

201006001A

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 22 年度 統括・分担研究報告書

主任研究員 浅原 孝之

平成 23 (2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

重症心不全患者の自己心筋幹細胞を用いた心筋・血管ハイブリッド 組織シート移植治療の臨床研究開発 浅原 孝之(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)	7
2. 心筋幹細胞シートを用いた重症心不全患者に対する移植治療の臨床研究開発 澤 芳樹(大阪大学大学院 医学系研究科)	11
3. 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)	21
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)	25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
-----------------------	----

I 総括研究報告書

統括研究報告書

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：22年度研究は、3年間のプロジェクトの最終年間で、hCSC 採取および維持培養の標準化のための基礎開発は完成した。培養されたhCSCは臨床治療効果を期待できる細胞品質を保つことが可能になった。細胞シートの移植方法は多岐にわたって検討されたが、hCSC シートと EPC 組み合わせで、慢性心不全モデルに心筋再生および血管再生効果をもたらし、機能回復を期待できることが判明した。この成果をもとに、先端医療センターおよび大阪大学の共同で、臨床研究を計画している。

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
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

A. 研究目的

最終年度の計画として、重症心不全の患者から分離する心筋幹細胞(hCSC)を、臨床応用できるレベルの培養システムの標準化、治療可能な細胞品質を有するhCSC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 hCSC を利用して、心筋分化および血管分化誘導を目標としたシートの作成とその移植効果の判定研究を進める。

B・C. 研究方法および結果

1. 臨床における心筋幹細胞(hCSC)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)

①hCSC 培養条件の最終検討

臨床研究に用いるhCSC 培養の標準化のため、培養条件の最終検討を進めた。維持培養での播種細胞密度と細胞周期制御蛋白、未分化能を推定するための心筋および血管分化度などの関連性を探索した。高い播種度（5500cells/cm²）は低い播種度（340，1400cells/cm²）に比べ細胞周期制御蛋白であるp21,p53の発現が高く、血管内皮・心筋・血管平滑筋細胞マーカーが出現し、未分化度が保たれていないという結果が得られた。播種密度が異なる細胞培養の後、分化誘導をかけると、低い播種度(340cells/cm²)でのhCSCが最も高い分化誘導を確認出来、細胞の分化誘導能の高い細胞群であることも確認された。昨年の結果から、340cells/cm²での細胞増殖速度が優れているという結果も合わせ、340cells/cm²で5継代(passage)が未分化hCSC 培養に適切と考えられた。以上を元に、採取されたhCSCの維持培養条件が確立され、臨床研

究に用いるべき標準培養が確立された。

また、心筋サンプルの維持培養条件を確認するために、9人の患者から9検体を採取しhCSC培養を試みた。全例でCSCは採取され、細胞倍加時間(doubling time)を測定したところ、患者の年齢と正の相関関係が確認され、高齢患者においては女性より男性由来hCSCのdoubling timeが延長される傾向が確認された。さらに多くの経験を必要とするが、基礎疾患とともに年齢・性別などを考慮した培養経過の観察が必要と考えられた。

2. 移植環境下での hCSC 移植効果に関連する研究

(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、東海大学:増田グループ)

①hCSC シートの移植生着検討

hCSCのシートが移植された場合の、炎症・低酸素組織の移植環境での有効性を推測するために、酸化ストレス下でのhCSCシートの細胞活性について検討が加えられた。

心筋分化誘導細胞シートの場合、熱ショックやhypoxiaを組み合わせても、in vitroにおける強い酸化ストレス(1mM H₂O₂)に対して細胞生存活性や細胞増殖活性は有意に向上することはなかった。心筋分化誘導細胞シートはこれらの処理を全く行わなくても酸化ストレスに対して細胞生存活性等の有意な亢進を示したことから、確立した心筋分化誘導条件で作製した心筋・血管細胞シートは抗酸化ストレス活性を十分に有しており、虚血下でも細胞増殖活性を示して、細胞保護作用を持つことが示唆された。

しかし、未分化のhCSC細胞シートを作成した場合、熱ショックとhypoxiaの両方で処理した時に心筋分化誘導細胞シートと同様の細胞活性を保てることが判明し、未分化hCSCシートの場合、熱ショックおよび低酸素などの耐性強化により、移植率を上げられる可能性が示唆された。

②移植環境下での hCSC 分化誘導研究

移植環境下でのhCSC分化条件を探るため、流れズリ応力および低酸素でのhCSC分化機序を研究した。静的条件下および低酸素条件下では細胞の配列は一定の方向性を示さなかったが、流れズリ応力条件下では流れの方向に細胞が伸展・配向した。この反応は血管内皮細胞に特異的であり、hCSCが流れズリ応力により血管内皮細胞系に分化誘導されたことを示している。これは、FACSによる血管内皮のマーカーであるKDRとTie2の流れズリ応力負荷および低酸素負荷で発現率が増大したことから推定できる。

また、増殖作用・抗アポトーシス作用も、流れズリ応力負荷および低酸素負荷で確認され、hCSCシートの移植環境下での分化誘導機序と、再生機序の有効性も推察できた。

③移植環境下での hCSC 血管再生作用の検討

hCSC、ヒト骨格筋芽細胞、ヒト骨髄間葉系細胞の非コンフルエント、コンフルエント、細胞シート培養の比較、分泌蛋白比較、血管形成効果の検討を行った。

hCSCの培養上清中のVEGF、bFGF濃度は、ヒト骨格筋芽細胞、ヒト間葉系細胞培養上清に比して有意に高かった。またこの差は、コンフルエント、細胞シート状態でより顕著であった。また培養上清をmatrigel上で培養したHUVECに添加したところ、増殖因子の濃度の同様に、hCSC培養上清を添加した群で管腔形成能が亢進し、さらにコンフルエント培養、細胞シートから回収した培養上清ではより管腔形成能が亢進した。以上よりhCSCは、ヒト骨格筋芽細胞、ヒト骨髄間葉系細胞より、多くの血管新生増殖因子を産生し、またこの産生された増殖因子は血管新生作用として機能的であると考えられた。

このhCSCシートにおける顕著な血管新生促進効果の機序として、Notchシグナルの活性化に伴うVEGFの産生亢進が、シグナル検索で推定された。

3. hCSC シート移植効果の検討(先端医療センター:

川本グループ、大阪大学:澤グループ)

①hCSC シートのラット移植予備検討

心筋梗塞モデルラットに hCSC シートを移植して細胞シートの治療効果を検証した。

シートの細胞密度とシート枚数について、移植検討したが、1枚 Low シート移植では治療効果が認められなかったが、3枚 Low および High シート移植群では、対照群と比較して心機能と毛細血管密度の有意な改善が認められた。よって hCSC シートは1枚ではなく複数枚積層化して移植する必要があることが示唆された。移植した hCSC がより効率よく心筋細胞に分化するような移植方法等の検討を進める余地があると考えられた。

②hCSC シートと血管内皮前駆細胞(EPC)の同時移植効果検討

hCSC シート単独移植群では、心機能が改善する傾向が見られた。hCSC シートと EPC を同時移植した群では、移植2週目と4週目において、細胞を移植しなかった群に比べて、さらに、移植後2週目において、hCSC シート単独移植群と比べて、有意な心機能改善効果(LVFS、左室内径短縮率)が検出された。組織学的にも、心筋分化と血管形成の促進が hCSC シート・EPC 同時移植群で明確に確認され、心筋血管両方の分化機序が機能改善に伴われたことを示唆した。

