

- 3) 重要な有害事象及び重篤な有害事象
- 4) 骨格筋組織採取により生じた有害事象（骨格筋組織採取との因果関係が否定できない有害事象）
- 5) バイタルサイン、血液一般検査及び血液生化学的検査の推移

また、5)においては、小児患者の年齢・月齢に応じて設定した基準値を用いる予定である。以上の考えについて、機構の意見を聞きたい。

【機構の意見】

本剤は心臓表面に貼付するものであるため、提示された評価項目に加えて、収縮性心外膜炎様の拡張障害や収縮障害の有無に関する評価について、検討する必要があります。

また、治験での有害事象とは被験者に生じたあらゆる好ましくない医療上の出来事であり、4)の骨格筋組織採取時及びその後の観察において認められた有害事象についてはすべて収集する必要があります。その上で、組織採取との因果関係の有無について考察し、安全性を評価する必要があることに留意してください。

相談事項 2 小児（小児重症心筋症に対する TCD-51073 の探索的試験）

4. 症例数について

【相談内容の解釈】

小児期特発性心筋症患者で、内科的治療が奏功せず、心移植登録となる患者は年間約 30 人と推定される。大阪大学医学部附属病院における小児心臓移植検討症例数は年間 10～15 例であり、補助人工心臓の適応となる患者は年間 5 例と考えることから、小児治験の対象となる重症心不全患者は、年間数例程度と考えられる。以上より、小児治験の実施期間（2 年間）における実施可能性から症例数を 3 例と設定し、乳幼児（6 歳以下）を最低 1 例以上組み入れることとしたが、この症例数の設定について、機構の意見を聞きたい。

【機構の意見】

小児治験の目的が「安全性（有害事象）の確認、小児における移植の実施可能性の検討」（小児治験計画書 p.28）であり、相談事項 2-2 に記載したとおり、小児治験の対象患者数が極めて限られていることについて一定の理解は可能であることから、小児治験の症例数を 3 例とすることは受入れ可能ですが、限られた症例数の中でさらに年齢による規定が設定されること、実施可能症例として「3 例～6 例」（薬事戦略相談 対面助言資料 別紙 1p.6 及び p.8）とされていることも考慮すると、可能な限り多くの症例を組み入れることが望ましいと考えます。

その他

<小児重症心筋症に対する TCD-51073 の探索的試験について>

- 「心筋梗塞モデル幼若ミニブタを用いた筋芽細胞シート移植の安全性及び有効性の検証を行った。」(平成26年3月5日提出回答書 p.5) として提示された成績において、幼若動物由来の筋芽細胞を用いて作製した「筋芽細胞シート」では、成熟動物由来の「筋芽細胞シート」と比較して、肝細胞増殖因子(HGF)及び血管内皮細胞増殖因子(VEGF)等のサイトカイン産生量が有意に高いことが説明されています。当該サイトカインは本剤の薬理作用に係わると推察されていることから、由来が成熟動物であるか幼若動物であるかによってサイトカイン産生量が異なり、「筋芽細胞シート」の安全性に影響する可能性が考えられます。したがって、小児治験の開始にあたっては、幼若動物を用いた動物試験の成績を踏まえて、非臨床安全性評価において懸念がないことを説明する必要があると考えます。

- 相談事項1と共通する成人ICM治験からの変更点については、相談事項1の議論も踏まえて再度検討する必要があります。

以上

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

細胞製剤製造施設構造設備にかかる Minimum Consensus Package (MCP)の提案

研究分担者 近畿大学薬学総合研究所 早川堯夫
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 松山晃文

研究要旨

近年、再生医療の発展とともに、細胞調整施設を持つ公的機関やアカデミアが多くなってきたが、適切に衛生管理、清浄度管理が行えている施設は少ないと思われる。空調設備や構造設備に関する的確な管理方法が記されたマニュアルが存在しないのも、一因と考える。本稿では、空調設備や構造設備に関する基本構造の説明及び具体的な管理方法について概説する。

A. 研究目的

細胞調整施設は、各種幹細胞や ES・iPS 細胞等から作製する再生医療で扱う細胞・組織工学製品を製造するためには欠かせない施設であるが、その構造や、運用方法については 案外知られていないのが現状である。施設の運用を間違えると、細胞の調製段階で交差汚染が発生し、苦心して調製した細胞を廃棄しなければならない等、時間的ロスや資金的にも厳しいものがある。本稿では、細胞調整施設の空調設備や構造設備の基本構造の説明と、清浄度を維持管理する具体的な管理方法について説明する。

B. 研究方法

GMP 対応の細胞培養システムの最適化にむけ製品標準書、製造手順書、製造指図書等に反映するための基礎情報を収集すべく、細胞製剤製造施設に関し、MCP(最低限要求される事項)を調査取りまとめた。

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験(研究)において遺伝子改変動物、プラスミドDNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。
2. 動物操作に当たっては、国立大学法人大阪大学の動物実験規定に従って行なう。
3. 臨床試研究の実施にあつては、計画書(プロトコール)に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

C. 研究結果

1. 1 製造施設

1. 1. 1 汚染防止

細胞製剤に対する汚染防止の原則は、次の3つに尽きる。

持ち込まない
拡散させない
増加させない

これら3つの原則を満足させるには、構造設備の完備、衛生管理、作業員の教育と作業管理を確立し、遵守していく以外、方法はない。

- 1) 構造設備の完備として、動線を考慮した作業室の配置、製造機器の配置・管理、空調設備の適切管理がある。
- 2) 衛生管理としては、施設の消毒方法の確立、消毒効果の確認方法及び原材料の搬入方法の確立、感染性廃棄物の適切な処理方法の確立がある。
- 3) 作業員の教育訓練と作業管理は、教育の年間スケジュールに基づき、衛生管理教育及び製造管理教育を行い、適切な作業方法を確立・遵守する。

1. 1. 2 作業室の清浄度区分

細胞調整施設内のゾーニング（エリア分け）を決定する上で重要な項目として、清浄度区分がある。この清浄度区分により、人と物品（製品や原材料等）の動線や気流方向も左右されるため、適切に設定する必要がある。清浄度区分で、清浄度が高い方が良いからと言って、全エリアをクラス1万にした場合、クラス1万を維持するための換気回数は、40回～50回と、他のクラスに比べ、20回～30回多い。この換気回数を維持するための電気量や室温、湿度を維持するための冷水、温水等の使用量を考えると、コスト高になる。また、環境測定を行う場合、クラス1万エリアと、クラス10万エリアとでは、クラス1万エリアの方が、測定頻度や測定ポイント数が増え、管理基準も厳しくなり、維持管理するには、技術的にも経済的にも負担が増すため、製品の品質を維持し

ながら、用途に応じた適切なクラス設定を行う必要がある。

1. 2 空調システム

細胞製剤は、その特徴として滅菌工程がないことが挙げられる。滅菌工程がない細胞製剤の無菌性、安全性については、製造工程での影響が大きく、構造設備における工夫や配慮が必要となる。細胞調整施設の構造設備は、薬事法のみならず、建築法や消防法等の数々の法規を満足させると共に、品質の良い製品を製造する施設として、GMP上、重要な位置づけとなっている。原材料の搬入から製品の出荷に至る全工程において、異物の混入、微生物汚染、他製品からのクロスコンタミネーションを防止できる構造設備とすることが重要である。細胞調整施設の構造設備の中で、クロスコンタミネーション防止を考える時、最も重要な設備として、空調システムが挙げられる。

1. 2. 1 原理

細胞調整施設で用いられている空調機は、エアハンドリングユニット（AHU）と呼ばれる比較的規模の大きな空調機が多い。外部熱源設備から供給される冷水、温水、蒸気等を用いて、外気をプレフィルターと中性能フィルターに通した後、空気の温度や湿度を調節して室内に供給する。一つのケーシングの中に、プレフィルター、中性能フィルター、冷温水コイル、加湿器、ドレンパン、送風機を組み合わせ、調節された空気をダクトから、細胞調整施設室内の天井に設置されたヘパフィルターに供給する。ヘパフィルターから供給された清浄な空気は、室内の排気口からダクトを通して、排気ファンを経て室外へと排出される。

1. 2. 2 陽圧のクリーンルーム

へパフィルターから、クリーンルーム室内に供給される空気量と、排気される空気量との差が、プラスであれば、陽圧のクリーンルームとなる。陽圧で有るため、空気の流れは、室内から外への流れとなる。このため、陽圧のクリーンルームで処理される検体は、感染症陰性の検体が主である。陽圧管理のクリーンルームは、2つのタイプがある。

