

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 惣一郎

平成19（2007）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. 骨髄由来間葉系幹細胞と骨髄単核球の遺伝子発現解析・・・8  
永谷 憲歳
3. 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・・・10  
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）・・・13  
竹下 聡
5. 間葉系幹細胞シートにおける血管新生関連サイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量の比較・・・15  
清水 達也
6. 房室ブロックに対する間葉系幹細胞移植の効果・・・17  
盛 英三
7. コントラストエコー法を用いた新生血管評価法の開発・・・19  
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・・・21  
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・・・22  
八木原 俊克
10. 抗酸化遺伝子導入MSCを用いた心筋梗塞モデルラットに対する心不全治療の試み・・・24  
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・・・25  
小林 順二郎
12. NOGAシステムを用いた間葉系幹細胞による心筋血管再生療法・・・27  
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・・・29  
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。慢性心不全に対する骨髄間葉系細胞移植に関しては、パイロット臨床試験により安全性と有効性が確認された。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。

### 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。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行った。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。また、間葉系培養細胞の培養・保存技術の開発を行っている。

### B. 研究方法

1. 自己間葉系細胞を用いた難治性循環器疾患に対する心筋血管再生療法の臨床応用  
患者自身の骨髄液 15-20mL と自己末梢血 400-600mL 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、虚血性心筋症による慢性心不全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、NOGA システムを用いて間葉系細胞を経カテーテル的に心内膜側から心筋へ注入した。

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細胞の移植を行った。

2. 間葉系細胞＋細胞シート、成長因子によるハイブリット再生治療の開発

間葉系細胞＋細胞シートによる心筋様組織再生療法の開発を行った（清水、西川、永谷、中谷、八木原、盛、北村）。まず、種々の細胞ソースから間葉系細胞を採取し、間葉系細胞シートを作製した。これらの細胞シートから分泌される血管新

生関連サイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量を調べた。また、皮下脂肪由来間葉系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し、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、治療効果を検討した。また、新たな細胞シート技術として、多孔性高分子フィルムを作製した。このフィルムを培養基材として用いることで間葉系細胞を心筋細胞へと分化誘導し、心筋組織様シートを作製できるか否か検討した。

間葉系幹細胞+成長因子によるハイブリット再生治療として、強力な抗アポトーシス作用と心筋保護作用を持つインスリン様増殖因子(IGF-1)を細胞移植に併用し、両者の相加・相乗効果を検討した(宮武、永谷、北村)。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、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. 間葉系培養細胞の培養・保存技術の開発

我々はヒト骨髄より間葉系細胞を増殖し、この増殖間葉系細胞を細胞懸濁液として心再生に用いている。今回、ヒト骨髄より間葉系細胞を増殖し、phosphate buffered saline(PBS)中に懸濁状態とし、懸濁液中の間葉系細胞のviabilityを測定した(大串)。

## C. 研究結果

### 1. 自己間葉系細胞を用いた難治性循環器疾患に対する心筋血管再生療法の臨床応用

難治性心不全患者11人、重症狭心症患者2人を臨床試験にエントリーし、難治性慢性心不全患者8人、重症狭心症患者2人に対して間葉系幹細胞移植を行った。細胞移植が施行できなかった3

例の内訳は、細胞増殖不良による中止1例、細胞移植待機時に急性腸炎発症1例、術前カテーテル検査や骨髄穿刺後の心不全増悪による中止1例であった。心不全患者に対してはカテーテルを用いて心内膜より約40ヵ所に細胞移植を行った(北村、永谷、清水、山岸、宮武)。細胞移植2ヵ月後の評価では左室駆出率の有意な改善が得られた。また、細胞移植後の安全性に関しては、細胞移植2・6・12ヵ月後に心臓CTや24時間心電図らを行ったが、致死的不整脈の増悪や心内骨形成らは認められなかった。1例の心不全患者において細胞移植1ヵ月後に肺炎を起こしたが、細胞移植との因果関係はないと安全委員会で判断された。また狭心症患者に対しては冠動脈バイパス術時に心外膜より間葉系幹細胞移植を行った。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(北村、小林、中谷)。

### 2. 間葉系細胞+細胞シート、成長因子によるハイブリット再生治療の開発

温度応答性培養皿から脱着した子宮内膜由来間葉系細胞シートは、脱着前の細胞シートに比べて4倍近いVEGFの産生が認められた。また骨髄由来間葉系細胞シートは、子宮内膜由来間葉系細胞シートに比べてVEGFの分泌量は若干低いものの、HGFとbFGFの分泌量は高かった。今回の結果は、同じ間葉系細胞シートでも由来する組織によりサイトカイン分泌量が異なり、また同じ細胞シートでも培養方法を変えることによりサイトカイン産生を増強できる事を示している。これらはより効果的な細胞シートの作製・移植法につながるものと思われる。

単層の皮下脂肪由来間葉系細胞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。また現在、大動物（ブタ）を使用した前臨床試験を施行し、脂肪組織由来の単層性間葉系細胞シートの有効性と安全性の検討を開始した。

