

重症心不全に対する骨格筋筋芽細胞シート移植による心筋再生治療の実用化研究

研究分担者 大阪大学医学系研究科 特任准教授(常勤) 齋藤 充弘
近畿大学薬学総合研究所 所長 早川 堯夫

研究要旨

すでにヒト幹細胞臨床研究指針に適合した臨床研究として実施している、重症心不全に対する骨格筋筋芽細胞シート移植による再生細胞治療法の安全性・有効性を検証し、高度医療化、ひいては保険医療化することを究極の目的と見据え、CPCにおける筋芽細胞の採取・培養・細胞シート形成・凍結保存と融解等の工程の効率化・標準化を進める。

A. 研究目的

1. 骨格筋筋芽細胞シートの凍結保存法の確立
細胞シートの汎用性を向上させるには長期間の保存方法の開発が重要である。本課題ではガラス化凍結法を用いて細胞シートの長時間保存の可能性を検討した。

2. CPCにおける適切な作業人数の検討

CPCでは作業環境の清浄度を確保するために、作業の有無を問わず常時微粒測定を行い、同時にユニット内に入室できる作業者を3名までとしているが、複雑な工程や長時間に及ぶ作業の際、4名以上での作業が望まれる場合もある。清浄度管理と作業効率の観点から、ユニット内の入室人数の検討は重要である。

B. 研究方法

1. 骨格筋筋芽細胞シートの凍結保存
ヒト骨格筋筋芽細胞シートを温度応答性培養皿を用いて作成した。カルボキシルポリリジン含有の

凍結保護剤に5分間浸漬し、メッシュ状の支持体で細胞シートをはさみ、耐低温のビニールで密閉した。液体窒素の液面上1cmで瞬間的に凍結し、その後、2日間、7日間、28日間凍結保存した。急速融解した細胞シートの構造を観察し、血管新生やミトコンドリア活性関連遺伝子発現をRT-PCRで解析した。

2. CPC内の微粒子数の計測

CPCユニット内で、2~4名で作業した際の微粒子数を、パーティクルカウンターを用いて1分おきに測定し、各作業人数によって、微粒子数に差があるかを検証した。

C. 研究結果

1. ガラス化凍結および融解後の筋芽細胞シートの組織学的・機能的保存状況

凍結前のviabilityは92.9%であったが、融解後は約80%を維持していた(2d:82.4%, 7d:85.1%, 28d:80.7%)。HE染色、電子顕微鏡による観察の結果、細胞間接着やFibronectin等も保存前後で

維持されていた。Caspase 8等、アポトーシス関連蛋白の発現、および Tunnel 染色は陰性であった。ミトコンドリア関連蛋白である ATP6、SDHA、mtND1 の発現は、凍結前および凍結後 28 日では差が認められなかった。

2 . CPC 内の作業人数と微粒子数の相関
作業人数 2 ~ 4 名では、作業人数と微粒子測定値の間に相関関係は認められなかった。作業内容によっては、基準値内であるが微粒子数が増加することも認められた。

D . 考察

1 . 筋芽細胞シートの凍結保

カルボキシルポリリジンを保護剤としたガラス化凍結により、少なくとも 1 か月間は細胞シートの形態、機能性蛋白の発現を維持しながら保存することが可能であることが示唆された。

2 . CPC 内の作業人数の検討

作業人数と微粒子数について、当 CPC では部屋全体の空気が一分間に 4 回入れ替わる空調設定となっており、4 名程度であれば作業人数に要微粒子の増加はあったとしても培養細胞にはほぼ影響ないと考えられた。一方、ダブルチェック等の観点から、作業は 2 名以上で行うことが望ましい。かつ、作業スペースの利便性を考慮すると、現状のユニットでは 5 名以上での作業は望ましくないと考えられる。

E . 結論

骨格筋筋芽細胞シートをガラス化凍結法によって少なくとも 4 週間は保存することができ、筋芽細胞シート治療の汎用性を向上させる可能性が示された。

また、当 CPC ユニット内における細胞培養作業は、2 ~ 4 名で行うことが適切である。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Saito A, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y. Targeted Delivery of Adipocytokines Into the Heart by Induced Adipocyte Cell-Sheet Transplantation Yields Immune Tolerance and Functional Recovery in Autoimmune-Associated Myocarditis in Rats. *Circ J.* 2015; 79(1):169-79. [2014 Nov 5. Epub ahead of print]
- 2) Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Pearson J, Chen YC, Saito A, Harada A, Shiozaki M, Iseoka H, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Ishibashi M, Ikeda H, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Naito H, Umetani K, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, et al. Cell-sheet Therapy with Omentopexy Promotes Arteriogenesis and Improves Coronary Circulation Physiology in Failing Heart. *Mol Ther.* 2014; 23(2):374-86
- 3) 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.* 2014 ;20(3-4):728-39.