隣接している着衣室に対して、室圧が高いタイプと室圧が低いタイプである。

着衣室に対して、室圧が高いタイプの長所は、空気が着衣室方向に流れるため、着衣室で発生した塵埃等を封じ込める事が出来る。短所は、クリーンルームで発生した塵埃等が着衣室に流れ込むため、感染の危険がある検体は取り扱うことが難しい点である。

着衣室に対して、室圧が低いタイプの長所は、着衣室からクリーンルーム方向へ、空気を押し込めることが出来るため、擬陽性の検体を処理することが可能である点。短所は、着衣室で発生した塵埃が、クリーンルームに流れ込む点である。この欠点を解消するには、着衣行為で発生した塵埃が治まるまで、着衣室で待機し、その後、クリーンルームに入室することで解消できる。一連の手順については、更衣手順書等に記載することが重要である。

1. 2. 3 陰圧のクリーンルーム

陽圧のクリーンルームとは逆で、クリーンルーム室内に供給される空気量と、排気される空気量との差が、マイナスであれば、陰圧のクリーンルームとなる。いわゆる封じ込めのクリーンルームで、室外に漏れると危険なベクターや感染性の検体を取り扱われる。

陽圧のクリーンルームでは、排気ダクトの先端

にある排気ファンに、排気用へパフィルターが設置してあるが、陰圧のクリーンルームでは、室内の排気口に排気用へパフィルターが設置してある。これは、消毒作業時に、排気用へパフィルターが排気ファン近くにあると、汚染された排気ダクトの奥まで消毒が困難であるため、それを防止する意味で、室内の排気口に排気用へパフィルターが設置されている。

陰圧のクリーンルームでは、ウィルスによる汚染も考えられるため、ガス滅菌対応の施設が多い。室内の壁やダクトの材質も、ガス滅菌による変色や錆を防止するために、フッ素樹脂のカラー鋼板や、ホルマリンガス対応のダクト等、特殊なものが使用される。

ベクターや感染性の検体を取り扱われる環境であるため、クリーンルームの陰圧に加え、汚染された空気が外部に漏れ出さないよう、バッファエリアを設け、空気を押し込めている。

陰圧のクリーンルームに付帯している脱衣室の室圧は、陰圧のクリーンルームより、さらに低く設定する必要がある。これは、脱衣行為で発生する塵埃や作業衣に付着している感染性の異物が、陰圧のクリーンルームに流れ込むのを防止すると共に、脱衣室に設置されているオートクレーブから発生する蒸気のみストが、陰圧のクリーンルームに流れ込むのを防止するためである。まれに陰圧のクリーンルームと脱衣室の室圧が逆転している施設があるが、コンタミネーションの危険性から、好ましい状態ではない。

陰圧系統と陽圧系統の空調システムは、別系統にするのが望ましい。別系統にする理由は二つある。一つは、一系統で陰圧系統と陽圧系統に空気を供給していると、空調システムでトラブルが発生した場合、気流の逆流が発生し、汚染された空気に製品や人体が暴露する危険性があるためである。二つ目は、各施設の仕様にもよるが、施設全体に停電が発生した場合、バッ

クアップ電源だけでは二系統の空調機を稼働させることが出来ない可能性があるためである。多くのバックアップ電源は、施設全体の電気量をカバー出来ず、全容量の50%程度の供給で設定されている施設が多い。陰圧系統と陽圧系統を一つの空調システムで稼働している場合は、消費電力が大きすぎて、50%程度の供給では、空調機が運転出来ないが、二系統にしておくと、一系統あたりの消費電力が低く抑えられ、危険性の高い陰圧系統の空調機を優先的に稼働することが出来る。

1. 2. 4 温湿度制御

一般医薬品の錠剤や高分子系の薬剤は、吸湿するとひび割れ、膨潤、変色、カビの発生等のリスクがあるが、細胞製剤は、室内環境に直接暴露される時間が短いため、一般医薬品の湿度条件（30%RH～50%RH）よりは、高め（35%RH～65%RH）でも支障はないと考えるが、65%RHを超えると、カビが発生しやすくなるので、注意が必要である。細胞調整施設室内の床材は、長尺塩ビシートを使用している施設が多いが、湿度が30%RHより下がると、静電気が発生しやすくなり、処理時に細胞製剤への影響が懸念される。

温度管理も、製品への影響よりは、作業員の快適性が主となる。通常は22℃±3℃で管理する事が多いが、無菌衣の重ね着等で、汗をかかないよう配慮する必要がある。汗や汗に存在する細菌等がコンタミネーションの原因になることが有るため、夏場は通常より1℃～2℃低めに設定することが多い。

1. 2. 5 換気回数と清浄度

細胞調整施設内の換気回数と清浄度には、密

接な関係がある。室内の換気量は、室内容積に相当する空気量が、1時間当たり何回入れ替わったかで表す。これを換気回数（回/時）という。

室内に存在する浮遊微粒子は、HEPAフィルターを通過した、ごく少量の浮遊微粒子と、室内で発生する浮遊微粒子からなり、取り入れた外気に含まれる浮遊微粒子、フィルター効率、循環空気率、送風空気量の関数で表される。経験値から、クラス1万程度の換気回数は、40～50回 クラス10万程度では、20回前後である。

1. 2. 6 差圧

細胞調整施設内の管理区域は、異物混入、クロスコンタミネーション防止、微生物汚染防止の目的で、各作業室、作業区域に気圧差（以後差圧）を設け、気流方向を決定する必要がある。GMP対策上、室間差圧及び気流方向は重要な項目である。

「陰圧のクリーンルーム」の項でも説明したが、感染性検体を取り扱う処理室は、バイオハザード防止の目的で、大気圧より低く設定するが、一般的には、陽圧で管理される。

隣接する2室間の差圧は、2室の清浄度により異なるが、10Pa～15Pa程度の差で設計されるのが通常である。差圧計の設置場所は、HEPAフィルターからの気流の影響を受けやすいため、風速（動圧）を感知しない場所に設置するのが望ましい。

室内の気流の流れは、HEPAフィルターからの吹き出し口と、排気口及び局所排気の位置により決まるが、作業員が気流を感じるような設定は、避けるべきである。

1. 3 防虫防鼠対策

薬事法では、異物が混入したものや、微生物

汚染された製品は、不良製品として取り扱われ、これを防止するために、細胞調整施設においては、高度な衛生管理が要求される。菌汚染を含め、異物混入対策として、重要な項目に防虫防鼠対策がある。製造施設として、製造上不必要な動物は排除されるべきで、特に昆虫や鼠に関しては、非衛生的な動物とされ、それら個体の排泄物や、個体が接触した箇所から、製品へのコンタミが無い様に十分注意すべきである。

1. 3. 1 防虫対策

[昆虫相調査]

細胞調整施設の防虫対策を立てるにあたり、クラス10万までの全エリアに捕虫トラップを設置し、春夏秋冬に捕獲される昆虫の種類、数及び捕獲場所の調査を行う。捕獲された昆虫の生態から、細胞調整施設内で発生しているのか、人や資材に付着し、持ち込まれた昆虫なのか、または、細胞調整施設外から侵入してきた昆虫なのかが、把握でき、適切な防虫対策をとることが出来る。また、侵入してきた昆虫に関し、侵入箇所を特定することにより、施設の不具合箇所の発見と、補修計画を立てることが可能となる。昆虫相調査に用いられる捕虫具には、粘着トラップとライトトラップがある。

- 1) 粘着トラップは、ゴキブリの捕獲用に市販されているトラップと同じ様に、板状に粘着剤を塗布したもので、徘徊する昆虫の捕獲に使用する。異物混入等の対策のため、細胞調整施設用のものは、トラップ内部に餌や誘引剤は設置しない。
- 2) ライトトラップは、飛来昆虫で、走光性の虫の捕獲に使用する。ライトトラップには、電撃式と粘着式のものがある。

I 細胞調整施設内に生息する昆虫

細胞調整施設内部で世代を繰り返す昆虫で、

徘徊昆虫が多い。原材料や製品に混入するチャンスが高く、中には単為生殖するものも居り、細胞調整施設内では絶滅対策が必要である。

代表的な昆虫として、コナチャタテムシ・トビムシ・ダニ・ヒメマキムシ・カツオブシムシ・シミ等がいる。

II 排水系から侵入する昆虫

浄化槽やピット、排水溝から発生する昆虫で、トイレの壁などでよく見かける。細胞調整施設内には、排水管から侵入してくることが多く、発生源の多くが、不潔な所であるため、侵入すると、コンタミを引き起こす原因となる。代表的な昆虫として、チョウバエ・ユスリカ・ニセケバエ等がいる。