また、新たな細胞シートとしてポリε-カプロラクトンと両親媒性ポリマーのブレンド溶液を用いて延伸多孔性フィルムを開発した。この多孔性薄膜を一軸延伸し、ライン状パターンを付与した細胞培養基材を作製した。パターン化培養基材を用い、ヒト骨髄間葉系細胞（hMSC）の培養を行ったところ、hMSCはパターンに沿って配向し、かつ高密度な細胞組織シートを得ることに成功した。さらに、分化誘導培地中でhMSCを培養することで、z帯を示す筋原繊維が発現することを見出した。

細胞移植+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. 間葉系培養細胞の培養・保存技術の開発

時間の経過とともにviabilityは低下する傾向にあったが6時間たった時点でも4度ならびに24度では約85%のviabilityを保ち、24時間の時点でも4度では約80%であった。また、24時間4度の状態では表面抗原のパターンに変化を認めなかった。以上より、4度の条件では間葉系細胞はPBS中でviabilityを保つことができ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療法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有効性を確認した。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。また心筋梗塞症の新たな治療として間葉系細胞+温度感応性細胞シート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（Miyahara, et al Nat Med 2006;12:456-65）。一層の間葉系細胞を心筋梗塞部位に移植することで血管を豊富に含んだ厚みのある組織をつくることに成功し、また心機能の改善や心筋リモデリングの抑制効果を確認した。また、間葉系細胞+成長因子（IGF-1）によるハイブリット再生治療として、強力な抗アポトーシス作用と心筋保護作用を持つIGF-1を細胞移植に併用し、両者の相加・相乗効果を確認した。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。慢性心不全患者を対象とした臨床試験では、骨髄間葉系細胞移植の安全性と有効性を確認した。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. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and

- Mononuclear Cells. Stem Cells. 2007 (in press)
2. Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. Tissue Eng. 2007 (in press)
  3. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. J Mol Cell Cardiol. 2007; 42: 88-97.
  4. 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 myocardial infarction. Nat Med. 2006; 12: 459-465.

## 2. 学会発表

- ①永谷憲歳：骨髄間葉系細胞移植による心不全治療. 第6回日本再生医療学会. パシフィコ横浜(横浜市)、3月14日、2007年
- ②永谷憲歳：脂肪組織・胎児付属物由来間葉系細胞を用いた心血管保護再生治療. 第6回日本再生医療学会. パシフィコ横浜(横浜市)、3月14日、2007年

## 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

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、左室駆出率は有意に増加し、血中BNP濃度は低下した。これらの結果より、細胞移植により左室機能の改善が得られることが明らかとなった。また、細胞移植による急性期と慢性期の安全性が確認された。

### 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た。本治療の安全性と有効性を検討するためにパイロット臨床試験を行った。

### 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、 $\beta$ 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 15-20mL と自己末梢血 400-600mL 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  $\alpha$  MEM メデイ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：NOGA システムと注入カテーテルを用いて心内膜側より心筋内約 40カ所に間葉系幹細胞を移植した。

4) 安全性と有効性の評価：急性期の安全性として、細胞移植時の致死的不整脈誘発や心筋穿孔の有無を調べた。また、慢性期の安全性としては、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 を施行し、致死的不整脈の有無や心内骨化の有無を検討した。有効性に関しては、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。また、血中 BNP 濃度を経時的に測定した。

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難治性心不全患者11人を臨床試験にエントリーし、難治性慢性心不全患者8人(拡張型心筋症5例と虚血性心筋症3例)に対して間葉系幹細胞移植を行った。細胞移植が施行できなかった3例の内訳は、細胞増殖不良による中止1例、細胞移植待機時に急性腸炎発症1例、術前カテーテル検査や骨髄穿刺後の心不全増悪による中止1例であった。

2) 安全性:細胞移植時の致死的不整脈誘発や心筋穿孔は全例で起らなかった。細胞移植2・6・12ヵ月後に心臓CTや24時間心電図らを行ったが、致死的不整脈の増悪や心内骨形成らは認められなかった。1例の心不全患者において細胞移植1ヵ月後に肺炎を起こしたが、細胞移植との因果関係はないと安全委員会で判断された。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:細胞移植2ヵ月後の評価では左室駆出率の有意な改善( $23.9 \pm 2.8\%$ から $27.8 \pm 2.7\%$ ,  $p < 0.05$ )が得られた。また、心不全の指標である血漿BNP濃度は、細胞移植により有意に低下した( $265 \pm 66$  pg/mlから $184 \pm 61$  pg/ml,  $p < 0.05$ )。細胞移植後6ヵ月の血漿BNPは8人中6人において持続低下していた。

### 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安全性と有効性を確認した。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。また、骨髄間葉系細胞はVEGFやHGFらの血管新生因子・アポトーシス抑制因子・線維化抑制因子を分泌し、パラクライン作用を発揮することも期待できる。今回の我々の臨床試験により、骨髄間葉系細胞移植は拡張型心筋症などの難治性心不全に対する新たな治療法となりうる可能性が示唆された。

### E. 結論

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い、細胞移植の安全性を確認した。また、細胞移植により左室機能の改善が得られることが明らかとなった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells. *Stem Cells*. 2007 (in press)

2. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42: 88-97.

3. Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;

349: 1242-1249.

4. 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 myocardial infarction. Nat Med. 2006; 12: 459-465.

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

## 骨髄由来間葉系幹細胞と骨髄単核球の遺伝子発現解析

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

**研究要旨** 心筋血管再生療法の新たな細胞治療ソースとして、骨髄間葉系幹細胞 (MSC) が注目されてきている。我々は、すでに臨床応用されている骨髄単核球細胞 (MNC) との遺伝子発現の差異を網羅的に解析し、組織再生における役割の違いを検討した。MSC は発生や形態形成、細胞増殖に関与する遺伝子を多く発現していたのに対し、MNC は炎症に関与している遺伝子を多く発現していた。低酸素下においても、MSC は主に増殖因子、MNC は炎症性サイトカインの発現が誘導された。したがって、MSC は MNC とは異なった機序で組織再生に寄与していると考えられた。

### A. 研究目的

心筋血管再生に対する細胞治療のソースとして、骨髄単核球細胞 (MNC) が用いられるようになってきた。一方、骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は強い増殖能と多分化能を持ち、新たな再生医療材料として注目されている。我々は組織再生における細胞の役割の違いを明らかにするために、これらの細胞の遺伝子発現の差異を検討した。

### B. 研究方法

ラット骨髄単核球および骨髄間葉系幹細胞を正酸素下 (20% O<sub>2</sub>) および低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) で 24 時間培養し、total RNA を抽出してマイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した。また、分泌タンパクをコードする遺伝子については定量的 PCR により経時的および低酸素の程度に応じた発現の変化を検討した。

### C. 研究結果

正酸素状態では、MSC で 2232 個 (7.2%)、MNC で 2193 個 (7.1%) の遺伝子が優位に (3 倍以上) 強発現していた。MSC では発生 (transgelin、short stature homeobox-2 など) や形態形成 (BMP-2、TGF-β など)、細胞増殖 (connective tissue growth factor、PDGF-A など)、細胞接着 (NCAM-1、cadherin-11 など) に関与する遺伝子が多く発現しており、一方 MNC では炎症反応や遊走に関与す

る遺伝子が多く発現していた。低酸素状態では、MSC で 135 個 (0.44%)、MNC で 49 個 (0.16%) の遺伝子の発現が誘導された。その中で分泌タンパクに着目すると adrenomedullin や VEGF-A、MIF は MSC と MNC の両者に共通して発現が誘導されていたが、MSC では VEGF-D や PlGF、MMP-9、pre-B-cell colony enhancing factor-1、HB-EGF といった増殖因子の発現が上昇していたのに対し、MNC では CXCL2 や IL-1α といった炎症性サイトカインの発現が上昇していた (図)。

また、これら低酸素で発現誘導される遺伝子は

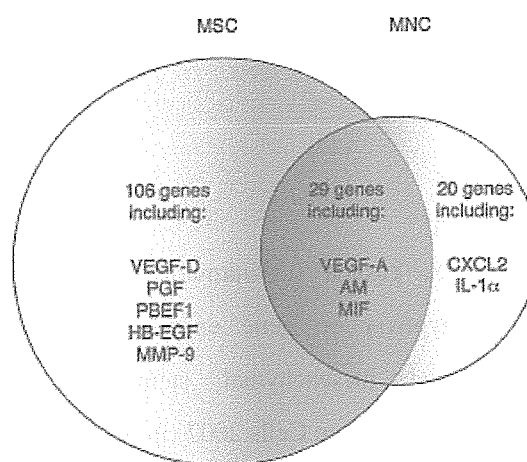


図: 低酸素により発現誘導された遺伝子

低酸素の程度に応じて発現が上昇していた。さら

に時間的経過を観察すると、MNCでは多くの遺伝子の発現が低酸素刺激開始6時間以内にピークに達したのに対し、MSCでは多くが24時間後にピークに達した。

#### D. 考察

MSCはMNCの亜分画であり、骨髄中に占める割合は約0.001%であるが、多分化能を有し増殖能が高い。一方MNCはリンパ球や単球を多く含む多様な細胞の集団であり、増殖能が低く幹細胞/前駆細胞の割合も少ないが、血管再生作用を有することが知られている。最近ではこれらの細胞が特異的な細胞に分化するのみならず、パラクライン効果により組織保護や血管新生をもたらすと考えられているが、詳細な機序は明らかになっていない。我々はこれらの遺伝子発現の差異を網羅的に解析し、MSCが発生や形態形成、増殖に関与する遺伝子を多く発現しているのに対し、MNCは主に炎症に関与する遺伝子を発現していたことから、両者の組織再生における役割が大きく異なると考えられた。

#### E. 結論

MSCとMNCでは正酸素および低酸素状態での遺伝子発現が大きく異なっていた。したがって、虚血状態に陥った組織において、MSCとMNCは異なった機序で心筋血管再生に関与することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells* 2007 (in press).

2) Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, kangawa K, Tabata Y.

Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improved cardiac function in

rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue Eng.* 2007 (in press).

3) Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S.

Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangitis obliterans. *Circulation.* 2006; 114(24):2679-84.

4) Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *Journal Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(1): 88-97.

#### 2. 学会発表

大西俊介、永谷憲歳、安田剛、北村惣一郎  
骨髄間葉系細胞と骨髄単核球の遺伝子発現の差異の検討

第10回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
2006年11月、福井

#### 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

なし。

## 間葉系幹細胞を用いた心血管再生療法の基礎及び臨床研究

分担研究者 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

研究要旨: 我々はヒト骨髄より間葉系細胞を増殖し、この増殖間葉系細胞を細胞懸濁液としたのちに心不全の心筋内への移植治療技術開発を国立循環器病センターとともにこなっている。この点において重要なのは懸濁液中の間葉系細胞の viability がどの程度かの疑問がある。今回、ヒト骨髄より間葉系細胞を増殖し、phosphate buffered saline(PBS)中に懸濁状態とし、懸濁液中の間葉系細胞の viability を測定した。懸濁液の状態では4度、24度、37度の保温で24時間まで保温した。時間の経過とともに viability は低下する傾向にあったが6時間たった時点でも4度ならびに24度では約85%の viability を保ち、24時間の時点でも4度では約80%であった。また、24時間4度の状態では表面抗原のパターンに変化を認めなかった。以上より、患者骨髄から間葉系細胞を増殖ののちPBSの懸濁状態で4度の条件では間葉系細胞の viability を保つことができ、この細胞懸濁液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、患者骨髄が我々産総研の cell processing center (CPC) に搬送され、国立循環器病センターの医師の責任のもとに、その医師とともに間葉系細胞を骨髄から増殖させている。その増殖細胞は再度国立循環器病センターに搬送されるが、採取ならびに搬送時間に約3時間を要している。この間の細胞の viability が良好であるのは確認しているが、3時間以上の viability についての詳細は不明である。もし、viability が長時間にわたり保つことが可能なら距離がはなれた医療機関においても輸送が可能となり、間葉系細胞を用いて循環器再生治療を必要とする多数の患者に有用な情報となる。

昨年度の結果によりマイナス80度保存されたヒト間葉系細胞は再度解凍しても細胞の表面抗原の発現ならびに増殖能が良好であることを確認している。そこで、18年度は冷凍保存されているヒト間葉系細胞を解凍後PBSに懸濁状態として、種々温度下での viability を測定した。

### B. 研究方法

#### 間葉系細胞の調整

骨髄をヘパリンと混合したリン酸緩衝液中に採取する。それを、当施設CPCの中へ搬送する。この骨髄液を遠心すると、血漿層、有核細胞層と血球層の三層に分離出来る。血漿を除去した残りの部分を、あらかじめ調製しておいた、患者本人の血清15%と抗生剤を含む液体培地と混合し、フラスコに播種する。2-3日後には線維芽細胞様細胞が赤血球の間に接着していることが観察できる。1週間に3回、培地交換する間に、浮遊している赤血球は取り除かれ、10日前後で接着細胞はフラスコの底一面にまで増殖する。この細胞群が間葉系細胞であり、幹細胞を含んでいる。約  $2.5-6.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になった段階で、0.05% trypsin/0.53 mM EDTA (Invitrogen Corp.)処理をおこない、 $5 \times 10^5$  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

### 冷凍細胞の解凍と細胞懸濁液調整

冷凍保存されたヒト間葉系細胞を解凍して  $5 \times 10^5$  cells の細胞を直径 9 cm の培養皿に播種して、再度培養をおこなった。約 7 日で培養細胞は confluent となる。この細胞をトリプシン処理により剥離して  $1 \times 10^6$  cells/mL の濃度で PBS 中に懸濁した。この懸濁液を 4 度、24 度、37 度の保温で 24 時間まで保温した。これらの状態におかれた細胞の細胞表面抗原分析ならびに viability の測定をおこなった。

使用した抗体は以下のとおりである。

CD13, CD34, CD45 (CALTAG Laboratories)、コントロールとして、Mouse immunoglobulin G (IgG) (Beckman Coulter, Inc.) を用いた。

### 細胞生存(viability)測定：

NucleoCounter (ChemoMetec) を用いて Cell viability (細胞生存率) を測定した。培養液で 10 倍に薄め、遠心ののち 5 ml 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

