

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 大阪大学大学院医学系研究科 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 . 筋芽細胞の採取、培養に及ぼす患者背景の影響の検討

重症心筋症患者を対象として、ヒト幹細胞指針に適合した自家骨格筋筋芽細胞シートの臨床研究において、これまで10名以上の対象患者から採取した筋肉に含まれる骨格筋筋芽細胞を培養している。その中で、回収細胞数や細胞純度の低下するケースがあり、これらには、ドナーである患者背景が起因している可能性が考えられた。そこで本課題では、臨床研究における細胞培養実績から患者背景が骨格筋筋芽細胞の培養に与える影響について評価した。

2 . 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。

3 . 細胞培養加工施設運用のための手順書作成

アカデミアにおける再生医療はこれまで「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に基づいて実施されてきたが、再生医療の迅速かつ安全な提供を測るため、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(以下、「新法」とする。)が2014年に施行され、これを遵守する細胞加工施設運用を行うことが求められる。

これまで大阪大学未来医療センター内 CPC (Cell Processing Center)では、医薬品に関する製造・品質管理を規定するGMP基準を基盤とし、標準業務手順書(SOP)等を整備してきた。新法により、再生医療の臨床研究に特化した基準が定められ、「指針」から「法」に移行したことにより、より強制力を持つ規制となっているため、センター内の手順書等の見直しが必要となった。

また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. 筋芽細胞の採取と培養、患者データの相関回収細胞数、細胞生存率や骨格筋筋芽細胞の特異的マーカーである CD56 陽性率(純度)を測定し、移植細胞の品質管理を行った。その結果をもとに、患者の年齢・体格・心疾患でグループ分けして、倍加時間・回収細胞数・純度を比較した。

### 2. 細胞シートのガラス化凍結

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 1 cm 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。

### 3. 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. 継代培養後の倍加時間はグループ間に大きな違いは無く、必要な移植細胞数  $3 \times 10^8$  cells 以上、細胞生存率 75% 以上を確保することができた。一方で、筋肉から単離された初代培養細胞数には患者の年齢などが影響している可能性が考えられた。

### 2. 細胞シートのガラス化凍結

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。

### 3. 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. 筋芽細胞の初代培養と患者背景

初代培養細胞数が低いことで培養期間が延長するため、継代培養後の骨格筋筋芽細胞数や純度が低下するケースがあった。今後、臨床研究における骨格筋筋芽細胞の培養データを蓄積する中、患者背景が骨格筋筋芽細胞の培養に与える影響について継続的に評価する必要がある。

### 2. 細胞シートのガラス化凍結

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。

### 3. 細胞培養加工施設運用のための手順書作成

新法に基づき、安全性と品質を保持しつつ、より効率的に運用が行えるよう、必要な手順書の追加と不必要な項目の削除を行った。とくに、細胞加工においては医薬品と異なり、品質の均一性よりもむしろ無菌性が重視される。これを踏まえ、製造工程においてはバリデーションよりもベリフィケーションを重視した品質管理を行うように改

訂した。一步、品質部門の監視体制を強化するよう体制整備を行った。

また、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名以上での作業な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.
- 5) Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y. Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69302.

- 6) 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.* 2013; 99(1):102-10.
- 7) 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.* 2013; 23(10):1305-19.
- 8) 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.* 2013 Sep; 43(9):970-6.
- 9) 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.* 2013; 77(4):1063-72. Epub 2012 Dec 29.
- 10) Saito S, Miyagawa S, Sakaguchi T, Imanishi Y, Iseoka H, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myoblast sheet can prevent the impairment of cardiac diastolic function and late remodeling after left ventricular restoration in ischemic cardiomyopathy. *Transplantation.* 2012; 93(11):1108-15.
- 11) Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Miyagawa S, Saito A, Mori S, Sawa Y, Matsuura N. Transplantation of elastin-secreting myoblast sheets improves cardiac function in infarcted rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2012; 368(1-2):203-14.
- 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回日本再生医療学会、横浜 2015/3/21 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、2015/3/21 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 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 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、2015/3/21 口演

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 回日本再生医療学会、横浜、2015/3/21、シンポジウム

