

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 1 月 14 日(14.01.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/006262 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/050028
- (22) 国際出願日: 2015 年 1 月 5 日(05.01.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-142804 2014 年 7 月 11 日(11.07.2014) JP
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 岩宮 貴紘(IWAMIYA, Takahiro) [JP/JP];
〒1710014 東京都豊島区池袋 4-17-3 サン
コート池袋 4 13 号室 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松浦 勝久(MATSUURA, Katsuhisa); 〒
1628666 東京都新宿区河田町 8 番 1 号 学校法
人東京女子医科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki
et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4
番 10 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo
(JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CARDIAC CELL CULTURE MATERIAL

(54) 発明の名称: 心臓細胞培養材料

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a cardiac cell culture material which specifically acts on cardiac cells. In addition, another purpose of the present invention is to provide artificial organ material obtained by culturing by using said cardiac cell culture material, and a method for producing the same. Thus, provided is a cardiac cell culture, wherein functional cardi-ac tissue is favorably built by using a cardiac cell culture material containing VCAM-1.

(57) 要約: 本発明は、心臓細胞に特異的に働きかける心臓細胞培養材料を提供することを目的とする。また、当該心臓細胞培養材料を使用して培養したことにより得られる人工臓器材料及びその製造方法を提供することを目的とする。心臓細胞培養において、VCAM-1を含む心臓細胞培養材料を使用することにより、機能的な心臓組織が良好に構築される。



WO 2016/006262 A1

明 細 書

発明の名称：心臓細胞培養材料

技術分野

[0001] 本発明は、心臓細胞培養材料、および、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面を、当該心臓細胞培養材料でコーティングした細胞培養基材に関する。また、当該心臓細胞培養材料を使用して心臓細胞を培養したことにより得られる人工臓器材料及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 線維芽細胞はほぼ全ての脊椎動物に存在し、組織が外傷や虚血で傷ついたときに、傷ついた領域が、線維芽細胞増殖と豊富な細胞外マトリックス付着により、線維性の組織に置き換えられる。同様に、心筋梗塞や心筋症のような種々の心疾患において、たくさんの心筋細胞が失われると、その領域も線維性組織が置き換えて、心臓リモデリングと、過剰な血液動態ストレス及び神経液性刺激を伴う心不全へと導く。アンジオテンシンII及びエンドセリン-1等の神経液性因子は、血圧上昇、心筋細胞アポトーシス及び局所炎症を通して、心臓リモデリングの促進に寄与することがよく知られているが、心臓線維芽細胞はそれらのファクターを分泌することが報告されている。心臓線維芽細胞は、心臓発生において重要な役割を担っていることも知られている。心臓線維芽細胞において相互接続する細胞プロセスが、コラーゲン、線維芽細胞及び筋肉細胞のネットワークを形成する。心筋細胞増殖は、厚みのある心室壁の形成に重要なプロセスであるが、胚性心臓線維芽細胞は、 $\beta 1$ インテグリンシグナリングを通して、心筋の有糸分裂活性を促進することも報告されている。心臓線維芽細胞ドミナントとなる効果を生み出す物質は、これまで知られていない。ここで、心臓線維芽細胞は様々な方法で心臓発生や発病に働きかけることから、心筋細胞と心臓線維芽細胞の間の相互作用と基礎メカニズムの理解の重要性が広く認識されていた。しかし、心臓線維芽細胞の特性がはっきりしていないことがボトルネックとなっており、心臓線維芽細胞

胞の機能と分子生物学的性質を明らかにすることが必要とされている。

[0003] 心臓組織エンジニアリングは、再生医療だけでなく、組織モデルとしても有望な方法である。心臓組織エンジニアリング方法の中で、温度応答性培養皿を使用した細胞シートを基礎とする心臓組織が開発された。以前、様々なタイプの血管床の上に、新生仔ラット由来の心筋細胞、線維芽細胞及び内皮細胞を乗せた心臓細胞シート層は、血管化する生存可能な(viable)心臓組織を三次元構築することができることが報告された（非特許文献1～3）。細胞シートを基礎とする組織エンジニアリングには何らの足場も必要としないので、細胞シートを構築するために特定量の細胞外マトリックスを必要とする。左心室は主に線維芽細胞と心筋細胞から構成されているというエビデンスと一致して、特定量の線維芽細胞は、精製した胚性幹細胞由来心筋細胞を使用したときに、心臓細胞シートを構築するのに重要である（非特許文献4）。最近の報告では、心筋細胞と非筋細胞との間の細胞間相互作用が心臓の生理学及び発症において重要であることが示唆されているので（非特許文献5）、心臓線維芽細胞機能は設計された心臓組織の機能にも影響を与え、組織モデルとしてインビトロで心臓組織を構築するのに適切な線維芽細胞を選択することは必須であろう。しかし、心臓線維芽細胞が、他の線維芽細胞や関連する分子メカニズムと比べて、心筋細胞に対して特異的な機能を有するかどうかは不明である。

[0004] 以上のように、心臓線維芽細胞は心臓発生や心臓病の発症又は治癒において重要な役割を果たすことから、心筋細胞等の心臓細胞に特異的に働きかける心臓線維芽細胞を、その他の線維芽細胞と選別し採取する必要がある。線維芽細胞は、以前は均一な細胞種と考えられていたが、最近の研究により、非常にバラエティーに富んだ表現型を持ち、存在する臓器、組織、又は細胞に対する負荷状態によって、その表現型が異なることが明らかとなってきた。

しかし、線維芽細胞は、その機能が良く分かっておらず、形態学的に分類されているほぼ唯一の細胞であるため、線維芽細胞の中から、ある特定の機

能を持つものだけを選別することは困難である。

- [0005] 一方、VCAM-1と $\alpha 4$ インテグリンについて、Kweeらは、VCAM-1は胎生11.5日において心外膜および心筋細胞、心室中隔等で発現していることを報告した。 $\alpha 4$ インテグリンはVCAM-1とほぼ同様の領域で発現が認められるが、心室中隔には発現していないことを報告している（非特許文献6）。さらに、VCAM-1欠損胚において、胎生11.5日では胎盤形成が阻害され胎生致死となるものと心室心筋の緻密層と心室中隔の減少による奇形が報告された。Yangらも、胎生11.5日での $\alpha 4$ インテグリンnull胚において心外膜の欠損を報告している（非特許文献7）。それゆえ、VCAM-1/ $\alpha 4$ インテグリンは主に、胚形成期において心臓細胞と心外膜の形成に寄与すると考えられる。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Shimizu T, et al., Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circulation research. 2002;90:e40

非特許文献2: Sekiya S, et al., Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. Biochemical and biophysical research communications. 2006;341:573-582

非特許文献3: Shimizu T, et al., Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. Biomaterials. 2003;24:2309-2316

非特許文献4: Matsuura K, et al., Hagiwara N, Zandstra PW, Okano T. Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets. Biomaterials. 2011;32:7355-7362

非特許文献5: Deschamps AM, et al., Disruptions and detours in the myocardial matrix highway and heart failure. Current heart failure reports. 2005;2:10-17

非特許文献6: Kwee L, et al., Defective development of the embryonic a

nd extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (vcam-1) deficient mice. Development (Cambridge, England). 1995;121:489-503

非特許文献7: Yang JT, et al., Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. Development (Cambridge, England). 1995;121:549-560

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、心臓細胞に特異的に働きかける心臓細胞培養材料、および、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面を、当該心臓細胞培養材料でコーティングした細胞培養基材を提供することを目的とする。また、当該心臓細胞培養材料を使用して心臓細胞を培養したことにより得られる人工臓器材料及びその製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 心臓細胞培養において、VCAM-1蛋白質を含む心臓細胞培養材料を使用することにより、機能的な心臓組織が良好に構築されることが明らかとなった。よって、当該心臓細胞培養材料を、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面にコーティングし、細胞培養基材として使用することができる。当該心臓細胞培養材料を使用して培養した心臓細胞は、人工臓器材料として使用可能である。
- [0009] すなわち、本発明は、以下のとおりである。
- [1] VCAM-1蛋白質を含む、心臓細胞培養材料。
 - [2] 上記VCAM-1蛋白質が、動物材料から分離精製したVCAM-1、VCAM-1組み換え蛋白質、又は、VCAM-1蛋白質を発現している細胞である、[1]に記載の心臓細胞培養材料。
 - [3] 心臓組織を構築するための培養に使用されるものである、[1]または[2]に記載の心臓細胞培養材料。
 - [4] 前記VCAM-1蛋白質を発現している細胞が、VCAM-1蛋白質を発現している

線維芽細胞である、[2]または[3]に記載の心臓細胞培養材料。

[5]前記線維芽細胞が、心臓由来のものである、[4]に記載の心臓細胞培養材料。

[6]前記線維芽細胞が、心外膜由来のものである、[4]または[5]に記載の心臓細胞培養材料。

[7][1]～[6]に記載の心臓細胞培養材料で、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面をコーティングした、細胞培養基材。

[8][1]～[6]に記載の心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養することにより得られる、人工臓器材料。

[9][1]～[6]に記載の心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養するステップを含む、人工臓器材料の製造方法。

[10]抗VCAM-1抗体を含む、心臓細胞培養材料スクリーニング用試薬。

[11]VCAM-1蛋白質を発現している心臓由来線維芽細胞。

[12]培養した細胞を培養基材から剥離し回収するステップをさらに含む、[9]に記載の人工臓器材料の製造方法。

[13]前記培養基材が温度応答性培養皿であり、前記剥離が温度変化により行われる、[12]に記載の人工臓器材料の製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明の心臓細胞培養材料を使用して心臓細胞を培養することにより、再生医療や組織モデルにおいて使用可能な、機能的な心臓組織を構築することができる。当該心臓細胞培養材料を、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面にコーティングし、細胞培養基材として使用することができる。また、培養して得られた心臓細胞又は心臓組織は、人工臓器材料として使用可能である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]NCF、ACF及びADFの顕微鏡観察（写真）。(A)各々の線維芽細胞の明視野顕微鏡像。(B-E)DDR2、ビメンチン及び α SMA発現の代表的な図（ほとんどの線維芽細胞はカルボニン、サイトケラチン11及びNG2を発現していなかった）

