

細胞シート工学研究の基礎と医療への発展

The foundation of cell sheet technology and development for clinical application.

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 助教 **関谷 佐智子**

Sekiya Sachiko (Assistant Professor)

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授 **清水 達也**

Tatsuya Shimizu (Professor)

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University



キーワード

細胞シート、温度応答性培養皿、再生医療

01 | はじめに

「細胞シート工学」は1990年前後から研究がスタートし、この数十年の間に小規模グループの基礎研究から、多くの様々な分野の研究者・技術者が関わり、最終的に医師による臨床応用が実現、疾病に苦しむ方々に新しい治療の技術として還元されている。その結果、論文の報告だけでなく、メディアでの紹介等が著しく増加し、2016年の現在専門家だけでなく、多くの方の耳に入る単語となっている。現在の大木のような研究技術に至るまでには、当該研究分野の開拓者の努力が根を張り、周辺の技術を改革する方々の苦労が幹を強靱にし、治療の困難な疾病に立ち向かう医師たちの強い信念が枝に実を成している。本稿は細胞シート工学の芽生えから、各方面での細胞シート工学の医療応用、さらに今後の未来医療への発展応用について紹介していく。

02 | 温度応答性培養皿

温度応答性培養皿は温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド、PIPAAm)をポリスチレン製の通常の細胞培養皿に固定化し、作成される。温度応答性高分子PIPAAmは32℃の相転移温度を境に、水和・脱水和変化を起こす刺激応答性高分子である。モノマーのIPAAM溶液を培養皿へ入れ、電子線照射することによって細胞培養基材の表面に重合されるのであるが、nmオーダーの薄い層として重合されるには非常に厳密な設定が必要である。このようにして作成された温度応答性培養皿は37℃の通常の細胞培養の温度では疎水性の性質を示し、細胞接着の可能な表面である。しかし、32℃以下になると親水性の性質へと変化し、細胞非接着性の表面となる。従って、細胞を37℃で培養している間は通常の細胞

培養皿と同様に細胞が接着・増殖するが、32℃以下にすると細胞を培養皿から剥離し、回収することができる¹⁾。細胞培養の際の剥離回収に用いるタンパク質分解酵素(TrypsinやDispase)を用いることなく、回収できるので、細胞の底面に存在する細胞外マトリックスおよび接着因子・細胞間接着は分解されることなく保持されて回収できる(図1)。

このような細胞の回収法の研究を開発当時東京女子医科大学に所属していた菊池・坂井らが岡野のもとで確立した²⁾。この細胞脱着システムにより、温度応答性培養皿にコンフルエントまで37℃にて細胞を培養し、その後32℃以下に温度を低下させるだけで、細胞が細胞間接着を維持したまま、2次元のシート状に回収されることになる。研究当初、温度応答性培養皿は少数を手作業で試行錯誤して作製し、最適化が検討された。現在ではセルシード社がUpCell[®]として大量に作製・販売を行っている(<http://www.cellseed.com/product/upcell/>)。現在までに様々な細胞が培養され、細胞シートとしての回収が可能となっている。また、継代培養に際して、トリプシン等のタンパク質分解酵素による細胞の性質の変化を避けるために温度応答性培養皿を用いることも可能であり、これまでに様々な研究者によって使用されている。

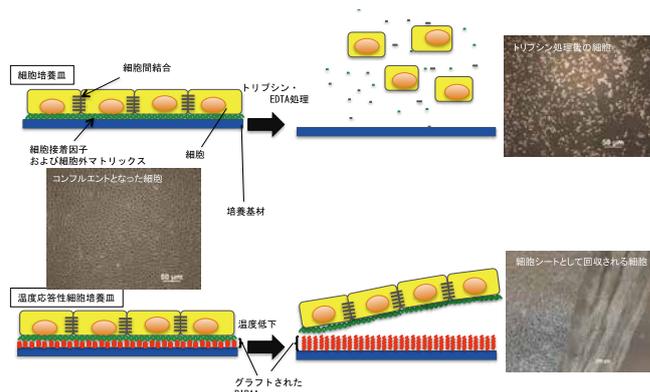


図1 温度応答性培養皿での細胞シート回収

03-1 | 組織工学

温度応答性培養皿を用いて、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、また、平滑筋細胞、自律拍動する心筋細胞など様々な細胞がこれまでに培養され、シート化されている。細胞によっては、シート化するにあたり、培地のコンディションの調製、培養期間、播種密度をコントロールする必要がある。温度応答性培養皿のため、観察を長く室温で行うと観察行為が細胞剥離を起こす原因になるために長期に観察したい場合は、37℃で保温した状態での観察が必要な場合もある。こうして作成される細胞シートは前述したように細胞間接着であるタイトジャンクションやギャップジャンクションが保持されており、またシート底面に接着因子や細胞自身が分泌した細胞外基質が維持されている。従って細胞シートは移植の際、すぐに底面が移植先へ接着し、縫合の必要がない。この性質は、細胞シートと細胞シートを積層化することで、3次元方向に厚みをもつ組織構築の加工を可能にしている。

