

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-540536
(P2008-540536A)

(43) 公表日 平成20年11月20日(2008.11.20)

(51) Int.Cl.

A61K 35/12	(2006.01)	F 1
A61M 37/00	(2006.01)	A 61 K 35/12
A61P 9/04	(2006.01)	A 61 M 37/00
A61P 9/10	(2006.01)	A 61 P 9/04
		A 61 P 9/10

テーマコード(参考)

4 C 087
4 C 167

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2008-511225 (P2008-511225)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月9日 (2006.5.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年1月7日 (2008.1.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/017683
 (87) 国際公開番号 WO2006/122005
 (87) 国際公開日 平成18年11月16日 (2006.11.16)
 (31) 優先権主張番号 60/678,976
 (32) 優先日 平成17年5月9日 (2005.5.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

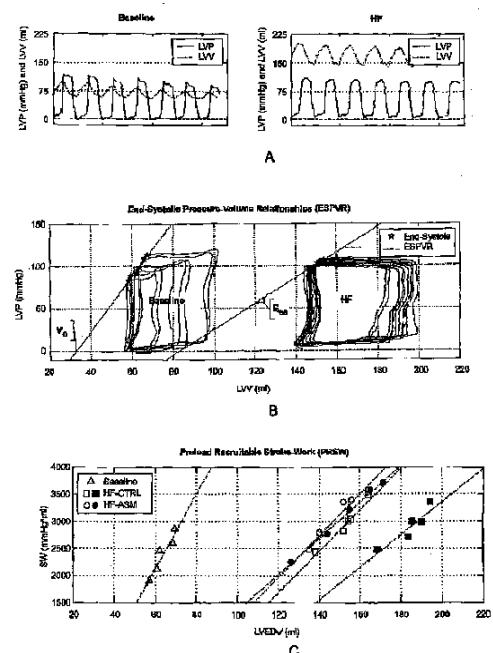
(71) 出願人 507040068
 マイティジェン、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 2 9, チャールズタウン, チャール
 ズタウン ネイビー ヤード, 1 3 ティ
 一エイチ ストリート - 9 6
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】心疾患の患者における補助治療としての細胞性心筋形成術

(57) 【要約】

本発明は、細胞性心筋形成術を用いた、「bridge to recovery(回復への橋渡し)」としての、心疾患を治療するためのシステムを提供する。システムは、冠動脈疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、および虚血による障害心筋を有する患者を選定し、治療するのに特に有用である。患者は、さまざまな臨床的基準に基づいて選定され、患者の心機能を改善するために、細胞性心筋形成術を用いて任意で治療される。心筋形成術は、薬物治療または左心室補助装置などの他の治療と併用されてもよい。望ましくは、細胞性心筋形成術は、バイパス移植術または心移植などの侵襲的手術の必要性を解消する。本発明は、本発明の方法を用いた患者の選定および治療に用いられるキットも提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

心疾患を有する患者を治療する方法であって、
左心室補助装置を用いて、心疾患に罹患している患者を治療するステップと、
細胞性心筋形成術を用いて、前記患者を治療するステップと、
を含む、心疾患を有する患者を治療する方法。

【請求項 2】

前記左心室補助装置を取り外すステップをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

細胞性心筋形成術を用いて前記患者を治療する前記ステップは、該患者の心臓への細胞の投与を含む、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 4】

前記細胞は、骨格筋芽細胞、胎児心筋細胞、胚幹細胞、および骨髄肝細胞から成る群から選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞は、自己骨格筋芽細胞である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

細胞性心筋形成術を用いて前記患者を治療する前記ステップは、左心室補助装置を用いて該患者が治療される前または最中に実施される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記患者は、急性心疾患に罹患している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記患者は、慢性心疾患に罹患している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記心疾患は、冠動脈疾患、心臓弁疾患、心筋炎、心不全、拡張型虚血性心不全、うつ血性心不全、心筋症、拡張型心筋症、心筋梗塞から成る群から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記投与される細胞の数は、細胞数 1×10^6 から 10×10^9 の範囲である、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 11】

前記投与される細胞の数は、細胞数 1×10^7 から 10×10^9 の範囲である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞は、90%を超えて生存している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞は、90%を超えて純粋な骨格筋芽細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞は、80%を超えて純粋な骨格筋芽細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施される少なくとも 1 週間後に終了される、請求項 1 記載の方法。 40

【請求項 16】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施される少なくとも 4 週間後に終了される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施される少なくとも 8 週間後に終了される、請求項 1 記載 50

の方法。

【請求項 18】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施された少なくとも 6 ヶ月後に終了される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 19】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施される少なくとも 12 ヶ月後に終了される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 20】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施される少なくとも 18 ヶ月後に終了される、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 21】

左心室補助装置により前記患者を治療する前記ステップは、細胞性心筋形成術により該患者を治療する前記ステップが実施される少なくとも 24 ヶ月後に終了される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 22】

細胞性心筋形成術による治療の対象となる患者を選定する方法であって、年齢、駆出率、冠動脈狭窄の数と割合、既往歴、心筋酵素値、血圧、コレステロール値、EKG、心拍出量、運動負荷試験の結果、ホルター心電図、慢性または急性心疾患、および尿検査から成る群から選択される任意の基準に基づいて、心疾患に罹患している患者を選定するステップを含む方法。

20

【請求項 23】

前記患者の心臓への細胞の投与をさらに含む、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

前記患者は、急性心疾患に罹患している、請求項 22 記載の方法。

【請求項 25】

前記患者は、慢性心疾患に罹患している、請求項 22 記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、35 U.S.C. § 119(e) の下で、2005年5月9日に出願された米国仮特許出願第60/678,976号に対する優先権を主張する。米国仮特許出願第60/678,976号は、本明細書中に参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

過去 30 年にわたる心疾患治療の飛躍的な進歩にかかわらず、西欧諸国において、冠動脈疾患 (CAD) は依然として主な死亡原因としてとどまっている (「Mortality from coronary heart disease and acute myocardial infarction」、Morbidity & Mortality Weekly Report, 50:90-93, 2001 年。参照により、本開示に含まれる)。さらに具体的には、予防措置および「機械的」血行再建術 (血管形成術およびバイパス手術) は、かかる療法の候補である個人に、80% を超える 5 年生存率をもたらしたが、冠疾患がびまん性、閉塞性疾患、および / または梗塞に進行してしまうと、治療の選択肢は依然として限られている (American Heart Association, Heart and Stroke Statistical Update, 2003 年。参照により本開示に含まれる)。このような進行した冠動脈疾患有する個人の 2 年生存率は、20% という低いものである (Anyangunwula, 「Pr

40

50

ognosis after heart transplantation: transplants alone cannot be the solution for end stage heart failure」、BMJ 326:509-510、2003年。参照により本開示に含まれる)。

【0003】

毎年、ほぼ110万人の米国人が急性心筋梗塞に罹患している(American Heart Association、Heart and Stroke Statistical Update、2003年。参照により本開示に含まれる)。早期介入は、梗塞面積を制限し、初期生存を向上させる(Mitchellら、「Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape」、J Am Coll Cardiol 19:1136-44、1992年; Migrinoら、「End-systolic volume index at 90 and 180 minutes into reperfusion therapy for acute myocardial infarction is a strong predictor of early and late mortality」、Circulation 96:116-121、1997年; Boyleら、「Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion. Study of time course and mechanism in a rat model」、Circulation 88:2872-83、1993年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。しかし、急性心筋梗塞を克服する患者の20%は、60mL/m²を下回る左室収縮末期容積指数(LVESVI)を伴う、著しい左室拡張を発現する。GUSTO I試験(Migrinoら、「End-systolic volume index at 90 and 180 minutes into reperfusion therapy for acute myocardial infarction is a strong predictor of early and late mortality」、Circulation 96:116-121、1997。参照により本開示に含まれる)は、心筋梗塞後の左室拡張は、死亡の重大かつ独立した予測因子であること実証した。したがって、心筋梗塞後の初期生存は、適切な再灌流療法の適時性および妥当性により予測できる可能性があるが、長期予後は左室の形態と機能の変化に大きく左右される。これらはうっ血性心不全の決定因子である(Mitchellら、「Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape」、J Am Coll Cardiol 19:1136-44、1992年; Gheorghiaideら、「Chronic heart failure in the United States, a manifestation of coronary artery disease」、Circulation 97:282-89、1998年; Whiteら、「Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction」、Circulation 76(1):44-51、1987年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。

【0004】

急性心筋梗塞に起因することがあるうっ血性心不全(CHF)には、現在500万人を超える米国人が冒されている(National Heart Lung and Bl

10

20

30

40

50

ood Institute National Institutes of Health Data Fact Sheet: congestive heart failure in the United States: A new epidemic、NHLBIウェブサイト。

www/nhlbi.nih.gov/health/public/heart/other/chf.htm; O'Connellら、「Economic impact of heart failure in the United States: time for a different approach」、J. Heart Lung Transplant. 13: S107-S112、1994年。これらはそれぞれ参考により本開示に含まれる)。医学療法は、進歩はあったものの、もっとも重度の末期CHFの患者に、未だ<50%の1年生存しかもたらさない(Roseら、「Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure」、NEJM 345(20): 1435-43、2001年。参考により本開示に含まれる)。その臨床効果にもかかわらず、心臓移植は心不全と闘う上で免疫学的意義がほとんどない療法である(Taylorら、「The registry of the international society of heart and lung transplantation: 20th official adult heart transplant report - 2003」、J. Heart Lung Transplant. 22(6): 616-624、2003年。参考により本開示に含まれる)。その結果、梗塞を起こした心筋の修復および再生のための細胞ベースの療法は、慢性心不全に罹患した患者を治療するために提案されてきた(Chiuら、「Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation」、Ann. Thor. Surg. 60: 12-8、1995年; Paganisら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischaemically damaged myocardium in humans」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 879-888、2003年; Ghostineら「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 106 [suppl I]: I131-6、2002年; Dorfmanら、「Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation」、J. Thor. Cardiovasc. Surg. 116: 744-51、1988年; Taylorら、「Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation」、Nat. Med. 4(8): 929-33、1998年; Reuertosら、「Angiogenic pre-treatment improves the efficacy of cellular cardiomyoplasty performed with fetal cardiomyocyte implantation」、J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 127: 1-11、2004年; Jainら、「Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103: 1920-27、2001年; Reineckeら、「Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells」、Circ. Res. 94(6): e56-60、2004年; McConellら、「Correlation of autologous skeletal

10

20

30

40

50

myoblast survival with changes in left ventricular remodeling in dilated ischemic heart failure」、*J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*、2004年(印刷中); Kesslerら、「Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications」、*Annu. Rev. Physiol.* 61: 219-42、1999年; Yooら、「Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters」、*Circulation* 102(19 Suppl 3): III204-9、2000年; 10 Kohら、「Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs」、*J. Clin. Invest.* 96(4): 2034-42、1995年; Kluगら、「Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts」、*J. Clin. Invest.* 98(1): 216-24、1996年; Jacksonら、「Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells」、*J. Clin. Invest.* 107(11): 1395-402、2001年; 20 Kocherら、「Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function」、*Nature Medicine* 7: 430-436、2001年; Kamihataら、「Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines」、*Circulation* 104: 1046-1052、2001年; Orlicら、「Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice」、*Ann. NY Acad. Sci.* 938: 221-9、discussion 229-30、2001年; Orlicら、「Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (98): 10344-9、2001年; Balsamら、「Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium」、*Nature* 428(6983): 668-73、2004年; Reineckeら、「Taking the toll after cardiomyocyte grafting: a reminder of the importance of quantitative biology」、*J. Mol. Cell. Card.* 34: 251-253、2002年; Perinら、「Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure」、*Circulation* 107: 2294-2302、2003年; 30 Tseら、「Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone ma 40

rrrow mononuclear cell implantations」、*Lancet* 361:47-49、2003年；Kamihataら、「Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines」、*Circulation* 104:1046-1052、2001年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）。機能および形態の回復を促進するための血管形成、脈管形成、および／または筋形成を目的に、未熟細胞が心筋機能障害の主要部に移植される。残念ながら、現在のヒトの臨床試験の結果は、移植細胞の生存数が、通常<1%の自己筋芽細胞生着と、非常に少ないことを示している（Paganiniら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans」、*J Am Coll Cardiol* 41:879-888、2003年。参照により本開示に含まれる）。このように細胞の生存および生着率が低い理由はわかっていない。

【0005】

細胞移入は、（1）瘢痕化した心筋を収縮筋細胞によって「再増殖」させ、（2）菲薄化した損傷心室のさらなるリモデリングを抑えるために「足場」を提供し、および／または（3）虚血心筋の血管形成刺激の媒体としての機能を果たすことにより、心筋梗塞の状態において心機能の再生を提供するための考えである（Scorsiniら、「Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function」、*J Thorac Cardiovasc Surg* 119:1169-75、2000年；Jainら、「Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、*Circulation* 103:1920-1927、2001年；Suzukiら、「Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery」、*Circulation* 102 [suppl III]: III-359-III-364、2000年；Orlicら、「Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium」、*Nature* 410:701-704、2001年；Wangら、「Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential」、*J Thorac Cardiovasc Surg* 120:999-1006、2000年；Tomitaら、「Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function」、*Circulation* 100 [suppl II]: II-247-II-256、1999年；Reineckeら、「Survival, Integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts」、*Circulation* 100:193-202、1999年；Sakaiら、「Cardiotoracic transplantation. Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types」、*J Thorac Cardiovasc Surg* 118:715-25、1999年；Chedrawyら、「Incorporation and integration of

10

20

30

40

50

implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements」、J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 124: 584-90、2002年; Klugら、「Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts」、J. Clin. Invest. 98: 216-224、1996年; Atkinsら、「Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ」、Ann. Thorac. Surg. 67: 124-9、1999年; Leorら、「Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium?」、Circulation 94 [suppl II]: II-332-II-336、1996年; Zhangら、「Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies」、J. Mol. Cell. Cardiol. 33: 907-921、2001年; Liら、「Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue」、Circulation 96 [suppl II]: II-179-II-187、1997年; Taylorら、「Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation」、Nature Medicine 4: 929-933、1998年; Menasche、「Cell therapy of heart failure」、C R Biologies 325: 731-738、2002年; Ohら、「Cardiac progenitors from adult myocardium: homing, differentiation and fusion after infarction」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12313-18、2003年; Teradaら、「Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion」、Nature 416: 542-5、2002年; Yingら、「Changing potency by spontaneous fusion」、Nature 416: 545-8、2002年4月4日。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。細胞性心筋形成術(CCM)の推定的有効性に関連があるとすれば、これらのうちどの機序が関連するのかは未知である。これに關し、通常は極度に効率の悪い(<10%)、観察された細胞の心筋瘢痕部への生着は、動物実験後に指摘された、比較的限定された心室機能の改善を説明する可能性があるものとして挙げられており(Paganiら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans: Histological analysis of cell survival and differentiation」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 879-88、2003年; Matsushitaら、「Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction」、Circulation 100 [suppl II]: I-262-II-268、1999年; Kehatら、「Human embryon

ic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes」、J. Clin. Invest. 108: 407-414、2001年；Bohelerら、「Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes」、Circ. Res. 91: 189-201、2002年；Tomaら、「Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart」、Circulation 105: 93-98、2002年；Tambaraら、「Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers」、Circulation 108 [suppl II]: II-259-II-263、2003年；Minamiら、「Skeletal muscle meets cardiac muscle」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 1084-6、2003年；Gostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 100 [suppl I]: I-131-I-136、2002年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）、また移植細胞の、血管形成の一時的なメディエータとしての潜在的役割ではない、心筋瘢痕における持続的な物理的存在について疑念を呼び起して（Scorsinら、「Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function」、J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 119: 1169-75、2000年；Reineckeら、「Survival, Integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts」、Circulation 100: 193-202、1999年；Zhangら、「Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies」、J. Mol. Cell. Cardiol. 33: 907-921、2001年；Menasche、「Cell therapy of heart failure」、C. R. Biologies 325: 731-738、2002年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）。また、CCMの有効性は、幹細胞の分化を機能的な心筋細胞に関連させるために理想化されてきたが、そのような分化の証拠は、潜在的に発生する移植された幹細胞と宿主筋細胞との細胞融合により交絡されてきた可能性がある（Ohら、「Cardiac progenitors from adult myocardium: homing, differentiation and fusion after infarction」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 12313-18、2003年；Teradaら、「Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion」、Nature 4

16: 542-5、2002年；Yingら、「Changing potency by spontaneous fusion」、Nature 416: 545-48、2002年4月4日。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）。しかし骨格筋芽

10

20

30

40

50

細胞移植は、心筋形成術の研究において、線維芽細胞移植に優る機能的利点を提供することが実証されてきている（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）。

【非特許文献1】Scorsinら、「Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function」、J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 119:1169-75、2000年

【非特許文献2】Jainら、「Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103:1920-1927、2001年

【非特許文献3】Sakaiら、「Cardiothoracic transplantation. Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types」、J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715-25、1999年

【非特許文献4】Taylorら、「Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation」Nature Medicine 4:929-933、1998年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

心疾患を治療するための細胞性心筋形成術の使用と、この分野でなされた進歩とを考慮すると、細胞性心筋形成術用いての心臓組織の損傷を治療する必要性が残されている。また、最近この治療が出現したことを考慮すると、さまざまなタイプおよび重症度の心疾患に罹患した患者の治療において、どうすればこの治療方法を最善の形で用いることができるのか、という問題が残されている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

（発明の要旨）

本発明は、細胞移植が、損傷した心臓を回復させ、心移植またはその他のさらなる療法が遅延あるいは回避するのに役立つという認識に端を発する。特定の実施例では、本発明は、細胞性心筋形成術の候補としての心疾患患者の選定を伴い、および／または選定された患者の疾患の管理に、細胞性心筋形成術がどのように用いられるべきかを判断する。本発明は、さまざまな原因論、重症度、予後など（虚血性心疾患、うっ血性心不全、急性または慢性心疾患、心原性ショックなど）を有するものを含む広範な心疾患に罹患している患者の治療において、細胞性心筋形成術を提供する。本発明は、細胞性心筋形成術は、患者によっては「destination therapy（最終治療）」あるいは「bridge to recovery（回復への橋渡し）」であってよいという認識を含む。

【0008】

1つの側面では、細胞性心筋形成術は、「bridge to recovery（回復への橋渡し）」として用いられてよい。心機能を改善するために、患者の心臓には骨格筋芽細胞などの細胞が移植される。細胞性心筋形成術は、単独で、あるいは左心室補助装置、心臓外科手術、移植、または薬物治療など、他の治療様式と併用して用いられてよい。特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、心臓手術または同所性心移植などの侵襲的処置の必要性を解消してよい。細胞性心筋形成術は、たとえば心臓のリモデリングを逆行、予防、または軽減させるなど、心機能を改善する。特定の実施例では、細胞性心筋形成術

