

700500169A

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の
基礎及び臨床研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 惣一郎

平成18(2006)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の
基礎及び臨床研究

目 次

I. 総括研究報告

- 間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究 1
北村 惣一郎

II. 分担研究報告

1. 間葉系幹細胞を用いた難治性心不全治療の開発 5
北村 惣一郎
2. 間葉系幹細胞シート移植による心筋組織再生療法 7
永谷 憲歳
3. 間葉系幹細胞保存技術の開発 11
大串 始
4. 重症末梢動脈閉塞症に対する間葉系幹細胞移植治療（微小血管造影法への応用） . . 15
竹下 聡
5. 心筋-内皮共培養細胞シートを用いた血管網の制御 17
清水 達也
6. 間葉系幹細胞移植による心不全改善機序に関する基礎的研究 19
盛 英三
7. 間葉系幹細胞移植とIGF-1の併用療法 23
宮武 邦夫
8. 間葉系幹細胞を用いた心筋組織再生療法-心疾患への応用 25
中谷 武嗣
9. 間葉系幹細胞シート移植による小児心不全治療の開発 27
八木原 俊克
10. 心臓超音波による経皮的細胞移植の機能評価に関する研究 29
山岸 正和
11. 間葉系幹細胞による心筋虚血血管再生療法の臨床評価 31
小林 順二郎
12. 間葉系幹細胞を用いた心筋組織再生療法におけるNOGAシステムの臨床的有用性 . . . 33
清水 渉
13. 多孔性高分子フィルムを用いた心筋組織・抹消血管組織の再生に関する研究 35
西川 雄大

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究

主任研究者 北村 惣一郎 国立循環器病センター 総長

研究要旨 拡張型心筋症や虚血性心筋症に対して自己骨髄間葉系細胞の移植による心筋血管再生療法の基礎および臨床研究を行った。臨床研究に関しては現在まだ少数例で細胞移植が施行されたのみであり、今後症例を重ねて安全性と有効性を確認していく必要があると考えられた。また、基礎研究として、次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞＋細胞シートまたは成長因子によるハイブリット再生治療による心筋再生療法を開発し、その一部が Nature Medicine 誌に掲載された。今後は臨床応用へ向けたさらなる検討を行っていく予定である。

分担研究者		清水 渉	国立循環器病センター
永谷憲歳	国立循環器病センター研究所 再生医療部 部長		心臓血管内科 医長
大串 始	産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 グループ長	西川雄大	国立循環器病センター研究所 先進治療機器開発室 室長
竹下 聡	国立循環器病センター 心臓血管内科 医長		
清水達也	東京女子医科大学先端生命医科学 研究所 講師		
盛 英三	国立循環器病センター研究所 心臓生理部 部長		
宮武邦夫	独立行政法人国立病院機構 大阪南医療センター 院長		
中谷武嗣	国立循環器病センター 臓器移植部 部長		
八木原俊克	国立循環器病センター 副院長		
山岸正和	金沢大学大学院医学系研究科 教授		
小林順二郎	国立循環器病センター 心臓血管外科 医長		

A. 研究目的

虚血性心疾患および拡張型心筋症などによる難治性心不全は心臓移植の適応であるが、ドナーの不足により十分な移植医療ができないのが現状である。近年、骨髄間葉系細胞の中には多分化能を有する幹細胞が存在し、心筋、血管、神経、脂肪及び骨に分化することが明らかとなってきた。我々は心不全動物の心筋内へ間葉系幹細胞を移植すると心筋と血管が同時に再生され、心機能が改善されることを証明してきた（Nagaya N, Kitamura S, et al Circulation 2005）。これらの基礎的検討をもとに、骨髄間葉系細胞を用いた難治性心不全治療・狭心症治療を開発し臨床応用を開始した。また次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞＋細胞シートまたは成長因子によるハイブリット再生治療による心筋再生療法の開発を行った。

B. 研究方法

1. 間葉系幹細胞を用いた心筋血管同時再生療法の開発に関する臨床試験

患者自身の骨髄液 15mL と自己末梢血 400mL を採取し、末梢血から分離した血清を用いて約 3 週間培養した。以下の 2 つのプロトコールを行った。

1) 拡張型心筋症、虚血性心筋症に対する経皮的細胞移植治療（北村、永谷、山岸、清水、宮武、中谷、竹下担当）虚血性心疾患や拡張型心筋症等が原因で心不全を有し、既存の治療に抵抗性を示す重症慢性心不全患者を対象に、間葉系幹細胞を経カテーテル的に心内膜側から心筋へ注入。

2) 虚血性心筋症に対する細胞移植および冠動脈バイパス手術併用療法（北村、小林、八木原担当）従来の治療法で改善困難な領域を有する重症虚血性心疾患患者を対象として、冠動脈バイパス術による外科的血行再建と同時に、自己骨髄より採取培養された間葉系幹細胞の移植を行った。

2. 細胞移植治療の治療増強法としてハイブリット再生治療の開発

1) 幹細胞＋細胞シートによる心筋再生療法の開発（清水、西川、永谷、中谷、八木原、盛、北村）ラットの左冠動脈結紮術時に皮下脂肪を摘出し、間葉系幹細胞を抽出・培養した。この脂肪由来間葉系幹細胞を温度応答性培養皿上で培養し、単層の細胞シートグラフトを作製、心筋梗塞後 4 週間経過した慢性心不全ラットの心外膜表面に移植した