。

[図2]線維芽細胞と共培養したmESC由来心臓細胞シートの特性の違い（写真）。

(A)剥離前、自律拍動する多くの細胞塊が、NCFとACF共培養シートにおいて観察された。温度降下後、mESC由来心筋細胞及び線維芽細胞（-）では細胞シート形成は観察されなかった。(B)各々の細胞シートにおける細胞外活動電位。ACFまたはNCF共培養シートにおける活動電位は各々のチャンネルにて観察された。しかし、ADF共培養シートにおいて、活動電位は単発的であった（囲み線は細胞シートの形を示す）。(c)共焦点顕微鏡を使用した各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。YFPは緑色（黄色）の蛍光（YFP：励起波長514 nm、蛍光波長527 nm）を、ビメンチンは赤色の蛍光（cy3：励起波長512 nm、蛍光波長552 nm）を発し、核はヘキスト33258（青色）（ヘキスト33258：励起波長352 nm、蛍光波長461nm）で染色された。共焦点顕微鏡観察は、線維芽細胞（-）またはADFとの共培養における細胞と比較して、NCFまたはACFと共培養した細胞においてYFP(+)の細胞が多いことを示唆した。(D)共焦点顕微鏡を使用した各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。cTnTは緑色の蛍光（FITC：励起波長488 nm、蛍光波長530 nm）を、ビメンチンは赤色の蛍光（cy3：励起波長512 nm、蛍光波長552 nm）を発し、核はヘキスト33258（青色）（ヘキスト33258：励起波長352 nm、蛍光波長461 nm）で染色された。共焦点顕微鏡観察は、線維芽細胞（-）またはADFとの共培養における細胞と比較して、NCFまたはACFと共培養した細胞においてcTnT(+)の細胞が多いことを示唆した。(E)棒グラフは、各々の細胞培養皿におけるYFP(+)またはcTnT(+)の細胞数の増加を示す。線維芽細胞（-）におけるYFP(+)またはcTnT(+)の細胞数を1とした。YFP(+)及びcTnT(+)細胞は、ADF共培養または線維芽細胞（-）における培養皿よりも、NCFまたはACF培養皿においてより多く観察された。加えて、NCFとACFにおける心筋細胞数の間に有意な関連はない。(N = 3, ** P < 0.01)

[図3]各々の細胞培養皿における細胞培養開始1日目と5日目の心筋細胞数（写真）。(A)共焦点顕微鏡を使用した培養開始1日目での各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。YFPは緑色（黄色）の蛍光（YFP：励起波長514 nm、蛍

光波長527 nm) を、cTnTは赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(B) 共焦点顕微鏡を使用した培養開始5日目での各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。YFPは緑色 (黄色) の蛍光 (YFP: 励起波長514 nm、蛍光波長527 nm) を、cTnTは赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(c) 各々の培養皿における心筋細胞数。棒グラフは、YFP(+)及びcTnT(+)の細胞数の増加を示す (培養開始一日目の線維芽細胞(-)での値を1とした)。ACFとNCF培養皿においては、培養開始から1日目のものと比較して、5日目においてより多くの心筋細胞が観察された。しかし、それ以外の培養皿では、1日目と5日目の間で心筋細胞数に差がなかった。ACFとNCFとの間には、有意差は観察されなかった。(N = 3, ** P < 0.01)

[図4]心筋細胞増殖の免疫蛍光染色による評価 (写真)。(A)共焦点顕微鏡を使用した各々の共培養皿におけるKi67陽性心筋細胞の免疫蛍光染色観察。cTnTは緑色の蛍光 (FITC: 励起波長488 nm、蛍光波長530 nm) を、Ki67は赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(B)各々の培養皿におけるKi67(+)又はリン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)(+)心筋細胞のパーセンテージ(N = 4, ** P < 0.01)。(C)共焦点顕微鏡を使用した各々の培養皿におけるリン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)陽性心筋細胞の免疫蛍光染色観察。cTnTは緑色の蛍光 (FITC: 励起波長488 nm、蛍光波長530 nm) を、リン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)は赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(D)各々の培養皿におけるリン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)(+)心筋細胞のパーセンテージ(N = 4, ** P < 0.01)。(E)(F)各々の培養皿における心筋細胞のBrdU FACSアッセイ (N = 3, ** P < 0.01)。(G)共焦点顕微鏡を

使用した、インサートカルチャーディッシュにおける培養開始 1 日目と 5 日目での YFP(+) と cTnT(+) の心筋細胞の免疫蛍光染色の観察。YFP は緑色（黄色）の蛍光（YFP: 励起波長 514 nm、蛍光波長 527 nm）を、cTnT は赤色の蛍光（cy3: 励起波長 512 nm、蛍光波長 552 nm）を発し、核はヘキスト 33258（青色）（ヘキスト 33258: 励起波長 352 nm、蛍光波長 461 nm）で染色された。(H) 棒グラフは、1 日目と 5 日目との間での YFP(+) と cTnT(+) の細胞数の増加を示す。1 日目での YFP(+) と cTnT(+) の細胞数を 1 とした。心筋細胞増殖は 5 日目において観察された ($N = 4$, $** P < 0.01$)。

[図5](A) ADF と NCF の網羅的遺伝子クラスター解析（写真）。この遺伝子ヒートマップは、ADF と NCF との間の顕著な相違を示している。このマップは 2 つのグループに分類された。1 つ目のグループは ADF のみから構成され、2 つ目のグループは NCF のみから構成された。(B) リアルタイム PCR により VCAM-1 遺伝子の発現レベルを検討した。VCAM-1 の発現レベルは NCF において有意に高かった。NCF における VCAM-1 遺伝子は ADF の 16 倍高かった ($N = 3$, $* P < 0.05$)。(C-D) ウェスタンブロット解析による NCF と ADF における VCAM-1 蛋白質の発現レベル。以下の一過性過剰発現細胞のライセートをポジティブコントロールとして用いた: Sol8 (SantaCruz, CA, USA) 各々の細胞における β -アクチンのラベルピークを 1 とした ($N = 3$, $** P < 0.01$)。(E) mESC 由来心筋細胞上の VCAM-1 レセプター ($\alpha 4 \beta 1$) の免疫蛍光染色。(F) mESC 由来心筋細胞における VCAM-1 レセプターのウェスタンブロット解析。以下の一過性過剰発現細胞のライセートをポジティブコントロールとして用いた: Jurkat 全細胞ライセート。

[図6] 免疫蛍光染色解析による心臓増殖因子の同定（写真）。(A-B) 5 日目の心筋細胞に対する中和抗体の効果についての免疫蛍光染色観察。YFP は緑色（黄色）の蛍光（YFP: 励起波長 514 nm、蛍光波長 527 nm）を、cTnT は赤色の蛍光（cy3: 励起波長 512 nm、蛍光波長 552 nm）を発し、核はヘキスト 33258（青色）（ヘキスト 33258: 励起波長 352 nm、蛍光波長 461 nm）で染色された。VCAM-1 中和抗体を用いて NCF と心筋細胞とを共培養すると、5 日目で心筋細胞

数が減少した。それに対して、アイソタイプコントロールを用いた場合は、5日目の心筋細胞数に影響はなかった($N = 3$, $** P < 0.01$)。(C-D) 5日目の心筋細胞に対するVCAM-1可溶性蛋白質の効果についての免疫蛍光染色観察。YFPは緑色(黄色)の蛍光(YFP: 励起波長514 nm、蛍光波長527 nm)を、cTnTは赤色の蛍光(cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm)を発し、核はヘキスト33258(青色)(ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm)で染色された。VCAM-1可溶性蛋白質($10 \mu\text{g/mL}$)との培養により、心筋細胞増殖効果が得られた。NCFとの共培養と、NCF(-)におけるVCAM-1可溶性蛋白質との共培養との条件の間で、心筋細胞数に有意差はなかった($N = 3$, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$)。

[図7]新生児マウス由来の心臓線維芽細胞のFACS解析結果。(A-C) 抗VCAM-1抗体で染色した結果を示す。(D) 皮膚線維芽細胞を二次抗体のみで染色したネガティブコントロールの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、VCAM-1を含む心臓細胞培養材料に関するものである。本発明において「心臓細胞培養材料」とは、心臓細胞を培養する際に用いられるいかなる材料であってよい。たとえば、培養培地に添加する試薬であってよいし、シャーレやフラスコ等の培養容器等の培養基材の底面又は壁面等をコーティングする材料等として使用することもできるが、それらに限定されない。

[0013] VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) は、血管内皮細胞等に発現する細胞接着分子として既知の蛋白質であり、例えば、ヒトの場合は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセッション番号 NM_001078等に記載された遺伝子によってコードされる蛋白質が挙げられるが、これらに限定されず、選択的スプライシングによるアイソフォームも含まれる。本発明におけるVCAM-1蛋白質には、細胞表面に発現しているVCAM-1や可溶性VCAM-1の他、VCAM-1蛋白質のアミノ酸において1若しくは数個、たとえば、1~20個、1~15個、1~10個、1~5個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつVCAM-1蛋白質と同等の活

性を有する各種変異体が含まれる。本発明におけるVCAM-1としては、動物材料中のVCAM-1蛋白質を公知の方法により分離精製したものを用いてもよいし、組み換え蛋白質を用いてもよい。組み換え蛋白質は、市販のものを使用可能である。

[0014] または、本発明におけるVCAM-1としては、VCAM-1を発現している細胞を用いてもよい。VCAM-1を発現している細胞をスクリーニングするためには、公知のセルソーティング法を用いればよい。たとえば、抗VCAM-1抗体を使用したフローサイトメトリー、磁気ビーズ法、アフィニティーカラム法、又はパニング法等のセルソーティング法が挙げられるが、それらに限定されない。

抗VCAM-1抗体は、特に制限されないが、市販のものを用いてもよいし、VCAM-1を抗原として既知の方法により作製したものを用いてもよい。また、VCAM-1を発現している細胞を選別できる限りにおいて、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれを用いてもよいが、特異性の観点から、モノクローナル抗体を用いるのが好ましい。