03-2 | 細胞シートを利用した
3次元心筋組織の構築

温度応答性培養皿を用いた様々な研究がある中、東京女子医科大学の清水らはまず初代培養した新生児ラット心室筋細胞を用いて、2次元の心筋組織を作製した。心筋細胞はそれまで、個々の拍動などが各々の細胞レベルで解析されていたが、隣り合う細胞の接着が続いた細胞シートの状態での解析は研究開発当時他に類を見なかった。心筋細胞シートは自律拍動を行い、肉眼でもフィブリンゲル上に積層化することで肉眼でも拍動が観察でき、また拍動のリズムの異なる2枚の細胞シートを積層化させると、細胞間で情報を受け渡す役割をもつギャップジャンクションがシート間にも作製され、2枚のシートが同期して拍動を行うようになることが明らかにされた。さらに清水らは厚みを増すために数枚を積層化した心筋シートを移植するが、生体内ではあまり厚みのあるものを一気に移植すると血管新生が間に合わずに移植組織の壊死を起こし、厚みのある組織が作製できなかった。そこで、まず血管のソースとするべく、血管内皮細胞や線維芽細胞を含む心筋シートを作製し、培養期間中に血管内皮細胞の網状構造をもつ細胞シートを作製、これを3枚積層化して移植すると移植後素早く宿主血管とシート内部の新生血管が連絡し血流を作れることが明らかになった。そこで、血流が生じたところで再び3枚の積層化心筋シートを移植するという繰り返し移植を行うことで厚みのある組織を生体内で作成することに成功している。さらには、生体外にて、3次元組織を構築するバイオリクターを開発、厚みのある心筋組織をヒトiPS細胞より分化誘導した心筋細胞を用いることで、作製可能となっている³⁾。一方で、このような心筋シートをチューブ状に成形し、拍動保持する培養も行っており、今後臨床応用に向けた本格的組織再生が期待されている。

04 | 細胞シートのマニピュレーション技術

細胞シートは一枚を移動する際の操作は、浸水している薄い紙の状態を想像して頂けるとわかりやすいが、鋭利なものなどに脆弱なため難易度が高い。以前はPVDF膜やニトロセルロース膜などでの回収も試みられていたが、現在では、CellShifter™(セルシード社)という回収支持体が販売もされ、簡便になっている。また、フィブリンゲル等を支持体として、スタンプのように細胞シートを保持・回収移動できるデバイスも開発されている(図2)。

支持体としてゼラチンゲルを用いることにより、再びゼラチンゲルを溶解させることで移植後にシートのみにもすることも可能になる。スタンプは手動で行える他、自動で数枚積層化できる自動積層化装置の開発も行われている⁴⁾。また、大阪大学工学部と東京女子医科大学の共同研究にて細胞シートを瞬時に回収して別の部位へ移動させる回収装置⁵⁾も開発されており、工学系の科学者との交流により、医学、生物学のみでは実現できなかった高い水準のマニピュレーション技術が完成している。このような周辺機器の発展は、汎用性を向上させ、より一般的な治療への近道となる非常に重要な研究となっている。

