

2009060/6A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

心筋組織再生を物理的・機能的に促進する

新規再生治療用デバイスの開発

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 齋藤 充弘

平成22(2010年)年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業  
心筋組織再生を物理的・機能的に促進する新規再生治療用デバイスの開発  
平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 齋藤 充弘  
平成22(2010年)年 3月

## 目 次

### 総括研究報告書

A. 研究目的	1
B. 研究方法	3
C. 研究成果	4
D. 考察	5
E. 結論	6
F. 健康危惧情報	6
G. 研究発表	6
H. 知的財産の出願・登録状況	8

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

心筋組織再生を物理的・機能的に促進する新規再生治療用デバイスの開発

研究代表者

齋藤 充弘 大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 助教

研究要旨 心不全動物に対する細胞移植の治療効果を検証し、心筋の再生を誘導するメカニズムとその因子を同定した。さらにこれら因子の発現を誘導する低分子化合物を主体とする因子を選び出し、その安全性および有効性について心不全モデル動物にて検証を行った。結果から、心筋再生誘導を賦活化する低分子化合物を明らかにした。

A. 研究目的

循環器領域において、高齢化、虚血性心疾患の増加にともない、今後、心不全患者数の増大及びそれに伴う治療費の増加が予想され、既に高額化した医療費の高騰にさらに拍車をかけるものと思われる。重症心不全に対する現在の最終的な治療法は、補助人工心臓や、心臓移植などの置換型治療であり、これまでその有用性が報告されてきたが、現段階では前者

はその耐久性や合併症など、後者はドナーの確保や免疫抑制剤の使用等に問題があり、普遍的な治療とは言い難いのが現状である。最近、このような重症心不全に対し、これまでの置換型治療から、遺伝子工学や細胞組織工学、再生医療等を駆使した再生型治療が新しい治療法として注目されている。

近年、重症心不全患者に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告され

ており、すでに自己骨格筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されている (Hagege AA, et al. *Circulation* 1141:1108-113, 2006)。我々も、自己骨格筋芽細胞と骨髄単核球細胞移植を併用すると、単独より心機能改善効果が高いことを証明し (Memon IA, et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130(3):646-653, 2005)、大阪大学医学部付属病院未来医療センターにおいて臨床研究をすすめている。さらに、自己筋芽細胞を細胞シート工学の手法により組織化し、これを虚血性心筋症モデル動物や拡張型心筋症モデル動物に移植することにより著明な組織の改善と心機能の向上が起こることを示した (Miyagawa S, et al. *Transplantation* 80:1586-1595, 2005, Memon IA, et al. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:1333-1341, 2005, Kondoh H, et al. *Cardiovasc Res* 69(2):466-475, 2006)。しかし、この手法では、細胞シートグラフトを作製するために自己筋芽細胞を長期間培養する必要があり、緊急性の高い治療を必要とする

重症患者への対処が困難である。

一方、最近の組織幹細胞研究の進歩により、心臓においても、細胞分裂し心筋細胞に分化しうる心筋幹細胞の存在が発見された (Beltrami AP, et al. *Cell* 19:763-776, 2003, Oh H, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12313-12318, 2003, Laugwitz KL, et al. *Nature* 433(7026):647-653, 2005)。よって、従来では胚性幹細胞や骨髄間葉系幹細胞といった多分化能をもった細胞からしか再生しえないと考えられていた心筋細胞が、自己心筋組織に存在する心筋幹細胞によって再生しうる可能性が示唆された。

また、近年のナノバイオテクノロジーの発展により、材料の表面の微細構造や、幹細胞の分化誘導を制御するケモカインやそのレセプター、その他分化誘導因子などを、ナノレベルで制御することにより機能性材料を構築し、それによって幹細胞の分化や機能を自在に操作する技術 (セルマニピュレーション) が可能になり、革新的材料開発も新しい段階を迎