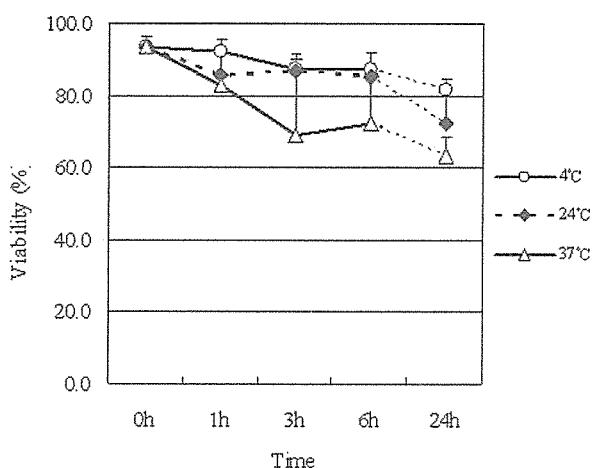


図 1

図 1 に見られるように、時間の経過とともに

viability は低下する傾向にあったが 6 時間たった時点でも 4 度ならびに 24 度では約 85% の viability を保ち、24 時間の時点でも 4 度では約 80% であった。この viability は NucleoCounter (ChemoMetec) を用いての測定である。図 2 に見られるように LIVE/DEAD 染色においてもこの良好な viability が保たれることが判明した。

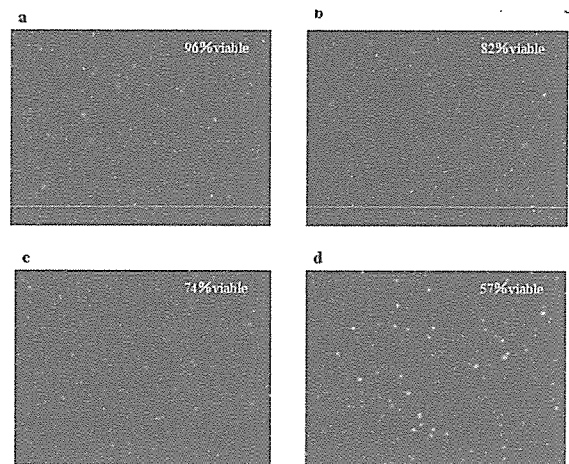


図 2 LIVE/DEAD 染色

(a: 直ちに測定, b: 24hr4度, c: 24hr24度, d: 24hr38度)

なお、これら図 1, 2 の結果より、4 度での懸濁液の状態にするのが良好な viability を保つことが判明し、培養中の条件である 38 度では PBS 中で多数の細胞が viability を失う結果となった。

図 3 にみられるように細胞懸濁液から回収した細胞は 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 CD13 はポジティブであった。また、これらの細胞表面抗原のパターンは 2 次培養をおこなった直後の細胞も 4 度で 24 時間たった細胞のパターンは両者とも同様のパターンをしめし、4 度では 24 時間 PBS 中での保存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、図 4 にみられるように、この懸濁状態の細胞の分化能も計測したが、4 度では良好な分化度を保つことがあきらかになった。

なお、心再生において心筋内の局所ではなく血管内への間葉系細胞の投与による治療もかんがえられるが、ラットの肝障害モデルにおいて、上記と同様に PBS に懸濁したラット間葉系細胞は

viabilityを保ち、肝実質に取り込まれることが判明し、血管内投与により心筋内にもとりこまれることが想定された。

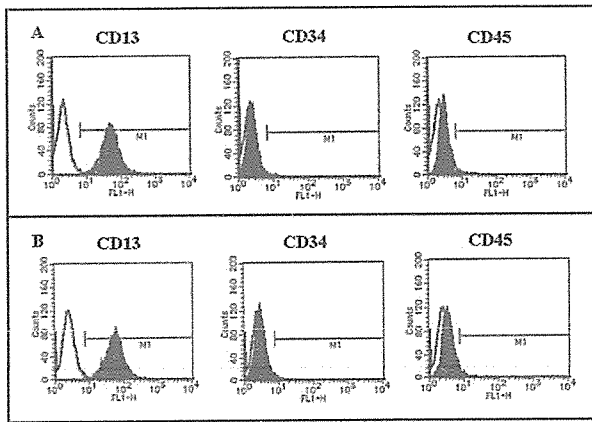


図3 FACS解析

上段は間葉系細胞を培養皿より剥離直後に測定し、下段は4度で24時間保存した細胞を測定した。

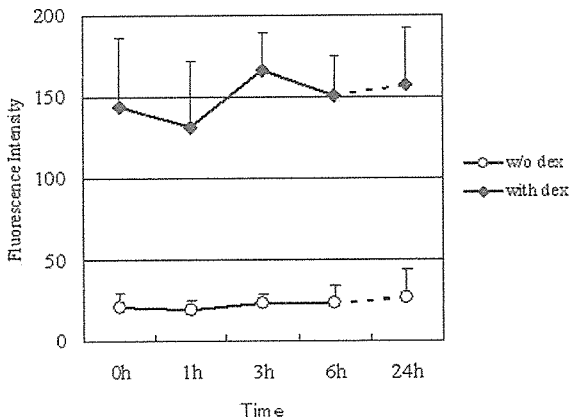


図4 分化度(fluorescence)

