

200906003A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究員 浅原 孝之

平成 22 (2010)年 5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((財)先端医療振興財団 先端医療センター)	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シート、心筋分化誘導細胞シートの作製 および積層化技術の確立と移植技術の開発 川本 篤彦((財)先端医療振興財団 先端医療センター)	5
2. 重症心不全患者由来心臓幹細胞の単離・培養条件に関わる検討 澤 芳樹(大阪大学大学院 医学系研究科)	11
3. 心筋幹/前駆細胞シート移植による梗塞心修復機序の検討 清水 達也(東京女子医科大学 先端生命科学研究所)	18
4. 心・血管系細胞ハイブリッドシート作成を目的とした心筋幹細胞由来 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 医学部基盤診療学系 再生医療科学)	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
-----------------------	----

I 總括研究報告書

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

代表研究者 浅原 孝之（財）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

研究概要

21年度研究は、臨床治療に応用できるヒト心筋幹細胞（hCSC）の分離・培養・品質管理法を確立し、心筋分化シートおよび血管分化シート作製開発研究を進めた。移植効果の確認も進み、臨床治療のための標準培養の確立研究を開始している。

分担者名

川本 篤彦（財）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
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
清水 達也 東京女子医科大学 先端生命科学研究
所 准教授
増田 治史 東海大学 医学部 基盤診療学系
再生医療科学 准教授

臨床における hCSC 細胞培養の樹立のための基礎データを採取した。

(1) 臨床の心筋採取部位と hCSC の分離効率の関係を追求したところ、右心房が最も心臓幹細胞の分離効率が高い傾向にあることが判明した。

(2) 臨床採取組織から分離する際のコラゲナーゼ反応時間と心臓幹細胞の分離効率の関係を追求したところ、12時間以内のコラゲナーゼ反応時間が最も hCSC の分離効率が高いことが判明。

(3) 播種細胞密度と1継代当りの培養日数が C-Kit 陽性率に与える効果を検討したところ、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage の条件が最も C-Kit 陽性率の低下を抑制し、細胞倍化時間の遅延化を抑制できることが判明。

(4) 各種心疾患と心臓幹細胞の分離効率の関係を検討したところ、全ての心疾患患者から心臓幹細胞は単離可能であること、が明らかになった。

以上の、臨床のための hCSC 培養方法の開発に伴い、米国の本法開発者 Piero Anversa 教授との会合も続けている。さらに研究者を派遣して、臨床における CSC 培養の開発の同期化を計っている。

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、心筋分化および血管分化誘導を応用したハイブリッドシート作製法の確立、およびその評価研究を進める。

B・C. 研究方法および結果

1. 臨床における心筋幹細胞培養の確立(大阪大学:澤グループ、先端医療センター:浅原グループ)

2. 未分化 hCSC シート開発 (先端医療センター:浅原グループ、東京女子医大:清水グループ)

最初に、分化誘導をかけない hCSC 細胞シート作製の適正化研究を行った。様々の条件検討を加えたところ、シート作製のための播種細胞密度は 1.5×10^6 個または 3.0×10^6 個/3.5cm ディッシュが最適であることが判明した。細胞シート移植時には、シートが心臓組織に確実に接着するまでしばらく静置する必要があるため、あらかじめ積層化したものを移植することが適切であることが判明した。現在、最も治療効果の高い積層化を *in vitro*、*in vivo* の両面から決定している。

3. 心筋分化誘導 hCSC シート開発 (先端医療センター:浅原グループ、東海大学:増田グループ)

心筋分化誘導 hCSC シート化には「細胞増殖効率」と「温度応答性培養皿への接着効率」の 2 つが重要な因子となる。様々な培養・播種条件を検討したところ、細胞播種密度 3.0×10^5 cells / 3.5cm ディッシュが細胞シート形成には必須であることが明らかになった。hCSC の心筋細胞への分化誘導に影響を与える因子として「分化培地に含まれる血清」と「分化誘導剤のタイミング」が考えられ検討した。人工血清 KSR は 2.5%の濃度において、細胞シートを構築される 10~14 日目にかけて心筋初期遺伝子の持続的な発現と心筋構造タンパク質の有意な増加が確認できた。分化誘導剤のタイミングは、dexamethasone を連続投与すると寧ろ、心筋・血管内皮・平滑筋遺伝子の発現を抑制する結果になり、初期投与で十分であることが判明した。

4. 血管分化誘導 hCSC シート開発 (東海大学:増田グループ、先端医療センター:浅原グループ)

血管分化誘導培養のための、培養条件、hCSC 細胞播種数及び分化培養期間の検討を進めた。最終的に FBS コーティングにおいて 2.5%FBS/7 日間、5%FBS/10 日間の培養条件が内皮系増殖能・分化能においてより良い培養環境を提供すると考えられた。さらに、心筋誘導

hCSC 培養との整合性を高め、臨床仕様の培養系に改変を進めている。

5. シート移植方法の検討 (先端医療センター:川本グループ、大阪大学:澤グループ)

未分化 hCSC シート移植実験および心筋分化細胞シート移植実験を評価している。血管分化シートは、まだ結果の報告はできないが実験中である。

シート移植後2週において、左室収縮能および局所壁運動指標は、対照群(移植なし)に比して、未分化 hCSC シートおよび心筋分化シート移植群両群で有意に回復している。治療後 4 週における左室線維化が対照群に比して有意に少ないことも判明している。免疫組織染色では、移植した未分化細胞の一部はラット心臓の梗塞境界領域に生着し、心筋・血管平滑筋・血管内皮細胞分化が確認された。心筋組織の脂肪化および石灰化の割合は、細胞シート移植群と対照群の間に差がなかった。安全性および効果性が確認できているが、さらに小動物実験での機能的・組織学的解析を進め、大動物実験プロトコルに移行する。

6. シート移植による再生環境促進効果の検証 (東京女子医大:清水グループ)

移植細胞の分泌する蛋白による再生環境促進のためのパラクリン効果について着目し検討を行った。今回は hCSC 由来のシート培養が開発中のため、マウス心筋前駆細胞(CPC)シートの移植を検討した。実験結果では、CPC は可溶性 VCAM-1 を発現し、可溶性 VCAM-1 はその受容体である VLA-4 を介して、*in vitro* においては血管内皮細胞の管腔形成を促進し、また心筋細胞死を抑制した。また *in vivo* においては移植細胞の生着に関与し、細胞シート移植による心機能改善効果に寄与することが明らかとなった。

D. 考察

臨床応用レベルの hCSC の分離・培養手技を確立する

ことが出来た。患者全例からの細胞採取が可能で、採取方法の臨床応用のめどを立てることができた。

採取 hCSC 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、そのシート作製も可能になった。これらシートの移植実験では、有意な機能改善も確認されており、シートの組み合わせの最適化、心筋・血管ハイブリッドシートの検討も進んでおり、最終的な小動物移植効果確認実験および大動物移植実験を経て、臨床プロトコール作製・培養標準手順書作製へと進むことが可能になった。

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がほぼ完成した。心筋・血管分化ハイブリッドシートの完成により、重症心不全治療の臨床応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 特記なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表・講演: 20 件

2) 海外

口頭発表・講演: 40 件

原著論文: 42 件

そのうち主なもの

1. Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M, Shimizu T, Okano T, Kasanuki H, Hagiwara N, Komuro I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest.* 2009 Aug;119(8):2204-17
2. Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, Takaki S, Asahara T. Pivotal role of lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circ Res.* 2009 Apr

