

200806006A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

「重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた
心筋・血管ハイブリッド組織シート移植治療の臨床研究開発」

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成21 (2009) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた心筋・血管ハイブリッド
組織シート移植治療の臨床研究開発
浅原 孝之（先端医療振興財団） 1

II. 分担研究報告書

1. 重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた心筋・血管ハイブリッド
組織シート移植治療の臨床研究開発
川本 篤彦（先端医療振興財団） 7
2. 重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた心筋・血管ハイブリッド
組織シート移植治療の臨床研究開発
澤 芳樹（大阪大学大学院医学系研究科） 11
3. 重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた心筋・血管ハイブリッド
組織シート移植治療の臨床研究開発
清水 達也（東京女子医科大学先端生命科学研究所） 17
4. 心筋・血管内皮ハイブリッド細胞シート作成を目的とした
心筋幹細胞及び血液幹細胞由来血管内皮前駆細胞の分化増幅法の確立
増田 治史（東海大学医学部） 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 23

I 総括研究報告書

重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた

心筋・血管ハイブリッド組織シート移植治療の臨床研究開発

主任研究者 浅原 孝之 先端医療振興財団先端医療センター 血管再生研究グループ グループリーダー

研究要旨

20年度研究として、臨床治療に応用できるヒト心筋幹細胞の分離・培養・品質管理法について基礎検討を重ね、シートの作成方法開発に着手した。

A. 研究目的

重症心不全の患者から心筋幹細胞を分離し、臨床応用できるレベルの培養システムを開発し、治療可能な細胞品質を有する心筋幹細胞を同定するための品質管理システムを構築する。この過程で作製された心筋幹細胞を利用して、シート作製およびその評価を開始する。

B. 研究方法

1. ヒト心筋幹細胞の分離・培養技術の確立(先端医療センター・浅原・川本、大阪大学・澤、東海大学・増田)

共同研究機関である大阪大学医学部附属病院心臓血管外科で開心術を受けた重症心不全患者から、術中に心臓組織を採取した。採取した心臓組織を大阪大学から先端医療センターに運搬し、米国ハーバード大学の Piero Anversa 教授グループの開発した方法に準じて、心筋幹細胞の分離・培養を試みた。分離・培養法の確立にあたっては主として、以下の検討を行った。

- 1) 培養過程で必須の c-kit 陽性細胞分離機器におけるカラム流量設定プログラムの最適化
- 2) 培養細胞の品質確認のためのフローサイトメトリ (FACS) 検査における最適な抗ヒト c-kit

抗体の選定

- 3) 培養に用いる仔牛血清のロットチェック
- 4) 培養継代に伴う細胞増殖能、c-kit 陽性率等の推移の確認
- 5) 播種細胞密度、血清非働化の有無、継代のタイミングなどの培養条件の検討

2. ヒト心筋幹細胞の分化培養の開発

- 1) ヒト心筋幹細胞由来血管分化の検討(東海大学・増田)

心筋幹細胞を bFGF, erythropoietin 添加 Ham's F12 培地を用いて、HYCLONE 社、VITROMEX 社製 FBS にて血管内皮系細胞分化能を FACS 及び qPCR 法にて検討

- 2) 骨髄由来血管内皮前駆細胞の応用;
臍帯血由来 CD133+細胞を採取し、8GF(SCF,TPO, SDF, angiopoietin-1, IGF, EGF, VEGF, IL6)添加 EPC 分化増幅培養を行い、EPC colony assay にて EPC 分化能を検討。

3. マウス心筋幹細胞シートの治療効果判定(女子医・清水)

マウス心筋幹細胞を Scd1 陽性細胞として採取し、ヒト心筋幹細胞シート治療のシュミレーションとして治療効果を確認。

C. 研究結果

1. ヒト心筋幹細胞の分離・培養技術の確立

1) c-kit 陽性細胞分離におけるカラム流量設定

posseld, posseld2, posselds の3種類のカラム流量設定プログラムのなかで、posselds が最も生細胞の回収率および c-kit 陽性細胞の純度が高く、かつ分離後の細胞増殖効率も良好で、posselds を採用することに決定した。

2) FACS 用に最適な抗ヒト c-kit 抗体の選定

培養細胞の品質確認のための FACS 検査を以下の2種類のクローンの抗ヒト c-kit 抗体 (YB5.B8 および A3C6E2) で実施したところ、後者で明らかに感度が優れていることが判明した。今後の実験で A3C6E2 を使用することに決定した。

3) 培養に用いる仔牛血清のロットチェック

臨床可能な製品のうち、増殖効率、c-kit 陽性率の双方で最も優れたロット (Hyclone 社ニュージールランド産#DQL0228) を選定した。

4) 培養継代に伴う細胞増殖能、c-kit 陽性率等の推移

複数の患者心臓組織から心筋幹細胞の分離・培養を試みた。その結果、P6 までは良好な増殖 (population doubling time (PDT) が2日以内) を示した。c-kit 陽性率は、個体差はあるが P4-P8 で 40-70% の高率を維持していた。これらの成績は、Anversa 教授グループの報告に匹敵するものであった。

5) 播種細胞密度、血清非働化の有無、継代のタイミングなどの培養条件の検討

播種は 310 cells/cm² 以下、血清非働化なし、が適切培養条件であった。

2. ヒト心筋幹細胞の分化培養の開発

1) ヒト心筋幹細胞由来血管分化の検討

HYCLONE 社製 FBS に比較して VITROMEX 社製 FBS では、CD31(内皮系マーカー)の発現が FACS にて約 4 倍上昇した。また qPCR では KDR