上段は分化誘導培地での培養、下段は通常の培地での培養

#### D. 考察

以上の結果より、ヒト間葉系細胞は培養皿よりトリプシン等により剥離後 PBS の懸濁状態において長時間にわたって viability が良好であることが確認された。なお、この良好な viability を保つには 4 度での保存が必要であり、培養中の 38 度より低温での保存が有効である。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、さらにこの細胞は懸濁液中で約 24 時間は安定であり、培養された細胞が良好な状態で離れた医療施設まで搬送可能であることが示唆された。

#### 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 Muraki K, Hirose M, Kotobuki N, Kato Y, Machida H, Takakura Y, Ohgushi H. Assessment of viability and osteogenic ability of human mesenchymal stem cells after being stored in suspension for clinical transplantation. Tissue Eng. 2006 Jun;12(6):1711-9

##### 2. 学会発表

- ① 日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006/12/6 名古屋市) 間葉系幹細胞を用いた再生医療の実際 (骨、軟骨、血管再生) 大串 始
- ② 第 85 回近畿血液学地方会 (2006.6/24, 神戸市) 幹細胞を用いた再生医療の実際 (シンポジウム) 大串 始
- ③ バイオテクノロジー医工融合講座 (2006.11/19, 神戸大学) 間葉系細胞を用いた再生医療 大串 始

#### 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

## 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

研究要旨 重症下肢虚血症例に対する「末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法」を骨髄単核球細胞移植不応例を含む 3 例に試行し、良好な治療結果を得た。治療前後における血管数の改善と、臨床所見との相関はなく、本療法の作用機序として血管新生以外の要因が関与していると推察された。

### A. 研究目的

本研究の目的は、末梢血単核球移植とアドレノメデュリン投与による低侵襲な血管新生療法を開発し、病院設置型微小血管造影装置による微小新生血管の評価を行うことである。

### B. 研究方法

血行再建術が困難な Fontaine III 度または IV 度の末梢動脈閉塞症患者を対象とし、末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法を行う。アフエレーシスにより末梢血単核球(50ml)を採取し、0.5ml ずつ虚血肢に筋注後、アドレノメデュリンを  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で持続皮下注した。

病院設置型微小血管造影装置は、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、 $50 \mu\text{m}$  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）

倫理委員会の審議・承認を得、本検査の合併症・効能・不利益・利益を説明し、本人及び家族の同意の元に施行した。

### C. 研究結果

末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法を 3 例に施行した。1 例は骨髄単核球細胞移植の無効例であった。全例で難治性皮膚潰瘍や安静時疼痛の消失を得、最長 2.5 年のフォローアップにおいて潰瘍の再燃を認めない。重篤な有害事象はなかった。

一般の血管造影は  $200 \mu\text{m}$  前後の解像度であるが、病院設置型微小血管造影装置は  $50 \mu\text{m}$  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 8 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  $100 \mu\text{m}$  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。血管新生療法後に明らかに微小血管数の増加が認められた症例は 3 割に過ぎなかった。

### D. 考察

重症末梢動脈閉塞症に対する血管新生療法として、骨髄単核球移植の有効性が報告されているが、大量の骨髄液採取など、その侵襲性は決して低くない。末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法は、骨髄単核球細胞移植に代わる新しい低侵襲血管新生療法として期待される。特に、今回施行した 3 例中 1 例は骨髄単核球移植の無効例であり、骨髄単核球細胞移植無効例に対する救済療法としての応用も期待される。

病院設置型微小血管造影装置は、通常の血管造影と同等の安全性を有している。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である。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、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た。



## E. 結論

難知性末梢動脈閉塞症に対する末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法は低侵襲かつ有用性の高い治療法である。微小血管造影装置は、ヒトの微小新生血管の評価を行うに十分な安全性と血管描出能とを有している。血管新生療法後に明らかな血管数の増加が認められる症例は全体の3割程度であり、臨床所見の改善に、血管新生以外の作用機序が関与している可能性が少なくないと思われた

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① 竹下聡: VEGF/VEGF-E (末梢動脈疾患), 細胞増殖因子と再生医療 (松本邦夫・田畑泰彦編, メディカルレビュー社,大阪):304, 2006
- ② Miyamoto K, Nishigami, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S: Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans, *Circulation* 114 : 2679, 2006
- ③ 竹下聡、閉塞性動脈硬化症、循環器疾患の早期発見の最前線、*モダンフィジシャン* 26:782,2006
- ④ 竹下聡、知久正明: 微小血管造影-新生血管描出への応用- *Cardiac Practice* 17:387-390,2006

### 2. 学会発表

- ① Kamiya C: Limited long-term efficacy of endovascular intervention in patients with superficial

femoral artery lesions (第70回日本循環器病学会総会・学術集会, 2006年3月、名古屋)

- ② Miyamoto K: Long-term results of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for patients with thromboangiitis obliterans (第70回日本循環器病学会総会・学術集会, 2006年3月、名古屋)

- ③ 石橋耕平, 血管超音波検査による下腿動脈病変の診断能に関する検討 (第54回日本心臓病学会学術集会, 2006年9月、鹿児島)

- ④ 坂本伸吾: 間歇性跛行を伴う閉塞性動脈硬化患者に対する運動療法の長期予後 (第47回日本脈管学会総会, 2006年10月、神戸)

