

201006020A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる
重症心不全治療実用化基盤技術の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 一真

平成 23 (2011) 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

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる
重症心不全治療実用化基盤技術の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 一真

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発に関する研究	----- 3
岡本一真	
II. 分担研究報告	
1. 細胞デリバリーシステムの開発に関する研究	----- 9
四津良平	
2. ヒト幹細胞の調整に関する研究	----- 11
三好俊一郎	
3. ヒト幹細胞の調整に関する研究	----- 13
五條理志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21

I. 総括研究報告

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる
重症心不全治療実用化基盤技術の開発に関する研究

岡本 一真

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究代表者 岡本一真 慶應義塾大学医学部外科（心臓血管）助教

研究要旨：重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することで、心筋への細胞移植を受けるレシピエントに侵襲が少なく、安全で効率的な移植システムを構築することを目的としている。細胞移植治療の臨床応用において、細胞移植における外科的侵襲の大きさが臨床応用を阻んでいることから、移植手法の低侵襲化は急務である。これを踏まえ、本研究では従来の大きな外科的侵襲を伴うアプローチとは異なり、移植手法の低侵襲化を目指している。今年度は、1)既製の内視鏡システムを用いた心嚢内での内視鏡手術手技の確立、マニピュレータを含めた周辺機器の最適化、心外膜側からの細胞移植デバイスツールの開発、及び、2)細胞移植治療に用いるための細胞ソースの安定的、効率的な培養を確立し、移植法の検討に必要な細胞数を確保するための培養システムの確立を行った。

研究分担者

四津良平
慶應義塾大学医学部外科（心臓血管） 教授

三好俊一郎
慶應義塾大学医学部循環器内科 講師

五條理志
東京大学大学院 医学系研究科
重症心不全治療開発講座 特任准教授

A. 研究目的

本研究課題は、重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することで、心筋への細胞移植を受けるレシピエントに侵襲が少なく、安全で効率的な移植システムを構築することを目的としている。そして、本研究の最終的なゴールは、人工心臓や心臓移植に代わる重症心不全治療の切り札としてヒト幹細胞移植をベッドサイドに導入することである。重症心不全治療において心臓移植が果たしてきた役割は大きい、世界的なドナー不足の中、心臓移植に代わる治療として、細胞治療に大きな期待が集め、心不全治療を目指した幹細胞研究が着実に進んでいる。そして臨床への応用において不可欠なのは、有効な心筋への細胞移植法の実用化である。従来のアプローチによる外科的侵襲の大きさが、細胞移植治療の臨床応用を阻んでいることから、移植手法の低侵襲化は急務であり、本研究は重症心不全治療の実用化に大きく貢献する。

B. 研究方法

- 1 心不全心に対する内視鏡下低侵襲幹細胞移植法の開発
 - 1.1 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植（開胸アプローチ）

雑種イヌ骨髄採取後、左側開胸にて心筋梗塞を作製（左前下行枝第一対角枝遠位部）、2週間の間の間葉系幹細胞を培養増殖させた。細胞を移植しないMedium群、骨髄間葉系幹細胞 $3-5 \times 10^7$ 個を移植するMSC群、pioglitazone $1 \mu\text{mol/L}$ を2週間添加して培養したMSC群（pio-MSC）に無作為に振り分けた。2週間後細胞移植直前に心臓超音波検査を施行した後に、開胸し細胞を心筋梗塞部位に注入移植した。移植細胞は移植3日前にAdenoウイルスを用いてEGFP遺伝子を強制発現させた。移植2週間後に、心臓超音波検査、左室内圧測定、心筋梗塞サイズの測定、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学的検討を行った。
 - 1.2 胸腔鏡アプローチ
全身麻酔下の閉胸雑種成犬を用いて、内視鏡補助下低侵襲心臓弁膜症手術として臨床応用されている技術を応用した胸腔鏡アプローチによる幹細胞移植技術の開発を行った。
 - 1.3 心嚢内視鏡アプローチ
全身麻酔下の閉胸雑種成犬を用いて、セルディング法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保した。各種マニピュレータープロトタイプを用いて、心嚢内で細胞移植シミュレーションを行い、器具の最適化を行った。既製の内視鏡システムを用いた