及び VE-cadherin の発現がいずれも約 2 倍に上昇した。VITROMEX 社製 FBS 添加培地の内皮系分化能が高かった。

2) 骨髄由来血管内皮前駆細胞の応用

8GF から各 1 成長因子削除培地による EPC 増幅培養による EPC 分化能を検討したところ、8GF から angiopoietin-1 削除培養条件において、最も高い分化能を示した (他の 1.7-6 倍)。

3. マウス心筋幹細胞シートの治療効果判定 (女子医・清水)

マウス心筋幹細胞 (CPC) シート群では、移植 3 週目以降に左室拡張末期径、左室収縮末期径の拡大抑制及び左室短縮率の改善効果を示し、移植 4 週間目では、その差は他の 2 群に比して有意であった。Masson trichrome 染色にて、梗塞後の線維化を評価すると、CPC シート移植群では、非移植群に比して有意に線維化の割合の減少効果を認めた。CPC シート移植群では、移植 4 週目で非移植群、脂肪間葉系細胞シート移植群に比して有意に血管数の増加を認めた。

次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、CPC と脂肪間葉系細胞の梗塞心への生着を評価した。移植 4 週目では、多くの RFP 陽性の CPC が障害部において確認された。Western blot にて、移植後の細胞の生着率を定量化すると、CPC シート移植群では、移植時の約 2 割の細胞が生着し、その約 30% の細胞が、明瞭なサルコメア構造を呈し、かつ α -アクチニンを発現しており、他の 30% の細胞は、管腔構造を呈しており、血管への分化も確認された。

D. 考察

まず、臨床応用レベルの心筋幹細胞の分離・培養手技を確立することが出来た。P6 以前の細胞の再生細胞活性が利用可能と考えた。重症心不全患者の心臓組織からでも効率よく幹細胞が得られることを確認した。

採取ヒト心筋幹細胞から心筋細胞と共に血管内皮細胞への効率的な分化誘導が可能であることが示された。骨髄由来血管内皮前駆細胞の効率的誘導が可能であることも確認され、心筋幹細胞シートへの応用も考えられた。

マウス心筋前駆細胞シート移植実験では、心臓のリモデリングの抑制及び心収縮力の改善が確認された。心筋前駆細胞は、対照として用いた脂肪間葉系細胞に比し、移植後の高い生着率を認め、結果心機能改善効果を示した。また、細胞移植と比べてシート移植の有用性も確認された。定量的評価より、今回の心筋前駆細胞シート移植によって創生された心筋細胞は、マウス心臓全体の約5%に相当すると考えられ、心収縮力改善の一因と考えられた。

E. 結論

臨床応用可能は心筋幹細胞の分離・培養・品質管理のシステムを構築した。この細胞は心筋細胞および血管細胞に分化し、細胞シートを用いた細胞移植法により心筋及び血管再生効果により、心筋梗塞後心機能障害を改善す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

Kwon SM, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Hozumi K, Iwaguro H, Masuda H, Kawamoto A, Asahara T. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization. *Circulation*. 2008; 118(2):157-65.

Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Kwon SM, Miwa M, Kurosaka M, Asahara T.

Local Delivery of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34-Positive Progenitor Cells Using Bioscaffold for Modality of Unhealing Bone Fracture. *Stem Cells*. 2008; 26(6): 1395-405.

Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, Kubo S, Kawamoto A, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R.

Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. 2008, 26(3):819-30.

Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T.

Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol*. 2008; 215(1):234-42.

Kawamoto A, Losordo DW.

Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18(1):33-37.

Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, Kawamoto A, Shoji T, Miwa M, Asahara T, Kurosaka M.

Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*. 2008 Bone. 2008; 43(3):434-9.

Eguchi M, Masuda H, Kwon S, Asahara T et al. Lesion-targeted Thrombopoietin Potentiates Vasculogenesis by Enhancing Motility and Enlivenment of Transplanted

Endothelial Progenitor Cells via Activation of Akt/mTOR/p70S6kinase Signaling Pathway. *JMCC*. 2008;45:661-669.

2. 学会発表

Matsuura et al. Adult cardiac progenitor cells promote angiogenesis and cardioprotection through their secreted sVCAM-1. American Heart Association. Nov. 2008

川本篤彦: 慢性重症下肢虚血患者に対する血管幹細胞移植治療: 医師主導医療機器治験による標準治療化の試み

SYMPOSIUM 再生医療—ガイドラインの今
2008年10月22日, 神戸.

Kawamoto A, Asahara T. : Vascular regeneration therapy by CD34+ cell transplantation in patients with critical limb ischemia.

The 40th Annual Scientific Meeting of the Japanese Atherosclerosis Society

Symposium 8: Therapeutic angiogenesis update
July 11, 2008. Tsukuba.

第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会プログラム・抄録集. 140.

川本篤彦, 浅原孝之.

血管内皮前駆細胞移植による心血管再生治療

第56回日本輸血・細胞治療学会総会

パネルディスカッション2 細胞治療の臨床成績向上に向けての課題

2008年4月26日, 福岡.

日本輸血細胞治療学会誌 (Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy). 2008; 54(2): 160.

川本篤彦

血管内皮前駆細胞移植による心血管再生治療—現状と

将来展望

日本医工学治療学会 第24回学術大会

シンポジウム4 再生医療の最前線

2008年4月20日, 千葉.

医工学治療 (Therapeutics & Engineering). 2008; 20 Supplement: 84.

Horii M, Iwasaki H, Kwon SM, Kawamoto A, Oyamada A, Yokoyama A, Akimaru H, Akimaru E, Nishimura H, Suchiro S, Asahara T.

Lnk gene deficiency contributes to cardiac repair post myocardial infarction by enhancing regenerative capacity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and resident cardiac stem cells.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association. November 10, 2008. New Orleans, LA, USA.