えたと言える。

これまでに、コラーゲンなどの生体吸収性材料からなる3次元の担体に細胞を播種し心筋組織を再生させる研究は報告されている (Li RK, et al. *Circulation* 100:II63-69, 1999)。しかし、心筋幹細胞を病巣に誘導し、かつ増殖、分化を制御して材料自身の機能によって心筋を再生するようなデバイスは現在のところ存在しない。

さらに、エラスチンに代表される弾性繊維の発現を制御する因子を組み合わせ、固定もしくは徐放するマトリックスを構築し、不全心に移植することで、心臓の弾性を回復させ、さらに心筋組織を再生させる、新規な心筋再生用デバイスの開発が可能となる。

本研究では、エラスチンに代表される弾性繊維の発現を制御する因子と、心筋の再生を誘導する因子を固定もしくは徐放するマトリックスを構築し、不全心に移植することで、心臓の弾性を回復させ、さらに心筋組織を再生させる、新規な心筋再生用デバイスを

開発する。そのため、エラスチン誘導因子と心筋再生因子の選択、マトリックスとの組み合わせの検討、そして、その安全性および有効性について重症心不全モデル動物にて検証を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. 心筋再生誘導因子の選択

心筋梗塞後2週間のモデルラットの心臓に直接、温度応答性培養皿上で作製した筋芽細胞シートを移植した後、1,4,8週後に組織を採取し、その組織の遺伝子発現を **Affymetrix Gene Chip** で解析した結果と、再生心筋組織の免疫染色結果から、心筋組織再生時に高発現する因子の抽出を行い、**HGF, VEGF, SDF-1** の3つの有力候補因子に絞り込んだ。そこで、これらの因子の産生を誘導する低分子薬剤を候補因子として選択した。

### B-2. 候補因子の *in vitro* におけ

る効果の検討

#### B-2-1. 血管誘導促進効果の検討

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) と正常ヒト皮膚線維芽細胞 (HDFB) の共培養下にて評価した。候補因子は2日ごとの培地交換時に添加し、培養 10 日後に抗 CD31 抗体により管腔の染色を行い、顕微鏡下で計測した。

#### B-2-2. 心筋再生誘導因子産生の検討

HUVEC と HDFB の共培養下に、もしくは HDF 単独培養下で培養液に候補因子を添加後、経時的に培養上清をサンプリングし、培養上清中の HGF, VEGF 濃度を ELISA キットにて測定した。さらに HGF, VEGF の遺伝子発現を解析した。

#### B-3. 候補因子の *in vivo* における効果の検討

ビーグル種成犬にペースメーカーを植え込み、230 回/分で持続的に高速ペーシングを行って拡張型心筋症モデルを作製した。ペ

ーシング開始 4 週後に候補因子を左心室心筋内に直接注入した群、もしくは sham operation を施行した。移植前後で経時的に経胸壁心エコーを用いて心機能を評価し、術後 4 週で心筋組織を採取し組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミド DNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なった。

#### C. 研究結果

##### C-1. 心筋再生誘導因子の選択

心筋組織再生時に高発現する因子として抽出した、HGF, VEGF, SDF-1 の3つの成長因子について、これらの発現と産生を



誘導する可能性の高い因子を心筋再生誘導因子の候補因子として選択し、*in vitro* および *in vivo* における、その効果を検証した。

### C-2. 候補因子の *in vitro* における効果の検討

心筋再生誘導の候補因子として選択した因子は、HUVEC と HDFB の共培養下に、HUVEC の管腔形成を促進することが明らかとなった。さらに、同様に共培養下において、HGF, VEGF, EGF, SDF-1 の産生を促進した。

以上の結果から、本因子が心筋再生誘導因子として有用であることが示された。

### C-3. 候補因子の *in vivo* における効果の検討

術後の心エコーでは、術前の状態と比して、因子移植群では有意に左室駆出率(EF)は改善していたが、sham 群では改善は認められなかった。組織学的検討においては、因子群において、有意な心筋線維化の抑制、心筋内における新生細胞の増加が認められ、リモデリン

