

efficacies of leukocyte-depleted terminal blood cardioplegia in 24-hour preserved hearts. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 1651-1656.

- 21) Kitamura S, Nakatani T, Yagihara T, *et al.* Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan: report of two cases. *Jpn Circ J* 2000; 64: 333-339.
- 22) Carrier M, Leung TK, Solymoss BC, *et al.* Clinical trial of retrograde warm blood reperfusion versus standard cold topical irrigation of transplanted hearts. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1310-1315.
- 23) 日本心臓移植研究会. 本邦心臓移植登録報告. 移植 2008; 43 (印刷中).
- 24) Shirakura R, Matsuda H, Nakano S, *et al.* Cardiac function and myocardial performance of 24-hour-preserved asphyxiated canine hearts. *Ann Thorac Surg* 1992; 53: 440-444.



展 望

TENBO

心臓疾患における幹細胞移植治療の 現状とその追跡法



橋 洋一
Tachibana Yoichi



山岡 哲二
Yamaoka Tetsuji

(国立循環器病センター研究所)

1 はじめに

アテローム（粥腫）性動脈硬化による心筋梗塞が引き起こす心筋の機能不全は、成人の死亡の大きな原因となっている。ダメージを受けた左心室はリモデリング状態（梗塞により心室の形態が変化する状態）へと移行し、筋細胞の減少と繊維化を伴いながら、心室の拡張が進む。これは、本来備わっている心筋の修復、再生のメカニズムを失っている状態である。心筋梗塞に対する治療法として、様々な細胞を梗塞部位に移植する研究が進められている。重度な心筋梗塞モデル動物を用いた実験において、骨髄細胞を注入することで、心室の機能の改善が観察されている。しかしながら、その効果が骨髄細胞中の造血系幹細胞によるのか、あるいは内皮細胞前駆細胞によるのか、全く明らかになっていない。そのような中、心筋梗塞に対して、骨髄から得られる間葉系幹細胞が治療に適しているとのことが知られるようになってきた。

2 間葉系幹細胞について

間葉系幹細胞は、骨髄における非造血性部位に存在しており、造血細胞群の増殖・分化への適切な造血微細環境を提供している。*In vitro*においては、接着性、コロニー形成能、非食性、繊維芽細胞様を有しており、自己再生や多分化能を持つ細胞として知られている。適切な実験条件において骨、軟骨、脂肪細胞への分化が可能である^{1,2)}。更に、神経細胞^{3,4)}、造血系細胞などへの分化も確認されている。また、間葉系幹細胞は、前記の分化能に加えて、免疫学的に未成熟であることも発見されている。間葉系幹細胞に対して、リンパ球増殖による免疫応答が見られないため、同種または異種の細胞移植を行っても、レシピエント（移植を受けた患者）の間葉系組織にドナーの間葉系幹細胞が生着しやすいと考えられている。しかしながら、今日においても、Stro1+、SH2+ (CD105+)、CD34-、CD45-、CD14-などの表面マーカーそれぞれ、もしくは組み合わせることによって

間葉系幹細胞を定義するしかなく、特異的なマーカーはいまだに間葉系幹細胞集合体から単離されていない現状である。純粋な間葉系幹細胞を得ることが可能になれば、細胞移植治療における再生効果・効率の向上及び安全性の確保に繋がるため、非常に重要なテーマである。現在、我々のグループにおいて、表面マーカー密度の差による純粋な間葉系幹細胞の分離方法に成功しつつある。

3 間葉系幹細胞の心筋組織への分化誘導

様々な研究により、物理的なもしくは非物理的な刺激によって、間葉系幹細胞は心筋細胞のような性質を示すことが知られてきた。特定の条件下で、間葉系幹細胞は筋管のような構造を持ち、時間の経過と共に振動を示す細胞へと分化した。この細胞は、心筋細胞に特有の構造（サルコメア、中心に位置した核や心房の顆粒など）が見られ、機能的特徴（ペプチドの産生や収縮性タンパクの発現など）を有するため、心筋細胞だと考えられる^{5,6)}。間葉系幹細胞への刺激だけでなく、メディアエターおよび細胞同士の相互作用による心筋細胞への分化誘導も研究されている。現在、間葉系幹細胞と心筋細胞を共培養することによって、ミオシン重鎖、ベータアクチン、トロポニンTのような心筋細胞に特有のフェノタイプ（表現型）を発現することが報告されている。しかし、間葉系幹細胞を心筋細胞用の培地のみで培養すると、ベータアクチンの発現しか観察されないため、間葉系幹細胞を心筋細胞へと分化誘導するためには、直接的な細胞同士の相互作用が必須と考えられる⁷⁾。また、間葉系幹細胞は、血管新生、血管の増大など血管形成に必要な血管平滑筋細胞や内皮細胞へ分化することも報告されている⁸⁾。

心筋梗塞モデルを用いた前臨床試験より、冠動脈投与あるいは心筋内投与後、移植された間葉系幹細胞が心筋内に滞在し、その環境に依存した影響を受けて分化する可能性が示されてい

る。移植された細胞は、新たに心筋細胞のマーカー（ミオシン重鎖、 α -actinin, トロポニンT, ホスホランバン）を発現していた^{9,10)}。これより、移植した間葉系幹細胞が心筋細胞へと分化し、機能の回復の一助となっている可能性もある。

しかしながら、細胞移植療法のメカニズムはいまだ不明な部分が多い。すなわち、組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の増殖により機能が回復したためによるのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエントが反応することで治療したパラクライン効果によるものかは全く不明である。その最大の原因は、特に大動物において、移植した細胞を見分けることが困難なためであり、*in vivo* において非侵襲的に、かつ、長期間に細胞をイメージングする技術の開発が求められてきた。

4 *In vivo* における幹細胞追跡法

非侵襲に移植細胞をイメージングすることは、学術的な側面（メカニズムの解明）だけでなく、臨床的な側面（ターゲットとなる組織への到達、組織内での細胞の生存、細胞の機能性の評価）からも非常に重要なことである。この *in vivo* イメージングを達成するためには、移植細胞をレシピエントの細胞と区別する工夫が必要であり、かつ、イメージング機器が検出できる十分な量の細胞（トレーサー・造影剤）が必要となる。更に、幹細胞のイメージングに用いるトレーサー・造影剤として、生体適合性、高い安全性、非毒性などの条件を有してはならない。また、遺伝子の変異を起こさないことも重要な要素となる。以下に、主に使用されている3つのイメージング方法について記した¹¹⁾（表1）。

4.1 光イメージング

幹細胞の光イメージングは、現在最も研究が進んでいる分野であり、主に2つの手法が存在

表1 移植細胞の *in vivo* 追跡法

モダリティー	Contrast agent	長所	欠点
光	ルシフェラーゼ基質 赤色蛍光	空間分解能 (表層) 感度 時間分解能	小動物に限定 細胞分裂による希釈
SPECT, PET	^{99m} Tc, ¹¹¹ In など ¹⁸ F, ¹²⁴ I など	感度 時間分解能 大動物でも可	放射活性物質の使用 細胞の遺伝子改変
MRI	ランタノイド金属(Gdなど) USPIO など	空間分解能 大動物でも可	細胞分裂による希釈

する。1つは発光を用い、もう1つは蛍光を用いる方法である。移植する細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、移植後、ルシフェリンを投与することで、細胞内の酸化反応による発光を *in vivo* 蛍光発光イメージング装置などで検出することができる¹²⁻¹⁶⁾。この手法により、高感度かつ容易に細胞を追跡することが可能である。しかしながら、ルシフェリン発光は約560 nm程度の可視光の放出によるため、組織での吸収と散乱が起こる。そのため、ラット以下の小動物や大動物においても表層での実験系に留まらざるを得ない。また、ヒトへの応用展開を考慮に入れた場合、ヒト以外の遺伝子、基質を用いることが問題となる。今後、組織に関係なく体内を通過できる赤外領域での発光の研究が望まれる。

蛍光イメージングにおいては、蛍光タンパクや Quantum dot などが細胞ラベリングに用いられている¹⁵⁻²²⁾。可視領域における光の吸収、散乱を防ぐために、赤外領域(700~1,000 nm)の蛍光が選択されている。しかしながら、蛍光イメージングにおいても、発光と同じように組織表面からの検出深度に大きな問題がある。大動物での *in vivo* における使用は、手術中など、用途が限定されてしまう。

4.2 SPECT, PET イメージング

Single-photon Emission Computed Tomography (SPECT) や Positron Emission Tomography (PET) を用いた *in vivo* における細胞イメージングは、活発に研究されている。SPECT・PETは高い感度を有するため、細胞数などに関してより定量的な議論が可能である。

SPECT や PET を用いた幹細胞イメージングは、直接レーザーを細胞内に導入する、または、レセプターを介し、細胞へ結合させるなどの手法が取られている²³⁻²⁶⁾。直接細胞内へ導入する方法では、長期間、放射線にさらされること及び幹細胞内のレーザーが他の細胞内へ取り込まれてしまう問題点が考えられる。レセプター介在型細胞トラッキングでは、移植細胞がレセプターを発現しているかぎり半永久的に細胞の追跡ができ、細胞分裂によってもシグナルは希釈されない利点がある。一方、生体に存在しないレセプターを安定に発現させる必要があり、また撮像ごとに放射性リガンド基質を静注しなくてはならない。例えば、herpes simplex virus type-1 thymidine kinase (HSV1-TK) を発現させた幹細胞を移植した後に、HSV1-TKの基質である¹⁸FHBGを注入することで、移植細胞のイメージングが可能である²⁷⁾。幹細胞の遺伝

子的操作や幹細胞、基質の被ばくなど、問題点はあるものの、数か月にわたって、高感度で幹細胞の追跡と定量化が可能な有用な手法である。投与される 10~20 mCi はトレーサー分子として $3.5\sim 7\times 10^{12}$ 分子に相当する。バックグラウンドに対してシグナルとして検出するためには、 10^9 のトレーサー分子が必要とされるため、*in vivo* において細胞（細胞群）を検出するためには、静注した総量の約 0.01% が移植細胞に集積しなければならない。これは、非常に困難であり、他の細胞によるトレーサー分子の取り込みとともに、標的細胞への集積効率向上の一層の工夫が必要とされる。

4.3 MRI イメージング

3D イメージングが可能であり、安全性の高い magnetic resonance imaging (MRI) は *in vivo* における細胞追跡に最も用いられているイメージング機器といえる。