Ii M, Nakahira A, Horii M, Akimaru H, Akimaru E, Yokoyama A, Iwasaki H, Kawamoto A, Asahara T.

Subacute timing of human CD34+ cell transplantation following acute myocardial infarction increases the therapeutic efficacy.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association. November 11, 2008. New Orleans, LA, USA.

Kawamoto A, Iwasaki H, Iwaguro H, Nakahira A, Oyamada A, Akimaru H, Carmeliet P, Asahara T.

Therapeutic neovascularization by catheter-based, intramyocardial gene transfer of naked DNA encoding human placental growth factor in swine chronic myocardial ischemia.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association. November 11, 2008. New Orleans, LA, USA.

Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T.

Transplantation of human unrestricted somatic stem cells from cord blood repairs myocardial infarction through pleiotropic mechanisms of cardiac myoangiogenesis. Scientific Sessions 2008, American Heart Association. November 11, 2008. New Orleans, LA, USA.

Kawamoto A, Iwasaki H, Iwaguro H, Nakahira A, Oyamada A, Carmeliet P, Asahara T.
Therapeutic neovascularization by intramuscular gene transfer of naked DNA encoding placental growth factor in swine chronic myocardial ischemia.
European Society of Cardiology Congress 2008.
August 31, 2008. Munich, Germany.

Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T.

Therapeutic potential of human unrestricted somatic stem cells from cord blood for concurrent cardiomyogenesis and vasculogenesis with functional regenerative recovery post myocardial infarction.

European Society of Cardiology Congress 2008.
September 3, 2008. Munich, Germany.

The American Heart Association (AHA), November 9, Poster presentation (Notch and vascular biology, first author), New Orleans, USA. Endothelial Specific Jagged-1/Notch Signal in Bone Marrow Niche Regulates Endothelial Progenitor Cell Development.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

Ⅱ 分担研究報告書

重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた
心筋・血管ハイブリッド組織シート移植治療の臨床研究開発

分担研究者 川本 篤彦 先端医療振興財団先端医療センター 血管再生研究グループ 上席研究員

研究要旨: 重症心不全患者の心臓組織から心筋幹細胞を分離・培養する基本技術を確立し、次年度からの in vivo 実験への準備を整えることができた。

A. 研究目的

重症心不全患者の心臓組織から心筋幹細胞を分離・培養する基本技術を確立すること。

B. 研究方法

1. 重症心不全患者からの心臓組織の採取

共同研究機関である大阪大学医学部附属病院心臓血管外科で開心術を受けた重症心不全患者から、術中に心臓組織を採取した。

(倫理面への配慮)

上記の心臓組織採取は、大阪大学の倫理審査委員会から実施の承認を得た後に、各患者から文書で同意を得たうえで実施した。

2. ヒト心筋幹細胞の分離・培養技術の確立

採取した心臓組織を大阪大学から先端医療センターに運搬し、米国ハーバード大学の Piero Anversa 教授グループの開発した方法に準じて、心筋幹細胞の分離・培養を試みた。分離・培養法の確立にあたっては主として、以下の検討を行った。

- 1) 培養過程で必須の c-kit 陽性細胞分離機器におけるカラム流量設定プログラムの最適化
- 2) 培養細胞の品質確認のためのフローサイトメトリー (FACS) 検査における最適な抗ヒト c-kit

抗体の選定

- 3) 培養に用いる仔牛血清のロットチェック
- 4) 培養継代に伴う細胞増殖能、c-kit 陽性率等の推移の確認

(倫理面への配慮)

心臓組織の運搬および先端医療センターにおける幹細胞培養実験については、大阪大学および先端医療センターの倫理審査委員会から承認を受けた。

C. 研究結果

1. c-kit 陽性細胞分離におけるカラム流量設定
心臓組織に collagenase 処理後に得られた細胞を培養し、PI の段階で AutoMACS を用いて c-kit 陽性細胞を分離 (positive selection) した。分離にあたっては、posseld、posseld2、posselds の3種類のカラム流量設定プログラムを用い、分離効率を比較した。その結果、posselds が最も生細胞の回収率および c-kit 陽性細胞の純度が高く、かつ分離後の細胞増殖効率も良好であった。以上より、posselds を採用することに決定した。

2. FACS 用に最適な抗ヒト c-kit 抗体の選定

培養細胞の品質確認のための FACS 検査を以下の2種類のクローンの抗ヒト c-kit 抗体 (YB5.B8 およ

び A3C6E2) で実施したところ、後者で明らかに感度が優れていることが判明した。このため、今後の実験で A3C6E2 を使用することに決定した。

3. 培養に用いる仔牛血清のロットチェック

将来の臨床適用を考慮して、スクレイパー伝播のリスクの低いオーストラリア、ニュージーランド産の仔牛血清を5ロット購入し、各ロットを用いた場合の細胞増殖効率と c-kit 陽性率を比較した。その結果、増殖効率、c-kit 陽性率の双方で最も優れたロット (Hyclone 社ニュージーランド産 #DQL0228) を選定した。

4. 培養継代に伴う細胞増殖能、c-kit 陽性率等の推移

上記のように最適化を進めた培養法を用いて、複数の患者心臓組織から心筋幹細胞の分離・培養を試みた。その結果、P6 までは良好な増殖 (population doubling time (PDT) が2日以内) を示したが、P7以降では PPD が著しく延長 (増殖速度が低下) することが判明した。また、c-kit 陽性率は、個体差はあるが P4-P8 で 40-70% の高率を維持していた。これらの成績は、Anversa 教授グループの報告に匹敵するものであった。

D. 考察

上記のように、心筋幹細胞の分離・培養手技を確立し、重症心不全患者の心臓組織からでも効率よく幹細胞が得られることを確認した。今後は増幅した幹細胞分画に対して、心筋細胞系列あるいは血管細胞系列への分化誘導技術の確立、シート培養技術の確立を目指す。さらに増幅細胞または分化誘導細胞を用いて心不全動物モデルへの移植実験も開始し、心筋幹細胞シート移植の安全性・有効性を検討する予定である。

E. 結論

重症心不全患者の心臓組織から効率よく心筋幹細胞分画を分離・培養する方法を確立した。この成果を基盤として心筋再生治療の有効性を高めるために、今後は cell processing 技術、移植技術の開発を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表 (主要)

Kwon SM, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Hozumi K, Iwaguro H, Masuda H, Kawamoto A, Asahara T. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization. *Circulation*. 2008; 118(2):157-65.

Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Kwon SM, Miwa M, Kurosaka M, Asahara T.

Local Delivery of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34-Positive Progenitor Cells Using Bioscaffold for Modality of Unhealing Bone Fracture. *Stem Cells*. 2008; 26(6): 1395-405.

Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, Kubo S, Kawamoto A, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R.

Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. 2008, 26(3):819-30.

Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T.

Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing.

J Cell Physiol. 2008; 215(1):234-42.

Kawamoto A, Losordo DW.

Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration.

Trends Cardiovasc Med. 2008;18(1):33-37.

Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, Kawamoto A, Shoji T, Miwa M, Asahara T, Kurosaka M.

Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing.

Bone. 2008 Bone. 2008; 43(3):434-9.

2. 学会発表 (主要)

川本篤彦

慢性重症下肢虚血患者に対する血管幹細胞移植治療: 医師主導医療機器治験による標準治療化の試み
SYMPOSIUM 再生医療—ガイドラインの今

2008年10月22日, 神戸.

Kawamoto A, Asahara T.

Vascular regeneration therapy by CD34+ cell transplantation in patients with critical limb ischemia.

The 40th Annual Scientific Meeting of the Japanese Atherosclerosis Society

Symposium 8: Therapeutic angiogenesis update
July 11, 2008, Tsukuba.

第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会プログラム・抄録集. 140.

川本篤彦, 浅原孝之.

血管内皮前駆細胞移植による心血管再生治療
第56回日本輸血・細胞治療学会総会

パネルディスカッション2 細胞治療の臨床成績向上に向けての課題

2008年4月26日, 福岡.

日本輸血細胞治療学会誌 (Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy). 2008; 54(2): 160.

川本篤彦

血管内皮前駆細胞移植による心血管再生治療—現状と将来展望

日本医工学治療学会 第24回学術大会

シンポジウム4 再生医療の最前線

2008年4月20日, 千葉.

医工学治療 (Therapeutics & Engineering). 2008; 20 Supplement: 84.

Hori M, Iwasaki H, Kwon SM, Kawamoto A, Oyamada A, Yokoyama A, Akimaru H, Akimaru E, Nishimura H, Suehiro S, Asahara T.

Lnk gene deficiency contributes to cardiac repair post myocardial infarction by enhancing regenerative capacity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and resident cardiac stem cells.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association.
November 10, 2008. New Orleans, LA, USA.

Li M, Nakahira A, Hori M, Akimaru H, Akimaru E, Yokoyama A, Iwasaki H, Kawamoto A, Asahara T.
Subacute timing of human CD34+ cell transplantation following acute myocardial infarction increases the therapeutic efficacy.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association.
November 11, 2008. New Orleans, LA, USA.

Kawamoto A, Iwasaki H, Iwaguro H, Nakahira A, Oyamada A, Akimaru H, Carmeliet P, Asahara T.
Therapeutic neovascularization by catheter-based,

intramyocardial gene transfer of naked DNA encoding human placental growth factor in swine chronic myocardial ischemia.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association. November 11, 2008. New Orleans, LA, USA.

Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T.

Transplantation of human unrestricted somatic stem cells from cord blood repairs myocardial infarction through pleiotropic mechanisms of cardiac myoangiogenesis.

Scientific Sessions 2008, American Heart Association. November 11, 2008. New Orleans, LA, USA.

Kawamoto A, Iwasaki H, Iwaguro H, Nakahira A, Oyamada A, Carmeliet P, Asahara T.

Therapeutic neovascularization by intramuscular gene transfer of naked DNA encoding placental growth factor in swine chronic myocardial ischemia.

European Society of Cardiology Congress 2008.

August 31, 2008. Munich, Germany.

Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T.

Therapeutic potential of human unrestricted somatic stem cells from cord blood for concurrent cardiomyogenesis and vasculogenesis with functional regenerative recovery post myocardial infarction.

European Society of Cardiology Congress 2008.

September 3, 2008. Munich, Germany.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた
心筋・血管ハイブリッド組織シート移植治療の臨床研究開発

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院 医学系研究科 心臓血管外科学 教授

研究要旨: 本研究の重要な要素技術となる、心臓幹細胞の培養、分化能力、細胞シート作製に関する条件検討を行った。具体的には、手術中に廃棄されるヒト心臓組織から単離された cKit 陽性細胞を心臓幹細胞として、実験に使用した。培養条件の検討では、播種細胞密度、血清非働化の有無、継代のタイミングに関する検討を行った。分化能力の検討では、心筋細胞や血管平滑筋細胞への分化能力に関する検討を行った。心臓幹細胞シート作製条件の検討では、播種細胞密度に関する検討を行った。その結果、基本的な培養条件を、『播種: 310 cells/cm²以下、血清非働化: なし、継代のタイミング: 顕微鏡下 400 倍でコロニー中央付近を観察した際の視野中細胞数が 20~50 個』とする事に依り、心筋細胞や血管平滑筋細胞への分化能力を保持するヒト心臓幹細胞が調製でき、 1.1×10^5 cells/cm²以上の播種条件において、移植可能なヒト心臓幹細胞シートが作製可能であると考えられた。