2) 幹細胞＋インスリン様増殖因子 (IGF-1) による心筋再生療法の開発（宮武、永谷、北村）ラットの左冠動脈結紮 1 時間後に 5×10^6 個の MSCs を梗塞周囲心筋に直接注入し、引き続き IGF-1 を 2mg/kg/day で 14 日間投与した。術後 4 週間目に心エコー、心カテーテル及び組織学的検

討を行った。また、MSCs に対する IGF-1 の作用機序を調べた。

3. 間葉系幹細胞移植治療の実用化を目指して間葉系幹細胞の保存技術の確立（大串、永谷）

ヒト骨髄より間葉系細胞を増殖したのち、長期間冷凍保存をおこなった。解凍後、FACS 分析により細胞表面抗原ならびに NucleoCounter (ChemoMetec) を用いて cell viability を探索し、冷凍保存されていないヒト間葉系幹細胞の結果と比較検討した。

C. 研究結果

1. 間葉系幹細胞を用いた心筋血管同時再生療法の開発に関する臨床試験

既存の治療に抵抗性である 5 例の慢性心不全患者（拡張型心筋症 3 例と虚血性心筋症 2 例）に対して細胞移植を行った。ホルター心電図による不整脈の増加は全例で認められなかった。CT 検査では細胞移植による心筋内の骨形成は否定された。また細胞移植後に若干白血球が上昇したが、すみやかに低下した。その他、血算や化学検査に異常は認められなかった。有効性に関しては現在、症例を積み重ねているところで、統計学的解析はまだ行っていないが、心不全の指標である血漿 BNP 濃度は、細胞移植により低下した。また左室駆出率は軽度の増加がみられた。

また、従来の治療法で改善困難な領域を有する重症虚血性心疾患患者を対象として、冠動脈バイパス術による外科的血行再建と同時に、自己骨髄より採取培養された間葉系細胞の移植を行う。虚血や心機能への効果と本治療法の安全性を評価する。これまで 2 例に同方法にて移植を行った。死亡、合併症はなく、有害事象も生じていないことから安全性には問題は無いものと考えられた。有効性の確立には更なる症例の蓄積と経過観察

が必要である。

2. 細胞移植治療の治療増強法としてハイブリット再生治療の開発

ラット皮下脂肪由来の間葉系幹細胞を温度応答性培養皿上で培養し、単層の間葉系幹細胞シートを作製した。この細胞シートをラット慢性心筋梗塞モデルの心外膜表面に移植すると、血管再生及び心筋分化を伴いながら増殖し、厚みのある組織を構築した。更に、心不全ラットの心機能及び予後を劇的に改善させた。また、新たな細胞シートとして延伸多孔性フィルムを開発し、ヒト骨髄間葉系幹細胞の高密度配向化細胞シートを作製することに成功した。

細胞移植+インスリン様増殖因子 (IGF-1) による心筋再生療法の開発に関しては、IGF-1 は移植 MSCs の増殖を促進、アポトーシスを抑制することで生着率を増大させ、その結果 MSCs 移植の心機能改善効果を増強することが確認された。また、これらの効果は PI3k-Akt 及び MEK-ERK1/2 シグナル経路を介したものであることも明らかになった。

3. 間葉系幹細胞移植治療の実用化を目指して間葉系幹細胞の保存技術の確立

数年間の保存後もヒト間葉系細胞は表面抗原のパターンに差がなく、さらに冷凍保存細胞の viability も約 90% を示した。以上より、患者骨髄から間葉系細胞を増殖ののち、冷凍保存をおこない、必要に応じて保存細胞が種々循環器病の再生に用いられることが判明した。

D. 考察

骨髄間葉系細胞による心筋血管再生治療の安全性と有効性に関して、基礎および臨床研究を行った。臨床試験において拡張型心筋症などの難治性心不全に対する安全性とある程度の有効性が

確認されたが、今後さらに症例を増やして検討する必要があると考えられた。また細胞移植治療の治療増強法として、単層の間葉系幹細胞シートの移植 (Nature Medicine 2006) や IGF-1 と間葉系幹細胞の併用の有効性を小動物実験で示した。今後は大動物を用いた前臨床研究を経て臨床試験を行っていく予定である。

E. 結論

拡張型心筋症や虚血性心筋症に対して自己骨髄間葉系細胞の移植による心筋血管再生療法の基礎および臨床研究を行った。間葉系幹細胞移植の安全性と有効性に関しては、今後症例を蓄積して検討を行っていく必要があると考えられた。また、基礎研究として、次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞+細胞シートまたは成長因子によるハイブリット再生治療による心筋再生療法を開発した。今後は臨床応用へ向けたさらなる検討を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium After Myocardium Infarction. Nature Medicine (in press).

2. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. Circulation. 2005; 112: 1128-35.

3. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S,

Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovasc Res. 2005; 66: 543-551.

