均一かつ大量			

作製が可能などの、細胞治療への応用に必要な条件を満たす方法は少ないのが現状である。そこで申請者は、これらの条件を満たし、かつ幅広い細胞種へと応用可能な細胞スフェロイド作製法の開発を目的に、マイクロモールディング技術を利用したポリジメチルシロキサン（PDMS）製マイクロウェルを作製した。種々の細胞種での検討から、PDMS 製マイクロウェルを用いることで均一なサイズの細胞スフェロイドを高収率で作製可能であることが明らかとなった。また、PDMS の疎水性表面への接着が問題となる細胞種に対しては、PDMS 製マイクロウェル表面へのポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）のコーティングが有用であることも見出し、幅広い細胞種に利用可能な細胞スフェロイド作製法の開発に成功した。

第三章 スフェロイド化による細胞の機能向上と治療効果の増強

これまでに細胞スフェロイド作製に関する報告は散見されるものの、作製した細胞スフェロイドを疾患治療に応用した例は少ない。インスリンを放出することで血糖値を維持している膵β細胞は、膵臓のスフェロイド様構造体である膵島内に他の細胞種と共存する。膵島を分散させることで膵β細胞からのインスリン放出性が低下することが報告されていることから、インスリン産生細胞を膵島のようなスフェロイド様形態とすることで、細胞の生存期間の延長に加えてインスリン放出性が向上し、1 型糖尿病に対する治療効果の増強が期待される。そこで、前章で開発した方法を用いてインスリン産生細胞スフェロイドを作製したところ、インスリン放出性は向上しなかったものの、スフェロイド化により移植後の細胞生存率が改善した。さらに、糖尿病モデルマウスにインスリン産生細胞スフェロイドを移植することで、懸濁状細胞の移植と比較して有意な血糖値抑制効果が得られた。

以上、申請者は、低分子化合物の利用あるいは PDMS 製マイクロウェルを利用した細胞スフェロイド作製法の開発により、細胞間相互作用を制御し、治療効果に優れる細胞治療システムの開発に成功した。本研究で得られた知見は、投与する細胞の相互作用を制御することで細胞治療の効果を著しく向上できることを示すものであり、細胞治療の発展に有用な情報を提供するものと考えている。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、細胞治療の最適化を目的に、細胞が非生理的環境で速やかに細胞死することで、生理活性を十分に発揮できないことが、細胞投与による治療効果が限定的な要因という仮説に基づき研究を行った。本研究では、生体投与後の細胞の生存期間を延長することによる細胞治療効果の増強し、投与する細胞同士あるいは投与部位のホスト細胞との細胞間相互作用を制御することで、優れた効果を発揮する細胞治療システムの開発を試みた。

第一章 細胞接着を促進する合成低分子化合物 adhesamine 誘導体の利用による細胞治療効果の増強

化合物ライブラリーのスクリーニングにより見出された低分子化合物 adhesamine および RGD ペプチドを両端のカルボニル基に結合させることにより開発された adhesamine 誘導体を用いて細胞接着の促進による、移植細胞の生存率改善ならびに体内分布制御を試みた。細胞を用いた *in vitro* での検討から、adhesamine 誘導体は細胞同士の接着や培養プレートへの接着を向上し、マウス皮内移植後の細胞生存率を延長することが示された。マウス皮膚損傷モデルにおいて adhesamine 誘導体を添加した骨髄由来細胞を損傷皮膚の近傍皮内に移植したところ、骨髄由来細胞単独投与と比較して損傷皮膚の有意に早い修復が認められた。

第二章 優れた細胞間相互作用を可能にする細胞スフェロイド作製法の開発

幅広い細胞種へと応用可能細胞塊（細胞スフェロイド）作製法の開発を目的に、マイクロモルディング技術を利用したポリジメチルシロキサン（PDMS）製マイクロウェルを作製した。種々の細胞種での検討から、PDMS 製マイクロウェルを用いることで均一なサイズの細胞スフェロイドを高収率で作製可能であることが明らかとなった。また、PDMS の疎水性表面への接着が問題となる細胞種に対しては、PDMS 製マイクロウェル表面へのポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）のコーティングが有用であることも見出し、幅広い細胞種に利用可能な細胞スフェロイド作製法の開発に成功した。

第三章 スフェロイド化による細胞の機能向上と治療効果の増強

前章で開発した方法を用いてインスリン産生細胞スフェロイドを作製した。その結果、インスリン放出性は向上しなかったものの、スフェロイド化により移植後の細胞生存率が改善した。さらに、糖尿病モデルマウスにインスリン産生細胞スフェロイドを移植することで、懸濁状細胞の移植と比較して有意な血糖値抑制効果が得られた。

以上、申請者は、投与する細胞の相互作用を制御することで細胞治療の効果を著しく向上できることを示し、これらの情報は細胞治療の発展に有用な情報を提供するものと考えられる。よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降