A. 研究目的

ヒト心臓幹細胞の培養、分化能力、細胞シート作製に関して検討した。

B. 研究方法

手術中に廃棄されるヒト心臓組織を、細切し、Ham' s F12 培地 (12-615F, Lonza) で調製した 1 mg/ml のコラゲナーゼ (17454, Serva) 溶液に入れ、37°C で 20 分間静置した。この作業を 5 回繰り返した。得られた細胞は、8 ml の維持培地 [10% FBS (SH30406. 02, Hyclone), 0.2 mM L-Glutathione (G6013, Sigma), 5 ml/ml human Erythropoietin (E5627-10UN, Sigma), 10 ng/ml bFGF (100-18B, Peprotech), Ham' s F12 培地] と共に 100mm ディッシュに播種し、培養した。残った組織片は、0.1 mg/ml に希釈した上記コラゲナーゼ溶液に入れ、37°C で一晩静置した後、上記と同様に播種した。培地交換は、最初のみ播種 2 日後に行い、以降は 3 日に 1 度行った。1 継代後 (P1)、それらの細胞に含まれる cKit 陽性細胞を、CD117 MicroBead Kit human (130-091-332, Miltenyi) と

MACS MS (Miltenyi)、又は CD117 antibodies human (130-091-734, Miltenyi) と FACS Aria (BD) を用いて単離し、その細胞を心臓幹細胞として実験に使用した (P2 以降)。

ヒト心臓幹細胞の培養における条件検討では、播種細胞密度、血清非働化の有無、継代のタイミングに関して検討を行った。

まず、播種細胞密度と培養増幅率の関係を調べた。P5 の細胞を種々の細胞密度で播種し、8 日間培養した後、それらの細胞中に含まれる cKit 陽性細胞の割合を FACS で解析した。FACS 解析では、CD117-APC (2 μ l/100 μ l, IM3638, Immunotech)、陰性コントロール試薬として APC Mouse IgG1 κ Isotype Control (2 μ l/100 μ l, 554681, BD)、死細胞を除去する為に 7-AAD (5 μ l/250 μ l, 51-68981E, BD) を用いた。

次に、血清の非働化の有無や継代のタイミングと回収される細胞数の関係を調べた。早い継代のタイミングは、細胞間接触が極力起こらない様に、顕微鏡下 400 倍でコロニー中央付近を観察した際の視野中の細胞数が 10~20 個であるタイミングと規定し

た。中程度の継代のタイミングは、細胞間接触があるものの、コロニー中央付近がコンフルエントとならない様に、上記細胞数が50~70個であるタイミングと規定した。遅い継代のタイミングは、コロニー中央付近がコンフルエントとなる様に、上記細胞数が100個以上であるタイミングと規定した。各群(合計6群)は、それぞれ、早く播き直す群(E-H又はE+H):0.066g/群、中程度の群(N-H又はN+H):0.050g/群、遅く播き直す群(L-H又はL+H):0.050g/群、のヒト心臓組織に由来していた。全ての群は、同じ日に培養を開始し(P1)、それぞれの播き直すタイミングにおいて、cKit陽性細胞を単離した後、同じ条件で継代を続け、最終的に、同じ日(実験開始から30日後)に実験を終了させた(早い継代の群ではP9、中程度の継代の群ではP6、遅い継代の群ではP3に相当)。それら細胞のFACS解析では、CD117 antibodies human (130-091-734, Miltenyi)、陰性コントロール試薬として Mouse IgG1 (130-092-212, Miltenyi)、死細胞を除去する為に7-AAD (1 μ l/250 μ l, 51-68981E, BD)を用いた。

ヒト心臓幹細胞の分化能力の検討では、それら細胞の心筋細胞や血管平滑筋細胞への分化能力を解析した。心筋細胞や血管平滑筋細胞への分化能力は、免疫細胞染色を用いて解析した。免疫細胞染色を行う為に、カバーガラス(C015001, Matsunami)を入れた4wellマルチディッシュ(144444, Nunc)に2500個/wellの細胞(P5)を播種し、10%FBS/10⁻⁸M Dexamethasone/EMEMを用いて、37°C、5%CO₂の条件で6日間培養した。培地交換は、培養3日目に1度行った。6日間の培養後、カバーガラス上に接着した細胞を染色する為に、それらの細胞をPBSで2回洗った後、4%PFA/PBSで固定(室温、10分)した。再びPBSで3回洗った後、抗体希釈液(S3022, Dako)で希釈した mouse anti human alpha sarcomeric actin (5C5) (dilution=1:4, ab1321, Abcam)又は

mouse anti human smooth muscle actin (1A4) (0.7 μ g/ml, M0851, Dako)を加え、反応させた(室温、1時間)。それぞれの陰性コントロール試薬として、抗体希釈液(S3022, Dako)又は mouse IgG2a (0.7 μ g/ml, X0943, Dako)を用いた。0.05 M Tris-HCl (pH7.2)/0.1% Tween20を用いた3回の洗浄作業の後、1次抗体として、抗体希釈液(S3022, Dako)で希釈した Alexa Fluor 633 goat anti mouse IgG (dilution=1:1000, A21052, Molecular Probes)を加え、反応させた(室温、1時間)。0.05 M Tris-HCl (pH7.2)/0.1% Tween 20を用いた3回の洗浄作業の後、DAPI(1 μ g/mlにPBSで希釈した、340-07971, Dojindo)で染色(室温、10分)し、スライドグラスにマウント(434980, Thermo)した。