2. 学会発表

Yoshinori Miyahara, Noritoshi Nagaya, Hidezo Mori. Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium While Growing In Situ. XIV International Symposium on Atherosclerosis, Roma, June 18-22, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特願 2005-19802

特願 2005-197489

2. 実用新案登録

なし

間葉系幹細胞を用いた難治性心不全治療の開発

主任研究者 北村 惣一郎 国立循環器病センター 総長

研究要旨 虚血性心疾患および拡張型心筋症による難治性心不全患者に対して自己骨髄間葉系細胞の移植による心筋血管再生療法の臨床応用を行った。カテーテルを用いて心内膜側より心筋内へ間葉系幹細胞を移植したところ、左室機能の改善が認められる症例が存在した。今後症例を重ねて安全性と有効性を評価していく予定である。

A. 研究目的

虚血性心疾患および拡張型心筋症などによる難治性心不全は心臓移植の適応であるが、ドナーの不足により十分な移植医療ができないのが現状である。近年、骨髄間葉系細胞の中には多分化能を有する幹細胞が存在し、心筋、血管、神経、脂肪及び骨に分化することが明らかとなってきた。我々は心不全動物の心筋内へ間葉系幹細胞を移植すると心筋と血管が同時に再生され、心機能が改善されることを証明してきた（Nagaya N, Kitamura S, et al Circulation 2005）。これらの基礎的検討をもとに、骨髄間葉系細胞を用いた難治性心不全治療を開発し臨床応用を開始したので報告する。

B. 研究方法

- 1) 対象：虚血性心疾患や拡張型心筋症等が原因で心不全を有し、既存の治療（利尿剤、ACE阻害薬、β遮断薬、両室ペーシング、外科的治療など）に抵抗性を示す重症慢性心不全患者。
- 2) 細胞採取と培養：患者自身の骨髄液 15mL と自己末梢血 400mL を採取する。末梢血から分離した血清を用いて 15%血清入りのαMEM メディウム

で骨髄液を培養した。細胞培養は産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門の Cell processing center (CPC) で行った。間葉系幹細胞の特異的表面抗原は存在しないことや、培養の操作過程を簡略化するために、間葉系幹細胞の接着性を用いて浮遊系細胞との分離を行った。このようにして間葉系幹細胞を体外で約 3 週間培養増殖させた。

- 3) 細胞移植：カテーテルを用いて心内膜側より心筋内へ間葉系幹細胞を移植した。
- 4) 安全性と有効性の評価：細胞移植前と 2 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後にホルター心電図、胸部 CT、BNP 採血を行った。また細胞移植前と 2 ヶ月後カテーテルによる左室造影等を行った。

研究は「間葉系細胞移植による難治性心不全治療の臨床評価」として国立循環器病センター倫理委員会に承認されている。

C. 研究結果

- 1) 心不全検討会で承認された既存の治療に抵抗性である 5 例の慢性心不全患者（拡張型心筋症 3 例と虚血性心筋症 2 例）に対して細胞移植を行った。

2) 安全性：ホルター心電図による不整脈の増加は全例で認められなかった。CT 検査では細胞移植による心筋内の骨形成は否定された。また細胞移植後に若干白血球が上昇したが、すみやかに低下した。その他、血算や化学検査に異常は認められなかった。

3) 有効性：現在、症例を積み重ねているところで、統計学的解析はまだ行っていないが、心不全の指標である血漿BNP濃度は、細胞移植により著明に低下した。また左室駆出率は軽度の増加がみられた。

D. 考察

今回我々は骨髄間葉系細胞による心筋血管再生治療の有効性について報告した。既存の骨髄単核球を用いた細胞移植と比較して、骨髄間葉系細胞移植には体外での無菌培養が必要であるという煩雑さはあるが、心筋に分化する能力を持ち、少量の骨髄液から大量培養が可能であるという利点がある。骨髄間葉系細胞移植は心筋内に移植すると心筋と血管が同時に再生されるとう点で、特に拡張型心筋症などの難治性心不全に対する治療として期待される。

E. 結論

少数例であるが、骨髄間葉系細胞移植による心不全治療の臨床応用を開始した。今後症例を重ねて安全性と有効性を評価していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium After Myocardium Infarction. Nature Medicine (in press).

2. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. Circulation. 2005; 112: 1128-35.

3. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. Circulation. 2005; 11: 356-362.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

間葉系幹細胞シート移植による心筋組織再生療法

分担研究者 永谷憲歳 国立循環器病センター研究所再生医療部 部長

分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部 部長

研究要旨 ラット皮下脂肪由来の間葉系幹細胞を温度応答性培養皿上で培養し、単層の間葉系幹細胞シートを作製した。この細胞シートをラット慢性心筋梗塞モデルの心外膜表面に移植すると、血管再生及び心筋分化を伴いながら増殖し、厚みのある組織を構築した。更に、心不全ラットの心機能及び予後を劇的に改善させた。単層間葉系幹細胞シート移植は、心筋組織再生の新たな治療法となる可能性がある。

