

(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
2012 年 10 月 4 日(04.10.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/133945 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
A61P 9/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/059427
- (22) 国際出願日: 2012 年 3 月 30 日(30.03.2012)
- (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 2011-076235 2011 年 3 月 30 日(30.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人東京女子医科大学(TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1628666 東京都新宿区河田町 8-1 Tokyo (JP). 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてののみ): 岡野 光夫(OKANO, Teruo) [JP/JP]; 〒1628666 東京都新宿区河田町 8-1 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP). 清水 達也(SHIMIZU, Tatsuya) [JP/JP]; 〒1628666 東京都新宿区河田町 8-1 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP). 山下 潤(YAMASHITA, Jun) [JP/JP]; 〒6068507 京都府京都市左京区聖護院川原町 5 3 国立大学法人京都大学再生医科学研究所内 Kyoto (JP). 升本 英利(MASUMOTO, Hidetoshi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー 3 2 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CARDIOMYOCYTE SHEET FROM EMBRYONIC STEM CELLS

(54) 発明の名称: 胚性幹細胞から心筋シートを製造する方法

図 1 3

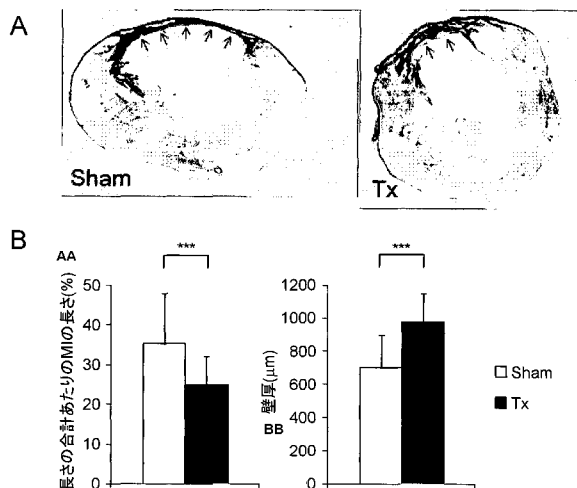


FIG. 13:
AA Length of MI relative to sum total of lengths (%)
BB Wall thickness (μm)

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing a cardiomyocyte sheet using a group of cells derived from embryonic stem cells. The method is characterized by mixing Flk/KDR-positive cells, cardiomyocytes, endothelial cells and parietal cells all derived from embryonic stem cells and culturing the mixed cells. The cardiomyocyte sheet is so adapted as to release a VEGF therefrom, and therefore can be used as a therapeutic agent for heart diseases.

(57) 要約: この発明は、胚性幹細胞由来の細胞群を使用して心筋シートを製造する方法を提供するものであり、この方法は、胚性幹細胞由来の Flk/KDR 陽性細胞、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を混合して培養することを特徴としており、ならびに、この心筋シートは、該シートから VEGF が放出されることにより心疾患治療剤として利用され得る。



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, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

胚性幹細胞から心筋シートを製造する方法

技術分野

本発明は、胚性幹細胞由来の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を用いて心筋シートを製造する方法に関する。

本発明はまた、上記の方法によって得られた心筋シートを含む心疾患治療剤に関する。

背景技術

成人の心筋細胞は、ほとんど増殖しないため、虚血性心疾患等で欠損した心筋細胞は不可逆的な損傷となる。現在、臨床的に使用されるどの薬剤も処置も、機能性収縮組織で心筋瘢痕を置換することにおいて、効力を示していない。そこで、正常な心筋細胞を再生するための新規な治療が所望されており、別途製造された心筋細胞を投与する補充療法が提案されている。このような補充療法において、心筋細胞はレシピエントの心臓へ生着させるためシート状にして投与することが検討されている（非特許文献 1、特許文献 2）。さらに、シートにおける細胞量が不十分であるため期待された治療効果が得られないことから、シートを積層化して投与する必要があると考えられている（非特許文献 2）。

一方、シート作製のための心筋細胞の供給元として、胎児心筋細胞、筋芽細胞、脂肪組織由来幹細胞由来の心筋芽細胞、胚性幹細胞由来の心筋細胞を用いた方法が例示されている（特許文献 2、非特許文献 3）。

しかし、胚性幹細胞由来細胞のみで形成されたシートの投与による直接的な効果によって心機能が改善されたとの報告はない。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 国際公開第 W02002/008387 号パンフレット

特許文献 2 特表 2007-528755 号公報

非特許文献

非特許文献 1 Shimizu, T, et al, Biomaterials 24, 2309-2316, 2003

非特許文献 2 Shimizu T, et al. FASEB J. 20: 708-10, 2006

非特許文献 3 Bel A, et al. Circulation. 122:S118-23, 2010

発明の概要

本発明の目的は、胚性幹細胞由来の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を用いて心筋シートを製造する方法およびそれによって得られた心筋シートを含む心疾患治療剤に関する。したがって、本発明の課題は、胚性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞へ分化誘導して得られた細胞を混合して作製された心筋シートを提供することである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、胚性幹細胞を Flk/KDR 陽性細胞を製造し、温度応答性ポリマーを被覆した培養皿上でこの Flk/KDR 陽性細胞から作製した心筋細胞ならびに内皮細胞および壁細胞を含有する細胞群を混合し培養することで、シートを得られることを見出した。さらに、このシートを移植することで生着し、心機能を改善できることを確認した。

以上の結果から、本発明者らは、胚性幹細胞由来の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を用いて製造された心筋シートによる心筋梗塞モデルを治療することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の特徴を包含する。

[1]以下の工程 (a) および (b) :

(a) 胚性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞をそれぞれ製造する工程、および

(b) 前記 Flk/KDR 陽性細胞へ前記心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を混合することによりシートを形成させる工程

を含む、胚性幹細胞由来の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞からシートを製造する方法。

[2]前記 Flk/KDR 陽性細胞が、胚性幹細胞をゼラチン被覆培養器材上で培養する

ことにより誘導される、[1]に記載の方法。

[3]前記工程(a)において、心筋細胞が、シクロスポリン A の存在下で前記 Flk/KDR 陽性細胞を培養することにより製造される、[1]または[2]に記載の方法。

[4]前記工程(a)において、内皮細胞および壁細胞が、VEGF および cAMP の存在下で前記 Flk/KDR 陽性細胞を培養することにより製造される、[1]または[2]に記載の方法。

[5]前記工程(b)において、Flk/KDR 陽性細胞を1~7日間、好ましくは3日間培養した後に、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を混合させる、[1]~[4]のいずれかに記載の方法。