24;104(8):969-77. Epub 2009 Mar 26

3. Ii M, Nishimura H, Sekiguchi H, Kamei N, Yokoyama A, Horii M, Asahara T. Concurrent Vasculogenesis and Neurogenesis From Adult Neural Stem Cells. *Circ Res.* 2009 Oct 23;105(9):860-8. Epub 2009 Sep 17.
4. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular Transplantation of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34-Positive Cells in Patients with Critical Limb Ischemia: A Phase I/IIa, Multi-Center, Single-Blind and Dose-Escalation Clinical Trial. *Stem Cells.* 2009 Nov;27(11):2857-64. Aug 26.
5. Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Oyamada A, Akimaru H, Shibata T, Hirai H, Suehiro S, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T. Therapeutic Potential of Unrestricted Somatic Stem Cells Isolated From Placental Cord Blood for Cardiac Repair Post Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Nov;29(11):1830-5. Epub 2009 Aug 13
6. 増田治史、浅原孝之、「血管老化からみた Stem cell aging,酸化ストレスと血管内皮前駆細胞の老化」、*メディカルサイエンスダイジェスト*、ニューサイエンス社、第 36 巻、136 号、p614-617、2010 年 1 月

学会発表

7. 松浦勝久 The importance of paracrine effects of cardiac progenitor cell sheet transplantation for cardiac repair 第 13 回日本心不全学会学術集会 2009 年 11 月 1 日 *Journal of Cardiac Failure* vol.15, S149, 2009
8. 松浦勝久 The Novel Paracrine Mechanisms in Cardiac Progenitor Cells and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation to Heart Failure 第 74 回日本循環器学会学術集会 2010 年 3 月 5 日 *Circ. J.* Vol74, Supple1, 72
9. Takenori MATSUDA, Sang-Mo KWON, Atsuhiko KAWAMOTO, Yoshiki SAWA, Takayuki ASAHARA, Novel Endothelial Progenitor Cell Culture Restores Vasculogenic Capacity of Aged Mouse Bone Marrow-Derived Stem Cells. 7th International Society for Stem Cell Research, 2009 年 7 月 10 日、Centre Convencions Internacional Barcelona、バルセロナ、スペイン
10. Takenori MATSUDA, Miki HORII, Hiroshi AKIMARU, Saito ATSUHIRO,

Shigeru MIYAGAWA, Atsuhiko KAWAMOTO,
Takayuki ASAHARA, Yoshiki SAWA
Correlation between Cardiac Stem Cell Number
per Muscle Weight and Derivation Site. 26th
International Society for Heart Research (日本部
会)、2009年12月5日、北海道大学 学術交流会
館、札幌、日本

11. 松田 剛典, 宮川 繁, 齋藤 充弘, 小松(堀井)
美希, 秋丸 裕司, 川本 篤彦, 浅原 孝之, 澤
芳樹, 心筋1g当りに回収される心臓幹細胞数と
病態の関係、第9回 日本再生医療学会、2010年
3月19日、広島国際会議場、広島、日本
12. Masuda H, Asahara T et al; 2009.7.8-11, ISSCR
7th Annual Meeting, Barcelona, Spain;
Establishment of hemato-endothelial lineage
commitment assay to determine single human cord
blood CD133 positive cell fate regulating
hematopoiesis and vasculogenesis.

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

研究協力者

松浦勝久(東京女子医科大学循環器内科)

Ⅱ 分 担 研 究 報 告 書

分担研究報告書

重症心不全患者の自己心筋幹細胞シート、心筋分化誘導細胞シートの作製

および積層化技術の確立と移植技術の開発

分担研究者 川本 篤彦 (財)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；平成 20 年度に重症心不全患者の心臓組織からの分離・培養技術を確立したヒト心筋幹細胞（hCSC）を用いて、細胞シート作製のためのコーティング及び細胞密度条件の最適化を行った。また、hCSC の心筋分化誘導シートの作製も試み、最適な培地・コーティング・デキサメサゾン添加条件を決定した。さらに、東京女子医大の技術を用いて積層化した hCSC シートまたは hCSC 心筋分化誘導シートをラット急性心筋梗塞モデルへ移植し、左室機能の改善傾向及び移植細胞の心筋細胞系列への分化を確認した。

(1)ヒト心筋幹細胞(hCSC)を用いた細胞シート作製およびシート積層化技術の確立

A. 研究目的

我々は平成 20 年度に、重症心不全患者の心臓組織から心筋幹細胞を分離・培養する技術を確立した。そこで次に、hCSC を用いた細胞シート作製および細胞シート積層化技術の確立を試みた。

B. 研究方法

hCSC を様々な細胞数で温度応答性培養皿に播種し、細胞シート作製のための条件検討を行なった。温度応答性培養皿はコーティングなし、hCSC 培養培地(10% ウシ血清(FBS)/ Ham's F-12) コーティング、100% FBS コーティングの3種類を用いた。細胞シート作製の成否は、培養の途中で剥離したり浮遊細胞塊を生じたりすることなく、細胞シート回収時に細胞が破れ等の無いシート状で回収できるかどうかで判断した。また、細胞シート作製時には細胞を高密度で培養するため、TUNEL アッセイや細胞増殖アッセイキットを用いて、細胞密度が細胞へ及ぼす影響についても検討した。

C. 研究結果

hCSC は、温度応答性培養皿(3.5 cm ディッシュ)1枚あたり 0.75×10^6 個以下の細胞密度では4日間培養しても細胞シートは作製できなかったが、 1.5×10^6 個または 3.0×10^6 個の細胞数では1日間の培養により細胞シートが作製できた。TUNEL アッセイや細胞増殖アッセイキットを用いた検討の結果、少なくともこの細胞密度で1日間培養しても有意なアポトーシスの増加や細胞増殖の低下は認められなかったため、細胞密度が細胞に与える影響は少ないことが示唆された。培養皿のコーティング条件については、コーティングなし又は hCSC 培養培地コーティングでは細胞シートが作製できず、100% FBS コーティングがシート作製に必須であった。

また、細胞シートの積層化にあたっては東京女子医大の技術を導入し、in vitro で3層の hCSC 細胞シート積層化が可能となった。

D. 考察

今回の検討から、hCSC 細胞シート作製の細胞密度は 1.5×10^6 個または 3.0×10^6 個/3.5cm ディッシュが適していることがわかった。 1.5×10^6 個のほうが必要細胞数が少な

くて済むメリットがあるが、どちらが細胞シートとしての治療効果が高いかを比較検討する必要があり、現在ラットへの移植実験を行なっているところである。

また、細胞シート移植にあたっては、シートが心臓組織に確実に接着するまでしばらく静置する必要があるため、あらかじめ積層化したものを移植することは手間および時間の節約になる。何層積層化させるのが最も治療効果が高いのか、in vitro、in vivoの両面から今後検討していく必要がある。

(2) ヒト心筋幹細胞(hCSC)の心筋分化誘導細胞シートの作成

A. 研究目的

ヒト心筋幹細胞(hCSC)の心筋細胞、及び血管内皮細胞への優れた分化能を利用して、分化誘導効率の高い分化条件を確立すると共に、細胞移植治療に適した細胞パッチ、又はシートを in vitro で形成する条件を構築する。

B. 研究方法

hCSC に由来する心筋分化誘導細胞シートを作成するため、未分化 CSC 細胞を心筋細胞に分化誘導させながら、同時に細胞シートを構築することを試みた。細胞分化にはステロイド系抗炎症薬の一つである dexamethasone を使用した。細胞シートの回収には形成された細胞シートを培養皿から細胞分解酵素を使用せずに剥離することが可能な温度応答性培養皿を用いた。以下に示す 5 つの分化培養条件を温度応答性培養皿上で試行し、細胞増殖能、細胞シート形成能、並びに定量 RT-PCR を用いた心筋分化遺伝子マーカー等の発現値を評価した。使用した hCSC は 3 人の心疾患患者の心臓からそれぞれ心尖部、右房、右室より単離、培養樹立された細胞系統を用いた。