III 飛来侵入する昆虫

飛来する昆虫については、細胞調整施設外の水田、雑草地、河川、樹木等で発生するもの多く、自然が相手だけに対策が難しい。飛来昆虫に関しては、発生している場所に近づかないこと、細胞調整施設に入れないこと、入ったものは、捕捉・殺虫することが重要である。代表的な昆虫として、クロバネキノコバエ・タマバエ・ヨコバエ・カメムシ・キクイムシ・ユスリカ等がいる。

IV 人・資材等に付着して持ち込まれる昆虫

原材料や人に付着して、細胞調整施設に持ち込まれる昆虫で、主にダンボールやクッション材に付着しているケースが多い。人に関しては、服や髪の毛、所持品等に付着し、更衣室を経て侵入するケースが多い。代表的な昆虫として、コナチャタテムシ・シミ・タカラダニがいる。

V 細胞調整施設周辺の土壌や緑地から侵入する昆虫

建物の外周の土壌や緑地で見かけることが多い昆虫で、多くは、歩行で細胞調整施設に侵入する。細胞調整施設内部と外部との接点である、パスルームや搬入口のドアの隙間をなくすことが大切である。代表的な昆虫として、ダンゴムシ・ゲジ・ヤスデ・ハサミムシ・ワラジムシ・ケラがいる。

[防虫対策の実施]

防虫対策の基本項目

- 1) 特定の昆虫を対象にするのではなく、細胞調整施設内の全ての昆虫を対象とする。
- 2) 前記、昆虫相調査から得られたデータを基に、採るべき対策と優先順位を決定する。
- 3) 対策として、物理的対策、化学的対策(殺虫剤)、衛生管理、作業員教育を効果的に組合せて実施する。
- 4) 昆虫の大規模な発生や、殺虫施工が困難な箇所等があれば、必要に応じて、専門業者に相談し、指導を受ける。
- 5) 防虫対策の効果を量的に確認し、評価する。

[物理的対策]

物理的な対策として、細胞調整施設の製造施設や資材保管場所等の密閉化と侵入防止化がある。

1) 密閉化

出入り口等：エアーロック室の設置（作業室の陽圧管理）

防虫カーテン
二重ドア
自動ドア

ドア隙間のシール
ガラス取り付け部分のシール
壁・天井：パネル隙間のシール
各種取り付け機器・器具との隙間シール

排水口：トラップ（水封）の設置

2) 侵入防止化

出入り口等：ガラス面に防虫フィルムの貼付
ドアと床との隙間にカバー設置（ゴムラバーのストッパー）

純黄色蛍光灯の設置
ナトリウム灯の設置
ライトトラップの設置
トラップの設置

排水口：防虫網の設置・排水トラップの水の補給

排気口：防虫網の設置

侵入防止化の純黄色蛍光灯の設置とライトトラップの設置は、相反する性質を利用している。純黄色蛍光灯は、白熱電球に集まる昆虫の数を100としたときの誘虫性は、10以下で、飛来昆虫数を大幅に減少させることができる。一方、ライトトラップに使用されている捕虫用蛍光灯（以下ブラックライトという）の誘虫性は、1300位で非常に高く、昆虫が集まりやすい。この光を利用し昆虫を粘着マットに付着させたり、電撃殺虫器の高圧電流で殺虫する。細胞調整施設内では、この2種類の光を上手く利用することで、防虫管理を行っている。細胞調整施設の外部へブラックライトの光が漏れると、一般エリアの昆虫を細胞調整施設に誘い込むことになるため、設置場所や取り付け角度を工夫する必要がある。光が漏れる場合は、ガラス面に、防虫フィルムを貼付する等、工夫することが大切である。

[化学的対策]

化学的対策として多く用いられるのが殺虫剤である。細胞調整施設で用いられる殺虫剤に求められるのは、残留性が少なく、比較的 안전한殺虫剤である。この条件に合うのが、ピレスロイド系殺虫剤である。ピレスロイド系殺虫剤は、薬液を20～50 μmの霧状にして、昆虫に直接噴霧するタイプと、50～100 μmの粒子を昆虫の潜んでいる箇所や、通路に噴霧し、昆虫がその上を通過する際に、脚部分に殺虫剤を接触させ、死滅させるタイプがある。このピレスロイド系の燻煙剤もあるが、比較的安全とは言え、薬剤が広範囲に広がり、殺虫が必要のない箇所や機器まで薬剤が附着するため、細胞調整施設内で使用するには、不適である。

細胞調整施設内の手洗い場等、排水系から発生する昆虫の駆除に有効な薬剤として、昆虫成長制御剤がある。このタイプの殺虫剤は、人や家畜に対して毒性が少なく、臭気もほとんどない。この殺虫剤は、少量をピット等、幼虫が生息している水系に投入することで、幼虫の成長を阻害し、駆除できる。商品名 スミラブ粒剤（主成分 ピリプロキシフェン）が広く使われている。

ピレスロイド系殺虫剤、昆虫成長制御剤以外の薬剤として、有機塩素系殺虫剤、有機リン系殺虫剤、カーバメイト系殺虫剤があるが、各殺虫剤の使用にあたっては、目的に合った有効成分、製剤の種類、処理方法等を吟味し、選択することが重要である。

比較的、安全性の高い殺虫剤を使用する時でも、原材料、資材及び製造機器等は、ビニールカバーやラップ等で養生を行うか、他の場所に移動するのが賢明である。

また、殺虫剤によるコンタミ防止のため、クラス10万～1万までの清浄度エリアでは、殺虫剤を使用しないことを含め、殺虫剤使用に関する手順書を作成し、遵守する必要がある。

[効果の評価]

物理的対策及び化学的対策を実施した後の評価は、対策後、昆虫相調査を行い、客観的に評価を行う。対策前後の捕獲数の差から、防除率を求めて、効果の評価を行う。

D. 考察

昨今、多くの研究機関などでCPCが設置されているが、その構造設備にソフトでは対応しがたい課題があるものが散見され、本調査研究で研究者がおざなりにしがちなCPC構造設備について、議論が深まったと考える。

E. 結論

大学など研究機関では、再生医療に関する多くの論文が出され、製造に関する知識が蓄積されていると考えるが、それが細胞製剤として、世の中に普及していくレベルかと言うと、必ずしもそうではなく、製品化や事業化するには構造設備や管理方法に関し、ハードルは高いと考える。

GMPに準拠した構造設備の、空調システムや衛生管理方法について説明したが、ハードだけではなく、それを動かし、管理するソフトも重要であり、ハードとソフトの両輪が機能することが重要と考える。GMPに準拠したハードの下で品質管理された製造を行い、本調査結果を参考にして骨格筋芽細胞シート開発が進められると信じる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived

- multi-lineage progenitor cells. Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, Matsuyama A, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S. *Inflammation and Regeneration*, 2014, in press
2. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A and Hayakawa T. Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *STEM CELLS & DEV* (In press)2014
 3. Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014 Jan 8.
 4. Shudo Y, Miyagawa S, Okura H, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng, part A*. 2014 Jan 3. [Epub ahead of print]
 5. Matsuyama A. Translational research in regenerative medicine: A translational gap. *Pharmaceuticals Policy and law*. 15:163-172. 2013
 6. Okura H, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Ichinose A, Matsuyama A. *in situ* reprogrammed spermine treated adipose –tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 39-42.
 7. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-54.
 8. Okura H, Soeda M, Morita M, Ichinose A, Matsuyama A. Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease*. 2013. 51-46.
 9. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One*. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
 10. Kawase R, Ohama T, Matsuyama A, Matsuwaki T, Okada T, Yamashita T, Yuasa-Kawase M, Nakaoka H, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ohmoto Y, Nishihara M, Komuro I, Yamashita S. Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2013 Oct 1;100(1):125-33.
 11. Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):514-5.