MRI を用いた幹細胞のイメージングにおいて、T2/T2* による造影が最も用いられているといえる。エンドサイトーシスを利用して細胞内

のエンドソーム内に ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) を取り込ませ、移植幹細胞の周囲に磁場を形成させる手法が一般的である^{15,21,28-32}。USPIO の有する磁場は非常に大きいため、高磁場において、細胞の検出に必要な細胞に取り込ませる造影剤の数は数千のオーダーでよい。このため、幹細胞のトラッキングのため、多くの研究がなされている。この研究においての問題点は、細胞分裂により細胞内における造影剤の量に希釈がかかること、アーチファクトの影響により定量性が出しにくいこと、幹細胞の崩壊後、マクロファージなどによる他の細胞へ取り込まれてしまうことなどが挙げられる。また、造影剤が組織へ残存することから、長期間の細胞移植追跡には不向きであると考えられる。

また、MRI として T1 短縮を利用した撮像法も存在する。この場合、 Gd^{3+} などのランタノイド系列の金属が造影剤として用いられる^{22,33,34}。現在、一般的に使用されている磁場強度において、幹細胞を検出するためには、50~500 μM

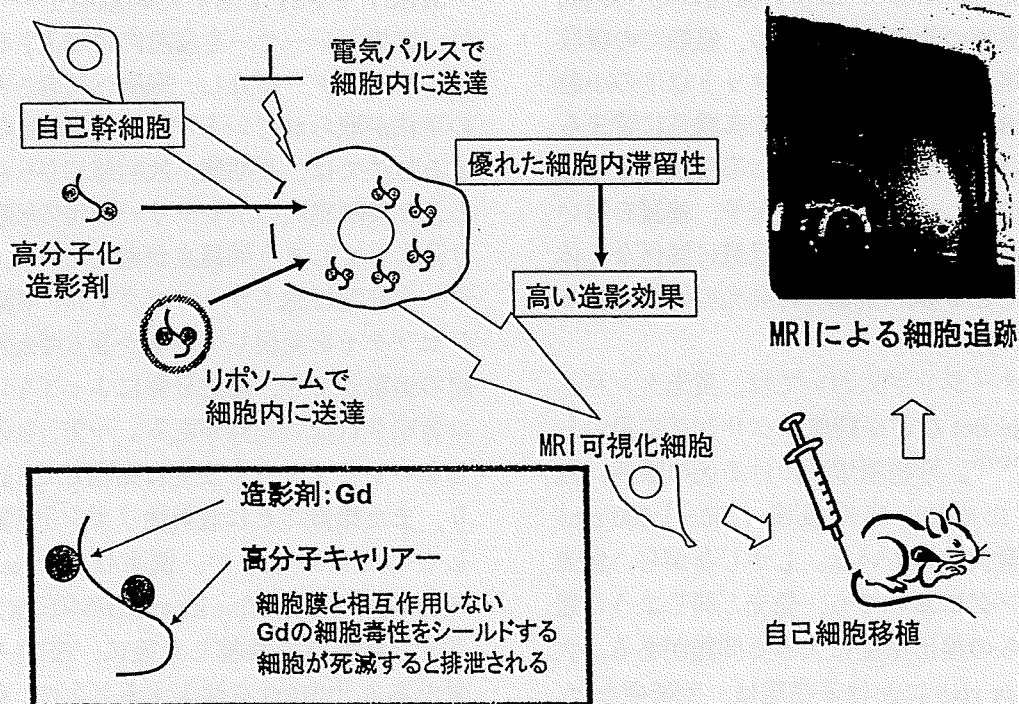


図1 移植した幹細胞のMRI追跡システム

の濃度が必要である。T1 短縮イメージングにおいて、シグナルは強調されるため、アーチファクトの影響を受けにくいという利点が存在するが、T2/T2* イメージングと同様の問題点がある。

そこで、我々のグループでは、ポリビニルアルコールを主鎖とし、 Gd^{3+} キレートを側鎖に有する MRI 用造影剤の開発を行った (図 1)。ガドリニウム錯体分子 (図 1 中: ⊙) の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、ポリビニルアルコールを高分子キャリアーとして用いた。ポリビニルアルコールは、その高い親水性のため細胞膜との相互作用が非常に低いことが知られている³⁵⁾。そのため、この造影剤を細胞膜内に導入させることで、細胞内に長時間滞在することが可能である。また、ポリビニルアルコールは、筋内からの半減期が数時間と非常に短いため、幹細胞が死滅した場合、造影剤は周囲細胞に取り込まれることなく速やかに体外へと排出されることが期待される。すなわち、生体内で生存し続けている移植細胞のみをイメージングすることが可能である。ポリビニルアルコールと結合させることにより、細胞滞留性が向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではなくなる。そこで、細胞に微弱な電氣的ショックを加える手法により、細胞内に高分子化造影剤を送達した。

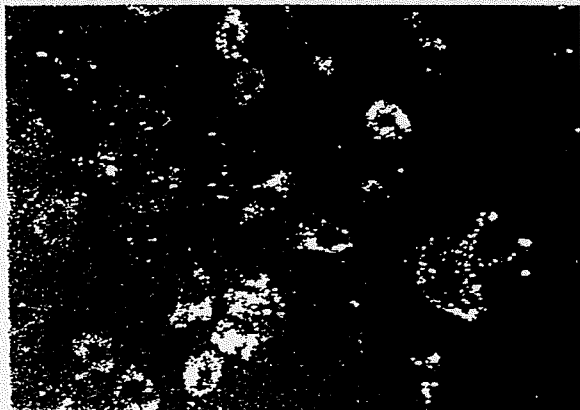


図 2 造影剤が送達された細胞の顕微鏡写真

このような物理的・機械的手法を選択することで、細胞の種類を問わず同一条件で、本造影剤を送達することが可能となった。ラット間葉系幹細胞を、本造影剤にて標識し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、ほとんどすべての細胞に造影剤が導入されていた (図 2)。また、リング状に観察されたことから、細胞の核ではなく、細胞質に導入されていることが分かった。継代を行った後も造影剤は確認されたことから、細胞内で非常に安定に存在しているといえる。その細胞内安定性は、10 日間にわたり、細胞からの造影剤の有意な漏出は認められなかった。このことより、1 年程度は、移植細胞を MRI により追跡できる性能を有していると考えられる。図 3 は、標識した細胞を皮下に埋入したマウスの MRI 断層写真である。移植細胞がはっきりと確認できる。本システムにより、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、有効な移植細胞数を実証することで、最低限のリスクで最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になるであろう。

4.4 マルチモダリティイメージング

このように、それぞれの機器には利点及び欠点を有するため、近年では、複数の機器に対応した造影剤の開発が行われている。蛍光ラベルを行った USPIO を細胞内に導入することで、

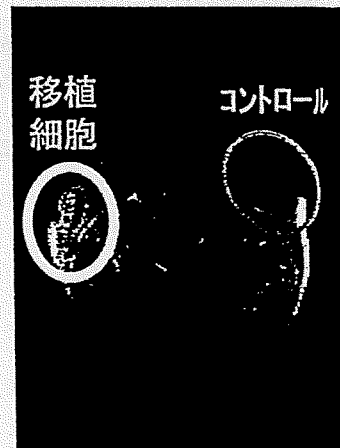


図 3 マウスに移植した細胞の MRI 撮像

光, MR イメージングを可能とし^{15,21)}, ナノパーティクルを用いることで, MR, 超音波, 蛍光イメージングを行う研究²²⁾なども行われている。また, 赤色蛍光, ルシフェラーゼ, HSV1-TK をコードされたタンパクを用いて, 光, PET, SPECT イメージングが達成されている。現在, このようなマルチモダリティな手法を用いた細胞追跡技術の研究が主体となっている。

5 おわりに

最近, 骨格筋芽細胞の移植による心不全治療の臨床例が大阪大学より報告され, 今後ますます, 細胞移植療法が注目されるであろう。今後, 細胞移植療法が, 一般的な治療法となるためには, 組織病理学的手法に加えて, 前述したようなイメージング法を駆使しながら, *in vivo* における回復過程のメカニズムを解明することが必須である。

参考文献

- 1) D. J. Prockop, *et al.*, *Science*, **276**, 71-74 (1997)
- 2) M. F. Pittenger, *et al.*, *Science*, **284**, 143-147 (1999)
- 3) W. Deng, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 148-152 (2001)
- 4) S. Ramos J, *et al.*, *Exp Neurol*, **164**, 247-256 (2000)
- 5) S. Tomita, *et al.*, *Circulation*, **100**, II247-II256 (1999)
- 6) S. Makino, *et al.*, *J Clin Invest*, **103**, 697-705 (1999)
- 7) N. Nagaya, *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **287**, 2670-2676 (2004)
- 8) G. Ferrari, *et al.*, *Science*, **279**, 1528-1530 (1998)
- 9) R. S. Tuan, *et al.*, *Arthritis Res Ther*, **5**, 32-45 (2003)
- 10) J. J. Minguell, *et al.*, *Exp Biol Med*, **231**, 39-49 (2006)
- 11) J. V. Frangioni, *et al.*, *Circulation*, **110**, 3378-3384 (2004)
- 12) X. Wang, *et al.*, *Blood*, **102**, 3478-3482 (2003)
- 13) N. Zhang, *et al.*, *Blood*, **103**, 617-626 (2004)
- 14) D. E. Kim, *et al.*, *Radiology*, **241**, 822-830 (2006)
- 15) Z. Li, *et al.*, *Stem Cells*, Published online (2008)
- 16) M. Tanaka, *et al.*, *Circulation*, **112**, I105-I110 (2005)
- 17) X. Michalet, *et al.*, *Science*, **307**, 538-544 (2005)
- 18) A. B. Rosen, *et al.*, *Stem Cells*, **25**, 2128-2138 (2007)
- 19) F. Tögel, *et al.*, *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F31-F42 (2005)
- 20) A. K. Hadjantonakis, *et al.*, *BMC Biotechnology*, **4**, 33 (2004)
- 21) K. A. Hinds, *et al.*, *Blood*, **102**, 867-872 (2003)
- 22) M. Modo, *et al.*, *NeuroImage*, **17**, 803-811 (2002)
- 23) F. Cao, *et al.*, *Circulation*, **113**, 1005-1014 (2006)
- 24) N. Adonai, *et al.*, *PNAS*, **99**, 3030-3035 (2002)
- 25) W. J. Kang, *et al.*, *J Nucl Med*, **47**, 1295-1301 (2006)
- 26) D. L. Kraitchman, *et al.*, *Circulation*, **112**, 1451-1461 (2005)
- 27) P. D. Acton, *et al.*, *Q J Nucl Med Mol Imaging*, **49**, 349-360 (2005)
- 28) J. W. M. Bulte, *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab*, **22**, 899-907 (2002)
- 29) S. A. Anderson, *et al.*, *Blood*, **105**, 420-425 (2005)
- 30) J. M. Hill, *et al.*, *Circulation*, **108**, 1009-1014 (2003)
- 31) J. W. M. Bulte, *et al.*, *PNAS*, **96**, 15256-15261 (1999)
- 32) D. L. Kraitchman, *et al.*, *Circulation*, **107**, 2290-2293 (2003)
- 33) M. Liu, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **347**, 133-140 (2006)
- 34) D. Orlic, *et al.*, *Circ Res*, **91**, 1092-1102 (2002)
- 35) T. Yamaoka, *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol*, **47**, 479-486 (1995)