C. 研究結果

1) 分化培地の選択

基本分化培地として、DMEM、aMEM、MEM の 3 種類

を用いて、分化誘導剤 dexamethasone 18 日間連続投与後の細胞シート形成能、心筋遺伝子マーカーの発現を定量 RT-PCR にて評価した。DMEM 条件下では細胞のシート化は認められたが、心筋分化遺伝子の効率的な発現誘導は殆ど認められず、DMEM は心筋分化への誘導よりも増殖効率を促進することが分った。一方、MEM を用いた場合、細胞増殖効率は著しく阻害され、細胞シートを形成するに至らず、hCSC の増殖停止、或いは細胞死を引き起こした。これらの培地に対し、aMEM は細胞シートを形成する適度な増殖能を与え、且つ、心筋初期遺伝子マーカー(Nkx2.5, GATA4, Isl-1 等)発現の経時的な上昇が認められたことから、基本分化培地には aMEM を用いることにした。

2) 血清選択と濃度決定

分化培地に添加する血清として、ヒト ES 細胞の培養にも用いられる人工血清(KSR:Invitrogen 社)と hCSC の増殖培養に用いるウシ血清(FBS)の 2 種類を評価した。aMEM に 1.0%、2.5%、或いは 5.0% KSR、又は 1.0%、2.5% FBS のそれぞれの血清を添加し、分化誘導剤 dexamethasone 投与を行い、経時的に心筋、血管内皮、及び、平滑筋遺伝子の発現を定量 RT-PCR で調べた。FBS の使用ではいずれの濃度においても心筋、平滑筋遺伝子の発現が全く誘導されなかった。1.0% KSR では Nkx2.5, Isl-1 などの多くの心筋初期遺伝子の発現は誘導されず、GATA4 や心筋構造タンパク質が一過的に上昇するに留まった。2.5% KSR では分化 10~14 日に心筋初期遺伝子や心筋構造タンパク質の発現ピークを示した。これに対して、5.0% KSR では心筋遺伝子、平滑筋遺伝子の多くが分化早期の 6 日目でピークになることが分った。2.5%及び 5.0% KSR の場合、分化誘導 6 日目では細胞間の接着が不十分で細胞シートの形成は未熟で、どの細胞系統においても温度応答性培養皿から細胞シートとして剥離することが出来なかった。しかし、10 日目以降になると、細胞はタイトなシートを形成した。また、血管内皮遺伝子の発現は 2.5%及び 5.0% KSR では、いずれも分化誘導 6 日目までに発現上昇し、それ以降は減

少する KSR 濃度に依存しない傾向を示した。これらのことから、10~14 日目で心筋遺伝子発現がピークを示し、且つ、細胞シートが形成される 2.5% KSR を使用することが最適であると結論付けた。

3) 分化誘導のタイミング

分化誘導剤として使用した 10nM dexamethasone の最適添加期間を検討した。未分化 hCSC を aMEM-2.5% KSR 培養液で播種した時点から 6 日、10 日、14 日、及び 18 日間の連続投与を行い、それぞれ分化培養 18 日間の経時的な分化誘導効率を調べた。心筋初期遺伝子や心筋構造タンパク質の発現は添加 6 日間で有意に上昇した。さらに連続投与を行うと分化培養と共に多くの心筋遺伝子発現は変化が認められないか、或いは徐々に減弱していく傾向が見られた。特に、18 日投与では心筋遺伝子、血管内皮遺伝子、平滑筋遺伝子のいずれもが 14 日以降急激に減少することが分った。しかし、dexamethasone の 6 日間投与後、dexamethasone を培養液から除いて培養を行うと心筋初期遺伝子や心筋構造タンパク質の発現は 6 日よりさらに増加し、心筋初期遺伝子群の発現は 14 日にピークを認め、心筋構造タンパク質もこれらに比例して増加した。

4) 培養皿へのコーティング剤の選択

温度応答性培養皿上での細胞シート形成には細胞を培養皿に接着させるコーティングが必須であるため、コーティング剤として分化誘導時に用いる人工血清 KSR、ウシ血清 FBS、並びに、ブタ由来ゼラチンを検討した。100% KSR、10%、又は 100% FBS、0.1% ゼラチンの濃度を用い、37 度で 2 時間それぞれのコーティング処理を温度応答性培養皿に施し、未分化 hCSC 細胞を aMEM-2.5% KSR 培養液で播種後、dexamethasone 6 日間投与にて分化誘導を行い、14 日目の細胞シート形成の有無、遺伝子発現を調べた。100% KSR でコーティングした場合、分化培養 3 日目で細胞が温度応答性培養皿から剥離し、細胞シート形成は調べた 3 細胞系統で全て不可能であった。一方、10%、並びに 100% FBS と 0.1% ゼラチンでは、心筋、血管内皮、平滑筋遺伝子の誘導発現パターンと

発現値はほぼ同一であった。しかし、調べた 3 細胞系統では、細胞接着能がそれぞれ異なり、10% FBS や 0.1% ゼラチン処理では分化誘導 14 日目で細胞シートが剥離する場合が数サンプルで認められたが、100% FBS 処理では細胞間の細胞接着能の違いにかかわらず、いずれの細胞系統でも細胞シート形成が可能であった。

5) 細胞播種密度の検討

細胞シートが形成可能な細胞播種密度を検討するため、35mm 温度応答性培養皿に 3.0×10^5 cells、 5.0×10^5 cells、及び 7.0×10^5 cells の未分化 hCSC を播種し、aMEM-2.5% KSR 培養液中で dexamethasone を 6 日間添加し、細胞シート形成を 14 日後に評価した。 5.0×10^5 cells、及び 7.0×10^5 cells / 3.5 cm ディッシュの細胞密度で播種した場合には、培養 4 日目には細胞剥離を始め、6 日後には剥離した細胞シートが細胞塊を作って浮遊してしまった。これに対して、 3.0×10^5 cells / 3.5 cm ディッシュの細胞播種密度では調べた 3 細胞系統で安定して細胞シートを作成することが出来た。

6) 心筋分化細胞シートの作成条件

以上の成績から、ヒト心筋組織から単離・培養した hCSC を心筋分化誘導細胞シート化する条件を次のように確立した。

1. 分化誘導培地:aMEM-2.5% KSR
2. 分化誘導剤:10nM dexamethasone、6 日間投与
3. 培養皿コーティング:100% FBS、37 度、2 時間
4. 細胞播種密度: 3.0×10^5 cells / 3.5cm ディッシュ
5. 分化培養期間:14 日

D. 考察

・細胞シート形成

hCSC の細胞シート化には「細胞増殖効率」と「温度応答性培養皿への接着効率」の 2 つが重要な因子である。「細胞増殖効率」は分化培養に使用する培地の組成に依存するところが大きく、高栄養成分を含む DMEM では細胞増殖が過剰になり過ぎて、細胞間の張力が培養皿との接着力より強くなり、細胞シートは形成されるものの