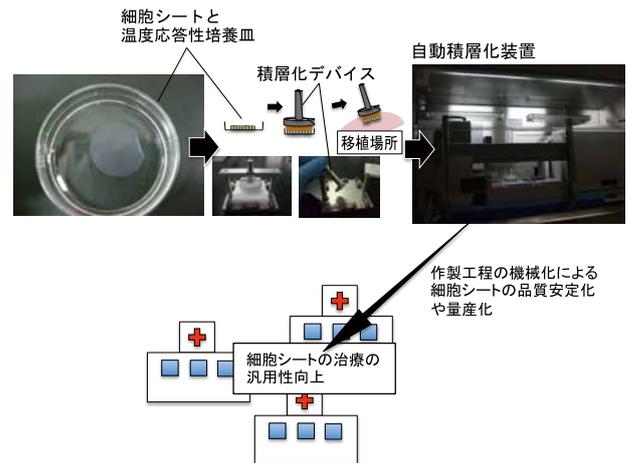


図2 細胞シートとマニピュレーション技術の例とその必要性

05 | 角膜再生臨床試験

眼の構造の中で、角膜は眼球を外部から保護する役割と光の屈折をおこし、視覚情報を網膜に結像させる役割を持つ。角膜は個人差があるが、およそ厚み500μm程度である。角膜の構造は角膜上皮、角膜実質、および角膜内皮によって構成されている。最外部の角膜上皮は角膜周辺の輪部上皮の基底細胞が幹細胞となり新しく細胞が産生され、2週間毎に新しく作られている。そのため、輪部の上皮細胞が熱傷や、アルカリや酸による腐食、Stevens-Jonson症候群、眼類天疱瘡などが原因で消失すると角膜上皮が血管を含む結膜に置き換わり、角膜混濁により視力が失われる。これまではアイバンクによる角膜組織の同種他家移植が行われてきたが免疫拒絶により、治療効果が得られにくいことが課題だった。患者本人の細胞から角膜上皮が再生され、移植可能になることが理想的であるが、タンパク分解酵素を用いない限り、培養皿からの回収が難しかった。このような問題点を克服するために、東京女子医科大学の大和ら、ま

た大阪大学・眼科・西田らは温度応答性培養皿を用いた角膜上皮シートの開発を行い、角膜再生治療の臨床応用を目指した研究を行った⁶⁾。輪部より角膜上皮幹細胞を回収できる場合はこれを用い、難しい場合は口腔粘膜上皮細胞を用いて細胞シートを作製し、角結膜上皮疾患部位への移植を行ったところ、患者視力の回復・維持といった良好な成績が得られている。現在では、大阪大学にてiPS細胞より誘導した角膜上皮、内皮細胞による細胞シートでの再生医療の開発が取り組まれている。

06 | 心筋再生臨床試験

本邦において、平成21年に臓器移植法が改正され、臓器提供の増加に伴い、移植数が増加し、また補助人工心臓の開発も進展しているが、合併症の課題があり、次世代のよりよい治療法の開発が望まれている。移植を必要とするような重症心不全治療として、近年再生医療が注目されている。2008年に発表された欧州における骨格筋由来細胞のdirect needle injection法での移植臨床試験が大規模に行われたが、プラセボに対して有効性が認められず、早期終了されている。このような中、前述したように東京女子医科大学では清水らによって、心筋細胞を用いた細胞シートが作成され、3次元組織構築研究が行われていた。一方で大阪大学・澤らはinjection法による細胞移植の効率の悪さに頭を悩ませていた。清水の人工臓器学会での講演を目にした澤教授はこの細胞シート工学の細胞移植効率の高さに着目し、injection法ではなく、骨格筋芽細胞を細胞シートとして重症心不全患者に移植し、治療効果を確認することに挑戦をした。その結果、移植細胞シートによるリモデリング抑制と、心機能の有意な改善効果を得ることができた。治療効果のメカニズムは移植した細胞シートによる心筋内のサイトカイン発現上昇、また再生に関わると考えられる幹細胞によく見られる因子を発現した細胞の集積が確認されている。従って、移植細胞が移植部位で心筋になるのではなく、移植細胞により、サイトカイン分泌が促進され、これにより心臓内で再生に関わる細胞が誘引され、心機能が改善すると考えられている。このような基礎研究を経て、自己骨格筋芽細胞シート移植治療を人工心臓の要する末期的拡張型心筋症へ臨床応用する試験を行ったところ、人工心臓を外し、退院するまで回復がみられた⁷⁾。現在は虚血性心筋症への移植も行い、本治療法はテルモ社より「ハートシート」という名称により販売承認を獲得、保険適用の治療へと発展している(<https://www.terumo.co.jp/pressrelease/detail/20150918/196>)。現在は、より多くの患者へ治療を行えるように治験が行われている。

07.1 | 食道狭窄予防治療・臨床試験

現在、食道がんの早期、まだ粘膜下層に癌がとどまっている状態ならば、内視鏡にて粘膜下層を剥離する治療(Endoscopic submucosal dissection:ESD)が広く行われている。しかしながら、粘膜下層切除によって生じる潰瘍が治癒する際に食道の狭窄を起こし、食物通過障害や摂食障害が生じる。そのため、従来バルーン拡張術による治療を行わなくてはならず、患者にとって大きな負担となっていた。このような狭窄