③ブタ慢性心筋梗塞モデルを用いた hCSC シート移植および EPC 心筋内投与併用療法の前臨床試験

将来的な臨床試験を目指し、ブタ大動物モデルを用いて、hCSC シートと hEPC 心筋内投与併用療法の安全性および治療効果を検討した。移植8週後の心臓超音波検査上、hCSC シート群では7.9%のEFの改善を認め、hCSC シート+hEPC 併用群では11.3%と治療効果の増大が確認された。全例が耐術し、経過観察

期間中、致死性不整脈を含めた主要な有害事象を認めず、これらの細胞移植の安全性は確認できた。さらにこれまでの小動物実験同様、慢性心筋梗塞モデルに対する hCSC シートと hEPC 併用による左室収縮能の改善効果が確認された。今後は、包括的評価の後、臨床応用の際のプロトコールを作成する予定である

D. 考察

1. 臨床における心筋幹細胞(hCSC)培養の確立

hCSC の採取方法の標準化に伴い、維持培養の適正化が試みられた。培養密度が、hCSC の未分化度と再生能力に影響を与えることが判明し、hCSC 細胞培養の標準化が進んだ。また、採取される hCSC は、基礎疾患とともに年齢・性別などを考慮した培養経過の観察が必要とであることも判明した。

2. 移植環境下での hCSC 移植効果に関連する研究

細胞シートの移植環境は、様々な生理的および病理的な環境を作り出しており、その中でのサバイバル、再生機序の進行が、移植された細胞にとって大きな課題となる。

流れずり応力負荷および低酸素負荷で細胞活性の増強と血管細胞分化が確認され、hCSC シートの移植環境下での再生機序の有効性が確認され、移植環境での再生メカニズムの一部を確認できた。

この hCSC は、従来使用されている筋芽細胞や骨髄間葉系細胞よりも多くの血管新生増殖・サバイバル因子を産生しており、また機能的にも血管再生を促進することも明らかとなった。

また、hCSC の作成シートは、形成しうるコンフルエントな状況で培養することにより、より多くの血管新生増殖因子が産生されることも明らかとなり、シート作成基準の一指標になることが判明した。

未分化の hCSC 細胞シートを作成した場合、熱ショックと hypoxia の両方で処理した時に心筋分化誘導細胞シートと同様の細胞活性を保てることが判明し、未分化

hCSC シートの場合は、熱ショックおよび低酸素などの耐性強化により、移植率を上げられる可能性が示唆された。

3. hCSC シート移植効果の検討

hCSC シートによるラット慢性心不全モデルへの心筋再生・血管再生効果が、組織学的および機能的検索によって確認された。移植効果を表す hCSC シートの最適化検討から始まり、hCSC シート移植にEPC 移植治療を組み合わせたハイブリッド療法の有用性をラット移植実験で確認し、前臨床試験の一環としての hCSC シート+EPC 移植ハイブリッド治療の大動物研究を進め、新機能改善効果を確認した。心筋再生と血管再生を組み合わせた幹細胞治療法の有用性は明らかになったが、当初予想した分化誘導の優位性ははっきり確認できず、シンプルな hCSC シートと EPC のハイブリッド治療が有効であることが証明された。

E. 結論

3 年間のプロジェクトの最終年間で、hCSC 採取および維持培養の標準化のための基礎開発は完成した。培養された hCSC は臨床治療効果を期待できる細胞品質を保つことが可能になった。細胞シートの移植方法は多岐にわたって検討されたが、hCSC シートと EPC 組み合わせで、慢性心不全モデルに心筋再生および血管再生効果をもたらし、機能回復を期待できることが判明した。

この成果をもとに、先端医療センターおよび大阪大学の共同で、臨床研究を計画している。

F. 健康危険情報 特記なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N,

Nishikawa S, Ochi M, Asahara T. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells*. 2010 Feb;28(2):365-75.

2. Ii M, Takeshita K, Ibusuki K, Luedemann C, Wecker A, Eaton E, Thorne T, Asahara T, Liao JK, Losordo DW. Notch signaling regulates endothelial progenitor cell activity during recovery from arterial injury in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2010 Mar 9;121(9):1104-12.
3. Matsumoto T, Ii M, Nishimura H, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Fukui T, Kawakami Y, Kuroda T, Kwon SM, Iwasaki H, Horii M, Yokoyama A, Oyamada A, Lee SY, Hayashi S, Kurosaka M, Takaki S, Asahara T. Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. *J Exp Med*. 2010 Sep 27;207(10):2207-23. Epub 2010 Sep 20.
4. Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, Kawamoto A, Mifune Y, Fukui T, Kawakami Y, Niikura T, Lee SY, Oe K, Shoji T, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Ono T, Koibuchi Y, Kawamata S, Fukushima M, Kurosaka M, Asahara T. Local Transplantation of G-CSF-Mobilized CD34+ Cells in a Patient with Tibial Nonunion: A Case Report. *Cell Transplant*. 2010 Dec 22. [Epub ahead of print]
5. Ii M, Horii M, Yokoyama A, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Asahi M, Asahara T. Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest*. 2010 Dec 6. [Epub ahead of

print]

6. Alev C, li M, Asahara T. Endothelial Progenitor Cells: A "Novel" Tool for the Therapy of Ischemic Diseases. Antioxid Redox Signal. 2011 Jan 22. [Epub ahead of print]

2) 学会発表

1. Basic Cardiovascular Science 2010 Scientific Sessions, 2010.7.22, Palm Springs, T. Shimizu, "Myocardial Tissue Engineering with Cell Sheets."
2. XXth World Congress of the International Society for Heart Reserch, 2010.5-13-16, Kyoto, T. Shimizu, "Cell sheet approach for cardiac repair."
3. 第8回 ISSCR Annual Meeting、Development of in vitro single cell based culture system to assess stem cell fate into endothelial lineage. 2010.6.16-19
4. 松田剛典、宮川繁、秋丸裕司、堀井美希、齋藤充弘、川本篤彦、浅原孝之、澤芳樹、心筋再生治療の為のヒト心臓由来 C-Kit 陽性細胞に対する維持培養法の検討、第10回再生医療学会、2011年3月1日、京王プラザホテル、東京、日本
5. Takenori MATSUDA, Daisuke YOSHIOKA, Shigeru MIYAGAWA, Miki KOMATSU, Hiroshi AKIMARU, Atsuhiko SAITO, Atsuhiko KAWAMOTO, Takayuki ASAHARA, Yoshiki SAWA, 75th Japanese Circulation Society, 2011年3月20日、パシフィコ横浜、横浜、日本（震災の為、中止）

6. 秋丸 裕司、小松(堀井) 美希、岩崎 弘登、松田 剛典、川本 篤彦、澤 芳樹、Piero Anversa、浅原 孝之、ヒト c-kit 陽性心筋幹細胞を用いた分化心筋・血管ハイブリッドシートの心筋梗塞モデルへの治療効果、第10回 日本再生医療学会、2011年3月1日、京王プラザホテル、東京、日本

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 特記なし
2. 実用新案登録 特記なし
3. その他 特記なし