分化培養の途中で剥離し、結果的に浮遊細胞塊を作る場合が生じた。また、分化誘導剤の使用にもかかわらず、細胞増殖活性が分化誘導活性に優れた結果、効率の良い心筋分化誘導が認められなかった。検証した培地の中で適度な細胞増殖を示す aMEM が細胞シート化と分化誘導効率において最も適していた。最初に播種する細胞密度も重要な因子で、 5.0×10^5 cells / 3.5cm ディッシュの細胞密度を越えると分化誘導過程で細胞密度が過剰となり、どの細胞系統でも細胞シートが途中で剥離しまうため、細胞播種密度 3.0×10^5 cells / 3.5cm ディッシュが細胞シート形成には必須であることが明らかになった。今回見出した至適細胞密度は多くの組織細胞の細胞シート化に必要とされる細胞密度の 10 分の 1 程度である。このことは、細胞シート化に必要とされる細胞総数を著しく減らすことが可能で、患者組織から単離、増殖培養する培養期間の短縮と培養液等の低コスト化に繋がるメリットがある。

「温度応答性培養皿への接着効率」は細胞数を厳密にコントロールすることと培養皿をコーティングすることが必須である。分化培養に用いる人工血清 KSR では細胞シート形成時に細胞と培養皿との接着を維持する因子が不十分なため、細胞シートの形成は全く認められなかった。これに対して、hCSC 増幅培養に用いるウシ血清 FBS、或いは、ブタ由来ゼラチンは心筋分化誘導に対してほぼ同程度の効率を示したが、ある心疾患患者から樹立された細胞接着性が低い細胞系統ではブタ由来ゼラチン処理での細胞シート化が十分に生じないことが確認された。また、ヒトへの細胞シート移植を考えた場合、最終細胞製品の評価効率や移植申請時のハードルの観点から可能な限り異種動物由来の組織成分を少なくする方が良いため、温度応答性培養皿へのコーティングは増殖培養に使用するのと同じウシ血清 FBS を利用することにした。

・分化誘導効率

hCSC の心筋細胞への分化誘導に影響を与える因子として「分化培地に含まれる血清」と「分化誘導剤のタ

イミング」が考えられる。hCSC の増殖培養に使用するウシ血清 FBS を分化培地に用いた場合、dexamethasone を様々なタイミングで添加したにも関わらず、心筋遺伝子、平滑筋遺伝子の発現誘導は生じなかった。ウシ血清 FBS にはこれらの遺伝子の発現を抑制する因子が含まれていることが推察される。これに対して、人工血清 KSR は 2.5% の濃度において、細胞シートを構築される 10 ~ 14 日目にかけて心筋初期遺伝子の持続的な発現と心筋構造タンパク質の有意な増加が確認できた。また、KSR は人工血清であることからロット間に分化誘導効率の差が無いので、安定して細胞の分化誘導に使用することが可能である。「分化誘導剤のタイミング」は dexamethasone を分化誘導時に連続投与すると寧ろ、心筋・血管内皮・平滑筋遺伝子の発現を抑制する結果になった。未分化 hCSC の心筋分化への最初のトリガーとして十分な能力は有しているが、ある程度分化過程に進んだ細胞群に対しては、dexamethasone の抗炎症作用や心筋・血管分化への直接的な抑制作用が惹起されるため、分化誘導には長期間の投与よりも初期投与で十分であることが分った。さらに、6 日間投与はこれらの遺伝子発現だけでなく、血管新生を促進する液性因子 (VEGF-A, Ang1 など) の発現を細胞シート形成 14 日まで恒常的に誘導することから、細胞シートに存在する分化心筋細胞の治療効果だけではなく、産生サイトカインによる血管新生の二次的な効果も期待できる。

(3) 心筋梗塞モデルラットへの細胞シート移植による治療効果の評価

A. 研究目的

ヌードラット心筋梗塞モデルにヒト心筋幹細胞シート (未分化 hCSC シート及び心筋分化誘導細胞シート) を移植して、治療効果を検証した。

B. 研究方法

ヌードラットの左冠動脈前下行枝結紮による心筋梗塞モデルを作製し、その 2 週後に未分化 hCSC 細胞シート (1.5×10^6 個 (Low) または 3.0×10^6 個 (High) / シート) ま

たは心筋分化誘導細胞シート(3x10⁵ 個/シート)を梗塞部位に3枚(積層)移植した。治療効果の評価には、心エコーによる心機能解析(細胞シート移植後2週、4週)のほか、心組織凍結切片を用いたマッソン・トリクローム染色による線維化の評価、isolectin B4 染色による毛細血管密度の解析、Oil Red O 染色による脂肪化、von Kossa 染色による石灰化の有無の検討などの組織学的解析を行なった。また、移植した細胞シート由来のヒト細胞が心組織に残存し、心筋などに分化しているか確認するため、ヒト細胞を検出する抗HLA抗体および心筋マーカーである抗 cardiac troponin I 抗体、平滑筋マーカーである抗 smooth muscle actin 抗体、血管内皮マーカーである抗 von Willebrand factor 抗体による二重免疫染色を行なった。

C. 研究結果

上記の in vivo 実験は現在も進行中であり、今後長期的な成績が得られる予定であるが、シート移植後2週において、左室収縮能および局所壁運動指標は、対照群(移植なし)に比して hCSC 未分化細胞シートおよび心筋分化細胞シート移植群で有意に回復していた(図1)。

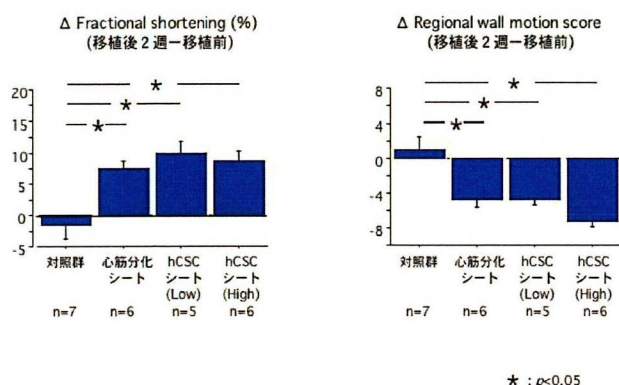


図1. 細胞シート移植後2週における心エコー図諸指標

hCSC 未分化細胞シート移植群の一部で実施し得た組織学的予備検討では、治療後4週における左室線維化面積の割合が対照群に比して細胞シート移植群で有意に低値を示した。また免疫染色の結果から、移植した未分化細胞シートのうち一部のヒト細胞はラット心臓の梗塞境界領域に生着し、心筋マーカーを発現していた。また、ヒト細胞のうち、平滑筋マーカー・血管内皮細胞マ-

ーカーの発現が確認されたものもごく少数ながら認められた。また、心筋組織の脂肪化および石灰化の割合は、未分化細胞シート移植群と対照群の間に差がなかった。

D. 考察

上記の小動物実験で得られた結果は、hCSC 未分化細胞シートおよび心筋分化誘導細胞シート移植による心筋修復および左室機能改善効果を示唆している。平成22年度には、機能的・組織学的解析をさらに進め、大動物実験プロトコルに必要なデータを集積する予定である。

E. 健康危険情報 特記なし

F. 研究発表

原著論文

1. Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, Takaki S, Asahara T. Pivotal role of lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circ Res*. 2009 Apr 24;104(8):969-77. Epub 2009 Mar 26
2. Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Horii M, Sadamoto K, Yokoyama A, Yamanaka T, Onodera R, Kuroda A, Baba R, Kaneko Y, Tsukie T, Kurimoto Y, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. Intramuscular Transplantation of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34-Positive Cells in Patients with Critical Limb Ischemia: A Phase I/IIa, Multi-Center, Single-Blind and Dose-Escalation Clinical Trial. *Stem Cells*. 2009 Nov;27(11):2857-64. Aug 26.
3. Iwasaki H, Kawamoto A, Willwerth C, Horii M, Oyamada A, Akimaru H, Shibata T, Hirai H, Suehiro S, Wnendt S, Fodor WL, Asahara T. Therapeutic Potential of Unrestricted Somatic Stem Cells Isolated From Placental Cord Blood for Cardiac Repair Post Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Nov;29(11):1830-5. Epub 2009 Aug 13