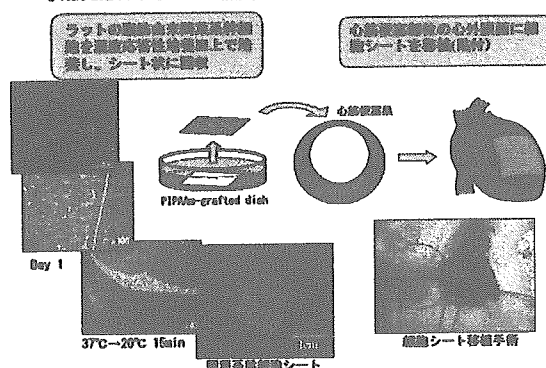
A. 研究目的

従来、薬物及び手術治療に抵抗性の重症心不全に対して、細胞懸濁液の心筋内直接注入による細胞移植治療が行われてきた。しかし、移植細胞が心筋組織内で散乱し、その多くが長期間生存できないため、心機能改善効果が少なく、また厚みのある心筋組織再生は不可能であった。そこで、心筋および血管内皮細胞への分化能を持つ脂肪由来の間葉系幹細胞を用いて単層の細胞シートグラフトを作製し、その治療効果を検討した。

B. 研究方法

ラットの左冠動脈結紮術時に皮下脂肪を摘出し、間葉系幹細胞を抽出・培養した。この脂肪由来間葉系幹細胞を温度応答性培養皿上で培養し、単層の細胞シートグラフトを作製、心筋梗塞後4週間経過した慢性心不全ラットの心外膜表面に移植した（図1）。移植後4週間目に心エコー、心カテーテル検査及び組織学的検討を行った。

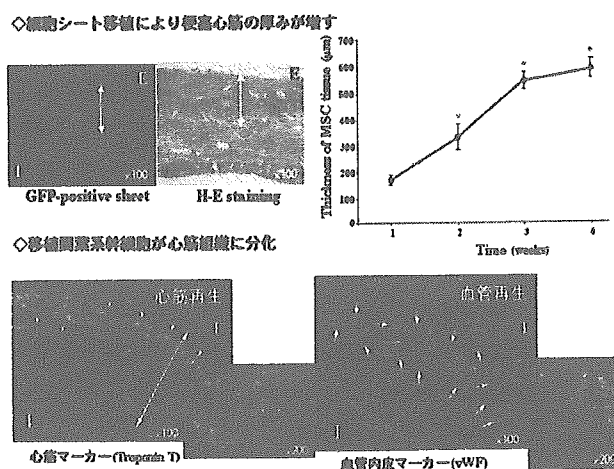
図1 ◇Rat old MI modelへの脂肪由来間葉系幹細胞シート移植



C. 研究結果

単層間葉系幹細胞シートは血管内皮増殖因子（VEGF）や肝細胞増殖因子（HGF）などの増殖因子を多く分泌した。単層間葉系幹細胞シートは移植後速やかに生着した。単層間葉系幹細胞シートは、移植シート内に多くの血管網を構築し、わずかな心筋分化も伴いながら、約600 μ mにも及ぶ厚い組織を形成した（図2）。間葉系幹細胞シートは梗塞領域の壁厚を増し、心不全ラットの収縮・拡張能を改善させ、また生命予後を著明に改善させた。

図2



D. 考察

単層間葉系幹細胞シート移植が厚い心筋組織を構築し心機能を改善するメカニズムは以下の通りである。間葉系幹細胞シートの作製にはトリプシン等の蛋白分解酵素を使用しないため、グラフとの底面には細胞間マリックス及び接着因子が保たれている。故に間葉系幹細胞シートは移植後速やかに心表面に接着する。更に間葉系幹細胞シートは VEGF や HGF などの血管新生及び抗アポトーシス因子を分泌するため、自身の血管組織への分化能のみならず、ホスト由来の細胞をグラフト内に誘導することで、高密度の血管網を構築する。この血管形成により豊富な血流供給を受けることで、生存及び増殖能を維持し、移植時には厚さ僅か20 μ m 程度の細胞シートが、4週間 で約600 μ m の実質組織に成長した。その結果、菲薄化した前壁の梗塞巣の厚みが増し、拡張期の wall stress が減少することで、心機能が改善したと考えられる。我々が間葉系幹細胞のソースに用いた皮下脂肪は、心血管疾患を持つ患者には不要な組織であり、脂肪吸引等の低侵襲な手技で採取できるため、理想的な再生治療法と言える。本研究結果は、Nature Medicine に掲載される予定である。

E. 結論

単層間葉系幹細胞シート移植は、心筋梗塞により線維化した組織の機能を修復する画期的な治療法となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium After Myocardium Infarction. Nature Medicine (in press).
2. Kataoka M, Nagaya N, Satoh T, Itoh T, Murakami S, Iwase T, Miyahara Y, Kyotani S, Sakai Y,

Kangawa K, Ogawa S. A Long-acting Prostacyclin Agonist with Thromboxane Inhibitory Activity for Pulmonary Hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 172 (12): 1575-80.

3. Nagaya N, Itoh T, Murakami S, Oya H, Uematsu M, Miyatake K, Kangawa K. Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD. Chest. 2005; 128: 1187-1193.

4. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Kataoka M, Iwase T, Horio T, Miyahara Y, Sakai Y, Kangawa K, Kimura H. A prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity (ONO-1301) attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006; 290(1): L59-65

5. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. Circulation. 2005; 112: 1128-35.

6. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Iwase T, Fujisato T, Nishioka K, Hamada K, Kimura H. Adrenomedullin Regenerates Alveoli and Vasculature in Elastase-induced Pulmonary Emphysema in Mice. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 172: 581-589

7. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovasc Res. 2005; 66: 543-551.

8. Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 288: R1432-7.

9. Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. Stroke 2005; 36:

853-858.

10. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 2005; 11: 356-362.

11. Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H1444-1450

2. 学会発表

Yoshinori Miyahara, Noritoshi Nagaya, Hidezo Mori. Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium While Growing In Situ. XIV International Symposium on Atherosclerosis, Roma, June 18-22, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特願 2005-19802

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

研究協力者

清水達也、岡野光夫（東京女子医科大学 先端生命研究所）

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究

分担研究者 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門
大串 始

研究要旨： ヒト骨髄より間葉系細胞を増殖したのち、長期間冷凍保存をおこなった。解凍後、細胞表面抗原ならびに cell viability を探索した。数年間の保存後もヒト間葉系細胞は表面抗原のパターンに変化がなく、さらに viability も約 90% を示した。以上より、患者骨髄から間葉系細胞を増殖ののち、冷凍保存をおこない、必要に応じて保存細胞が種々循環器病の再生に用いられることが判明した。

A. 研究目的

我々は国立循環器病センターと共同で、患者骨髄より間葉系細胞を増殖ののち、心不全等の循環器疾患の患者に移植するという新しい心再生技術を開発しつつある。この再生医療において、患者間葉系細胞は同一の患者に用いられるが、用いる細胞は採集された新鮮骨髄から約 3 週間かけて増殖されたものであり、その増殖細胞がただちに患者に移植されている。この点において、もし増殖された細胞の一部が細胞活性を有したまま保存可能であれば、患者の心機能が再度低下した場合や、あるいは間葉系細胞の多分化能を利用して、将来患者が種々の循環器病に陥った場合、その保存細胞が利用できる。このことにより、患者にとっては、たった一回の骨髄の採取により、多数回の治療に用いることが可能となり、循環器再生治療の新たな展開が可能となる。そこで、17 年度では、数年間マイナス 80 度から 150 度で保存されたヒト間葉系細胞を再度解凍して、細胞の表面抗原の発現ならびに増殖能や生存活性の研

究を目的とした実験をおこなった。

B. 研究方法

冷凍保存：

新鮮ヒト骨髄約 3 ml をフラスコに播種し約 $2.5-6.5 \times 10^4$ cells/cm² になった段階で、0.05% trypsin/0.53 mM EDTA (Invitrogen Corp.) 処理をおこない、 5×10^5 cells/mL の細胞浮遊液を storage solution (Cell Banker, Juji Field, Inc.) を用いて作成した。次に、以下のステップで冷凍保存をおこなった。

4°C for 10 min, -30°C for 1 h

-80°C for 2-3 days.

-152°C

FACS 分析：

冷凍保存あるいは保存されていないヒト間葉系最奥の表面抗原分析をおこなった。なお、冷凍保存されている細胞は急速に解凍をおこない直ちに使用した。

使用した抗体は以下のとおりである。

CD14, CD34, CD45 (CALTAG Laboratories), CD29, CD105, and human leukocyte antigen region DR

(HLA-DR) (Serotec, UK).

コントロールとして、Mouse immunoglobulin G (IgG) (Beckman Coulter, Inc.) を用いた。

細胞生存測定：

NucleoCounter (ChemoMetec)を用いて Cell viability (細胞生存率) を測定した。冷凍細胞を解凍ののちただちに培養液で10倍に薄め、遠心ののち5mlに再調整した。このうち200uをNucleoCounterにかけて non-viable 細胞と総細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞の採取は患者の同意のもとにおこなわれ、冷凍細胞を用いての研究は産業技術総合研究所の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

図1に見られるように、CD34、CD45等の血液幹細胞にみられるマーカーはネガティブであり、間葉系にみられるとされているマーカーはポジティブであった。また、これらのパターンは冷凍保存されていない細胞も冷凍保存された細胞も同様のパターンをしめし、長期の冷凍によっても間葉系細胞としての性質を保つことが判明した。さらに、この解析のためには、保存されている細胞を増殖して解析する必要があったが、この増殖も問題なくおこなわれ、細胞分裂能も長期の保存によって損なわれないことが明らかとなった。また、この増殖された細胞のviabilityを測定したところ、図2に見られるように数年たっても90%以上であった。

D. 考察

以上の結果より、ヒト間葉系細胞は冷凍保存が可能であり、さらに保存された細胞は長期にわたって活性 (cell viability) を有することが判明した。以上より、新鮮骨髄から間葉系細胞を増殖したのち、その増殖細胞は種々の再生

医療に用いることが可能であるが、さらに一歩すすんで、余剰の細胞を冷凍保存をおこない、将来にむけてこの冷凍細胞が使用可能である。

E. 結論

心不全等を含む循環器病疾患が、患者自身の冷凍保存された細胞 (間葉系細胞) を用いての再生医療がおこなえる可能性を示した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Oshima. Culturing Human Mesenchymal Stem Cells on Bioceramics for Hard Tissue Regeneration Key Eng Mater 2005; 284-286:603-606.
2. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y. Tissue engineered ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. Biomaterials 2005;26(22):4654-61
3. Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H. Viability and Osteogenic Potential of Cryopreserved Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells. Tissue Engineering 2005;11(5/6):663-673

2. 学会発表

1. The 7th International conference on Cellular Engineering (Sep.8, 2005, Seoul, KOREA) 2005
N. Kotobuki, Y. Katsube, M. Hirose, Y. Takakura, A. Caplan, and H. Ohgushi
SURFACE MARKER EXPRESSIONS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS USED FOR REGENERATIVE MEDICINE