12. Takayama K, Nagamoto Y, Mimura N, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Hayakawa T, Kawabata K, Mizuguchi H. Long-Term Self-Renewal of Human ES/iPS-Derived Hepatoblast-like Cells on Human Laminin 111-Coated Dishes. *Stem Cell Reports*. 3;1(4) 322-335,2013
13. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development*[Epub ahead of print]2013
14. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Suzuki S, Hayakawa T, Kakehi K. Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. *J Chromatogr A* 27;1309: 76-83,2013
15. Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T, Suzuki T, Kakehi K. Free glycans derived from glycoproteins present in human sera. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1;928; 16-21,2013
16. Yodoshi M, Iikeda N, Yamaguchi N, Nagata M, Nishida N, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. A novel condition for capillary electrophoretic analysis of reductively aminated saccharides without removal of excess reagents. *Electrophoresis*,34; 3198-3205 566,2013
17. Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Kakehi K. Common Glycoproteins Expressing Polylactosamine-Type Glycans on Matched Patient Primary and Metastatic Melanoma Cells Show Different Glycan Profiles. *J Proteome Res*. [Epub ahead of print]2013
18. 松山晃文：「再生医療とレギュラトリーサイエンス -早期実現にむけて合理的な理解を-」ヒューマンサイエンス 2013: (7),28-31.
19. 松山晃文：「再生医療の規制と今後の動向」リーガルマインド 2013:337.36-102.
20. 松山晃文：「再生医療の早期実現化と国際展開に向けた研究開発支援」再生医療 2013:12(2),133-134.
2. 学会発表
- 1) 早川堯夫：再生医療製品・遺伝子治療薬等の品質評価の上での科学的妥当性とは. 第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム（基調講演）,東京（2013.12.12）
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他
(政策への提言)
- 1) 厚生労働省医薬食品局「再生医療等製品原料基準」のあり方に関する検討」での提言
- 2) 経済産業省「グローバル認証基盤整備事業再生医療等基準検討委員会」での提言

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y.	Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model.	Tissue Eng Part A	20(3-4)	728-39	2014
Alshammary S, Fukushima S, Miyagawa S, Matsuda T, Nishi H, Saito A, Kamata S, Asahara T, Sawa Y.	Impact of cardiac stem cell sheet transplantation on myocardial infarction	Surg Today	43(9)	970-6	2013
Matsuda T, Miyagawa S, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Akimaru H, Horii-Komatsu M, Kawamoto A, Saito A, Asahara T, Sawa Y.	Human Cardiac Stem Cells With Reduced Notch Signaling Show Enhanced Therapeutic Potential in a Rat Acute Infarction Model	Circ J	78(1)	222-31	2013
Shudo Y, Miyagawa S, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y	Myocardial layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging	Circ J	77(4)	1063-72	2013

Shudo Y, Cohen JE, Macarthur JW, Atluri P, Hsiao PF, Yang EC, Fairman AS, Trubelja A, Patel J, Miyagawa S, Sawa Y, Woo YJ	Spatially oriented, temporally sequential smooth muscle cell-endothelial progenitor cell bi-level cell sheet neovascularizes ischemic myocardium.	Circulation	128	S59-68	2013
Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N	Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts	Cardiovasc Res	99(1)	102-10	2013
Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, Matsuyama A, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S	Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells.	Inflammation and Regeneration		in press	2014
Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, <u>Hayakawa T</u>	Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system.	<i>PLoS ONE</i>	8(6)	e66274	2013

Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model

Yasuhiro Shudo, MD,¹ Shigeru Miyagawa, MD, PhD,¹ Hanayuki Ohkura, PhD,^{1,2}
Satsuki Fukushima, MD, PhD,¹ Atsuhiko Saito, PhD,¹ Motoko Shiozaki, PhD,¹ Naomasa Kawaguchi, PhD,³
Nariaki Matsuura, MD, PhD,³ Tatsuya Shimizu, MD, PhD,⁴ Teruo Okano, PhD,⁴
Akifumi Matsuyama, MD, PhD,² and Yoshiki Sawa, MD, PhD¹

Introduction: Functional skeletal myoblasts (SMBs) are transplanted into the heart effectively and safely as cell sheets, which induce functional recovery in myocardial infarction (MI) patients without lethal arrhythmia. However, their therapeutic effect is limited by ischemia. Mesenchymal stem cells (MSCs) have prosurvival/proliferation and antiapoptotic effects on co-cultured cells *in vitro*. We hypothesized that adding MSCs to the SMB cell sheets might enhance SMB survival post-transplantation and improve their therapeutic effects.

Methods and Results: Cell sheets of primary SMBs of male Lewis rats (r-SMBs), primary MSCs of human female fat tissues (h-MSCs), and their co-cultures were generated using temperature-responsive dishes. The levels of candidate paracrine factors, rat hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor, *in vitro* were significantly greater in the h-MSC/r-SMB co-cultures than in those containing r-SMBs only, by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MI was generated by left-coronary artery occlusion in female athymic nude rats. Two weeks later, co-cultured r-SMB or h-MSC cell sheets were implanted or no treatment was performed ($n=10$ each). Eight weeks later, systolic and diastolic function parameters were improved in all three treatment groups compared to no treatment, with the greatest improvement in the co-cultured cell sheet transplantation group. Consistent results were found for capillary density, collagen accumulation, myocyte hypertrophy, Akt-signaling, STAT3 signaling, and survival of transplanted cells of rat origin, and were related to poly (ADP-ribose) polymerase-dependent signal transduction.

Conclusions: Adding MSCs to SMB cell sheets enhanced the sheets' angiogenesis-related paracrine mechanics and, consequently, functional recovery in a rat MI model, suggesting a possible strategy for clinical applications.

Introduction

A RECENT LARGE-SCALE clinical trial, in which autologous skeletal myoblasts (SMBs) were directly injected into the heart by needle, reported only modest therapeutic benefits and a substantial risk of ventricular arrhythmias, due at least partly to the delivery method.^{1,2} The major drawbacks of SMB delivery by needle injection are poor cell survival in the heart, leading to insufficient paracrine effects, and mechanical myocardial injury, potentially causing lethal arrhythmia.¹⁻³ In contrast, cell-sheet techniques, which we developed, deliver SMBs more effectively with

minimal myocardial injury, enhanced paracrine effects, and consequently better cardiac function than attained by needle injection.⁴⁻⁸

The mechanism by which damaged myocardium is restored by transplanted SMB cell sheets is complex, involving many pathways.⁴⁻⁸ Recent reports show beneficial effects of SMB cell-sheet transplantation in several animal experimental models and patients with heart failure, which are primarily attributed to cytokine secretion from the transplanted cell sheets (i.e., a paracrine effect).⁴⁻⁹

However, SMB cell sheets attached to the surface of the infarcted myocardium are poorly supported by the vascular

Presented at the American Heart Association, Orlando, Florida, November 12–15, 2011.

¹Department of Cardiovascular Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan.

²Laboratory for Somatic Stem Cell Therapy, Foundation of Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan.

³Department of Pathology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan.

⁴Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan.

network of the native myocardium, which limits the survival of the SMBs and, consequently, their therapeutic effects.⁷ Thus, conventional SMB cell-sheet transplantation might be insufficient to repair severely damaged myocardium, which has poor viability. Mesenchymal stem cells (MSCs) are used as feeder cells to support the survival, proliferation, and differentiation of co-cultured stem/progenitor cells *in vitro*.^{10–12} Moreover, MSCs are advantageous for cellular therapy because they are multipotent, potentially immune privileged, and expand easily *ex vivo*. MSCs also proliferate rapidly and induce angiogenesis.^{13,14}

We hypothesized that adding MSCs to the SMB cell sheets *in vitro* might enhance their survival and function after transplantation, which might enhance the benefits of SMB cell-sheet transplantation therapy. Here, we investigated whether co-culturing SMBs with MSCs would enhance the SMBs' cytokine production *in vitro*. We also examined the therapeutic effects on chronic ischemic heart failure of transplanting cell sheets created from co-cultured SMBs and MSCs, compared with SMB-only and MSC-only cell sheets.

Materials and Methods

This study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Osaka University. Humane animal care was used in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" formulated by the National Society for Medical Research, and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the Institute of Animal Resources and published by the National Institutes of Health (Publication No. 85–23, revised 1996). All procedures and evaluations, including assessments of cardiac parameters, were carried out in a blinded manner. The authors had full access to the data and take full responsibility for its integrity. All authors have read and agreed to the article as written.

Isolation of SMBs and adipose tissue-derived mesenchymal cells, and cell-sheet preparation

Primary skeletal myoblasts of rat origin (r-SMBs) were isolated from Lewis rats (3 weeks old, male; CLEA Japan, Inc.) and expanded *in vitro* as described previously^{7,8}; more than 70% of the isolated cells were actin positive and 60–70% were desmin positive, as determined by flow cytometry (data not shown). To detect r-SMBs, we used GFP transgenic Lewis rats.¹⁵ Primary human MSCs (h-MSCs) were isolated from female subcutaneous adipose tissue samples as described.¹² h-MSCs exhibit mesenchymal morphology (Fig. 1A). Cell sheets consisting of r-SMBs or h-MSCs were prepared using temperature-responsive culture dishes (UpCell®; CellSeed), as described.¹² Cell sheets containing both r-SMBs and h-MSCs were prepared by co-culturing these cells in temperature-responsive culture dishes.