グ抑制効果が示された。

以上の結果から、心筋再生誘導因子の候補因子は、左室のリモデリング抑制効果と心機能の改善が認められた。

### D. 考察

本研究の最も大きな特色は、心臓の機械的補助をする弾性組織の産生を促進する因子と、心筋再生を誘導する因子を固定、徐放するようなマトリックスを移植することで、自己組織の修復能力を機械的、機能的に制御し、心筋組織を再生することである。つまり、細胞移植や細胞培養など必要とせず、自己体内で自己組織修復能により心筋を再生するデバイスの開発は、末期重症心不全治療における新しい方向性を見出すことである。

昨年度までに明らかとなった、HGF, VEGF, SDF-1 などの心筋再生誘導に関連する因子が、タンパク性の因子であるため、薬剤としての安定性、体内半減期、材料と組み合わせた際の加工性が乏

しく、デバイス設計にとって障壁となっていた。そこで、本年度は、これらの心筋再生誘導に関連する因子を、生体内で誘導する、低分子化合物を主体とした因子の選択を実施した。HGF, VEGF, SDF-1 などの心筋再生誘導に関連する因子を、自らの生体内で誘導することにより、筋芽細胞シートと同様の心筋再生効果が気体され、本来持つ再生能力を賦活化することで、病態に適した再生を促進できる可能性が示唆される。さらに、本因子は低分子化合物を主体としていることから、徐放化の制御やマトリックスとの組み合わせ、デバイス設計が、タンパク性の因子と比較して容易になる。

#### E. 結論

本年度の研究成果より、心筋組織の再生を促進する低分子化合物を主体とした因子を選択した。

既存の心筋再生治療で問題となっている細胞移植や細胞培養など必要とせず、自己体内で自己

組織修復能により心筋を再生するデバイスが具体化し、次いで、本研究終了後さらに安全性と有効性が検証され臨床へ展開されれば、末期重症心不全治療における新しい方向性を見出すことが可能となり、多くの重症心不全患者の QOL を飛躍的に高めることが期待できる。社会的効果として、心移植でしか救命できない重症心不全患者を救済することが可能となる。加えて、心臓移植と比較して安価な重症心不全患者に対する根治的治療法が可能となり、医療経済へも貢献すると期待される。本研究は、基礎的研究成果の社会還元にむけた一層の加速ならびに国際競争力の強化に資するものである。

#### F. 健康危惧情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T,

Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Impaired Myocardium Regeneration With Skeletal Cell Sheets-A Preclinical Trial for Tissue-Engineered Regeneration Therapy. Transplantation. *in press*

Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(4) 985-993 (2009)

Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(2)

460-467 (2009)

Saito A, Takekita K, Miki K, Sawa Y. Crosslinked and glycated albumin such as advanced glycation end products (AGEs) induce angiogenesis in rat ischemic hindlimb. (on contribution)

#### G-2. 学会発表

宮川繁、松宮護郎、倉谷 徹、坂口太一、山内 孝、上野高義、齋藤充弘、齊藤俊輔、首藤恭広、今西悠基子、澤 芳樹「重症不全心再生治療の現状と展望」日本D D S学会 2009年7月3日

宮川繁、松宮護郎、倉谷 徹、上野高義、坂口太一、山内 孝、齋藤充弘、齊藤俊輔、首藤恭広、上仲永純、今西悠基子、澤 芳樹「虚血性心筋症に対する細胞を用いた再生型治療の現状と展望」日本冠動脈外科学会 学術大会2009年7月16日

齋藤 充弘 「細胞シートによる  
心筋再生治療の現状と展望」細胞  
シート2009 公開シンポジ  
ウム 2009年10月29日

宮川繁、松宮護郎、坂口太一、山  
内 孝、齋藤充弘、齋藤俊輔、首  
藤恭広、今西 悠基子、倉谷 徹、  
上野高義、清水達也、岡野光夫、  
澤 芳樹「重症心不全に対する自  
己細胞組織移植と左室補助人工  
心臓を用いた集学的心筋再生治  
療」 日本人工臓器学会大会 2  
009年11月13日