2. 1st Japanese-German Conference on Regenerative Medicine (Invited) (Sep.10, 2005 ; Mie University, JAPAN) H. Ohgushi, Y. Takakura. Tissue Engineered Biomaterials for Hard Tissue Regeneration: Our Clinical Experiences using Patient's Mesenchymal Stem Cells Cultured on Bio-Ceramics
3. The Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (Invited) (Oct.24, 2005, Shanghai, China) H. Ohgushi. Clinical Applications of Tissue Engineered Artificial Joints

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

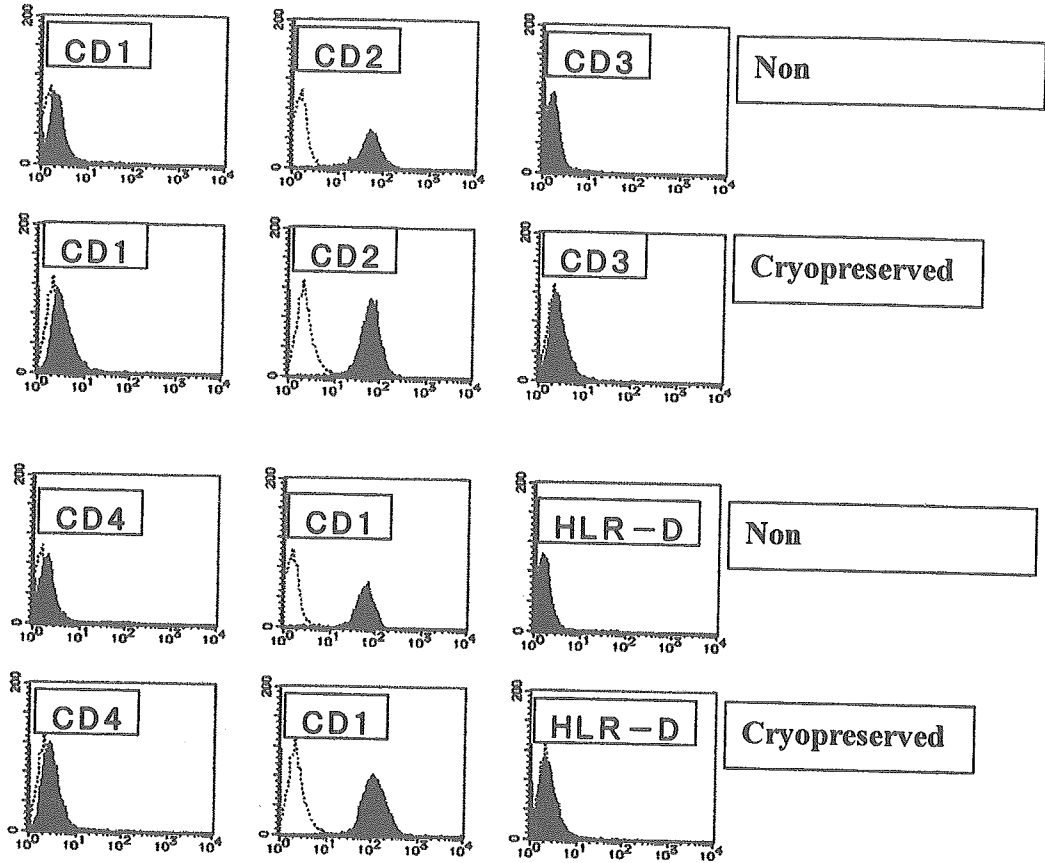


Fig. 1 Cell surface antigen analyses

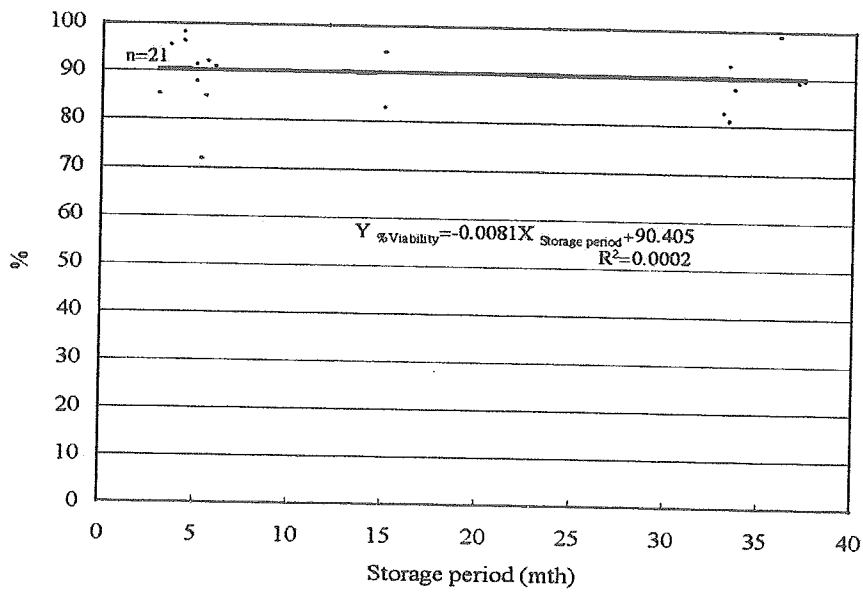


Fig 2 Cell viability of MSCs after cryopreservation.