10

20

30

40

50

は、患者が心移植まで生存できるよう、LV拡張を予防、および／またはLVサイズを減少させる（左室収縮末期指数（LVESI）を約60mL/m²に維持するなど）。特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、心機能の改善を提供し、それにより患者の入院の必要性がなくなったり、入院期間が短縮されたり、または再入院の必要性が低減されたりする。特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、細胞性心筋形成術を受けていない患者のものと比較して、より質の高い生活を提供する。特定の実施例では、細胞性心筋形成術により治療された患者の死亡率は低下する。

【0009】

本発明は、特定の臨床的基準に基づき、細胞性心筋形成術の候補となる患者を選定する方法も提供する。この方法は、細胞性心筋形成術による、「bridge to recovery（回復への橋渡し）」としての治療の対象となる患者を選定する方法も提供する。患者がかかる治療の候補であるかどうかを判断するために用いられる基準には、駆出率（左室駆出率など）、左室収縮末期容積指数、左室拡張末期容量指数、心拍出量、血圧、負荷テスト、心エコー検査またはその他の心臓画像法、EKGなどが含まれてよい。特定の実施例では、細胞性心筋形成術に選定される患者は、びまん性虚血性心疾患に罹患している。別の特定の実施例では、患者は例えば心筋梗塞の後などの、心原性ショックに陥っていてよい。特定の実施例では、患者は心術後ショックに陥っている、またはその危険性がある。別の実施例では、患者は心筋炎に罹患している。さらに別の実施例では、患者は心筋症に罹患している。特定の実施例では、患者は心臓移植に失敗している、または失敗しつつある。別の実施例では、細胞性心筋形成術の対象に選定される患者は、心臓移植の候補ではない。さらに別の実施例では、患者は冠動脈バイパス移植術などの心臓手術の候補ではない。特定の実施例では、選択された患者は軽度の心疾患に罹患しており、細胞性心筋形成術および薬物治療により管理することができる。特定の実施例では、選択された患者は急性心疾患に罹患している。別の実施例では、選択された患者は慢性心疾患に罹患している。

10

20

30

40

【0010】

細胞性心筋形成術の候補としての患者が選定されると、細胞は、患者の心臓に任意で移植される。細胞性心筋形成術を実施するためのあらゆる手法が用いられてよい。特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、米国特許出願第USSN60/666,932号（2005年3月31日申請）の、名称「Treatment for Heart Disease」（参照により本開示に含まれる）に記載されるように、血管形成促進療法と併用される。本発明の方法に用いられる細胞は、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞、心筋細胞、胎児心筋細胞、胚幹細胞、線維芽細胞、胚幹細胞、および成人骨髄由来幹細胞を含んでよい。特定の実施例では、骨格筋芽細胞が用いられる。別の特定の実施例では、間葉系幹細胞が患者の心臓に移植される。使用される細胞は、人工的に改変されていてよい。細胞は、例えば直接心外膜注射によるもの、またはカテーテルでの心外膜供給によるものなど（2005年3月4日申請の米国特許出願第USSN60/658,887号に記載されるが、これは参照により本開示に含まれる）を含むいかなる手段で供給されてもよい。細胞は、外科的処置の最中に供給されてよい。細胞は、複数回投与されてよい。例えば細胞は、LVAD設置またはその他の侵襲的処置時に心外膜注射により投与され、その後カテーテルを用いて投与されてよい。特定の実施例では、サイドポート針を用いて細胞を移植する（2003年8月6日出願の米国特許出願第USSN10/635,212号に記載されるが、これは参照により本開示に含まれる）。

50

【0011】

本発明は、「bridge to recovery（回復への橋渡し）」としての心筋形成術の候補である患者を選定および治療する方法をともに提供する。治療の対象となる患者が選ばれると、患者の心疾患を治療するために、心臓、特に心臓の障害のある部分に細胞を供給するあらゆる手法を用いてよい。本発明は、「bridge to recovery（回復への橋渡し）」として患者を選定、治療する際に有用であってよいキット（診断キット、治療キットなど）、試薬、ソフトウェア、細胞組成物、医療装置なども

50

含む。

【0012】

定義

血管形成とは、新生血管（毛細血管など）の形成を指す。特に本発明で使用される血管形成は、細胞が移植された、または移植される予定の心臓組織における新生血管の形成を指す。特定の実施例では、細胞が虚血領域に移植され、血管形成が増進される。血管形成は、例えば細胞移植の実施の結果として、虚血の結果として、および／またはVEGFなどの血管新生促進因子の投与の結果として発生する。

【0013】

心機能不全に特徴付けられる心臓障害または疾患は、慢性、急性に関わらず、正常な心機能の傷害または不在、あるいは異常な心機能の存在を含む。異常な心機能は、病気、損傷、および／または加齢によるものの場合がある。ここで使用される異常な心機能には、心筋細胞、心筋細胞の数、心臓組織、心筋、心内膜、心外膜、心臓の部分（左心室、右心室、左心房、右心房、中隔、伝導系など）、または心臓自体の形態学的および／または機能的異常が含まれる。形態学的および／または機能的異常の例としては、心筋細胞の物理的劣化および／または死、心筋細胞の異常な成長パターン、心筋細胞間の物理的接続の異常、心筋細胞による1つあるいは複数の物質の産生不足または過剰、心筋細胞が健康な心筋細胞により産生される1つあるいは複数の物質を産生しない、また異常なパターンでまたは異常な時期に電気的刺激を伝達する、運動異常、駆出率の減少、心エコー検査で観察される変化（拡張など）、EKGの変化、運動耐容の変化、毛細血管血流の低下、および血管造影で観察される変化などが挙げられるが、これらに限定されない。異常な心機能は、例えば狭心症、心筋梗塞、慢性虚血性心疾患などの虚血性心疾患、高血圧性心疾患、肺性心疾患（肺性心）、リウマチ熱、僧帽弁逸脱、僧帽弁輪石灰化などの心臓弁疾患、カルチノイド心疾患、感染性心内膜炎、先天性心疾患、心筋炎、拡張型心筋症、高血圧性心筋症などの心筋症、うっ血性心不全を引き起こす心傷害、および原発性肉腫や二次性腫瘍などの心臓腫瘍などの多くの傷害を伴って現れる。

【0014】

～に由来するとは、試料または対象から得られた細胞、あるいは試料または対象から得られた細胞の後代または子孫の細胞を指す。1つの細胞株に由来する細胞は、その細胞株のメンバー、あるいはその細胞株のメンバーである細胞の後代または子孫である。臓器、組織、個人、細胞株などに由来する細胞は、採取したあとにインビトロで修正してよい。例えば細胞は、関心のある遺伝子を発現するよう作り変えてよい。そのような細胞でも、その由来から由来するとみなされる。

【0015】

生着するとは、移植された筋細胞または筋細胞組成物が、移植された筋細胞の被移植者心臓への直接の付着の有無に関わらず（形成デスマソームまたはギャップ結合などによって）、心臓組織に組み込まれることである。特定の実施例では、細胞は、例えば心拍出量を増加させたり、あるいは心機能の低下を予防または減速したりすることによって、新機能を向上させる。別の実施例では、生着は、損傷した心臓のリモデリングを防止するための足場を提供してよい。別の実施例では、生着は、血管形成を刺激してよい。特定の実施例では、生着は、移植された細胞の心臓における生存を指す。

【0016】

心臓内の細胞生存、筋芽細胞生存、または線維芽細胞生存とは、（1）細胞、筋芽細胞、または線維芽細胞自体の生存、（2）細胞、筋芽細胞、または線維芽細胞が分化される細胞の生存、（3）細胞、筋芽細胞、または線維芽細胞の後代の生存、（4）融合産物（細胞、筋芽細胞、または線維芽細胞が融合する細胞）の生存のいずれか、またはこれらの組み合わせを指す。

【0017】

心筋虚血とは、心筋虚血性障害を引き起こす、心臓またはその一部への酸素流量の不足を指す。ここで使用される心筋虚血性障害というフレーズは、心筋への血流の低下に起因

10

20

30

40

50

する傷害を含む。心筋虚血および心筋虚血性障害の原因の例としては、大動脈拡張期血圧の低下、心室内圧および心筋収縮の上昇、冠動脈狭窄（冠動脈結紮、固定冠動脈狭窄、急性プラーク変化（崩壊、出血など）、冠動脈血栓症、血管収縮など）、大動脈弁狭窄および逆流、右心房圧の上昇が含まれるが、これらに限定されない。心筋虚血および心筋虚血性障害の有害作用の例としては、筋細胞損傷（筋細胞消失、筋細胞肥大、筋細胞過敏性）、狭心症（安定狭心症、異型狭心症、不安定狭心症、突然心臓死）、心筋梗塞、およびうつ血性心不全が含まれるが、これらに限定されない。心筋虚血による障害は、急性または慢性であってよく、結果には瘢痕形成、心臓リモデリング、心臓肥大、壁菲薄化、拡張、および関連する機能変化が含まれてよい。急性または慢性心筋障害および／または心筋虚血の存在と原因論は、当業者に周知のさまざまな方法および手法を用いて診断されてよいが、これには例えば、非侵襲性画像診断（MRI、心エコー検査など）、血管造影法、ストレス試験、心筋トロポニンなどの心筋特異的なタンパク質のアッセイ、臨床症状の評価などが含まれる。これらの方法および手法、また他の適切な手法は、どの対象がここに記載される治療方法に適した候補であるかを判断するために用いられてよい。

10

【0018】

ペプチドまたはタンパク質は、ペプチド（アミド）結合によって互いに結合する少なくとも3本のアミノ酸の鎖を備える。「ペプチド」という用語は、個々のペプチドまたはペプチドの集合を指してよい。発明のペプチドは、多くの場合天然アミノ酸のみを含有するが、非天然アミノ酸（自然に発生したのではないが、ポリペプチド鎖に組み込まれることが可能な化合物）、および／または当業者には既知のアミノ酸類似体を代替的に採用してよい。また、発明のペプチドにおける1つ以上のアミノ酸は、例えば炭水化物基、リン酸基、ファルネシリ基、イソファルネシリ基、脂肪酸基、接合のためのリンカーなどの化学物質の添加、官能基化、またはその他の修飾などにより、変更されてよい。

20

【0019】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、少なくとも3つのヌクレオチドのポリマーを指す。ポリマーは、天然ヌクレオチド（アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン）、ヌクレオチド類似体（2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、C5-プロピニル-シチジン、C5-ブロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-メチルシチジン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、および2-チオシチジンなど）、化学的に修飾された塩基、生物的に修飾された塩基（メチル化塩基など）、挿入塩基、修飾糖（2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソースなど）、または修飾リン酸基（ホスホロチオエートおよび5'-N-ホスホラミダイト連鎖など）を含んでよい。

30

【0020】

小分子とは、非ペプチド性、非オリゴマー性有機化合物を指す。特定の実施例では、小分子は、実験室における全合成、部分合成、または半合成によって合成される。別の実施例では、小分子は自然界に見られるものである。ここで使用される小分子は、「天然物様」化合物を指すことができるが、「小分子」という用語は「天然物様」化合物に限定されない。さらに正確には、小分子は通常、いくつかの炭素-炭素結合を含み、また1500を下回る分子量を有することに特徴付けられるが、この特徴付けは本発明の目的を制限することを意図しない。

40

【0021】

骨格筋芽細胞および骨格筋芽細胞は、筋管および骨格筋纖維の前駆体を指す。骨格筋芽細胞という用語は、骨格筋中の筋纖維と密接に関わる衛星細胞、単核細胞も含む。衛星細胞は、骨格筋筋原線維の基底膜付近に位置し、筋原線維に分化できる。前述のように、骨格筋芽細胞を備える発明の組成物のいくつかは、検出可能な筋管および筋纖維が欠如している。心筋細胞という用語は、心筋に由来する筋肉細胞を含む。このような細胞は、1つ

50

の細胞核を有し、心臓に存在する場合は、介在板構造により結合される。

【0022】

幹細胞は、正しい条件下で、さらに分化した細胞を生じさせるあらゆる多能性細胞を指す。幹細胞は、複数の型の分化した細胞に分化することができてよい。本発明に従って使用されてよい幹細胞には、間葉、筋肉、心筋、骨格筋、胎児幹細胞、および胚幹細胞が含まれる。本発明で有用な幹細胞は、心筋細胞、または心臓で通常見られるその他の細胞を生じさせる。幹細胞は、(1)自己更新する(2)さらに分化した細胞を生じさせる、というその能力により特徴付けることもできる。これは、運動的定義と言われている。

【0023】

ここで使用される治療するとは、心筋障害または機能障害の少なくとも1つの有害作用または症状を低減する、あるいは緩和することを指す。この用語は特に、心筋虚血、心筋虚血性障害、心臓障害、または心機能不全に特徴付けられる疾患の治療に適用される。心疾患の有害作用または症状は、多数あり、よく特徴付けられている。心疾患の有害作用または症状の例としては、呼吸困難、胸痛、動悸、眩暈、失神、浮腫、チアノーゼ、蒼白、倦怠、および死亡が含まれるが、これらに限定されない。多種の心疾患の有害作用または症状のさらなる例としては、Robbinsら(1984年)、Pathological Basis of Disease(W.B.Saunders Company、フィラデルフィア州)、547-609; Schroederら編集(1992年)、Current Medical Diagnosis & Treatment(Altelon & Lange、コネチカット州)、257-356を参照されたい。

10

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明は、細胞性心筋形成術を用いて、心疾患に罹患した患者を選定し、任意に治療するためのシステムを提供する。1つの実施例では、本発明は、「bridge to recovery(回復への橋渡し)」として、あるいは「destination therapy(最終治療)」として、心疾患に罹患した患者を選定および治療する方法を提供する。心室補助装置が移植または回復への橋渡しであると考えられてきたのとほぼ同様に(Kheraniら、「Ventricular Assist Devices as a Bridge to Transplant or Recovery」、Cardiology 101:93-103、2004年; Honら、「Bridge to Recovery with the Use of Left Ventricular Assist Device and Clenbuterol」、Ann. Thorac. Surg. 75:S36-41、2003年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)、心疾患の治療での高い成功を収めてきた細胞性心筋形成術の発達は、心疾患の管理において、これをbridge to recovery(回復への橋渡し)となるよう導いてきた。心疾患に罹患した患者に対する細胞性心筋形成術を用いての治療は、入院を減らし、再入院の必要性を減少させ、生活の質を向上させ、および/または死亡率と疾病率を低下させることができる。

【0025】

本発明のシステムは、心疾患に罹患したいかなる患者の介護を管理するのにも有用である。心疾患の例としては、心筋症、肥大型心筋症、拡張型心筋症、アテローム性動脈硬化、冠動脈疾患、虚血性心疾患、心筋炎、ウイルス感染、寄生虫感染、細菌感染、創傷、高血圧性心筋症、心臓弁膜症、先天性心疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、不整脈、心原性ショック、心術後ショック、心臓移植失敗、末期心不全などが含まれるが、これらに限定されない。本発明のシステムは、収縮性の欠如(駆出率の低下により示される可能性があるものなど)など、心臓組織への傷害を伴う心臓疾患に罹患した患者を選定し、治療するのに有用である。本発明のシステムは、虚血に起因する心臓の損傷を伴う心臓疾患に罹患した患者を選定し、治療するのに有用である。発明のシステムは、心原性ショック、心筋炎、または心筋症に罹患した患者を選定し、治療するのに有用である。発明のシステムは、心臓移植に失敗した、あるいは失敗しつつある患者の治療に用いられてもよい。本発明

40

50

のシステムは、心臓移植のリストに載っている患者の治療に用いられてもよい。患者は、慢性心疾患または急性心疾患に罹患していてよい。心疾患を有するあらゆる患者は、細胞性心筋形成術を用いた診断および／または治療のための本発明のシステムの使用を検討されてよい。

【0026】

本発明のシステムは、ヒトの治療に限定されず、家畜またはペットを含むあらゆる動物の治療に使用することができる。本発明のシステムは、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヒツジ、および靈長類（類人猿、チンパンジー、サルなど）にも使用してよい。本発明のシステムは、心疾患、特に心臓の収縮性の欠如を伴う疾患、虚血性心疾患、または心臓のリモデリングを引き起こす疾患に罹患した動物の治療を提供する。

10

【0027】

患者は通常、治療する医師、看護士、医師助手、またはその他の医療専門家により、評価される。患者を細胞性心筋形成術を用いて治療するかどうかの決定は、治療する医師には明らかであろう任意の数の基準に基づいてよい。医療専門家に使用される基準は、患者の年齢、患者の状態、疾患の程度、疾患の種類、予後、患者のライフスタイル、身体検査、病歴、他の疾患（糖尿病、高コレステロール血症、不整脈など）、臨床的兆候（血圧、心拍数、脈拍など）、臨床症状（胸痛、息切れ、眩暈など）、医学的検査（心筋酵素、心エコー検査または他の画像検査、EKG、負荷テスト、血管造影など）、患者の他の疾患、心臓パラメータ（駆出率、心拍出量、左室収縮末期指数（LVEF）、心拍出量など）、心エコー検査、ホルター心電図、MRI、PET、尿検査などを含んでよい。例1は、細胞性心筋形成術を用いた「bridge to recovery（回復への橋渡し）」治療の対象となる患者を選定する際に使用してよいいくつかの基準を詳述している。治療する臨床医学者は、これらの基準を評価し、患者が本発明のシステムを使用した治療に適しているかどうかを判断する。特定の実施例では、患者がbridge to recovery（回復への橋渡し）療法としての細胞性心筋形成術の候補であるかどうか決定する際に、患者の心拍出量が判断される。

20

【0028】

特定の実施例では、患者は虚血性心疾患有する。特定の実施例では、患者はびまん性冠動脈疾患に罹患している。別の実施例では、患者は心筋梗塞に罹患したことがある。さらに別の実施例では、患者は血管形成術または冠動脈バイパス移植術などの侵襲的処置を受けたことがある。患者は、心筋梗塞またはその他の虚血性疾患のとの心臓リモデリングを予防または減少させるための治療に選定される。特定の学説にとらわれることを望まないが、細胞移植は、死んだまたは損傷した心筋の修復または交換を促進してよい。患者は、心拍出量を増加させるための治療に選定されてよい。