[0015] すなわち、本発明における心臓細胞培養材料をスクリーニングする方法は、細胞を入手するステップ、当該細胞を抗VCAM-1抗体を用いてセルソーティングを行うステップ、セルソーティングの結果、VCAM-1を発現していると判定された細胞のみを回収するステップ、を含む。

[0016] VCAM-1を発現している細胞としては、VCAM-1を発現している限りその種類に制限はないが、線維芽細胞を用いることが好ましい。当該線維芽細胞には、最終的に線維芽細胞または筋線維芽細胞となる全ての細胞が含まれる。すなわち、分化又は成熟段階の途中の細胞であって、その時点では線維芽細胞または筋線維芽細胞と同定できないものであっても、最終的に線維芽細胞または筋線維芽細胞となるものであれば、本発明における線維芽細胞の範囲に含まれる。

[0017] 線維芽細胞の由来に制限はなく、ES細胞、iPS細胞またはミューズ細胞等の多能性幹細胞や、間葉系幹細胞などの成体幹細胞を分化させて用いてもよいし、動物から採取したプライマリー細胞を用いてもよいし、株化した細胞を

用いてもよいが、心臓由来の線維芽細胞を使用することが好ましく、中でも、心外膜由来の線維芽細胞が、特に好ましい。株化した細胞を用いる場合には、VCAM-1を発現することが知られた細胞を選択することにより、細胞選別の処理を省くことができる。線維芽細胞の由来となる動物は、共培養する細胞の由来動物に合わせて、適宜選択することができる。たとえば、ヒト：マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、サル、又はウサギ等の実験動物：イヌ、ネコ又は鳥等の愛玩動物：ウシ、ウマ、ヒツジ又はヤギ等の家畜等が挙げられる。動物から線維芽細胞を採取する場合には、胎児、新生児、小児、成体のいずれの時期のものを用いてもよく、特に制限はない。

[0018] 本発明における心臓細胞培養材料には、VCAM-1蛋白質又はVCAM-1蛋白質を発現している細胞の維持または保存のために、生理的食塩水、細胞培養液、または細胞保存液等を含めた組成物としてもよく、VCAM-1の機能を損なわない限りにおいて当該組成物に含めるものに制限はない。また、本発明における心臓細胞培養材料は、液状、ゲル状であってもよいし、凍結保存又は凍結乾燥保存されたものであってもよく、その状態に制限はない。

[0019] また、本発明における心臓細胞培養材料には、VCAM-1蛋白質の発現の有無に拘わらず、線維芽細胞を含めることができる。当該線維芽細胞としては、最終的に線維芽細胞または筋線維芽細胞となる全ての細胞が含まれる。すなわち、分化又は成熟段階の途中の細胞であって、その時点では線維芽細胞または筋線維芽細胞と同定できないものであっても、最終的に線維芽細胞または筋線維芽細胞となるものであれば制限なく使用可能である。その中でも、CD31（血管内皮細胞マーカー）を発現している線維芽細胞が好ましい。VCAM-1蛋白質としてVCAM-1蛋白質を発現している線維芽細胞を用いる場合、VCAM-1蛋白質発現細胞（cell number）：CD31発現細胞（cell number）は、5：5～9：1が好ましく、5：5～8：2がより好ましく、6：4～8：2がさらに好ましい。

[0020] 本発明は、上記心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養することにより得られる、人工臓器材料またはその製造方法に関するものである。すなわち

、本発明における心臓細胞培養材料は、心臓細胞と共に培養することにより、再生医療や組織モデルにおいて使用可能な、機能的な心臓組織を構築することができる。当該心臓組織は、人工臓器材料として使用可能である。当該人工臓器材料は、どのような形態であってもよい。たとえば、シート状にして心臓等の臓器の損傷部へ付着させてもよいし、シートを積層したり、スキャフォールドを用いてある程度の厚みを持たせた塊状にし、臓器欠損部へ移植してもよい。当該スキャフォールドの材質としては、ハイドロキシアパタイト、アテロコラーゲン又はゲル等が挙げられるが、それらに限定されない。また、特定の形状とせず、培養細胞の状態のまま、細胞移植を行ったり、学術研究等に用いることも可能である。さらに、3Dプリンターを用いて、当該人工臓器材料から人工臓器を作製することもできる。作製された人工臓器は、移植に用いるだけでなく、安全性薬理試験や前臨床研究等に幅広く利用できる。

[0021] 本発明において、「心臓組織を構築する」とは、心臓細胞の分裂を促進、又は組織全体で均一な拍動を呈し、再生医療や組織モデルとして使用可能な、心臓が有する機能を少なくとも1つ備えた組織を構築することをいう。心臓が有する機能とは、自律拍動能、収縮及び弛緩能、刺激伝導能、ホルモン分泌能等のこれまでに知られている心臓機能の全てを包含する。当該心臓機能は、心臓のみが有するものに限定されない。たとえば、収縮及び弛緩能は筋細胞も有しているが、他の細胞も同等の機能を有していることは、本発明における心臓機能の定義に影響を及ぼさない。また、当該心臓機能について、その機能の高低に制限はなく、心臓組織の使用目的に適うものであればよい。たとえば、人工心臓を作製する目的であれば、全身に血液を拍出できる程度の収縮弛緩能が必要であるが、*in vitro*での収縮弛緩能の学術的研究等が目的であれば、収縮弛緩能が何らかの手段で検出さえできればよい。

[0022] 本発明における人工臓器材料またはその製造方法において使用される心臓細胞には、心筋細胞、平滑筋細胞、ペースメーカー細胞及び血管内皮細胞等の心臓を構成する全ての細胞が含まれる。当該心臓細胞の由来は、人工臓器

材料としての使用目的に合わせて、適宜設定することが可能である。たとえば、ヒトへの移植を目的とする場合には、ヒト由来の心臓細胞を用いればよいし、マウス実験における組織モデルの構築を目的とする場合には、マウス由来のものを用いればよい。また、心臓細胞は、胎児、新生児、小児、成体のいずれの時期のものを用いてもよく、特に制限はない。本発明における心臓細胞は、ES細胞、iPS細胞またはミューズ細胞等の多能性幹細胞や、間葉系幹細胞などの成体幹細胞から作製することが好ましい。

[0023] 本発明における「培養」とは、心臓細胞培養材料と心臓細胞とが一つの培養容器内に存在する状態、または同一の培養液に浸っている状態である限り、その培養条件に制限はなく、公知の細胞培養方法により行うことができる。心臓細胞培養材料がVCAM-1蛋白質を発現している細胞である場合、心臓細胞に対するVCAM-1蛋白質を発現している細胞 (cell number) の混合割合は、3～20%が好ましく、6～18%がより好ましく、9～16%が最も好ましい。

[0024] 本発明において、培養に用いられる培養液は、培養する細胞の種類により適宜設定可能であるが、たとえば、DMEM、 α -MEM、RPMI-1640等が使用可能である。当該培養液に、FCSやFBS等の栄養物質や抗生物質等を添加してもよい。

培養期間は、所望の細胞数や機能が備わるまでの日数を適宜設定すればよいが、たとえば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、1ヵ月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月等の期間が挙げられる。培養温度は、培養する細胞の種類に合わせて適宜設定可能であるが、たとえば、10～60℃、好ましくは20～50℃、より好ましくは30～40℃である。

[0025] 本発明における製造方法には、さらに、培養した細胞を回収するステップを含めてもよい。当該「培養した細胞」とは、線維芽細胞と心臓細胞の両方を含むものであっても、心臓細胞のみを含むものであってもよい。細胞を回収するステップとしては、トリプシン等のプロテアーゼにより細胞を剥離し

て回収してもよいが、細胞外マトリックス等を保持したまま細胞の剥離が可能である温度応答性培養皿を使用して、温度変化により細胞を剥離させ、回収するのが好ましい。

実施例

[0026] 以下に、本発明を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0027] [実施例 1]

1. 材料と方法

<動物と試薬>

ワイルドタイプのC57BL/6マウスは、日本SLC（静岡）から購入した。B6 Cg-Tg(CAG-DsRed*MST) 1Nagy/Jマウスは、ジャクソンラボラトリー（米国メイン州バーハーバー）から購入した。全ての実験プロトコルは、東京女子医科大学の動物実験委員会に承認された。後述する抗体は、免疫細胞化学、ウェスタンブロット及びフローサイトメトリー解析に用いた：ウサギポリクローナル抗ディスコイジンドメインレセプターチロシンキナーゼ2（DDR2）（GeneTex, Irvine, CA）；モルモットモノクローナル抗ビメンチン（Progen, Heidelberg, Germany）；マウスモノクローナル抗NG2（Millipore, Temecula, CA）；ウサギポリクローナル抗 α 平滑筋アクチン（Abcam, Cambridge, UK）；マウスモノクローナル抗心筋型トロポニンT（cTnT）（Thermo Scientific, Rockford, IL）；マウスモノクローナル抗サイトケラチン11（EXBIO, Nad Safinou, CZ）；ウサギポリクローナル抗Ki67（Abcam, Cambridge, UK）；ウサギポリクローナル抗ヒストンH3（phosphor S10）（Abcam, Cambridge, UK）；ラットモノクローナル抗インテグリン $\alpha 4/\beta 1$ （Abcam, Cambridge, UK）。組み換えマウスVCAM-1/CD106 Fc キメラ（R&D systems, Minneapolis, MN）特に指定がない限り、全ての試薬はシグマアルドリッチから購入した。二次抗体はJackson ImmunoResearch Laboratories（West Grove, PA）から購入した。

[0028] <マウスES細胞培養>

α -ミオシン重鎖プロモーターの制御下でのネオマイシンホスフォトランス

フェラーゼ遺伝子を発現するマウスES細胞 (mESC) の維持、心筋細胞分化、及び精製については、既報 (Matsuura K, et al., Biomaterials. 2011;32:7355-7362) に記載の方法に従った。簡潔に言うと、心筋細胞への誘導と心筋細胞精製のために、トリプシン処理したES細胞をスピナーフラスコ(Integra Biosciences, Zizers, Switzerland)に 5×10^4 細胞/mL (計125 mL/フラスコ) 播種し、10% FBS添加DMEMで10日間培養し、その後分化した細胞を8日間ネオマイシンで処理した。