[6]前記工程(b)において、温度応答性ポリマーを被覆した培養器材を用いてシートを形成させる、[1]~[5]のいずれかに記載の方法。

[7]前記工程(b)において、混合後 VEGF の存在下でさらに培養することによりシートを形成させる、[1]~[6]のいずれかに記載の方法。

[8]前記シートを積層化する工程をさらに含む、[1]~[7]のいずれかに記載の方法。

[9]前記積層化が3層である、[8]に記載の方法。

[10][1]~[9]のいずれかに記載の方法で得られた心筋シートを含む心疾患治療剤。

[11] 心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から成る混合細胞。

[12] 前記心筋細胞を少なくとも40%以上含む、[11]に記載の細胞。

[13] 前記内皮細胞を少なくとも3%以上含む、[11]~[12]のいずれかに記載の細胞。

[14] 前記壁細胞を少なくとも50%以上含む、[11]~[13]のいずれかに記載の細胞。

[15] 前記混合細胞が、シートの形状である、[11]~[14]のいずれか1項に記載の細胞。

[16] 前記心筋細胞、内皮細胞および壁細胞が、胚性幹細胞から製造された細胞である、[11]~[15]のいずれかに記載の細胞。

[17] 前記混合細胞が、ヒト由来の細胞である、[11]～[16]のいずれかに記載の細胞。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2011-076235 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、温度感受性皿への共培養前の CM, EC component のそれぞれの FACS の結果およびシート形成後の FACS の結果を示す。図中、APC; Allophycocyanin, PE; phycoerythrin, SSC; side scatter, GFP; green fluorescent protein, FITC; fluorescein isothiocyanate を表す。

図2は、(A)シリウスレッド染色像（上）：細胞培養皿接着部に細胞外マトリクスの層状形成を認める。H-E 染色像（中）：3-4 層の細胞がシートを構成している。cTnT 染色像（下）：cTnT 陽性細胞はシートの主な構成成分として存在している。(B) 多光子レーザー顕微鏡によるシート断面像。(C) シート表面像。CM の間に EC が散在を認める。図中、H-E; ヘマトキシリン・エオジン, cTnT; cardiac troponin T, Scale bar=200 μ m を表す。

図3は、(A)MED64 プローブ上に接着されたシート像。(B)各電極での細胞外電位を示す。(C) (B)で測定した電位の分布を示す。peak negative potential の最も高い電極（図の下部）をゼロ点として、そこから各電極の peak negative potential への時間差（秒）にて色分けを行った。下部より上部に向かう伝導を認める。

図4は、培養上清に対する ELISA による各サイトカインの測定結果を示す。シート形成中（Condition 1）およびシート作成後（Condition 2）において、VEGF が無血清培地と比較し極めて多量であることが示された。図中、SF; serum free, TNF α ; tumor necrosis factor- α , IGF-1; insulin-like growth factor-1, VEGF; vascular endothelial cell growth factor, bFGF; basic fibroblast growth factor, IFN γ ; interferon- γ , EGF; epithelial growth factor, HGF; hepatocyte growth factor を表す。

図5は、細胞シート積層化の方法の模式図を示す。

図 6 は、心筋細胞 (CM) 添加もしくは不添加により作製したシートの VEGF の産生量を比較したグラフを示す。(A) 心線維芽細胞 (CF) シートにおける定量性 RT-PCR の値と比較した結果を示す。(B) 培養上清を用いた ELISA の結果を示す。図中、**： $p < 0.01$ を表す。

図 7 は、(A) Group1 (左図：心筋シートを回収直後) での代表的未分化コロニー (矢印) および Group2 (右図；LIF を加えて 3 日継続培養したもの) の増大コロニーを示す。(B) 各 Group における未分化コロニー数を示す。(C) 各 Group における平均コロニー面積を示す。(D) 各 Group の全コロニーをサイズを順に示す。5,000 μm^2 以上のものを赤で表示した。5,000 μm^2 以上を Positive とし 5,000 μm^2 以下を Negative として、各 Group のコロニー数およびその割合を表に示す。有意差検定は Fisher の正確確率検定を使用した。図中、Scale bar=100 μm , *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, N.S.; 有意差なしを表す。

図 8 は、(A) 積層化後シートの肉眼的所見を示す。(B) 積層化後シートの光学顕微鏡像を示す。(C) シート移植後の肉眼的所見を示す。矢印は積層化シートを指す。

図 9 は、心臓超音波検査の結果を示す。(A) 心筋シート移植群での M モード図の経時的変化を示す。梗塞壁 (図上部) の壁運動が移植後経時的に回復していることを認める。左室内径短縮率 (FS) (B)、左室断面変化率 (FAC) (C)、収縮期壁厚増加率 (D) の経時的変化をそれぞれ示す (いずれも左室収縮能の指標)。(D) では梗塞壁 (左図) において治療群での有意な増加を示すのに対し、非梗塞壁 (右図) では変化を認めない。治療後 4 週 (Tx4w) において治療群では非梗塞壁とほぼ同様の値まで回復しているのが示されている。(E) 非収縮範囲 (AL) の経時的変化を示す (梗塞部位範囲の指標)。(F) 治療前 (PreTx) に対する拡張期左室内腔面積の変化率を示す (左室拡大の指標)。図中、PreTx; 治療前, Tx2w; 治療後 2 週目, Tx4w; 治療後 4 週目, LV; 左室。† : $p < 0.05$, ‡ : $p < 0.01$ (vs PreTx, paired t-test), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (vs. Sham(B)(C)(D) または Tx(E)(F), unpaired t-test) を表す。

図 10 は、左室容量圧曲線測定検査結果を示す (A) Sham 群 (左図) および治療群 (右図) での前負荷減少に伴う容量圧曲線偏移を示す。収縮末期左室弾性率 (Ees)

は矢印で示す直線の傾きで示される。(B) Sham 群 (白) および治療群 (黒) の Ees (左図) および時定数 (Tau) (右図) をそれぞれ示す。Ees は左室収縮能を (高値だと収縮能が高い)、Tau は左室拡張能を (低値だと拡張能が高い) それぞれ示す。図中、***: $p < 0.001$, N.S.: 有意差なしを表す。

図 1 1 は、(A) 移植後 1 日目 (左図)、1 週日目 (中図)、4 週日目 (右図) の FISH (マウス由来細胞: 黄色) および cTnT 免疫染色像 (赤色) を示す。移植後 28 日目 (Tx-d28) の生着部位を矢印で示す。(B) 移植後 7 日目の connexin43 (緑色) 免疫染色像を示す。左下の白線で囲まれた図は、正常心筋層の像を示す。正常心筋層のように整った構造にはまだなっていないが、生着心筋塊の内部に connexin43 陽性の部位を認める (矢印)。図中、Cx43; connexin 43、scale bar=200 μm (A), 50 μm (B) を表す。