- ⑤ Ishibashi K: Accuracy of duplex ultrasound examination for detecting below knee artery lesions (American Heart Association, Scientific Sessions 2006, Nov 12, 2006, Chicago, Illinois)

## 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

坏宏一 国立循環器病センター 心臓血管内科

横山直之 国立循環器病センター 心臓血管内科

田守唯一 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

## 間葉系幹細胞シートにおける血管新生関連サイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量の比較

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

今回、間葉系幹細胞シートにおける血管新生関連サイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量を比較検討した。温度応答性培養皿から脱着した子宮内膜由来間葉系幹細胞シートは、脱着前の細胞シートに比べて4倍近い VEGF の産生が認められた。また骨髄由来間葉系幹細胞シートは、子宮内膜由来間葉系幹細胞シートに比べて VEGF の分泌量は若干低いものの、HGF と bFGF の分泌量は高かった。今回の結果は、同じ間葉系幹細胞シートでも由来する組織によりサイトカイン分泌量が異なり、また同じ細胞シートでも培養方法を変えることによりサイトカイン産生を増強できる事を示している。今後、これらの結果と *in vivo* 移植実験の結果とを比較検討し、より効果的な細胞シート作製・移植法につなげていきたいと考えている。

### A. 研究目的

我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いた様々な細胞シートの作製に成功している。細胞外マトリクスが無傷で存在する細胞シートは、支持体を用いることなく積層化が可能である。温度応答性培養皿から回収した間葉系幹細胞シートあるいは骨格筋芽細胞シートの心筋梗塞動物モデルへの移植実験では、心機能の改善が認められた。間葉系幹細胞シートから血管新生関連あるいはアポトーシスを抑制するサイトカイン（VEGF、HGF）が多く分泌されていることが報告されている。また骨格筋芽細胞シートの移植部分において、これらのサイトカイン（VEGF、HGF、SDF-1）RNA の高い発現が認められることも報告されている。細胞シートの移植による心機能改善効果は、移植細胞シートから産生されるこれらのサイトカインに起因していると考えられている。すなわちこれらのサイトカイン産生の高い細胞シート

あるいは増強した細胞シートを移植することにより、治療効果はより高まるものと考えられる。そこで今回、間葉系幹細胞シートにおけるこれらのサイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量を比較検討し、より効果的な移植法を開発する事を目指し実験を行った。

### B. 研究方法

1. 細胞シートの調製：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞またはヒト子宮内膜由来間葉系幹細胞を温度応答性培養皿に播種した。そして4日間培養後、培養皿を 20℃で低温処理することによりシート状に細胞を脱着させ、得られた細胞シートを以下の実験に用いた。
2. サイトカイン産生量・発現量の測定：回収した間葉系幹細胞シートを通常の培養皿に播種後、経時的に培養上清を回収し ELISA によりサイトカイン（VEGF、HGF、bFGF）の産生量を測定した。また同時に細胞内の RNA を抽出し、リアル

タイム RT-PCR 法によりサイトカイン RNA (VEGF、HGF、bFGF、Adrenomedullin、SDF-1) の発現量を測定した。

### C. 研究結果

1. 脱着前後の細胞シートから産生されるサイトカイン産生量の比較：最初に、ヒト子宮内膜由来間葉系幹細胞シートを脱着する前の細胞と脱着後の細胞シートの VEGF の分泌量を測定した。脱着前の細胞シートから分泌される VEGF 量は  $3.8 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$  に対し、脱着後の細胞シートから分泌される VEGF 量は  $14.7 \pm 1.3 \text{ ng/ml}$  であり、4 倍近く高かった。またリアルタイム RT-PCR 法を用い、VEGF の RNA の発現量を測定したところ、VEGF RNA の発現量も同様に脱着後の細胞シートで高かった。また脱着後の細胞シートを組織学的に観察すると数層の細胞から成り立っていた。

2. 各種間葉系幹細胞のサイトカイン分泌量の比較：脱着後の子宮内膜由来間葉系幹細胞シートと骨髄由来間葉系幹細胞シートの各種サイトカイン量の分泌量を比較した。まず VEGF 量は子宮内膜由来間葉系幹細胞では  $96 \pm 8 \text{ ng/ml}$  に対し、骨髄由来間葉系幹細胞では  $63 \pm 24 \text{ ng/ml}$  であり、子宮内膜由来間葉系幹細胞で若干高い傾向が認められた。一方、骨髄由来間葉系幹細胞シートの HGF 分泌量は  $2.3 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$  で、bFGF の分泌量は  $17 \pm 1 \text{ pg/ml}$  であるのに対し、子宮内膜間葉系幹細胞シートでは両者とも検出の限界以下であった。

### D. 考察および結論

今回、温度応答性培養皿から脱着した細胞シートの VEGF 分泌量は、培養皿から脱着される前の細胞シートに比べて 4 倍近く高かった。また RNA の発現レベルでも脱着後の細胞シートで高い発現量が確認された。培養皿から脱着した細胞シートは数層の細胞からなり、一方脱着前の細胞シートは単層である。これは 2 次元的な培養と 3