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ヒト心筋幹細胞（hCSC）の分離・培養技術を確立した。21 年度には hCSC 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い、hCSC の心筋分化誘導シート作製のための最適な培地・コーティング・デキサメサゾン添加条件も決定した。22 年度はさらに、hCSC の心筋分化誘導シートが虚血環境下での酸化ストレスに対して、高い耐性を有することを証明した。また、積層化した hCSC 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、毛細血管密度の上昇傾向及び移植細胞の血管・心筋細胞系列への分化を確認した。

(1)ヒト心筋幹細胞(hCSC)シートおよびhCSCの心筋分化誘導細胞シートにおける酸化ストレス活性の比較

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、虚血環境下において酸化ストレスに耐性を有し細胞移植治療に適した細胞シートを in vitro で形成する条件を構築する。

B. 研究方法

心筋・血管への様々な分化誘導条件を検討して我々が確立したhCSC心筋分化誘導細胞シートが虚血環境下においても酸化ストレスに耐性を持つかどうかを in vitro 系にて検証した。さらに、一般的に酸化ストレス耐性を増強すると考えられているhypoxia、並びに熱ショック(hs:heat shock)処理を心筋分化誘導細胞シートに施すことで酸化ストレス性が向上するかどうかも評価した。

確立した心筋分化誘導法(1. 分化誘導培地：

aMEM-2.5% KSR、2. 培養皿コーティング:100% FBS、37℃、2時間、3. 細胞播種密度:3.0 x 10⁵ cells / 3.5cm² ディッシュ、4. 分化誘導剤:10nM dexamethasone、6日間投与、5. 分化培養期間:14日)により未分化hCSCから心筋分化誘導細胞シートを作製する際、14日間連続して normoxia(O₂分圧 20%)、又は hypoxia(O₂分圧 5%) 条件下に曝露した。さらに、それぞれの条件下で分化誘導13日目に細胞シートを42℃、CO₂インキュベーター(O₂分圧 20%、又は O₂分圧 5%)に30分間、静置して熱ショック処理を行ったものを行わなかったもの、計4グループ(1. normoxia+hs+、2. normoxia+hs-、3. hypoxia+hs+、4. hypoxia+hs-)の心筋分化誘導細胞シートを作製した。これらの細胞シートの酸化ストレス耐性を評価するため、14日目に0.5mM、1mM、2mM、4mM H₂O₂濃度で培養液に添加し、12時間培養することで酸化ストレスを与え、H₂O₂処理を行った後の各細胞シートの細胞生存活性を dehydrogenase 酵素活性の高さで評価した。また、細胞増殖能を調べるため、1mM H₂O₂処理(12時間)した各細胞シートに対して cell

cycle マーカーKi67 タンパク質の細胞組織免疫染色を行い、Ki67 陽性率を算出した。

C. 研究結果

4 条件で作製した心筋分化誘導細胞シートに種々の濃度の H₂O₂ を作用させた後の細胞生存活性を調べた結果を図1に示す。0.5mM H₂O₂ 処理ではどの細胞シートも H₂O₂ 処理を行っていない細胞シートよりも細胞生存活性が亢進する傾向が認められた。1mM H₂O₂ では熱ショック処理、或いは hypoxia 処理を行った細胞シートではその生存活性の減少が見られたが、normoxia 条件下で熱ショック処理を行っていない細胞シートは 0.5mM H₂O₂ 処理時の生存活性よりさらに亢進し、H₂O₂ 未処理のコントロールに比べて1.5倍生存活性が上昇することが分かった。

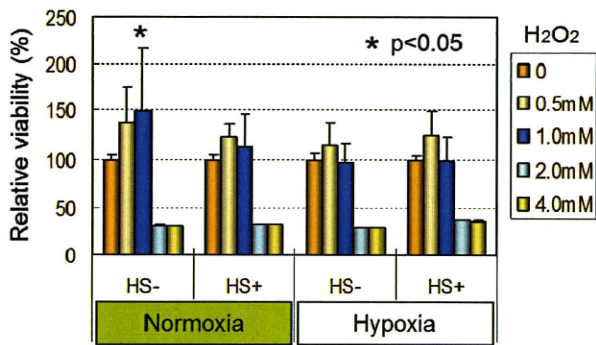


図1. Hypoxia、Heat shock 処理を行った細胞シートの細胞生存活性

細胞増殖活性を評価するため、Ki67 抗体を用いて 1mM H₂O₂ 処理した 4 種類の細胞シートの細胞 100 個あたりの Ki67 陽性率を調べた結果、熱ショック処理、或いは hypoxia 処理を行った細胞シート中の細胞増殖率は酸化ストレスを施していないコントロールと同程度を示した。一方、normoxia 条件下で熱ショック処理を行っていない細胞シートの細胞増殖活性はコントロールや他の細胞シートに対して 2.5 倍亢進した。

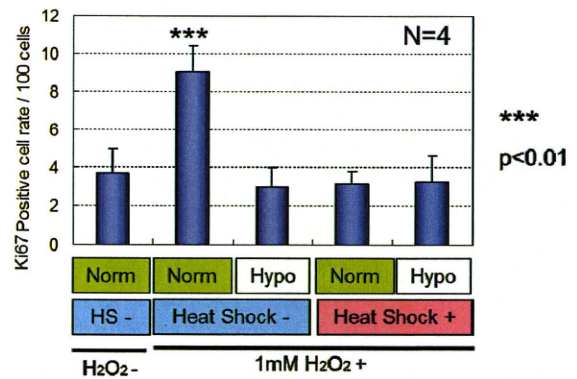


図2. 酸化ストレスに対する細胞シートの細胞増殖活性

D. 考察

細胞への熱ショック、或いは hypoxia は酸化ストレスに対する抵抗性を与える要因として一般的に知られている。hCSC 心筋分化誘導細胞シートを構成する細胞群もこれらの処理によって慢性心筋梗塞などの虚血環境下で強い酸化ストレスに抵抗性を獲得して、治療効果の向上を期待した。しかし、我々が確立した hCSC 心筋分化誘導条件に熱ショックや hypoxia を組み合わせても、in vitro における強い酸化ストレス(1mM H₂O₂)に対して細胞生存活性や細胞増殖活性は有意に向上することにはなかった。心筋分化誘導細胞シートはこれらの処理を全く行わなくても酸化ストレスに対して細胞生存活性等の有意な亢進を示したことから、我々が確立した心筋分化誘導条件で作製した心筋・血管細胞シートは抗酸化ストレス活性を十分に有しており、虚血下でも細胞増殖活性を示して、心筋保護作用を持つことが示唆された。

一方、未分化の hCSC 細胞シートではシート作成時に同様の処理を施した場合、熱ショックと hypoxia の両方で処理した hCSC シートの細胞生存活性のみが心筋分化誘導シートと同様な値で強くなることが認められた。このことから、心筋分化誘導細胞シートは心筋分化と同時に、抗酸化ストレス活性を持つことで、細胞生存活性を失うことなく、より成熟した心筋細胞に素早く分化出来る特性を持つと考えられる。

(2) 心筋梗塞モデルラットを用いたヒト心筋幹細胞(hCSC)シート移植による治療効果の評価

A. 研究目的

我々はこれまでに、重症心不全患者の心臓組織から hCSC を分離・培養し、細胞シートを作製、積層化させる技術を確立している。そこで次に、心筋梗塞モデルラットに hCSC シートを移植して細胞シートの治療効果を検証する。