の予防に頭を悩ます中、東京女子医科大学の大木医師は大和らのもと、眼科領域での細胞シートの治療効果からヒントを得て、食道ESD後の自己口腔粘膜シート移植による狭窄予防効果を検討した。食道上皮細胞も口腔粘膜上皮細胞も同じ扁平上皮細胞であり、非常に的を射た検討であった。大型動物での検討を行った結果、経内視鏡的細胞シートの移植に成功し、また、FBSを用いない培養法としてセルカルチャーインサートによる口腔粘膜上皮細胞シートの作製にも成功し、臨床試験へと進んでいった^{8),9)}。2011年までに10例が終了、良好な成績が得られている。

07.2 | 細胞シート・デリバリー

細胞シートを成す細胞は、患者もしくはボランティア由来であり、また体内に戻すために、細胞シートの作製工程は医薬品の製造管理および品質管理規則(Good Manufacturing Practice: GMP)を遵守したものが要求される。これは、安全性などの患者保護のための医薬品の臨床試験の実施に関する基準(Good Clinical Practice: GCP)に基づいた規制である。このGCPおよびGMP遵守のためには、細胞シートの作製をCell processing center (CPC)にて行う必要がある。このCPCは空調、温度、機器等が高度に管理された細胞培養施設であり、必ず2名で入室、作業者と記録者が必要で、取り違えを排除するため一区域1検体しか培養できず、細かく厳密な管理が要求される。そのためCPCが無い施設の場合は細胞シートを用いた治療が難しくなるという問題がある。そこで、CPCがなくても細胞シートの移植治療可能なことを実証することも含め、東京女子医科大学のCPCを用いて作製した患者由来口腔粘膜細胞シートを、遠隔地の長崎大学にて食道ESDを受けた患者へ狭窄予防のための移植治療をしようという臨床試験が東京女子医科大学と長崎大学・医学部、移植・消化器外科の江口らによって遂行された。患者由来組織を空輸で東京へ輸送し、その後およそ2週間かけ、細胞シートが作成され、長崎に再び空輸され、厳密な品質と安全性試験をクリアした結果、無事患者へ移植された。10例の臨床研究を終え、好成績が得られており、離島での治療などへの今後の展望が開ける結果となっている。

08 | 歯周組織再生臨床試験

歯周病は歯周組織に発症する疾患の総称で細菌によって生じる炎症疾患である。可逆的な病態であり、自己での適切な管理と専門のメンテナンスにて改善可能であるが、放置して病態が進行すると歯の周囲組織が破壊され、歯が喪失されてしまい、さらに細菌が血中、呼吸器へ侵入すると心筋梗塞や肺炎を引き起こすなど、全身性の病気にも関わる。現状、破壊された歯周組織を再生させるために、人工膜や、エナメルマトリックス蛋白の応用などが検討されているが、歯周組織の破壊が著しく進行している場合には既存の治療では再生が難しい。そこで、東京女子医科大学の石川・岩田らは歯周組織のなかの歯根膜から細胞を採取、歯根膜細胞シートを作成し、歯周欠損患者へ移植、歯周組織再生の臨床研究を行った¹⁰⁾。2000年前後に基礎研究をスタートし、十分に小動物、大型動物などで試験を重ね、

有効性が得られた末、患者由来細胞を用いて安全性、品質の安定化試験を重ね、2011年～2014年で患者10例への臨床試験が終了している。

09 | 軟骨再生臨床試験

人体にはおよそ350箇所の関節が存在し、骨と骨の間を緩衝する軟骨が関節部で骨を被膜している。外傷などでも軟骨が損なわれることがあるが、老化などで誰しも関節軟骨は疲弊し、特に変形性膝関節症は非常に多くの患者が存在する。従来の治療法としては、ステロイドの注射、ヒアルロン酸の注入、人工関節などが挙げられる。しかし、近年の再生医療の発展により、不可能だと考えられてきた軟骨の再生が現在可能になりつつある。日本においては、滑膜由来幹細胞を用いた3次元軟骨組織の移植(大阪大学)、また骨髄由来幹細胞を用いたコラーゲンを支持体にした移植(信州大学)、そして、細胞シート工学を応用した、滑膜細胞との共培養軟骨細胞シートの移植(東海大学)が軟骨再生の臨床応用として行われているが、変性膝関節軟骨損傷への適用が認められているのは軟骨細胞シートの移植治療のみである。患部へ移植された積層化自己軟骨細胞シートは様々なサイトカインを発現することで組織修復再生効果を示す¹¹⁾。臨床試験を終え、良好な成績を収めており、今後は先進医療として申請を準備している(<http://cellsheet.med.u-tokai.ac.jp/project.html>)。将来的には、さらに多くの患者を対象として速やかに治療を行うために、同種他家移植の可能性を考えている。骨、軟骨は同種組織移植にて免疫抑制剤の必要のない希少な組織であり、一般化すれば多くの患者のQOLを向上させる優れた治療法となることが期待されている。