重症末梢動脈閉塞症に対する間葉系幹細胞移植治療（微小血管造影法への応用）

分担研究者 竹下 聡 国立循環器病センター 心臓血管内科医長

研究要旨 間葉系細胞移植施行患者における血管新生の評価を目的に、病院設置型微小血管造影装置の開発と臨床応用とを進めている。末梢動脈閉塞症患者に対し、本装置を用いた血管造影を試行した結果、被検者の被曝線量は、一般の造影装置と同等のレベルであった。また、直径 50 μm 前後までの下肢微小血管を描出することが可能であった。現在、細胞移植施行患者を対象とし、微小新生血管の描出を試みている。

A. 研究目的

難知性の重症末梢動脈閉塞症に対する血管新生療法の臨床応用が進められている。しかしながら、通常の血管造影装置を用いた検査では、有意な血管新生が認められないことも多い。

本研究の目的は、病院設置型微小血管造影装置を開発し、間葉系細胞移植施行患者における微小血管レベルでの血管新生評価を行うことである。

B. 研究方法

新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援のもと、浜松ホトニクス(株)を中心に、NHK エンジニアリングサービス、国立循環器病センター研究所、東海大学医学部等が協力して、世界で唯一の病院設置型微小血管造影装置を開発した。装置は、高出力の CT 用 X 線源と高感度なハイビジョン撮像系により構成されており、50 μm の解像度を有する。本装置を用いて血管新生療法の前後で血管造影を施行し、微小血管レベルにおける血管新生について評価していく。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理委員会の審議・承認を得て施行している。被験者に対して本検査の合併症・効能・不利益・利益を説明した後、同意の元に行う。

C. 研究結果

一般の血管造影は 200 μm 前後の解像度であるが、病院設置型微小血管造影装置は 50 μm であった。ヒトに対する臨床応用として、下肢末梢動脈

閉塞症の患者を対象に、これまでに合計 7 回の微小血管造影を施行した。造影に伴う被曝線量は通常の血管造影と同レベルであることが判明した。微小血管造影によって通常の造影では描出困難な 100 μm 以下の微小血管が鮮明に描出された。DSA に比較して少なくとも 1-2 分枝末梢側の血管が描出可能であった。1 ヶ月から 1 年の間隔を置いて施行した造影検査における微小血管の再現性は良好であった。

D. 考察

病院設置型微小血管造影装置の 1 号機は、通常の血管造影と同等の安全性を有している。また、その血管描出能は通常装置に比し優れていることは明白で、ヒトの微小血管評価に用いることが可能な新しい検査法と言える。造影検査を繰り返し施行し得た症例における微小血管の再現性は良好であり、血管新生療法前後における新生血管の評価を、本装置によって行うことが可能と思われる。今後、間葉系細胞移植患者を対象として本検査を施行していく予定である。

E. 結論

病院設置型微小血管造影装置は 50 μm の微小血管が観察可能であり、安全性や再現性にも問題ない。末梢動脈閉塞症に対する間葉系細胞移植によって、微小血管新生がどのように促進されるのか、本装置を用いた検討を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

①Nishigami K, Nakatani T, Chiku M, Mori H. A novel micro-angiography detecting angiogenesis, Application for autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in the patients with critical limb ischemia. In Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. Ed by Mori H, Matsuda H, Springer, Tokyo, 191-199, 2005

②知久正明、西上和宏、内藤博昭、盛 英三、佐藤英一：画像解析-微小血管造影-. 遺伝子医学 MOOK 1 再生医療へのブレイクスルー(その革新技術と今後の方向性)、田畑 泰彦編集、メディカルドゥ 223-227, 2005

③竹下聡、血管新生療法. 治療学 39:775-777, 2005.

2. 学会発表

① Masaaki Chiku: Evaluation of novel micro-angiography for clinical therapeutic angiogenesis、日本循環器学会総会、横浜、2005年3月19日

②神谷千津子、林富貴雄、田中良一、坏宏一、竹下聡、野々木宏：浅大腿膝窩動脈領域を主病変とする閉塞性動脈硬化症への治療戦略、第46回日本脈管学会総会、大阪、2005年12月1日

③神谷千津子、林富貴雄、坏宏一、竹下聡、野々木宏：日本語 WIQ による症状転帰からみた PTA 適応の検討、第46回日本脈管学会総会、大阪、2005年12月1日

④林富貴雄、竹下聡、坏宏一、野々木宏、エビデンスに基づく閉塞性動脈硬化症の治療戦略“間歇性跛行肢に対する運動療法の有用性”、第46回日本脈管学会総会、大阪、2005年12月1日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

研究協力者：

西上和宏 国立循環器病センター心臓血管内科

知久正明 国立循環器病センター心臓血管内科

坏 宏一 国立循環器病センター心臓血管内科

笠井智司 国立循環器病センター心臓血管内科

心筋-内皮共培養細胞シートを用いた血管網の制御

分担研究者 清水 達也 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

研究要旨 我々はシート状の心筋細胞を積層化することで3次元の心筋組織を再構築する独自の研究を展開してきた。しかしながら再生組織内における酸素・栄養の供給および老廃物の除去には限界があり再生可能な組織の厚さが制限される。そこでこの限界を克服するため再生組織内に血管網を付与する必要がある。これまでに血管再生の細胞源となる内皮細胞と心筋細胞の共培養細胞シートを重層化し移植することで血管網を伴った心筋組織が再生可能であることを明らかにした。本研究では共培養する内皮細胞の量を変えることで *in vitro* および *in vivo* での血管網新生の制御が可能であることを示した。