細胞移植と分子イメージング

*1国立循環器病センター研究所生体工学部, *2ヒューマンサイエンス振興財団

山岡 哲二*1, 橋 洋一*1,2

Tetsuji YAMAOKA, Yoichi TACHIBANA



1. はじめに

再生医療の諸戦略を筆者なりに整理すると図1のようになる。概念的発端は1993年に報告された、ポリグリコール酸不織布に軟骨細胞を播種した*in vivo*軟骨再生である(図1-②)。産業的には、*in vitro*組織再生(図1-③)が強く望まれ、2007年には、我が国初の細胞組織加工製品である重症熱傷治療用自家培養皮膚製品が承認されるに至った。技術的な完成から長い年月がかかったが、細胞や組織を含む医療機器の幕開けの年となった。スキャホールドと細胞からなる再生医療戦略と比較して、何れかのみを利用する単純な戦略が臨床的には有利である。最も単純と考えられたGTR(図1-①)は、神経誘導管や人工真皮として実現されている。また近年は、様々な周辺科学の発展から、細胞移植療法(図1-④)が実現性の高い再生医療戦略として注目されている。

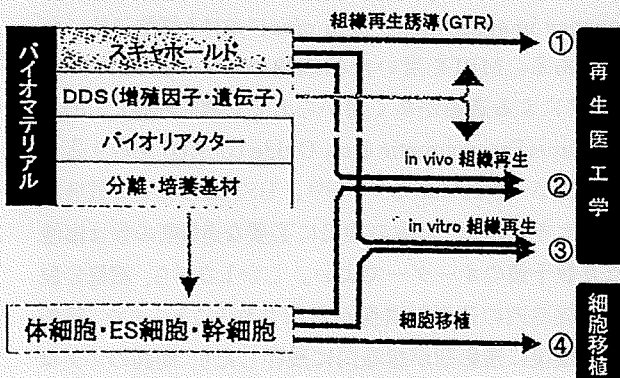


図1 再生医療の戦略

■ 著者連絡先

国立循環器病センター研究所先進医学センター生体工学部
(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)
E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

2. 細胞移植

ES細胞が様々な同種細胞源として大きく期待されているところに、iPS細胞の報告により自己細胞移植医療の可能性が大きく広がった。さらに、ヒト細胞組織加工医薬品等の品質・安全性評価指針「1314号通知」が、近日に、自己由来製品と同種由来製品に分けて改訂される方針である。その結果、自己細胞の臨床利用が加速すると期待できる。一方で、導入遺伝子の問題やテラトーマなど、まだ課題は残る。

それに対して、骨髄間葉系幹細胞や脂肪由来幹細胞など、患者自身から採取可能な自己細胞の移植医療は、倫理面、制度面におけるハードルが比較的 low、高い実現性を有する再生医療戦略である。

例えば、心疾患に対して、骨格筋芽細胞、脂肪由来幹細胞、間葉系幹細胞などの移植が検討されている。骨髄に存在する間葉系幹細胞は、患者本人からの単離が可能であり、一般的には、骨髄細胞中の接着性細胞として粗精製されて用いられる。Stro-1+, SH2+ (CD105+), CD34-, CD45, CD14-などの表面マーカーの組み合わせによって特定可能であり、その細胞集団は多くのポピュレーションを含んでいる。適切な実験条件において骨、軟骨、脂肪、神経、造血系の細胞、あるいは、血管平滑筋細胞や内皮細胞へ分化することも報告されている。さらに、間葉系幹細胞と心筋細胞を共培養することによって、心筋細胞に特有の表現型を発現すること、また、直接的な細胞同士の相互作用が必須との報告もある¹⁾。心筋梗塞モデル動物へ移植された間葉系幹細胞は、心筋細胞のマーカーを発現する心筋様細胞への分化が報告されている^{2),3)}が、自己拍動する心筋様細胞への分化については、未だ、議論中のようだ。このように、様々な分化能をもつ間葉系幹細胞を移植した場合、心筋細

表1 移植細胞の *in vivo* 追跡法

モダリティー	ContraTst agent	長所	欠点
光	ルシフェラーゼ基質 赤色蛍光	空間分解能(表層) 感度 時間分解能	小動物に限定 細胞分裂による希釈
SPECT, PET	^{99m} Tc, ¹¹¹ In など ¹⁸ F, ¹²⁴ I など	感度 時間分解能 大動物でも可	放射活性物質の使用 細胞の遺伝子改変
MRI	ランタノイド金属(Gdなど) USPIO など	空間分解能 大動物でも可	細胞分裂による希釈

胞への分化などの直接的効果が主か、産生する生理活性物質などに起因するバラクライン効果が主かを識別することは極めて困難である。これらを解明するためにも、移植した細胞を非侵襲的に、かつ、長期間にイメージングする技術の開発が必要となる。

3. *In vivo* 細胞追跡

非侵襲に移植細胞を *in vivo* イメージングすることは、臨床的な移植効率の最適化(移植数や移植のタイミング、組織生着率、生存期間、機能性の評価)からも非常に重要である。そのためには、移植細胞をレシピエントの細胞と区別する工夫が必要であり、かつ、幹細胞のイメージングに用いるトレーサー・造影剤として、生体適合性、高い安全性、非毒性などの条件を有していなくてはならない。また、遺伝子の変異を起こさないことも重要な要素となる。以下に、近年使用されている3つのイメージング方法について記した⁴⁾(表1)。

1) 光イメージング

幹細胞の光イメージングは、現在最も研究が進んでいる分野であり、主に2つの手法が存在する。一つは発光を、もう一つは蛍光を用いる方法である。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を移植後、ルシフェリンを投与することで、生体内で発光させ、近年急速に普及してきた *in vivo* 蛍光発光イメージング装置で検出できる^{5)~7)}。しかしながら、ルシフェリン発光の波長が約560 nmで組織透過性に劣るため、マウスやラットなどの小動物実験に限られる。近年、組織に関係なく体内を通過できる長波長発光の研究が急速に進んでいる。蛍光イメージングにおいては、長波長蛍光タンパク(700~1,000 nm)やQuantum dotなどが開発されてきた^{8)~10)}。

2) SPECT, PETイメージング

Single-photon Emission Computed Tomography (SPECT)

やPositron Emission Tomography (PET)を用いた *in vivo* における細胞イメージングは、深部観察も可能で、細胞数などに関してより定量的な議論ができる。この場合、直接レーザーを細胞内に導入する、または、レセプターを介して細胞へ結合させる手法が取られている^{11)~13)}。前者では、長期間、放射線にさらされる問題点がある。レセプター介在型細胞トラッキングでは、移植細胞がレセプターを発現しているかぎり半永久的に細胞の追跡ができ、細胞分裂によってもシグナルは希釈されない。例えば、herpes simplex virus type-1 thymidine kinase (HSV1-TK)を発現させた幹細胞を移植した後に、HSV1-TKの基質である¹⁸FHBGを注入することで、移植細胞のイメージングができる¹⁴⁾。高感度で長期間、幹細胞の追跡と定量化が可能となる有用な手法である。今後、非特異的なトレーサー分子の取り込み抑制による標的細胞への集積効率の向上が必要とされる。

3) MRIイメージング

3Dイメージングが可能であり、安全性の高いmagnetic resonance imaging (MRI)は *in vivo* における細胞追跡にも有利である。MRIを用いた幹細胞のイメージングでは、T2/T2*による造影が多く用いられる。標的細胞にUltra-small SuperParamagnetic Iron Oxide (USPIO)を取り込ませる手法が一般的である^{6),15),16)}。USPIOの有する磁場は非常に大きいため、細胞の検出に必要な造影剤の数は細胞あたり数千個のオーダーでよい。しかしながら、細胞分裂により細胞内の造影剤濃度が希釈されること、また、幹細胞の崩壊後に造影剤が組織内に残存したり、周囲のマクロファージなどに取り込まれたりするために、長期間の細胞移植追跡には不向きである。

また、Gd³⁺などのランタノイド系列の金属の利用もある^{17)~19)}。一般的な磁場強度で検出するためには、50~500 μMの濃度が必要である。我々のグループでは、主鎖

としてポリビニルアルコールを用い、蛍光物質とGd³⁺キレートとを側鎖に有するMRI用造影剤の開発を行った。ポリビニルアルコールは、その高い親水性のため細胞膜との相互作用が非常に低いことが知られている²⁰⁾。そのため、この造影剤を細胞膜内に導入させることで、細胞内に長時間滞在することが可能である。また、ポリビニルアルコールの組織中半減期が非常に短かく、移植細胞が死滅した場合に造影剤が周囲細胞に取り込まれることなく速やかに体外へと排出されるため、生体内で生存している移植細胞のみをイメージングすることが可能である。合成した造影剤を、エレクトロポレーションにより細胞内に送達したところ、ほとんど全ての細胞に造影剤が導入されていた。また、細胞の核ではなく、細胞質に導入されており、細胞から漏洩することなく、細胞内での高い安定性を得ることに成功した。本システムにより、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、有効な移植細胞数を実証することで、最低限のリスクで最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になる。

4. おわりに

それぞれのイメージング法には利点と欠点があるため、近年では、複数の機器を利用したマルチモダリティイメージングが注目されている。蛍光ラベルを行ったUSPIOを細胞内に導入することで、光、MRイメージングを可能とし^{6),15)}、ナノパーティクルを用いることで、MR、超音波、蛍光イメージングが行える¹⁸⁾。今後、様々なイメージングに基づいた、新たな現象や治療効果の解明が待たれる。

文 献

- 1) Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al: Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: 2670-6, 2004
- 2) Tuan RS, Boland G, Tuli R: Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5: 32-45, 2003
- 3) Minguell JJ, Erices A: Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med* 231: 39-49, 2006
- 4) Frangioni JV, Hajjar RJ: *In vivo* Tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation* 110: 3378-84, 2004
- 5) Kim DE, Tsuji K, Kim YR, et al: Neural stem cell transplant survival in brains of mice: Assessing the effect of immunity

and ischemia by using real-time bioluminescent imaging. *Radiology* 241: 822-30, 2006