図 1 2 は、移植後 1 日目 (Tx-d1)、3 日目 (Tx-d3)、1 週目 (Tx-d7)、4 週目 (Tx-d28) のグラフト由来生着心筋細胞の FISH (マウス由来細胞: 黄色) および cTnT 免疫染色像 (赤色) を示す。移植後 1 日目では cTnT 陽性部位が細胞質内に粒上に点在しているが、移植後 3 日目、1 週目と経時的な線維状構造の形成を認める。移植後 4 週目ではグラフト由来心筋細胞 (矢印) とレシピエント心筋細胞 (矢頭) は形態的にはほぼ同一に観察される。図中、scale bar=25 μm を表す。

図 1 3 は、(A) Sham 群 (左) および治療群 (Tx: 右) のシリウスレッド染色像を示す。治療群において壁菲薄化が抑えられ、梗塞領域の減少を認める。(B) Sham 群 (白) および治療群 (Tx: 黒) に対する梗塞領域の割合 (左図) と壁厚 (右図) を示す。図中、***: $p < 0.001$ を表す。

図 1 4 は、(A) 移植後 1 日目 (Tx-d1: 左図)、3 日目 (Tx-d3: 中図)、7 日目 (Tx-d7: 右図) の FISH (マウス由来細胞: 黄色)、cTnT 免疫染色像 (赤色)、von Willebrand factor (vWF) 免疫染色像 (緑色) を示す。(B) 移植後 3 日目の蛍光顕微鏡の各拡大像を示す。GFP 陽性のグラフト由来心筋細胞塊の内部に管腔構造を伴った vWF 陽性部位が一部認められる。さらに明視野にて観察すると、その管腔内に赤血球が認められる。(C) 移植後 3 日目の FISH および vWF 免疫染色による蛍光顕微鏡の各拡大像を示す。新生血管の一部にマウスのシグナル (黄色) を認める。図中、Scale bar=200 μm (A), 500 μm (B) 右上, 50 μm (B) 右下を表す。

図 15 は、移植後 4 週における新生血管密度(capillary density)の測定結果を示す。(A) 移植後 4 週における治療群のマッソン・トリクローム染色像を示す。図中、梗塞中央部 (Central-MI) と梗塞周辺部 (Peri-MI) を示す。(B) 治療群 (Tx) と Sham 群のそれぞれ梗塞周辺部と中央部の cTnT (赤色)、vWF (緑色) の染色像を示す。周辺部および中央部ともに治療群において管腔構造を伴う vWF 陽性部位の著明な形成を認める。(C) 図 (A) に示す各群における Central-MI および Peri-MI 部位の capillary density を示す。図中、**: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ (unpaired t-test) を表す。

発明を実施するための形態

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明は、上記のとおり、(a) 胚性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞をそれぞれ製造する工程、および (b) 該 Flk/KDR 陽性細胞を、該心筋細胞、内皮細胞および壁細胞と混合することにより心筋シートを形成させる工程を含む、胚性幹細胞から心筋シートを製造する方法およびこの方法によって得られた心筋シートを含む虚血性心疾患などの心疾患の治療剤に関する。

<胚性幹細胞>

ES 細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚 (例えば胚盤胞) の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

ES 細胞は、受精卵の 8 細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES 細胞は、マウスで 1981 年に発見され (M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でも ES 細胞株が樹立された (J. A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

ES 細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を

線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサル ES 細胞の樹立と維持の方法については、例えば USP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. USA. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485 などに記載されている。

ES 細胞作製のための培養液として、例えば 0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSR 及び 4ng/ml β -FGF を補充した DMEM/F-12 培養液を使用し、37°C、2% CO₂/98% 空気の湿潤雰囲気下でヒト ES 細胞を維持することができる (O. Fumitaka et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:215-224)。また、ES 細胞は、3~4 日おきに継代する必要がある、このとき、継代は、例えば 1mM CaCl₂ 及び 20% KSR を含有する PBS 中の 0.25% トリプシン及び 0.1mg/ml コラゲナーゼ IV を用いて行うことができる。

ES 細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanog などの遺伝子マーカーの発現を指標にして Real-Time PCR 法で行うことができる。特に、ヒト ES 細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECAD などの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる (E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。

ヒト ES 細胞株は、例えば WA01(H1) および WA09(H9) は、WiCell Research Institute から、KhES-1、KhES-2 及び KhES-3 は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

<分化培地>

心筋シートを製造するための Flk/KDR 陽性細胞(Flk⁺細胞ともいう)、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の製造に使用される分化培地の例を以下に記載する。

培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば IMDM 培地、Medium 199 培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 α MEM 培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12 培地、RPMI 1640 培地、Fischer's 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。

培地はまた、必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES 細胞培養時の FBS の血清代替物)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの 1 つ以上の血清代替物を含んでもよいし、ならびに、脂質、アミノ酸、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの 1 つ以上の物質も含有しうる。

< 胚性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞を製造する方法 >

本発明において Flk/KDR 陽性細胞とは、少なくとも Flk/KDR を発現している細胞であり、ここで Flk/KDR とは、Flk1 または KDR を意味し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の受容体である。Flk1 は、NCBI の accession 番号 NM_010612 が例示され、KDR は、NCBI の accession 番号 NM_002253 が例示される。

Flk/KDR 陽性細胞は、胚性幹細胞を任意の方法で分化誘導して作製することができる (Yamashita J, et al, Nature. 408, 6808, 2000 または Yamashita JK, et al, FASEB J. 19:1534-6, 2005)、例えば、未分化維持をさせない条件 (LIF を培地へ加えないまたはフィーダー細胞を用いない) にて、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル™ (ベクトン・ディキンソン) などの物質でコーティングした培養皿を用いて、4 日から 5 日培養することで作製することができる。

< 胚性幹細胞から心筋細胞を製造する方法 >

本発明において心筋細胞とは、少なくとも心筋トロポニン (cTnT) または α MHC を発現している細胞を意味する。cTnT は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM_000364 が例示され、マウスの場合、NM_001130174 が例示される。 α MHC は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM_002471 が例示され、マウスの場合、

NM_001164171 が例示される。

胚性幹細胞を浮遊培養により細胞塊（胚様体）を形成させて心筋細胞への分化誘導を行うことができる。この他にも胚性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法としては、公知の方法を用いることができ、特に特定されるものではないが、例えば、BMP シグナル伝達を抑制する物質の存在下で分化誘導を行う方法（W02005/033298）、Activin A と BMP を順に添加させて分化誘導を行う方法（W02007/002136）、カノニカル Wnt シグナル経路の活性化を促す物質の存在下で分化誘導を行う方法（W02007/126077）および胚性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞を単離し、シクロスポリン A の存在下で分化誘導を行う方法（W02009/118928）を用いて胚性幹細胞から心筋細胞を分化誘導することができる。本発明において、好ましくは、胚性幹細胞を培養器材上で接着培養し、Flk/KDR 陽性細胞を製造した後、シクロスポリン A の存在下で分化誘導する方法である。培地中のシクロスポリン A の含有量は、例えば 0.1 から 30 μ g/mL、好ましくは、1 から 3 μ g/mL であるが、心筋細胞の分化誘導を可能にする任意の量とすることができる。培養器材は、細胞との接着性を向上させる目的で、その表面を、細胞支持物質、例えばコラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル™（ベクトン・ディキンソン）などの物質でコーティングすることができる。培養日数は、特に限定されないが、Flk/KDR 陽性細胞をシクロスポリン A の存在下で培養後、1 日から 10 日であり、好ましくは 4 日である。