齋藤 充弘、宮川 繁、澤 芳樹  
「細胞シートによる心筋再生治  
療の現状と展望」第3回 Smart  
Biomaterials セミナー 2010  
年1月15日

H. 知的財産の出願・登録状況

H-1. 特許取得

特記事項なし。

H-2. 実用新案登録

特記事項なし。

H-3. その他

特記事項なし。

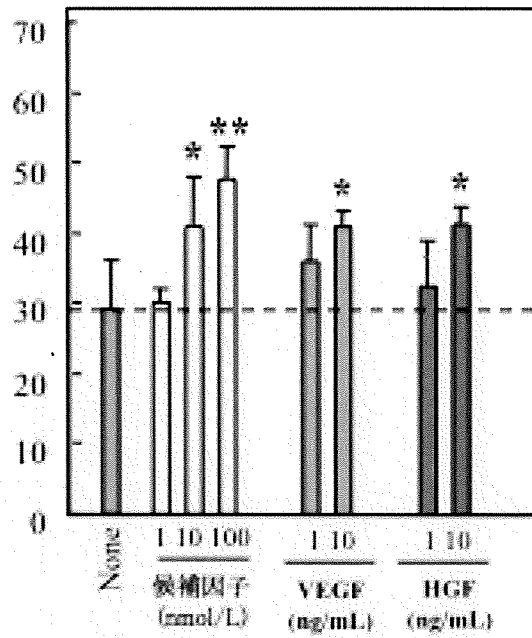


図1 血管誘導促進効果の検討

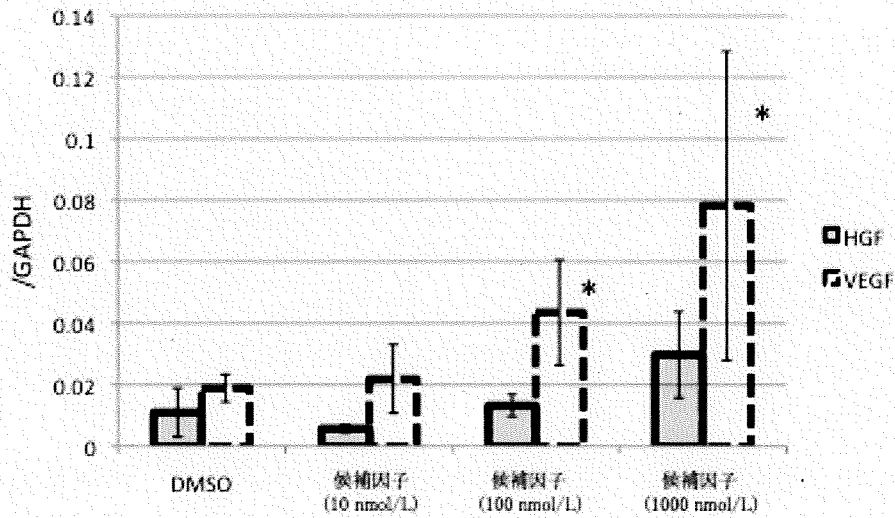


図2 心筋再生誘導因子の遺伝子発現

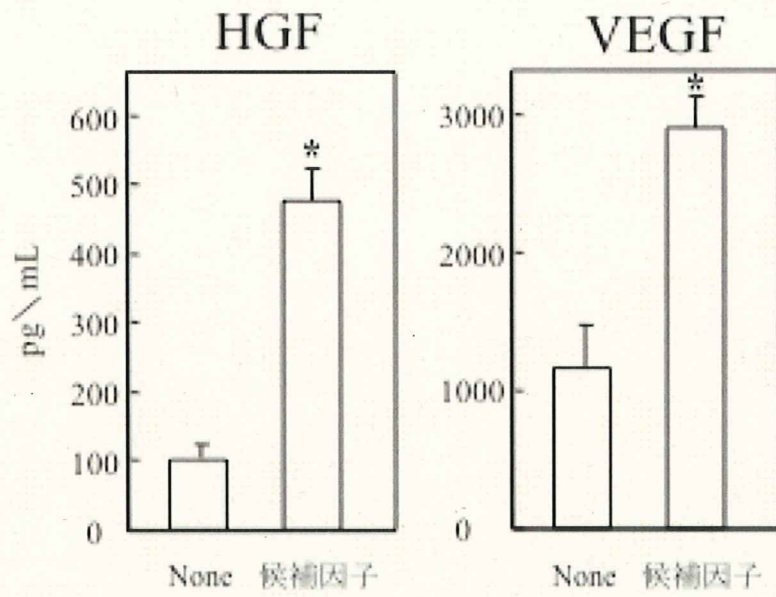


図3 心筋再生誘導因子の産生

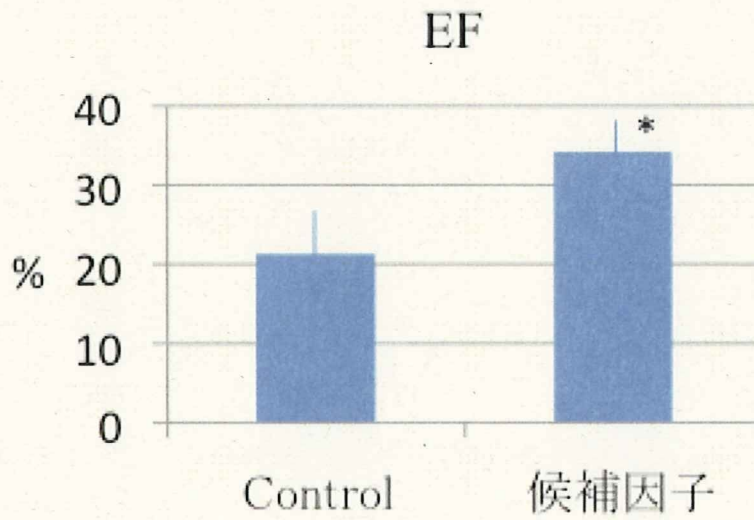
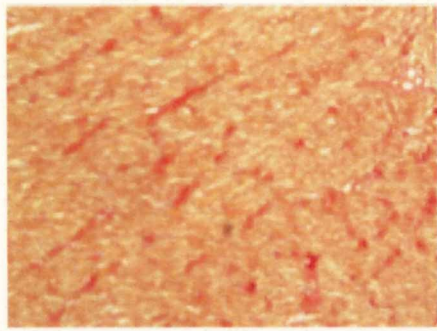
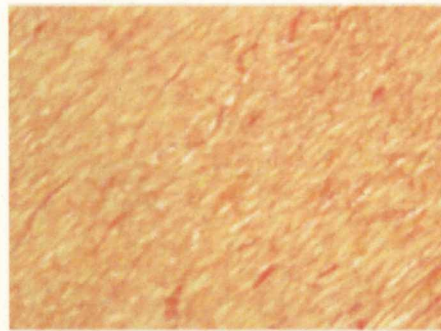


図4 左室駆出率(EF) (イヌ DCM モデル)



Control



候補因子

図4 心筋組織の繊維化 (イヌ DCM モデル)

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表



雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y.	Impaired Myocardium Regeneration With Skeletal Cell Sheets-A Preclinical Trial for Tissue-Engineered Regeneration Therapy.	Transplantation.	in press		2009
Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y.	Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart.	J Thorac Cardiovasc Surg.	138(4)	985-993	2009
Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y.	Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart.	J Thorac Cardiovasc Surg.	138(2)	460-467	2009