- 4) Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakatani S, Kawamoto A, Saito A, Harada A, Shimizu T, Daimon T, Okano T, Asahara T, Sawa Y. Improvement of cardiac stem cell sheet therapy for chronic ischemic injury by adding endothelial progenitor cell transplantation: analysis of layer-specific regional cardiac function. *Cell Transplant*. 2014; 23(10):1305-19.
2. 学会発表
- 1) 齋藤充弘 再生医療等製品開発ガイドライン策定に資する大阪大学の取り組み 第14回再生医療学会、横浜 2015/3/19-21 特別シンポジウム
- 2) 齋藤充弘 アカデミアにおける細胞調製施設(CPC)の現状と課題 第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21 シンポジウム
- 3) 原田明季摩、宮川繁、福嶋五月、甲斐沼尚、小澤秀登、齋藤充弘、清水達也、岡野光夫、澤芳樹。ラット心筋梗塞モデルに対する細胞シート移植治療に於ける血管新生プロセスの検討。第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21 口演
- 4) 大河原弘達、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、戸田宏一、澤芳樹。ガラス化凍結による骨格筋筋芽細胞シート長時間保存の検討。第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21 口演
- 5) 金井浩美、江副幸子、大河原弘達、蒲克郎、藤元若菜、齋藤充弘、名井陽、吉峰俊樹、澤芳樹。「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に準拠した細胞培養加工施設運用のための手順書作成。第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21 口演
- 6) 齋藤充弘、宮川繁、福嶋五月、堂前圭太郎、大橋文哉、伊勢岡弘子、石川烈、武田真季、大河原弘達、武内涼平、頼紘一郎、松村匡記、広瀬正一、佐野進弥、野口枝莉、竹内稔和、車陽介、菅原浩行、鮫島正、澤芳樹。自家骨格筋筋芽細胞シート移植の臨床研究における細胞培養実績。第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21 ポスター
- 7) 蒲克郎、江副幸子、大河原弘達、藤元若菜、金井浩美、齋藤充弘、名井陽、吉峰俊樹、澤芳樹。CPCにおける適切な作業人数の検討。第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21, ポスター
- 8) 塩崎元子、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、樋口貴宏、吉岡大輔、伊東絵望子、望月 小田紀子、増田茂夫、松本邦夫、澤芳樹。体性幹細胞シート移植は肝細胞増殖因子により平滑筋細胞の表現型を変化させ細胞外基質の再構築を促進する。第14回日本再生医療学会、横浜 2015/3/19-21, ポスター
- 9) 藤元若菜、江副幸子、大河原弘達、蒲克郎、金井浩美、齋藤充弘、名井陽、吉峰俊樹、澤芳樹。解放経最簿調整ユニットと閉鎖系細胞調製ユニットにおける清浄度の指標としての微粒子測定の適正 第14回日本再生医療学会、横浜、2015/3/19-21, ポスター
- 10) 宮川繁、戸田宏一、仲村輝也、吉川泰司、福嶋五月、齋藤哲也、河村拓史、堂前圭太郎、石田勝、増田茂夫、齋藤充弘、伊東絵望子、今西悠基子、島本知美、小田 望月紀子、澤芳樹。重症心不全に対する再生治療の現状と

展望．第14回日本再生医医療学会、横浜、
2015/3/19-21、シンポジウム

- 11) 大河原弘達、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、伊勢岡弘子、寒川延子、戸田宏一、澤芳樹。ガラス化凍結法を用いた、骨格筋芽細胞シート長時間保存の検討 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会、大阪 2014/11/28-29 一般口演
- 12) 堂前 圭太郎、宮川繁、戸田宏一、仲村輝也、吉川泰司、福嶋五月、齊藤俊輔、吉岡大輔、齋藤充弘、上野高義、倉谷徹、澤芳樹．重症心不全に対する骨格筋芽細胞シートを用いた心筋再生治療における安全性、有効性の検討 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会、大阪 2014/11/28-29 シンポジウム
- 13) 石田 勝、他．虚血性心疾患モデルにおける幹細胞種別細胞シートの心機能改善効果の比較検討 第67回日本胸部外科学会 福岡国際会議場 2014/9/30-10/3 ポスター
- 14) 堂前圭太郎、他．重症心不全に対する骨格筋芽細胞シートを用いた心筋再生治療の中期成績と心機能改善効果 第67回日本胸部外科学会 福岡国際会議場 2014/9/30-10/3 一般口演
- 15) 甲斐沼 尚、宮川繁、福嶋五月、James Pearson、齋藤充弘、渡部直史、清水達也、岡野光夫、上野高義、倉谷 徹、戸田宏一、畑澤 順、白井幹康、澤芳樹．筋芽細胞シートと大網同時移植による心筋再生療法の治療効果メカニズム：新生血管の安定性および冠動脈微小循環に与える影響についての検討、第67回日本胸部外科学会、福岡、2014/9/30-10/3 ポスター

H．知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1．特許取得

特願 2014-179148

内容：シート状細胞培養物回収システムおよび方法

発明者：大橋文哉、竹内涼平、鮫島正、宮川繁、澤芳樹、齋藤充弘

特願 2014-179149

内容：シート状細胞培養物回収システムおよび方法

発明者：大橋文哉、鮫島正、宮川繁、澤芳樹、齋藤充弘

特願 2014-179150

内容：シート状培養物とフィブリンゲルとの積層体の製造方法

発明者：竹内涼平、大橋文哉、鮫島正、宮川繁、澤芳樹、齋藤充弘

特願 2014-179151

内容：補強部を有するシート状培養物とフィブリンとの積層体

発明者：竹内涼平、大橋文哉、鮫島正、宮川繁、澤芳樹、齋藤充弘

2．実用新案登録 該当なし

3．その他 特記事項なし