- 6) Li Z, Suzuki Y, Huang M, et al: Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells* Published online 2008
- 7) Tanaka M, Swijnenburg RJ, Gunawan F, et al: *In vivo* Visualization of cardiac allograft rejection and trafficking passenger leukocytes using bioluminescence imaging. *Circulation* 112: I105-10, 2005
- 8) Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, et al: Quantum dots for live cells, *in vivo* Imaging, and diagnostics. *Science* 307: 538-44, 2005
- 9) Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, et al: Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative *in vivo* three-dimensional fluorescence Analysis. *Stem Cells* 25: 2128-38, 2007
- 10) Tögel F, Hu Z, Weiss K, et al: Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F31-42, 2005
- 11) Cao F, Lin S, Xie X, et al: *In vivo* Visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113: 1005-14, 2006
- 12) Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, et al: Tissue distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 47: 1295-301, 2006
- 13) Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, et al: Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* 112: 1451-61, 2005
- 14) Acton PD, Zhou R: Imaging reporter genes for cell tracking with PET and SPECT. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 49: 349-60, 2005
- 15) Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, et al: Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* 102: 867-72, 2003
- 16) Anderson SA, Glod J, Arbab AS, et al: Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood* 105: 420-5, 2005
- 17) Liu M, Guo YM, Wu QF, et al: Paramagnetic particles carried by cell-penetrating peptide tracking of bone marrow mesenchymal stem cells, a research *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 133-40, 2006
- 18) Modo M, Cash D, Mellodew K, et al: Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 17: 803-11, 2002
- 19) Orlic D, Hill JM, Arai AE: Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 91: 1092-102, 2002
- 20) Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y: Comparison of body distribution of poly (vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration. *J. Pharm. Pharmacol* 47: 479-86, 1995

Preservation of Porcine Hepatocytes in Three-Dimensional Bioreactor at Room Temperature Using Epigallocatechin-3-Gallate

Azizi Miskon, M.Eng.,¹⁻³ Tetsuji Yamaoka, Ph.D.,¹ Suong-Hyu Hyon, Ph.D.,⁴
Makoto Kodama, Ph.D.,³ and Hiroshi Uyama, Ph.D.²

A bioartificial liver (BAL) assist system employing a three-dimensional (3D) bioreactor has been studied as a temporary support in liver failure. In the present study, a novel preservation method of primary cultured porcine hepatocytes in monolayer and 3D culture systems was studied. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which has recently been found to have various bioactivities, was selected as a key compound for hepatocyte preservation. Hepatocytes isolated from porcine liver using the collagenase perfusion method were pre-cultured for 6 days, preserved at room temperature in the presence of EGCG at various concentrations for 4 days, and post-cultured in normal medium for another 6 days. In the monolayer culture, only albumin production rate was fully recovered after preservation when EGCG concentration was high (0.25 mg/mL). In contrast, albumin production and ammonium metabolism in the 3D bioreactor under the same condition recovered to $72 \pm 16\%$ and $98 \pm 32\%$, respectively, of levels before preservation. These results indicate that hepatocytes can be preserved in the presence of 0.25 mg/mL of EGCG at room temperature, especially in a 3D culture system, which is promising technology for BAL preparation.

Introduction

VARIOUS CELL-BASED THERAPIES have been proposed and widely studied recently. Among them, hepatocyte-based treatments for fulminant or chronic hepatitis have been attracting great attention. Injection of hepatocytes isolated from unused donor livers and bioartificial liver (BAL) assist systems is used for treating acute liver failure and liver-based metabolic defects.¹⁻⁵ A large number of hepatocytes must be prepared for emergency care and for repeated treatment,⁶ but because the isolation and reconstruction into a three-dimensional (3D) structure of the hepatocytes would take a long time and requires complex steps, metabolic activity rapidly decreases during the preparation process. We previously reported that the BAL system, using a radial flow bioreactor, needs at least 1.0×10^9 hepatocytes to maintain function.⁷ Therefore, it is essential to preserve cells that maintain their functions in BALs. However, maintaining the specific functions of the hepatocytes using conventional cryopreservation is difficult.⁸⁻¹⁶

Various strategies to maintain cell functions have been proposed. Watts *et al.* and Mckay *et al.* reported that mono-

layer culture is superior to suspension culture in preserving hepatocytes.^{17,18} Kakinoki *et al.* have succeeded in storing peripheral nerves for longer than 1 month using green tea polyphenol,¹⁹ and Hyon *et al.* reported that green tea polyphenol also preserved the rat pancreatic islet for longer than 2 months.²⁰

The green tea polyphenol is composed of epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, epicatechin, and epigallocatechin, but the effect of each component on cell preservation is unknown. We focused on epigallocatechin-3-gallate (EGCG) because it is the main component of the green tea polyphenol and is well known to have a wide range of pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherogenic, and anti-thrombotic.²¹⁻²³ Recently, the effects of polyphenol on various diseases such as tissue ischemia,^{24,25} neoplasm inflammation,^{26,27} and arteriosclerosis^{28,29} have been reported.

In the present study, we attempted to preserve primary cultured hepatocytes for a 3D BAL system. The effect of EGCG on hepatocyte preservation at room temperature was evaluated using monolayer culture. The preservation experiments in 3D BAL systems were also conducted in our

¹Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan.

²Department of Chemical Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

³Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu City, Fukuoka, Japan.

⁴Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

original BAL, which consisted of a perfusion-type bioreactor and a polytetrafluoroethylene (PTFE) non-woven fabric coated with the copolymer of poly (ϵ -methyl-L-glutamate) and poly urethane (PAU).⁷

Materials and Methods

Animals and hepatocytes

Mini pigs (male, 4–16 weeks) were purchased from Japan Farm LTD. (Kagoshima, Japan). Hepatocytes were isolated from the liver lobes (70–90 g) and used for a 2D monolayer culture experiment at the National Cardiovascular Center Research Institute (Osaka, Japan). The Animal Subjects Committee of the National Cardiovascular Center (Osaka, Japan) had reviewed and approved the experimental protocol.

A slaughtered pig (male, 7 weeks) was purchased from Kitakyushu Prefecture Edible Meat Center (Fukuoka, Japan). Hepatocytes were isolated from a liver lobe (103.4 g) and used for 3D BAL experiments at the Kyushu Institute of Technology (Fukuoka, Japan). The animal experiment was conducted in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Science, approved by the Physiological Society of Japan.

Hepatocytes were isolated using the collagenase perfusion technique with modifications.^{30,31} The liver was perfused with 1000 mL of calcium-free ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer solution (0.15 M sodium chloride (NaCl), 5.63 mM calcium chloride (KCl), 0.02 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.02 M sodium bicarbonate (NaHCO_3), and 0.99 mM EDTA disodium salt (EDTA-2Na; Wako, Ltd., Osaka, Japan), pH 7.4) at 80 mL/min and 37°C to remove the blood and then perfused with 500 mL of calcium-free buffer solution to rinse the ED-

TA-2Na, because EDTA-2Na reduces collagenase activity. After that, 500 mL of dispase solution (0.15 M NaCl, 5.63 mM KCl, 0.02 M HEPES, and 6.0×10^5 U Dispase; Gibco Co, Grand Island, NY) and then 500 mL of collagenase solution (0.15 M NaCl, 5.63 mM KCl, 0.02 M HEPES, 0.02 M NaHCO_3 , 3.74 mM calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), and 6.5×10^4 U collagenase (Wako, Ltd., Lot no. 06032W)) were perfused. The perfused liver was carefully minced with a scalpel blade, and the resulting crude homogenate was shaken in the presence of the last perfusate. The resulting cell suspension was filtered through nylon mesh with a 200- μm pore size and centrifuged at 600 rpm at 4°C for 2 min. The hepatocytes were washed with washing buffer with DNase (0.12 M NaCl, 6.2 mM KCl, 1.26 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.49 mM magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 6 H_2O , 0.41 mM magnesium sulfate heptahydrate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES, 1.0 g/L of bovine serum albumin (Wako, Ltd.), and 10 mg/L of DNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Lot 13738000)) and with washing buffer (0.12 M NaCl, 6.2 mM KCl, 1.77 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 M HEPES, and 1.0 g/L of bovine serum albumin (Wako, Ltd.)) twice.

Isolated hepatocytes were cultured in William's E medium with L-glutamate (Sigma-Adrich Inc., St. Louis, MO) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Adrich Inc., Lot no. 043K83032), 100 IU/L penicillin-streptomycin, 1.0×10^{-7} M insulin (Wako, Ltd.), 1.0×10^{-6} M dexamethasone (Wako, Ltd.), 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ epidermal growth factor (Sigma-Aldrich Inc.), and 1.5 mM L-ascorbic acid phosphate magnesium salt *n*-hydrate (Wako, Ltd.).

Cell culture

Static culture. Hepatocytes (1.0×10^6) were initially seeded on a 60-mm collagen type I-coated dish (Iwaki, Asahi

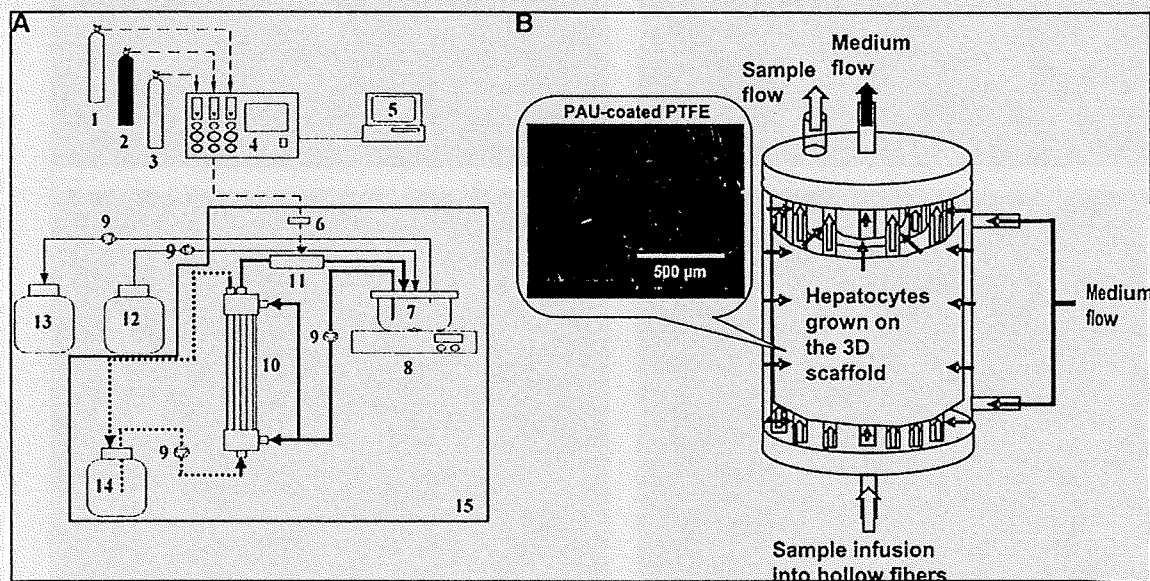


FIG. 1. (A) A schematic diagram of a bioartificial liver (BAL) (1) carbon dioxide cylinder, (2) oxygen cylinder, (3) air cylinder, (4) gas control equipment, (5) computer, (6) membrane filter, (7) conditioning vessel, (8) stirrer, (9) peristaltic pump, (10) radial flow bioreactor module, (11) silicone oxygenator module, (12) fresh medium tank, (13) spent medium tank, (14) plasma bottle, and (15) incubator. \rightarrow : medium flow for hepatocytes culture. $\cdots\rightarrow$: Sample flow for ammonium metabolism evaluation. (B). Radial flow bioreactor module.