30

【0029】

特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、他の治療と併用される。例えば、細胞性心筋形成術は、薬物療法と併用されてよい。特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、選択的-2アゴニストであるクレンブテロールの投与と併用される。別の実施例では、細胞性心筋形成術は、心移植と併用される。ただし、特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、心移植以外の他の治療と併用される。細胞性心筋形成術は、左心室補助装置、バルーンポンプ、またはペースメーカーなどの心臓装置の使用と併せて用いられてよい。特定の実施例では、細胞性心筋形成術は、左心室補助装置と併用され、任意によりさらにクレンブテロールなどの薬物治療と併用される。患者が慢性心不全を再発せずに、安定した状態を保つのに十分なだけ正常な心機能が回復するまで、左心室補助装置の使用が継続される。回復およびさらなるサポートを伴うLVADの除去が予定される患者は、生活の質の改善、罹患率の低下、死亡率の低下、入院の減少、および／または再入院の必要性の低下につながる細胞性心筋形成術の利益を受けてよい。

40

【0030】

特定の実施例では、LVADのサポートからの脱却を保障するのに十分なほど回復していない患者でも、細胞性心筋形成術の利益を受けることができる。LVADを除去せずに

50

でも、細胞性心筋形成術により治療される患者は、入院、再入院、罹患率、および／または死亡率が減少し、心機能および生活の質の改善が見られる。そのため、これらの患者も細胞性心筋形成術の候補である。

【0031】

特定の実施例では、細胞性心筋形成術による治療は、細胞の移植と、血管新生促進因子（血管新生促進因子をコードするベクター）の投与との双方が伴う。この治療は、米国特許出願第U.S.S.N.60/666,932号、2005年3月31日申請、名称「Treatment for Heart Disease」にさらに詳しく記載されているが、これは参考により本開示に含まれる。特定の学説にとらわれることを望まないが、細胞性心筋形成術を血管新生促進因子の投与と組み合わせることにより、移植される細胞は、細胞性心筋形成術単独での治療と比較して、より高い生存率を有することが仮定される。血管新生促進因子（1つまたは複数）による治療は、移植細胞を受け入れる心臓の虚血、障害、または損傷部分における新生血管の発現につながる。細胞性心筋形成術と組み合わされた結果は、移植された細胞のより生存および生着率につながってよい。

10

【0032】

細胞性心筋形成術

患者が「bridge to recovery（回復への橋渡し）」としての細胞性心筋形成術を用いた治療に選定された場合は、その患者の心臓に細胞が移植される。細胞は、心機能を改善するために、心臓の疾患または損傷部分に移植される。本発明のシステムに有用な細胞には、患者の既存の心筋中で自ら増殖、生着することができる細胞が含まれる。本発明のシステムにおいて特に有用であると考えられる細胞には、筋芽細胞（骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞、胎児心筋細胞、胚幹細胞、および骨髄肝細胞が含まれる。特定の実施例では、骨格筋芽細胞が本発明のシステムにおいて用いられる。本発明のシステムにおいて有用な骨格筋芽細胞についてのより詳しい説明は、米国特許出願第U.S.S.N.60/145,894号、1999年7月23日申請；U.S.S.N.09/624,885号、2000年7月24日申請；およびU.S.S.N.10/105,035号、2002年3月21日申請（これらはそれぞれ参考により本開示に含まれる）を参照されたい。特定の実施例では、心筋細胞が本発明のシステムで用いられる（例として、米国特許第6,673,604号；6,491,912号；5,919,449号；公開米国特許出願第2003/0232431号；2003/0022367；2001/0053354号参照。これらはそれぞれ参考により本開示に含まれる）。特定の実施例では、投与される細胞は、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%純粋な細胞集団である。別の実施例では、純粋な細胞集団が調製され、心臓への投与前に任意で別の細胞型と混合される。上述の出願に記載されるように、骨格筋芽細胞またはその他の細胞集団の純度は、筋生検材料から、一定の条件下で、5～20倍加、望ましくは10～15倍加、あるいはさらに望ましくは11～12倍加により細胞を培養することにより得られてよい（Jainら、Circulation 103: 1920-1927、2000年を参照。参考により本開示に含まれる）。特定の実施例では、細胞は培養されない。別の実施例では、細胞は最小限に培養される。例えば細胞は、数分、数時間、または数日間、細胞培養皿に放置されたあと、非接着性細胞が除去される。特定の実施例では、細胞の全てまたはかなりの部分は、投与される前に細胞分裂していない。別の実施例では、細胞は1～2倍加、3～4倍加、4～5倍加、または5～10倍加がおこなわれている。骨格筋芽細胞の純度は、細胞上のCD56マーカーまたはその他のマーカーの存在によりテストされてよい。別の実施例では、細胞は幹細胞（幹細胞胚幹細胞、胎児幹細胞、成人由来幹細胞など）である。投与される細胞は、望ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%生存であり、さらに望ましくは90%または95%生存である。

20

30

40

【0033】

特定の実施例では、細胞は間葉系幹細胞、または間葉系幹細胞由来の細胞である。特定の実施例では、細胞は、幹細胞特性を獲得させるような方法で処理される。通常、細胞は

50

未熟または未分化であり、移植後に筋細胞に分化させる。特定の実施例では、間葉系幹細胞は、患者の骨髄から得られる。間葉系幹細胞は、胎児心筋細胞などの心筋細胞と共に培養されてよい。胎児心筋細胞との培養は、あらかじめ心筋細胞表現型へと分化した細胞を得るのに役立つ。特定の実施例では、幹細胞は心筋細胞と融合する。別の実施例では、この融合は回避される。特定の実施例では、細胞は全く培養されない、または上述のように最小限に培養される。

【0034】

本発明のシステムで使用される細胞は、あらゆる供給源から得ることができる。しかしながら、細胞は通常、拒絶問題が起きないよう、患者から採取される（自己移植）。細胞は、例えば患者の筋肉から、骨髄から、血液から、患者の胎児臍帯血からなど、採取されてよい。自己移植以外に、細胞は血縁者、MHC適合ドナー、同血液型のドナー、または同種のあらゆるドナーから得られてもよい。特定の実施例では、細胞の異種間提供が用いられる（異種間移植）。治療する医師には明らかであろうように、ドナー細胞が患者または血縁ドナーからのものでない場合、免疫抑制が要求されてよい。細胞は、免疫原性を低下させるために処理または修正されてもよい。例えば、細胞のMHCクラスI分子は、その免疫原性を制限するためにマスクされても、または修正されてもよい。

10

【0035】

一般的に、集団が本発明により有用となるために、集団の中の細胞の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%は生存であるべきである（トリパンブルー排除などの方法により判断される）。通常、投与直前の細胞生存率は、90%、95%、または98%を超える。投与される細胞数の範囲は、 1×10^4 ~ 1×10^{10} 細胞、または 1×10^5 ~ 1×10^9 細胞、または 1×10^6 ~ 1×10^8 細胞、または 1×10^6 ~ 1×10^{10} 細胞、または 1×10^7 ~ 1×10^8 細胞、または 1×10^8 ~ 1×10^9 細胞であってよい。細胞は1つの部位にあるいは複数の部位に注射されてよい（3 ~ 30部位など）。通常、1回の注射で1千万の細胞が投与される。投与される細胞の合計数は、損傷心臓組織の範囲による。細胞は通常、心筋の心内膜と心外膜の間の1 ~ 5 cmの距離にわたって注射される。

20

【0036】

本発明に使用される細胞は、遺伝子操作されていてよい。細胞は、当技術分野で知られるいかなる方法を用いて操作されてもよい。例えば、細胞のゲノムは永久的に改変されてよく、あるいは細胞は一時的にのみ遺伝子を発現するように改変されてもよい。特定の実施例では、細胞は、米国出願第USSN 60/666,932号、2005年3月31日申請、名称「Treatment for Heart Disease」に記載されているように、血管新生促進ペプチドまたはタンパク質を产生するよう遺伝子操作されている。特定の実施例では、少なくとも1つの血管新生促進因子を発現するよう操作された細胞の移植は、血管新生促進剤の投与および細胞の移植の双方を構成する。血管新生ペプチド/タンパク質は、移植された細胞で構成的に発現されてよく、あるいは特定の刺激により発現されてもよい。遺伝子発現を制御してよい特定の刺激には、低酸素症、栄養不良、成長因子の存在、pHの変化、老廃物の蓄積、細胞ストレスなどが含まれる。特定の実施例では、移植された本発明の細胞は、抗アポトーシス遺伝子を発現してよい。別の実施例では、細胞は、成長因子（塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）など）などの増殖を高めるための遺伝子を発現する、または発現するよう誘発されることが可能である。別の実施例では、心臓細胞表現型は、細胞中の心臓細胞遺伝子産物の発現により、細胞内で促進される。例えばGATA転写（GATA4、GATA6など）は、心臓細胞表現型を促進するために、発現されてよい。

30

【0037】

細胞は、当技術分野で知られる任意の方法で、損傷組織に供給される。細胞は、心臓手術中に供給されてよい。代替として、あるいは追加で、細胞はカテーテルを介して供給されてよい。細胞は通常、注射器と針を用いて損傷細胞に注射される。特定の実施例では、サイドポート針を用いて、細胞を組織に注射する（米国特許出願第USSN 60/401

40

50

, 449号、2002年8月6日申請、およびUSSN10/635, 212号、米国第2004/0191225号として公開、2003年8月6日申請、を参照。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。

【0038】

心臓の収縮する力のため、心筋の注射部位から流出する細胞数を制限する措置を講じることが望ましくてよい。例えば、注射部位に、針が除去されたあと数秒から数分間、圧力を付加することができる。代替として、または追加で、基質など粘度増強剤を、例えば注射前に細胞に混合された状態で使用してよい。基質は生体適合性ポリマー(セルロース、タンパク質、ポリエチレングリコール、ソルビトール、ポリ(乳酸-グリコール酸)など)、あるいはグリセロール、炭水化物など、その他の賦形剤であってよい。特定の実施例では、ポリマーは生分解性もある。いくつかの実施例では、ポリマーは生物基質(タンパク質、ECMタンパク質など)である。いくつかの実施例では、ポリマーはバイオゲルである。特定の実施例では、基質はCymetraである。別の特定の実施例では、基質は無細胞化真皮基質であり、望ましくは無細胞化真皮基質である。基質は、基底膜基質であってもよい。特定の実施例では、基質に血管新生促進因子が添加されてよい。基質は、血管形成促進因子の遅延放出(例えば、経時的におよび/または信号または環境刺激に反応して)を可能にするために選択することができる。別の実施例では、注射された細胞の流出を防ぐために、注射部位上にプラグ(ポリマープラグなど)または帶具(縫合糸など)を適用してよい。

【0039】

本発明の方法は、治療する医師による判断で繰り返されてよい。方法の一定のステップは繰り返されてよい。例えば、血管新生促進因子は繰り返し投与されてよく、あるいは細胞は繰り返し移植されてよく、またはその両方でもよい。患者の疾患および状態は、反復療法が必要とされる程度を判断する際に利用してよい。上述のように、本発明の方法は、血管形成術、冠動脈バイパス移植、左心室補助装置、薬物療法、ステント留置、心臓移植など、さらに従来の治療と併用してよい。

【0040】

本発明のシステムは、患者の心機能を改善し、心機能を安定させ、および/または心機能の低下を制限するよう意図されている。特定の実施例では、本発明のシステムは、心機能を駆出率、心拍出量、心拍出量、血圧などを含む任意の数のパラメータによる測定で、1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、200%、300%、400%、または500%改善させてよい。これらのパラメータは、心エコー検査、MRI、カテーテル検査、EKG、血液測定用カフ、パルス酸素濃度計などにより測定されてよい。特定の実施例では、心機能の改善は、運動負荷試験により測定されてよい。特定の実施例では、本発明のシステムは、特に心臓の虚血性損傷後の、心臓の拡張および/または衰弱を予防する。特定の実施例では、本発明のシステムは、左室収縮末期指数を50mL/m²を超えて、60mL/m²を超えて、または70mL/m²を超えて維持する。特定の実施例では、左室拡張は低下または安定化される。特定の実施例では、中隔乳頭短軸の長さが短縮される。特定の実施例では、本発明のシステムは、心臓移植などの他の治療が実施される前に、患者を安定させるために用いられる。望ましくは、患者の「bridge to recovery(回復への橋渡し)」治療は、患者がMIなどの心イベントの前に従っていたライフスタイルで生活することを可能とする結果をもたらす。例えば、患者は、心イベントの前と同じ距離を歩くことができ、同じ量の運動をおこなうことができる。特定の実施例では、患者は、入院、バイパス手術、血管形成術、ステント留置、または心移植をもはや必要としない。特定の実施例では、患者の死亡率は低下する。

【0041】

本発明のシステムは、他の治療様式と併用される。これらの他の治療には、薬物治療(例えば、血圧薬物治療、カルシウムチャンネル遮断剤、ジキタリス、不整脈治療剤、ACE阻害剤、抗凝血剤、免疫抑制剤、鎮痛剤、血管拡張剤など)、血管形成術、ステント留

10

20

30

40

50

置、冠動脈バイパス移植、心臓補助装置（左心室補助装置、バルーンポンプなど）、ペースメーカー設置、心臓移植などが含まれる。特定の実施例では、本発明のシステムは、心臓移植を受けるのを待っている患者に、回復への橋渡しを提供する。

【0042】

キット

本発明は、本発明のシステムの実践に有用なキットも提供する。キットは通常、発明の実践に有用な機器、器材、医薬品、生物製剤、試薬、医療装置、細胞などの任意の組み合わせを含む。キットの内容は、治療する医師、看護士、またはその他の医療関係者が使用するのに便利なように包装されている。キットの中の材料も、滅菌状態で包装されている。特定の実施例では、キットは、細胞、注射器、カテーテル、針（サイドポート針など）、媒体、緩衝剤、血管新生因子、血管新生因子発現のためのベクター（V E G F、またはその他の上述のあらゆる因子など）、アデノウイルスベクター、保存容器、バイアル、麻酔剤、消毒剤、使用説明書、ポリヌクレオチド、帶具、細胞を供給するための医薬的に許容される賦形剤、組織培養皿、酵素、抗体などのうちいくつか、または全てを含んでよい。

10

【0043】

特定の実施例では、キットは、「bridge to recovery（回復への橋渡し）」としての、細胞性心筋形成術による治療の対象となる患者を選定するために提供される。キットは、血液検査、尿検査などを含むさまざまなテストを実施するための試薬および用具を含んでよい。キットは、患者を選定するためのソフトウェアまたは説明書を含んでよい。キットは、患者が治療に選定された場合、患者を治療するための素材も含んでよい。

20

【0044】

特定の実施例では、キットは、患者から骨格筋芽細胞を採取し、細胞を精製し、細胞を増殖させるために提供される。かかるキットは、針、注射器、緩衝剤、細胞培養培地、血清、保存媒体、グリセロール、細胞培養皿、取扱説明書、およびその組み合わせのいずれかを含んでもよい。キットは、細胞を精製するための素材も含んでよい。キットは、得られた集団の純度を検出するための素材（細胞マーカーに対する抗体など）も含んでよい。

【0045】

別の実施例では、キットは治療方法を実践するために提供される。キットは、針、カテーテル、注射器、血管新生因子、血管新生因子発現のためのベクター、細胞を注射するための医薬的に許容される賦形剤、取扱説明書、およびその組み合わせのいずれかを含んでよい。特定の実施例では、キットは、V E G Fなどの精製された血管新生因子を含む。因子は、凍結乾燥粉末として提供されてよい。

30

【0046】

本発明は、上述とおりキットに含まれてよい他の素材および試薬も提供する。例えば発明は、本発明で有用なベクターおよびポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例では、ベクターは遺伝子操作されたアデノウイルスである。一部の特定の実施例では、ベクターは、感染した細胞におけるV E G Fの発現をもたらす遺伝子操作されたアデノウイルスである。ベクターは、血管新生因子の発現を制御するための制御配列を含んでもよい。例えば、血管新生因子の発現は、酸素欠乏、p Hの変化、老廃物の蓄積などを誘発されてよい。ベクターはベクターを複製および選択するための配列を含んでもよい。

40

【0047】

本発明は、本発明のシステムのための細胞も提供する。通常これらの細胞は、筋芽細胞（骨格筋芽細胞など）、胎児心筋細胞、胚幹細胞、および骨髄肝細胞である。特定の望ましい実施例では、細胞は骨格筋芽細胞である。細胞は、遺伝子操作されていてよい。特に細胞は、血管新生因子を発現するよう遺伝子操作されていてよい。別の場合、細胞は抗アポトーシス遺伝子を発現し、細胞がアポトーシスを起こすのを防いでよい。特定の実施例では、細胞は他の細胞から離して、または通常細胞とともに見られる他の成分から離して精製されてよい。

50

【0048】

本発明のこれらおよびその他の側面は、以下の例を検討することによりさらに理解されるであろう。これらの例は、本発明の一部の特定の実施例を例示することを目的とし、請求項に定義される要旨を制限することを意図しない。

【実施例】

【0049】

実施例1 - 自己骨格筋芽細胞生存と拡張型虚血性心不全における左室リモデリングの変化との相関

序論

自己骨格筋芽細胞(ASM)移植または心筋形成術は、複数の実験的研究において、心筋梗塞(MI)後的心機能を改善することが示されてきた(Chiulà、「Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation」、Ann. Thor. Surg. 60:12-18、1995年; Liら、「Cardiomyocyte transplantation improves heart function」、Ann. Thor. Surg. 62:654-61、1996年; Murrayら、「Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis」、J. Clin. Invest. 98:2512-23、1996年; Scorsinら、「Comparison of effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function」、J. Thor. Cardiovasc. Surg. 119:1169-75、2000年; Tambaraら、「Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers」、Circulation 108 [suppl II]: II-259-63、2003年; Taylorら、「Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation」、Nat. Med. 4(8):929-33、1998年; Jainら、「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103:1920-1927、2000年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。研究の大部分は、MIの小動物モデルにおいて実施されてきたが、大型動物モデルにおいても(Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 106 [suppl I]: I131-6、2002年。参照により本開示に含まれる)、また最初の患者試験においても、(Menascheら、「Myoblast transplantation for heart failure」、Lancet 357:279-80、2001年; Menascheら、「Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction」、J. Am. Coll. Cardiol. 41:1078-83、2003年; Paganisら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans」、J. Am. Coll. Cardiol. 41:879-888、2003年)。