学会発表

1. Takenori MATSUDA, Sang-Mo KWON, Atsuhiko KAWAMOTO, Yoshiki SAWA, Takayuki ASAHARA, Novel Endothelial Progenitor Cell Culture Restores Vasculogenic

Capacity of Aged Mouse Bone Marrow-Derived Stem Cells. 7th International Society for Stem Cell Research, 2009年7月10日、Centre Convencions Internacional Barcelona、バルセロナ、スペイン

2. Takenori MATSUDA, Miki HORII, Hiroshi AKIMARU, Saito ATSUHIRO, Shigeru MIYAGAWA, Atsuhiko KAWAMOTO, Takayuki ASAHARA, Yoshiki SAWA
Correlation between Cardiac Stem Cell Number per Muscle Weight and Derivation Site. 26th International Society for Heart Research (日本部会)、2009年12月5日、北海道大学 学術交流会館、札幌、日本
3. 松田 剛典, 宮川 繁, 齋藤 充弘, 小松(堀井) 美希, 秋丸 裕司, 川本 篤彦, 浅原 孝之, 澤 芳樹, 心筋1g当りに回収される心臓幹細胞数と病態の関係、第9回 日本再生医療学会、2010年3月19日、広島国際会議場、広島、日本

G. 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 なし

分担研究報告書

重症心不全患者由来心臓幹細胞の単離・培養条件に関わる検討

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

研究趣旨；前年度は、ヒト心臓幹細胞の培養方法、分化能力、細胞シート作製能力に関して大まかな検討を行い、それらがほぼ期待通りである事が確認された。本年度は、当移植治療の手順書作成を見据え、その手順の詳細な検討に移った。具体的には、（１）心臓の部位と心臓幹細胞の分離効率の関係、（２）細胞を組織から分離する際のコラゲナーゼ反応時間と心臓幹細胞の分離効率の関係、（３）播種細胞密度と１継代当りの培養日数がC-Kit陽性率に与える効果の検討、（４）各種心疾患と心臓幹細胞の分離効率の関係、を検討した。その結果、（１）右心房が最も心臓幹細胞の分離効率が高い傾向にあり、（２）１２時間以内のコラゲナーゼ反応時間が最も心臓幹細胞の分離効率が高いこと、また、（３） 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passageという条件が最もC-Kit陽性率の低下を抑制でき、細胞倍化時間の遅延化が抑制できること、さらに、（４）全ての心疾患患者から心臓幹細胞は単離可能であること、が明らかになった。これらの実験結果から、現実的に臨床応用可能かどうかに関しては今後慎重に検討する必要があるものの、最も効率の良い心臓幹細胞の単離・培養方法として、『右房から組織を採取し、１２時間以内のコラゲナーゼ反応を用いて細胞を分離し、複数回継代した後、C-Kit陽性細胞を単離し、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passageという条件で培養する』という方法が考えられた。

A. 研究目的

心臓幹細胞を用いた移植治療に関する手順の詳細な検討を行うこと。

B. 研究方法

インフォームドコンセントが得られた患者の手術時に廃棄されるヒト心臓組織から、肉眼的に筋肉部分を分離し、電子天秤で質量を計測した。その後、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8 mlと共に50 mlチューブに入れ、37℃で20分間振盪(60 rpm)した。得られた上清は4℃、500 g、5分の遠心後、8 mlのHam's F12 培地で懸濁し、40 μmのセルストレーナーを通した後、氷上で保存した。残った組織塊に対しては、再び上

記コラゲナーゼ反応を行った。この上記コラゲナーゼ反応とその後の細胞回収作業を合計5回行った。合計5回のコラゲナーゼ反応で得られた上清由来細胞懸濁液に対しては、再び4℃、500 g、5分の遠心を行い、沈殿した細胞塊を8 mlの維持培地 [Ham's F12 培地, 10% FBS(SH30406.02, Hyclone), 0.2 mM L-Glutathione (G6013, Sigma), 5 mU/ml human Erythropoietin (E5627-10UN, Sigma), 10 ng/ml bFGF (100-18B, Peprotech)]で懸濁し、10 cm dish(353003, BD)に播種し5日間培養した(以降、継代するまでの間、これらの細胞をAPP0とする)。

上記40 μmのセルストレーナー上に残った組織塊も維持培地に懸濁し、10 cm dishに播種し5日間培養した[以降、APP0(All Population P0) pieces]。上記5回の

コラゲナーゼ反応後に残った組織塊には、0.1 mg/ml のコラゲナーゼ溶液 10 ml を添加し、再び 50 ml チューブ中で 37 °C、一晩の振盪(60 rpm)反応を行った。その反応後に得られた上清に対しては、4 °C、500 g、5 分間の遠心を行った後、沈殿した細胞塊を 8 ml の維持培地で懸濁し 10 cm dish 上で 4 日間培養した[以降、APP0 o/n(All Population P0 overnight)]。この一晩の振盪反応でも残った組織塊は、そのまま維持培地で懸濁し、10 cm dish に播種し 4 日間培養した(以降、APP0 o/n pieces)。上記全てのサンプル(APP0, APP0 pieces, APP0 o/n, APP0 o/n pieces)に対しての培地交換は、播種後 2 日目に行った。上記 4 ~ 5 日間の培養後(培養後の写真を図 1 に示す)、0.05%トリプシン(T3924, Sigma)を添加し 2 分間、37 °C でインキュベートする事に依り回収し、再び 10^4 cells/10 cm dish という条件で播種し 4 日間培養した(P1)。

図 1

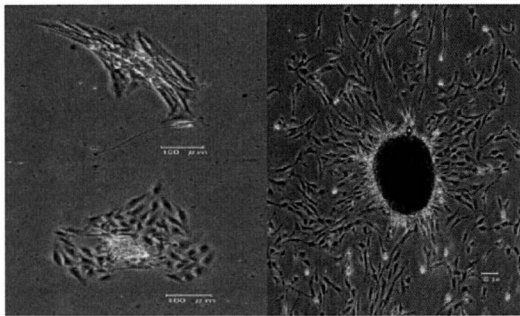


図 1、コラゲナーゼ処理した後に得られた細胞(P0)の形態：ヒト心臓組織をコラゲナーゼ処理した後、回収できた細胞を播種し、4 ~ 5 日間培養した。形態学的には、2 種類の細胞が観察された(図中左上と左下)。また、残存組織塊から細胞が遊走している像も確認された。

それらの細胞を、Cell Dissociation Solution(C5914, Sigma)を添加し 6 分間、37 °C でインキュベートする事に依り回収し、CD117(AC126)-PE (130-091-735, Miltenyi Biotec、添加量: $10 \mu\text{l}/\text{total } 110 \mu\text{l}/10^7$ cells 以下)と FACS Aria(BD)を用いて、それらの細胞に含まれる C-Kit 陽性細胞を単離した。それらの細胞を染色する際は、 $10^5 \sim 10^7$ 個までの細胞を $110 \mu\text{l}$ の 3% FBS/PBS に懸濁し、4 °C で 10 分間反応させた。染色反応後は、3% FBS/PBS を 1ml 加え、4 °C、2000 g、5 分間の遠心を行