Rat myocardial infarction model and cell-sheet implantation

A proximal site of the left anterior descending coronary artery (LCA) of athymic nude rats (F344/NJcl-rnu/rnu, 8-week-old, female, 120–130 g; CLEA Japan) was permanently occluded using a thoracotomy approach. The animals were then kept in temperature-controlled individual cages for 2 weeks to generate a subacute ischemic heart failure mod-

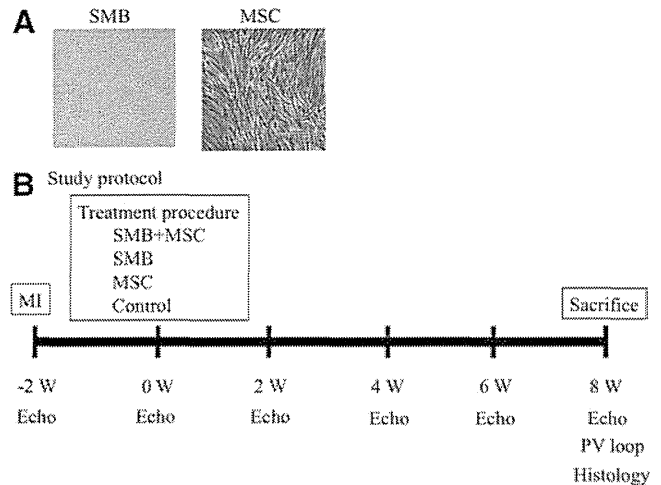


FIG. 1. (A) Morphology of SMB and MSC. (B) Study protocol used for the assessment of cardiac function and histology. Athymic nude rats (F344/NJcl-rnu/rnu) underwent induction of myocardial infarction by occluding the LAD permanently, followed by the treatment procedure 2 weeks later. Cardiac function was assessed by echocardiography just before 2, 4, 6, and 8 weeks after the treatment procedure. Eight weeks after the treatment procedure, invasive hemodynamic analysis and histological examination were performed following the sacrifice. SMB+MSC, co-culture of SMBs and MSCs; SMB, skeletal myoblast; MSC, derived mesenchymal stem cell; Echo, echocardiography; PV loop, invasive hemodynamic analysis. Color images available online at www.liebertpub.com/tea

el.^{7,8,12} The rats were then divided into 4 experimental groups ($n=10$ in each) as follows: (1) transplantation of triple-layer h-MSC cell sheets (7.5×10^5 cells per sheet), (2) transplantation of triple-layer r-SMB cell sheets (3.0×10^6 cells per sheet), (3) transplantation of triple-layer co-cultured r-SMB (3.0×10^6 cells per sheet) and h-MSC (7.5×10^5 cells per sheet) sheets, and (4) no treatment (control) (Fig. 1B). Thereafter, the rats were kept in individual cages for 4 weeks.

Echocardiography

Echocardiography was performed under general anesthesia using 1% isoflurane just before, and 2, 4, 6, and 8 weeks after the treatment procedure (SONOS 7500; Philips Medical Systems) (Fig. 1B). Left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), and end diastolic anterior wall thickness at the level of the papillary muscles were measured for at least three consecutive cardiac cycles, following the American Society for Echocardiology leading-edge method. Fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) were calculated as parameters of systolic function, as follows:

$$\text{FS (\%)} = (\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD}$$

$$\text{EF (\%)} = [(\text{LVEDD}^3 - \text{LVESD}^3) / \text{LVEDD}^3] \cdot 4$$

Cardiac catheterization

To assess systolic and diastolic cardiac function, cardiac catheterization was performed under general anesthesia using 1% isoflurane, 8 weeks after the treatment procedure. A MicroTip catheter transducer (SPR-671; Millar Instruments, Inc.) and conductance catheters (Unique Medical

Co.) were placed longitudinally in the left ventricle (LV) from the apex and connected to an Integral 3-signal conditioner-processor (Unique Medical Co.). End-systolic pressure-volume relationships (ESPVR) were determined by transiently compressing the inferior vena cava. Data were recorded as a series of pressure-volume loops (~20), which were analyzed using Integral 3 software (Unique Medical Co.). The maximal and minimal rates of change in LV pressure (dP/dt max and dP/dt min, respectively) were obtained from steady-state beats using custom-made software. We assessed the early active part of the relaxation using the relaxation time constant (τ), which was determined from the LV pressure decay curve. After the hemodynamic assessment, the heart was removed for further biochemical and histological analyses.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cultured cell sheets or cardiac muscle tissue 8 weeks post-transplantation using TRIzol reagent (Invitrogen) and reverse transcribed into cDNA using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). Subsequently, real-time PCR assays were performed using an ABI PRISM 7700 machine.^{4,7,8} Hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin growth factor (IGF), and thymosin β were assayed using rat-specific primers and probes (Applied Biosystems). The average copy number of gene transcripts for each sample was normalized to that for GAPDH.

Survival of grafted donor cells

The presence of grafted male cells in the female heart was quantitatively assessed by real-time PCR for the Y chromosome-specific gene *sry*. Four weeks after cell-sheet transplantation, genomic DNA was extracted from the entire LV walls using the QIAmp genomic DNA purification system (Qiagen). The signals for the autosomal single-copy gene were normalized to the amount of total DNA.⁷ The primers were *sry*: forward, 5' GCCTCAGGACATATTAATCTCTGGAG-3'; reverse, 5'-GCTGATCTCTGAATTCTGCATGC-3'.

Protein analysis

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to measure proteins, such as HGF (Institute of Immunology) and VEGF (Quantikine; R&D) of rat origin, secreted from the cultured cell sheets *in vitro*, according to the manufacturers' suggested protocols. Values were calibrated for the extracted total proteins ($n=5$ in each group). The ELISA kits were also used to quantitatively analyze HGF (r-HGF) and VEGF (r-VEGF) of rat origin in heart tissue lysates ($n=5$ in each group).

Cytokine/chemokine multiplex immunology assay

The amount of each protein secreted from the cultured cell sheets *in vitro* was measured by Milliplex Rat Cytokine/Chemokine Panel Premixed 32Plex (Millipore), according to the manufacturer's instructions.⁴ In this procedure, we applied human SMBs (h-SMBs) isolated and cultured from the patient (age 53 years, male) and expand *in vitro* as described previously.⁶

Histological analyses

Eight weeks after cell-sheet implantation, the hearts were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in either optimum cutting temperature compound for 5- μ m-thick cryosections or paraffin for 5- μ m-thick sections ($n=5$ in each group) (Fig. 1). The paraffin-embedded sections were used for routine hematoxylin-eosin (HE) staining to assess the myocardial structure. Masson's trichrome staining was performed to assess cardiac fibrosis in the remote myocardium. The fibrotic cardiac area was calculated as the percentage of myocardial area. The data were collected from 10 individual views per heart at a magnification of $\times 200$. The heart sections were also stained with an antibody to von Willebrand Factor (vWF) to assess capillary density, which was calculated as the number of positively stained capillary vessels that were 5–10 μ m in diameter in 10 randomly selected fields in the peri-infarct area, per heart. To determine the extent of apoptosis, sections from frozen tissue samples were subjected to terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) with an *in situ* apoptosis detection kit (Apoptag; Chemicon). Image J software was used for quantitative morphometric analysis.

To detect r-SMBs, we used GFP transgenic Lewis rats.¹⁵ Cryosections were stained with an anti-HGF antibody (1:50 dilution; LifeSpan BioSciences). To detect h-MSCs and differentiation of the transplanted cell sheet, sections were stained with an antibody to human leukocyte antigen (1:50 dilution; Dako). The secondary antibody was Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (1:200 dilution; Molecular Probes). Cell nuclei were counterstained with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen). The images were examined by fluorescence microscopy (Keyence).