ヒト心臓幹細胞シートの作製における条件検討では、ヒト心臓幹細胞を種々の細胞密度で温度感受性培養皿(24穴マルチウェル又は35mm dish, Upcell, Cellseed)に播種し、維持培地を用いて、37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。その後、それらの培養皿を実験室(室温)で30~60分間放置し、移植可能な細胞シートが作製可能を確認した。

C. 研究結果

1. ヒト心臓由来cKit陽性細胞(ヒト心臓幹細胞)の培養における条件検討

a. 播種細胞密度と培養増幅率の関係

P5の細胞を種々の細胞密度で播種し、8日間培養した後、細胞を回収し、100mm dish1枚当りに回収された細胞数を算出した。さらに、それらの細胞中に含まれるcKit陽性細胞の割合をFACSで解析した。その結果、100mm dish1枚当たりの総細胞数やcKit陽性細胞数の何れの項目においても、より少ない播種細胞密度で培養増幅率が高くなる傾向を確認した(表1)。

表1：播種細胞密度と培養増幅率の関係

種々の細胞密度で播種し8日間培養を行った。播種細胞密度が少ない程、100mm dish1枚当たりの総細胞数やcKit陽性細胞数の増幅率が高くなる傾向を確認した。

播種細胞密度 (cells/cm ²)	総細胞		cKit陽性細胞		
	回収細胞数/dish (x10 ⁴)	培養増幅率 (倍)	cKit陽性率 (%)	回収細胞数/dish (x10 ⁴)	培養増幅率 (倍) (*)
76	8.5	19	46.6	4.0	18
150	10	11	52.0	5.2	12
310	20	11	51.2	10	11
610	23	6.4	39.9	9.2	5.1

(*)培養前のcKit陽性率は解析していなかったが、全ての条件で同じ細胞を用いたので、便宜的に培養前のcKit陽性率を50%と仮定した。

b. 血清非働化の有無や継代のタイミングと回収される細胞数の関係

血清の非働化に関しては、非働化なし(-H)の条件において、非働化あり(+H)の条件に比して、より多くの総細胞数(図1;E-H vs. E+H, N-H vs. N+H, L-H vs. L+H)やcKit陽性細胞数(表2)が得られた。継代のタイミングに関しては、早いタイミング(E)と中程度のタイミング(N)で(図1;E-H vs.

N-H vs. L-H)、より多くの総細胞数(E-H:1.2x10⁶, E+H:4.7x10⁶, N-H:1.2x10⁶, N+H:7.3x10⁶, L-H:2.6x10⁶, L+H:5.6x10⁶)が得られた。また、中程度のタイミングで、より多くのcKit陽性細胞が得られた(表2)。継代のタイミングと形態的な変化の関係を調べた所、継代のタイミングが遅くなるに従い、形態的な変化を確認した(図2)。

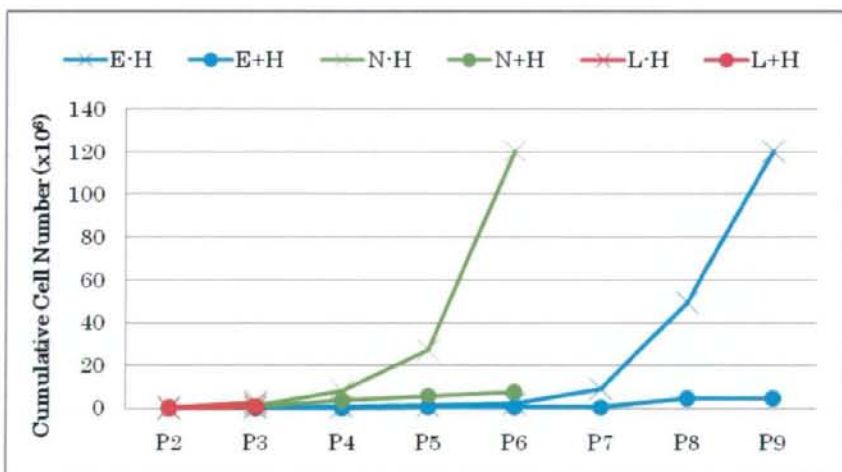


図1：血清非働化の有無や継代のタイミングと回収される総細胞数の関係、それぞれの培養条件で培養を継続した場合に各継代時において得られる総細胞数(全ての細胞を継代したと仮定)をグラフ化した。最終的な培養期間は30日間であった(E群:P9、N群:P6、L群:P3に相当)。E-HとN-Hの条件で、最終的により多くの細胞が得られた。E:早いタイミング、N:中程度のタイミング、L:遅いタイミング、-H:血清非働化なし、+H:血清非働化あり

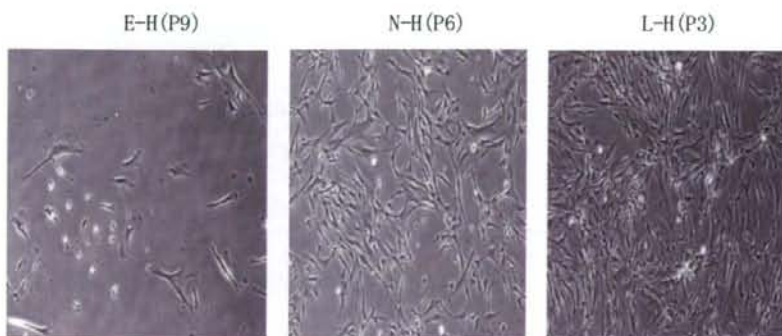


図2：継代のタイミングと形態的变化の関係、左からE-H(P9)、N-H(P6)、L-H(P3)の位相差顕微鏡下(40倍)における形態画像を示す。E-H(P9)では、心臓幹細胞を単離した直後にも観察された、小さな細胞(図中左下)が観察された。N-H(P6)やL-H(P3)では、扁平で大きな細胞が多数観察された。