[0029] <線維芽細胞分離>

線維芽細胞は ワイルドタイプのC57BL/6マウス(新生仔, 1日齢; 成体, 10-12週齢)から得た。

新生仔マウス心臓線維芽細胞(NCF)は、新生仔マウス (1日齢) の心臓から、既報 (Matsuura K, et al., Biomaterials. 2011;32:7355-7362) に記載の方法に従って得られた。3回継代したNCFが実験に使用された。

成体マウス心臓線維芽細胞(ACF)は、成体マウス (10-12週齢) の心臓から、下記の外植片培養方法により得られた。まず、心臓をPBS(-)で洗浄し、約5 mm²にカットした。カット片は滅菌したカバーガラスで覆い、10% FBS添加DMEMで10 cm培養皿にて培養した。培養開始から2週間後、細胞を0.25% トリプシン/EDTAで剥離し、他の10cm培養皿で継代培養した。3回継代したACFが実験に使用された。

成体マウス背部線維芽細胞(ADF)は、成体マウス (10-12週齢) の背部皮膚組織から得られた。まず、皮膚組織を採取し、ディスパーゼI [1000 U / mL] (エーディア株式会社) で一晩4℃にて処理した。次に、組織を約1mm²にカットした。カット片は、滅菌したカバーガラスで覆い、10% FBS添加DMEMで10 cm培養皿にて培養した。培養開始から2週間後、細胞を0.25% トリプシン/EDTAで剥離し、他の10cm培養皿で継代培養した。3回継代したADFが実験に使用された。

いくつかの実験では、NCFとADFは、B6.Cg-Tg (CAG-DsRed*MST) 1Nagy/J mice (新生仔:1日齢、成体: 10週齢) から、上記と同様の方法で得られた。

[0030] <細胞シート作製>

細胞を播種する前に、温度応答性培養皿(UpCell; セルシード)の表面を、FBSで2時間コートした。mESC由来心筋細胞とそれぞれの種類の線維芽細胞とは、8:2の割合で、10% FBS添加DMEMにて共培養した(3.2×10^5 細胞/cm²)。培養5日後、細胞シートを剥離するために、細胞を20℃で培養した。サンプルの明視野像はNikon ECLIPSE Tiにより得られた。

[0031] <電気生理学的解析>

細胞シートの電気生理学的解析は、既報 (Matsuura K, et al., Biomaterials. 2011;32:7355-7362) に記載のとおり、多電極アレイ (multi-electrode array: MED) システム(Alpha MED Sciences, Osaka, Japan)による細胞外活動電位測定から得られた。

[0032] <免疫細胞化学>

細胞を、既報 (Matsuura K, et al., Biomaterials. 2011;32:7355-7362) に記載のとおり、4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色を行った。サンプルの染色像がImageXpress Ultra Confocal High Content Screening System (Molecular Devices, CA, USA)により得られた。画像解析データはMetaExpress software (Molecular Devices, CA, USA)によって得られた。

[0033] <FACS解析>

培養細胞(5×10^5 細胞)は、細胞培養液中の最終濃度が10 μ MでBrdU染色された。FACS解析用のBrdU 染色は、BrdU Flow Kits Instruction Manual (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)に記載のとおりに行われた。簡潔に言うと、細胞は固定され、BD Cytofix/Cytoperm バッファーにて細胞膜透過処理された。それから取り込まれたBrdUをDNaseに曝した。BrdU染色は、APC-anti-BrdU antibody (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)を使用して行われた。サンプルはGallios (Beckman Coulter, Brea, CA)で解析された。下記の試薬が解析に使用された: BD Cytofix/Cytoperm Buffer (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); BD Perm/Wash Buffer (10X) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); BD CytopermPlus Buffer (10X) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)

); BrdU (10 mg/mL) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); DNase (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)。

[0034] <タイムラプス撮影>

サンプルは5日間、5% CO₂、37℃の条件下にて、BZ-9000 Fluorescence Microscope (Keyence, Osaka, Japan)により観察された。

[0035] <RNA抽出及び網羅的遺伝子解析>

トータルRNAは、TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA)を製品に添付されたメーカー指示書に従って使用して、抽出した。トータルRNAは、Qiagen RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA)を製品に添付されたメーカー指示書に従って使用して、さらに精製した。

RNAの量と質は、Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) とAgilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)を推奨どおりに使用して決定した。

[0036] cRNA増幅とラベリングのために、トータルRNAを増幅し、Agilent Low Input Quick AmpLabeling Kit, one-color (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)をメーカー指示書に従って使用してCyanine 3 (Cy3)でラベリングした。簡潔に言うと、トータルRNA100ngが、ポリdT-T7プロモータープライマーを使用して、二本鎖cDNAに逆転写された。プライマー、鋳型RNA、及び、濃度と品質が既知のクオリティコントロール転写物が、まず65℃で10分間変性され、そして、40℃で2時間、5X first strand Buffer、0.1 M DTT、10 mM dNTP mix及びAffinityScript RNase Block Mixと共にインキュベートされた。AffinityScript酵素が、70℃15分間で不活性化された。

[0037] cDNA産物はそれから、蛍光性cRNAを作製するためのインビトロトランスクリプションにおいて、テンプレートとして使用された。cDNA産物は、T7 RNAポリメラーゼとCy3標識CTPの存在下で、transcription master mixと混合し、40℃で2時間インキュベートした。標識cRNAはQIAGEN's RNeasy mini spin columnsを用いて精製し、30 µlのヌクレアーゼフリー水で抽出した。増幅とラベリングの後、cRNAの量とシアニン取り込みを、Nanodrop ND-1000分光光

度計とAgilent Bioanalyzerを使用して決定した。試料のハイブリダイゼーションのために、Cy3標識cRNA 1.65 μ gがフラグメント化され、Agilent Mouse GE 4x44Kv2 Microarray (Design ID: 026655)に65°C17時間ハイブリダイズした。洗浄後、マイクロアレイはAgilent DNA microarray scannerを使用してスキャンされた。マイクロアレイのデータ解析では、各々のスキャンされたフィーチャーの強度値を、バックグラウンド低減を行うAgilent feature extraction software version 10.7.3.1を使用して定量した。

[0038] エラーなし（フラグ検出）としてフラグされたフィーチャーのみを使用し、ポジティブでないもの、顕著でないもの、均一でないもの、バックグラウンドを超えないもの、飽和したもの、母集団からの外れ値（マージナル又はフラグ未検出）は除外した。標準化はAgilent GeneSpring GX version 11.0.2.（チップごとに75パーセントアイルシフトで標準化し、遺伝子ごとに全ての試料の中央値で標準化する）を使用して行った。コントロールのプローブを除く計39,429プローブがAgilent Mouse GE 4x44K v2 Microarray (Design ID:026655)において得られた。

転写物の変化は比較法により定量された。我々は、この実験において、シグナル強度2倍以上の変化を遺伝子発現の顕著な変化と定義した。

[0039] <定量的リアルタイムPCR解析>

相補的DNAは、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)を用いて、トータルRNAから作製された。PCR関連プライマーとしては、VCAM1 Gene Expression Assays(life Technologies)が使用された。各々のRT-PCRは、iCycler (BIO-RAD)にて、10分25 °C、120分37 °C、及び5秒85 °Cにて行われた。各々の試料から、cDNAテンプレート（1 μ g）が使用された。TaqManプローブリアルタイムPCR実験は、TaqMan Gene Expression Assays (Applied biosystems)を用いて行われた。全ての実験は三重測定で行われた。試料は7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)にて40回のサイクルで、以下のように行われた。50°C2分、95°C10分、その後95°C15秒及び60°C1分の40サイクルが続いた。相対的な定量は、内在性コントロールとしての

GapDH遺伝子を使用した定量的リアルタイムPCRのための $\Delta\Delta CT$ 法に従って計算された。

[0040] <ウエスタンブロット>

NCF及びADFは、Laemmliサンプルバッファー(BIO-RAD, CA, USA)、プロテアーゼインヒビター(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、及び2-メルカプトエタノール(Wako Pure Chemical Industries, Japan)において溶解した。試料は4%-12% Bis-Tris Gels (Life Technologies, MD, United States)にて分離し、iBlot 7-Minute Blotting System (Life technologies, MD, United States)を使用してiBlot Transfer Stack, nitrocellulose, regular-size (Life technologies, MD, United States)に電氣的にトランスファーを行い、そして化学発光解析のためにAmersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, PA, United States)を使用して処理した。バンド強度はLAS4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)及びNIH image software (version 1.46r)を使用して解析された。下記の一過性過剰発現細胞溶解物がポジティブコントロールとして使用された。Col11a1を発現するK562 (ヒト赤骨髄芽球様白血病細胞系)(Abcam, CB, UK); Vcam-1を発現するSol8 (SantaCruz, CA, USA); $\beta 1$ /CD29を発現するITGB1 293T (Abnova, Taipei, Taiwan); integrin $\alpha 4 \beta 1$ を発現するJurkat全細胞溶解物(SantaCruz, CA, USA)。

[0041] <中和抗体アッセイ>

下記の抗体及び培養皿は、中和抗体アッセイに使用された：抗VCAM-1 (LifeSpan Biosciences, Seattle, WA); ヤギIgG アイソタイプコントロール(LifeSpan Biosciences, Seattle, WA)。セルカルチャーインサート24ウェルプレート。ポアサイズ0.4 μ m半透明High Density PET Membrane (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)。

10 μ g/mLの抗体で30分間前処理した後、線維芽細胞はインサートカルチャーディッシュの上層に播種された(2.4 x10⁵ cells)。mESC由来心筋は下層に播種された(4.8 x10⁵ cells)。10 μ g/mLの抗体を含む培養液は、5日目まで毎日交換された。

[0042] <統計解析>

全てのデータは平均 ± SDで表された。異なる群間の変動有意性は、一元配置分散分析により決定した。その後、2つの群間の差は、Statcel ソフトウェアを使用してTukey-Kramer Multiple Comparison Testにより決定した。0.05より低いp値は有意に異なると見なされた。