10 | 中耳閉塞予防治療・臨床試験

聴覚は外耳から入って鼓膜が振動され、中耳に入った振動が耳小骨を振動、内耳の蝸牛にてシグナルとなり、脳に伝達される。一連の流れの中で、中耳が重要な役割を担っており、難治性中耳炎である中耳真珠腫や癒着性中耳炎などは聴力の著しい低下を招くため、鼓室形成術という手術を行い、真珠腫や癒着を改善し、中耳環境を整える必要がある。しかし、多くは粘膜再生が上手くいかず、再発することが懸念され、新しい治療法が望まれていた。そこで、慈恵医大の濱らは食道再生研究の上皮細胞シートから着想し、鼻粘膜細胞シートを用いて中耳腔粘膜の再建を行い、新しい難治性中耳炎治療法の開発を試みている¹²⁾。特に中耳粘膜は狭い領域に骨に隣接しているため、薄く、かつ縫合なしに接着する細胞シートは非常に適している。また、微絨毛を有する粘膜上皮細胞は機能的にも癒着や真珠腫再発防止に大きく貢献することが期待され、臨床応用が開始されている。

11 | 今後の臨床に向けた検討

現在、東京女子医科大学の呼吸器外科・神崎らによって、肺がん切除後の気漏予防を目的とした自己線維芽細胞シート移

植臨床研究がまさに行われようとしている。肺がんなどで肺が切除された場合、切除部位が塞がれなければ肺機能が著しく低下する。そのために以前から癒着を促進させるような施術が行われていたが、一時的な肺機能の保持には有効であっても、肺の自由な駆動が癒着によって制限されてしまうために、いずれまた肺機能が低下するおそれがある。また、がん再発時に癒着が発生している場合は癒着剥離に時間を要し、手術時間の延長などが懸念される。そこで、次世代に向けた癒着なしの気漏防止による早期肺機能保持を目指したのが細胞シートの切除部位への移植である¹³⁾。細胞シートはその性質により縫合なしに術後素早く生着できる。また、移植した細胞シートは肺の伸展収縮に非常によく適合する。今後、臨床研究が行われ、その効果が得られることに期待が寄せられている。

その他にも現在までに、動物実験レベルにて細胞シートを用いた様々な組織の再生が検討されてきた。肝臓再生においては、小動物体内にて細胞シートより分泌するアルブミンが確認されており¹⁴⁾、また、膵島細胞シートでは、長期的なインシュリン分泌による糖尿病モデルでの高血糖状態の抑制結果が得られている¹⁵⁾。分泌物による治療効果としては、血友病モデル動物に対して、欠損遺伝子を導入した細胞シートを移植することにより、病態改善を行う研究も行われている¹⁶⁾。さらに、甲状腺細胞シートを用いた甲状腺切除モデルでの甲状腺ホルモン分泌の確認が行われ、甲状腺摘出手術後の甲状腺再生治療法開発に繋がる研究が行われている。今後、細胞ソースがiPS細胞由来などのヒト細胞になるとさらに臨床応用への道が拓けると期待される。また、腎臓に関しては、増え続ける末期腎不全患者の治療法開発として、透析治療を要する前に、腎機能・腎構造保持を目指した腎への直接的治療法開発が細胞移植法を用いて検討されている。このような背景の中、東京女子医科大学の腎臓内科では、HGF分泌細胞シートを水腎症・線維化モデルへ移植、腎臓構造崩壊の著しい抑制効果を得ており、今後は細胞ソース選択を行い、臨床応用への発展が期待されている。最新の組織構造の再生研究としては、子宮内膜の重度障害における子宮内膜再生不全による不妊症を想定した子宮内膜再生研究が行われており、動物実験レベルではあるが、再生した子宮内膜での自然妊娠の成立が示唆される結果が得られており、今後の不妊症治療への可能性が期待されている¹⁷⁾。このような基礎研究は主に医師になって間もない若い大学院生が発信源となっており、今後も再生医療を発展させてくれることを期待したい。