### III. 研究成果の刊行物・別刷

## Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart

Naosumi Sekiya, MD,<sup>a</sup> Goro Matsumiya, MD, PhD,<sup>a</sup> Shigeru Miyagawa, MD, PhD,<sup>a</sup> Atsuhiko Saito, PhD,<sup>a</sup> Tatsuya Shimizu, MD, PhD,<sup>b</sup> Teruo Okano, PhD,<sup>b</sup> Naomasa Kawaguchi, PhD,<sup>c</sup> Nariaki Matsuura, MD, PhD,<sup>c</sup> and Yoshiki Sawa, MD, PhD<sup>a</sup>

**Objective:** We previously showed that autologous myoblast sheets constructed with tissue-engineering techniques improved the function of the impaired heart. In this study, we evaluated the effects of layered myoblast sheets to clarify whether increasing the number of sheets provides improvement of cardiac function.

**Methods:** Myoblast sheets were constructed in dishes that release confluent cells from the dish surface via temperature reduction. Sixty infarcted Lewis rats underwent implantation of myoblast sheets on the infarcted area. There were 4 groups (n = 15 in each group): S1: one layer, S3: three layers, S5: five layers, and a sham group. We examined cardiac function by echocardiography and catheterization, mRNA expression by real time reverse-transcriptase polymerase chain reaction, and histology.

**Results:** The ejection fraction and end-systolic pressure–volume relationship in the S5 and S3 groups were significantly improved. End-diastolic area was significantly reduced in the S5 group. The mRNAs for hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor, and stromal cell–derived factor-1 were all up-regulated in dose-dependent fashion. On histologic examination, fibrosis was most decreased in S5, and vascular density was increased. Cellular hypertrophy was attenuated in both the S5 and S3 groups. Elastic fibers were massively up-regulated in the infarction and implanted sheets in the S5 and S3 groups, with expression of the elastin gene.

**Conclusions:** Implantation of three- and five-layered myoblast sheets yields favorable results, with better improvement of cardiac function, induction of angiogenesis, more elastic fibers, and less fibrosis. Thus, layered myoblast sheets, in optimal numbers, may attenuate adverse cardiac remodeling of the infarcted heart.

Myocardial regeneration therapy has been widely performed for myocardial infarction (MI). Cell transplantation using skeletal myoblasts has commonly been undertaken in animal models as well as in clinical trials.<sup>1,2</sup> Most myoblast transplantation studies for cardiac failure have supported the feasibility and safety of this method.<sup>3-6</sup> In these studies, the method of cell transplantation was direct myocardial injection with a fine needle. However, needle injection has some disadvantages, including loss of transplanted cells by leakage, poor survival of grafted cells, myocardial damage resulting from injury by the needle and subsequent acute inflammation,<sup>7,8</sup> and the potential to cause a lethal arrhythmia.<sup>6</sup> To overcome these disadvantages, we investigated the efficacy of a novel

transplantation technique using cell sheets grown in temperature-responsive dishes.<sup>9</sup> Myoblast sheets, without scaffolding, were implanted to treat cardiac impairment in small and large experimental animal models, and greater improvement of cardiac function was observed as compared with that obtained by needle injection and control groups.<sup>10-13</sup>

However, the method of cell delivery in these studies had several limitations, including the implantation method (implanting two-layered myoblast sheets with collagen film to keep the sheets on the heart) and delivery of an optimal number of cells. It has been unclear whether delivery of more cells will be more effective in inducing cardiac regeneration. It has also not been clearly determined whether increasing the number of layers would yield better results. Shimizu and co-workers<sup>14</sup> reported that transplanted three-layered sheets of cardiomyocytes could be vascularized in subcutaneous tissue without necrosis, but that sheets with four or five layers have areas with disorganized vasculature and primary ischemia.

Our previous reports<sup>10,11</sup> showed that implantation of two-layered, autologous myoblast sheets improved cardiac function and prevented remodeling of the infarcted heart. In this study, we tested whether increasing the number of layered myoblast sheets would enhance functional recovery and attenuate adverse cardiac remodeling of the infarcted heart to estimate the optimal number of myoblast sheet layers for regeneration of host heart.