Western blotting

Tissue homogenates from LV samples in the cell-sheet transplanted site ($n=3$ in each group, on day 1) were prepared using lysis buffer (100 mM Tris pH 7.4, 20% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate). The equivalent total protein was loaded onto SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels. Antibodies obtained from Cell Signaling were antiphosphorylated STAT3 (#9145), antiphosphorylated Akt (#4051), anti-Bcl₂ (#2876), and anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (#9542). The labeled membrane was stripped and then re-probed with anti-STAT3 (#9132), anti-AKT (#9272), and anti-cleaved PARP (#9545) antibodies. Blots were scanned, and quantitative analysis was performed using Image J software. The relative proportion of the phosphorylated STAT3 was referred to that of the STAT3. The relative proportion of the phosphorylated Akt was referred to that of the Akt. The relative proportion of the PARP, cleaved PARP, Bcl₂ was referred to that of the control group.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as the mean \pm SD. The significance of differences was determined using a two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni correction following repeated-measures analysis of variance for individual differences. A *p*-value less than 0.05 was considered to be statistically significant. All statistical calculations were performed using the SPSS software (version 11.0; SPSS, Inc.).

Results

Production and release of cytokines/chemokines by cell sheets

Both h-SMBs and h-MSCs, as analyzed by cytokine antibody array, released abundant angiogenic factors *in vitro*, with distance profiles (Fig. 2A). Co-cultures of h-SMBs and h-MSCs showed significantly enhanced levels of HGF, VEGF, Leptin, and PECAM-1, but not of follistatin, G-CSF, IL-8, or PDGF-BB from the h-SMBs.

The seeding ratio of 4:1 r-SMBs:h-MSCs elicited the greatest *in vitro* mRNA expression of rat HGF and VEGF by real-time PCR (Fig. 2B). The mRNA levels of SMB-derived r-HGF and r-VEGF, analyzed by real-time PCR using rat-specific primers, were significantly greater in the co-cultured cell sheets than r-SMB-only ones (Fig. 2C), whereas the mRNA levels of IGF-1, bFGF, SDF-1, and TMSB4 were essentially the same (Supplementary Fig. S1; Supplementary

Data are available online at www.liebertpub.com/tea). No mRNAs for cytokines of rat origin were detected in h-MSC-only cell sheets. Rat HGF and VEGF in the culture supernatants, analyzed by ELISA with rat-specific primary antibodies, were significantly higher in the co-culture supernatants than the r-SMB-only ones, and no rat cytokines were detected in the h-MSC-only supernatants (Fig. 2D).

Cardiac functional recovery after cell-sheet transplantation

The effects of cell-sheet transplantation on cardiac function were assessed in a rat chronic ischemic heart-failure model. Two weeks after permanent occlusion of the LCA, the LV developed echocardiographic features typical of chronic ischemic heart failure, including decreased FS, EF, and anterior wall thickness, and increased end-diastolic and systolic diameter (EDD and ESD, respectively). Following myocardial

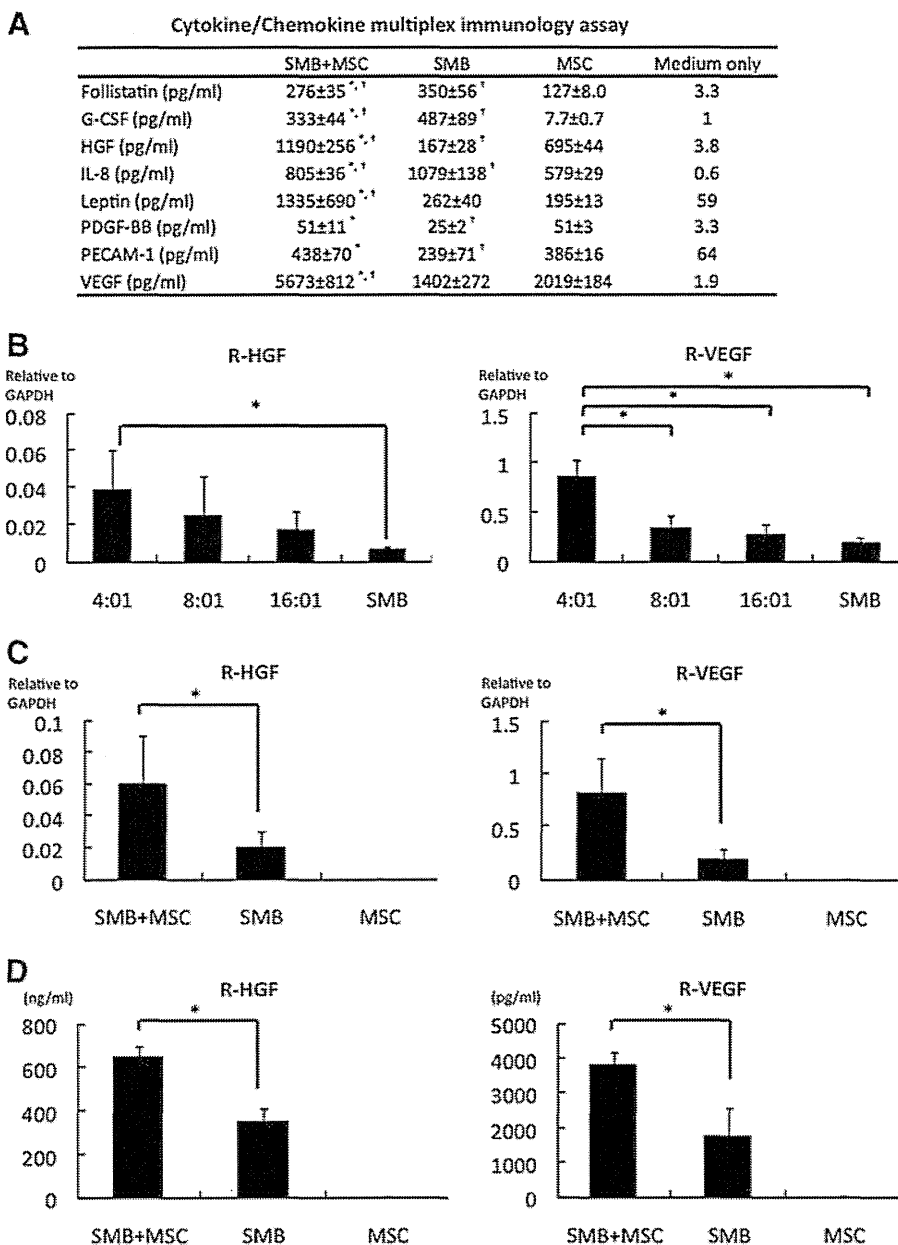


FIG. 2. Production and release of angiogenic factors by cell sheets. **(A)** Cytokine/chemokine multiplex immunology assay results from cultured cell sheets *in vitro*, prepared from human SMBs, human MSCs (h-MSCs), or both. SMB+MSC showed significantly enhanced the release of HGF, VEGF, leptin, and PECAM-1. *N*=4 in each group. **p* < 0.05 versus SMB. †*p* < 0.05 versus MSC. **(B)** Optimal seeding ratio of rat SMBs (r-SMBs) to h-MSCs. The *in vitro* mRNA levels of rat HGF and VEGF, analyzed by real-time PCR, were highest at 4:1 r-SMBs:h-MSCs. *N*=4 in each group. **p* < 0.05. **(C)** mRNA levels in cultured cell sheets determined by real-time PCR using rat-specific primers. The SMB+MSC sheets expressed significantly more HGF and VEGF than the SMB-only ones. *N*=5 in each group. **p* < 0.05. **(D)** Secretion of cytokines into the culture medium determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The SMB+MSC sheets secreted significantly more HGF and VEGF than the SMB-only sheets. *N*=5 in each group. **p* < 0.05. G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; HGF, hepatocyte growth factor; IL, interleukin; PDGF, platelet-derived growth factor; PECAM, platelet/endothelial cell adhesion molecule; VEGF, vascular endothelial growth factor. Error bars = SD.

infarction (MI), FS, EF, and anterior wall thickness showed steady reductions, whereas EDD/ESD showed steady increases, suggesting progressive LV remodeling.

Following either SMB-only or MSC-only cell-sheet transplantation, the heart showed mild recovery, including increases in FS, EF, and anterior wall thickness. At 2, 4, 6,

and 8 weeks after treatment, FS, EF, and anterior wall thickness were significantly greater following SMB-only or MSC-only cell-sheet transplantation than the control, and significantly better recovery was obtained using the co-cultured cell sheets than either single cell-type sheet (Fig. 3A).