[0043] 2. 実験結果

<mESC由来心筋細胞及び線維芽細胞を使用した細胞シート作製>

まず我々は、共培養実験に使用する予定の細胞の特性を評価した。位相差像は、新生仔マウスの心臓、成体マウスの心臓、または成体マウスの皮膚組織から分離した細胞は線維芽細胞様の形態を示すことを明らかにした（図1A）。線維芽細胞に特異的な抗体がないので、DDR2(CD167b)、ビメンチン、 α SMAなどの線維芽細胞において発現することが知られている蛋白質の発現を調べてみた。図1B-Eが示すとおり、ほとんどすべての各々のタイプの細胞がDDR2、ビメンチン、 α SMAを発現していたが、カルポニン（平滑筋細胞マーカー）、サイトケラチン（上皮細胞マーカー）、及びNG2（ペリサイトマーカー）は発現していなかった。これらの発見に基づいて、我々はこれらの細胞を、続く実験において線維芽細胞として使用した。

[0044] 特定範囲の量の線維芽細胞が、mESC由来心筋細胞を使用した細胞シートの構築に必要であり、心筋細胞と線維芽細胞との最適比は8:2であるという以前の発見に基づいて（Biomaterials, 2011;32:7355-7362）、mESC由来心筋細胞と3種の線維芽細胞（ACF、ADF及びNCF）を使用して、温度応答性培養皿UpCellにおいて心臓細胞シートの作製を試みた。心筋細胞をACF又はNCFと共培養すると、全ての範囲にわたって拍動する心臓が等しく分布していた。それに対して、心筋細胞をADFと共培養すると、拍動する細胞は凝集していた。5日間の培養後に、37℃から20℃に培養条件を変更する温度降下処理を行うと、線維芽細胞と共培養したものは全て単層細胞シートとなったが、線維芽細胞と共培養しなかったものは、単層細胞シートにはならなかった（図2A）。

[0045] 次に、MEDシステムを使用して、細胞シートの電気生理学的な評価を行った (Biomaterials, 2011;32:7355-7362、Biomaterials, 2006;27:4765-4774) 。顕微鏡観察と一致して (図 2 A) 、ACF又はNCFと共培養した細胞シートにおいて、細胞外活動電位が各チャンネルで観察された (図 2 B) 。それらの細胞シートでは、シート全体が均一に拍動していることが認められたことから、それらの細胞シートは、電気的なネットワークがシート内に構築されており、電気の伝搬を行うことが可能であることが示唆された。一方、ADFと共培養した細胞シートでは、細胞外活動電位は局所でしか観察されなかった。

[0046] 細胞シート間の心筋細胞分布の違いを確認するために、共焦点顕微鏡解析が行われた。図 2 C - E において示されるように、YFP(+)細胞数と心筋型トロポニンT (cTnT) (+)細胞数は、mESC由来心筋細胞を示している。ACF又はNCFと共培養した細胞シート中のそれら細胞数は、ADFと共培養した細胞シート中のものよりも多かった。ADFと共培養した細胞シートにおける心筋の数は、線維芽細胞なしの条件下で培養したものと同程度であった。さらに、ACF又はNCFと共培養した細胞シート間における心筋細胞数に有意な相関関係はなかった。これらの発見は、全ての種類の線維芽細胞は細胞シートを構築するのに有益であるが、心臓由来の線維芽細胞がより機能的な心臓細胞シートを構築するのに適しているかもしれないということを示唆している。

[0047] <細胞シートにおける心筋細胞の増殖>

心臓由来の線維芽細胞と共培養した細胞シートにおける心筋細胞数と、皮膚由来の線維芽細胞と共培養した細胞シートにおける心筋細胞数が異なる原因を調べるために、共培養開始から 1 日目と 5 日目における心筋細胞数を検査した (図 3 A - C) 。1 日目においては、心筋細胞数は各条件間で同じであったことから、各々のタイプの線維芽細胞は播種後の心筋細胞の初期接着には影響しないことが示唆された。ACF又はNCFとの共培養において、5 日目におけるYFP(+)とcTnT(+)の心筋細胞数は、有意に1日目よりも多かった。一方、ADFと共培養又は心筋細胞のみの条件下では、5 日目の心筋細胞数は 1 日目と同じであった。YFP(+)心筋細胞及びDsRedマウス由来線維芽細胞の低速度撮

影像解析は、NCF共培養において、心筋細胞が移動して増殖し、相互ネットワーク構成を形成することを示した。これに対してADF共培養においては、心筋細胞の増殖は少なく、ネットワーク構成を形成しなかった。これらの発見は、皮膚由来ではなく心臓由来の線維芽細胞が共培養条件下でmESC由来の心筋細胞の増殖を誘導しているかもしれないことを示唆している。

[0048] 各条件間での心筋細胞の増殖を、免疫蛍光染色により確認した。図4 A-Dにおいて示されるように、NCF共培養下におけるKi67(+)細胞とリン酸化ヒストン3(PHH3) (+)の心筋細胞のパーセンテージは、ADF共培養下のもの又は心筋細胞のみで培養したものよりも有意に高かった。さらに、BrdU取り込みアッセイもまた、ADF共培養下のもの又は心筋細胞のみで培養したもの比べて、NCF共培養下での増殖した心筋細胞のパーセンテージについて有意な増加を示した(図4 E及びF)。これらの発見は、心臓由来の線維芽細胞は心筋細胞の増殖を誘導することを、強く示唆している。

[0049] NCF共培養下での心筋細胞増殖の基礎となるメカニズムを調査するために、mESC由来心筋細胞とNCFを、セルカルチャーインサートを用いて培養した。この実験において、NCFは上層において培養され、心筋細胞は下層において培養された。NCF存在下で、5日目の心筋細胞数は、1日目のものよりも顕著に多かった(図4 G)。しかしながら、セルカルチャーインサート実験において、1日目と5日目の間の心筋細胞数の増加程度(～1.8倍)(図4 H)は、共培養条件下(～2.5倍)のものよりも低かった。これらの発見は、NCFから分泌される可溶性因子と、心臓線維芽細胞と共培養した心筋細胞における細胞間相互作用が、心筋細胞増殖を促進しているのかもしれないことを、示している。

[0050] <NCF及びADFの網羅的遺伝子解析>

上記の効果関連のものを左右する因子を同定するために、NCFとADFとの間でマイクロアレイ解析を使用して、網羅的遺伝子解析を行った。図5 Aに示されるように、遺伝子発現において多くの異なる遺伝子がNCFとADFとの間で観察された。NCFでは、500以上の遺伝子の発現が、ADFと比較して10倍以上促

進されていることが示された。リストの中で心血管関連遺伝子を選択すると、20遺伝子が残った。さらに、ノックアウトマウスモデルにおいて、心臓の発生に異常をきたし、胎生致死フェノタイプを示すことが報告された遺伝子であり、可溶性因子と接着因子の2つのフォームで作用する遺伝子を選択したところ、Vcam-1が残った。定量的RT-PCRとウエスタンブロット解析により、ADF共培養と比べて、NCF共培養では、Vcam-1発現が促進されていることを確認した（図5 B-D）。

[0051] <心臓線維芽細胞との共培養におけるVCAM-1依存的心筋細胞増殖>

インテグリン $\alpha 4\beta 1$ はVCAM-1の主要な補助受容体として知られているので、mESC由来心筋細胞におけるインテグリン $\alpha 4\beta 1$ の発現を調べた。図5 E及びFに示すとおり、ほぼ全てのmESC由来心筋細胞はインテグリン $\alpha 4\beta 1$ の発現を示した。

次に、VCAM-1が心臓線維芽細胞誘導性心筋細胞増殖に寄与しているかどうかを、中和抗体を使用して解明した。NCFを抗VCAM-1抗体により前処理した後、NCFとmESC由来心筋細胞をセルカルチャーインサートを使用して培養した。抗VCAM-1抗体処理は、心臓線維芽細胞誘導性的心筋細胞数の増殖を、有意に抑制した（図6 A及びB）。

最後に、VCAM-1の心筋細胞増殖に対する直接的な効果を解明した。培養開始から1日後、心筋細胞にVCAM-1組み換え蛋白質を添加し、5日目まで続けた。図6 C及びDに示されるように、VCAM-1処理により心筋細胞数がコントロールと比べて増加した。これらの発見は、心臓由来線維芽細胞は心筋細胞におけるVCAM-1とインテグリン $\alpha 4\beta 1$ 経路で心筋細胞増殖を誘導するかもしれないことを、示唆している。

[0052] 機能的な心臓細胞シート構築におけるVCAM-1陽性細胞の重要性を確認するために、生体由来心臓線維芽細胞におけるVCAM-1陽性細胞の割合を測定した。

マウスC57/BL6の新生児マウス（1日齢）から心臓線維芽細胞を、成体マウス（10-12週齢）から皮膚線維芽細胞を解剖し、回収した。各々の線維芽細胞

を継代数3まで接着培養し、1条件につき 1×10^7 細胞の細胞量を得た。なお、継代数3は、細胞シートにより作製された上記心筋組織の培養条件と同一である。

両者の線維芽細胞をGoat polyclonal anti-VCAM-1抗体 (R&D systems, Minneapolis, MN) で一次免疫蛍光染色し、Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat IgG (Life Technologies, MD, United States) で二次免疫蛍光染色を行った。その後、Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA) でFACS解析を行い、VCAM-1陽性細胞率を測定した (N = 3)。優位差の算出は、Student's t-testにより算出した。

[0053] 心臓線維芽細胞 (NCF) の結果を、図 7 A-Cに示す。NCFのうちVCAM-1陽性細胞の割合は、約 60%であることが分かった (図 7 A : 66.57%、図 7 B : 58.95%、図 7 C : 54.73%)。それに対して、皮膚線維芽細胞 (ADF) のうちVCAM-1陽性細胞の割合は約5%であり、NCFにおけるVCAM-1陽性細胞の割合は、ADFと比べて有意に多く含まれることが判明した ($P < 0.001$)。

[0054] VCAM-1陽性細胞を多く含む心臓線維芽細胞は、その発現するVCAM-1を介してマウスES由来の心筋細胞を増殖し、機能的な心筋組織構築のために寄与していることが示唆された。また、VCAM-1陽性の心臓線維芽細胞は、発生学的観点から心外膜由来細胞を起源とすることが考えられ、線維芽細胞を発生学的な観点から分類し、機能的な組織を構築するための細胞ソースとして、形態学的分類ではなく機能的分類を行うことが有効であるとの示唆を得た。