心嚢内での内視鏡手術手技の確立、マニピュレータを含めた周辺機器の最適化、心外膜側からの細胞移植デバイスツールを開発した。

2 ヒト幹細胞調製法の確立

2.1 ヒト間葉系幹細胞培養システムの確立

重症心不全に対する幹細胞移植においては、一定数の細胞を安定的、効率的に樹立しかつ大量に増やす必要がある。そこでヒト胎児付属物由来間葉系細胞について、採取法から樹立に至るまでの培養法について検証を行った。

2.2 ヒト幹細胞の特性解析

得られた細胞について、増殖能や細胞表面マーカーについて検討し、樹立した細胞の特性を明らかにした。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を施行した。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行した。「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮した。本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う準備を整えたうえで研究を遂行した。

実験動物を用いる研究については、当該施設動物実験指針に準拠して研究を実施した。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、その際も、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

また本研究では、アデノウイルスベクターを用いた、遺伝子組み換え技術が用いられた。当該研究は当該施設、遺伝子組み換え実験安全委員会によって適正に審査を受け承認を受けており、運営上でも最新の注意を払って研究をすすめた。

C. 研究結果

1. 心不全心に対する内視鏡下低侵襲幹細胞移植法の開発

1.1 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植（開胸アプローチ）

シンプソン法で計測した左室駆出率を移植直前と移植2週間後の変化量を比較した。左室機能はMSC移植群ではあまり変化無かったが、pio-MSC移植群では有意に左室駆出率を改善した。また左室内圧はpio-MSC移植群で有意に増大していた。心臓を5mm厚で切断し、TTC染色を用いて心筋梗塞領域を明らかにし、Digitizerを用いて心筋梗塞容積を比較した所、MSC移植群に比して、pio-MSC移植群では

有意に心筋梗塞サイズの低下を認めた。心筋梗塞周辺部では、EGFP陽性細胞に、alpha actinin陽性細胞が免疫組織化学的検討で観察され、明瞭な横紋が観察され、心筋への分化も確認された。

1.2 胸腔鏡アプローチ

国内外の多くの低侵襲心臓弁膜症手術の拠点施設と意見交換を行い、低侵襲心臓弁膜症手術を支える最新の手術器具開発および心臓への側方小開胸アプローチの技術的進歩についての情報収集を行った。また、雑種成犬を用いて胸腔鏡アプローチによる低侵襲細胞移植法のシミュレーションを行った。

1.3 心嚢内視鏡アプローチ

全身麻酔下の閉胸雑種成犬を用いて、セルディング法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保する。各種マニピュレータープロトタイプを用いて、心嚢内で細胞移植シミュレーションを行い、器具の最適化を行った。

2. ヒト幹細胞調製法の確立

2.1 ヒト間葉系幹細胞培養システムの確立

ヒト胎児付属物である胎盤および羊膜を組織学的に分類して採取し、細胞の樹立を試み、各組織より細胞を安定的に樹立する方法をほぼ確立できた。

2.2 ヒト幹細胞の特性解析

各組織から得られた細胞の遺伝子発現解析ならびに細胞表面マーカーの解析を行った。各組織由来の細胞は間葉系マーカーの発現が認められ、また遺伝子発現解析の結果も骨髄由来間葉系細胞に近いことが認められた。

D. 考察

既に臨床応用されている胸腔鏡アプローチを用いて心臓に安全に到達し幹細胞を安全に移植することは十分可能であることがわかった。しかしながら、重症心不全における幹細胞移植治療は左心室が主なターゲットとなることが多く、従来、低侵襲心臓弁膜症手術において用いられてきた右側方小開胸によるものでは左心室への到達が困難であることも立証された。これらをふまえて、左側方小開胸による心臓への到達法について知見を深める必要がある。

心嚢アプローチについては、空気による心嚢腔拡張法を考案しこれの安全性の確認を主として行った。心タンポナーデ等の血行動態の変化をきたす事無く心嚢内視鏡治療が可能であった。今後慢性期まで癒着が少なく、繰返し移植操作が可能な手技の開発が必要となることが予想される。

胎盤・羊膜は複雑な構造を有しており、各組織を分離採取して細胞の樹立を試みた結果、形態学

的・細胞表面特性には大きな違いが認められなかった。一方、細胞の増殖能には違いが認められた。今回の結果からどの部位の細胞が移植に適したソースとなるかについての一定の知見が得られた。今後はより安定的にかつ性状を維持したまま細胞を効率よく増やしていくための培養システムの構築が求められる。