B. 研究方法

温度応答性培養皿(UpCell 35mm dish) をウシ血清(FBS) でコーティングした後、hCSC を 1.5×10^6 個(Low)または 3.0×10^6 個(High)の細胞数で播種し、一晚培養して細胞シートを作製した。

心筋梗塞モデルラットへの細胞シート移植実験は、ヌードラットの左冠動脈前下行枝を結紮して心筋梗塞モデルを作製し、2週後に hCSC Low シートを1枚または3枚、あるいは High シートを3枚積層化したものを移植した。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 (cTnI)抗体、平滑筋マーカーである抗 smooth muscle actin (SMA)抗体、血管内皮マーカーである抗 von Willebrand factor (vWF)抗体による二重免疫染色を行なった。

C. 研究結果

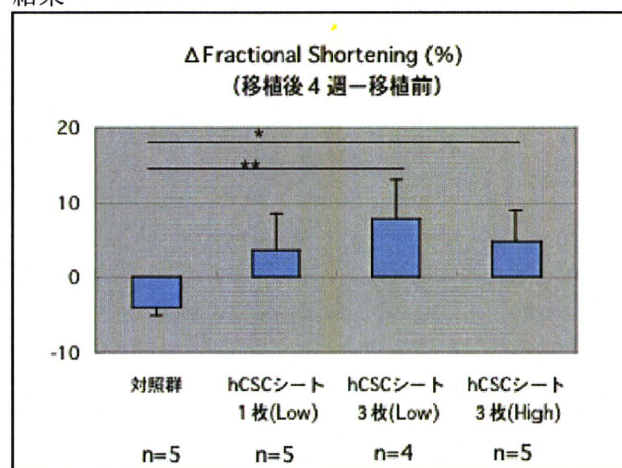
(1) 心筋梗塞モデルラットへの細胞シート移植による治療効果の評価

hCSC Low シートを1枚移植した群においては、対照群と比較して心機能、組織学的解析に有意な治療効果は認められなかった。hCSC Low シートおよび High シートを3枚移植した群においては、移植後4週で対照群(移植なし)に比べて有意に心機能の回復がみられた(図1)。組織学的にも、hCSC Low

および High シート3枚移植群では対照群(移植なし)に比べて有意に毛細血管密度が増加していた(図2)。一方、左室線維化組織面積比は、各群間で差が認められなかった。なお、上記の機能的・組織学的効果は、Low シート3枚移植群と High シート3枚移植群の間で差がなかった。

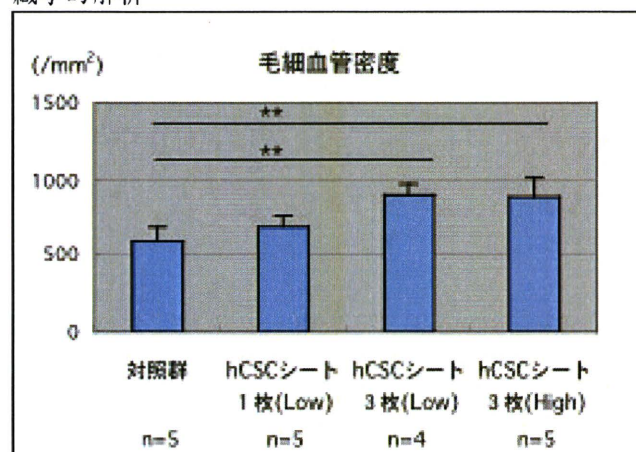
また免疫染色の結果から、移植したシートに由来するほとんどのヒト細胞はラット心臓の移植部位付近に残存し、血管平滑筋または内皮系の細胞に分化していたが、一部の細胞は梗塞部位境界部に移動し心筋細胞に分化していることが示唆された(図3)。これらの結果はシートの細胞数が 1.5×10^6 個/シートでも 3.0×10^6 個/シートでも同様であった。

図1. hCSC シート移植後4週における心エコーの結果



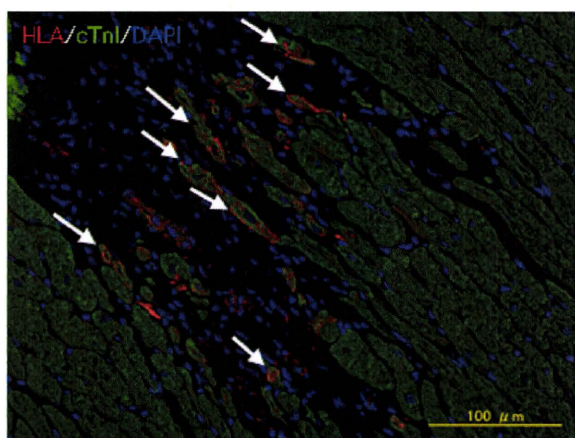
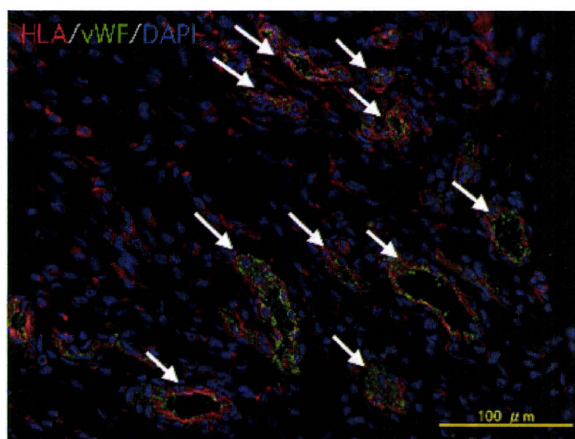
* p<0.05, ** p<0.01aa

図2. hCSCシート移植後4週における毛細血管密度の組織学的解析



* p<0.05, ** p<0.01

図 3. hCSC シートを移植したラット心臓の免疫染色写真
(上図矢印:血管内皮細胞に分化した hCSC 細胞、下図
矢印:心筋細胞に分化した hCSC 細胞)



D. 考察

ラット心筋梗塞モデルへの hCSC シート移植実験においては、1枚の Low シート移植では治療効果が認められなかったが、3枚の Low および High シート移植群では、対照群と比較して心機能と毛細血管密度の有意な改善が認められた。よって hCSC シートは1枚ではなく複数枚積層化して移植する必要があることが示唆された。今後は移植した hCSC がより効率よく心筋細胞に分化するよう、移植方法等を検討していく。

E. 健康危険情報 特記なし

F. 研究発表

学会発表

秋丸 裕司、小松(堀井) 美希、岩崎 弘登、松田 剛典、川本 篤彦、澤 芳樹、Piero Anversa、浅原 孝之、ヒト c-kit 陽性心筋幹細胞を用いた分化心筋・血管ハイブリッドシートの心筋梗塞モデルへの治療効果、第10回 日本再生医療学会、2011年3月1日、京王プラザホテル、東京、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