[0055] NCFのうちVCAM-1を発現していない細胞の大部分は、CD31 (血管内皮細胞マーカー) を発現していると考えられる。これは、組織常在性の心臓線維芽細胞は心外膜由来細胞から上皮間葉移行 (EMT) を介して産生される他に、内皮間葉移行 (EndMT) を介して血管内皮細胞から分化することが知られているためである。また、心臓線維芽細胞と同様に血管内皮細胞からEndMTを介して分化する腎臓線維芽細胞がCD31を発現していることも (J Am Soc Nephrol 19:2282-2287, 2008)、NCFがCD31を発現していることの根拠の一つとなり得る。

[0056] 以上より、皮膚線維芽細胞ではなく、心臓線維芽細胞が、マウス胚性幹細胞

胞(mESC)由来心筋細胞の増殖を促進し、より機能的な心臓細胞シートの構築に寄与することが明らかとなった。さらに、心臓線維芽細胞は、皮膚線維芽細胞と比べて豊富にVCAM-1を発現しており、そして、心臓線維芽細胞における当該VCAM-1が、心臓細胞の増殖と、機能的に生物設計された心臓組織の構築に重要な役割を果たしていることが示された。

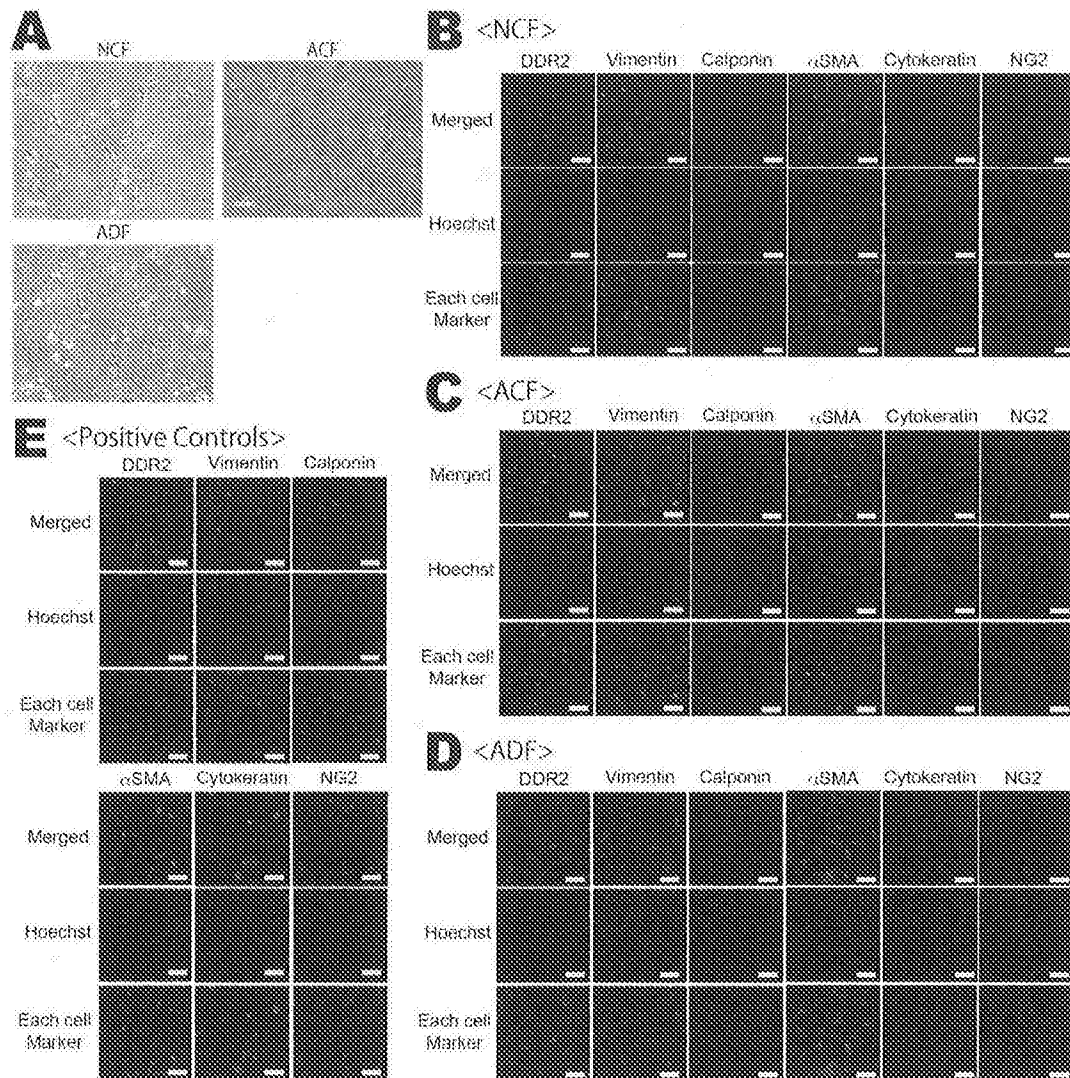
産業上の利用可能性

[0057] 本発明における心臓細胞培養材料を使用して培養することにより、機能的な心臓組織が良好に構築される。当該培養により得られる心臓細胞は、移植等の再生医療又は心臓組織モデル等の人工臓器材料として使用可能である。

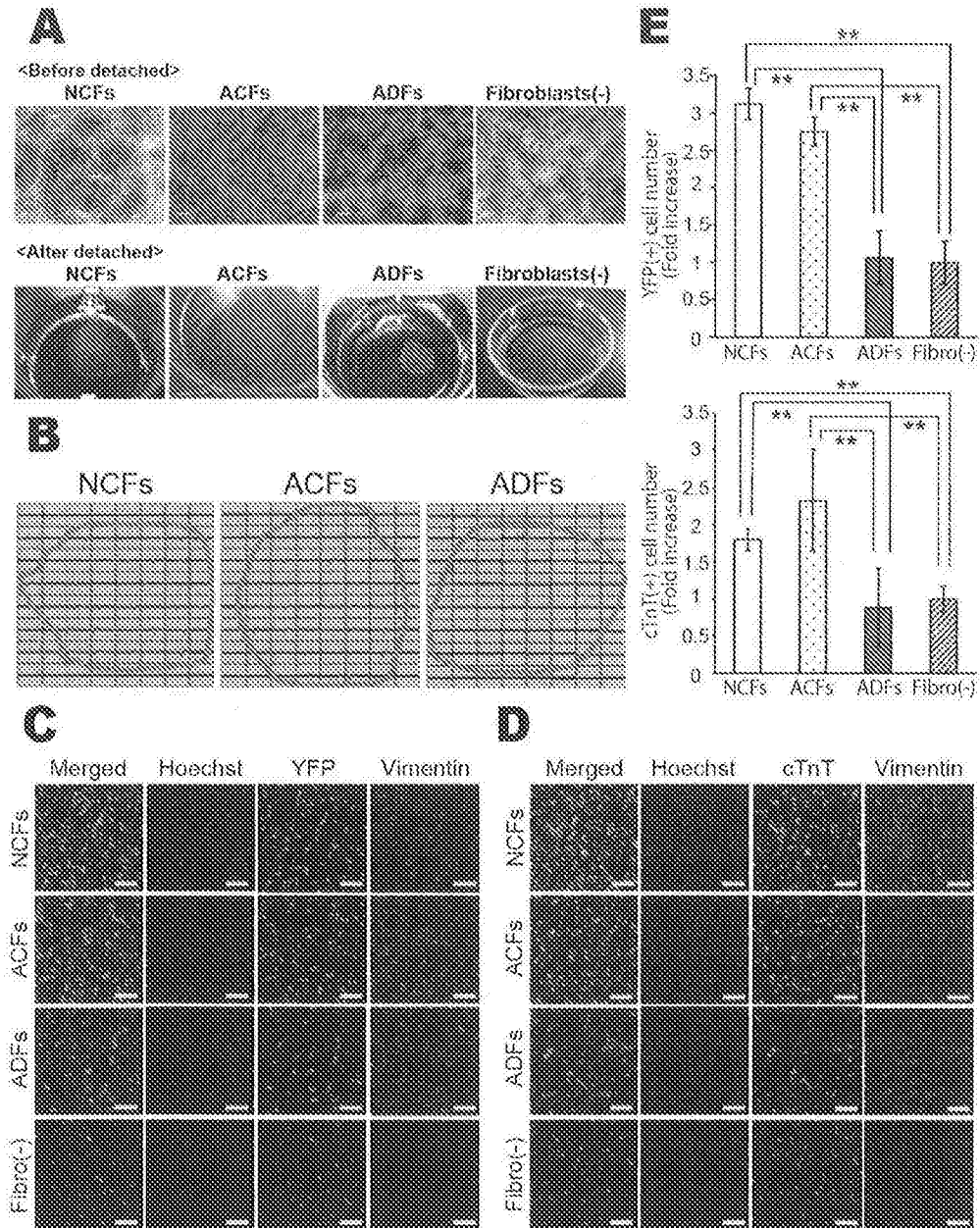
請求の範囲

- [請求項1] VCAM-1蛋白質を含む、心臓細胞培養材料。
- [請求項2] 上記VCAM-1蛋白質が、動物材料から分離精製したVCAM-1蛋白質、VCAM-1組み換え蛋白質、又は、VCAM-1蛋白質を発現している細胞である、請求項1に記載の心臓細胞培養材料。
- [請求項3] 心臓組織を構築するための培養に使用されるものである、請求項1または2に記載の心臓細胞培養材料。
- [請求項4] 前記VCAM-1蛋白質を発現している細胞が、VCAM-1蛋白質を発現している線維芽細胞である、請求項2または3に記載の心臓細胞培養材料。
- [請求項5] 前記線維芽細胞が、心臓由来のものである、請求項4に記載の心臓細胞培養材料。
- [請求項6] 前記線維芽細胞が、心外膜由来のものである、請求項4または5に記載の心臓細胞培養材料。
- [請求項7] 請求項1～6に記載の心臓細胞培養材料で、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面をコーティングした、細胞培養基材。
- [請求項8] 請求項1～6に記載の心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養することにより得られる、人工臓器材料。
- [請求項9] 請求項1～6に記載の心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養するステップを含む、人工臓器材料の製造方法。