E. 結論

胸腔鏡による重症心不全心に対する幹細胞移植法は視野、操作性ともに良好で臨床応用が十分可能であった。心嚢内視鏡による細胞移植手技は、硬性鏡を用いる事で操作性が飛躍的に向上し、血行動態にも大きな影響を及ぼさず安全に移植が可能であった。内視鏡下・低侵襲アプローチによる細胞移植システムの移植細胞ソースとして有用と考えられている胎児付属物由来細胞からの細胞樹立ならびに特性解析により移植法開発へとつながる基盤ができた。

F. 健康危険情報

健康危険情報について特記すべき事項は生じなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells.
Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Artif Organs. 2010 Apr;34(4):280-8.

2. 学会発表

高橋辰郎、古梶清和、三好俊一郎、岡本一真、石田治、木村雄弘、宗形昌儒、村木浩司、稲川浩平、肥田直子、西山信大、新村大輔、梅澤明弘、四津良平 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植がイヌ心筋梗塞モデルで心機能を改善する
第 63 回日本胸部外科学会定期学術集会
2010. 10. 24 大阪

Endoscopic-assisted cardiac surgery via mini-thoracotomy for mitral valve and atrial septal defect in the era of catheter based interventional cardiology Kazuma Okamoto, Mikihiro Kudo, Ryohei Yozu 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 2011/3/20 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

II. 分担研究報告

1. 細胞デリバリーシステムの開発に関する研究

四津 良平

2. ヒト幹細胞の調整に関する研究

三好 俊一郎

3. ヒト幹細胞の調整に関する研究

五條 理志

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究分担者 四津良平 慶應義塾大学医学部外科（心臓血管） 教授

研究要旨：心不全治療を目指した幹細胞研究が着実に進む中、臨床へ向けた移植手法の低侵襲化を目指し重症心不全治療の実用化に大きく貢献することを目指している。今年度は低侵襲小切開心臓弁膜症手術に用いられている胸腔鏡アプローチによる心筋への幹細胞移植の技術的可能性について検討した。

A. 研究目的

本研究課題は重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することによって、移植レシピエントの負荷を低減し安全で効率的な細胞移植システムを構築することを目的とした。

B. 研究方法

内視鏡補助下低侵襲心臓弁膜症手術として臨床応用されている技術を応用した胸腔鏡アプローチによる幹細胞移植技術の開発を行った。国内外の低侵襲心臓外科手術の拠点施設との意見交換を密に行い、低侵襲心臓外科手術の最先端技術を獲得し、これらの技術の転用の可能性を探った。雑種犬を用いた実験において、心筋に対して安全に幹細胞を確実に移植する方法についての検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト由来細胞ならびに実験動物を用いた研究を行った。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行った。動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行った。

C. 研究結果

国内外の多くの低侵襲心臓弁膜症手術の拠点施設と意見交換を行い、低侵襲心臓弁膜症手術を支える最新の手術器具開発および心臓への側方小開胸アプローチの技術的進歩についての情報収集を行った。また、雑種成犬を用いて胸腔鏡アプローチによる低侵襲細胞移植法のシミュレーションを行った。

D. 考察

既に臨床応用されている胸腔鏡アプローチを用いて心臓に安全に到達し幹細胞を安全に移植することは十分可能であることがわかった。しかしながら、重症心不全における幹細胞移植治療は左心室が主なターゲットとなることが多く、従来、低侵襲心臓弁膜症手術において用いられてきた右側方小開胸によるものでは左心室への到達が困難であることも立証された。これらをふまえて、左側方小開胸による心臓への到達法および拍動する心臓を安定化する方法について知見を深める必要性がある。

E. 結論

内視鏡下・低侵襲アプローチによる細胞移植システムを確立するために、胸腔鏡による重症心不全に対する幹細胞移植法は非常に有用であった。視野、操作性ともに良好で臨床応用が十分可能であったが、左心室への有効な到達法および細胞移植手技についてはさらなる検討を要する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirofumi Kasahara, Mikihiko Kudo, Hiroyuki Kawajiri, Ryohei Yozu Repair of traumatic tricuspid insufficiency via minimally invasive port access(194-196) General Thoracic and Cardiovascular Surgery Vol.58. Number 4, 2010