From the Department of Cardiovascular Surgery,<sup>a</sup> Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka; the Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science,<sup>b</sup> Tokyo Women's Medical University, Tokyo; and the Department of Molecular Pathology,<sup>c</sup> Osaka University Graduate School of Allied Health Science, Osaka, Japan. This work was supported by the New Energy and Industrial Technology Development Organization in Japan.

Read at the Eighty-eighth Annual Meeting of The American Association for Thoracic Surgery, San Diego, Calif, May 10–14, 2008.

Received for publication May 15, 2008; revisions received Jan 7, 2009; accepted for publication Feb 2, 2009.

Address for reprints: Yoshiki Sawa, MD, PhD, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan (E-mail: sawa@surg1.med.osaka-u.ac.jp).

J Thorac Cardiovasc Surg 2009;138:985-93

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2009 by The American Association for Thoracic Surgery  
doi:10.1016/j.jtcvs.2009.02.004

**Abbreviations and Acronyms**

HGF	= hepatocyte growth factor
LV	= left ventricular
LVEF	= left ventricular ejection fraction
MI	= myocardial infarction
RT-PCR	= reverse-transcription polymerase chain reaction
SDF-1	= stromal-derived factor 1
VEGF	= vascular endothelial growth factor

**MATERIAL AND METHODS****Isolation of Myoblasts and Construction of Myoblast Sheets**

Myoblasts were isolated from the skeletal muscle of the anterior tibialis from 3-week-old male Lewis rats. The rats were humanely killed, and their skeletal muscles were excised and washed with Hanks balanced salt solution (Gibco, Grand Island, NY) containing  $1 \times$  penicillin–streptomycin–amphotericin B (PSA; Gibco). After the removal of as much fibrous tissue, tendons, and fat tissue as possible, the muscles were minced and enzymatically dissociated with collagenase type II (Gibco) (5 mg/mL) and trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (Gibco) for 30 minutes. The cells were collected by centrifugation (5 minutes at 280g), and the enzyme reaction was arrested by adding 20% fetal bovine serum (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio), after which the cells were spun again. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in culture medium composed of Dulbecco modified Eagle solution (Gibco) with 20% fetal bovine serum and 1% penicillin–streptomycin–amphotericin B. The initial plating was performed in noncoated 150-mm dishes (Iwaki, Tokyo, Japan) for 4 hours. Secondary plating was performed in noncoated dishes for 20 hours. After being pre-plated twice, the nonadherent cells were placed in collagen-coated 150-mm dishes (Iwaki) and incubated for 3 days, after which cell passaging was performed into five collagen-coated dishes. When the cells became approximately 70% confluent after 7 days' cultivation, they were dissociated from the dishes with trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid and reincubated on 35-mm temperature-responsive culture dishes (UpCell; Cellseed, Tokyo, Japan) at 37°C, with cell number adjusted to  $3.0 \times 10^6$  per dish. More than 70% of these cells were actin-positive and 40% to 50% were desmin-positive (Figure 1, A to D). After 24 hours, the dishes were incubated at 20°C for 30 minutes. During that time, the myoblast sheets detached spontaneously to generate free-floating, monolayer cell sheets. After detachment, the area of the sheets decreased to  $1.00 \pm 0.05$  cm<sup>2</sup>, whereas the thickness increased to  $100 \pm 10.0$  μm (Figure 1, E).