表2：血清非働化の有無や継代のタイミングと cKit 陽性細胞数の関係、FACS で測定した、任意の継代時における cKit 陽性細胞の割合を、それぞれ対応する総細胞数(図1)に掛けて算出した。中程度の継代のタイミングで血清非働化なし(N-H)の条件で、最終的により多くの cKit 陽性細胞が得られた。図中の略号は、図1と同じ。

	E-H	E+H	N-H	N+H	L-H	L+H
P3			1.1×10^5	3.4×10^4	1.8×10^5	2.5×10^4
P5	6.6×10^4	2.2×10^4				
P6			1.6×10^7	10^5		
P9	3.2×10^6	2.8×10^4				

2. ヒト心臓幹細胞の分化能力における検討

ヒト心臓幹細胞の心筋細胞や血管平滑筋細胞への分化能力を確認する為に、それらの細胞を、分化培地中で6日間培養した。その後、 α -Sarcomeric Actin や α -Smooth Muscle Actin に対する抗体を用いて、細胞免疫染色を行った(図

3)。その結果、 α -Sarcomeric Actin 陽性細胞(左図、左下の細胞)や α -Smooth Muscle Actin 陽性細胞(右図、左下の細胞)の存在が確認された。陰性対照群では、その様なシグナルは検出されなかった(掲載していない)。図中の棒は、 $100 \mu\text{m}$ を示す。



α -Sarcomeric Actin (赤)、DAPI (青)



α -Smooth Muscle Actin (赤)、DAPI (青)

図3：心臓幹細胞の心筋細胞や血管平滑筋細胞への分化能力、分化培地でP6の細胞を6日間培養した後、 α -Sarcomeric Actin や α -Smooth Muscle Actin に対する抗体で染色した。その結果、 α -Sarcomeric Actin 陽性細胞(左図、左下)や α -Smooth Muscle Actin 陽性細胞(右図、左下)が観察された。

3. ヒト心臓幹細胞シートの作製における条件検討
ヒト心臓幹細胞を用いて、種々の播種細胞密度において、移植可能な細胞シートの作製を試みた。その結果、2500, 5000, 104, 2.5x10⁴, 5.0x10⁴, 7.5x10⁴ cells/cm² の条件では移植可能な細胞シートを作製する事ができなかった。1.1x10⁵

cells/cm² の条件では、P6 の細胞を用いた際には作製できなかったが、P8 の細胞を用いた際には移植可能な細胞シートが作製可能であった。2.7x10⁵ (図4)、4.5x10⁵ cells/cm² の条件では移植可能な細胞シートが作製可能であった。



図4：心臓幹細胞シートの作製、非働化していない血清を用いて培養した P10 の細胞(中程度のタイミングで継代した、ckit 陽性細胞の割合=30.5%)を 2.7x10⁵ cells/cm² の条件で 35mm dish (Upcell, Cellseed) に播種し、24 時間培養する事に依り、移植可能な細胞シートが作製可能であった。図中右が 35mm dish に入ったヒト心臓幹細胞シート。図中左は 1 円硬貨。

D. 考察

心臓幹細胞の培養方法の確認では、播種細胞密度、血清非働化の有無、継代のタイミング(回収細胞数)、という3点に関して検討した。

まず、播種細胞密度に関する検討では、より少ない播種細胞密度で、より高い培養増幅率が達成される傾向を観察した(表1)。その際には、310 cells/cm² の条件よりも少ないと、コロニー間の間隔が広くなり、また、その条件よりも多いとコロニー同士が重なりあう現象を観察した(掲載していない)。将来的に臨床応用を考えた場合、大量の細胞が必要であり、大量の培養皿と培地が必要であると考えられる為、播種細胞密度を増やした方が、経済的に好ましいと考えられた。しかしながら、マウス心臓幹細胞では、細胞間の接触がそれらの細胞の分化方向付けに促進的に働くと考えられている事から、310 cells/cm² 以上の条件では、ヒト心臓幹細胞をより分化した状態に導く可能性が考えられた。上記考察から、310 cells/cm² 以下の播種条件が、ヒト心臓幹細胞の培養に適していると考えられた。

血清非働化の有無に関する検討では、非働化していない血清を用いた培地で培養する事により、非働

化したものを使用した際よりも、最終的に得られる細胞数と cKit 陽性細胞数が多くなる傾向にあった

(図1、表2)。これらの結果から、心臓幹細胞の培養には、非働化していない血清の使用が適していると考えられた。

継代のタイミングに関する検討では、早いタイミングと中程度のタイミングにおいて、最終的に得られる総細胞数がより多くなる傾向を確認した(図1)。さらに、上記2つの培養条件の内、中程度のタイミングで継代した群では、最終的に得られる cKit 陽性細胞の数がより多くなる傾向を確認した(表2)。これらの結果から、中程度の継代のタイミングが、心臓幹細胞の培養に適している可能性が考えられた。しかしながら、それら中程度のタイミングで継代した細胞は、cKit 陽性細胞として単離した直後の細胞に比べて形態的に変化していると考えられた(図2)。逆に、早いタイミングで継代した細胞は、培養中の形態的な変化が少ない傾向にあった(図2)。この結果は、細胞接触がこれら心臓幹細胞の分化方向付けに関与しているという最近の報告(Boni et al., P.N.A.S., 105, 40, 15529-15534, 2008)と一致していると考えられた。しかしながら、早い継代のタイ