2. 学会発表

Ryohei Yozu My way to seek Art and Science in Cardiac Surgery The 24th Annual Kalyanakit Kitiyakara Lecture Bangkok, Thailand, September 21, 2010

Ryohei Yozu Minimally invasive mitral valve surgery on a routine basis The 20th Annual Congress of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia Beijing, China, October 30, 2010

四津良平 工藤樹彦 Mini Mitral valve plasty-ポートアクセス法による僧帽弁形成術 (MICS) 第110回日本外科学会定期学術集会 2010.4.8 名古屋

工藤樹彦 四津良平 古梶清和 笠原啓史 石田治 根本 淳 小谷聡秀 福原進一 心臓手術に対するさらなる低侵襲化手術の試み-Port-Access MICS 460症例の経験より- 第35回日本外科系連合学会学術集会 2010.6.18 舞浜

四津良平 心臓外科における低侵襲手術 第10回横浜低侵襲手術研究会 2010.9.30 横浜

四津良平 Techno-College: Minimally invasive Mitral valve surgery on a Routine basis 第63回日本胸部外科学会定期学術集会 2010.10.23 大阪

高橋辰郎、古梶清和、三好俊一郎、岡本一真、石田治、木村雄弘、宗形昌儒、村木浩司、稲川浩平、肥田直子、西山信大、新村大輔、梅澤明弘、四津良平 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植がイヌ心筋梗塞モデルで心機能を改善する 第63回日本胸部外科学会定期学術集会 2010.10.24 大阪

四津良平 Mitral Valve Repair via Port-Access Approach Edwards International Valve Forum in Japan 2011.2.6 東京

工藤樹彦 四津良平 古梶清和 石田 治 根本 淳 山辺健太郎 河尻拓之 小谷聡秀 僧帽弁形成術におけるMICSの工夫—安全・確実な mini mitral valve repair に向けて— 第41回日本心臓血管外科学会学術総会 2011.2.23 舞浜

工藤樹彦 四津良平 古梶清和 石田 治 根本 淳 山辺健太郎 河尻拓之 小谷聡秀 僧帽弁手術における標準化術式としての mini mitral valve surgery 第41回日本心臓血管外科学会学術総会 2011.2.24 舞浜

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究分担者 三好俊一郎 慶應義塾大学医学部循環器内科 講師

研究要旨：重症心不全治療に対する幹細胞移植において有効な細胞移植を阻むのは心機能が悪い患者に対する侵襲度の低い細胞移植法が存在しないという事実である。そこで本研究では従来の外科的侵襲を伴うアプローチとは異なり、移植手法の低侵襲化を目指している。今年度は既製の内視鏡システムを用いた心嚢内での内視鏡手術手技の確立及びマニピュレータを含めた周辺機器の最適化を行い、主に心外膜側からの細胞移植デバイスツールの開発を行った。

A. 研究目的

既製の内視鏡システムを心嚢内で運用することで、低侵襲で心嚢内手術（特に細胞移植）に最適化したマニピュレータを開発する。この技術を確認することでヒト幹細胞移植が人工心臓や心臓移植に代わる侵襲度の低い重症心不全治療の切り札となることを目指す。

B. 研究方法

全身麻酔下の閉胸雑種成犬を用いて、セルディンガー法により心嚢内に内視鏡を挿入して心嚢内の視野を確保した。各種マニピュレータープロトタイプを用いて、心嚢内で細胞移植シミュレーションを行い、器具の最適化を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行った。すなわち動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行った。

C. 研究結果

従来血行動態への影響の少ない軟性鏡を用いていたが操作性が悪く、硬性鏡を用いた実験を行った。その結果、操作性視認性が飛躍的に向上し、懸念された血行動態への影響も軽微であった。また体位変換を行い、硬性鏡を左房後壁側まで到達させる事に成功した。細胞移植器具プロトタイプを作製し、安定して細胞移植プロセスが可能な事を確認した。

D. 考察

我々が考案した空気による心嚢腔拡張は、心タンポナーデ等の血行動態の変化をきたす事無く心嚢内視鏡治療が可能であった。今後慢性期まで癒着が少なく、繰返し移植操作が可能な手技の開発が必要となることが予想される。

E. 結論

心嚢内視鏡による細胞移植手技は、硬性鏡を用いる事で操作性が飛躍的に向上し、血行動態にも大きな影響を及ぼさず安全に移植が可能であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium. Ito A, Kimura T, Miyoshi S, Ogawa S, Arai T. Photochem Photobiol. 2011 Jan-Feb;87(1):199-207.

Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function. Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Nakamizo H, Segawa K, Tsukada Y, Ogawa S, Umezawa A. Stem Cells. 2010 Dec 9. [Epub ahead of print]

Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo. Kimura T, Miyoshi S, Takatsuki S, Tanimoto K, Fukumoto K, Soejima K, Fukuda K. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010 Nov 10. [Epub]

Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. Hum Mol Genet. 2011 Jan 15;20(2):235-44. Epub 2010 Oct 14.

Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Circ Res. 2010 May 28;106(10):1613-23.

Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Artif Organs. 2010 Apr;34(4):280-8.

2. 学会発表

高橋辰郎、古梶清和、三好俊一郎、岡本一真、石田治、木村雄弘、宗形昌儒、村木浩司、稲川浩平、肥田直子、西山信大、新村大輔、梅澤明弘、四津良平 ピオグリダゾン活性化骨髄間葉系幹細胞移植がイヌ心筋梗塞モデルで心機能を改善する
第63回日本胸部外科学会定期学術集会
2010.10.24 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

低侵襲・ヒト幹細胞デリバリーシステムによる 重症心不全治療実用化基盤技術の開発

研究分担者 五條理志 東京大学大学院 医学系研究科重症心不全治療開発講座特任准教授

研究要旨：重症心不全治療において心臓移植が果てしてきた役割は大きいですが、世界的なドナー不足の中、それに代わる治療として幹細胞移植医療に大きな期待が寄せられている。心不全治療を目指した幹細胞研究が着実に進む中、臨床へむけては有効な心筋への細胞移植法の開発法が不可欠な課題となっている。そこで本研究では従来の外科的侵襲を伴うアプローチとは異なり、移植手法の低侵襲化を目指し重症心不全治療の実用化に大きく貢献することを目指している。今年度は細胞移植治療に用いるための細胞ソースの安定的、効率的な培養を確立し、移植法の検討に必要な細胞数を確保するための培養システムの確立を行った。すなわち、細胞ソースとして有用と考えられる胎児付属物である胎盤および羊膜より、細胞を採取、培養し、かつその特性解析を行った。また各組織由来の細胞ならび移植治療に使われている骨髄由来間葉系細胞の特性について比較検討を行った。

A. 研究目的

本研究課題は重症心不全に対するヒト幹細胞移植において、内視鏡下・低侵襲アプローチを応用することによって、移植レシピエントの負荷を低減し安全で効率的な細胞移植システムを構築することを目的とする。この技術を確立することでヒト幹細胞移植が人工心臓や心臓移植に代わる重症心不全治療の切り札となることを目指す。

B. 研究方法

1. ヒト幹細胞調製法の確立

重症心不全に対する幹細胞移植においては、一定数の細胞を安定的、効率的に樹立しかつ大量に増やす必要がある。そこでヒト胎児付属物由来間葉系細胞について、採取法から樹立に至るまでの培養法について検証を行った。

2. ヒト幹細胞の特性解析

得られた細胞について、増殖能や細胞表面マーカーについて検討し、樹立した細胞の特性を明らかにした。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト由来細胞ならびに実験動物を用いた研究を行った。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行った。動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行った。

C. 研究結果

1. ヒト幹細胞調製法の確立

ヒト胎児付属物である胎盤および羊膜を組織学的に分類して採取し、細胞の樹立を試み、各組織より細胞を安定的に樹立する方法をほぼ確立できた。

2. ヒト幹細胞の特性解析

各組織から得られた細胞の遺伝子発現解析ならびに細胞表面マーカーの解析を行った。各組織由来の細胞は間葉系マーカーの発現が認められ、また遺伝子発現解析の結果も骨髄由来間葉系細胞に近いことが認められた。