本発明において心筋細胞は、単離精製されていてもよく、他の細胞種と混在していても良い。好ましくは、単離精製された細胞である。単離精製の方法として、特に限定されないが、例えば、N-カドヘリンなどの心筋細胞マーカーを指標として選別する方法（Honda M, et al, Biochem Biophys Res Commun. 29, 351, 877-82, 2006）、心筋細胞内のミトコンドリアを指標として選択する方法（W02006/022377）、低栄養条件で生存することができる細胞を選抜する方法（W02007/088874）を用いることができる。

<胚性幹細胞から内皮細胞および壁細胞を製造する方法>

本発明において内皮細胞とは、少なくとも PE-CAM、VE-cadherin およびフォン・ウィルブラント因子(vWF)のいずれか一つを発現している細胞を意味する。また、

壁細胞とは、少なくとも Smooth muscle actin (SMA) を発現している細胞を意味する。ここで、PE-CAM は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM_000442 が例示され、マウスの場合、NM_001032378 が例示される。VE-cadherin は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM_001795 が例示され、マウスの場合、NM_009868 が例示される。vWF は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM_000552 が例示され、マウスの場合、NM_011708 が例示される。SMA は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM_001141945 が例示され、マウスの場合、NM_007392 が例示される。

胚性幹細胞を浮遊培養により細胞塊（胚様体）を形成させて内皮細胞または壁細胞へ分化誘導を行うことができる。この他にも胚性幹細胞から内皮細胞または壁細胞を分化誘導する方法としては、公知の方法を用いることができ、特に特定されるものではないが、例えば、胚性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞を単離し、VEGF および cAMP の存在下で分化誘導を行う方法（Yamashita J, et al. Nature. 408: 92-6, 2000）を用いて胚性幹細胞から心筋細胞を分化誘導することができる。培地中の VEGF および cAMP の含有量は、内皮細胞または壁細胞を分化誘導可能であれば限定されないが、VEGF の場合、例えば 25ng/mL から 150ng/mL、好ましくは 50 から 100 ng/mL である。cAMP は、その誘導体（例えば 8-bromo-cAMP）を含む意味で使用されるが、その含有量は、非制限的に例えば 0.1 mmol/L から 2mmol/L、好ましくは 0.5 から 1 mmol/L である。培養日数は、特に限定されないが、Flk/KDR 陽性細胞を VEGF および cAMP の存在下で培養後、1 日から 10 日であり、好ましくは 3 日である。

本発明において内皮細胞または壁細胞は、互いに単離精製されていてもよく、内皮細胞または壁細胞が他の細胞種と混在して存在しても良い。

<心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から成る混合細胞>

本発明では、上記の方法を用いて得られた、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を同時に含有する、混合細胞を製造することができる。

この時、心筋細胞の含有率として、例えば、10%、20%以上、30%以上、40%以上または 50%以上であり、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下または 50%以下である。好ましい含有率は、40%以上であるより好ましい含有率は、40%以上および 50%以下の範囲である。

同様に、内皮細胞の含有率として、例えば、1%、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上または10%以上であり、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下または10%以下である。好ましい含有率は、3%以上であり、より好ましい含有率は、3%以上および10%以下の範囲である。

同様に、壁細胞の含有率として、例えば、10%、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上または60%以上であり、90%以下、80%以下、70%以下または60%以下である。好ましい含有率は、20%以上、30%以上、40%以上または50%以上であり、より好ましい含有率は、50%以上および60%以下の範囲である。

本発明において、前記混合細胞は、細胞培養物として単離されれば良く、好ましくは、シートの形状をした混合細胞である。

<心筋シートを製造する方法>

心筋シートとは、心臓または血管を形成する各種細胞から成り、細胞間結合により細胞同士が連結されたシート状の細胞集合体である。ここで、心臓または血管を形成する各種細胞とは上述の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞が例示される。

本発明において好ましい心筋シートは、細胞間の電氣的結合および配向性を有しており、VEGFを細胞外へ分泌している。

心筋シートは、少なくとも、上述の方法で作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を含む細胞を混合して培養することによって製造される。このとき培養に供する各細胞の細胞数は、例えば $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ である。本発明において、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞以外の細胞を含んでも良い。好ましくは、上述の胚性幹細胞由来の Flk/KDR 陽性細胞を1日から7日、好ましくは3日培養した細胞へ心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を混合して培養して製造される。ここで、心筋シート移植後の腫瘍の形成を防ぐ目的で多能性を保持している未分化細胞を除外して混合することが望まれる。多能性を保持している未分化細胞は、例えば、Nanog または Oct3/4 により認識することが可能である。

各細胞を混合後、培養液へ VEGF を添加してさらに培養してもよく、この時の培養日数は、1日から10日でよく、好ましくは4日である。

上記培養には、(メタ) アクリルアミド化合物、N- (若しくは N,N-ジ) アルキル置換 (メタ) アクリルアミド誘導体 (特開 2010-255001)、又はビニルエーテル

誘導体を重合させた温度応答性ポリマーを被覆した培養器材を用いてもよく、好ましくは、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを固定した培養器材である。尚、本培養器材は、UpCell としてセルシード社より購入することもできる。

本発明において、心筋シートの大きさは培養器材に依拠するが、好ましくは、移植対象の部位を覆うに十分な面積を有する。

作製した心筋シートは、積層化して用いても良く、好ましくは、3 層重ねた心筋シートである。積層化は、心筋シートを培養液中で重ねた（好ましくは、各心筋シートをずらして重ねた）後、培養液を除去する事によって接合させることができる。複数枚重ねる場合は、一度に同作業を行っても良く、好ましくは、1 層ごとに同作業を行う。

上記の方法で製造された心筋シートは、例えば、次のような特徴を有している。

- ・少なくとも、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を含み、心筋シートを構成する細胞構成比は、以下のものに限定されないが、例えば、心筋細胞 35～50%、内皮細胞 0.5～7%、壁細胞 45～63%である。

- ・内皮細胞が心筋細胞と心筋細胞の間に散在している。

- ・VEGF を発現し分泌する。

<心疾患の治療>

本発明で提供する心筋シートは、動物（好ましくはヒト）の心疾患の治療剤として用いることができる。心疾患の治療方法は、心筋シートを、所望の部分を覆うように配置することによって達成される。ここで、所望の部分を覆うように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。配置に際し、所望の部分が大きい場合は、組織を取り巻くように配置してもよい。また、心筋シートの配置は、所望の効果をを得るため、同部分へ数回の配置を行うこともできる。数回の配置を行う場合、心筋シートが組織へ生着し、血管新生を行うために十分な時間をおいて行うことが望ましい。