Glass Co., LTD, Tokyo, Japan) and incubated in a 5% carbon dioxide (CO₂)/air atmosphere at 37°C for 6 days. We started monitoring the hepatocyte functions on day 3 and continued for 4 more days (pre-preservation). After that, to preserve the hepatocytes, the given concentrations of EGCG (0, 0.25, 0.025, and 0.0025 mg/mL) were added to the culture medium and kept at room temperature for 4 days. CO₂ was not supplied during the preservation period. The preserved cells were properly washed with culture medium four times and cultured for 6 days in the normal medium (post-preservation). The medium was changed every 24 h.

The cell morphologies were observed at 3 days pre-preservation, on day 3 of the preservation period, and on 6 days in post-preservation using a Nikon TMS phase-contrast light microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were taken using a Nikon CoolPix 990 digital camera (Nikon). The hepatocytes adhered in 2 days after seeding. Because of the high density of the seeded cells, the cells were in the confluent stage and do not proliferate.

Perfusion culture. Perfusion culture was performed in the radial flow bioreactor system that we reported previ-

ously.⁷ In brief, hepatocyte suspension (2.0×10^9 cells in 50 mL) was inoculated into a conditioning vessel (Fig. 1A(7)) and perfused to a bioreactor module composed of a 3D scaffold made of PAU-coated PTFE non-woven fabric at the flow rate of 17 mL/min for 10 min. The suspension in the conditioning vessel was turbid because of the high density of inoculated cells before use (Supplementary data 1A). After 10 min of perfusion at 17 mL/min and 2 h of perfusion at 84.2 mL/min, the suspension became clear (Supplementary data 1B), and no cells were detected in the medium, indicating that the cell seeding efficiency was high and that almost all inoculated cells were adhered onto or entrapped in the non-woven scaffold.

The pH and oxygen concentration of the medium were fixed at 7.3 and 313 μ M, respectively, using the pH and oxygen sensors of the conditioning vessel (Fig. 1A(7)). The gas controller equipment (Fig. 1A(4)) controlled air flow and carbon dioxide flow at 10 mL/min to control the pH. Meanwhile, the controller controlled oxygen at 50 mL/min to maintain the diluted oxygen rate.

We started monitoring the hepatocyte functions 24 h after inoculating the cells and continued for 4 days. The best

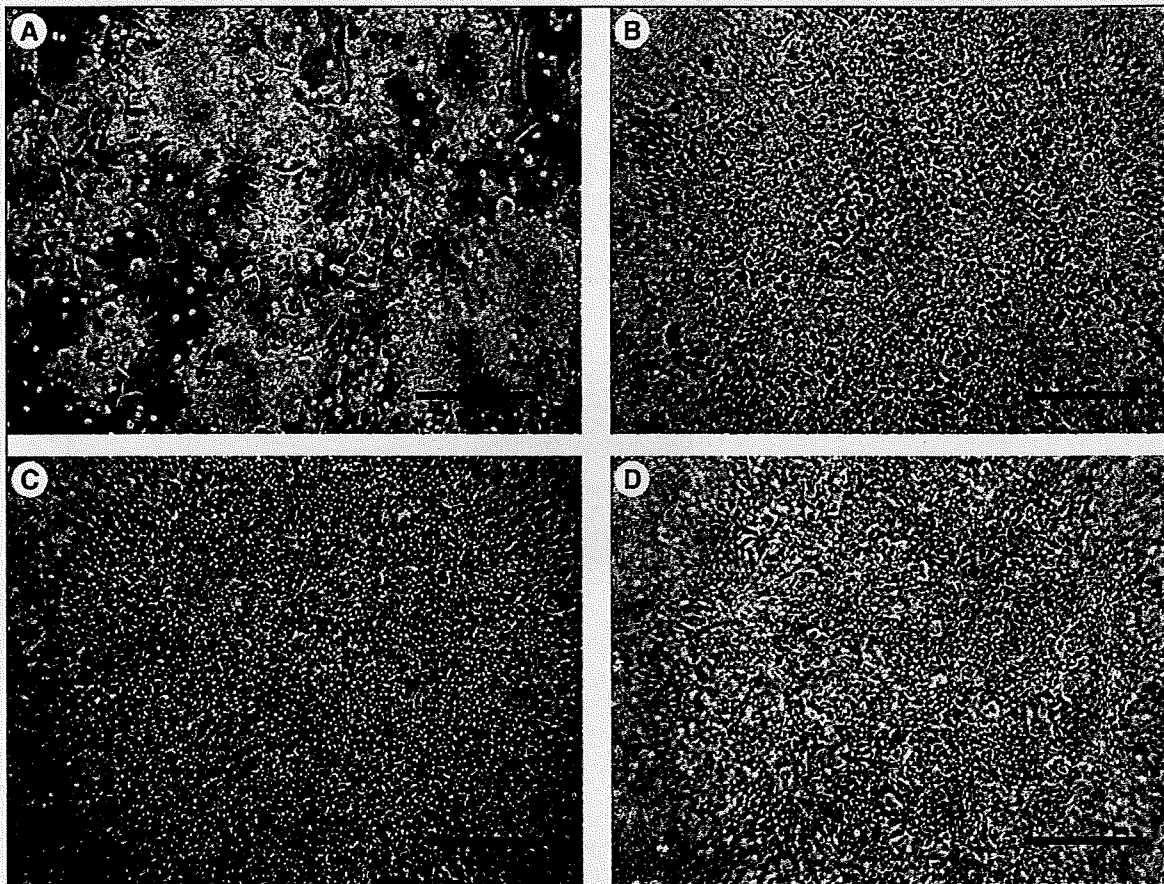


FIG. 2. Light microscopic images of porcine hepatocytes preserved for 3 days in (A) epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-free medium or in EGCG-containing medium at the concentration of (B) 0.25-, (C) 0.025-, and (D) 0.0025-mg/mL EGCG. The arrows show the cells detaching from the dish. Bars represent 200 μ m.

concentration of EGCG fixed in the monolayer culture system was applied to the 3D culture system and preserved at room temperature for 4 days. The medium perfusion and oxygen, air, and CO₂ supplies were stopped during the preservation period. The preserved cells were properly washed with 3 L of culture medium and cultured for 5 days in the normal medium. Medium exchange was performed every 24 h throughout the culture period.

Hepatocyte functions

Albumin production rate. One mL of medium was taken before and after the medium change in static and perfusion culture for measuring albumin production using enzyme-linked immunosorbent assay.³² For the perfusion culture, the albumin concentration in the conditioning vessel and the plasma bottle were measured. Briefly, a 96-well plate was coated overnight with 1000-times-diluted goat anti-pig albumin antibody (Bethyl Lab, Inc., Montgomery, TX) at 4 C. The plate was washed four times with 1% (v/v) Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS) (-), incubated with 0.01 g/mL block ace (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) for 3 h at 37 C to block unspecific binding, and washed four times. Samples were added to the plate, incubated for 3 h at 37 C, and washed with 1% (v/v) Tween 20 in PBS (-) five times. The peroxidase-conjugated goat anti-pig albumin (Bethyl Lab, Inc., 15,000 times diluted) was added to each well and incubated for 2 h at 37 C. Afterward, the plate was washed, and the o-phenylenediamine (Wako, Ltd.) solution in 0.01% hydrogen peroxide (H₂O₂, 3 mg/mL) was added. The color reaction was stopped by adding 50 μ L of 1.0M sulfuric acid, and the ultraviolet absorbance was measured using a microplate reader at 490 nm. The albumin secretion is indicated as the amount in a dish and in a reactor per day (μ g/dish per day, mg/reactor per day).

Ammonium metabolism rate

Static culture. To assess the ammonium metabolism of the hepatocytes, 1 mM ammonium chloride (NH₄Cl) was added to the medium, and the ammonium concentration was measured after 0, 3, and 6 h using the Amicheck meter (Arkray Factory Inc., Shiga, Japan). Ammonium metabolism rate defined as amount of decreased ammonium in a dish per hour (μ mol/dish per h).

Perfusion culture. The plasma bottle (Fig. 1A(14)) of the 3D bioreactor system was filled with 300 mL of 1 mM NH₄Cl-containing medium, and the hepatocytes grown on the 3D scaffold (Fig. 1B) were perfused with this medium. The ammonium concentrations in the conditioning vessel and plasma bottle were measured after 0, 3, and 6 h using the Amicheck meter (Arkray Factory Inc.). The ammonium metabolism rate was expressed as μ mol/reactor per hour.

Scanning electron microscopy

Hepatocytes attached to the scaffold in the bioreactor were fixed with 2.5% glutaraldehyde, dehydrated with graded ethanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 99.5%), and dried with tert-butyl alcohol (t-BuOH) freeze-drying (t-BuOH freeze dryer VFD-21; Vacuum Devices Co., Ltd., Ibaraki, Japan). The specimens were coated with palladium by sputtering (E-1030, Hitachi Co., Tokyo, Japan) and then observed using scanning electron microscopy (SEM; S-3000N, Hitachi Co.).