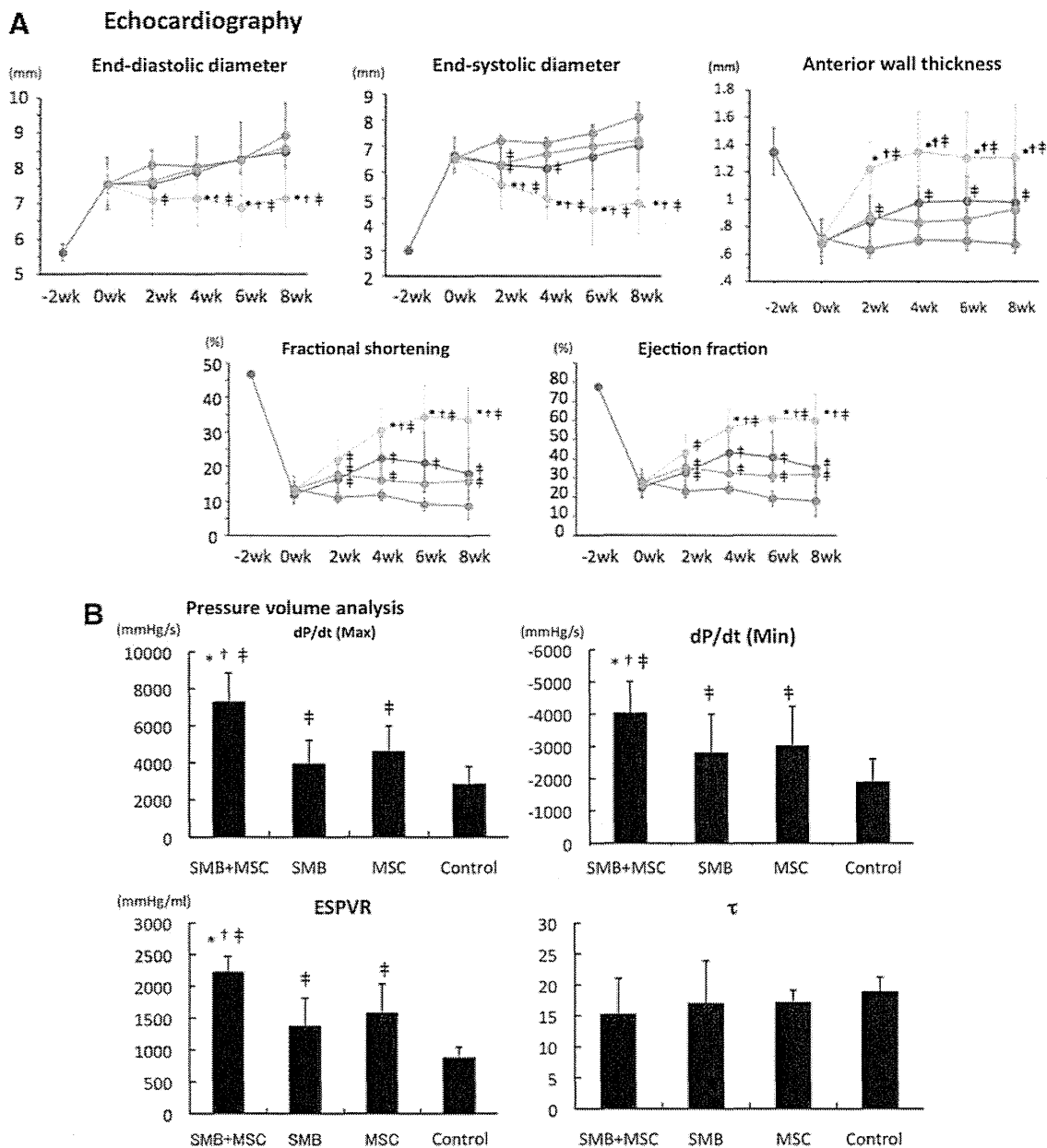


FIG. 3. Cardiac functional recovery after cell-sheet transplantation. **(A)** Echocardiographic analysis. Fractional shortening, ejection fraction, and anterior wall thickness were significantly improved 2, 4, 6, and 8 weeks after cell-sheet transplantation in the SMB+MSC sheet group, compared with the other three groups. Left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters in the SMB+MSC sheet group were significantly decreased 4, 6, and 8 weeks after cell-sheet transplantation, compared with the other three groups ($N=10$ in each group. SMB+MSC group, green line; SMB group, blue line; MSC group, pink line; control group, red line). **(B)** Hemodynamic measurements determined by cardiac catheterization ($n=10$ in each group). Max. and min. dP/dt and ESPVR significantly improved in the SMB+MSC group, compared with the other three groups. Max. dP/dt , maximal rate of change in left ventricular pressure; min. dP/dt , minimal rate of change in left ventricular pressure; ESPVR, end-systolic pressure-volume relationship; EDPVR, end-diastolic pressure-volume relationship; τ , active part of relaxation shown by the relaxation time constant. $N=10$ in each group. * $p < 0.05$ versus SMB-only cell sheet. † $p < 0.05$ versus MSC-only cell sheet. ‡ $p < 0.05$ versus control. n.s., not significant. Error bars=SD. Color images available online at www.liebertpub.com/tea

Assessment by LV catheter showed a similar trend. Eight weeks after transplantation, the maximal and minimal rate of change in LV pressure (max. dP/dt and min. dP/dt , respectively) and end-systolic pressure-volume relationship (ESPVR) were significantly greater following either single-cell-type cell-sheet transplantation than the control, but τ was significantly different. After the co-culture cell-sheet transplantation, the max. dP/dt , min. dP/dt , and ESPVR improved further, with no significant difference in EDPVR or τ (Fig. 3B).

Reverse remodeling after co-culture cell-sheet transplantation

The LV structure was better maintained after SMB-only or MSC-only cell-sheet transplantation, compared to the control, in which the LV cavity was severely enlarged with a thin anterior wall, as assessed by HE staining (Fig. 4A). The LV structure was even better maintained after the co-culture cell-sheet transplantation. In the control, abundant collagen accumulations were observed in the infarct area, and diffuse fibrotic changes were induced in the remote area, whereas collagen accumulation was attenuated in both the remote area with the single cell-type sheet transplants, as assessed by Masson's trichrome staining (Fig. 4B, C). Fibrotic changes

in the remote area were further attenuated by transplantation of the co-cultured cell sheet (Fig. 4D).

A greater number of vWF-positive blood vessels was detected in the peri-infarcted myocardium following the transplantation of either single-cell-type cell sheet, compared to the control (Fig. 5A), and even more vWF-positive blood vessels were seen with transplantation of the co-cultured cell sheet. The capillary density in the peri-infarcted myocardium, which was semi-quantitatively assessed in 10 randomly selected individual fields, was significantly greater following the transplantation of either single-cell-type cell sheet, compared to the control (Fig. 5B), and it was further increased after the co-cultured cell-sheet transplantation.

Major intercellular signaling molecules relevant to angiogenesis and cell survival were analyzed by western blotting. The ratio of p-STAT3 over total STAT3 was greatly increased after co-cultured cell-sheet transplantation (Fig. 5C).

Survival of transplanted cells in the heart

Four weeks after the cell-sheet transplantation, significantly more transplanted rat cells survived in co-cultured sheets than SMB-only sheets, as analyzed by PCR assays for the Y-chromosome-specific *Sry* gene (Fig. 6A).