分担研究報告書

心筋幹細胞シートを用いた重症心不全患者に対する移植治療の臨床研究開発

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院 医学系研究科 心臓血管外科学 教授

研究趣旨；前年度までに、ヒト心臓幹細胞の分離や維持培養に関わる条件を確立した。本年度は、それらの条件を検証すると共に、それらの条件を用いて調製された心臓幹細胞を用いた心筋梗塞に対する治療法の検討を行った。その結果、昨年度までに確立した維持培養条件を用いる事に依り、心臓幹細胞の細胞周期活性、未分化性、多分化能が維持されるという事が判った。また、複数の検体から心臓幹細胞を単離し培養した所、細胞倍化時間は患者の年齢、性別、年齢と性別の交互作用という3つの因子に依って予測できると判った。さらに、心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時移植する事に依り、亜急性期心筋梗塞モデルにおいて左室内径短縮率を改善できると判り、大動物を用いた実験でもその傾向が確認された。これらの実験結果から、昨年度までに確立した維持培養条件は、少なくとも、比較的若い患者、或いは、より高齢の患者であれば女性の患者由来の心臓幹細胞に適用可能である事、さらに、心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時移植する事に依り、亜急性期心筋梗塞に対する治療が可能であると考えられた。

(1) ヒト心臓幹細胞に対する維持培養条件の検証

A. 研究目的

昨年度までに決定したヒト心臓幹細胞の維持培養における播種細胞密度条件の妥当性を検証すると共に、それら維持培養条件が複数の患者由来検体に対しても適用可能か検討すること。

B. 研究方法

(i) 播種細胞密度の検証

昨年度において維持培養条件の決定を行った際に使用したヒト心臓幹細胞(P8;合計8回継代した細胞)を実験に用いた。その心臓幹細胞は、12歳の拡張型心筋症を有する女性で、心移植のレシピエントである患者の右房に由来していた。細胞の分離とP1における心臓幹細胞単離までの方法は、昨年度の報告書に記載の通りとした。P1における心臓幹細胞の

単離後、便宜的に 170 cells/cm², 4 days/passage で4継代し、P5において再びFACSに依りC-Kit陽性率を高めた後(93.0 ± 0.9 % ;平均 ± 標準誤差)、異なる播種細胞密度で3継代(P6-P8, 5 days/passage)培養した細胞を実験に用いた。その異なる播種細胞密度とは、340, 1400 或いは 5500 cell/cm² (それぞれ、昨年度の報告書にある、2x10⁴, 8x10⁴ 或いは 3.2x10⁵ cells/100 mm dish に相当)であった。それら異なる3条件で調製した細胞(P8)のそれぞれから mRNA を抽出し、cDNA を作製後、市販のプライマーとプローブ (Gene Expression Assays, Applied Biosystems)を用いて種々の遺伝子(p21, p53, Ets1, Tie2, Gata6, alpha Smooth Muscle Actin)に対する mRNA の発現量を Real time PCR (ABI7500 FAST, Applied Biosystems)に依り半定量し、それら細胞が有する細胞周期の活性や未分化性

を上記3群間で比較した。また、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞への分化能力を比較する為に、最も良い条件と最も悪い条件と考えられた2つの異なる播種細胞密度(340 或いは 5500 cell/cm², 5 days/passage)で培養した細胞(P8)を回収し、分化誘導培地(alpha MEM supplemented with 10⁻⁸M Dexamethasone and 10% FBS)と共に、同一の播種細胞密度(3400 cells/cm²; 2x10⁵ cells/100 mm dishに相当)で播き直し、9日間の培養を行った。分化誘導開始後3日目、5日目、7日目、9日目のそれぞれの時点で数ディッシュずつ回収し、上述のようにReal time PCRに依り種々の遺伝子(Cardiac troponin T, alpha Sarcomeric Actin, Tie2, Platelet-derived growth factor receptor beta)の発現を解析し、それら細胞の多分化能を上記2群間で比較した。

(ii) 複数検体に対する維持培養条件の検討

合計9検体(表1)に対して、前年度の報告書に記載した通りの方法で心臓組織からの細胞分離、さらに、P1における心臓幹細胞の単離を行った。その後は、昨年度までに決定した維持培養条件(340 cells/cm², 5 days/passage)に従ってP2より培養を続け、最終的に、P4からP8の培養期間中における、連続する3継代から4継代において細胞倍化時間を算出した。細胞倍化時間は、(回収時の細胞数) ÷ (播種細胞数) = 2^(培養期間/細胞倍化時間) という式を基に算出した。

Table1. Sample summary

(9 samples from 9 patients) [Values are n (%)]

Patient Characteristics (n=9 patients)	
Age (yearold, mean±SD)	36±19
Male	3(33%)
Dilated Cardiomyopathy	3(33%)
Ischemic Cardiomyopathy	2(22%)
Myocarditis	2(22%)
Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy	1(11%)
Hypertrophic Cardiomyopathy	1(11%)
Cell Source (n=9 samples)	
Right atrium	1(11%)
Right ventricle	3(33%)
Left ventricle	5(55%)

表1、複数検体に対する維持培養条件の検討に用いたサンプル: 9人の患者から9つの検体を採取した。平均年齢は36歳、最高年齢は67歳、最低年齢は12歳であった。拡張型心筋症患者由来サンプルが最も多く、3検体あった。左室由来サンプル5検体の内4検体が心尖部由来であった。

C. 研究結果

(i) 播種細胞密度の検証

細胞周期の活性評価では、細胞周期制御蛋白質であるp21やp53の発現が、340や1400 cells/cm²に比べて、5500 cells/cm²で有意に高まっていた(図1)。また、未分化性の評価においても、血管内皮細胞のマーカであるEts1やTie2、さらに、血管平滑筋細胞のマーカであるGata6やalpha Smooth Muscle Actinの発現が、340や1400 cells/cm²に比べて、5500 cells/cm²で培養した細胞で有意に高まっていた(図1)。多分化能の評価では、5500 cells/cm²に比べて、340 cells/cm²の条件で培養した細胞の方が、分化誘導後に検出されたCardiac troponin T、alpha Sarcomeric Actin、Tie2、Platelet-derived growth factor receptor beta等の発現レベルが、誘導後7日目等において有意に高かった(図2)。

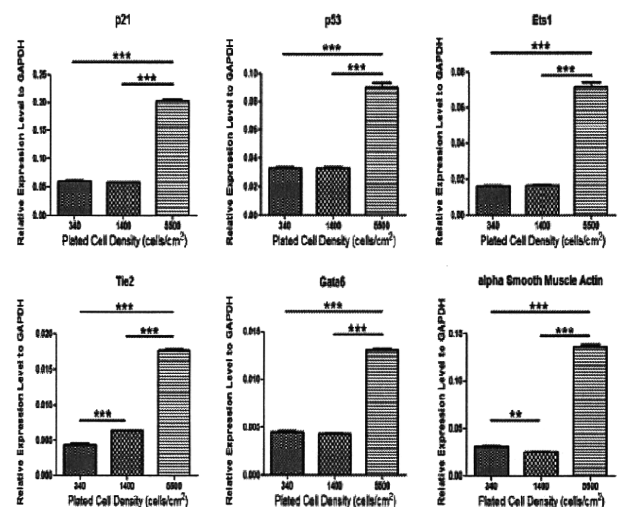


図1、細胞周期制御遺伝子と分化マーカーの発現量: 340や1400 cells/cm²に比べて、5500 cells/cm²の条件で培養した細胞で細胞周期制御遺伝子や分化マーカーの発現が有意に上昇した。