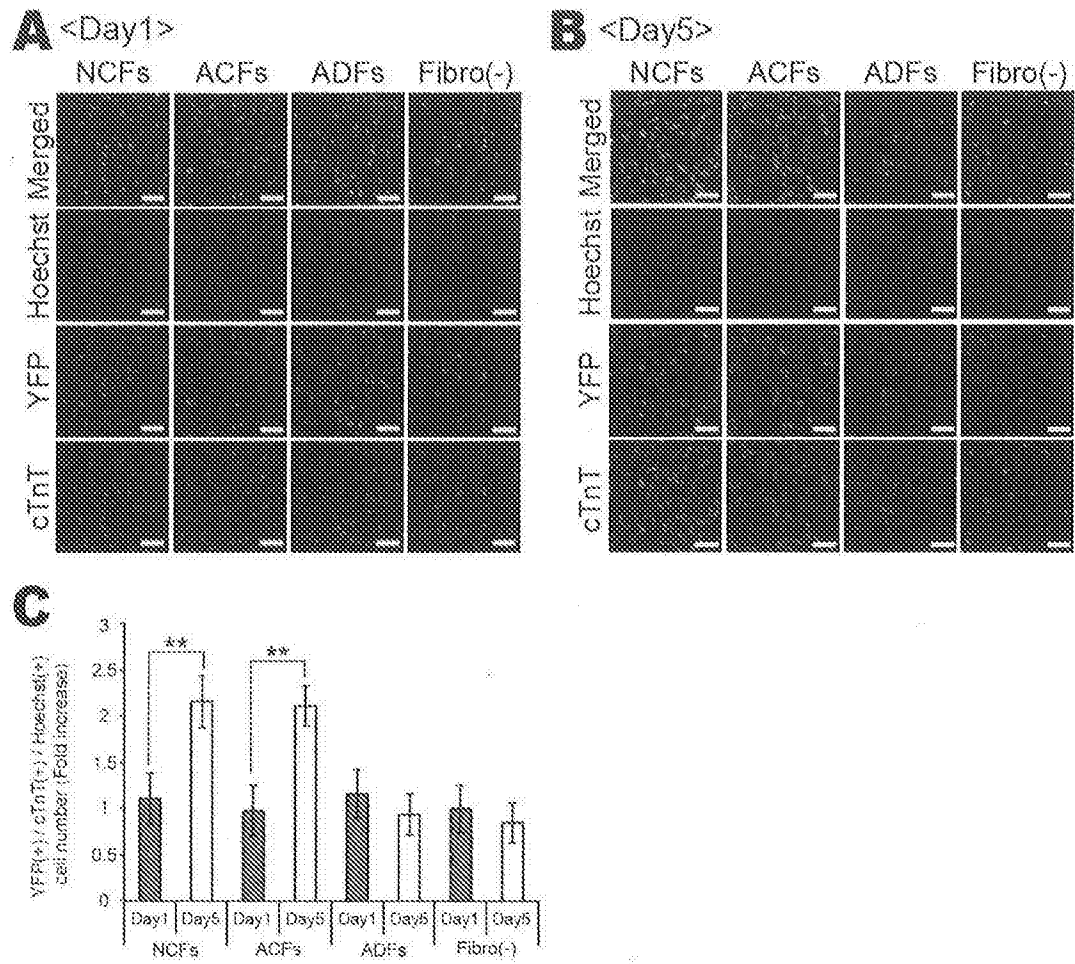
[図1]



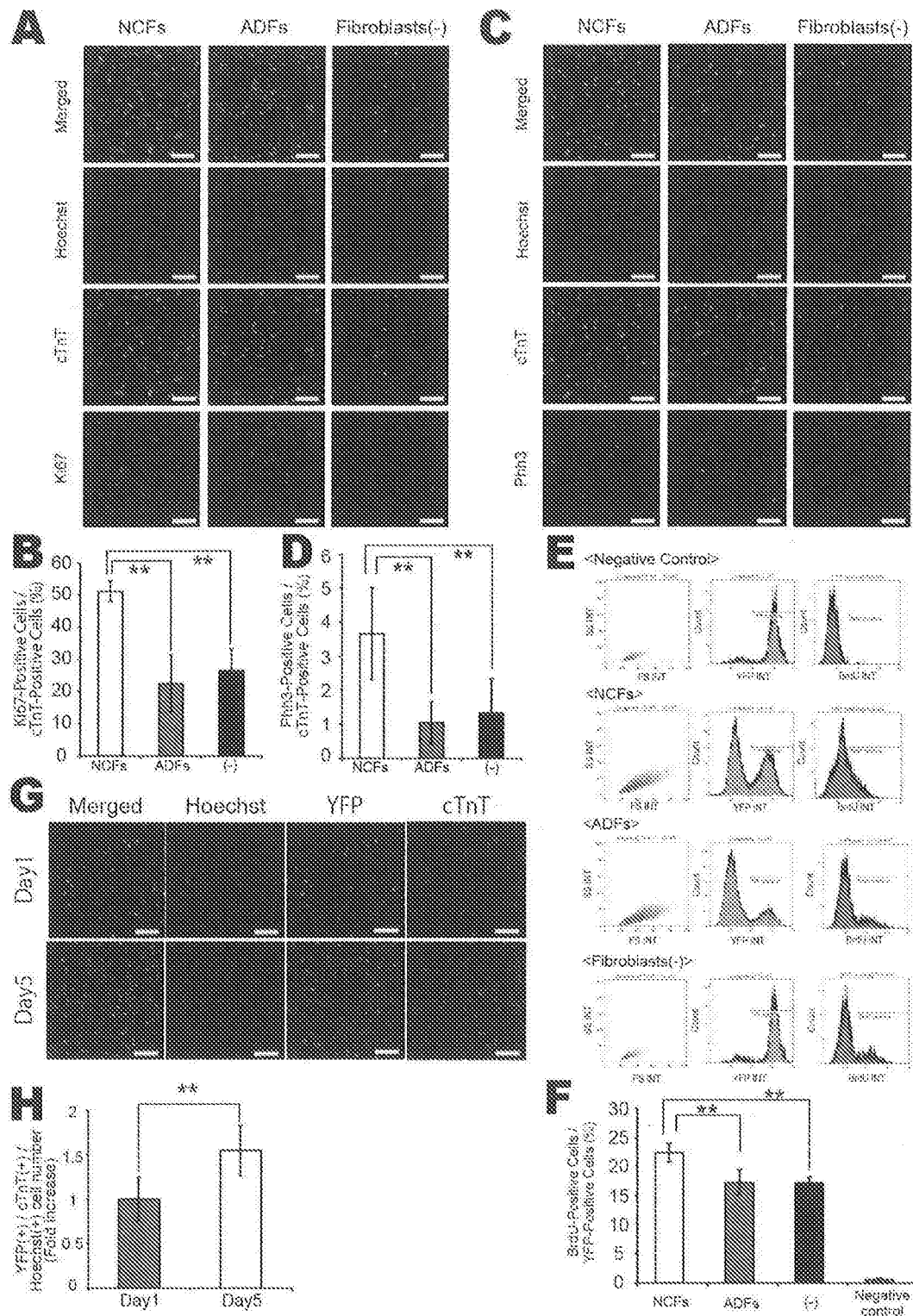
[図2]



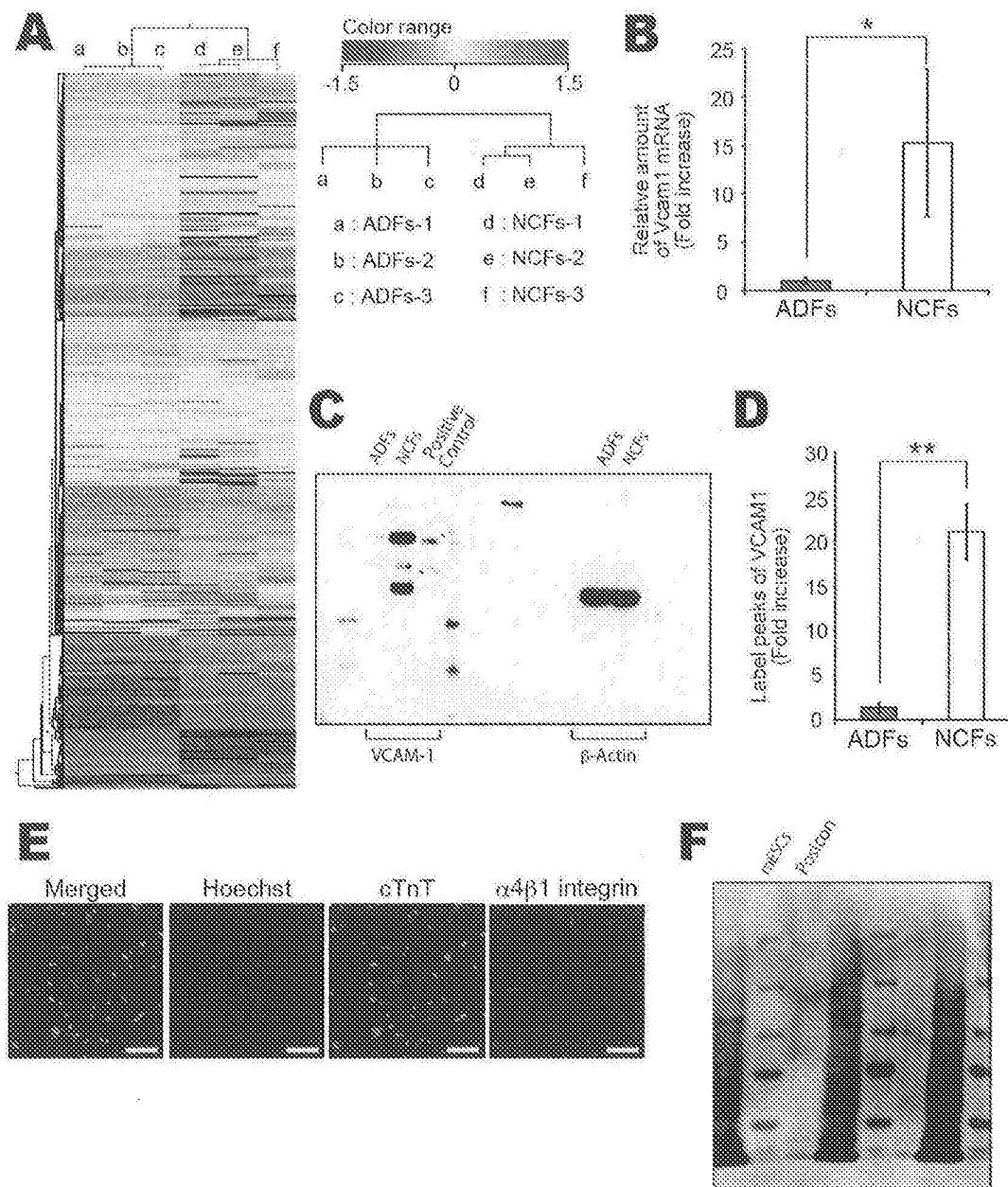
[図3]