本発明における心疾患は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの疾患または障害による欠損等が挙げられる。

（実施例）

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれらの実施例によって制限されないものとする。

[実施例 1] 心筋シート作製

Yamashita JK, et al. FASEB J. 19:1534-6, 2005 に記載の aMHC プロモーターにより EGFP の発現が制御されるよう操作されたマウス ES 細胞株 (EMG7) を用いた。

Flk+細胞は、これまでに報告された方法により作製した (Yamashita J, et al. Nature. 408:92-6, 2000 または Yamashita JK, et al. FASEB J. 19:1534-6, 2005)。簡潔には、EMG7 または 20D17 を、分化培地 (10% ウシ胎児血清および 5×10^{-5} mol/L の 2-mercaptoethanol を添加した α MEM) を用いて、ゼラチンコーティングディッシュ上で 4 日間培養した後、FACS により Flk 陽性細胞を純化することで作製した。

上述の方法で得られた Flk+細胞からこれまでに報告された方法を用いて内皮細胞および壁細胞の混合細胞を作製した (Yamashita J, et al. Nature. 408:92-6, 2000 または Yurugi-Kobayashi T, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26:1977-84, 2006)。簡潔には、50 ng/ml の VEGF と 0.5 mmol/L の 8-bromo-cAMP を添加した分化培地を用いて、ゼラチンコーティングディッシュ上で 3 日間培養することにより得られた。

上述の方法で得られた Flk+細胞からこれまでに報告された方法を用いて心筋細胞を作製した (W02009/118928 または Yan P, et al. Biochem Biophys Res Commun. 379:115-20, 2009)。簡潔には、1-3 μ g/mL の Cyclosporin-A を添加した分化培地を用いて、mitomycin C 処理をした OP9 細胞上で 4 日間培養した後、GFP 陽性分画を分離することにより得られた。

心筋シートは、上記の複数種の細胞を用いて、次の方法により作製された。 2.5×10^4 から 4.0×10^4 の Flk+細胞を温度感受性培養皿 (UpCell、セルーシード社) 上に播種し、分化培地を用いて培養した。培養開始 3 日目に、 5.0×10^5 の上述の内皮細胞および壁細胞の混合細胞ならびに 5.0×10^5 の上述の心筋細胞を同培養皿へ播種し、VEGF を添加した分化培地を用いて 37°C にて培養した。心筋細胞添加 4 日後 (培養開始 7 日目) に室温に戻すことで培養皿より細胞をシート状に剥離さ

せ、心筋シートを得た。尚、2種の細胞混合後2日目に培地の交換を行った。

[実施例2] 心筋シートの細胞構成

上述のように EMG7 より作製した心筋シートを 0.25%トリプシンを用いて単離し、PE(phycoerythrin)結合の抗 CD31 抗体にて標識し、FACS を用いて GFP(FITC) および PE の陽性率により心筋細胞(CM), 内皮細胞(EC), 壁細胞(MC)の割合について定量した結果を図1に示す。その結果、CM: $43.4 \pm 6.2\%$, EC: $3.3 \pm 2.6\%$, MC: $53.3 \pm 8.2\%$ と計算された。

[実施例3] 心筋シートの組織学的評価

組織学的評価を行うため、EMG7 より作製した心筋シートを 4%PFA(paraformaldehyde)を用いて固定し、1%スキムミルクにてブロッキング後、抗体(一次抗体: mouse anti-cTnT, rat anti-VE-Cadherin、二次抗体: anti-mouse Alexa Flour 546, anti-rat Alexa Flour 488)を用いて CM, EC を標識し、DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole)を用いて核染色した後、多光子レーザー顕微鏡 (LSM 510, Carl-Zeiss) または蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence) により観察した (図2B および C)。さらに、4%PFA にて固定し、脱水・脱脂・脱アルコールののち、パラフィン浸透ののち包埋した。6 μ m の切片をヘマトキシリン・エオジン染色、シリウスレッド染色あるいは前述と同様に cTnT に対する免疫染色 (HRP/DAB 発光) した (図2A)。その結果、細胞外マトリクス (図2A上段、シリウスレッド染色) が保持されたままシートが回収されていることが示された。シートは3-4層の細胞で成り立っていることが示された。また CM は細胞シートの主な構成成分であるが、その間に EC が散在している様子が観察された。

[実施例4] 心筋シートの電気生理学的評価

電気生理学的評価を行うため、0.1%ゼラチンにてコーティングした電極付き培養皿 (MED64 system, アルファメッド・サイエンス) の電極上に EMG7 より作製した心筋シートを静置した。続いて、培地を吸引し 37°C にて 30 分インキュベートすることにより電極とシートを固定し、それぞれの電極の電位を測定することにより、シート上での電位の伝導を記録した。その結果を図3に示す。細胞外電位測定により、拍動が電氣的に連続して一方向性に伝導することを確認した (図3C)。

[実施例5] 心筋シートのサイトカイン産生能

EMG7 より作製した心筋シートの形成中 (Condition 1) および完成後 (Condition 2) の培養上清のサイトカイン量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を用いて TNF α 、IGF-1、VEGF、IL-6、bFGF、IFN γ 、EGF、Leptin および HGF を測定した (HGF: mouse HGF EIA kit, IIM, それ以外: mouse angiogenesis ELISA strip, Signosis)。その結果を図 4 に示す。心筋シートの形成中および完成後のいずれにおいても、angiogenesis に関わるサイトカイン (TNF α 、IGF-1、VEGF、IL-6、bFGF、IFN γ 、EGF、Leptin、HGF) のうち、VEGF が非常に多く産生されることが示された。

・条件 (Condition) 1: 心筋細胞添加 2 日後、無血清培地 (5×10^5 mol/L の 2-mercaptoethanol を添加した α MEM) を用いて 2 回洗浄し、無血清培地により培養 2 日後、培養上清を回収し、サイトカイン量の測定に用いた。

・条件 (Condition) 2: ゼラチンコーティングディッシュ上に上述の方法で作製した心筋シートを広げたと静置し、培地を吸引し培養皿とシートを固定後、培地を加えて 37°C にて 30 分インキュベートする。別の心筋シートを広げてディッシュに固定したシートの上へ静置し、培地を吸引して積層させた。同様に 3 層分繰り返す。2, 3 層目は元のシートから少しずつ位置をずらして積層化させた。続いて、ピペットマンを用いて培養皿底面を沿わせるように培地を流し、積層化された細胞シートを培養皿からはがした (図 5)。このように積層化した心筋シートを無血清培地を用いて 2 回洗浄し、無血清培地にて培養を継続し、3 時間後培養上清を回収し、サイトカイン量の測定に用いた。