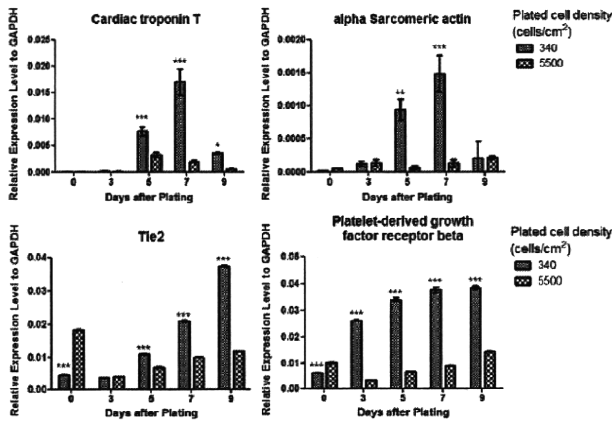


図2、維持培養における播種細胞密度の心臓幹細胞の多分化能に対する影響：340 cells/cm²で培養した心臓幹細胞の方が、5500 cells/cm²で培養したそれに比べて、分化誘導後（特に7日目）における分化マーカーの発現量が有意に高かった。

(ii) 複数検体に対する維持培養条件の検討

9検体の細胞倍化時間を算出した所(P4からP8の期間)、33 ± 13 時間（平均±標準偏差）であった。

9検体の細胞倍化時間に対して、それぞれの検体が由来する患者情報を基に因子解析を行った結果、細胞倍化時間を規定する因子として、年齢、性別、年齢と性別の相互作用という3つの因子が検出された

(R²乗 = 0.98, P = 0.0001、図3)。これらの解析から、細胞倍化時間(Population Doubling Time; PDT) = 15.7 + (0.5 x Age) + Gender1 + ((Age - 35.6) x Gender2) という予測式が算出された。この式中のAgeには患者の年齢を、また、Gender1とGender2の箇所には、性別に依り異なる値を代入する。即ち、患者が女性の場合には、Gender1 = -5.3, Gender2 = -0.2であり、患者が男性の場合には、Gender1 = +5.3, Gender2 = +0.2であった。

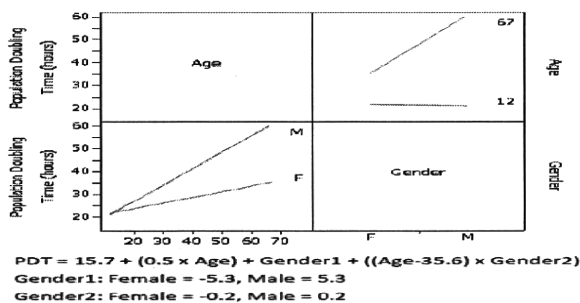


図3、心臓幹細胞の細胞倍化時間と患者の年齢や性別との関係：年齢、性別、年齢と性別の交互作用、この3つの因子によって、心臓幹細胞の細胞倍化時間が予測できると判った。特に高齢の男性患者において、細胞倍化時間の遅延が著しくなると判った。

D. 考察

(i) 播種細胞密度の検証

まず、細胞周期制御蛋白質である p21 や p53 の発現レベルが、340 や 1400 cells/cm²で培養した細胞に比べて、5500 cells/cm²で培養した細胞において有意に高まっていた為(図1)、後者では、細胞周期が抑制され、細胞増殖活性が低下していると考えられた。この結果は、前年度に確認された、それら条件で培養された細胞の細胞倍化時間が遅延するという結果と一致しており、妥当だと考えられた。また、5500 cells/cm²で培養した細胞において、血管平滑筋細胞のマーカーである Gata6 や alpha Smooth muscle actin、さらに、血管内皮細胞のマーカーである Ets1 や Tie2 の発現レベルが、340 や 1400 cells/cm²で培養した細胞に比べて有意に高まっていた為(図1)、心臓幹細胞を 5500 cells/cm²で培養すると、血管平滑筋や血管内皮細胞へ分化すると考えられた。一般的に分化した細胞は増殖活性が低下する為、昨年度に確認されたこれらの細胞の細胞倍化時間の遅延は、上記細胞周期制御蛋白質の発現上昇に加えて、これら幹細胞が分化した事にも起因すると考えられた。続いて、340 や 1400 cells/cm²で培養した心臓幹細胞は、5500 cells/cm²で培養した細胞に比べて、分化誘導後、例えば7日目の時点において、心筋細胞のマーカーである Cardiac troponin Tや alpha Sarcomeric actin、また、血管内皮細胞のマーカーである Tie2、さらに、血管平滑筋細胞のマーカーである Pdgfrb の発現レベルが有意に高く誘導された(図2)。これらの事から、前者の条件において、心臓幹細胞の多分化能が比較的高

く維持されていると考えられた。分化誘導後9日目の時点において、Cardiac troponin T や alpha Sarcomeric actin の発現が低下していたのは、これらの遺伝子が心筋細胞の最終分化に必要な骨格系の蛋白質を命令している為、これらを発現した細胞において心筋細胞への分化が完了し、これら分化マーカーの転写が停止した為だと考えられた。上記結果から、前年度までに決定した様に、播種細胞密度を 340 cells/cm² とし、5 days/passage という条件で培養を行う事で、心臓幹細胞の細胞周期活性、未分化性、多分化能が比較的高く維持できると考えられた。逆に、5500 cells/cm², 5 days/passage という条件では、細胞間接触等のストレスに起因する細胞周期制御蛋白質の発現上昇と血管内皮細胞や血管平滑筋細胞への分化が相まって、細胞倍化時間が遅延し、心筋細胞等への分化能力が低下すると考えられた。上記実験では、1400 cells/cm², 5 days/passage という培養条件においても細胞周期活性や未分化性は 340 cells/cm², 5 days/passage という条件で培養された細胞と極端に異なるとは考えられなかった(図1)。しかしながら、前年度までの検討で、1400 cells/cm² という培養条件では、340 cells/cm² に比べて、細胞倍化時間が遅延する傾向が確認されていた為、ヒト心臓幹細胞の増殖活性、未分化性、多分化能を維持する培養条件としては、昨年度に決定した通り 340 cells/cm², 5 days/passage が適当と考えられた。

(ii) 複数検体に対する維持培養条件の検討

合計9人の患者から心臓幹細胞を単離し、前年度までに決定した維持培養条件が、全ての検体に適用可能か検討した。心臓幹細胞の分化に細胞間接触が深く関わっている事、また、細胞間接触の程度は、検体毎の細胞倍化時間に依存していると考えられる為、全検体で細胞倍化時間を算出し、全ての検体に対して、この培養条件が等しい細胞間接触の程度(維持培養条件)を提供しているか検討した。その結果、

細胞倍化時間は、患者の年齢と正の相関関係があり、さらに、高齢患者においては、女性よりも男性由来心臓幹細胞において、細胞倍化時間が著しく遅延する事が判った(図3)。昨年度までに行った維持培養条件の検討では12歳の女性由来心臓幹細胞を用いていた事から、その培養条件が適用できる患者としては、その検体と近い年齢の、より若年の患者(男性と女性両方)や、より高齢の患者であれば女性患者が適当と考えられた。一方、心臓幹細胞が高齢の男性患者に由来する場合、細胞倍化時間の遅延が考えられる為、想定される培養期間中に十分に増幅できない可能性が考えられた。よって、治療に用いる心臓幹細胞が高齢の男性患者に由来する場合には、上記の事を考慮し、移植細胞数を固定するのであれば、培養期間を延長させる等の措置が必要だと考えられた