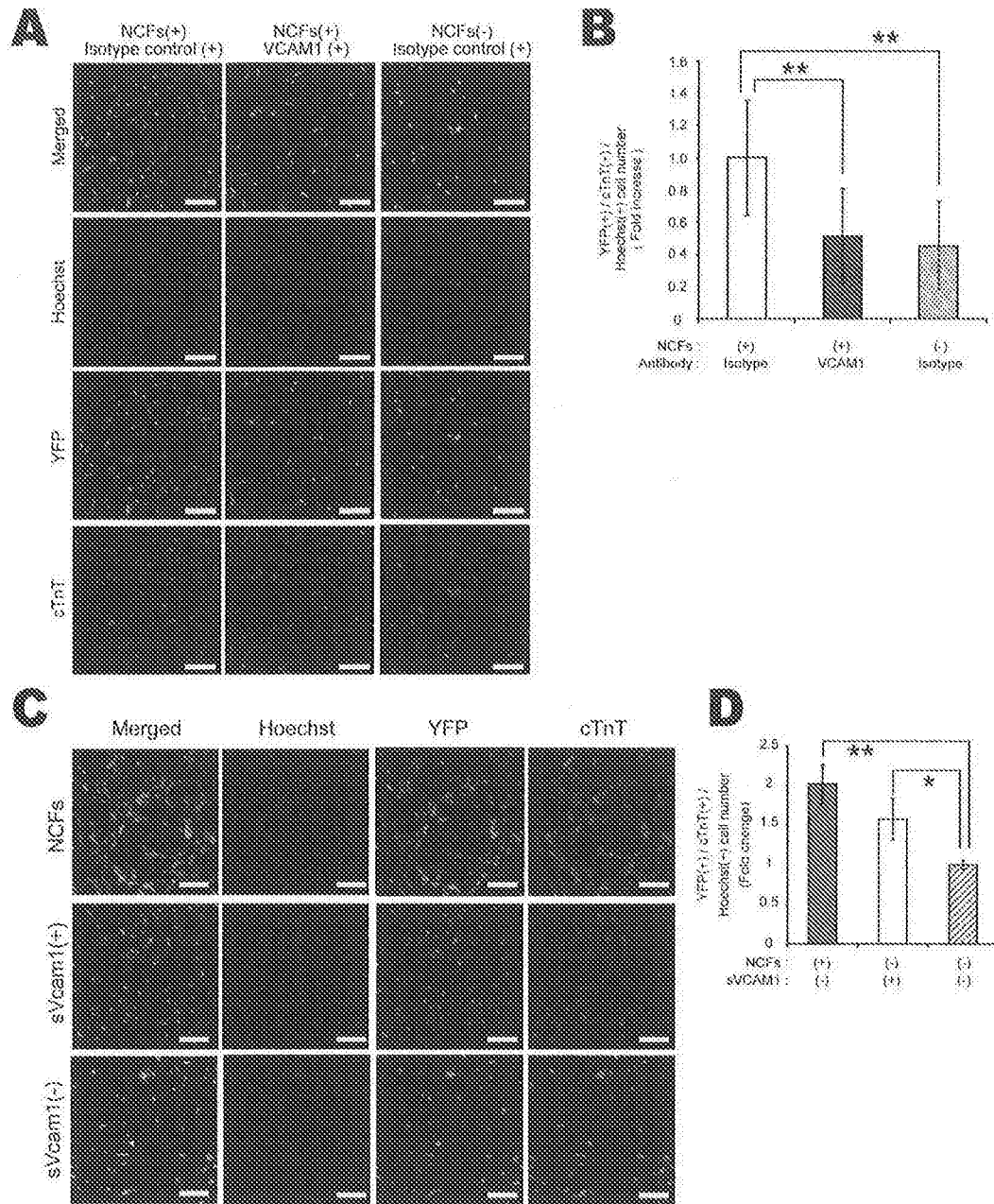
[図4]



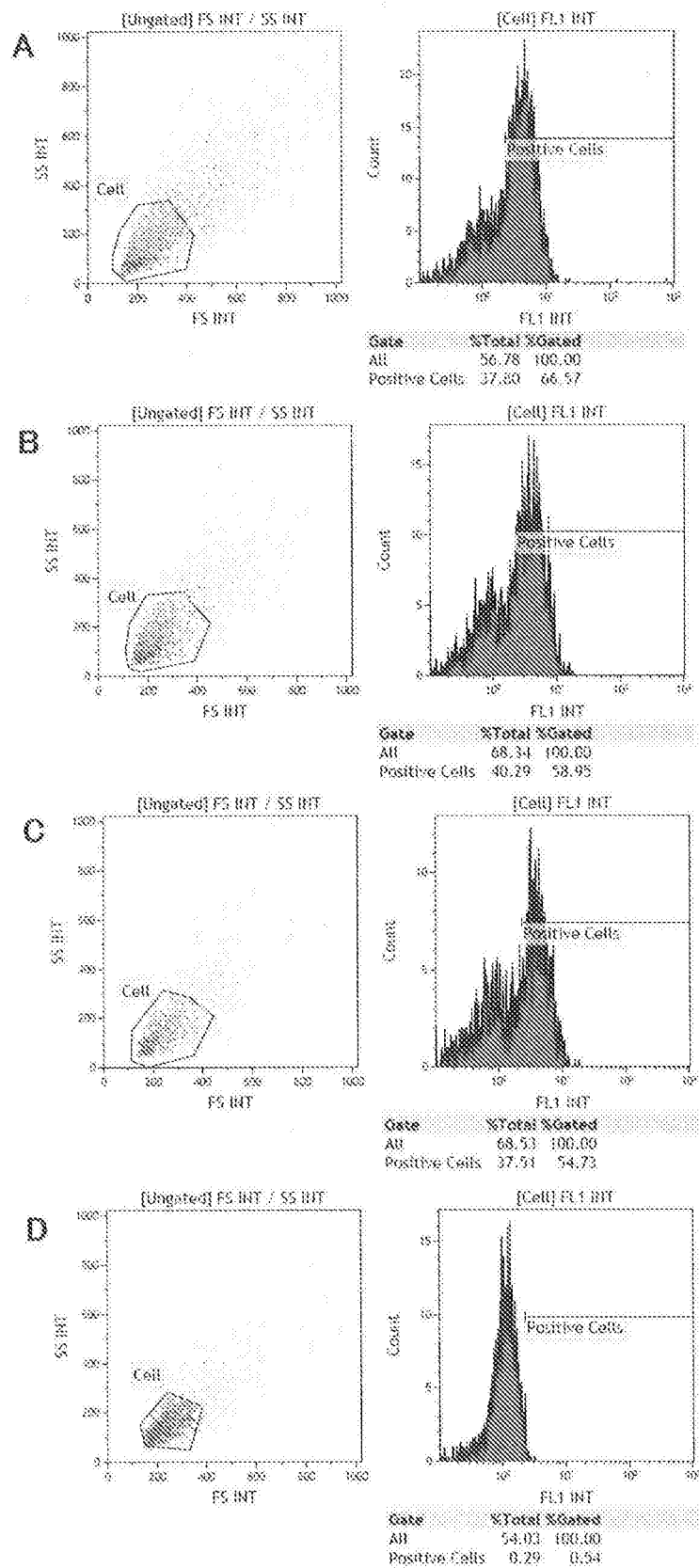
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/077(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/077, C12N1/00, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus(JDreamIII), PubMed, Thomson Innovation, Scopus, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATSUURA K., et al., Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets, Biomaterials, 2011, Vol.32, No. 30, p.7355-7362	1-9
X	Katsuhisa MATSUURA et al., "Tissue Engineering Chiryo 6 Kekkan Shinkin no Saisei Chiryo", Biomedicine & Therapeutics, 2009, vol.43, no.6, pages 646 to 650	1-9
A	MASUMOTO H., et al., Pluripotent stem cell-engineered cell sheets reassembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization, Stem Cells, 2012, Vol.30, No.6, p.1196-1205	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 March 2015 (11.03.15)

Date of mailing of the international search report
24 March 2015 (24.03.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050028

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UOSAKI H., et al., Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression, PLoS ONE, 2011, Vol.6, No.8, p.e23657	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/077(2010.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/077, C12N1/00, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDreamIII), PubMed, Thomson Innovation, Scopus, Science Direct

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	MATSUURA K., et al., Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets, Biomaterials, 2011, Vol.32, No. 30, p.7355-7362	1-9
X	松浦勝久他, ティッシュエンジニアリング治療 6 血管・心筋の再生治療, 治療学, 2009, Vol.43, No.6, p.646-650	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.03.2015

国際調査報告の発送日

24.03.2015

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

森井 文緒

4 B

5802

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MASUMOTO H., et al., Pluripotent stem cell-engineered cell sheets reassembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization, Stem Cells, 2012, Vol.30, No.6, p.1196-1205	1-9
A	UOSAKI H., et al., Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression, PLos ONE, 2011, Vol.6, No.8, p.e23657	1-9