D. 考察

医療用廃棄物であるヒト胎児付属物は細胞移植用のソースとして非常に有用であると考えられている。一方で、胎盤・羊膜は複雑な構造を有しておりそこを構成する細胞も異なる。そこで組織学的な分類のもと、各組織を分離採取して細胞の樹立を試みた結果、形態学的・細胞表面特性には大きな違いが認められなかった。一方、細胞の増殖能には違いが認められた。重症心不全治療を目的とした幹細胞治療においては細胞数の確保が必要であり、今回の結果からどの部位の細胞が移植に適したソースとなるかについての一定の知見が得られた。今後はより安定的にかつ性状を維持したまま細胞を効率よく増やしていくための培養システムの構築が求められる。さらに今後期待される多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞）を念頭にした基盤へとつながることが期待できる。

E. 結論

本研究の課題である内視鏡下・低侵襲アプローチによる細胞移植システムを確立するためには、ソースとなる細胞の安定した培養システムの確立が必要となる。今回移植細胞ソースとして有用と考えられている胎児付属物由来細胞からの細胞樹立ならびに特性解析により移植法開発へとつながる基盤ができたといえる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

2. 論文発表

上大介、五條理志、梅澤明弘：心筋再生医療の現状 -細胞移植療法を用いた再生医療-. Heart view 14 (6):116-120, 2010.

五條理志、許俊鋭：(シリーズ) 再生医学のいま-基礎研究から臨床への展開に向けて- 44- 細胞移植：心臓病における臨床応用への潮流。治療, 92(12): 2793-2799, 2010

五條理志、豊田雅士、梅澤明弘：組織工学と再生医療、人工臓器 39(3), 202-207, 2010

五條理志、上大介：(特集) 臨床工学技士が知っておきたい人工臓器と再生医療の展望：心臓における再生医療, Clinical Engineering, 22(1): 9-14, 2011.

2. 学会発表

五條理志：再生医療における臨床研究の現状と今後の課題。第 14 回日本心筋・血管新生療法研究会、大阪、2010. 7. 29.

五條理志、上大介、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、梅澤明弘：ヒト iPS 細胞株間における遺伝子発現解析と心筋分化誘導。第 58 回日本心臓病学会学術集会、東京、2010. 9. 17-19.

木村光利、五條理志、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、三好俊一郎、梅澤明弘、小野稔：ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植、第 10 回再生心臓血管外科治療研究会、千葉、2011. 2. 23.

木村光利、五條理志、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、西村隆、川島大、梅澤明弘、小野稔：ブタ慢性心筋虚血モデルにおける同種ブタ羊膜由来細胞移植、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011. 3. 1-2.

上大介、板倉陽子、豊田雅士、梅澤明弘、五條理志：ラット右心耳由来細胞の細胞移植療法に向けた特性解析、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011. 3. 1-2.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A.	Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells.	Artif Organs.	34(4)	280 ~288	2010
Kasahara H., Kudo M., Kawajiri H., Yozu R.	Repair of traumatic tricuspid insufficiency via minimally invasive port access	Gen Thorac Cardiovasc Surg.	58(4)	194 ~196	2010
Ito A., Kimura T., Miyoshi S., Ogawa S., Arai T.	Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium.	Photochem Photobiol	87(1)	199 ~207	2011
Shinmura D., Togashi I., Miyoshi S., Nishiyama N., Hida N., Tsuji H., Tsuruta H., Nakamizo H., Segawa K., Tsukada Y., Ogawa S., Umezawa A.	Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function	Stem Cells.	29	357 ~366	2010
Kimura T., Miyoshi S., Takatsuki S., Tanimoto K., Fukumoto K., Soejima K., Fukuda K.	Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo	J Thorac Cardiovasc Su		1~10	2010
Cui CH., Miyoshi S., Tsuji H., Makino H., Kanzaki S., Kami D., Terai M., Suzuki H., Umezawa A.	Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy.	Hum Mol Genet.	15; 20(2)	235 ~244	2010