Histological study

The transverse section (2 μ m thick) was taken from the construct in the bioreactor. The section was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and azan to demonstrate

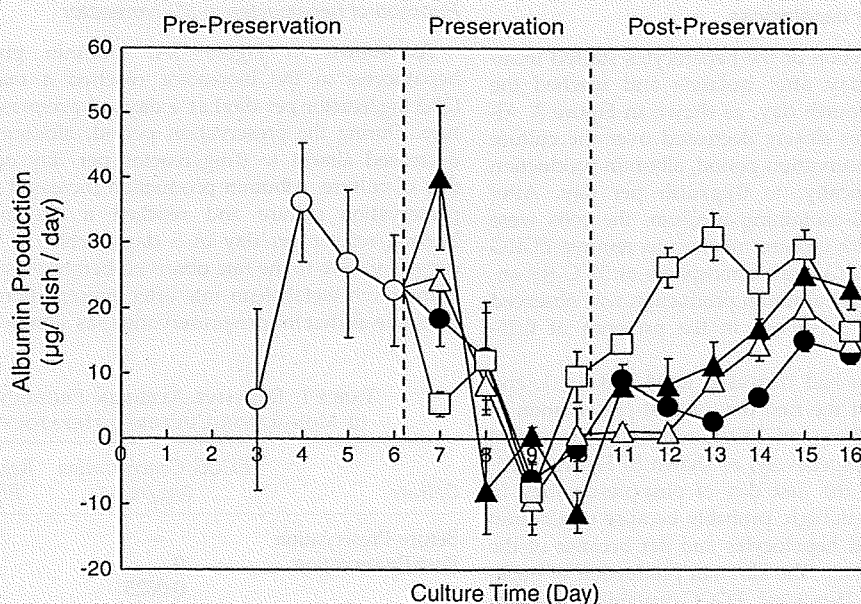


FIG. 3. Albumin production of monolayer-cultured hepatocytes during pre-preservation (○); preservation in epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-free medium (●) and in 0.0025- (△), 0.025- (▲), and 0.25-mg/mL EGCG-containing medium (□).

hepatocytes and collagen and was examined using light microscopy (DMR, Leica Co., Tokyo, Japan). For albumin immunostaining, the transverse section was permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 10 min. Cells were incubated with 3 mL/L of H₂O₂ in methanol for 10 min to block endogenous peroxidase activity and then washed twice in PBS for 5 min. Nonspecific binding sites were blocked with 3 mL/L normal goat serum. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibody (goat anti-pig albumin antibody, Bethyl Lab, 1:200). After being washed for 15 min in PBS twice, slides were incubated at 37°C for 30 min with secondary antibody (anti-goat immunoglobulin G rhodamine-conjugated donkey antibody, Chemicon International, Temecula, CA), with streptavidin marked using horseradish peroxidase. The positive cells presented as brownish yellow.

Results

Isolation of hepatocytes

More than 2.5×10^9 hepatocytes were routinely obtained from a lobe. Viability determined according to the trypan blue exclusion method was higher than 90%.

Morphology of the monolayer-cultured hepatocytes

Three days after preservation in 0.25- or 0.025-mg/mL EGCG-containing medium, cells kept their morphologies and adhered to the culture dish, as shown in Figures 2B and C, whereas cells preserved in 0.0025 mg/mL and EGCG-free medium started to detach from the culture dish, as shown in Figures 2A and D. The number of detached cells in 0.0025-mg/mL EGCG-containing medium was much smaller than in EGCG-free medium. These results indicate that cellular damage in normal medium at room temperature leading to cell detachment can be prevented by adding EGCG to the medium.

Function of monolayer hepatocytes

The albumin production of the hepatocytes started to increase on the third day after isolation and reached the highest value on the fourth day, as shown in Figure 3. Albumin production rates slowly decreased over the culture period. During the preservation period, albumin production rates decreased drastically, to 0 µg/dish per day. After preservation in EGCG-containing medium, the cells were washed four times with culture medium to remove EGCG and incubated in a 5% CO₂/air atmosphere at 37°C for another 6 days. The highest albumin production was observed when the cells were preserved in the presence of 0.25-mg/mL EGCG.

Albumin production had increased to 14.5, 8.0, 1.1, and 8.9 µg/dish per day on the first day of post-preservation in 0.25-, 0.025-, and 0.0025-mg/mL EGCG-containing media and EGCG-free medium, respectively, as shown in Figure 3. Albumin production on the first day of post-preservation in EGCG-free medium was high, probably because of albumin released from the dead hepatocytes and not because of the albumin secretion process. The albumin production of hepatocytes preserved in 0.25-mg/mL EGCG-containing medium had drastically increased, up to a maximum rate of 30.9 µg/dish per day, on the third day of the post-preservation

period, which was much higher than in the other conditions. The effect of EGCG concentration on the relative albumin production rate during the post-preservation period was compared with that before preservation (Table 1). Relative albumin production rate was calculated as follows:

$$\text{Relative of albumin production rate} = \frac{\text{Average value of albumin production rate during post-preservation}}{\text{Albumin production rate before preservation}} \times 100$$

From Table 1, albumin production of hepatocytes after preservation increased with increasing EGCG concentration. Production after preservation in 0.25-mg/mL EGCG-containing medium completely recovered and reached $111 \pm 25.1\%$, but the albumin production rates of hepatocytes preserved in 0.025- and 0.0025-mg/mL EGCG-containing medium and EGCG-free medium recovered only to 74 ± 32.1 , 58 ± 21.9 , and $36 \pm 23.7\%$ of their pre-preservation levels, respectively.

The ammonium metabolism rate for hepatocytes preserved in EGCG-containing medium also recovered and reached higher levels than that of the hepatocytes preserved in EGCG-free medium (Fig. 4). Relative ammonium metabolism rate was calculated as follows:

$$\text{Relative of ammonium metabolism rate} = \frac{\text{Average value of ammonium metabolism rate during post-preservation}}{\text{Ammonium metabolism rate before preservation}} \times 100$$

The relative ammonium metabolism rates in hepatocytes preserved in 0.25-, 0.025-, and 0.0025-mg/mL EGCG-containing medium and EGCG-free medium after preservation were $52 \pm 11.5\%$, $40 \pm 8.3\%$, $53 \pm 21.1\%$, and $17 \pm 23.8\%$, respectively, compared to the rate before preservation, as shown in Table 2. These results indicate that maintaining the ammonium metabolism functions of hepatocytes in the monolayer culture is difficult even in the presence of EGCG.

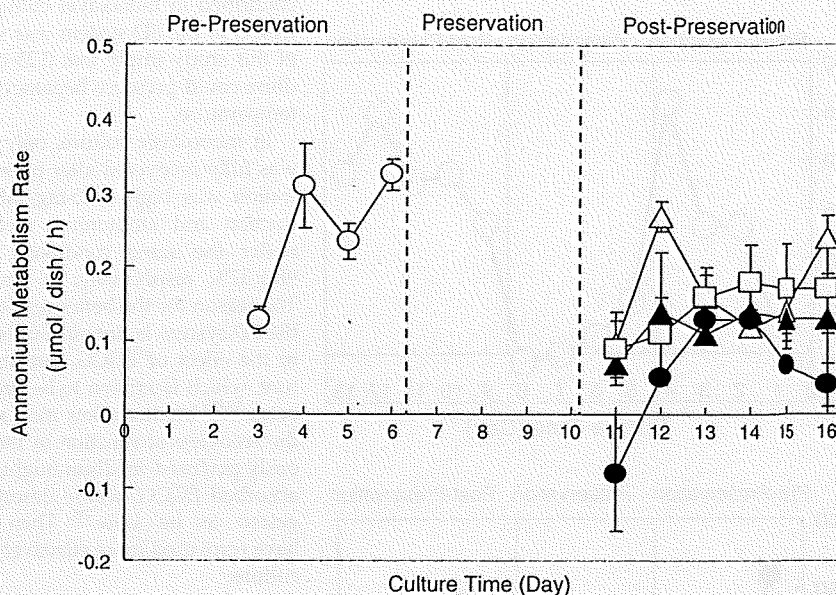
Function of hepatocytes in 3D bioreactor

As shown in Figure 5A, albumin production of hepatocytes in the bioreactor reached a maximum rate (25.8 mg/reactor per day) at 4 days of pre-preservation culture. During the preservation period, albumin production decreased almost to 0 mg/reactor per day on the eighth day of culture. Albumin production increased during post-preservation culture and reached a maximum rate of 24.6 mg/reactor per day in 5 days, which is $72 \pm 16\%$ recovery relative to the rate observed before preservation. The ammonium metabolism rate after preservation was almost the same as that for pre-preservation, as shown in Figure 5B.

TABLE 1. RELATIVE ALBUMIN PRODUCTION OF MONOLAYER-CULTURED HEPATOCYTES

Culture	EGCG Concentration (mg/mL)	Relative Albumin Production (%)
Before-Preservation	—	100 ± 37.8
Post-Preservation	0	36 ± 23.7
	0.0025	58 ± 21.9
	0.025	74 ± 32.1
	0.25	111 ± 25.1

FIG. 4. Ammonium metabolism rate of monolayer-cultured hepatocytes during pre-preservation (○); preservation in epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-free medium (●) and in 0.0025- (△), 0.025- (▲), and 0.25-mg/mL EGCG-containing medium (□).



The maximum rates of ammonium metabolism before preservation and after preservation were 167 $\mu\text{mol}/\text{reactor}$ per hour and 149 $\mu\text{mol}/\text{reactor}$ per hour, respectively, whereas the minimum rates before preservation and after preservation were 92 $\mu\text{mol}/\text{reactor}$ per hour and 64 $\mu\text{mol}/\text{reactor}$ per hour, respectively. The 3D bioreactor system is much more effective at maintaining the ammonium metabolic activity of the hepatocytes than the monolayer culture (Fig. 4), which is an almost 100% ($98 \pm 32\%$) recovery relative to the rate observed before preservation.

SEM and histological observation for perfusion culture

The hepatocytes preserved in 0.25-mg/mL EGCG-containing medium and post-cultured for 5 days produced extracellular matrix (ECM) proteins and were covered by them (Fig. 6A). The aggregates of hepatocytes which have spheroid-like structure were surrounded by the ECM structure rather than adhering onto PAU-coated PTFE, as shown in Figure 6B. This result was similar to our previous report in which the hepatocytes were cultured continuously for 1 week (supplementary data 2).⁷ In addition, fibrin-like fibers were observed on the ECM layer (Fig. 6A).

The difference between the hepatocytes adhering onto substrates in 2D culture and forming the spheroid-like structure would be related to the higher functions of hepa-

toocytes in a 3D system.³³⁻³⁵ This was also proven using H&E staining, Azan staining, and albumin immunostaining, as shown in Figures 7A, B, and C. These images indicate that hepatocytes producing albumin were located in the ECM layer composed of collagen.