**Animals and Surgical Procedures**

Eight-week old male Lewis rats were used (220–250 g; Seac Yoshitomi Ltd, Fukuoka, Japan). All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the institutional animal care and use committee and are in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The rats were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and MI was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery under mechanical ventilation, as previously described.<sup>15</sup> Two weeks after the ligation, baseline cardiac functions were measured, and the infarcted rats underwent implantation of myoblast sheets via rethoracotomy. The rats were randomly divided into 4 treatment groups: (1) S1 group (one-sheet implantation); (2) S3 group (three-sheet implantation); (3) S5 group (five-sheet implantation); and a sham group (sham surgery alone). The myoblast sheets were implanted directly over the scar area without sutures. After detachment from the

temperature-responsive dish, each sheet was picked up individually and applied to the surface of the heart. So that the sheet could be spread, the folded areas were gently stroked with wet, round tip forceps. After 3 to 5 minutes, subsequent sheets were applied by the same technique. After treatment, the pericardium was overlapped by suturing with 8-0 Prolene polypropylene suture (Ethicon, Inc, Somerville, NJ) to prevent sheets from adhering to the chest wall.

**Assessment of Cardiac Function**

Left ventricular (LV) function of the treated rats was monitored by echocardiography 4 and 8 weeks after myoblast sheet implantation and compared with results before implantation (baseline). Cardiac ultrasonography was performed with a SONOS 5500 sonograph (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif) using a 12-MHz annular array transducer under anesthesia with diethyl ether. The hearts were imaged in short-axis 2-dimensional views at the level of the papillary muscles, and LV end-systolic area, LV end-diastolic area, and the LV dimensions at end-systole and end-diastole (LVDs, LVDd) were determined. Fractional shortening was determined as  $(LVDd - LVDs)/LVDd \times 100$ . Ejection fraction (EF) was calculated by the Pombo method, as  $EF (\%) = (LVDd^3 - LVDs^3)/LVDd^3 \times 100$ .

Eight weeks after implantation, the rats were anesthetized and placed in a supine position on a controlled heating pad, and core temperature, measured via a rectal probe, was maintained at  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . A MicroTip catheter transducer (SPR-671; Millar Instruments, Inc, Houston, Tex) and conductance (Unique Medical Co, Tokyo, Japan) catheters were placed longitudinally in the left ventricle from the apex. We connected the catheters to an Integral 3 signal conditioner–processor (Unique Medical Co, Tokyo, Japan). LV pressure and volume and the electrocardiogram were displayed and digitized on a personal computer. LV pressure–volume relations were measured by transiently compressing the inferior vena cava. Data were recorded as a series of pressure–volume loops (about 20 loops). The pressure–volume loop data were analyzed with Integral 3 software (Unique Medical Co).<sup>16</sup>

**Histologic Examination**

LV myocardial specimens were obtained 4 weeks after sheet implantation. Each specimen was fixed with 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Hematoxylin and eosin and Masson's elastic staining were performed. Picrosirius red staining to detect myocardial fibrosis and periodic acid–Schiff staining for cardiomyocyte hypertrophy were performed for specific treatment groups, as described.<sup>17</sup> Anterior wall thickness was measured in at least 3 hematoxylin and eosin–stained sections of the middle portion of the left ventricle of each heart. To label vascular endothelial cells, so that blood vessels could be counted, we performed immunohistochemical staining for factor VIII–related antigen according to a modified protocol. We used EPOS-conjugated antibody to factor VIII–related antigen coupled with HRP (Dako EPOS Anti-human von Willebrand Factor/HRP; Dako, Carpinteria, Calif) as primary antibody. The stained vascular endothelial cells were counted under a light microscope. Results were expressed as the number of blood vessels per square millimeter. Quantitative morphometric analysis for each sample was performed with MacScope software (Mitani Corporation, Tokyo, Japan). Myocardial fibrosis was expressed as percent fibrosis, the fraction of red-stained area in total myocardium, with results obtained from 10 fields per section per animal. To determine myocyte cell size, we randomly selected 10 fields from each ventricle and measured 5 randomly chosen myocytes per field.

**Measurement of Growth Factors and Elastin Gene Expression After Implantation**

Infarcted and noninfarcted LV myocardium from the rats having a ligated left anterior descending coronary artery was removed 4 weeks