い、1 ml の上清を除くという一連の洗浄作業を合計 2 回行った。洗浄後、染色された細胞は合計 $400 \mu\text{l}$ の 3% FBS/PBS に懸濁し、解析を行うまで遮光し氷上で保存した。コントロール試薬としては、Mouse IgG1-PE (130-092-212, Miltenyi Biotec、添加量: $10 \mu\text{l}/\text{total } 110 \mu\text{l}/10^7$ cells 以下)を用いた。上記試薬の反応時には、同時に、FcR Blocking Reagent (130-059-901, Miltenyi Biotec、添加量: $20 \mu\text{l}/\text{total } 110 \mu\text{l}/10^7$ cells 以下)を反応させた。FACS Aria の機器管理と単離設定には、それぞれ、SPHERO Ultra Rainbow Fluorescent Particles, 3.0-3.4 μm (URFP-30-2, Spherotech)と BD FACS Accudrop Beads (345249, BD)を用いた。陽性細胞のゲーティング位置は、コントロール試薬を用いた際に陽性細胞集団が 2%となる位置とした。単離した C-Kit 陽性細胞は、 10^4 cells/10 cm dish, 4 days/passage という条件で 4 継代した。継代の際は、上述のトリプシンを用いた。その後、再び C-Kit 陽性細胞を上記方法で (Cell Dissociation Solution で細胞を回収し FACS Aria を用いて)単離し、C-Kit 陽性率が $93.0 \pm 1.9\%$ (平均±標準誤差)であるという事が確認できた細胞群(P5)を用いて、心臓幹(C-Kit 陽性)細胞の培養条件の検討を行った。具体的には、前年度までの検討から C-Kit 陽性率の変動に寄与していると考えられた播種細胞密度と 1 継代当りの培養日数に関して検討を行った。即ち、 5×10^3 , 2×10^4 , 8×10^4 或いは 3.2×10^5 cells/10 cm dish/8 ml の維持培地, 3, 4 或いは 5 days/passage という培養条件で 3 継代(P6 ~ P8)し、継代毎に C-Kit 陽性率を FACS Aria(上述)に依り解析した。

心臓幹細胞シート作製条件の検討では、C-Kit 陽性細胞単離後の培養条件を 10^4 cells/10 cm dish, 4 days/passage として 4 継代した後(P5)、再度 C-Kit 陽性細胞を単離し、2 継代した細胞(P7; C-Kit 陽性率=32.0%)を用いた。細胞播種前には、1 ml の FBS を 3.5cm dish(UpCell, CellSeed)に入れ、30 分以上の予備培養を行った。その後、1.5, 3.0, 6.0 または 9.0×10^6 cells/3.5cm dish という条件で播種し、17 時間のインキ

ュベートをを行った。細胞シートを浮遊させる為に、シートの端とディッシュとの接着箇所を黄チップで切断し、室温で静置し、シートが作製可能か肉眼で確認した。

C. 研究結果

1、心臓の部位と心臓幹細胞の分離効率の関係:

サンプル数、患者数、術式、サンプルの由来部位、患者情報等を表 1 に示す。

Table1. Cardiac Procedures, Origin of Tissue Samples and Patient Characteristics (25 samples from 15 patients) [Values are n (%)]

Cardiac Procedures (n=15 patients)	
Implantation of ventricular assist device	8(53%)
Heart transplantation	3(20%)
Maze procedure	2(13%)
Aortic valve replacement	2(13%)
Origin of Tissue Samples (n=25 samples)	
Left ventricle apex	9(36%)
Right atrium	5(20%)
Septum	4(16%)
Right ventricle	3(12%)
Left atrium	2(8%)
Left ventricle	2(8%)
Patient Characteristics (n=15 patients)	
Age (year-old, mean±SD)	45±25
Male	10(67%)
Dilated Cardiomyopathy	7(47%)
Aortic Stenosis	3(20%) →2/3 were failed.
Ischemic Cardiomyopathy	2(13%)
Dilated Hypertrophic Cardiomyopathy	1(7%)
Hypertrophic Cardiomyopathy	1(7%)
Myocarditis	1(7%)

表 1、術式、由来部位、患者情報：15 人（男性 10 人）の患者から得た 25 サンプルを実験に用いた。補助人工心臓装着の際に廃棄される心尖部の割合が多かった。また、心移植患者からは、複数の部位が得られるので、部位間の比較に用いた。疾患別では、拡張型心筋症患者の割合が多かった。大動脈弁狭窄症の患者からは、採取される細胞数が少なく、3 名の内 2 名分に関しては心臓幹(C-Kit 陽性)細胞の単離に失敗した。

心臓の部位[右房、左房、右室、左室(心尖部を含む)、中隔]と心臓幹細胞の分離効率の関係を探る為に、心臓移植の際に廃棄されるレシピエントの心臓から各部位を採取し、上述の方法を用いて各組織に由来する心臓幹(C-Kit 陽性)細胞の割合を解析した。組織から細胞を分離する際に用いたコラゲナーゼ反応時間(上述; 一晚)は便宜的に 12 時間とした。心臓移植患者の心臓に限定したのは、患者毎の差を可能な限り排除する為である。その結果、右房からより多くの心臓幹(C-Kit 陽性)細胞が採取できる可能性が考えられた(図 2; 以降、特に記

述が無い限り平均±標準誤差で示す。右房= 18 ± 7、左房= 3.2 ± 0.7、右室= 1.5 ± 0.3、左室= 1.1 ± 0.3、中隔= 2.1 ± 0.3 x10⁴ cells/g muscle, n = 2~3)。

図2

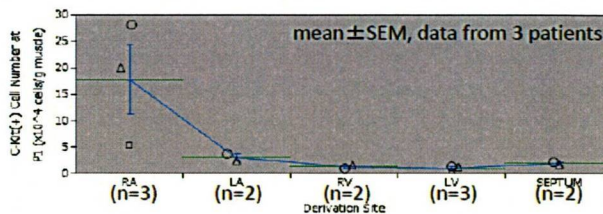


図 2、心臓の部位と心臓幹細胞の分離効率の関係：心移植を受けた患者(3 例)の心臓から各部位を採取し、細胞を分離・培養した後、C-Kit 陽性率を FACS に依り解析し、C-Kit 陽性細胞数を算出した。3 例の内 1 例で全ての部位が得られなかったため、各部位の n 数は 2~3 となった。結果は、平均±標準誤差で表されている。心臓幹(C-Kit 陽性)細胞の分離効率は、右房で高まる可能性が考えられた。

2、組織から細胞を分離する際のコラゲナーゼ反応時間と心臓幹細胞の分離効率の関係:

経験上、コラゲナーゼ反応(上述; 一晚)時間が長引くと採取される細胞(C-Kit 陰性細胞を含む)数が減少すると考えられた為、その反応時間(12、15 又は 18 時間)と心臓幹(C-Kit 陽性)細胞の分離効率に関して検討を行った。その結果、12 時間のコラゲナーゼ反応において、最も心臓幹細胞の分離効率が高いことが判った(図 3; * = p < 0.05, 12 時間 = 0.96 ± 0.16、15 時間 = 0.23 ± 0.08、18 時間 = 0.28 ± 0.13 x10⁴ cells/g muscle, n = 3)。

図3

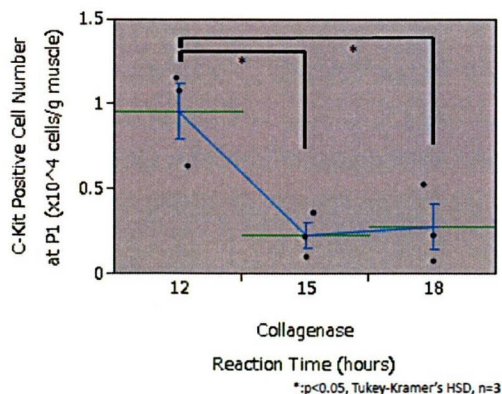


図 3、細胞を組織から分離する際のコラゲナーゼ反応時間と心臓幹細胞の分離効率の関係：ヒト心臓組織から細胞を分離する際に行うコラゲナーゼ反応(一晚)の反応時間を検討した。その結果、15 時間や 18 時間に対して 12 時間という反応時間が最も心臓幹細胞の分離効率に優れている事が判った。