[実施例 6] 心筋シートの VEGF 産生能

上述のように作製した心筋シートを RNeasy mini (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、vegfl64 の発現量を定量性 RT-PCR にて測定した (Step One Plus, Appliedbiosystems、vegfl64 の forward primer: 5' -CCAGCACATAGGAGAGATGAGCTT-3' (配列番号 1) および reverse primer: 5' -CAAGGCTCACAGTGATTTTCTGG-3' (配列番号 2)、b-actin の forward primer: 5' -CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3' (配列番号 3) および reverse primer: 5' -ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (配列番号 4))。この時、対照として、マウス新生仔由来心線維芽細胞 (CF) を用いて作成した細胞シートを用いた。その結果を図 6 A

に示す。EMG7 より作製した心筋シートが CF シートに比べ vegf164 を極めて多く発現することが示された。さらに、上述の心筋シート作製過程において心筋細胞を添加したシート (CM(+)) と添加しなかったシート (CM(-)) をそれぞれ回収前 (室温に下げる前) に培養上清を吸引し、無血清培地にて 2 回洗浄した後、無血清培地にて 3 時間培養後の上清を回収し、VEGF の量を測定した (Quantikine mouse VEGF, R&D)。その結果を図 6 B に示す。CM(+)シートが CM(-)シートに比べ VEGF を極めて多く分泌することが示された。

[実施例 7] 心筋シートへの未分化細胞混入評価

心筋シートを回収後にゼラチンコーティングディッシュ上に静置し、培地を吸引し 37℃にて 30 分インキュベートすることによりディッシュとシートを固定した。次のように 3 群に分け、各群 3 枚ずつ作成し、4%PFA による固定後、%スキムミルクにてブロッキングし、抗体 (一次: mouse anti-Oct 3/4, rabbit anti-Nanog、二次: anti-mouse Alexa Flour 488, anti-rat Alexa Flour 546) を用いて Nanog または Oct3/4 陽性細胞を標識し、蛍光顕微鏡を用いて計測した。結果を図 7 に示す。回収直後のシート内 (Group1) に未分化細胞の小コロニーが混入していることを確認した。また、LIF(+)の環境下でのシート継続培養 (Group2) では混入未分化コロニーのサイズが増大するが、LIF(-) (Group3) ではその増大は抑えられることを確認した。

- ・ Group 1: 心筋シートを回収直後に蛍光免疫染色を行う。
- ・ Group 2: 心筋シートを回収後、LIF(白血病阻害因子)を添加した ES 細胞用培地 (Yamashita J, et al. Nature. 408:92-6, 2000) にて 3 日間継続培養後、蛍光免疫染色を行う。
- ・ Group 3: LIF を添加しない ES 細胞用培地にて 3 日間継続培養後、蛍光免疫染色を行う。

[実施例 8] 疾患モデルラットに対する心筋シート移植

10-13 週齢、250~330g の無胸腺免疫不全ラット (F344/N Jcl-rnu/rnu) (日本クレア) より次の方法で亜急性期心筋梗塞 (MI) モデル作成した。当該ラットをラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルラン吸引により麻酔した。続いて、少量の酸素による人工呼吸下で左肋間開胸による心膜切開より心臓を露出後、前

下行枝を第一中隔枝末梢で 6-0 ポリプロピレン糸にて結紮した。末梢灌流領域の収縮低下および色調変化を確認(それらを認めない場合再度結紮を施行)した後、4-0 ポリプロピレン糸にて閉創した。6 日後に心臓超音波検査 (Vivid7, GE 横河メディカル) にて MI の有無を確認した。左室内径短縮率 (FS) が 40%を超えるものは不適モデルとして除外した。

このように MI 導入後 7 日目に EMG7 より作製した心筋シート (図 8) の移植を行った。移植には前述の方法にて 3 枚の心筋シートを積層化して用いた (図 5)。移植は、MI モデルラットに対しジエチルエーテルにて麻酔導入後、ラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルランにて麻酔を維持した。左肋間開胸にて開胸、肺・胸壁との癒着を慎重に剥離し心筋梗塞部を露出させ、積層化心筋シートを梗塞部に移植した。15 分静置ののち 4-0 ポリプロピレン糸にて閉創した。Sham 手術群に対しては心筋梗塞部露出を同様に行い、15 分後に同様に閉創した。

移植後 4 週まで観察した 12 例は全て生存した。そのうち肉眼的に心臓を観察した 9 例全てにおいて、奇形腫の形成を認めなかった。残り 3 例も心臓超音波検査上奇形腫を認めなかった。

[実施例 9] 心筋シート移植による心機能評価

移植後 2 週および 4 週に心臓超音波検査および移植後 4 週に左室容量圧曲線測定検査 (心臓カテーテル検査: MIKRO-TIP catheter system, Millar instruments) により心機能を測定した。治療群と Sham 群についてそれぞれ評価し比較した。

上記の心臓超音波検査は次の方法で行った (各群 n=9)。ジエチルエーテルにて麻酔導入後、ラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルランにて RR 間隔 120 ~ 200msec になるような深度で麻酔維持した。続いて、10S プローブ (4.0 ~ 11.0MHz) を用いて測定した。M モードにて拡張期および収縮期の中隔径、左室内腔径、後壁径を測定し、左室内径短縮率 (fractional shortening; FS) および収縮期壁厚増加率 (systolic thickening) を計算した。B モードにて拡張期および収縮期の左室内腔面積および左室周囲長を測定し、左室断面積変化率 (fractional area change; FAC) および非収縮範囲 (akinetic lesion; AL) を計算した。測定時には、人工呼吸を停止し、呼吸によるバイアスを除いた。その結果、左室収縮能を示す FS, FAC および systolic thickening は、治療群において、治療後 2 週お

よび 4 週で治療前に比べ改善を認め、Sham 群に比べ有意に高値であることが示された。また AL で示される梗塞範囲についても治療前に比べ 2 週および 4 週で縮小し、Sham 群と比較して有意に限定されていた。拡張期左室内腔面積（治療前からの変化率）については、2 週の段階で Sham 群は治療群に対して有意に左室拡大を認めた（図 9F）。

また、上記の左室容量圧曲線測定検査（心臓カテーテル検査）は次の方法で行った（各群 n=8）。ジエチルエーテルにて麻酔導入後、ラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルランにて麻酔維持した。コンダクタンスカテーテル(2Fr)を右内頸動脈より挿入し後、左室に誘導し、左室容量圧曲線を測定し時定数(Tau)を計算した。カテーテルを挿入した状態で横隔膜下にて開腹し、下大静脈を圧迫、前負荷減少による容量圧曲線偏移における収縮末期左室弾性率(elastance of end systole; Ees)を計算した。測定時には人工呼吸を停止し、呼吸によるバイアスを除いた。その結果、左室収縮能を示す収縮末期左室弾性率(Ees)は治療群でより高いことが確認され、心臓超音波検査と同様の結果が得られた。一方、拡張能を示す時定数(Tau)については治療群でやや優れる傾向を示すものの、有意差には至らなかった（図 10）。