次元的な培養環境で遺伝子発現が異なり、また同じ細胞シートを用いても培養方法を変えることにより血管新生関連サイトカインの分泌量を増強できる事を示している。

今回、骨髄由来間葉系幹細胞シートは、子宮内膜由来間葉系幹細胞シートに比べ VEGF 分泌量は若干低い、HGF、bFGF に関しては高い分泌量が認められた。すなわち、同じ間葉系幹細胞シートでも由来する組織により分泌されるサイトカインの種類と量が異なる事が示された。今後それぞれのサイトカインに関し RNA の発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて調べていくとともに、脂肪組織など別の組織に由来する間葉系幹細胞シートや他の細胞シートについても比較検討していくつもりである。さらに細胞シートの移植実験を行い、その治療効果と *in vitro* のサイトカイン産生実験の結果と比較検討することにより、より効果的な細胞シート作製法および移植法につながるものと思われる。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

①清水達也：心筋に対する再生医療。臨床看護 32 (8) : 1136-1143, 2006.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 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

原口裕次(東京女子医科大学 先端生命医科学研究所)

## 房室ブロックに対する間葉系幹細胞移植の効果

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 房室ブロックの原因として、房室結節-ヒス束における線維化、変性が最も多いとされている。間葉系幹細胞を完全房室ブロックモデルラットの房室結節周囲に直接注入したところ、房室伝導の改善を認めた。その機序として、間葉系幹細胞のパラクライン効果による房室結節周囲の線維化抑制が考えられた。間葉系幹細胞移植が房室ブロックに対する新たな治療法となる可能性がある。

### A. 研究目的

従来、症候性の完全房室ブロックに対しては永久ペースメーカー植込みが唯一の治療法であった。しかし、ペースメーカー治療は必ずしも患者の quality of life を改善するとはいえない。一方、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は多分化能を持ち、心筋血管再生療法の細胞ソースとして最近注目されている。そこで、MSC の注入による刺激伝導系の興奮伝播の改善効果を検討した。

### B. 研究方法

ラットの房室結節周囲にエタノールを注入し、完全房室ブロックモデルを作成した。モデル作成 5 日後に完全房室ブロックが維持されている持続性房室ブロック例の房室結節周囲に MSC ( $2 \times 10^6$  個) の注入を行った。移植後の心電図記録で房室伝導の改善度を確認し、14 日後に組織学的検査を行った。

### C. 研究結果

間葉系幹細胞の注入後14日間で、15例中5例に完全房室ブロックの1:1伝導への改善を認めた (図1)。組織学的検査では、房室結節内のコラーゲン線維の沈着が有意に抑制されていた (図2)。また、線維化促進因子である TGF- $\beta$  の発現が房室結節周囲の心筋組織において有意に抑制されていた。移植された MSC の一部は伝導系マーカーである NF160 や connexin-45 を発現していた。また培養実験において、MSC の培養上清は心線維芽細胞の増殖を抑制し、線維化抑制因子である

hepatocyte growth factor ( HGF ) や interleukin-10 ( IL-10 ) を多く分泌していた。

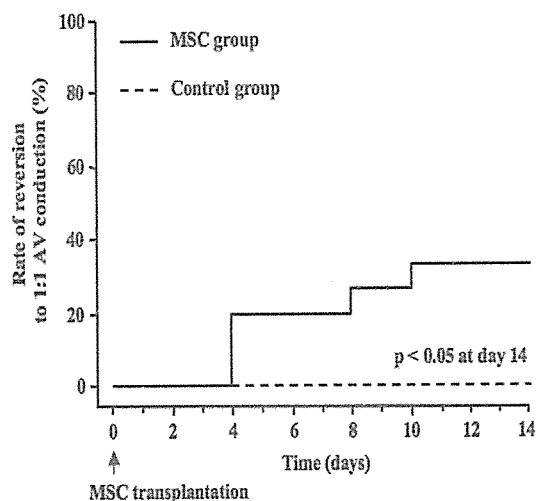


図1: MSC注入による完全房室ブロックの改善

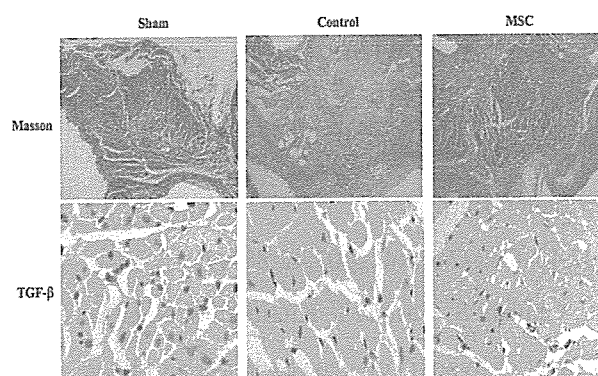


図2: 房室結節の線維化抑制  
(上段: Masson染色、下段: TGF- $\beta$ )