A. 研究目的

我々は細胞シートを重層化することで3次元組織を再構築する「細胞シート工学」により同期して拍動する心筋組織の再生に成功しているが、より機能的な心筋組織の再生には再生組織内においていかに血管網新生を促進し十分な酸素・栄養を供給するかが課題となっている。この課題を克服するため血管の細胞ソースである内皮細胞と心筋細胞の共培養細胞シートを作製し皮下組織に移植したところ、導入した内皮細胞が再生組織内の血管網再構築に寄与するという知見を得た。そこで本研究では心筋単独の細胞シートおよび種々の比率で血管内皮細胞と心筋細胞を共培養した細胞シートを作製し、血管網新生の制御を試みた。

B. 研究方法

新生仔ラット心室から単離した細胞を自動磁気細胞分離装置を用い心筋細胞（CD31 陰性）と内皮細胞（CD31 陽性）に分画し、それぞれ温度応答性培養皿上で単独および共培養した。心筋細胞は 2.5×10^6 cells/dish の濃度で播種し内皮細胞は 0, 0.1, 0.5, 1.5, 2, 2.5×10^6 cells/dish のそれぞれの濃度で心筋細胞と共培養した。各細胞シートでの内皮細胞の挙動を抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫染色にて解析し、その占有面積を NIH image にて定量化

した。次に温度降下処理により回収した共培養細胞シートを積層化し重層化共培養細胞シートを作成しヌードラット皮下組織に移植、*in vivo* での血管網新生を比較した。内皮細胞はその同定を目的に GFP 陽性ラットから採取した。

（倫理面への配慮）

実験動物に関しては苦痛を伴わないよう正しく取り扱い、適切な麻酔を行って研究を行った。

C. 研究結果

抗CD31抗体を用いた蛍光免疫染色の結果、共培養する内皮細胞の濃度の上昇に伴って、血管内皮細胞の網目構造が増加した (0×10^6 cells/dish: $3.9 \pm 0.3\%$, 0.1×10^6 cells/dish: $9.0 \pm 2.1\%$, 0.5×10^6 cells/dish: $23.7 \pm 0.3\%$, 1.5×10^6 cells/dish: $38.5 \pm 13.5\%$)。しかしながら、さらに濃度が上がると逆に網目構造が減少する結果となった (2.0×10^6 cells/dish: $28.6 \pm 9.0\%$)。 2.5×10^6 cells/dish の場合には一部内皮細胞が敷石状の形態を呈した。GFP陽性内皮細胞-GFP陰性心筋細胞の共培養細胞シートを重層化してヌードラットに移植して1週間後の組織像を観察したところ心筋細胞単独シートの移植に比べグRAFT内に有意に多くの血管が新生

していることが明らかとなった。また共培養細胞シートを移植して再生された心筋組織内の血管網は導入した内皮細胞 (GFP陽性) で構築されていることも明らかとなった。

D. 考察

今回の研究においては心筋細胞に対し 5:3 の濃度の内皮細胞を共培養することで最も多くの血管内皮細胞の網目構造を形成できることが明らかとなった。この内皮細胞の網目構造は心筋細胞との共培養において形成される細胞外マトリクスの 3 次元的構造や心筋細胞から分泌される種々のサイトカインの作用によるものと考えられるが今後その詳細を明らかにしていく必要がある。一方、この比率を超える内皮細胞との共培養ではむしろ網目構造は減少し一部、敷石状の形態となった。これは心筋細胞に対して過剰な内皮細胞が心筋細胞と接着しないため培養皿表面上で単独培養と同じ環境になるためであると考えられる。また GFP 陽性の内皮細胞が移植後の再生組織内の血管網を再構築していたことは組織内血管網の促進を目的に *in vitro* であらかじめ内皮細胞を導入しておくという新たなアプローチが有用であることを示す。

E. 結論

心筋組織再生において心筋細胞と共培養する血管内皮細胞の量を調節することにより再生組織内での血管網新生を制御することが可能となった。血管内皮細胞との共培養細胞シートを用いた組織再生の技術は虚血に伴う再生組織厚の限界を克服する可能性があり心筋組織のみならず他臓器も含めた今後の再生医療に大きく貢献するものとする。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:573-582, 2006

2. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J.* 2006 Jan 26; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

・清水達也：Tissue Engineering における血管新生. 第 26 回日本炎症・再生医学会、東京、7.12-13, 2005

・清水達也：重症心不全に対する再生医療の現状と展望～細胞シートを用いた心筋組織再生～. 第 8 回日本組織工学会、東京、9.1-2, 2005

・清水達也：心筋組織再生の現状と展望. 第 43 回日本人工臓器学会、東京、11.30-12.2, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

関谷佐智子 (東京女子医科大学 先端生命医科学研究所)

小林芳郎 (東邦大学理学部生物分子科学科)

金内郁子 (東邦大学理学部生物分子科学科)