Tsuji H., Miyoshi S., Ikegami Y., Hida N., Asada H., Togashi I., Suzuki J., Satake M., Nakamizo H., Tanaka M., Mori T., Segawa K., Nishiyama N., Inoue J., Makino H., Miyado K., Ogawa S., Yoshimura Y., Umezawa A.	Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes.	Circ Res.	28; 106 (10)	1613 ~1623	2010
上大介, 五條理志, 梅澤明弘	心筋再生医療の現状 -細胞移植療法を用いた再生医療-	Heart view	14(6)	116 ~120	2010
五條理志, 許俊鋭	(シリーズ)再生医学のいま-基礎研究から臨床への展開に向けて-44-細胞移植:心臓病における臨床応用への潮流	治療	92 (12)	2793 ~2799	2010
五條理志, 豊田雅士, 梅澤明弘	組織工学と再生医療	人工臓器	39(3)	202 ~207	2010
五條理志, 上大介	(特集)臨床工学技士が知っておきたい人工臓器と再生医療の展望:心臓における再生医療	Clinical Engineering	22(1)	9~14	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Serum-independent Cardiomyogenic Transdifferentiation in Human Endometrium-derived Mesenchymal Cells

*†Yukinori Ikegami, †‡Shunichiro Miyoshi, *†Nobuhiro Nishiyama, *†Naoko Hida,
†§Kazuma Okamoto, †Kenji Miyado, ¶Kaoru Segawa, *Satoshi Ogawa,
and †Akihiro Umezawa

**Department of Cardiology, Keio University School of Medicine; †Department of Reproductive Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development; ‡Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine; §Department of Cardiovascular Surgery, Keio University School of Medicine; and ¶Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan*

Abstract: Media with high concentrations of serum are commonly used to induce cardiomyogenic transdifferentiation in mesenchymal stem cells; however, serum contains numerous unknown growth factors and interferes with definition of specific cardiomyogenic transdifferentiation factors secreted from feeder cells. In the present study, we determined whether the transdifferentiation of human mesenchymal cells can be observed in a FBS-free medium. The efficiency of transdifferentiation was observed in 10% FBS-containing standard medium (10%FBS) and in FBS-free medium containing insulin and thyroxin (FBS-free). In the present study, we used human uterine endometrium-derived mesenchymal cells (EMC100, EMC214) and menstrual blood-derived mesenchymal cells (MMCs). After cardiomyogenic transdiffer-

entiation, the efficiency and physiological properties of cardiomyogenesis (fractional shortening of the cell [%FS] and action potential [AP]) were evaluated. The efficiency of transdifferentiation in EMC100 and in MMCs increased 36%* and 163%* (* $P < 0.05$), respectively. The %FS in EMCs increased to 103%*. AP-duration more than 250 ms with a marked plateau was only observed in FBS-free (3/19), and not in 10% FBS (0/41). The cardiomyogenic transdifferentiation of human mesenchymal cells can be observed in the FBS-free medium. Phenotypes of generated cardiomyocytes were significantly more physiological in FBS-free than in 10% FBS. **Key Words:** Cardiomyogenesis—Human mesenchymal stem cells—Serum free—Assay system—Cardiomyogenic factors.

Many types of stem cells, for example, embryonic stem cells (1,2), marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) (3–5), circulating endothelial progenitor cells (6), and cardiac residential precursor cells (7,8), etc., have been shown to transdifferentiate into cardiomyocytes in vitro; therefore, such cells are good candidates for cardiac stem cell therapy. However, only the marrow-derived MSCs (9), hematopoietic stem cells (10–12), and skeletal myoblasts (13) have been used for clinical patients at

the present time, since these cells can be obtained in an autologous manner and there is no ethical problem. The effects of this stem cell therapy are still limited, and among these stem cells, only the marrow-derived MSCs are known to cause cardiomyogenic transdifferentiation in vitro. The cardiomyogenic transdifferentiation efficiency of the MSCs was limited in vitro; therefore, we tentatively conclude that the observable effect of the MSC transplantation in clinical patients is due either to grafted MSC-induced neovascularization (3,14) or the paracrine effect (15) on the residual host myocardium. To further improve the efficacy of cardiac stem cell-based therapy, cardiomyogenesis from engrafted stem cells is essential.