ミングは、100mm dish1枚あたりに回収される細胞数が少なく、将来的な臨床応用の際に必要となる細胞数を考えた場合、必要な培養皿と培地の量という視点から、経済的効率が低いと考えられた。上記考察から、早いタイミングから中程度のタイミングの中間、つまり、顕微鏡下400倍でコロニー中央付近を観察した際に視野中の細胞数が20~50個である継代のタイミングが、心臓幹細胞の効率的な培養条件に適していると考えられた。

心臓幹細胞の分化能力における検討では、それらの細胞を分化培地中で6日間培養した後、免疫細胞染色を用いて評価した。その結果、 α -Sarcomeric Actin陽性細胞や α -Smooth Muscle Actin陽性細胞が確認された(図3)。この結果から、我々が培養している心臓幹細胞が、心筋細胞や血管平滑筋細胞へ分化する能力を保持している可能性が推察された。

最後に、ヒト心臓幹細胞シートの作製における条件検討を行った。具体的には、播種細胞密度に関して検討を行った(結果3.ヒト心臓幹細胞シートの作製における条件検討)。一般に、より多い播種細胞密度で細胞シートは作製できると考えられることから、上記実験結果から、 1.1×10^5 cells/cm²以上の条件で細胞シートが作製できると考えられた(図4)。た

だし、この播種条件であっても、P6(N-H; 中程度の継代のタイミング、血清非働化なし)の細胞では移植可能な細胞シートが作製できず、P8(N-H)の細胞では作製が可能であった。それら細胞を調製する際に用いた培養条件では、細胞間の接触が起こっていたと考えられ、継代を経るに従い、形態的に扁平な、一般的により分化した状態であると考えられている細胞が増加していた可能性が考えられたことから、分化した細胞の方がより少ない播種細胞数で細胞シートが作製できるという可能性が推察された。上記考察から、移植可能なヒト心臓幹細胞シートを作製する為の播種細胞密度は、 1.1×10^5 cells/cm²以上であると考えられた。

E. 結論

基本的な培養条件を、『播種:310 cells/cm²以下、血清非働化:なし、継代のタイミング:顕微鏡下400倍でコロニー中央付近を観察した際の視野中細胞数が20~50個』とする事に依り、心筋細胞や血管平滑筋細胞へ分化する能力を保持するヒト心臓幹細胞を調製でき、 1.1×10^5 cells/cm²以上の播種条件において、移植可能なヒト心臓幹細胞シートが作製可能であると考えられた。

重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた
心筋・血管ハイブリッド組織シート移植治療の臨床研究開発

分担研究者 清水達也 東京女子医科大学先端生命科学研究所 准教授

研究要旨: 成体マウス心臓由来心筋前駆細胞を用いた細胞シートの作成に成功した。心筋梗塞後に心筋前駆細胞シートの移植を行うことにより、梗塞後のリモデリング抑制、左室収縮力の改善が認められ、梗塞後の線維化の抑制、血管新生促進効果が確認された。さらに移植 4 週目には、生着した心筋前駆細胞の多くが心筋細胞への分化も確認された。心筋前駆細胞シート移植は、重症心不全治療への有用な治療法と考えられる。

A. 研究目的

心筋梗塞モデルに対する、細胞シートを用いた心筋幹/前駆細胞移植の有用性及びその機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1.0×10^6 個の心臓由来 Sca-1 陽性心筋前駆細胞 (CPC) を、3.5cm の温度応答性培養皿に播種し、37 度で 5 日間培養した後に、コンフルエントとなったことを確認後、20 度でさらに 2 時間培養を継続することで、単層の細胞シートを回収することができた。そこで、心筋前駆細胞による梗塞心の再生能を検討するために、非移植群、CPC シート群、また、すでに心機能改善効果が報告されている脂肪間葉系細胞シート群の 3 群に分けて検討を行った。各々の細胞より、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作成した。野生型マウスの左前下行枝を結紮することにより心筋梗塞を作成し、この梗塞部を覆うように単層の細胞シートを各々移植し、その後の心機能の経時的な変化を心臓エコーを用いて評価し、またその分子機序を、免疫組織学的に検討した。

C. 研究結果

単層の細胞シート中の細胞数は、CPC、脂肪間葉系細胞では差を認めなかった (CPC, $2.0 \pm 0.2 \times 10^6$;

脂肪間葉系, $1.9 \pm 0.1 \times 10^6$)。CPC シート群では、移植 3 週目以降に左室拡張末期径、左室収縮末期径の拡大抑制及び左室短縮率の改善効果を示し、移植 4 週目では、その差は他の 2 群に比して有意であった (FS (4 週目): CPC, 0.29 ± 0.01 ; 非移植群, 0.22 ± 0.01 ; 脂肪間葉系, 0.24 ± 0.01 , $p < 0.001$)。Masson trichrome 染色にて、梗塞後の線維化を評価すると、CPC シート移植群では、非移植群に比して有意に線維化の割合の減少効果を認めた。次に、細胞シート移植による血管新生効果について検討した。移植 1 週目では、脂肪間葉系細胞シート移植群で、梗塞境界領域において、他の 2 群に比し有意に von Willebrand factor 陽性の血管数の増加を認めたが、移植 4 週目では、非移植群と血管数に差を認めなかった。一方、CPC シート移植群では、移植 1 週目では、非移植群と血管数に差を認めなかったが、移植 4 週目では、非移植群、脂肪間葉系細胞シート移植群に比して有意に血管数の増加を認めた。CPC シート移植及び脂肪間葉系細胞シート移植による梗塞後心機能改善効果の時期の相違は、この血管数の増減により一部説明しうるものと考えられた。

次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、CPC と脂肪間葉系細胞の梗塞心への生着を評価した。移植 4 週目では、多くの RFP 陽性の CPC が障害部において確認されたが (健康部 1.1 ± 0.4