10

20

30

40

50

年; Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、Ann. Thorac. Surg. 71: 844-851、2001年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)同様の改善が示されている。かかる機能の前向きの変化の背後にある機序は、成長する生着した骨格筋芽細が、その宿主心筋から電気機械的に分離されている(コネキシン43および/またはギャップ結合がみられないことから証明される)ことを考えると、依然としてあまり理解されていない(Scorsinら、「Comparison of effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function」、J Thor. Cardiovasc. Surg. 119: 1169-75、2000年; Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 106 [suppl I]: I 131-6、2002年; Menascheら、「Myoblast transplantation for heart failure」、Lancet 357: 279-80、2001年; Menascheら、「Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 1078-83、2003年; Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、Ann. Thorac. Surg. 71: 844-851、2001年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。さらに、臨床的ASM心筋形成術は、重度の虚血性心筋症にのみ適用されてきており、またさらに重要なことに、これは常に冠血行再建術および/または左心室補助装置(LVAD)の補助として実施されてきた(Paganiら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischaemia-damaged myocardium in humans」、J Am. Coll. Cardiol. 41: 879-888、2003年。参照により本開示に含まれる)。これらの併用療法により、心筋灌流、生存、および機能指数の改善は、ASM注射のみによるものとすることは難しい。

【0050】

さらに、増加する実験的証拠は、移植されたASM細胞の数と機能的/形態的影響が直接関連していることを示唆している(Tambaraら、「Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers」、Circulation 108 [suppl II]: II-259-63、2003; Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、Ann. Thorac. Surg. 71: 844-851、2001年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。例えば、Tambaraら(「Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers」、Circulation 108 [suppl II]: II-259-63、2003年。参照により本開示に含まれる)は、ラットに胎児由来ASMを使用し、心機能とリモデリングとともに用量依存的な形で影響されたことを実証している。しかしこれ

らの利益は、上昇した壁応力と変更された心筋の機械的エネルギー特性がASM生存、分化、そして最終的には機能的有効性に障害を生じさせる虚血性拡張型HFでは実証されていない。そのため、本研究の目的は、末期虚血性HFの動物モデル(LVEF < 35%およびLV収縮末期容量 > 80 ml/m²)へのASM移植後のLVリモデリングおよび機能を評価することであった。さらに研究は、これら同動物に注射されたASMの生存、分化、および整列を評価することも意図した。

【0051】

素材と方法

虚血性心不全モデル

実験的虚血性心不全は、Sabahら(「A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations」、Am. J. Physiol. 260: H1379-84、1991年。参照により本開示に含まれる)がイヌについて記載しているように、微細な変更を加えてヒツジにおいて作成された。端的に説明すると、連続および選択的な左冠動脈回旋枝(LCxA)微少塞栓術(1動物当たり2.9 ± 0.4注射)が、ポリスチレンビーズ(70 - 110 μm)を週ごとに、左室駆出率(LVEF)が2週連続して35%以下に維持されるまで注射することにより実施された。

【0052】

実験群

ヒツジのHF対照群(ベースライン)は、LCxA微少塞栓術およびHF誘発の2週間前に準備された(HF対照、N = 6)。ヒツジの移植群は、準備およびASMの注射の前にLCxA微少塞栓術およびHF誘発がおこなわれた(HF + ASM、N = 5)。研究は、覚醒した鎮静剤を与えられていない動物に対し、週ごとに6週間実施された。

【0053】

長期準備

全てのヒツジは、左開胸により準備された。左室(LV)ソリッドステート電子圧力トランステューサ(4.0または4.5 mm、Konigsberg、カリフォルニア州)がLVの心尖に設置され、大動脈、LV、および右室(RV)圧を監視するために、長期、ヘパリン化(1000 U/mL)液充填カテーテル(Tygon)が挿入された。6つの圧電性結晶(Sonometrics Inc.、カナダ、オンタリオ州ニューロンドン)が、LV心内膜の中隔乳頭レベル(短軸、SA)、LV基部、および心尖(長軸、LA)、またLV後外側の心筋中央(セグメント長、SLpost)に外科的に設置された。16 mmオクルーダ(In Vivo Metrics.、カリフォルニア州ヒールズバーグ)は、下大静脈(IVC)周囲に位置づけられた。全てのカテーテルおよびケーブルは動物の肩甲骨の間に位置するよう通された。

【0054】

血行動態計測および圧容積解析

大動脈、RV、およびLV液体充填カテーテルは、較正されたStatham圧力トランステューサ(型: P23XL; Biogeo-Spectramed、カリフォルニア州オックナード)に取り付けられ、増幅された(Gould、オハイオ州バレー)。電子LV圧力計は、LV液体充填カテーテルを使用して較正された。圧力波形を収集し(1 kHz)、16チャンネルのデータ収集およびソフトウェアシステム(FOX; EMKA Technologies、バージニア州フォールズチャーチ)で解析された。

【0055】

ソノメトリック信号は、波形の心周期依存(拡張末期および収縮末期)および独立(最低、最高、平均など)パラメータについて解析された。左室容積(ml)は、SAおよびLA径、および方程式: SA² * LA² / 6 / 1000、を用いてリアルタイムで計算された。左室容積指数も計算された: LV容積 * 体表面積(ml/m²)。下大静脈閉塞は、解析ソフトウェア(FOX、EMKA)によりオフラインで解析されるPV関係を

10

20

30

40

50

発生させるために実施された。

【0056】

左室仕事量は、圧容積面積 (PVA) を計算することにより、推定された (Todakら、「Characterizing ventricular mechanics and energetics following repeated coronary microembolizations」、Am. J. Physiol. 272: H186-94、1997年; Suga、「Ventricular Energetics」、Physiol. Rev. 70: 247-77、1990年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。

PVAは、オフラインのESPVR由来データから、LVの位置エネルギー (PE_{LV}) および一回仕事量 (SW_{LV}) として計算された。

$$PE_{LV} = \left(\frac{1}{2} [V_0 - LVESV] \times LVESP \right)$$

$$PVA = SW_{LV} + PE_{LV}$$

V₀：圧力ゼロでのLVの容積 (E_{es}の×切片)、LVESV：LV収縮末期容量 (mL)、およびLVESP：LV収縮末期圧

骨格筋生検材料および自己骨格筋芽細胞培養

骨格筋生検材料 (1~3グラム) は、HF+ASMヒツジへの最初微少塞栓術時にヒツジの左前肢から採取された。前肢筋肉が露出され、生検材料が、電気メスを避けて鋭的切開で取り出され、生検材料輸送培地を含む管に入れられ、Jainらにより記載されるもの (Jainら、「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103: 1920-1927、2000年。参照により本開示に含まれる) と同様のASMの調製と培養のため、GenVec, Inc (マサチューセッツ州チャールズタウン) に輸送された。

【0057】

全細胞は、移植前に11~12倍加のあいだ拡張され、低温保存される。筋芽細胞は解凍され、移植媒体に調製され、直接心筋に注射するために輸送された。筋芽細胞の純度は、抗NCAMmAb (CD56-PE、Clone MY-31、BD Biosciences、カリフォルニア州、サンディエゴ) に対する反応性により、また多核筋管への融合力により測定された。細胞生存率は、トリパンブルー排除により判断された。筋芽細胞は、ツベルクリン注射器 (~1.0 × 10⁸ 細胞 / mL) に装填され、4°Cで輸送された。移植時、細胞は徐々に室温にあたためられ、緩やかな攪拌により再懸濁され、それ以上操作せずに注射された。自己骨格筋芽細胞は、分節性のソノマイクロトリ結晶近接の、梗塞を起こした心筋の複数の部位に注射された。不慮の血管内または心室内への細胞の注入を回避するために、注射針は心外膜および心内膜表面から等距離の心筋中央へと3~4cmの距離にわたり通過させ、注射器に陰圧が付加され、血液が戻ってこなければ、針をゆっくりと引きながら細胞が注入された。注射後、針出口部の上に、数秒間わずかな圧力を付加し、細胞が針跡から流出するのを制限した。

【0058】

組織学的検査

研究の6週間後、各動物を安楽死させ、心臓を摘出して10%緩衝ホルマリンで灌流した。ASM注射を受ける塞栓心筋から組織片が作られた。標準方法を用いて、ヘマトキシリソ、エオシン、およびトリクロム染色が実施された。

【0059】

免疫組織化学的検査

成熟した移植片の表現型を確認するために、脱パラフィンされた切片が、心筋と反応しない抗ミオシン重鎖抗体、アルカリフィオスマターゼ結合MY-32mAb (Sigma、St Louis、ミズーリ州) により免疫組織化学的に染色された。切片は、BCIP-NBT (Zymed Lab Inc.、カリフォルニア州サンフランシスコ) で発

10

20

30

40

50

色させ、核の赤と対比染色された。さらに、コネキシン-43Ab (Chemicon、カリフォルニア州テメキュラ) および心筋特異的なトロポニンI (Chemicon) の染色もおこなわれた。

【0060】

筋芽細胞生存の推定

心臓は、寸法約2.5cm×2.5cm×3mmの断片に切り取られ、パラフィンで処理された。いくつかの例では断片全体が切断され (5μm厚)、別の例では組織の一部のみが切断された。定量的に細胞を数えるために、続いて組織切片に、骨特異的なミオシン重鎖 (MY-32) の免疫染色をおこなった。6週間での細胞生存率は、ミオシン重鎖発現の開始 (Havenithら、「Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies」、Histochem. 93:497、1990年。参照により本開示に含まれる)、骨格筋細胞と一致する細胞構築構成、および末梢に位置する正常な外見の核の存在に基づいて推測された。典型的な組織切片とコンピュータによる画像解析を用いて、生着範囲が計算され、トリクロムに染色された切片で別個に計算した核密度により、生着した核の数に換算された。各組織片における生存筋芽細胞核の合計数は、以下の方程式を使って推定された。

【0061】

切片移植面積合計 × 移植面積当り核密度 × 断片当り切片数* × Abercrombie補正

(Abercrombie、「Estimation of nuclear population from microtome sections」、Ant. Rec. 94:239-47、1946年。参照により本開示に含まれる)

* 断片厚およそ3mm、切片厚およそ5μmに基づいた、断片当りの切片の推定数。

【0062】

統計的分析

データは、平均±標準誤差 (SEM) として提示された。6週間のHF研究期間におけるLVの血行動態、形態的、および機能的データの、経時的および群間の差は、反復測定による多因子 (二元配置) 分散分析 (ANOVA) を用いて検討された (因子: 群および時間)。HF対照では、ベースラインとHFとの時点の差は、反復測定による一元配置ANOVA試験を用いて規定された。F比が臨界値 (アルファ<0.05) を超える場合、ポストホックStudent-Newman-Keuls法を用いて、一対比較が実施された。HF第1週におけるHF+ASMデータは、t検定を用いてベースラインと比較された。

【0063】

PV関係の独立した回帰分析は、解析ソフトウェア (IOX、EMKA Technologies) により計算された。HF+ASMとHF対照のPV関係の同一性は、定性的 (群) および相互作用的条件の両方を考慮して、重回帰により検討された。つまり回帰関数の勾配と交差の差を同時にテストした。線形回帰分析も実施され、LVリモデリングと機能の指標の関係を、HF対照 (N=11) を含む生存しているASM由来筋細胞の数と対比して検討した。

【0064】

HFをESVI上昇とLVEF低下の両方、2つの変数から成る帰無仮説として規定する際、複数の比較のためのボンフェローニ法が、適切な信頼度で使用された: アルファ<0.025。P値を判断および考慮し、比較の有意性と重要性を指定した。

【0065】

結果

HFの確立後、11頭のヒツジは、ASM注射有り (HF+ASM、N=5)、また無

10

20

30

40

50

し (HF 対照、N = 6) で、6 週間検討された。HF + ASM 群用の 8 頭のうち 3 頭のヒツジは、準備処置中の ASM 注射前 (N = 2) あるいは注射後 72 時間以内に死亡し、研究には含まれなかった。HF 対照のヒツジはいずれも初期に死亡しなかった。動物は、研究期間の 6 週間にわたり食欲と体重を維持した。ヒツジは、HF 誘発後活性が低下し、軽度の労作で呼吸困難となったが、毎日の観察では、群間で違いは認められなかった。

【0066】

組織学的検査

注射された筋芽細胞の平均数は、 $3.44 \pm 0.49 \times 10^8$ 細胞であり、1.53 から 4.3×10^8 細胞の範囲であった。筋芽細胞の純度 $92 \pm 1.4\%$ 、および細胞生存率 $93 \pm 1.2\%$ は、輸送時に評価され、筋芽細胞生存率は、輸送 (4°C) 後に $> 90\%$ であることが確認された (トリパンブルー排除を使用)。ASM 由来骨格筋筋線維は、注射された心臓全てに見られたが、第 6 週に生存していた注射された筋芽細胞の相対生存率 (考察参照) は、140,000 細胞 (0.05% 生存) ~ 3,300 万細胞 (10.7% 生存) であった。

10

【0067】

典型的な組織学切片は、詳しい説明とともに図 1 および 2 に示されている。一般的に、骨格筋細胞は他の骨格筋繊維と整列して、また残存心筋細胞とも整列している (図 1 C - F ; 図 2 A, B)。生着した骨格筋繊維は、重鎖速筋イソフォームを染色することに特徴付けられた (紫に染色、図 1 B, D, F および 2 B)。しかしながら、生存している心筋細胞との緊密な並列にもかかわらず、どの切片にも、トロポニン I またはコネキシン-43 に染色された ASM 由来筋原線維は見られなかった (それぞれ図 2 C および D)。

20

【0068】

心血行動態

血行動態データは、表 1 にまとめられている。研究は、LVEF の 50% 变化を検出するよう、適度に強化された (0.20) が、ASM 注射後、どの動物にも dP/dT_{max} および LVEF の改善はなかった。生存細胞の数と LVEF ($R^2 = 0.00017$ 、 $p = 0.99$)、または dP/dT_{max} ($R^2 = 0.048$ 、 $p = 0.543$) との間に直線関係は見られなかった。

30

【0069】

【表 1 - 1】

表1:自己骨格筋芽細胞移植後の心血行動態

	ベースライン (N=6)	HF対照 第1週 (N=6)	HF対照 第6週 (N=6)	ASM+HF 第1週 (N=5)	ASM+HF 第6週 (N=5)
左心室 ESVI ml/m ²	39 ± 4	93 ± 7*	124 ± 15 ^{†‡}	85 ± 16*	98 ± 18 [§]

【0070】

【表1-2】

LVEF %	48±2	30±2*	28±2	29±4*	27±4	
HR bpm	109±4	126±7*	125±9	128±9*	110±10†	10
LVSP mmHg	106±6	103±5	102±7	103±2	106±4	
LVEDP mmHg	11±1	23±4*	26±3	21±2*	22±3	
EDVI ml/m ²	75±7	135±9*	170±15‡§	118±16*	131±2§	
dP/dT _{max} mmHg/秒	3414±92	2428±327*	1864±216†	2863±152*	2166±174†	
dP/dT _{min} mmHg/秒	-2124±108	-1582±173*	-1423±147	-1880±68*	-1713±84	
Tau ms	17±1	38±8*	39±4	34±4*	44±3†	
E _{es}	3.7±0.5	1.3±0.11*	0.9±0.13	1.6±0.22	1.6±0.28	20
V _o	18±3.9	39±7.8*	59±8.7†	32±3.1	25±3.4§	
M _w	97±7.4	66±10.1*	58±7.8†	67±5.9*	57±8.0†	
V _w	50±9.5	88±4.9*§	107±15‡§	75±3.3*§	71±2.9§	
PVA	5257±542	6943±856	8794±449†	6456±492	6900±497	30
PE	1347±165	2982±381*	4304±375†	2791±437*	3208±500	
SW	3910±433	3961±542	4489±710	3675±185	3688±541	

平均±SEM。* p<0.05 第1週のベースラインから。† p<0.05 群内第1週から。‡ p<0.05 群間それぞれの時間。

dP/dT : 圧力の導関数、HR : 心拍数、LVSP : LV収縮期圧、LVEDP : LV拡張末期圧、ESVI および EDVI : LV収縮末期および拡張期容積指数、Tau : 弛緩時定数 (Weiss法)。M_w : 前負荷動員一回仕事量 ; E_{es} : 収縮末期圧容積関係 ; V_o : E_{es} の x - 切片 ; V_w : M_w の x - 切片 ; PE : LV位置エネルギー ; SW : LV一回仕事量

圧容積解析 (PV解析)

HF対照およびHF+ASMヒツジからのESPVR、PRSW、および仕事量のデータ(PVA)は、表1にまとめられ、図3に例示されている。PV解析は、両群のHFヒツジで、ベースラインからのPRSW勾配(M_w)および心収縮性の負荷非依存指数(E_{es})の低下を示した。群間の共分散を明らかにするさらなる複数の線形回帰分析も、容積修正PV関係の勾配(WKL : p = 0.614、WKL : p = 0.519、power

40

50

= 1) または切片 (W K 1 : $p = 0.945$ 、 W K 6 : $p = 0.928$ 、 power = 1) の群間での有意差は、どの時点でも見られなかったことを示した。生存細胞の数と E_{es} ($R^2 = 0.088$ 、 $p = 0.436$) または M_w ($R^2 = 0.018$ 、 $p = 0.731$) との間に直線関係は見られなかった。

【 0 0 7 1 】

HF 対照に関して、第 1 週から第 6 週までの E_{es} の V_0 (× 切片) に増加 (右方向の移行、 $p = 0.026$) があった (図 3)。反対に HF + ASM ヒツジに関しては、 V_0 は、 HF + ASM 動物では 6 週間にわたり減少傾向 ($p = 0.20$) (左方移行) にあり、第 6 週に HF 対照と HF + ASM との間に差が指摘され ($p = 0.014$) 、 ASM 注射が LV リモデリングを減衰したことを立証した。結果として、また HF 対照において心筋効率の多大な喪失を示唆するように、 PE は、 HF 対照において第 1 週から第 6 週までに増加したが ($p = 0.028$) 、総仕事量 (PVA) は 6 週間の研究にわたり、群間で差が認められなかった。 V_0 と同様に、 PR SW (V_w) の × 切片は、第 1 週から第 6 週までに、 HF 対照群 ($p = 0.03$) で増加し、第 6 週では HF + ASM 群と比較して異なったままであった ($p = 0.009$) (表 1 および図 3)。

【 0 0 7 2 】

ソノマイクロメトリおよび左室の分節性機能

左室の局所性および分節性データは、表 2 に提示されている。 SL_{post} は、第 1 週から各群で差はなかったが、 HF 対照群のベースラインからは増加した (HF 第 1 週において、 $p < 0.05$)。左室の分節性運動異常は微少塞栓術後に現れ、そのため収縮期隆起 (SB) と収縮後短縮 (PSS) は、ともに 6 週間の研究を通して明白であった。