3、播種細胞密度と1継代当りの培養日数が C-Kit 陽性率と細胞倍化時間に与える効果の検討:

前年度までに、大まかな最適培養条件は絞られていたが、より詳細に検討する為に、最適と考えられる条件とその前後の条件で培養を行い、どの条件が最も C-Kit 陽性率の低下と細胞倍化時間の遅延を抑制できるか確かめた。その結果、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage という条件が最も C-Kit 陽性率の低下と細胞倍化時間の遅延を抑制できることが判明した(図4、図5; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, $n = 3$ 、但し 6, 7 及 9 days/passage のデータは $n = 1$)。

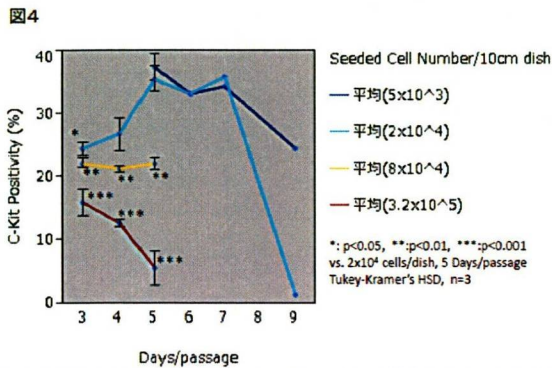


図4、播種細胞密度と1継代当りの培養日数が C-Kit 陽性率に与える効果の検討: FACS Aria を用いて単離した心臓幹細胞(C-Kit 陽性率=93.0 ± 1.9 %; 平均±標準誤差)を種々の条件で培養し、FACS Aria を用いて C-Kit 陽性率を測定した。3、4 又は 5 days/passage の条件では、各条件で3継代行い平均を算定した。6、7 又は 9 days/passage の条件では、1継代だけの試行を行い、傾向を確認した。その結果、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage の条件で、C-Kit 陽性率の低下を最も抑制できる事が判った

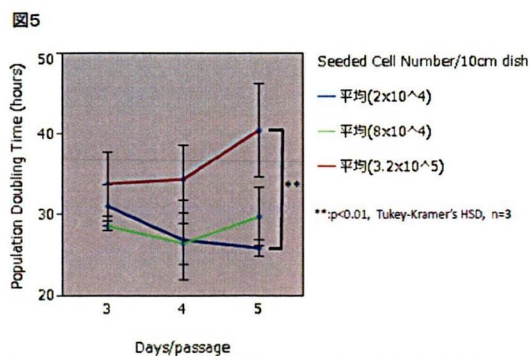


図5、播種細胞密度と1継代当りの培養日数が細胞倍化時間に与える効果の検討: FACS Aria を用いて単離した心臓幹細胞(C-Kit 陽性率 93.0 ± 1.9 %)を種々の条件で培養し、各継代時の細胞倍加時間(時間)を、播種細胞数、回収細胞数と培養時間を元に算出した。各条件(合計9条件)で3継代行い、各々の平均を算定した。その結果、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage の条件が、他の条件よりも細胞倍加時間の遅延化を抑制できる傾向にあった (**: $p < 0.01$, vs. 3.2×10^5 cells/10cm dish, 5 days/passage, $n=3$)。

4、各種心疾患と心臓幹細胞の分離効率の関係:

臨床応用を見据え、心疾患患者から心臓幹細胞が単離可能か、そして、その分離効率は患者の性別、年齢、病態に依らず同等かどうか調べた。

その結果、まず、全ての心疾患患者の組織から接着細胞(C-Kit 陰性細胞を含む)が得られる事が判った。ただ、3名の大動脈弁狭窄症患者から得られたサンプルの内、2名分のサンプルにおいては、接着細胞の数が少なく、C-Kit 陽性細胞の単離に失敗した(技術的な問題)。その他の心疾患患者由来組織からは心臓幹細胞(C-Kit 陽性)細胞の単離に成功した。

また、心臓幹細胞の分離効率は、患者の性別や年齢に依らない可能性が考えられた[図6、図7; 上述の研究結果(1、)より、右房から心臓幹細胞がより多く採取できる可能性があった為、この解析では右房由来サンプルのデータを除いた。女性 vs. 男性 = 15 ± 13 vs. 12 ± 7 , $p > 0.05$, $n = 4 \sim 7$, 年齢との有意な(逆)相関は検出されなかった; $p > 0.05$ 。]。しかしながら、心臓幹細胞の分離効率は、心筋炎患者や拡張肥大型心筋症患者由来サンプルで高くなる可能性が考えられた(図8)。

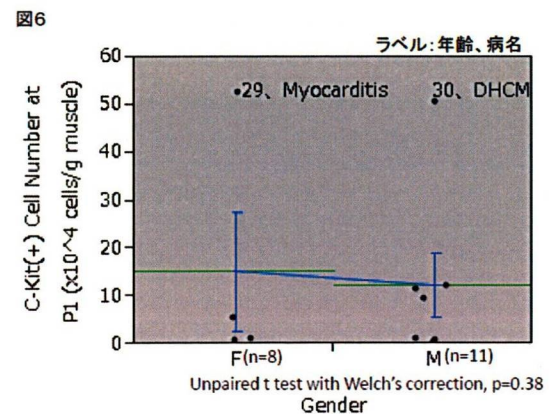


図6、性別と C-Kit 陽性細胞数の関係: 右房から得られたサンプルを除き、解析を行った。その結果、C-Kit 陽性細胞数において、男女間で有意な差は検出されなかった($p=0.38$)。

図7

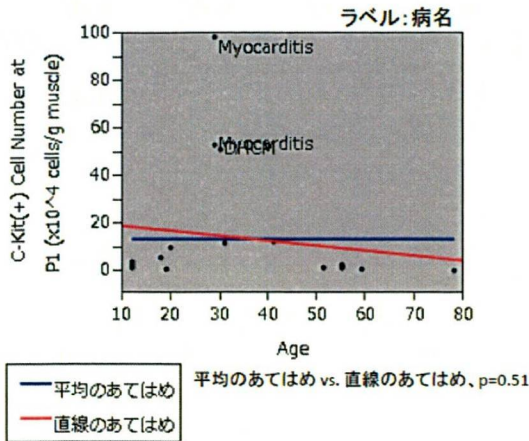


図7、年齢と C-Kit 陽性細胞数の関係：右房から得られたサンプルを除き、解析を行った。その結果、年齢と C-Kit 陽性細胞数との間に有意な相関は検出されなかった(p=0.51)。

図8

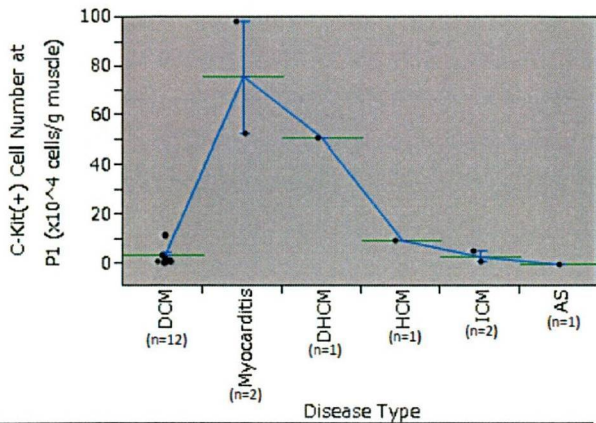


図8、病態と C-Kit 陽性細胞数の関係：右房から得られたサンプルを除き、解析を行った。心筋炎と拡張肥大型心筋症(DHCM)で C-Kit 陽性細胞数が高まる可能性が考えられた。DCM=拡張型心筋症、HCM=肥大型心筋症、ICM=虚血性心筋症、AS=大動脈弁狭窄症