The precise mechanisms for cardiomyogenesis from the human MSCs are still unclear. Nonspecific

doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00859.x

Received December 2008; revised April 2009.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Shunichiro Miyoshi, Keio University School of Medicine, 35-Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. E-mail: smiyoshi@cpnet.med.keio.ac.jp

demethylation of DNA by 5-azacitidine initiated cardiomyogenic transdifferentiation of murine marrow-derived MSCs (16); however, in human MSCs, it failed to cause cardiomyogenesis (17). For human MSCs, environmental factors are believed to play a pivotal role in cardiomyogenesis, since co-cultivation with murine cardiomyocytes (feeders) is essential *in vitro*. Nevertheless, specific cardiomyogenic differentiation factors are difficult to determine, because environmental factors are complex and numerous. Previously, we have reported that the human uterine endometrial gland-derived mesenchymal cells (EMCs) or menstrual blood-derived mesenchymal cells (MMCs) have an extremely high cardiomyogenic transdifferentiation efficiency (76–97% and 27–32%, respectively) (18) compared to the marrow-derived MSCs (0.3%). This also suggests that our feeder secretes significant cardiomyogenic transdifferentiation factors for human mesenchymal cells.

Serum-containing media are commonly used for the culture procedures, and the serum may be one of the major environmental factors for cardiomyogenesis. The serum contains numerous growth factors, some of which are unknown. Therefore, it is very difficult to determine feeder-derived specific cardiomyogenic transdifferentiation factors by use of serum-containing media. In the present study, we showed cardiomyogenic transdifferentiation in our *in vitro* cardiomyogenic transdifferentiation assay system with a chemically defined FBS-free medium. Finally, we established a FBS-free *in vitro* cardiomyogenic transdifferentiation system to detect feeder-derived humoral factors for cardiomyogenesis of human mesenchymal cells.

MATERIALS AND METHODS

Cardiomyogenic induction

Fetal cardiomyocytes were obtained from the hearts of day 17 mouse fetuses, as described previously (17). Cultured cardiomyocytes were plated at $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ on the culture dish as feeders for the co-culture system. In the control experiment, the obtained cardiomyocytes were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, then plated on the 1% gelatin-coated dishes. In the test experiment, we used a FBS-free medium, which was designated as ACCITT medium (19): M199 medium containing 5 mM creatine, 2 mM L-carnitine, 5 mM taurine, 0.1 nM thyroxin (T3), 0.1 μM insulin, 2.5 mM pyruvate, and 2 mg/mL heat-treated bovine serum albumin (Fraction-V). In order to negate the possible contamination of serum, cells were washed

with PBS three times after collection. In the FBS-free medium, cells attached to the gelatin-coated dishes were rare; therefore, a laminin-coated dish was used for the experiment. Human EMCs and MMCs were obtained as described previously (18). In short, individual human endometrial glands were isolated under a microscope and then seeded. After the retroviral transfection of HPV16E6, E7, and hTERT, endometrial cell strains of EMC100 and EMC214 were generated by the limiting-dilution methods. MMCs were established by primary culture of human menstrual blood. EGFP-labeled (17) EMCs and MMCs were plated on the feeders at $3 \times 10^3/\text{cm}^2$.

Immunocytochemistry

The samples were stained with mouse monoclonal anticardiac troponin-I antibody (# 4T21 Lot 98/10-T21-C2, HyTest, Turku, Finland) diluted 1:300, or monoclonal anti- α actinin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) and anti-connexin 43 antibody diluted 1:300. For nuclei staining, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used. Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma), TRITC-conjugated goat antirabbit IgG (Sigma), and Cy5-conjugated goat antimouse IgG (Chemicon, Temecula, CA, USA) were used as secondary antibodies (20). A laser confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) was used for immunocytochemical analysis (18,20,21).

Calculation of induction rate

EMCs and MMCs were dissociated 1 week after cardiomyogenic induction by 1% trypsin and 0.25 mM EDTA for 5 min at 37°C. These cells were then dissociated by 0.5% collagenase type-II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) and 10 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM) (Sigma) for 20–40 min at 37°C. After centrifugation (1000 rpm, 5 min), the EMCs and MMCs were seeded on the poly-L-lysine-coated dishes for 2–3 h at room temperature. The dishes were fixed and immunocytochemically stained by the anti-troponin-I antibody (16 h, 4°C), then observed by the laser confocal microscope. The cardiomyogenic induction rate was calculated as the fraction of human cardiac troponin-I positive cells in the EGFP-positive cells. The rate was calculated as the average of five separate experiments. The calculations were done by analyzing photomicrographs recorded under the same conditions (18,20,21).