Discussion

Cho *et al.* reported that the viability of hepatocytes decreased to 60% of control when preserved at low temperature in University of Wisconsin (UW) and Euro-Collins (EC) solutions for 48 h.³⁶ Not only the hepatocytes, but also the other valuable cells generally lost their viability in preservation. For example, peripheral blood stem cells and hemopoietic progenitor cells lost more than 50% of their viability after 3 days preserved at room temperature.³⁷ When hepatocytes were preserved at room temperature in monolayer culture for 4 days, more than half of the hepatocytes died and detached from the culture dish (Fig. 2A). In contrast, cell detachment was almost completely prevented, and the functions of the hepatocytes could be preserved in 0.25-mg/mL EGCG-containing medium for 4 days at room temperature. Albumin production in static culture increased after preservation at room temperature with increasing EGCG concentration.

A mechanism of cell or tissue preservation using EGCG has not been clarified, but it has been considered to be related to the intrinsic characteristics of polyphenol, that is, its amphipathic property.^{19,20,38} The amphipathic property of EGCG is feasible to pass through the plasma membrane and the polyphenol adsorbs to the cellular receptors because of the high affinity that polyphenol and protein have for one another.³⁸ They proposed a hibernation-like phenomenon of the cells or tissues. As the polyphenol reversibly leaves the cell membrane with the progression of time, the cell cycle will be resuming.^{20,38}

Our final aim is to develop a 3D BAL system for clinical use. Because a bioreactor system needs a large amount of hepatocytes, the effect of EGCG on hepatocyte function was

TABLE 2. RELATIVE AMMONIUM METABOLISM OF MONOLAYER-CULTURED HEPATOCYTES

Culture	EGCG Concentration (mg/mL)	Relative Ammonium Metabolism (%)
Before-Preservation	—	100 \pm 6.4
Post-Preservation	0	17 \pm 23.8
	0.0025	53 \pm 21.1
	0.025	40 \pm 8.3
	0.25	52 \pm 11.5

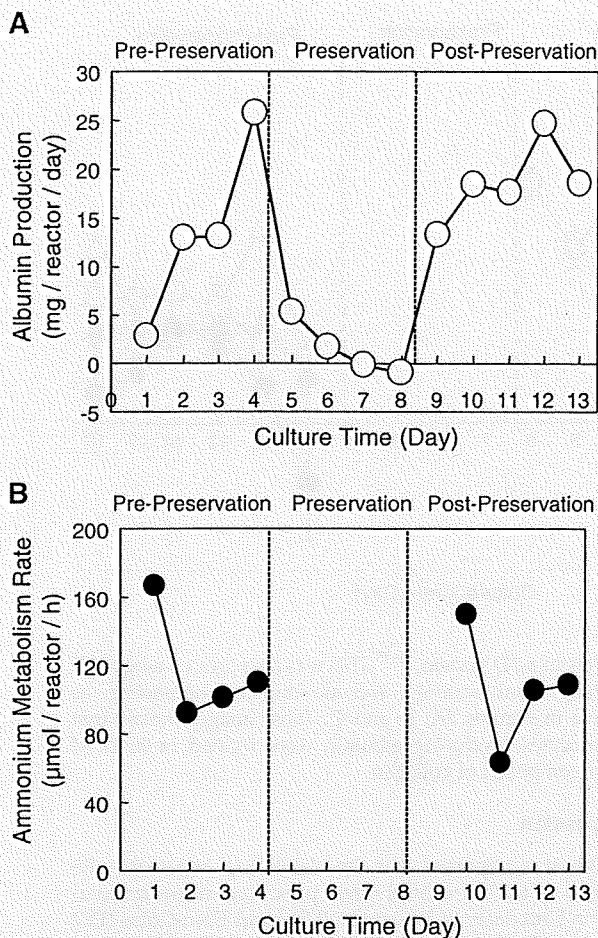


FIG. 5. Albumin production (A) and ammonium metabolism rate (B) of hepatocytes in three-dimensional bioreactor during pre-preservation, preservation in 0.25-mg/mL epigallocatechin-3-gallate-containing medium, and post-preservation.

confirmed in monolayer culture. Then, the concentration of EGCG in the 3D system was set to 0.25 mg/mL. The results of this study imply that 0.25-mg/mL EGCG-containing medium could preserve hepatocyte function for 4 days at room temperature.

In monolayer culture, only the albumin production rate was fully recovered after preservation when EGCG concentration was high (0.25 mg/mL). In contrast, albumin production and ammonium metabolism in a 3D bioreactor under the same conditions recovered to $72 \pm 16\%$ and $98 \pm 32\%$, respectively, of their levels before preservation. The reason for the better result in ammonium metabolism in the 3D system is unclear but is considered to relate not only to the effect of EGCG, but also to the spheroid-like structure, which is known to be preferable condition for hepatocytes.³³⁻³⁵ Medium flow may also play an important role for the recovery of function in the 3D bioreactor. The continuously perfused medium might have effectively removed the adsorbed EGCG, whose desorption from the cells was suggested to be slow.²⁰ Then hepatocyte function might have recovered more effectively in a 3D system than in static culture.

Conclusion

In conclusion, EGCG-containing medium were found to be able to maintain the cultured hepatocyte morphology and functions. This system is useful for BAL preparation. Nevertheless, further studies are required to characterize the full effects of EGCG on hepatocytes as well as on how to preserve the cultured hepatocytes for longer than 4 days.

Acknowledgments

This work was partly supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (B) in the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology. We thank Ms. Sachiyo Fujinobu for her outstanding technical assistance. The author would like to thank Ministry of Higher Education Malaysia and Tun Hussein Onn University of Malaysia for funding his study under the Academic Training Scheme.

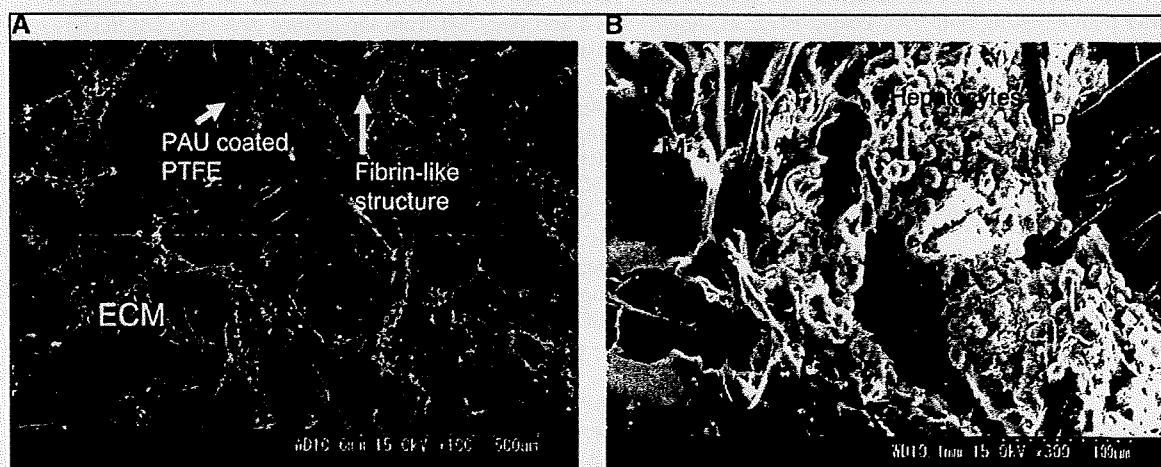


FIG. 6. Scanning electron microscopy photographs of hepatocytes preserved in the presence of 0.25-mg/mL epigallocatechin-3-gallate and cultured for 5 days in a bioartificial liver. (A) Extracellular matrix (ECM) and fibrin-like structures covering the non-woven fabric. (B) The aggregations of hepatocytes were observed under the ECM.