【 0 0 7 3 】

【 表 2 】

表2:自己骨格筋芽細胞移植後の左室局所性および分節性機能

	ベースライン (N=6)	HF 対照 第1週 (N=6)	HF 対照 第6週 (N=6)	HF+ASM 第1週 (N=5)	HF+ASM 第6週 (N=5)
SA _{ES} (mm)	37.9 ± 2.5	51.8 ± 2.9*	57.6 ± 3.6†	51.5 ± 4.9*	53.4 ± 4.9
SA (% shrt)	22.3 ± 1.2	14.3 ± 2.3*	13.3 ± 1.7	15.2 ± 0.8*	13.0 ± 1.4
LA _{ES} (mm)	73.2 ± 3.8	83.7 ± 5.2*	90.2 ± 4.6†	80.4 ± 4.1	85.5 ± 4.9
LA (% shrt)	11.8 ± 0.9	9.8 ± 1.1*	8.5 ± 1.6	8.5 ± 0.9*	8.1 ± 1.9
SL _{post} ** (mm)	13.7 ± 3.4	17 ± 4.7*	18.9 ± 5.6	12 ± 1.3	12.1 ± 1.3
SL _{post} (% shrt)	7.8 ± 1.6	-1.6 ± 1.1*	-2.1 ± 1.8	-1.8 ± 2.2*	-2.4 ± 1.8
SB (mm)	0.04 ± 0.03	0.42 ± 0.10*	0.53 ± 0.16	0.40 ± 0.14*	0.43 ± 0.18
PSS (mm)	0.06 ± 0.04	0.47 ± 0.13*	0.61 ± 0.2	0.45 ± 0.13*	0.57 ± 0.12

平均 ± SEM. * $p < 0.05$ ベースラインから。† $p < 0.05$ 群内第1週から。§ $p < 0.05$
HF 対照と HF + ASM 間。

10

20

30

40

50

E S : 収縮末期、S A : L V 短軸、L A : L V 長軸、S L_{post} : 後部 L V 切片（微小塞栓術）、% shrt : % 収縮期短縮、S B : 収縮期隆起、PSS : 収縮後短縮。^{**}注 : S L_{post} 長さは、準備後の局所性の梗塞拡大によりベースラインと HF 対照とで異なるが、HF + ASM では、HF + ASM 動物の準備が心不全後（梗塞拡大後）であったため、ベースラインと異なる。そのため群間の相対比較は、第 1 週から第 6 週までである。

【0074】

ソノマイクロメトリおよび左室径

左室収縮末期および拡張末期容積指標（ESVI および EDVI それぞれ）は、HF 第 1 週において両群でベースラインから増加したが（p < 0.05）、第 1 週では群間で差はなかった（表 1）。HF + ASM では、LV 拡張は、HF 対照（p = 0.016）と比較して、第 3 週までに減衰され（ESVI の%変化：それぞれ 5.3 ± 1.2% および 17.8 ± 3.3%）、第 6 週までに向上した（p = 0.006）（図 4）。有意な（p = 0.005）減衰により、LV 容積の差が、SA 拡張にのみ、また第 3 週までには HF + ASM に生じた。LA 拡張では、群間で差はなかった（P > 0.5）。ESVI、SA、および LA の ASM 生存との相関は、図 4 に示されている。

10

【0075】

考察

過去の研究は、骨格筋芽細胞が、実験的心筋梗塞後の心機能とリモデリングの改善に貢献したと推定される生存骨格筋移植片を形成することを示唆している。既存の臨床的に有意で重度の虚血性機能障害およびリモデリングを有する心臓（LVEF < 35%、LVE SVI > 80 ml / m²）での、ASM の影響を調査した研究は、もしかったとしてもほとんどのない。本研究は、冠血行再建術または他の支持療法に付随する交絡因子を伴わない、虚血性拡張型心不全の臨床的に適用されるモデルにおいて、ASM 心筋形成術の治療的有用性を確立する。

20

【0076】

ASM 由来骨格筋は、6 週間で、注射を受けた全てのヒツジに観察された。動物間での相対生存率の比較を可能とする、推定生存率をここに報告する。細胞生存率を計算するために使用される方法には、著しい限界があるため（Abercrombie、「Estimation of nuclear population from microtome sections」、Ant. Rec., 94: 239-47、1946 年。参照により本開示に含まれる）、細胞生存率の数値は絶対的細胞生存であると解釈されるべきではない。本研究で認められた筋芽細胞の長期生存率（最高 10.7% 生存）は、LVAD 設置時に同様の数の ASM 細胞を移植された患者について報告されているよりも高いものであった（< 1% 生存）（Pagani ら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 879-888、2003 年。参照により本開示に含まれる）。他でも報告されているように（Scorsin ら、「Comparison of effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function」、J. Thor. Cardiovasc. Surg. 2000; 119: 1169-75；Jain ら、「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103: 1920-1927、2000 年；Gostine ら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circul

30

40

50

ation 106 [suppl I] : I 131-6, 2002年; Menascheら、「Myoblast transplantation for heart failure」、Lancet 357: 279-80, 2001年; Menascheら、「Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 1078-83, 2003年; Paganiら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischaemia-damaged myocardium in humans」、J. Am. Coll. Cardiol. 41: 879-888, 2003年; Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、Ann. Thorac. Surg. 71: 844-851, 2001年。これらはそれぞれ参考により本開示に含まれる)、ASM由来骨格筋においてコネキシン-43染色は見られなかった。移植されたASM由来骨格筋筋線維は、全ての切片において、互いに、また残存心筋原線維と整列した(図1および2)。このようなASM由来繊維の編成された整列は、これらの繊維が、心筋内に見られる応力-ひずみ関係に影響を受けやすいことを示唆している(Kadaら、「Orientation change of cardiocytes induced by cyclic stretching stimulation: time dependency and involvement of protein kinases」、J. Mol. Cell. Cardiol. 31: 247-59, 1999年; Pfefferら、「Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications」、Circulation 81: 1161-72, 1990年; Atkinsら、「Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ」、Ann. Thorac. Surg. 67: 124-9, 1999年。これらはそれぞれ参考により本開示に含まれる)。ASM注射後の瘢痕の置換についての有意義な推定は、微少栓術後に存在した異質な梗塞パターンと、研究された動物が比較的少数であったことを考慮すると、不可能であった。しかしながら、高密度の心筋梗塞において、互いに整列して生存する細胞が一貫して観察され(図1)、頻度は高くないが生存心筋細胞の隣接に細胞が認められた(図2)。

【0077】

比較的低い筋芽細胞の細胞生存率であっても(図1、1.1%細胞生存率の動物)、瘢痕心筋のかなりの範囲は、筋原線維の細胞融合と、それに続く増殖(未発表の観察結果では、筋芽細胞に対し、細胞核当りの筋原線維の断面積が約10倍増加)の結果として、生存筋原線維で補うことができる。従って、低い細胞生存率であっても、心筋の損傷範囲を完全に補うことができる可能性がある。一般的に、注射された細胞の最大95%は、注射後直ちに喪失する(Menasche、「Myoblast-based cell transplantation」、Heart Failure Reviews 8: 221-27, 2003年; Grossmannら、「Incomplete Retention after Direct Myocardial Injection」、Catheterization and Cardiovascular Interventions 55: 392-397, 2002年。これらはそれぞれ参考により本開示に含まれる)。この早期喪失は、直接心筋内注射後のリンパおよび/または静脈の細胞排出により説明される(Grossmannら、「Incomplete Retention after Direct Myocardial Injection」、Catheterization and Cardiovascular Interv 50

entions 55:392-397、2002年。参照により本開示に含まれる)。他の因子も、心筋/瘢痕内に保持される細胞のさらなる喪失の原因となる可能性がある。最近の研究では、ASMのVEGFによる前処理(Retuertoら、「Angiogenic pre-treatment improves the efficacy of cellular cardiomyoplasty performed with fetal cardiomyocyte implantation」、J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 127:1-11、2004年。参照により本開示に含まれる)、およびトランスフェクション(Askariら、「Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in the improved left ventricular function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy」、JACC 43:1908-14、2004年。参照により本開示に含まれる)が、おそらく灌流と栄養供給を促進したことにより、心機能を改善したことを示している。さらに、炎症および/またはアポトーシスとともに制限する戦略も、細胞性心筋形成術後の効果を向上させるのに有益であると証明されている(Zhangら、「Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies」、J Mol. Cell. Cardiol. 33:907-21、2001年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。注射から6週間後の移植部位における極度の炎症の形跡は観察されなかった(図1および2)。

【0078】

左室機能

表1および2の、ASM注射後の心機能を評価するデータは、このモデルの末期拡張型虚血性HFを有するヒツジにおいて、いかなる血行動態パラメータまたは心収縮性指標の改善も示唆しなかった。過去に発表されたヒツジにおける結果とのこの不一致は(Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 106 [suppl I]: I131-6、2002年。参照により本開示に含まれる)、本研究のヒツジのLV構造および機能がより劣るためと思われる。Ghostineらの局所的心機能の改善は、病態がより軽度であり、そのため、もし存在するとすればASM収縮への妨害がより少なかった結果と思われる。

【0079】

LV機能(LVEF)により層別化したラットにおいて、注射された細胞の数とLV指標との有意な相関(最も重度に障害のあるものが、最も大きな利益を受けた)を示したPouzetら(Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、Ann. Thorac. Surg. 71:844-851、2001年。参照により本開示に含まれる)とは違い、本研究では、生存しているASM由来筋細胞の数と比較し、かかる関係を示すことができなかった。注射された細胞の数と生存している割合を比較することの明らかな違いを除いて、この違いは、筋芽細胞の培養、増殖の違い、または単に細胞の投与量の不足により説明できるであろうか。PouzetらおよびGhostineらは、注射時の筋芽細胞純度を50%未満と提示しているが、我々はより純粋な筋芽細胞集団を増殖した(>90%CD56陽性)。筋芽細胞注射懸濁液の純度は、結果に影響し得るであろうか。もしそれが可能だとしても、より高い純度の筋芽細胞が、機能的利益を低下させるとは考えにくい。さらに、本研究とその他の公開されている動物実験(Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation」、

10

20

30

40

50

non regional structure and function after myocardial infarction」、*Circulation* 106 [suppl I] : I131-6、2002年; Menascheら、「Myoblast transplantation for heart failure」、*Lancet* 357: 279-80、2001年; Menascheら、「Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction」、*J. Am. Coll. Cardiol.* 41: 1078-83、2003年; Paganisら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischaemia-damaged myocardium in humans」、*J Am. Coll. Cardiol.* 41: 879-888、2003年; Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、*Ann. Thorac. Surg.* 71: 844-851、2001年。これらはそれ参考により本開示に含まれる)とにおけるLV病態の多様性を考慮すると、細胞培養および増殖手法の影響を理解することは難しい。

【0080】

本研究で実証できる直接の機能的利益が認められなかつことは、単回の虚血性発作(クライオインファクション(cryoinfarction)(Taylorら、「Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation」、*Nat. Med.* 4(8): 929-33、1998年。参考により本開示に含まれる)、結紮(Jainら、「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、*Circulation* 103: 1920-1927、2000年。参考により本開示に含まれる)、コイル塞栓術(Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、*Circulation* 106 [suppl I] : I131-6、2002年。参考により本開示に含まれる))を用いた動物モデルと比較して、本研究のHFモデル(数週間にわたる複数の微小梗塞)が、LV機能障害の慢性的性質と重症性を有したことに関連する可能性がある。微少塞栓術モデルは、ASM注射後に陳旧性心筋が関与することを避け、意図的に、陳旧性心筋の代償機序をより効果的に研究していると思われる(Sabbahら、「A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations」、*Am. J. Physiol.* 260: H1379-84、1991。参考により本開示に含まれる)。我々は、ラットの体外標本における、ASM注射後に観察された適度の機能改善は、非機能性特性への効果の結果(直接的にLV収縮ではなく、LV拡張の減衰)であると思われるというJainらによる解釈(「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、*Circulation* 103: 1920-1927、2000年。参考により本開示に含まれる)に同意する。要するに、ASM由来骨格筋によって、陳旧性心筋の細胞への壁応力が小さくなつて、さらなるLVの室拡張が防がれたことが、陳旧性心筋機能の改善を生み出したのであろう。おそらく、治療が早いほど、LVリモデリングに対し、ASM由来骨格筋の効果がより早く実現され、そのため陳旧性

心筋細胞が十分に全体的なLV機能を代償し、またそれに貢献する可能性が高まるのであろうか。同様に、本研究に基づき、拡張が重度であるほど、機能的变化が観察されるまでに、より長い期間を要すると考えられる。

【0081】

左室リモデリング

本研究の重要な発見は、細胞生存率に依存する形での、ASM移植後のLV拡張の減衰であった(図4)。小型および大型の両動物における研究は、ASM注射後のLV拡張への好ましい効果も示してきた(Tambaraら、「Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers」、Circulation 108 [suppl II]: II-259-63、2003年; Taylorら、「Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation」、Nat. Med. 4(8): 929-33、1998年; Jainら、「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103: 1920-1927、2000年; Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 106 [suppl I]: I131-6、2002年; Pouzetら、「Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation」、Ann. Thorac. Surg. 71: 844-851、2001年。参照により本開示に含まれる)。最近の研究のその他の興味深い発見は、LV拡張への効果は、SA寸法に対してのみであったことである。このSAリモデリングへの優先的効果を定義する機序は、完全に明確ではない。細胞性心筋形成術が、瘢痕の弾性に直接影響し、そのため瘢痕の拡張を制限するという考えは、局所的拡張の減衰の説明となり得る(Torrent-Guaspら、「The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping. Articles I-VII」、Semin. Thor. and Cardiovasc. Surg. 13: 298-416、2001年。参照により本開示に含まれる)。慢性的な虚血心筋における、収縮後短縮と収縮期隆起との相互作用は、あまり特性が明らかになっていない(Skulstadら、「Post-systolic shortening in ischemic myocardium, active contraction or passive recoil」、Circulation 106: 718-24、2002年。参照により本開示に含まれる)、ASM注射後に、PSSあるいはSBに無視できない改善が見られるという事実は依然存在する。

【0082】

ASM由来骨格筋線維が、体外で実証されたように(Murphyら、「Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis」、J. Clin. Invest. 98: 2512-23、1996年。参照により本開示に含まれる)、その纖維で列になって積極的に力(伸縮)に抵抗し、それによりLV拡張を制限することができれば、選択的にLV短軸に対するLV拡張の減衰が観察されたことの説明となるかもしれない。例えば、虚血性障害のあと、心室が次第に球状になるに従い、優位な心筋纖維の軸(例: 60°)は、漸進的に水平軸または短軸(例: 30°)に向かって方向を変える(Torrent

- Guaspら、「The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping. Articles I - VII」、Semin. Thor. and Cardiovasc. Surg. 13: 298 - 416、2001年。参照により本開示に含まれる)。我々は、ASM由来骨格筋筋線維が互いに、また残存心筋細胞と整列して認められ、そのため理論的には、生着したASM由来筋原線維の志向性は、LV短軸とより整列することの証拠が提供される。示唆されるように、ASM由来筋原線維は、その纖維長上への、またはそれに沿った拡張力に対する先天的な抵抗力を示し、それにより、LV短軸に沿ったASM生着細胞と整列する拡張を選択的に防いでよい(図4)。

【0083】

Jainら(「Cell therapy attenuated deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction」、Circulation 103: 1920 - 1927、2000年。参照により本開示に含まれる)と同様に、摘出心臓標本において、本研究でもASM心筋形成術が、 E_{es} 切片(V_0)およびPRSWの切片の右方向の移行を防いだことが認められた(表1および図4)。ASM移植のLVリモデリングとLV機能とへの明らかに不調和な効果を有意義に定量化する観点で、またその目的で、得られた圧容積データからPVAを計算した(Todakaら、「Characterizing ventricular mechanics and energetics following repeated coronary microembolizations」、Am. J. Physiol. 272:H186 - 94、1997年; Recchiaら、「Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decapsulation of pacing induced heart failure in the conscious dog」、Circ. Res. 83(10): 969 - 79、1998年; Takaokaら、「Depressed contractile state and increased myocardial consumption for non-mechanical work in patients with heart failure due to old myocardial infarction」、Cardiovasc. Res. 28: 1251 - 7、1994年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。非機械的心仕事量またはPEの増加(表1)が、ASM移植に減衰したという事実は、心臓の機械的エネルギー特性への利益を示唆している。かかる利益は、長期にわたるより高い心機能を可能としてよく、これはASM動物が、6週間にわたりその E_{es} にそれ以上の悪化を示さず、より時間が与えられれば、これは群間ににおいて有意であることが証明されたかもしれないという事実に裏付けられる。研究は、心機能の改善が、より先の時点において、またはより多数のASM細胞の移植後に実証されるかどうかを評価するために、現在進行中である。

【0084】

研究の限界

本研究で使用された動物モデルは、原因論、病態の程度、冠動脈構造において臨床的虚血性HFに近似している(Sabbahら、「A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations」、Am. J. Physiol. 260:H1379 - 84、1991年; Pfefferら、「Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications」、Circulation 81: 1161 - 72、1990年; Menasche、「Myoblast - ba

10

20

30

40

50

sed cell transplantation」、Heart Failure Reviews 8: 221-27、2003年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。微少塞栓術は、全ての患者、特に単一の広範囲な梗塞に罹患した患者の虚血性HFにつながる心筋梗塞の事象を完全に模倣しない。さらにこのモデルは、慢性虚血性HFに典型的な疾患進行を大きく加速する(Pfefferら、「Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications」、Circulation 81: 1161-72、1990年; Pfeffer、「Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction」、Ann. Rev. Med. 46: 455-66、1995年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)。

【0085】

各動物は、同じ数と種類の処置を受け、またHFの確定のための同様の血行動態基準に従った。本研究に認められた差異は、群間での準備(およびASM注射)のタイミングに基づいて生じた可能性がある。HF+ASMにおいて、SA寸法でのみ拡張の減衰が観察され、相互に関連付けられたが、LA拡張はHF対照とASMとの群間でほぼ同一であったという事実は、群間で見られた差異が、処置の順序よりも筋芽細胞注射に依存していることをさらに裏付ける。