12 | おわりに

温度応答性培養皿から始まり、細胞ソースの選定、対象疾患の設定また、移植に際するマニピュレーションおよび輸送のデバイスなど、化学、生物学、理学、医学、薬学、工学の知識が集学した細胞シート工学は今後さらに進化・発展を遂げていくであろう。基材を加工する技術の発展により、より細胞を形態および機能的に制御する技術も開発されており¹⁸⁾、今後の成果が期待されている。

参考文献

- 1) N Yamada, T Okano, H Sakai, F Karikusa, Y Sawasaki, Y Sakurai. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem Rapid Commun* 11, 571-576 (1990)
- 2) A. Kikuchi, M. Okuhara, F. Karikusa, Y. Sakurai, T. Okano. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 9, 1331-1348 (1998).
- 3) H. Sekine, T. Shimizu, K. Sakaguchi, I. Dobashi, M. Wada, M. Yamato, E. Kobayashi, M. Umezu, T. Okano, In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun* 4, 1399 (2013).
- 4) T. Kikuchi, T. Shimizu, M. Wada, M. Yamato, T. Okano, Automatic fabrication of 3-dimensional tissues using cell sheet manipulator technique. *Biomaterials* 35, 2428-2435 (2014).
- 5) K. Tadakuma, N. Tanaka, Y. Haraguchi, M. Higashimori, M. Kaneko, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, A device for the rapid transfer/transplantation of living cell sheets with the absence of cell damage. *Biomaterials* 34, 9018-9025 (2013).
- 6) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, Y. Tano, Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351, 1187-1196 (2004).
- 7) Y. Sawa, Y. Yoshikawa, K. Toda, S. Fukushima, K. Yamazaki, M. Ono, Y. Sakata, N. Hagiwara, K. Kinugawa, S. Miyagawa, Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure Due to Ischemic Heart Disease. *Circ J* 79, 991-999 (2015).
- 8) T. Ohki, M. Yamato, D. Murakami, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki, T. Okano, K. Takasaki, Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 55, 1704-1710 (2006).
- 9) T. Ohki, M. Yamato, M. Ota, R. Takagi, D. Murakami, M. Kondo, R. Sasaki, H. Namiki, T. Okano, M. Yamamoto, Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* 143, 582-588 e581-582 (2012).
- 10) T. Iwata, M. Yamato, H. Tsuchioka, R. Takagi, S. Mukobata, K. Washio, T. Okano, I. Ishikawa, Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials* 30, 2716-2723 (2009).
- 11) 佐藤正人, セルシートエンジニアリング, 関節軟骨再生. 最新医学 69(7月増刊号), 144-153 (2014).
- 12) T. Hama, K. Yamamoto, Y. Yaguchi, D. Murakami, H. Sasaki, M. Yamato, T. Okano, H. Kojima, Autologous human nasal epithelial cell sheet using temperature-responsive culture insert for transplantation after middle ear surgery. *J Tissue Eng Regen Med*, (2015).
- 13) M. Kanzaki, M. Yamato, J. Yang, H. Sekine, R. Takagi, T. Isaka, T. Okano, T. Onuki, Functional closure of visceral pleural defects by autologous tissue engineered cell sheets. *Eur J Cardiothorac Surg* 34, 864-869 (2008).
- 14) K. Ohashi, T. Yokoyama, M. Yamato, H. Kuge, H. Kanehiro, M. Tsutsumi, T. Amanuma, H. Iwata, J. Yang, T. Okano, Y. Nakajima, Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 13, 880-885 (2007).
- 15) T. Saito, K. Ohashi, R. Utoh, H. Shimizu, K. Ise, H. Suzuki, M. Yamato, T. Okano, M. Gotoh, Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation* 92, 1231-1236 (2011).
- 16) K. Tatsumi, M. Sugimoto, D. Lillicrap, M. Shima, K. Ohashi, T. Okano, H. Matsui, A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A. *PLoS One* 8, e83280 (2013).
- 17) G. Kuramoto, S. Takagi, K. Ishitani, T. Shimizu, T. Okano, H. Matsui, Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intrauterine adhesions. *Hum Reprod* 30, 406-416 (2015).
- 18) H Takahashi, T Shimizu, M Nakayama, T Okano. Anisotropic cellular network formation in engineered muscle tissue through the self-organization of neurons and endothelial cells. *Adv Healthc Mater* 4, 356-360 (2015).