(2) ヒト心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞の同時移植における治療効果の検討

A. 研究目的

ヒト心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時移植する事に依り、その治療効果が、ヒト心臓幹細胞シート単独移植群に比べて高まるか検討すること

B. 研究方法

(i) 移植に用いた細胞等の解析

移植には、前年度の報告書に記載した通りの方法に従い単離し(P1)、維持培養した心臓幹細胞(P7)を用いた。その細胞は、29歳の女性で、心筋炎後心筋症を有し、右室補助人工心臓を装着した患者の右室に由来していた(上記、維持培養条件検討に用いた細胞とは異なる)。まず、移植に用いた心臓幹細胞をFlowcytometryに依り解析し、それらの細胞中に含まれるCD31, CD34, CD45, CD90, CD105, C-KitまたはKDR陽性細胞の割合を測定した。続いて、それら細胞の分化能力を評価する為に、昨年度までに

本プロジェクトで確立された培養法(Dexamethasoneを6日間添加し、合計14日間培養する方法)でそれらの細胞を分化誘導し、それら細胞が発現している遺伝子(Cardiac Troponin T, PDGFRB, Tie2)をReal time PCRを用いて解析した。心臓幹細胞シートの作製に用いた温度応答性培養皿(UpCell, 3.5 cm, CellSeed)は、細胞を播種する前日に7 mlのFBSで表面を覆った後、細胞を播種するまで37度、5%CO₂で一晩インキュベートした。細胞を播種する直前に、上記FBSを除去し、維持培養培地で懸濁した心臓幹細胞(P7)を播種し(1.5x10⁶ cells/ml/35 mm UpCell)、一晩37度、5%CO₂でインキュベートした。移植直前に18度で40分間インキュベートする事に心臓幹細胞シートを回収し、PBSで洗浄した後、移植した。心臓幹細胞シートに関しては、組織学的に解析する為に、ヘマトキシリン・エオシン染色と共に細胞間接着に関与するCD31やN-cadherin、さらに、心筋細胞との電気的な結合に関与するConnexin43に対する免疫化学染色を行った。心臓幹細胞シートと同時に移植した血管内皮前駆細胞は、市販されている細胞を使用した。その細胞は、African American/Caucasianの26歳、男性に由来していた。

(ii)細胞移植と移植後の心機能評価

動物実験を行うにあたり、大阪大学院医学系研究科動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた。実験では、ヌードラット(F344/NJcl-rnu/rnu、メス、8週齢)の左前下降枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製後、2週間目において、再開胸し、梗塞部に心臓幹細胞シート(2 sheets/rat)を移植した。血管内皮前駆細胞を同時移植する群では、PBSに懸濁した血管内皮前駆細胞を梗塞境界部分に針で移植した(10⁵ cells/rat, 20 ul/site, 4 sites/rat)。移植した細胞の心機能改善効果を評価する為に、移植直前と移植後2週目と4週目において超音波を用いて心機能を測定した。測

定項目は、LVd(左室拡張末期径)、LVds(左室収縮末期径)、LVFS(左室内径短縮率)、LVEF(左室駆出率)であった。最終的に、移植後2週目と4週目の値と移植直前の値との差を算出し、その値を基に統計学的な解析を行った。

(iii)細胞移植後4週目における組織学的評価

移植後4週目において、実験に供したラットから心臓を摘出し、組織染色を行った。染色は、マッソントリクローム染色、PAS染色、そして、vWF陽性細胞の免疫蛍光染色を行った。解析では、左室の繊維化率、非梗塞領域(中隔)における線維化率、非梗塞領域における心筋細胞短径の測定、梗塞境界領域におけるvWF陽性血管数の測定を行った。移植したヒト細胞の検出では、HLAに対する免疫蛍光染色を行った。検出されたヒト細胞に対しては、心筋細胞のマーカーであるCardiac troponin I、血管平滑筋細胞のマーカーであるalpha Smooth muscle actin、血管内皮細胞のマーカーであるvWFに対する免疫蛍光染色を行い、それら細胞の特徴付けを行った。

C. 研究結果

(i)移植に用いた細胞等の解析

Flowcytometryを用いた解析の結果、移植に用いた細胞の内、81.0 ± 0.5%がCD31陽性細胞、41.7 ± 7.3%がCD34陽性細胞、0.9 ± 0.4%がCD45陽性細胞、19.4 ± 1.7%がCD90陽性細胞、99.9 ± 0.1%がCD105陽性細胞、13.0 ± 2.1%がKDR陽性細胞、10.0 ± 2.5%がC-Kit陽性細胞であると判った(図4)。また、移植に用いた細胞を分化誘導した所、Cardiac troponin T, Pdgfrb, Tie2の遺伝子の発現レベルが、分化誘導前に比べて有意に高く誘導された(図5)。さらに、それら心臓幹細胞を用いて作製した細胞シートを免疫組織学的に評価した所、それらの細胞がCD31, N-cadherin、そして、Connexin43を発現していると判った(図5)。

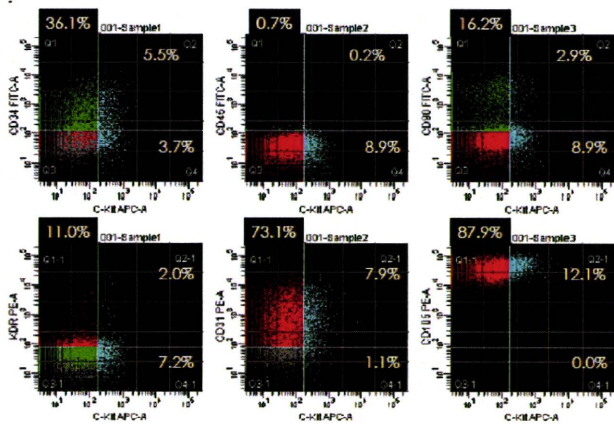


図4、移植した心臓幹細胞のFlowcytometryに依る解析:10.0 ± 2.5%がC-Kit陽性細胞であった。また、血球系のマーカーであるCD45陽性細胞は検出されなかった。グラフ中の数字は独立して3回行った実験の平均値を示している。

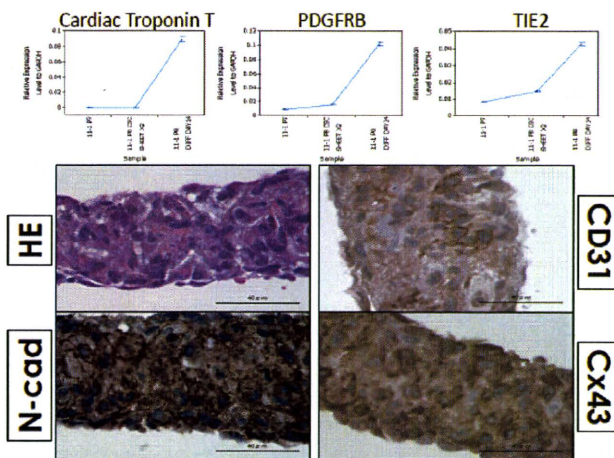
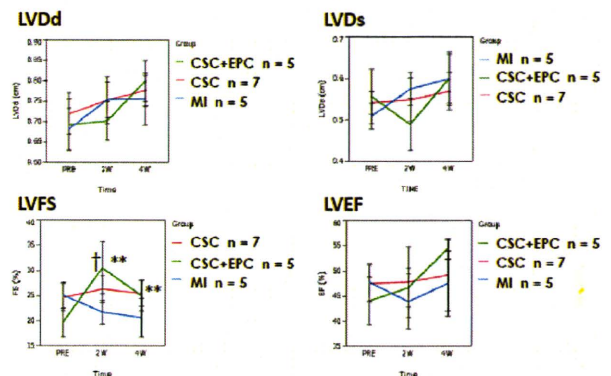