【0086】

ソノマイクロメトリにより計測される局所性および/または分節性機能は、ASM生存率の可変性により、ASM生着の正確な範囲における機能を十分に明らかにしていかもしれないが、筋芽細胞注射は、明確にソノマイクロメトリ結晶に向けられ、また第6週にはその直近で発見された。局所性の準備がASM注射後の機能的利益を明らかにすることができないなかつたのであれば、ESPVR(E_{es})およびPRSW(M_w)などの指標は、室圧に関わるLV容積の変化に対して引き続き敏感であり、ASM注射の影響を明らかにすべきであった。過去に認識されているように、Abercrombieにより記載される方法は(「Estimation of nuclear population from microtome sections」、Ant. Rec. 94: 239-47、1946年。参照により本開示に含まれる)、細胞数を計るための標準化されたアプローチである。これは生存する細胞の数を推定する最良の方法であるが、サンプリング誤差が大きな限界となっている。最後に、ASM注射後にLV機能への利益が観察されていないことは、研究期間が限られていたことに関連している可能性がある(Ghostineら、「Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction」、Circulation 106 [suppl I]: I131-6、2002年。参照により本開示に含まれる)。

【0087】

結論

本研究は、付随する介入を伴わない、臨床的に適用される慢性虚血性HFの大型動物モデルにおけるASM移植について記載している。心機能への直接の機能的影響はないようであるが、我々は、ASM移植後のLV拡張の有意な減衰を実証することができた。LV拡張の減衰は、短軸のみに対してであり、細胞生存率依存性の形で観察された。これらの観察は、ASMが、細胞間コミュニケーションと無関係の機序、および/または直接の機能改善によりLVリモデリングに影響するが、ASMの生着と整列はかかる機序で役割を果たしてよいことを示唆している。

【0088】

実施例2-コイル塞栓術により梗塞を起こしたブタの心筋における経皮的自己骨格筋芽細胞移植の安全性と可能性

10

20

30

40

50

全ての実験は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(DHHS 出版番号 NIH 85-23、1985年改訂)に公開されているガイドライン、およびUnited States Department of AgricultureによるFederal Animal Welfare ActのA節に従って、またFDA Good Lab Practiceの精神で実施された。研究プロトコルは、研究開始前に、アリゾナ州フェニックス、Arizona Heart HospitalのHarrington Animal Care and Use Committeeにより承認された。

【0089】

素材と方法

10

動物の準備：生後3～6ヶ月で、体重 91 ± 251 bs.の10頭の雌ヨークシャーブタは、心筋梗塞を誘発された。3頭が、心筋梗塞の誘発中、または直後に死亡した。1頭は注射された筋芽細胞の短期滞留と生体内分布を判定するために用いられ、6頭はASMまたは輸送培地のみのいずれかの受容動物としての役割を果たした。

【0090】

梗塞を誘発する直前、心電図記録、心エコー検査、心拍出量および指数、および血液値が評価され、筋肉生検材料が採取され、ループ記録装置が埋め込まれた(これらの処置の更なる詳細は以下を参照)。各動物は、筋肉内(塩酸チレタミンと塩酸ゾラゼパム、500mg)により麻酔され、挿管され、人工的に2%イソフルレンおよび酸素を吸入された。8-F動脈シースが、経皮的にまたは静脈切開法により右大腿動脈に挿入され、選択的左右冠動脈造影、左心室造影およびNOGATMマッピングが実施された。

20

【0091】

大腿静脈切開と同時に、生検材料が6頭の研究用ブタそれぞれから採取された。滅菌状態で、右後肢に沿って縦方向に6cm切開し、5～10グラムの大筋筋の生検材料が、鋭的切開法により摘出された。その後切開部は、層状に吻合された。筋生検材料は、速やかに氷上の生検材料移植媒体に置かれ、筋芽細胞増殖のために細胞培養施設に送られた。

【0092】

筋生検のあと、埋め込み型ループ記録器(ILR)が、各ブタに挿入された。無菌操作を行い、脊椎の左側に沿って、心臓のすぐ上に単一の2cm切開がなされた。切創は筋膜まで切開され、約 4×2 cmの皮下ポケットが筋肉上に形成された。事象観察装置は、皮下に設置され、心電図(ECG)信号の特性と振幅が検証された。創縫合は、従来の方法で実施された。

30

【0093】

梗塞モデル：ILR埋め込みと左心カテーテルの直後に、 2×10 mmの複合螺旋または 3×23 mmのダイヤモンド型のVortxコイル(Boston Scientific/Targuet、マサチューセッツ州ナティック)を用いた、左冠動脈前下行枝(LAD)遠位部に対するコイル塞栓術により、各ブタに前壁梗塞が誘発された。冠動脈閉塞は、冠動脈造影と左冠動脈前下行枝の閉塞の数分後にV₁～V₃においてST上昇を示したECGに実証されるように、コイル配置の平均16分後に発生した。大腿動脈は、Angio-Seat血管吻合装置または縫合糸を使用して吻合され、動物は標準作業手順により回復させた。重大な心室性不整脈は、2%リドカインの静脈ボーラス投与、および電気的除細動により治療された。処置後の不快感は、筋肉内酒石酸プロトルファノール(Dolorex、1.0mL)投与により治療された。

40

【0094】

筋芽細胞の増殖：自己骨格筋芽細胞は、筋肉組織を細かく刻み、続いて0.5mg/mlトリプシンおよび0.5mg/mlコラゲナーゼを含む3ステップの酵素消化をおこなうことにより分離される。各ステップで遊離された細胞は、洗浄され、ゼラチンコートディッシュで培養された。細胞は、SkBM^(R)(骨格筋基本培地、Cambrex Corporation、ニュージャージー州イーストラザフォード)から成り、15%(vol/vol)ウシ胎児血清(Hyclone、ユタ州ローガン)、10ng/mlのr

50

h E G F (Cambrex)、3.9 μg / mL のデキサメタゾン (American Reagent Lab、ニューヨーク州シャーリー)、および 50 μg / mL のゲンタマイシン (Gibco / Invitrogen Corp、カリフォルニア州カールズバッド) を補填した成長培地 (GM) において、2代の継代にわたって増殖された。細胞は、自然発生的細胞融合を防ぐため、密度 < 70 % に維持され、トリプシン / EDTA 消化により採取され、低温保存された。培養物の約 10 % は、BrDU 特異的な免疫組織化学的検査により、生着した細胞の識別を容易にするために、培養の最終 24 時間の間にプロモデオキシウリジン (BrDU) で標識された。

【 0095 】

細胞注射に備えて、凍結された筋芽細胞は解凍され、GM で 2 回、移植媒体で 2 回洗浄された。最後に、細胞は適切な細胞密度にされて 1 mL 注射器に入れられ、氷またはコールドパック上で、動物実験施設に輸送された。

【 0096 】

細胞をイリジウムで標識するため、動物からの 4 千万の細胞は、13.4 × 10¹⁰ イリジウム粒子 (0.3 μm 径、提供 : BioPhysics Assay Laboratory、マサチューセッツ州ウースター) と混合され、筋芽細胞によるイリジウムの吸収を助長するために、37 °C で 2.5 時間インキュベートされた。吸収されなかった粒子は、細胞を成長培地で 6 回洗浄することにより除去された。残った標識された細胞は、標識されていない筋芽細胞と混合されて、移植媒体で最終細胞産物が調製され、1cc 注射器に装填された。最終細胞産物の一定分量は、検量線が作成できるように保持された (下記参照)。

【 0097 】

細胞集団の特徴付け : 細胞は、生存、無菌性、純度、能力を分析された。生存は、トリパンブルーを用いて評価され、無菌性は膜ろ過法と LAL (カブトガニアメーバ様細胞溶解物) ゲルクロットアッセイを用いて、エンドトキシンを検出するために測定された。細胞純度は、筋芽細胞に特異的なインテグリン 7 (イリノイ大学 Kaufman 博士提供、H36) に対する一次抗体を用いて、FACS (蛍光活性化細胞分類) により判定された。筋芽細胞の能力は、コンフルエントな筋芽細胞培養物を融合培地に交換することにより実施される融合アッセイを用いて評価された。これらの条件の下で、筋芽細胞は融合し、多核筋管を形成した。汚染線維芽細胞は、この能力を有さず、単一細胞のままとなる。

【 0098 】

筋芽細胞移植媒体での最終調製時に、細胞の生存率は 60 % ~ 96 % であった (表 4 参照)。動物実験現場での筋芽細胞の受け取り時には、生存率は低下していた。細胞調製物の純度は、30 % から 62 % の範囲であり、線維芽細胞の状態である可能性がある汚染細胞を含んでいた。全ての移植細胞は、USP の濾過滅菌およびエンドトキシン LAL 試験に合格した。

【 0099 】

自己筋芽細胞移植 : 梗塞の 30 日後、自己骨格筋芽細胞は、4 頭の治療用ブタそれぞれに移植された。各動物は、上記と同様に麻酔された。8-F 動脈シースが、静脈切開法を用いて左大腿動脈に挿入され、心筋評価が繰り返された。

【 0100 】

経皮的自己骨格筋芽細胞移植は、8-F 動脈シースを用いて、左右いずれかの大腸動脈を通して、血管内注射カテーテル (Biosense 心筋内注射装置) を前進させることにより実施された。3 次元ユニポーラ電圧マップ (NOGATM) を使用して、梗塞範囲を判定し、針注射カテーテルを誘導した。137 地点の平均を用いて左室をマッピングし、ユニポーラ電圧の中間値 7.8 ± 1.5 mV (バイポーラ : 2.3 ± 0.4 mV) を用いて梗塞範囲を検出した。使用されたカテーテルは、B または C のいずれかであった。注射針は直線および曲線部 (90 度) で計測され、心エコー検査で測定された壁厚に応じて、心内膜の梗塞部位内に 3 ~ 5.5 mm 伸びるように調整された。貫通は、蛍光透視、ST 上昇、または針の前進中の心室性期外収縮のいずれかにより検証された。

10

20

30

40

50

【0101】

注射の直前、各注射器は室温に戻され、確実に細胞懸濁液を均一にするため、数回反転させた。温度は接触により評価され、均一性は視覚的に評価された。懸濁細胞は、心筋の梗塞部位の中心および周辺端部に注射された。第2群の動物は、1回100μLの19回の注射で $\sim 300 \times 10^6$ 細胞を投与された。第3群の動物は、100~150μLの31~39回の注射で $\sim 600 \times 10^6$ 細胞を投与された。第1群の動物(対照)は、同様の回数の注射および注入量で筋芽細胞移植媒体を注射された。表4には、用量特性を詳細に記載している。注射が完了したあと、大腿動脈はAngio-Senal血管吻合装置または縫合糸により吻合され、動物を回復させた。

【0102】

10

インジウムで標識したASM分布の定量化

最後の注射の2時間後、イリジウムで標識したASMを注射された動物を致死させ、心臓、脳、腎臓、肝臓、肺、および脾臓が計量された。左心室の前部、側部、下部、および中隔部は、8つの等しい切片に切断され(各部につき2つの垂直方向切片)、また5~9グラムの各臓器が、分析のために切除された。全ての組織試料と標識された細胞の標準物質は、バイアルに入れ、70°Cで1晩乾燥させた。

【0103】

20

得られた乾燥試料は、活性化および検出の2つのステップを含む解析のため、Biophysics Assay Laboratoryに送られた。活性化中、細胞内のイリジウム原子に入射中性子を捕獲させる高エネルギー中性子に、試料を曝露した。中性子束の不安定な放射性生成物は、自然放射能の介入を軽減するために、続けて2日間崩壊させた。検出期には、試料は高解像度ガンマ線検出モニタに設置され、エネルギー準位と放出されたガンマ粒子の数を計測した。既知の数のイリジウム標識された細胞を含む試料から作成された検量線を使用して、各組織試料のガンマ粒子放出は、保持されたイリジウム標識された細胞の数に換算された。それぞれの臓器(心臓以外)全体で、標識された細胞の合計を計算するために、各試料の数値に、試料組織の重量で除された臓器の重量を乗じた。

【0104】

30

安全性評価：安全性は、動物の生存、健康、心拍リズム、血液検査、および有害事象により判断された。健康と生存は、90日の研究期間中、連続的に監視、記録された。心拍リズムは、安静時仰臥位で選択された時点に取得した、埋め込み型ループ記録器(ILR)による、標準12誘導心電図を使用して監視された。使用されたILRは、Medtronic Reveal^(R) Plus 9526(Medtronic、ミネソタ州ミネアポリス)であるが、これは不整脈イベント中に、皮下心電図を連続的に(ルーピング)記録するために作られた、使い捨ての、プログラム可能な装置である。ILRは、心筋梗塞および移植の最中およびその後24時間、起動していた。さらなる照会が、各処置から2週間は週3回、移植と摘出との間には週1回おこなわれた。各装置は以下のようにプログラムされた。格納モード-連続16回の拍動間に、徐脈<30bpm、頻脈>230bpm、心停止>3秒を検出する、42分間の13の自己活性イベント。全てのILR装置は、最大ゲイン8(± 0.2)mVに設定され、最適感度を得るために、感度は10~13に調整された。

40

【0105】

血液学および化学：(表3参照)標本は、各処理で動物を1晩断食させたあと採取した。血液は、麻酔下で大腿部経由で採取された。EDTAナトリウムが血液テストのための抗凝血剤として使用された。臨床化学試験のための試料は、抗凝血剤を使用せずに採取された。

【0106】

【表3-1】

表3: ブタ血液サンプルに実施された検査室試験

血液学	ヘモグロビン 血小板数 ヘマトクリット値 白血球数および赤血球数 血球百分率数 血球形態	10
化学	ブドウ糖 ナトリウム、カルシウム、カリウム、塩化物 尿酸 総ビリルビン 尿素窒素 クレアチニンおよびクレアチニナーゼ 総タンパク質 アルブミン、グロブリン、およびアルブミン/グロブリン比 コレステロール トリグリセリド類 無機リン	20

【0107】

【表3-2】

	アルカリホスファターゼ アラニンアミトランスフェラーゼ γグルタミルトランスフェラーゼ アスパラギン酸アミトランスフェラーゼ	30
--	---	----

心筋機能評価：心臓の機能評価は、細胞移植の効果を治療群と対照群とで検出、比較するため、選択された時点での実施された。

【0108】

駆出率および心室壁厚は、標準安静時心エコー（エコー）を用いて評価された。エコーは2次元で、傍胸骨長軸および短軸像、心尖部四腔、二腔、および長軸、肋骨下四腔および短軸像で実施された。エコー結果は、熟練した心臓病専門医により、盲検的に解釈された。さらなる駆出率評価は、心室造影（LVグラム）により成された。冠動脈は、右および左前斜投影を使用した左心カテーテル中に、冠動脈造影により開存性を可視化され、研究者により解釈された。心指標は、Bio-Z装置（Cardio Dynamics International Corporation、カリフォルニア州サンディエゴ）を使用して、非侵襲的インピーダンスカルジオグラフィ（ICG）により評価された。4つのICGセンサーが、各動物に取り付けられ（首と胴の両側に各1つずつ）、ブタの胸部構造の値を調整するために、補正率1.48が使用された（Broomehead、Br. J. Anesth. 78: 323-325, 1997年。参照により本開示に含

10

20

30

40

50

まれる)。

【0109】

3次元電気機械的マッピングは、8-Fシースを通して左心室に前進させた7-F N A V I S T A RTMカテーテルを介して、NOGA Biosenseナビゲーションシステム(Biosense Webster、カリフォルニア州ダイヤモンドバー)を用いて実施された。このナビゲーションシステムは、弱い磁場エネルギーと、先端にセンサーが付いたカテーテルを使用し、3次元空間におけるカテーテルの位置を特定する。これは電気機械的マッピングと相まって、心室の健康/正常、虚血、および梗塞の範囲を識別する、左心室(LV)の3D画像の構築を可能とする(Kornowskiら、Circulation 98:1116-1124、1998年。参照により本開示に含まれる)。これらのマップには、ユニポーラ(UP)およびバイポーラ(BP)電圧マップが含まれる。心筋の各部分における電圧を表示するための数および色の基準は、コンピュータにより指定された。

【0110】

Biosense注射カテーテルは、物質を心筋内に注射するために作られた、偏向可能なチップと注射針を有する多電極の経皮的カテーテルである。注射カテーテルのチップには、Biosense位置センサーと、液体供給のための伸縮自在の中空27ゲージ針が備えられている。注射部位は、リアルタイムで左心室マップに表示され、注射の正確な配置を可能とする。局所的電気信号が取得され、カテーテルチップによる外傷を最小限に抑える。

【0111】

組織学的検査：組織学的分析は、治療および対照群の動物の心臓が研究の90日目に摘出されたあと、その全てに対し実施された。心臓は計量され、10%中性緩衝ホルマリン中に保存され、組織学的分析のため、室温でGenVecに輸送された。各心臓の梗塞を起こした部分は、パラフィンに包埋され、切断され、スライド上に設置された。これは移植細胞の生着と、処置に対する炎症反応の可能性を識別するために、染色された。組織染色には、ヘマトキリン&エオシン、およびトリクロムが含まれた。免疫組織化学的染色には、骨格筋特異的なミオシン重鎖(MY32)、およびプロモデオキシウリジン(BrdU)に対する免疫反応性が含まれた。

【0112】

統計的分析：群間の連続型変数は、スチューデントt検定を用い、P値<0.05を有意とみなして比較された。相対変化率は、ベースライン値で除された前後の値の差として計算された。

【0113】

予備実験

経皮的注射の可能性：損傷心筋および正常心筋の双方への経皮的カテーテル注射の可能性は、まず2頭のブタにおいて判定された。正常なブタおよび梗塞を起こしたブタの心筋に、メチレンブルーまたは造影剤を別々の機会に注射するために、2つの異なるカテーテルが使用された。染料の注射前に、血管造影がおこなわれ、カテーテルが心臓の心尖の心筋梗塞部位に正確に位置づけられた。この予備実験は、心臓の特定の部位を標的として、筋芽細胞を供給することが可能であることを示した。

【0114】

注射カテーテルの生体適合性：MyoStarTM心筋内注射装置(Biosense-Webster、カリフォルニア州ダイヤモンドバー)を使用して移植研究を開始する前に、予備生体適合性研究が実施された。この実験は、細胞通過中にカテーテル自体から排出されたかもしれない残渣の存在または不在を微視的に検証することも目的とした。筋芽細胞は、10、30、50、70、および 100×10^6 細胞/mLの濃度で、あらかじめ標識された注射器で、実験当日にGenVecから提供された。細胞濃縮物の容量は、それぞれ0.44、0.44、0.28、0.45、および0.40mLであった。細胞生存率は、細胞通過の前後に、トリパンブルー染色(0.4%、Gibco)を用いて