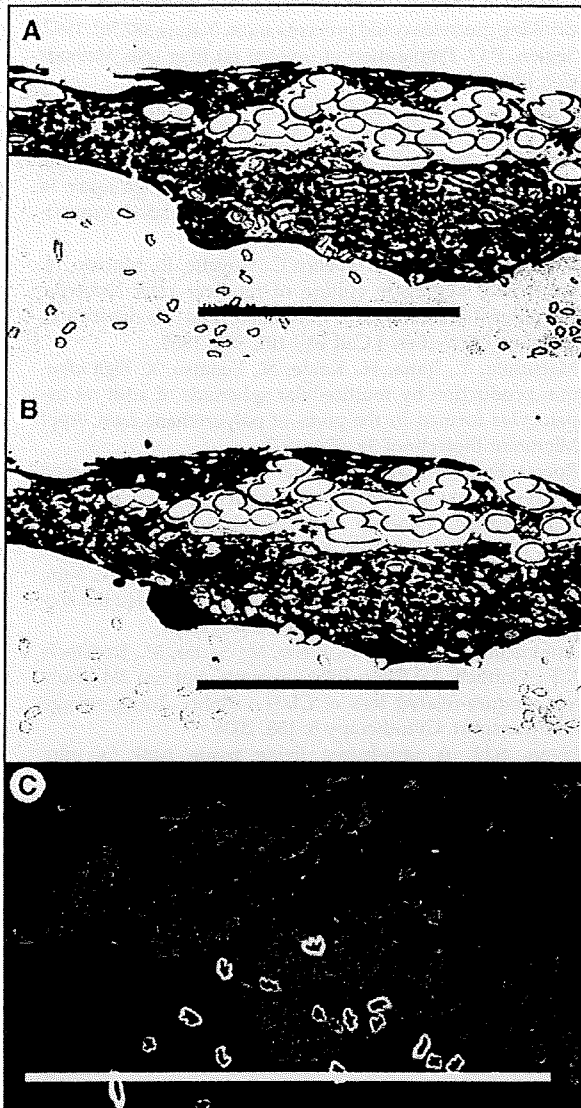


FIG. 7. (A) Hematoxylin and eosin staining, (B) Azan staining, and (C) albumin immunostaining of cultured hepatocytes in bioreactor. Cells were preserved in the presence of 0.25-mg/mL epigallocatechin-3-gallate for 4 days and cultured in normal medium for another 5 days. Bars represent 300 μ m.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Demetriou, A.A., Brown, R.S., Busuttill, R.W., Fair, J., McGuire, B.M., Rosenthal, P., Am Esch, J.S. 2nd, Lerut, J., Nyberg, S.L., Salizzoni, M., Fagan, E.A., de Hemptinne, B., Broelsch, C.E., Muraca, M., Salmeron, J.M., Rabkin, J.M., Metselaar, H.J., Pratt, D., De La Mata, M., McChesney, L.P., Everson, G.T., Lavin, P.T., Stevens, A.C., Pitkin, Z., Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 239, 660, 2004.
- Bilir, B.M., Guinette, D., Karrer, F., Kumpe, D.A., Krysl, J., Stephens, J., McGavran, L., Ostrowska, A., Durham, J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 6, 32, 2000.
- Baccarani, U., Sanna, A., Cariani, A., Barriga, M.S., Adani, G.L., Zambito, A.M., Piccolo, G., Risaliti, A., Nanni-Costa, A., Ridolfi, L., Scalapogna, M., Bresadola, F., Donini, A. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 9, 506, 2003.
- Opolon, P. High permeability membrane hemodialysis and hemofiltration in acute hepatic coma. Experimental and clinical results. *Artif Organs* 3, 354, 1979.
- Millis, J.M., Cronin, D.C., Johnson, R., Conjeevaram, H., Conlin, C., Trevino, S., Maguire, P. Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminate hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation* 74, 1735, 2002.
- Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R.R., Hughes, R.D. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 53, 149, 2006.
- Azizi, M., Noriko, S., Tetsuji, Y., Hiroshi, U., Makoto, K. Radial flow type bioreactor for bioartificial liver assist system using PTFE non-woven fabric coated with poly-amino acid urethane copolymer. *Macromol Symp* 249-250, 151, 2007.
- Innes, G.K., Fuller, B.J., Hobbs, K.E. Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation. *Cryobiology* 25, 23, 1988.
- Pahernik, S.A., Thasler, W.E., Mueller-Hoecker, J., Schildberg, F.W., Koebe, H.G. Hypothermic storage of pig hepatocytes: Influence of different storage solution and cell density. *Cryobiology* 33, 552, 1996.
- Guillouzo, A., Rialland, L., Fautrel, A., Guyomard, C. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact* 121, 7, 1999.
- Darr, T.B., Hubel, A. Postthaw viability of precultured hepatocytes. *Cryobiology* 42, 11, 2001.
- Yagi, T., Hardin, J.A., Valenzuela, Y.M., Miyoshi H, Gores, G.J., Nyberg, S.L. Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 33, 1432, 2001.
- Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R., Herbet, D.G. Cold-induced apoptosis of hepatocytes: Mitochondrial permeability transition triggered by non-mitochondrial chelatable iron. *Free Radic Biol Med* 35, 12, 1664, 2003.
- Muller, P., Aurich, H., Wenkel, R., Schaffner, I., Wolff, I., Walldorf, J., Fleig, W.E., Christ, B. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. *Cell Tissue Res* 317, 45, 2004.
- Li, L., Li, C.M., Zhang, B.Y., Hu, M.D., Li, X.Y., Ran, J.H., Huang, M. Apoptosis of rat liver in cold preservation with custom-designed KYL solution. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6, 497, 2007.
- Lloyd, T.D.R., Orr, S., Skett, P., Berry, D.P., Dennison A.R. Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank* 4, 3, 2003.
- Watts, P., Grant, M.H. Cryopreservation of rat hepatocytes monolayer cultures. *Hum Exp Toxicol* 15, 30, 1996.
- McKay, G.C., Henderson, C., Goldie, E., Connell, G., Westmoreland, C., Grant, M.H. Cryopreservation of rat hepatocytes.

- cyte monolayers: cell viability and cytochrome P450 content in post-thaw cultures. *Toxicol In Vitro* 16, 71, 2002.
19. Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Nakayama, K., Morimoto, Y., Nakamura, T. Successful storage of peripheral nerves using University of Wisconsin solution with polyphenol. *J Neurosci Methods* 159, 57, 2007.
 20. Hyon, S.H., Kim, D.H. Long-term preservation of rat pancreatic islet under physiological conditions. *J Biotechnol* 85, 241, 2001.
 21. Tipoe, G.L., Leung, T.M., Hung, M.W., Fung, M.L. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7, 135, 2007.
 22. Neuhaus, T., Voit, S., Lill, G., Vetter, H., Schor, K., Weber, A.A. Platelet aggregation induced by the C-terminal peptide of thrombospondin-1 (4N1-1) is inhibited by epigallocatechin gallate but not by prostaglandin E1. *Platelets* 15, 455, 2004.
 23. Ivanov, V., Roomi, M.W., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., Rath, M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 49, 140, 2007.
 24. Omasa, M., Fukuse, T., Matsuoka, K., Hyon, S.H., Wada, H. Effect of green tea extracted polyphenol on ischemia/reperfusion injury after cold preservation of rat lung. *Transplant Proc* 35, 138, 2003.
 25. Lee, S.R., Suh, S.L., Kim, S.P. Protective effects of the green tea polyphenol (-)epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 287, 191, 2000.
 26. Varilek, G.W., Yang, F., Lee, E.Y., Villiers, W.J.S.D., Zhong, J., Oz, H.S., Westberry, K.F., McClain, C.J. Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity. *J Nutr* 131, 2034, 2001.
 27. Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys* 376, 2, 338, 2000.
 28. Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2744, 1997.
 29. Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R., Jankun, E.S. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387, 561, 1997.
 30. Seglen, P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29, 1976.
 31. Moldeus, P., Hogberg, J., Orrenius, S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 52, 60, 1978.
 32. Schwerer, B., Bach, M., Bernheimer, H. ELISA for determination of albumin in the nanogram range: assay in cerebrospinal fluid and comparison with radial immunodiffusion. *Clin Chim Acta* 163, 237, 1987.
 33. Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R., Marceau, N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol* 101, 914, 1985.
 34. Matsuhita, T., Ijima, H., Koide, N., Funatsu, K. High albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the pores of polyurethane foam. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 324, 1991.
 35. Robert, R.A., Soames, A.R. Hepatocyte spheroids: prolonged hepatocyte viability for *in vitro* modeling of nongenotoxic carcinogenesis. *Fundam Appl Toxicol* 21, 149, 1993.
 36. Cho, H.R., Choi, D.H., Ko, B.K., Nam, C.W., Park, K.M., Lee, Y.J., Lee, S.G., Lee, J.S., Lee, K.A., Lee, E.A., Ju, S.A., Kim, B.S. Cold preservation of rat cultured hepatocytes: the scoparone effect. *Transplant Proc* 32, 2325, 2000.
 37. Antonenas, V., Garvin, F., Webb, M., Sartor, M., Bradstock, K.F., Gottlieb, D. Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-related loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy* 8, 158, 2006.
 38. Hyon, S.H. A non-frozen living tissue bank for allotransplantation using green tea polyphenols. *Yonsei Med J* 45, 1025, 2004.

Address reprint requests to:
 Tetsuji Yamaoka, Ph.D.
 Department of Biomedical Engineering
 Advanced Medical Engineering Center
 National Cardiovascular Center Research Institute
 5-7-1 Fujishirodai, Suita
 Osaka 565-8565
 Japan

E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Received: August 14, 2008

Accepted: November 20, 2008

Online Publication Date: January 13, 2009

ORIGINAL ARTICLE

Azizi Miskon, MEng · Tomo Ehashi, PhD
Atsushi Mahara, PhD · Hiroshi Uyama, PhD
Tetsuji Yamaoka, PhD

Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19.CL6 cells on different extracellular matrix components

Abstract Stem cell-based therapy in cardiac tissue engineering is an emerging field that shows great potential for treating heart diseases. However, even preliminary issues, such as the ideal niche for cardiomyocytes, have not been clarified yet. In the present study, the effects of extracellular matrix (ECM) components on the beating duration of neonatal rat cardiomyocytes (RCMs) and on the cardiac differentiation of P19.CL6 carcinoma stem cells were studied. RCMs were cultured on gelatin-, fibronectin-, and collagen type I-coated dishes and on noncoated polystyrene dishes, and their beating rate, beating duration, and cardiac gene expression were evaluated. The beating period and the expression of troponin T type-2 (TNNT2) and troponin C type-1 (TNNC1) of cardiomyocytes cultured on gelatin-coated dishes were longer and higher than for those on dishes with other coatings. For the cardiac differentiation of P19.CL6 cells, troponin T type-2 expression on gelatin- and fibronectin-coated dishes was five times that on collagen type I-coated dishes or polystyrene dishes 11 days after induction. These results indicate that a gelatin-coated surface has a high ability not only to maintain the cardiac phenotype but also to enhance cardiac differentiation.

Key words Extracellular matrix · Cardiomyocyte · Beating · Differentiation

Introduction

Cardiac tissue engineering, such as cardiomyocyte transplantation for patients with ischemic heart disease or dilated cardiomyopathies, is of great potential therapeutic value to enhance the contractile function of the failing heart. Recently, fetal or neonatal rat cardiomyocytes were reported to form mature cardiac tissue in syngeneic hearts, acutely injured myocardium, and granulation tissue in the heart.¹ However, the best cell sources for clinical cardiomyocyte transplantation are still under debate. In general, three types of potential cell sources have been proposed.² One is the allogeneic source, including human embryonic stem cells or fetal allogeneic cardiomyocytes, but there still remain ethical issues. Another is the transgenic source. Genetically engineered animal cardiomyocytes have been studied in an attempt to reduce the rejection reaction in vivo, which is still a long-term problem in recipients.

The most promising cell source is the autogeneic one. Isolating cardiomyocytes from patients' hearts is unrealistic at present, and autologous skeletal muscle precursors, fibroblasts, or mesenchymal stem cells have been studied so far.³ However, since beating cardiomyocytes are more promising,⁴ we have been trying to differentiate bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into "beating" cardiomyocytes. There is no certain induction method for BMSC differentiation into beating cardiomyocytes. Many researchers have observed cardiac gene expression in MSCs treated with various inducers⁵⁻⁷ or passage numbers,⁸ but they do not beat spontaneously. Wakitani et al. and Makino et al. reported that murine BMSCs were differentiated to beating cardiomyocyte-like cells in vitro by exposing them to DNA-demethylating agent 5-azacytidine.^{5,6} This is in contrast with a report stating that functional cardiac cells and gene expression were not obtained by treatment with 5-azacytidine.⁹

Producing autologous beating cardiomyocytes is thus an attractive goal for cell-based therapy. The crucial part is how to differentiate cells to cardiomyocytes in vitro and how to maintain the beating. Various microenvironments surrounding the cells (niches) play important roles not only

Received: September 5, 2008 / Accepted: January 14, 2009

A. Miskon · T. Ehashi · A. Mahara · T. Yamaoka (✉)
Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical
Engineering Center, National Cardiovascular Center Research
Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
Tel. +81-6-6833-5012 ext. 2637; Fax +81-6-6835-5476
e-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

A. Miskon · H. Uyama
Department of Chemical Engineering, Osaka University, Osaka,
Japan