[実施例 10] 心筋シート移植による組織学的評価

経時的なグラフト細胞の生着、生着細胞の局在の評価およびグラフト由来心筋細胞形態の変化（成熟）の評価を移植後 1 日、3 日、1 週、4 週において次の方法により行った。ジエチルエーテルにて麻酔導入後、ラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルランにて麻酔維持した。正中にて開胸し上大静脈・左上大静脈および下大静脈を確保し遮断した。心尖部に 23G 針を刺入し、生理的食塩水注入にて左室内血液を流出させると同時に右心房を開放し心臓の過拡張および浮腫を防止した。右心房から生理的食塩水のみ流出することを確認した後、45 分間、4%PFA を同様に注入し組織を固定した（灌流固定法）。続いて、心臓を摘出し 4%PFA に浸潤、4°C overnight の後、15%スクロース液に浸潤させた（4°C、2 回交換、計 24 時間）。イソペンタンにドライアイスを加えた溶液および OCT コンパウンドを用いて凍結包埋を行った。さらに、梗塞部位の中心部にて 6 μ m 切片を作成し、ブロッキング剤（Protein Block Serum-Free, DAKO）によりブロッキングを行った

後、抗体（一次抗体：mouse anti-cTnT, rabbit anti-GFP および二次抗体：anti-mouse Alexa Flour 546 または anti-rat Alexa Flour 488）を用いて GFP 陽性心筋細胞を標識し、蛍光顕微鏡（BZ-9000, Keyence）を用いて観察した。

また、移植後 1 週モデルに対し、connexin 43 を標識し（一次抗体：rabbit anti-connexin 43、二次抗体：anti-rabbit Alexa Flour 488）を用いてグラフト部位の gap junction の発現の有無を蛍光顕微鏡（BZ-9000, Keyence）を用いて観察した。

続いて、cTnT に対する免疫染色と同時に、種特異的反復配列を認識する FISH (fluorescence in situ hybridization) プローブを用いて、ラット心臓組織中のマウス細胞を次の方法により検出した。上記のプロローブはクロモソームサイエンスラボ社製ラットゲノム DNA FISH プローブ (Cy5 標識) およびマウスゲノム DNA FISH プローブ (digoxigenin 標識) を使用した。組織切片は、次の方法で前処理後使用した。PBS で洗浄後、4%PFA/PBS にて 15 分固定、PBS で洗浄後、アルコールシリーズにより脱水・乾燥させた。さらに 10mM Tris-EDTA (pH 9.0) 溶液に浸け、電子レンジを用いて 10 分加熱後、10 秒～1 分間 0.02% ペプシン / 0.1N HCN で処理し、さらに PBS で洗浄、アルコールシリーズにより脱水・乾燥させた。このように前処理した標本にラットおよびマウスゲノム DNA FISH プローブをアプライした後、ホットプレート上 (80℃) にて切片とプロローブを同時に 10 分間変性処理し、37℃ でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズした染色体標本を 37℃ の 50% ホルムアミド / 2×SSC で stringency wash した後、anti-Dig-Cy3 によりマウスゲノム DNA FISH プローブのシグナルによりラットおよびマウス核シグナル検出した。また、FISH 済切片に mouse anti-cTnT を Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で規定濃度に希釈 (1:200) した溶液を滴下し 37℃ で 1 時間反応させた。反応後 PBST で 5 分×3 回洗浄し、Can Get Signal Solution2 で 1:500 希釈 2 次抗体 (anti-rabbit-Alexa488 および anti-mouse-Alexa 594) を添加し、30 分反応させ免疫染色を行った。反応後 PBST で 5 分×3 回洗浄し、DAPI により核染色も行った。染色後、ゲノム DNA プローブシグナルおよび蛍光標識抗体を Leica CW-4000 システムを用いて顕微鏡観察した。

その結果、マウス由来の生着グラフト細胞は経時的に減少し、28 日目には少数

を認めるのみとなっていた。7 日目以降生着している部位は主に、レシピエント心筋層がより多く残っている梗塞周辺部であった。心筋細胞生着部位については、移植後 7 日目の段階で gap junction を形成しつつあることが確認された(図 1 1)。さらに、移植後時間が経過するに伴い、心筋細胞サルコメア（超分子集合体）を構成する cardiac troponin T(cTnT)の構造が形態的に成熟してゆくことが cTnT に対する免疫染色にて示され、4 週目にはレシピエント心筋細胞とほぼ形態的に同一になっていることが確認された（図 1 2）。

〔実施例 1 1〕心筋シート移植による梗塞後左室リモデリングの評価

移植 4 週後に、梗塞中心部より 50 μ m 間隔で 6 μ m 厚にて各個体あたり 5 枚の切片を作成し、シリウスレッドにより染色し蛍光顕微鏡観察を行った。心室内腔長と梗塞部位長を測定し、梗塞部位の割合を計算した。また、梗塞部位面積を梗塞部位長で割り、梗塞部位平均壁厚を計算した。治療群と Sham 群でそれぞれ行い(各 5 個体ずつ)、比較した。その結果、治療群が Sham 群に比べ梗塞領域が限定され、梗塞部位の壁菲薄化が抑えられることが示された(図 1 3)。これらは治療群において梗塞後左室リモデリングが抑制されているためと示唆された。

〔実施例 1 2〕心筋シート移植によるグラフト部位における血管新生の評価

移植後 1 日、3 日、1 週、4 週に、前述と同様の方法で作製した切片を用いて vWF に対する免疫染色(1:500)と FISH を同時に行った。4 週目での治療群と Sham 群における新生血管数 (capillary density) につき、梗塞部位を中心部 (Central-MI) と周辺部 (Peri-MI) に分けて計測し比較した (各 3 個体につき、無作為 5 視野ずつ)。この時、中心部と周辺部を図示するために、治療群の 1 例についてはマッソン・トリクローム染色を行った。治療群については 1 日、3 日、1 週の段階での新生血管の分布(グラフト由来心筋細胞生着部での血管新生の有無等)を観察した。移植後 1 日目にはグラフト部位の内部に vWF 陽性細胞が散在しており、3 日目にはグラフト部位の心筋細胞塊を内側から囲むように vWF 陽性細胞の集積が認められたが、これらは明らかな管腔構造は示していなかった。マウスのシグナルも示していないので、レシピエント (ラット) 側からの集積と考えられる。移植後 7 日目には、3 日目に示された集積はすでに認められなかった。さらに高倍率にて 3 日目の状態を観察すると、グラフト心筋細胞塊の中に一部 vWF 陽性の管腔構造を