10

20

30

40

50

判断された。残渣に対する微視的視覚評価は、カテーテル前検査、カテーテルのフラッシュ、およびカテーテル後検査の時点に、光学顕微鏡を使用して $20\times$ 拡大で実施された。実験中に蓄積した可能性があるあらゆる残渣を証明するために、デジタル写真が撮影された。

【0115】

筋原性細胞株(Oronら、「Technical delivery of myogenic cells through an endocardial injection catheter for myocardial cell implantation」、Int. J. Cardiovasc. Intervent. 3:227-230、2000年。参照により本開示に含まれる)と同じように、本データは、細胞濃度 10×10^6 ~ 100×10^6 細胞/mlにおいて、カテーテル通過後の細胞生存率の有意な変化を示さず、Biogenesisカテーテルの使用時に細胞生存率に対する有害作用が起らなかったことを示唆した。さらに、全ての用量の濃縮物で、カテーテル前、フラッシュ、またはカテーテル後において、微視的差が認められなかった。

10

【0116】

【表4】

細胞濃度	注入速度	注射前 生存率%	注射後 生存率%
10×10^6	0.5 ml/分	91%	90%
30×10^6	0.5 ml/分	93%	92%
50×10^6	0.4 ml/分	82%	87%
70×10^6	1.0 ml/分	85%	94%
100×10^6	0.7 ml/分	83%	86%

20

Biogenesisカテーテルによる、梗塞を起こしたブタの心筋への筋芽細胞供給：前述のカテーテル供給法は、筋芽細胞を心臓に注射するために使用された。3頭のブタの大軽筋から、生検材料(約5グラム)が採取され、筋芽細胞培養のために輸送された。生検後約3~4週間で、注射のための細胞を受け取った。2件の筋芽細胞移植が、Biogenesis NOGAマッピングおよび注射を用いて実施された。自己移植は、1頭のブタで完了し、2頭目は、免疫抑制を伴わず、同種異系筋芽細胞移植を受けた。

30

【0117】

瘢痕範囲への貫通は、ST上昇により、また針の前進中の心室性期外収縮により検証された。 5.6×10^4 細胞/mlでの9回の0.1mL注射(自己注射)、および 200×10^6 細胞/mlでの25回の0.1mL注射(同種異系)が、2頭のブタにそれぞれ実施された。注射部位は、電気機械的マップに描写された。移植の成功は、10日目(同種異系)および3ヶ月目(自己)の心筋摘出の実施時に認められた(図6参照)(Nibら、J. Envasc. Ther. 9:313-319、2002年。参照により本開示に含まれる)。

40

【0118】

結果

ブタモデルにおける筋芽細胞の生体内滞留および分布：梗塞範囲は、健康な心筋壁より薄い。染料の供給には成功したが、心臓損傷部位への細胞のカテーテル供給は、正常な厚い壁と比較し、また別の課題を呈示するかもしれない。心筋梗塞は、冠動脈前下行枝に白金コイルを設置することにより、ブタに誘発された。移植の直前、筋芽細胞はイリジウム粒子の吸収により標識された。心筋梗塞の1ヶ月後、イリジウムで標識した筋芽細胞は、3D NOGATMマッピングに誘導され、Biogenesisカテーテルを用いて移植さ

50

れた(図5参照)。移植2時間後、ブタを致死させ、心臓、脳、脾臓、肝臓、両腎臓、および肺を摘出した。臓器は、組織を高エネルギー中性子源に曝露することにより、筋芽細胞の滞留について評価された。励起したイリジウムから放出されたガンマ粒子は、筋芽細胞の局在性の、間接的な定量的測定として数えられた。筋芽細胞の約4.1%は、注射を受けた梗塞範囲で観察された。筋芽細胞の約5%は、肺で観察された。0.1%未満が脾臓で観察され、脳、肝臓、または腎臓では筋芽細胞は検出されなかった。

【0119】

これらのデータは、Biosense心筋内注射装置を使用して、細胞が心筋の特定の部位(薄壁の梗塞範囲)を正確に標的とできることを示している。注射部位での滞留全体は、この供給方式を用いて約4%である。心臓壁に留まらなかった細胞は、おそらく針跡を通して漏出し心室内に戻ったか、または心臓静脈系に注射され、肺に到達したと思われる。注射された細胞の大多数が把握されてはないが、脳、腎臓、肝臓、または脾臓では大量に検出されていないため、検出するには低すぎるレベルの細胞が、動物の体内に分散したと思われる。

10

【0120】

Biosense注射カテーテルシステムを使用した自己骨格筋芽細胞移植の安全性と可能性：表4は、自己骨格筋芽細胞の特徴付けの結果をまとめている。筋芽細胞移植媒体での最終調製時に、細胞の生存率は60%～96%であり、動物実験現場での筋芽細胞の受け取り時には、生存率は低下していた。全ての移植細胞は、USSPの濾過滅菌およびエンドトキシンLAL試験に合格した。

20

【0121】

【表5】

表4:対照および細胞移植動物への投与

群	ブタ番号	注射された細胞数	輸送時	移植前	細胞生存率(%)		容量／注射(ml)	総注射量(ml)
					純度%*	注射回数		
対照	03	媒体	N/A	N/A	N/A	20	0.15	3.0
対照	08	媒体	N/A	N/A	N/A	28	0.10	2.8
1	06	233×10^6	77	54	ND	19	0.10	1.9
1	07	302×10^6	96	79	30	19	0.10	1.9
2	09	595×10^6	89	60	35	39	0.15	5.9
2	11	756×10^6	81	73	62	31	0.15	4.7

30

* FACSによる7インテグリン免疫染色率

N/A - 該当なし ND - 実施せず

対照動物(第1群)は、第2および3群における対応する治療動物と同様の注射回数および注射容量で、筋芽細胞移植媒体を注射された。第2群の動物は、1回100μLの19回の注射で、約 300×10^6 細胞を注射された。第3群の動物は、1回100～150μLの31から39の注射で、約 600×10^6 細胞を注射された。表4には、用量特性を詳細に記載している。

40

【0122】

全ての群において、カテーテルによる自己骨格筋芽細胞の供給に関連しての合併症または死亡はなかった。心拍リズムは、安静時仰臥位で選択された時点に取得した、埋め込み型ループ記録器(ILR)による、標準12誘導ECGを使用して監視された。ILRは、MIおよび移植の最中およびその後24時間、起動していた。さらなる照会が、各処置から2週間は週3回、移植と摘出との間には週1回おこなわれた。ILRは、非持続性心室頻脈の発現を1件、洞性頻脈の発現を2件記録したが、これらは全て移植前であった。

50

どの群においても、ASMT後60日間、ILRにより不整脈は記録されなかった（表5参照）。

【0123】

【表6】

表5:ループ記録器からの結果

群	ブタ番号	照会回数	不整脈	
			移植前	移植後
対照 第1群	1-001-03	23	1-NSVT MI後	0
	1-001-08	25	0	0
対照 第2群	1-001-06	23	0	0
	1-001-07	21	2-ST	0
対照 第3群	1-001-09	22	0	0
	1-001-11	21	0	0

NSVT = 非持続性心室頻脈、ST = 洞性頻脈

心筋機能：心臓の機能的評価は、対照と比較して治療群で発生したかもしれない、可能性と機能の変化を検出および比較するために実施された。移植時（ベースライン）、エコーによるEF、LVグラムによるEF、Bio-Zによる心指数、NOGAによる左室ユニポーラ電圧（LVUPV）、およびNOGAによる心尖ユニポーラ電圧（APUPV）において、治療および対象群間で優位な差は認められなかった。

【0124】

致死時、対照と比べ、治療群では心機能改善への一貫した傾向が見られた（表6）。3億と6億のASMを注射された動物間で、心機能の改善に明らかな違いがなかったことを考慮し、両治療群からのデータを解析のために蓄積した。盲検的心エコー評価により、治療された動物は、エコーによるEFでは、対照動物の-10%悪化に対し15%改善を、またLVグラムによるEFでは、対照動物の12%悪化に対し2%減少を示した。最後に、APUPV中間値は、治療動物では23%改善したが、対照動物では4%低下した。

【0125】

【表7】

表6:ASMT時（ベースライン）および60日後（致死）における心機能パラメータ

駆出率					
	エコー	LVグラム	心指数	LVUVP	APUPV
対照 : 第1群 (n=2)					
ベースライン	49	43	0.85	7.8	7.5
致死	44	38	0.65	9.3	7.2
変化%	-10	-12	-24	19	-4
治療 : 第2および3群 (n=4)					
ベースライン	46	42	0.95	7.9	7.7
致死	53	41	0.83	9.3	9.5
変化%	15	-2	-13	18	23

試験化学データ：ベースライン、移植（心筋梗塞1ヶ月後）、および摘出（移植2ヶ月

10

20

30

40

50

後)において、完全血球算定、血小板、白血球分類、血中尿素窒素、電解質、重炭酸塩、アニオンギャップ、クレアチニン、LFT、アルカリホスファターゼ、クレアチン、B型ナトリウム利尿ペプチド、カルシウムとリン酸塩、尿酸、コレステロール、およびトリグリセリド値の有意な変化は測定されなかった。さらに、選択されたどの時点においても、治療の2群と対照との間に有意な差は認められなかった。

【0126】

組織学的検査：各治療ブタの左室前壁を通して採取された切片の組織学的分析は、移植60日後に細胞が生存していないことを示した。注射された筋芽細胞、あるいはより成熟した多核筋管は、H&Eおよびトリクロム染色、または筋芽細胞特異的なミオシン重鎖免疫染色(MY-32)により検出されなかった。H&Eおよびトリクロム染色による形態評価は、形態評価の存在の有無を確定的に判断するには、十分な感度を有さない。また、全動物において細胞核BrDUの免疫染色は陰性であった。被移植ブタの病変は、対照動物のものより重度ではなく、または量的に異ならなかった。

これらのデータを合わせると、経皮的なカテーテルによる自己骨格筋芽細胞の移植は、受容動物の全般的健康、または梗塞を起こしたブタの心筋に有害効果を及ぼさないことが示される。さらに、対照と比べ、2つの治療群で確認された心筋機能の改善への傾向は、安全性の結果を裏付けるだけでなく、カテーテルによる供給は可能であり、より優れた全体的心機能につながることを示している。

【0127】

考察

実験的に、筋芽細胞は、数々の方法を用いて、損傷心臓に供給されてきたが、これには冠循環への血管内注入(Taylorら、Proc. Assoc. Am. Physicians 109:245-253、1997年。参照により本開示に含まれる)、筋芽細胞の損傷心筋への直接注射(Taylorら、Proc. Assoc. Am. Physicians 109:245-253、1997年; Dibら、Circulation 108(sup[rho]117):IV-623、2003年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる)、また最も近年ではカテーテルによる心室内供給(Dibら、J. Endovasc. Ther. 9:313-319、2000年。参照により本開示に含まれる)が含まれる。カテーテルによる供給は、心筋壁が回復する組織よりも薄いことから、直接注射よりも難しい。そのため、細胞を薄壁に供給するための針注射カテーテルの使用が検討され、穿孔と細胞漏出のリスクが評価された。

【0128】

治療されたブタのうち1頭を検査することにより、梗塞を起こした心筋におけるイリジウム標識された自己骨格筋芽細胞の4.1%の生体内滞留率が得られた。人体試験により、心外膜供給で移植された筋芽細胞が生存し、筋管および筋原纖維を形成することは知られている(Menashenら、J. Am. Coll. Cardiol. 41:1078-1083、2003年。参照により本開示に含まれる)。さらに、移植5ヵ月後のLVAD患者から外植された心臓の組織学的分析は、骨格筋遅筋ミオシンの発現を示し、移植物が異環境で生存できることを示唆した(Paganiら、J. Am. Coll. Cardiol. 41:879-888、2003年。参照により本開示に含まれる)。

【0129】

ここに提示される安全性と可能性の研究では、経皮的カテーテルによる供給方法での移植処置に関連する合併症は見られなかった。外科的に埋め込まれたループ記録器への照会では、総容量5.85mLの最高6億の細胞が注射されたときの不整脈が示されなかった。2ヵ月後、炎症または腫瘍形成過程の徵候である可能性がある心筋酵素の上昇はなかった。心筋酵素後、細胞移植処置前までに発症した合併症は観察されなかったが、ブタの1頭は心筋梗塞を生き延びず、1頭は持続性VTを有し、2頭は洞性頻脈を有した。

【0130】

MY-32による組織化学的染色での陰性に関わらず、心エコー検査、左心室造影、および導電性の出力により、心機能改善への傾向が認められた。この矛盾した結果は、治療

群における改善が、心筋梗塞範囲の他の細胞型の動因、新生血管形成、またはさらなるアポトーシスの防止によるものである可能性を示唆している。これはまた、移植された筋芽細胞の寿命は、心筋機能の長期改善に不可欠でなくてよいという概念も生み出す。

【0131】

本研究の限界の1つは、心エコー検査結果は盲検的に判定されたが、左心室造影の結果は判定されなかったことである。この評価の盲検判定は、結果の精度を向上させていた可能性がある。

【0132】

ブタ以外の種における、多数の動物および臨床試験から（ラット（Jainら、*Circulation* 103: 1920、2001年。参照により本開示に含まれる）、ウサギ（Taylor、*Nature Med.* 4: 929、1998年）、ヒツジ（Hostine、*Circulation* 106 [suppl I]: I-131-I-136、2002年）、ヒト（Hagege、*Lancet* 361: 492、2003年；Paganisら、「Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischaemia-damaged myocardium in humans」、*J. Am. Coll. Cardiol.* 41: 879-888、2003年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）、心外膜供給により移植された筋芽細胞が生存し、筋管および筋原纖維を形成することが知られているが、これは移植された筋芽細胞が異環境でも生存できることを示唆している。現在我々は、ブタの筋芽細胞が、正常なまたは梗塞を起こした心筋で、筋芽細胞を長期間生存させられない特異的性質を有すると推測している。この結論は、心外膜に注射されたブタ筋芽細胞を用い、移植後数日以上のASM生存を示さなかった他の研究（データは示さない）における、未公開の発見に基づいている。文献では、ブタの心臓における筋芽細胞移植の短期研究（Brasseletら、「The coronary sinus: A safe and effective route for percutaneous myoblast transplantation」、*J. Am. Coll. Cardiol.* 41: 67A-68A、2003年；Chazaud、*Cardiovasc. Res.* 58: 444-450、2003年。これらはそれぞれ参照により本開示に含まれる）についての参考資料はあるが、ASM生存を説明する長期研究についてのものはない。

10

20

30

40

50

【0133】

要約すると、得られたデータは、自己骨格筋芽細胞の、経皮的な心室内手法による、コイル梗塞を起こしたブタ心筋への供給は、処置あるいは細胞への毒性に関連する有害事象を伴わず、安全におこなわれるであろうことを示している。さらに、本結果は、自己骨格筋芽細胞のカテーテルによる供給が実現可能で、その処置が心機能の改善につながるという過去の研究を裏付ける。

【0134】

（その他の実施形態）

上述は、本発明の限定されない望ましい実施例の一部についての記載である。当業者には、以下の請求項に定められる本発明の精神または要旨から逸脱することなく、この記載に対するさまざまな変更および修正が加えられてよいことは明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】図1は、虚血性心不全（HF）のヒツジへの自己骨格筋芽細胞（ASM）注射の6週間後の、染色部分を示しているが、複合トリクロム（A）および骨格筋特異的ミオシン重鎖（B、MY-32、紫色染色）染色は、心筋瘢痕の部位に生着したASM由来骨格筋纖維の広範な斑紋を示している。パネルCおよびDでは、パネルAよりも高い拡大率で（矢印）、骨格筋纖維がお互いに整列し、さらに筋原纖維束を編成しているのが見られた（パネルCおよびD）。ASM由来骨格筋は、残存心筋細胞（パネルE、「c」）と整列し、MY-32の染色により確認される近接の骨格筋筋線維と整列した（F）。パネルB、

D および F のスケールバーは、それぞれ 2 mm、0.5 mm、および 0.2 mm である。【図 2】図 2 は、トリクロム染色 (A) により見られる、心筋線維症予および瘢痕の範囲内にある生筋を示している。MY-32 による染色 (B) は、残存心筋細胞 ('c') の隣接に整列して生着した ASM 由来骨格筋が、トロポニン-I (C) に選択的に染色されないことを確認した。同じ部位からの (C、矢印) 高い拡大率では、ASM 由来骨格筋細胞は、残存心筋細胞 ('c') と非常に緊密な並列であるが、コネキシン 43 (D) に染まっていない。パネル A および D のスケールバーは、それぞれ 0.2 mm および 0.1 mm である。

【図 3】図 3 は、単一のヒツジの、微少塞栓術の前後 (上および中央のパネル) の左室容積 (L V V) および左室圧 (L V P) の出力記録を表しているが、ハイライトは、ESP VR (中央)、および微少塞栓術後の ASM 移植 (下パネル、丸) を伴う、または伴わない PR SW (下、四角) で変化している。ASM 移植は、第 1 週目のあと (および) に心機能 (傾斜) を改善しなかったが、移植は第 6 週目 (および) に、HF 対照動物に見られる PR SW における右方向の移行を防止した。

【図 3 A】図 3 は、単一のヒツジの、微少塞栓術の前後 (上および中央のパネル) の左室容積 (L V V) および左室圧 (L V P) の出力記録を表しているが、ハイライトは、ESP VR (中央)、および微少塞栓術後の ASM 移植 (下パネル、丸) を伴う、または伴わない PR SW (下、四角) で変化している。ASM 移植は、第 1 週目のあと (および) に心機能 (傾斜) を改善しなかったが、移植は第 6 週目 (および) に、HF 対照動物に見られる PR SW における右方向の移行を防止した。

【図 3 B】図 3 は、単一のヒツジの、微少塞栓術の前後 (上および中央のパネル) の左室容積 (L V V) および左室圧 (L V P) の出力記録を表しているが、ハイライトは、ESP VR (中央)、および微少塞栓術後の ASM 移植 (下パネル、丸) を伴う、または伴わない PR SW (下、四角) で変化している。ASM 移植は、第 1 週目のあと (および) に心機能 (傾斜) を改善しなかったが、移植は第 6 週目 (および) に、HF 対照動物に見られる PR SW における右方向の移行を防止した。

【図 3 C】図 3 は、単一のヒツジの、微少塞栓術の前後 (上および中央のパネル) の左室容積 (L V V) および左室圧 (L V P) の出力記録を表しているが、ハイライトは、ESP VR (中央)、および微少塞栓術後の ASM 移植 (下パネル、丸) を伴う、または伴わない PR SW (下、四角) で変化している。ASM 移植は、第 1 週目のあと (および) に心機能 (傾斜) を改善しなかったが、移植は第 6 週目 (および) に、HF 対照動物に見られる PR SW における右方向の移行を防止した。