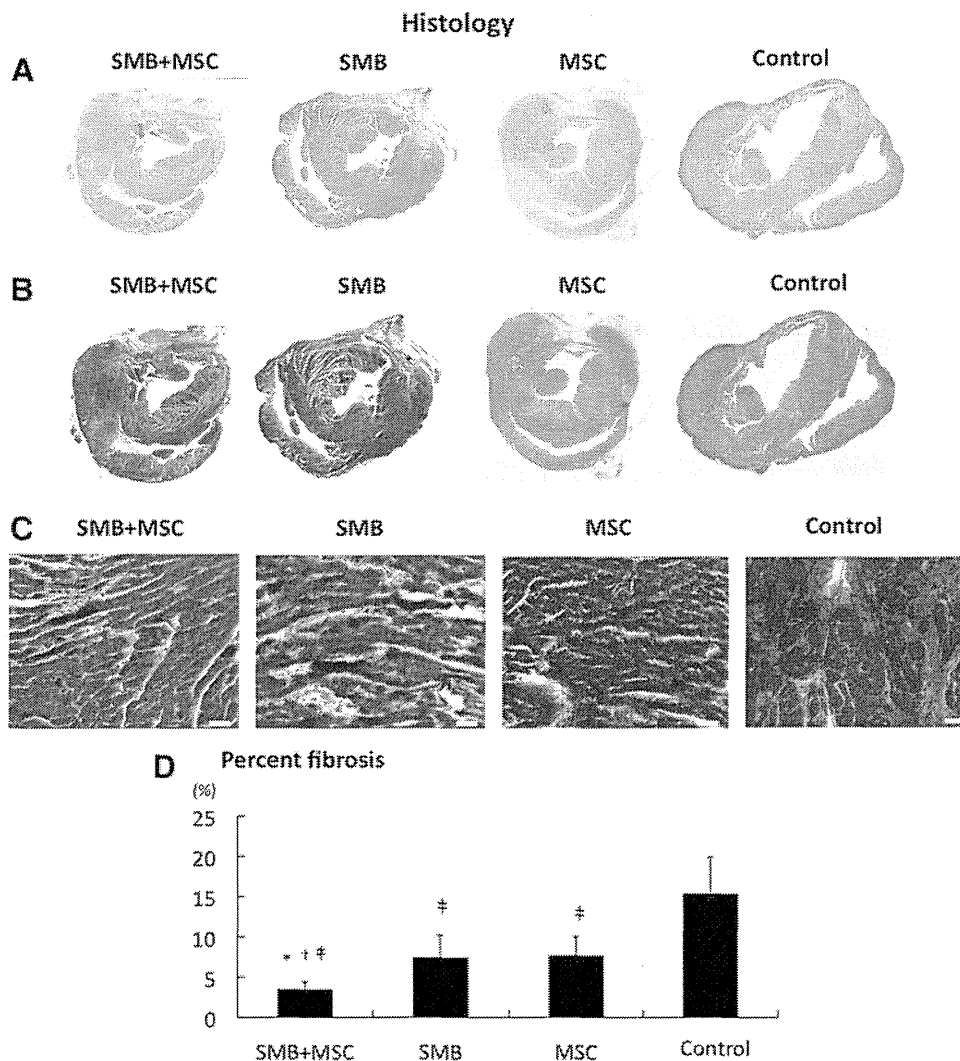


FIG. 4. Histological reverse remodeling after cell-sheet transplantation. **(A)** Macroscopic ($\times 40$) views of the heart stained by hematoxylin-eosin. **(B)** Macroscopic ($\times 40$) views of the heart stained by Masson's trichrome. **(C)** Microscopic ($\times 200$) representative Masson's trichrome staining at the remote myocardium (white bar = $40 \mu\text{m}$). **(D)** Quantification of percent fibrosis at the remote area. Significant suppression of fibrosis was found after SMB+MSC sheet transplantation compared with the other three groups. $N=5$ in each group. $*p < 0.05$ versus SMB. $^{\dagger}p < 0.05$ versus MSC. $^{\ddagger}p < 0.05$ versus control. Error bars = SD. Color images available online at www.liebertpub.com/tea

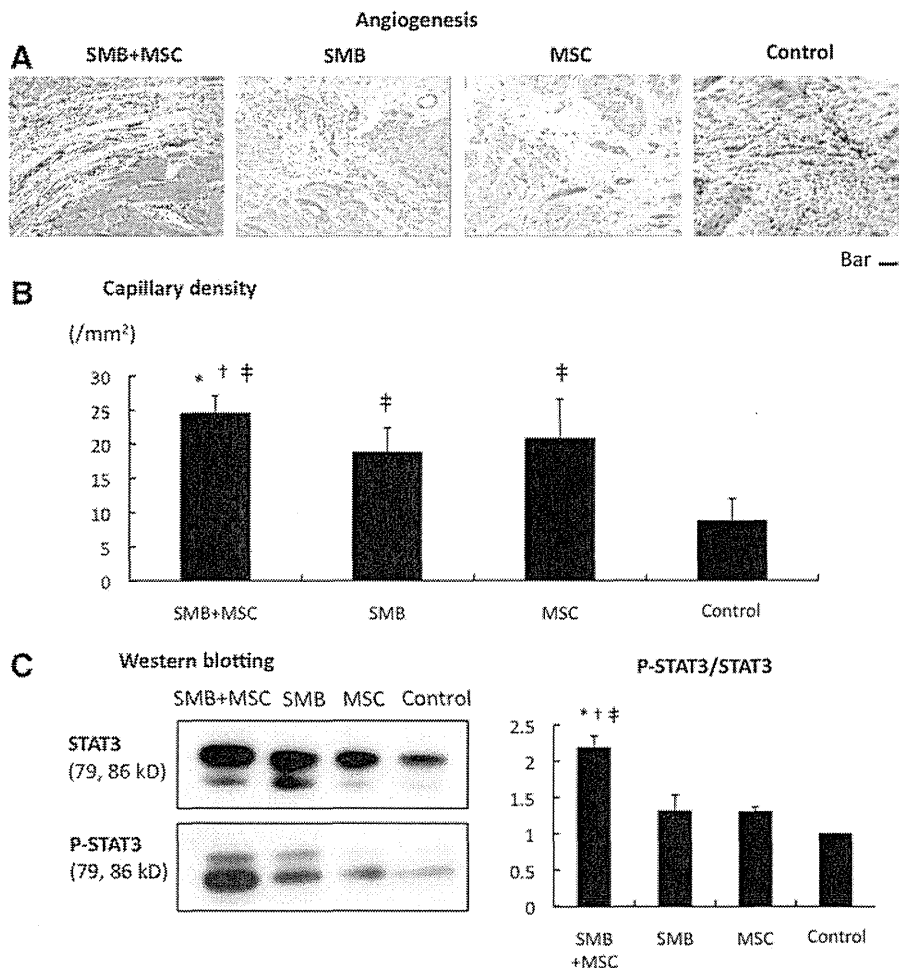


FIG. 5. Angiogenesis. **(A)** Microscopic ($\times 100$) views of sections of the peri-infarct border-zone region stained with anti-von Willebrand factor antibody (factor VIII) in the four groups (bar = 50 μm). **(B)** Capillary density: the SMB+MSC group showed significant improvement in capillary density as assessed by immunostaining for von Willebrand factor-positive blood vessels. $N=5$ in each group. **(C)** Western blotting showing enhanced STAT3 phosphorylation over total STAT3 in the SMB+MSC sheet group. $N=3$ in each group. $*p < 0.05$ versus SMB. $^{\dagger}p < 0.05$ versus MSC. $^{\ddagger}p < 0.05$ versus control. Error bars = SD. STAT3, signal transducer and activator of transcription 3. Color images available online at www.liebertpub.com/tea

The percentage of TUNEL-positive myocytes was significantly lower following the transplantation of the co-cultured cell sheet compared to the control (Fig. 6B).

Akt-1 and Bcl-2 were highly expressed in the heart following transplantation of the SMB-only or co-cultured cell sheet, compared with the control, as analyzed by real-time quantitative PCR using rat-specific primers (Fig. 6C).

Notably, among apoptosis-signaling molecules, Bcl₂ and cleaved PARP were increased 1 day after the co-culture cell-sheet transplantation. There was no significant difference in the ratio of phosphorylation of Akt over Akt (Fig. 6D).

Upregulation of cardioprotective factors in the myocardium after cell-sheet transplantation

The mRNA expression of cardioprotective factors, such as HGF, VEGF, IGF-1, and bFGF, in the infarct and infarct-remote areas of the myocardium was analyzed by real-time PCR using rat-specific primers, which detected factors released by transplanted SMB or the native myocardium. The expression of these factors was not significantly different after transplantation of either single-cell-type cell sheet or no treatment, except for HGF expression in the infarct area, which was significantly greater after the SMB-only sheet transplantation (Fig. 7A, B). In contrast, following transplantation of the co-cultured cell sheet, the HGF and VEGF

levels in the infarct area were significantly greater than after transplantation of either single cell-type cell sheet or control, although the levels of IGF-1 and bFGF were unchanged (Fig. 2A). The intramyocardial protein levels of HGF and VEGF, analyzed by ELISA, were significantly greater after transplantation of the co-cultured cell sheet than of either single-cell-type cell sheet or no treatment (Fig. 7C).

Immunoconfocal microscopy showed that HGF was found in the transplanted SMBs from the co-cultured cell sheet (Fig. 8A).

MSCs differentiate into new vessels in situ

The differentiation capacity of the transplanted h-MSCs was assessed by immunoconfocal microscopy. As expected, no human-derived cells were seen in either the r-SMB-only transplantation group or the control group. However, human vWF-positive staining was observed in the host vessels in both the co-cultured cell-sheet group and the h-MSC-only cell-sheet transplantation group. Thus, the h-MSCs could differentiate into vessel walls *in vivo* (Fig. 8B).

Discussion

Here, we demonstrated that SMB cell sheets abundantly synthesized and extracellularly released multiple cytokines and chemokines, and adding MSCs enhanced the SMB cell