5、心臓幹細胞シート作製条件の検討：

前年度までに心臓幹細胞シート作製条件(最低播種細胞密度)に関しては検討していたが、さらに高い播種細胞密度での検討を行う為に、最低播種細胞密度と考えられた条件よりも高い条件で検討を行った。その結果、17時間の培養後、 9.0×10^6 cells/3.5cm dish 以外の条件では、細胞シートが既に浮遊していた。また、 1.5×10^6 cells/3.5cm dish の条件では、細胞の一部が dish に接着したまま一部が剥離し、細胞シートが破れてい

た。 $3.0, 6.0$ 又は 9.0×10^6 cells/3.5cm dish の条件では細胞シートの作製が可能と考えられた(図9)。

図9

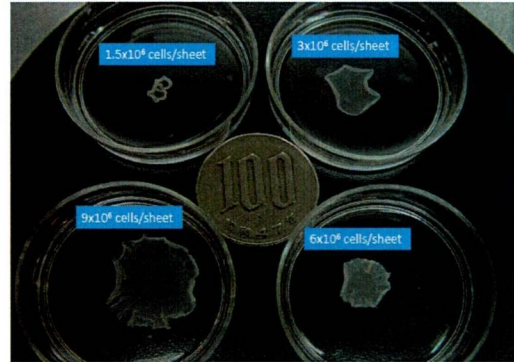


図9、心臓幹細胞シートの作製： $1.5 \sim 9.0 \times 10^6$ cells/3.5cm dish の条件で細胞シートの作製を試みた。その結果、 $3.0 \sim 9.0 \times 10^6$ cells/3.5 dish の条件で細胞シートが作製可能と考えられた。

D. 考察

前年度までの研究結果より、ヒト心臓幹細胞の大まかな培養条件と細胞シート作製条件は絞れていた。しかし、臨床応用可能な手順書の作製を見据えると、再現性の取れる定量的な指標でその手順を明確に示す必要がある為、今年度はその定量的な指標を検討した。

まず、心臓の部位と心臓幹細胞の分離効率の関係を調べた所、1gの心筋組織から採取できる心臓幹(C-Kit 陽性)細胞の数が最も多い組織が右房であるという可能性が考えられた(図2)

その他の部位に関しては、左房、中隔、右室、左室の順にその数が多い可能性が考えられた。臨床応用の際には、経皮的にカテーテルを用いて心筋組織を採取する事が想定される為、将来的な心臓幹細胞の採取源としては、右房、中隔、右室の順で適当と考えられた。右房が非常に薄い組織であり組織採取が困難であるという事を考慮すると、臨床応用を行う際の心臓幹細胞の細胞源としては、中隔、次いで右室が適当と考えられた。

続いて、組織から細胞を分離する際のコラゲナーゼ反応時間と心臓幹細胞の分離効率の関係を調べた結果、12時間のコラゲナーゼ反応が、15時間、18時間の反応に比べてより効率良く心臓幹細胞を分離できる

事が明らかとなった(図 3)。この反応は、密封した 50 ml チューブの中で、細胞の栄養源となる血清を添加せずに行っている為、反応時間が長引くと分離された細胞の一部が死ぬと考えられた。一方で、コラゲナーゼ反応は酵素反応である為、反応時間がある時間に達するまでは、その反応に依って組織から分離される細胞数が増加すると考えられた。よって、このコラゲナーゼの最適反応時間は、12 時間以内であると考えられた。臨床応用の際には、非常に少ない患者組織から大量の治療用細胞を調製する必要がある為、この反応時間の検討は重要と考えられる。よって、今後、更なる検討が必要と考えられた。

次に、単離した C-Kit 陽性細胞群の C-Kit 陽性率を維持しながら細胞倍化時間の遅延を抑制できる条件を探索する為、播種細胞密度と 1 継代当りの培養日数が C-Kit 陽性率と細胞倍化時間に与える効果を確認した。その結果、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage という培養条件が、C-Kit 陽性率の低下と細胞倍化時間の遅延を最も抑制すると判った(図 4、図 5)。一方で、 3.2×10^5 cells/dish, 5 days/passage という条件では、C-Kit 陽性率が1桁に低下し、細胞倍化時間も 40 時間程度にまで遅延した。以前から心臓幹細胞は、細胞間相互作用に因り分化するという事が知られている事、さらに、一般的に、分化した細胞は増殖能力が低下するという事が知られている為、この 3.2×10^5 cells/dish, 5 days/passage という条件では、心臓幹細胞が何らかの細胞系列に分化方向付けされたのではないかと考えられた。これらの考察から、より低い細胞密度で播種し長い期間培養すると、さらに C-Kit 陽性率の低下を抑制できるのではないかと考えられた。しかしながら、 5×10^3 cells/10cm dish, 6 days/passage の条件であっても、 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage の条件の際と、C-Kit 陽性率に関して有意な差があるとは考えられなかった為(図 4)、現段階においては 2×10^4 cells/10cm dish, 5 days/passage という条件がヒト心臓幹細胞の最適な培養条件と考えられた。付け加えて、 2×10^4

cells/10cm dish, 9 days/passage では、C-Kit 陽性率が1桁にまで低下したが、 5×10^3 cells/10cm dish, 9 days/passage の条件では、C-Kit 陽性率の低下が20% 台に留まっていた事、また、低い細胞密度条件では、ある培養日数まで C-Kit 陽性率が上昇する事、さらに、それら低い細胞密度条件では、心臓幹細胞がコロニーを形成している事から、今までに報告されている細胞間相互作用に因る心臓幹細胞の分化という現象は、同一コロニー内で起こる現象というよりも、むしろ、異なるコロニー間の接触に因り起こる現象ではないかと考えられた。このメカニズムは、心臓組織中に発生した障害部位を再生する為に心臓幹細胞が増殖すると仮定すれば、非常に合理的であると考えられた。即ち、損傷部位の修復を行う為に、心臓幹細胞が心臓組織内で増殖を行うとすれば、その増殖は、他の心臓幹細胞由来コロニーに到達するまで継続すると考えられた。さらに、臨床応用の際にこのメカニズムが利用可能となれば、心臓幹細胞を体外で効率的に増やす(分化を抑制し、細胞倍化時間の遅延を抑制する)事が可能かもしれない。1つの可能性としては、心臓幹細胞の分化に関与していると言われている Notch1 受容体由来シグナルを阻害する γ -Secretase InhibitorXXI を培養液中に添加するという方法が考えられる。

続いて、各種心疾患と心臓幹細胞の分離効率の関係を調べた。その結果、全ての心疾患患者から心臓幹細胞を単離できるが、病態に依りその分離効率が異なるという可能性が考えられた。特に、大動脈弁狭窄症の患者では、3 名の内、2 名由来のサンプルで、組織から回収できた細胞(C-Kit 陰性細胞を含む)数が極端に少ない事が観察された。この問題への対策としては、心臓幹(C-Kit 陽性)細胞を単離するまでの培養期間を、現在は合計 8 ~ 9 日間(P0 と P1 の合算)としているが、より長い期間に変更し、全細胞数を増やすという事が考えられた。病態と心臓幹細胞の分離効率等に関する検討は、今まで2報の論文で報告されており(1報はインド、もう1報はイスラエルのグループ;Aghila Rani et al. Asian