【図 4】図 4 は、左室拡張 (ESVI、上パネル) および中隔乳頭の短軸の長さ (SA、中央パネル) の増加が、心不全対照 (N = 6、斜線棒グラフ) と比較して、ASM 注射後 (N = 5、無地棒グラフ) に減衰したことを表している。左室の長軸の長さ (LA、下パネル) は、群間で違いがなかった。HF 対照 ('なし') を含む全動物は、ASM 由来筋細胞生存 (ログ) の LV リモデリング (各パネルに挿入、N = 11) との関係を評価するために使用された。ASM 由来筋細胞生存が最高であった動物は、特に LV の短軸拡張において、最大の減衰を示した。それぞれの関係に、相関統計が提示されている。

【図 4 A】図 4 は、左室拡張 (ESVI、上パネル) および中隔乳頭の短軸の長さ (SA、中央パネル) の増加が、心不全対照 (N = 6、斜線棒グラフ) と比較して、ASM 注射後 (N = 5、無地棒グラフ) に減衰したことを表している。左室の長軸の長さ (LA、下パネル) は、群間で違いがなかった。HF 対照 ('なし') を含む全動物は、ASM 由来筋細胞生存 (ログ) の LV リモデリング (各パネルに挿入、N = 11) との関係を評価するために使用された。ASM 由来筋細胞生存が最高であった動物は、特に LV の短軸拡張において、最大の減衰を示した。それぞれの関係に、相関統計が提示されている。

【図 4 B】図 4 は、左室拡張 (ESVI、上パネル) および中隔乳頭の短軸の長さ (SA、中央パネル) の増加が、心不全対照 (N = 6、斜線棒グラフ) と比較して、ASM 注射後 (N = 5、無地棒グラフ) に減衰したことを表している。左室の長軸の長さ (LA、下パネル) は、群間で違いがなかった。HF 対照 ('なし') を含む全動物は、ASM 由来

10

20

30

40

50

筋細胞生存（ログ）の L V リモデリング（各パネルに挿入、N = 11）との関係を評価するために使用された。A S M 由来筋細胞生存が最高であった動物は、特に L V の短軸拡張において、最大の減衰を示した。それぞれの関係に、相関統計が提示されている。

【図 4 C】図 4 は、左室拡張（E S V I、上パネル）および中隔乳頭の短軸の長さ（S A、中央パネル）の増加が、心不全対照（N = 6、斜線棒グラフ）と比較して、A S M 注射後（N = 5、無地棒グラフ）に減衰したことを表している。左室の長軸の長さ（L A、下パネル）は、群間で違いがなかった。H F 対照（「なし」）を含む全動物は、A S M 由来筋細胞生存（ログ）の L V リモデリング（各パネルに挿入、N = 11）との関係を評価するために使用された。A S M 由来筋細胞生存が最高であった動物は、特に L V の短軸拡張において、最大の減衰を示した。それぞれの関係に、相関統計が提示されている。

【図 5】図 5 は、N O G A B i o s e n s e ナビゲーションシステムからの画像である。前壁中隔および前壁心尖部の壁の短縮前後の3次元電気機械的（電圧）マッピング。N O G A マップのカラーコーディングは、電圧の高いものから低いものへと、紫（> 15.00 mV）から赤（< = 5.00 mV）の虹形式で表される。

【図 6 A】図 6 は、生着した筋芽細胞のマッソン・トリクローム組織像を示している。A) 筋芽細胞注射後の梗塞を起こした心筋の低倍率（10 X）画像（右）。右下隅の部分は、赤に染色される正常心筋である。青に染色された部分は、瘢痕化した梗塞部分に見られる纖維性細胞を示している。心内膜表面の赤い斑点状の部分（矢印）は、増殖筋芽細胞を含んでいるが、これは高倍率画像（左上；H & E、原型拡大200 X）でより認識しやすい。B) 筋芽細胞は、多核筋管を形成している。

【図 6 B】図 6 は、生着した筋芽細胞のマッソン・トリクローム組織像を示している。A) 筋芽細胞注射後の梗塞を起こした心筋の低倍率（10 X）画像（右）。右下隅の部分は、赤に染色される正常心筋である。青に染色された部分は、瘢痕化した梗塞部分に見られる纖維性細胞を示している。心内膜表面の赤い斑点状の部分（矢印）は、増殖筋芽細胞を含んでいるが、これは高倍率画像（左上；H & E、原型拡大200 X）でより認識しやすい。B) 筋芽細胞は、多核筋管を形成している。

【図 1 A】



FIG. 1A

【図 1 B】

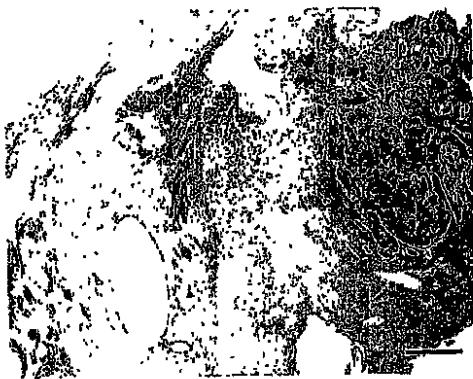


FIG. 1B

【図 1 C】

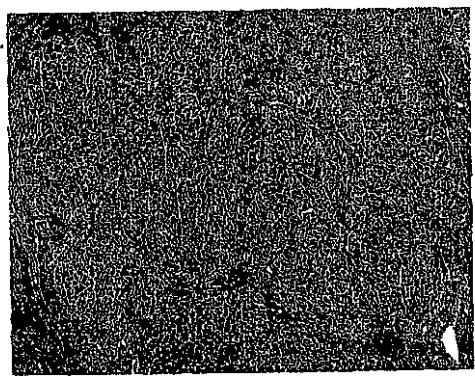


FIG. 1C

【図 1 D】

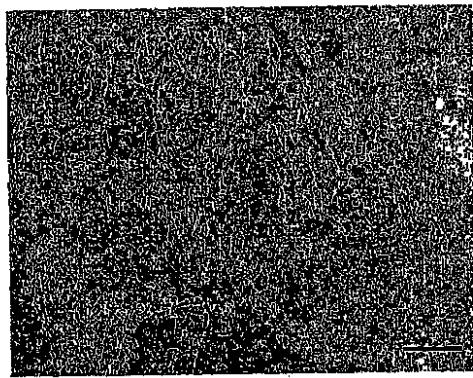


FIG. 1D

【図 1 E】



FIG. 1E

【図 1 F】

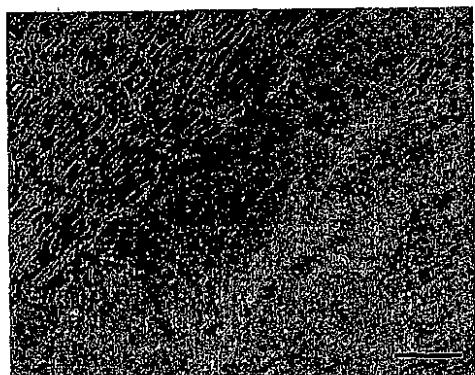


FIG. 1F

【図 2 A】

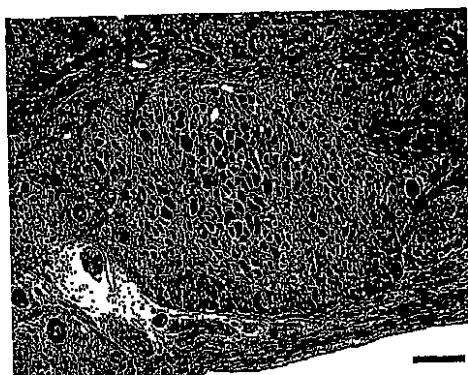


FIG. 2A

【図 2 B】



FIG. 2B

【図 2 C】



FIG. 2C

【図 2 D】

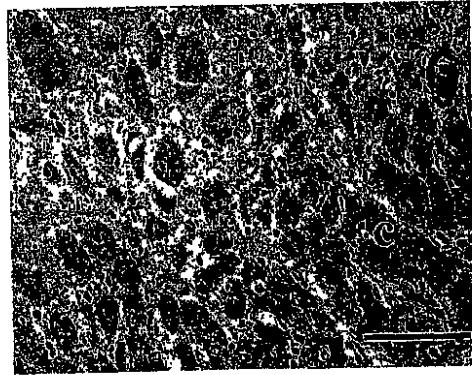


FIG. 2D

【図 3 A】

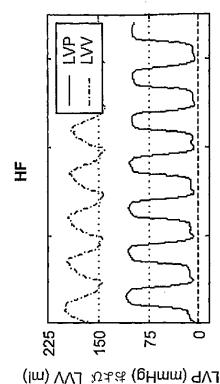
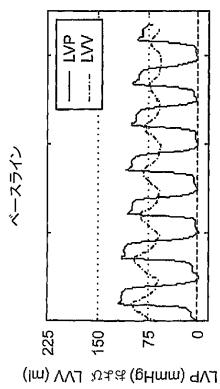


FIG. 3A



【図 3 B】

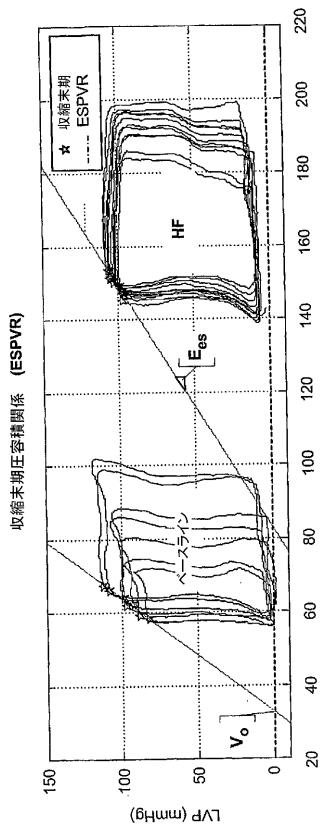


FIG. 3B

【図 3 C】

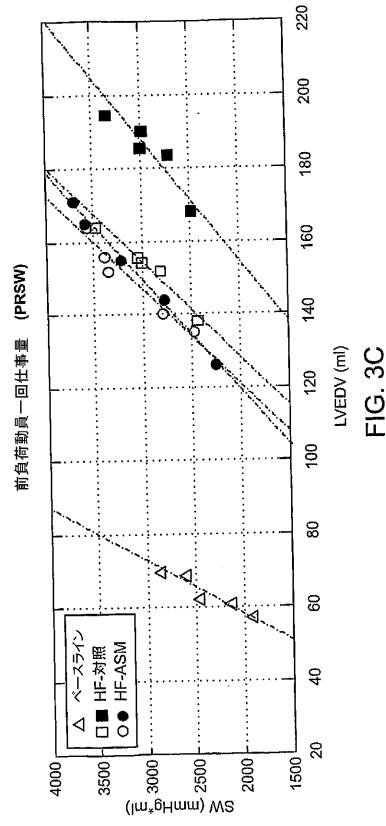


FIG. 3C

【図 4 A】

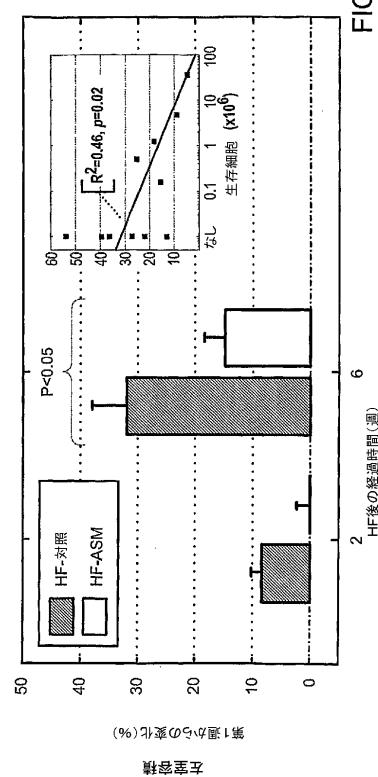


FIG. 4A

【図 4 B】

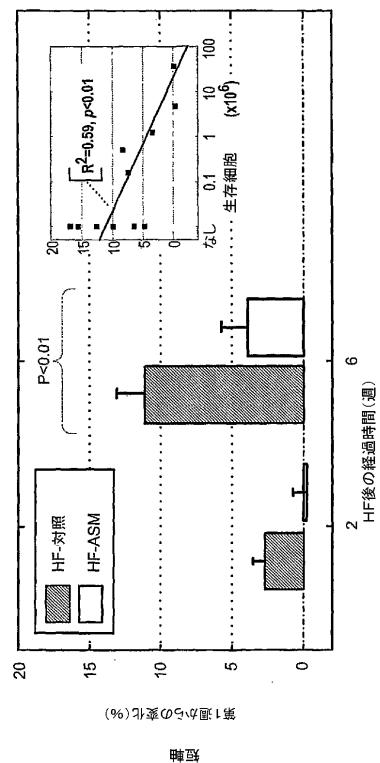


FIG. 4B

【図 4 C】

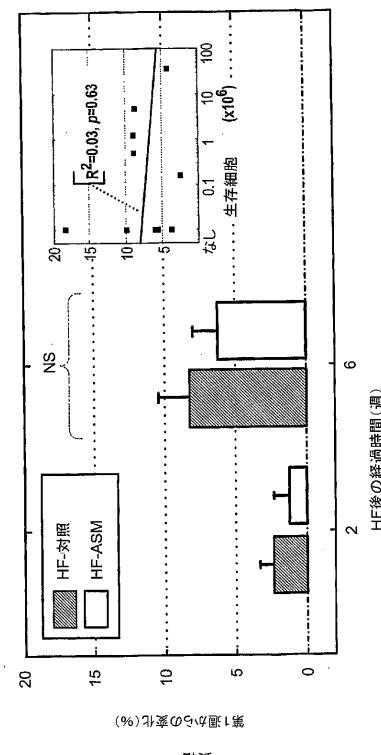


FIG. 4C

【図 5】

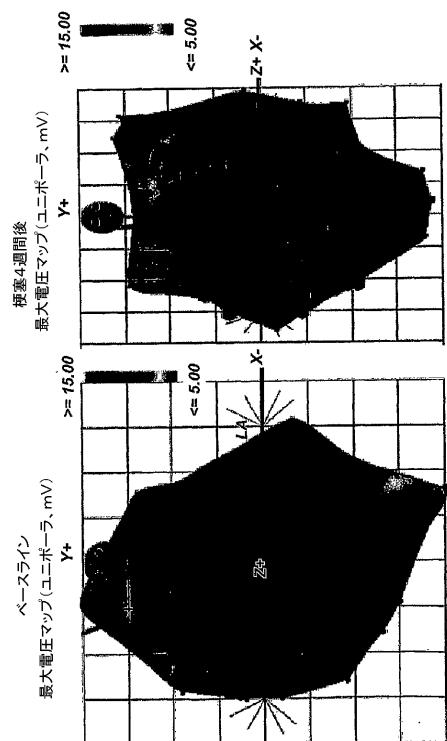


FIG. 5

【図 6 A】

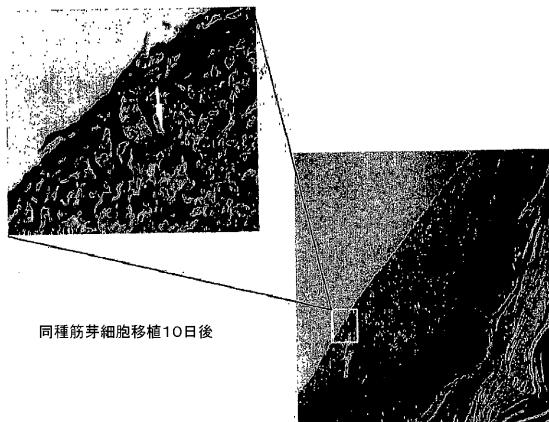


FIG. 6A

【図 6 B】

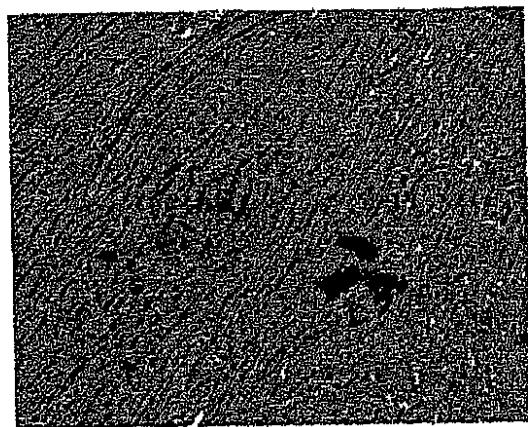


FIG. 6B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/17683															
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 63/00 (2007.01) USPC - 424/93.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																	
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) -A01N 63/00 (2007.01) USPC - 424/93.7; 435/366, 372; 128/898</p>																	
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) MicroPatent, IP.com, DialoPro																	
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2003/0113301 A1 (EDGE et al) 19 June 2003 (19.06.2003) entire document</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2001/22978 A2 (CHIU et al) 05 April 2001 (05.04.2001) entire document</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,110,458 A (MICKLE et al) 29 August 2000 (29.08.2000) entire document</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,151,525 A (SOYKAN et al) 21 November 2000 (21.11.2000) entire document</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2003/0113301 A1 (EDGE et al) 19 June 2003 (19.06.2003) entire document	1-25	Y	WO 2001/22978 A2 (CHIU et al) 05 April 2001 (05.04.2001) entire document	1-25	A	US 6,110,458 A (MICKLE et al) 29 August 2000 (29.08.2000) entire document	1-25	A	US 6,151,525 A (SOYKAN et al) 21 November 2000 (21.11.2000) entire document	1-25
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	US 2003/0113301 A1 (EDGE et al) 19 June 2003 (19.06.2003) entire document	1-25															
Y	WO 2001/22978 A2 (CHIU et al) 05 April 2001 (05.04.2001) entire document	1-25															
A	US 6,110,458 A (MICKLE et al) 29 August 2000 (29.08.2000) entire document	1-25															
A	US 6,151,525 A (SOYKAN et al) 21 November 2000 (21.11.2000) entire document	1-25															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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																	
Date of the actual completion of the international search 10 May 2007		Date of mailing of the international search report 09 AUG 2007															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISAVUS, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>															

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ディンズモア, ジョナサン エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02445, ブルックライン, ホワイト プレイス 2
6

F ターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB44 BB63 CA04 MA67 NA06 NA14 ZA36
4C167 AA02 AA21 CC19