- 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、2015/3/20、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 2015/3/21、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、2015/3/21、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 回日本再生医療学会、横浜、2015/3/21、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 2014/11/29 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、齋藤俊輔、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 2014/11/29 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 2014/10/1 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 2014/10/1 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、2014/10/1  
ポスター
- 16) 原田明希摩、他 . Impacted mechanism of angiogenic process of skeletal myoblast sheet induced in chronological paracrine manner of various cytokines. 第 78 回日本循環器学会 東京 2014/3/23 ポスター
- 17) Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Pearson J, Chen Y C, 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, Daimon T, Ueno T, Kuratan Ti, Toda T, Takakura N, Hatazawa J, Shirai M, Sawa YCell Sheet Implantation combined with Pedicle Omentum Flap Promotes Angiogenesis and Stabilizes Blood Vessels in Rat Myocardial Infarction Model 第 78 回日本循環器学会、東京、2014.3.22 会長要演題
- 18) 大河原弘達、宮川繁、福嶋五月、原田明希摩、伊東絵望子、齋藤充弘、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹 . 細胞シートの臨床的汎用性の向上を目指した新しい長時間保存法の開発 第 13 回日本再生医療学会、2014/3/4-6 一般(口演)
- 19) 吉川泰司、宮川繁、戸田宏一、齋藤充弘、西宏之、福嶋五月、吉岡大輔、川村匡、齋藤哲也、上野高義、倉谷徹、澤芳樹 . LVAD を要する末期拡張型心筋症患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果 第 13 回日本再生医療学会、京都、2014/3/4-6、口演
- 20) 小澤 秀登、宮川繁、福嶋五月、原田明希摩、伊東絵望子、齋藤充弘、上野高義、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹 . 幼弱ブタ虚血性心筋症モデルに対する自己骨格筋細胞シート移植の有効性の検討 第 13 回日本再生医療学会 京都 2014/03/04 一般(ポスター)
- 21) 原田 明季摩 宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、甲斐沼尚、小澤秀登、清水達也、岡野光夫、澤芳樹、細胞シート移植治療における血管新生プロセスの検討、第 13 回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 22) 鎌田創吉、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、今西悠基子、松田剛典、澤芳樹、心不全に対する細胞シート治療の新展開 - 心病態応じた細胞ソースの選択 第 11 回日本再生医療学会総会 横浜 2012/6/12-14
- 23) 鎌田創吉、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、原田明希摩、川本篤彦、清水達也、浅原孝之、澤芳樹、虚血性心筋症に対する心筋幹細胞シート移植及び血管内皮前駆細胞併用治療法の有用性の検討、第 11 回日本再生医療学会総会 横浜 2012/6/12-14
- 24) 石田 勝、宮川繁、坂口太一、西宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、齋藤充弘、澤芳樹 . 虚血性心筋症に対する筋芽細胞シート移植の効果 - 症例報告 - 第 11 回日本再生医療学会総会 横浜 2012/6/12-14
- 25) 大河原弘達、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、原田明希摩、鎌田創吉、伊勢岡弘子、石川烈、寒川延子、澤芳樹、骨格筋芽細胞シートの長時間保存可能な条件の検討、第 39 回日本臓器保存生物医学会学術集会、福島、2012/11/16-17

- 26) 大河原弘達、宮川繁 原田明希摩 石丸和彦  
鎌田創吉 伊勢岡弘子 石川烈 寒川延子  
齋藤充弘 福嶋五月 澤芳樹、骨格筋芽細胞  
シートの保存条件の検討 第 11 回日本再生  
医療学会総会、横浜 2012/6/12-14
- 27) 塩崎元子、宮川繁、福嶋五月、樋口貴宏、吉  
岡大輔、齋藤充弘、澤芳樹、ラット慢性心不  
全梗塞モデルにおける筋芽細胞シート移植に  
よる細胞外基質の reverse remodeling 効果に  
関する検討 第 11 回日本再生医療学会総会、  
横浜 2012/6/12-14

繁、澤芳樹、齋藤充弘

2012/4/2 PCT/JP2012/059003

内容:CELL SHEET TRANSPLANTATION  
JIG AND METHOD FOR UTILIZING  
SAME

発明者:宮川繁、齋藤充弘、澤芳樹、水谷学、  
原田明希摩

(ア) 2 . 実用新案登録 該当なし

(イ) 3 . その他 特記事項なし

#### 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 2014-179151

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

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 2014-179149

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 2014-179148

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