図5、移植に用いた細胞の多分化能と心臓幹細胞シートが発現している接着系蛋白質の解析:移植に用いた細胞を分化誘導すると、Cardiac Troponin TやPDGFRBやTIE2の発現が誘導された。横軸は左から、心臓幹細胞、心臓幹細胞シート、分化誘導した細胞という順で示している。移植に用いた細胞シートからは、CD31、N-cadherin(N-cad)やConnexin 43(Cx43)が発現されていた。図中スケールバーは、40 μmを示す。

(ii) 細胞移植後の心機能評価

細胞を移植後4週目において、心臓幹細胞シートを移植した群では、移植前と比べてLVFSが+0.8 ±

2.0%、LVEFが+1.7 ± 8.2%の変化を示した(図6)。さらに、心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時に移植した群では、移植前と比べて、LVFSが+5.4 ± 5.4%、LVEFが+10 ± 6%の改善を示した。この血管内皮前駆細胞を同時に移植した群では、LVFSの項目において、移植しなかった群に対しては移植後2週目と4週目において、また、心臓幹細胞シート単独移植群に対しては移植後2週目において有意な改善を認めた。



** P < 0.01 vs. MI at 2 and 4 weeks
† P < 0.05 vs. CSC Sheet at 2 weeks
Tukey-Kramer's HSD.

図6、細胞移植後の心機能評価:横軸は左から、移植直前(PRE)、移植後2週目(2W)、移植後4週目(4W)という順で示している。LVDd:左室拡張末期径、LVDs:左室収縮末期径、LVFS:左室内径短縮率、LVEF:左室駆出率、MI:細胞を移植しなかった群、CSC:心臓幹細胞シート単独移植群、CSC+EPC:心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時移植した群

(iii) 細胞移植後4週目における組織学的評価

細胞移植後4週目において、実験に供したラットの心臓を回収し、組織学的な評価を行った。まず、マッソントリクローム染色を行い、左室全体に対する線維化率と非梗塞部位(中隔)における線維化率を算出した所、各群間で有意な差は検出されなかった(以降、移植しなかった群、心臓幹細胞シート単独移植群、心臓幹細胞と血管内皮前駆細胞を同時移植した群の順で示す;左室全体、6.9 ± 3.3 vs. 14.5 ± 9.5 vs. 11.4 ± 5.0%;非梗塞部位、0.5 ± 0.3 vs.

1.0 ± 0.8 vs. 0.6 ± 0.2 % in x200 視野中)。次に PAS 染色を行い、非梗塞部位（中隔）における心筋細胞の短径を計測したが、各群間で有意な差は検出されなかった（15 ± 1 vs. 17 ± 2 vs. 15 ± 2 μm）。vWF 陽性の血管数を梗塞境界部位において計測した所、各群間で有意な差は検出されなかった（5 ± 2 vs. 10 ± 4 vs. 6 ± 2 in x200 視野中）。最後に、心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時に移植した群に対してヒト細胞のマーカー（HLA）と分化マーカーの検出を試みた所、梗塞部位外膜側や梗塞境界領域において移植したヒト細胞を検出し、それらの細胞において、Cardiac troponin I、alpha Smooth muscle actin 或いは vWF の発現を検出した（図 7）。

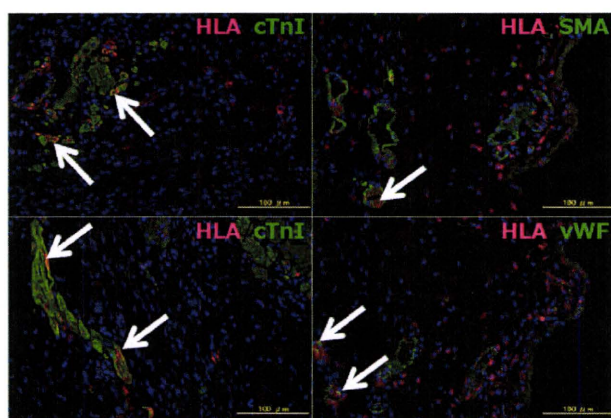


図 7、移植した細胞に対する免疫蛍光染色：移植した細胞はヒトに由来する為、HLA 陽性（赤色）であると考えた。HLA 陽性細胞の内、Cardiac Troponin I(cTnI)や alpha Smooth Muscle Actin(SMA) や vWF を発現している細胞（緑色）が確認された（白矢印）。図中スケールバーは、100 μm を示す。

D. 考察

(i) 移植に用いた細胞等の解析

Flowcytometry を用いた解析では、心臓幹細胞のマーカーである C-Kit 陽性細胞の割合が 10.0 ± 2.5 %であった（図 4）。この値は、陰性コントロールサンプルの値よりも有意に高い事から（P = 0.031, n=3）、移植に用いた細胞には、確かに C-Kit 陽性細胞が含まれていると考えられた。また、血球系細胞

のマーカーである CD45 陽性細胞の割合は、0.9 ± 0.4%であった。この値は、陰性コントロールサンプルの値よりも有意に低い事から（P = 0.018, n=3）、移植に用いた細胞群で検出した C-Kit 陽性細胞は、骨髄中に存在している血球系の C-Kit 陽性細胞とは異なる細胞であると考えられた。移植した細胞では、上記の他に、血管系細胞のマーカーである CD31、CD34、KDR、さらに、間葉系幹細胞のマーカーである CD90、CD105 が発現していた事から、それらの細胞が血管系や間葉系細胞への分化能力を有する可能性が考えられた。心臓幹細胞が、血管系や間葉系細胞への分化能力を有するという報告が過去に為されている事から、これら上記の結果は、妥当であると考えられた。移植に用いた細胞を分化誘導した所、心筋細胞のマーカーである Cardiac troponin T、血管平滑筋細胞のマーカーである Pdgfrb、血管内皮系のマーカーである Tie2 等の発現が誘導された為、これら移植に用いた細胞は、心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞への分化能力を有するという事が考えられた（図 5）。分化した細胞は一般的に増殖能力が低い事、また一方で、移植に用いた細胞の増殖能力が高いという事を考慮すると、移植に用いた細胞中には、上記 3 種類の細胞への分化能力を持つ幹細胞、即ち、心臓幹細胞が含まれていると考えられた。それらの細胞を用いて細胞シートを作製した所、細胞シート中において、細胞間接着に必要な N-cadherin に加えて、心筋細胞との電氣的結合に必要な Connexin43 が発現されていた。これらの蛋白質は、心筋細胞との接着、さらに電氣的結合を行う際に重要な働きを持つと考えられている為、移植した心臓幹細胞シートが心筋細胞と高い親和性を有し、移植後も心筋組織中に残存できる可能性が考えられた。

(ii) 細胞移植後の心機能評価

心臓幹細胞シート単独移植群では、心機能が改善する傾向が見られた。心臓幹細胞シートと血管内皮前駆細胞を同時移植した群では、移植 2 週目と 4 週目