認め、またその内部に赤血球を認め、血流を伴った新生血管がグラフト内に増生していることを示した。また同部位にて FISH と vWF 免疫染色を同時に行うことにより、その新生血管の一部にマウス由来細胞が取り込まれていることが示された。新生血管形成にはレシピエント細胞のみならずグラフト由来細胞も寄与していることが考えられた（図 1 4）。移植後 4 週では前述のように、グラフト由来細胞の生着自体はかなり減少しているが、capillary density の測定により、血管新生は治療群において有意に促進されていることが示された。またその血管新生は治療群において、梗塞周辺部でより多く起こっていることが示された（図 1 5）。

産業上の利用可能性

本発明の心筋シートは、それを患者の心疾患患部に移植することによって、正常な心筋細胞が増殖かつ生着するとともに、血流を伴った血管新生をも促進することができる。このことから、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの心疾患の治療のための再生医療に本発明の心筋シートを使用することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1～4： プライマー

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 以下の工程 (a) および (b) :

(a) 胚性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞をそれぞれ製造する工程、および

(b) 当該 Flk/KDR 陽性細胞へ当該心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を混合することによりシートを形成させる工程

を含む、胚性幹細胞由来の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から心筋シートを製造する方法。

2. 前記 Flk/KDR 陽性細胞が、胚性幹細胞をゼラチン被覆培養器材上で培養することにより誘導される、請求項 1 に記載の方法。

3. 前記工程 (a) において、心筋細胞が、シクロスポリン A の存在下で前記 Flk/KDR 陽性細胞を培養することにより製造される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

4. 前記工程 (a) において、内皮細胞および壁細胞が、VEGF および cAMP の存在下で前記 Flk/KDR 陽性細胞を培養することにより製造される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

5. 前記工程 (b) において、Flk/KDR 陽性細胞を 1~7 日間、好ましくは 3 日間培養した後に、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を混合させる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

6. 前記工程 (b) において、温度応答性ポリマーを被覆した培養器材を用いてシートを形成させる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

7. 前記工程 (b) において、前記混合後 VEGF の存在下でさらに培養することによりシートを形成させる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

8. 前記シートを積層化する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

9. 前記積層化が 3 層である、請求項 8 に記載の方法。

10. 請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた心筋シートを含む心疾患治療剤。

- 1 1. 心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から成る混合細胞。
- 1 2. 前記心筋細胞を少なくとも 40%以上含む、請求項 1 1 に記載の細胞。
- 1 3. 前記内皮細胞を少なくとも 3 %以上含む、請求項 1 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。
- 1 4. 前記壁細胞を少なくとも 50%以上含む、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の細胞。
- 1 5. 前記混合細胞が、シートの形状である、請求項 1 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。
- 1 6. 前記心筋細胞、内皮細胞および壁細胞が、胚性幹細胞から製造された細胞である、請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の細胞。
- 1 7. 前記混合細胞が、ヒト由来の細胞である、請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

図 1

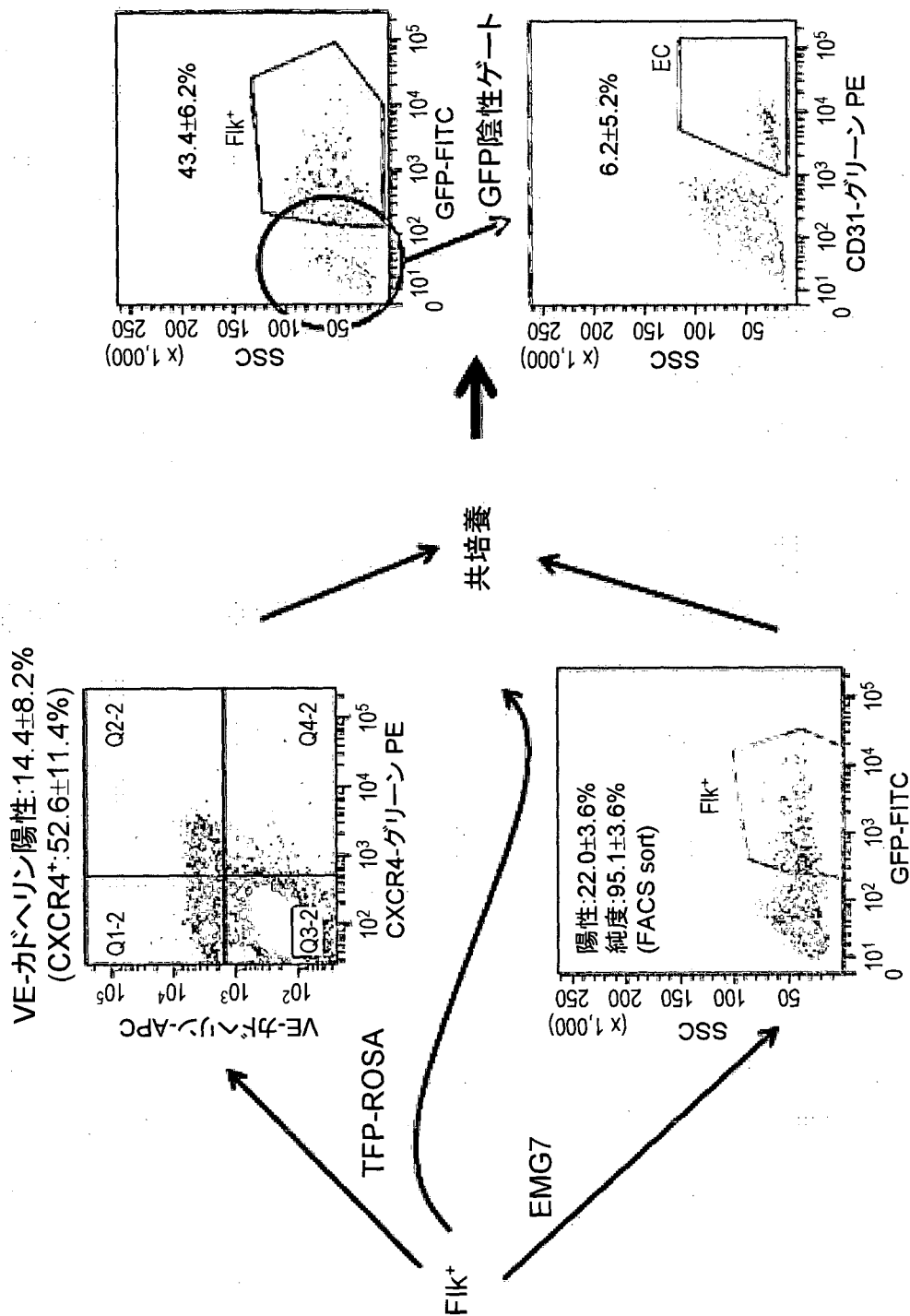


図 2

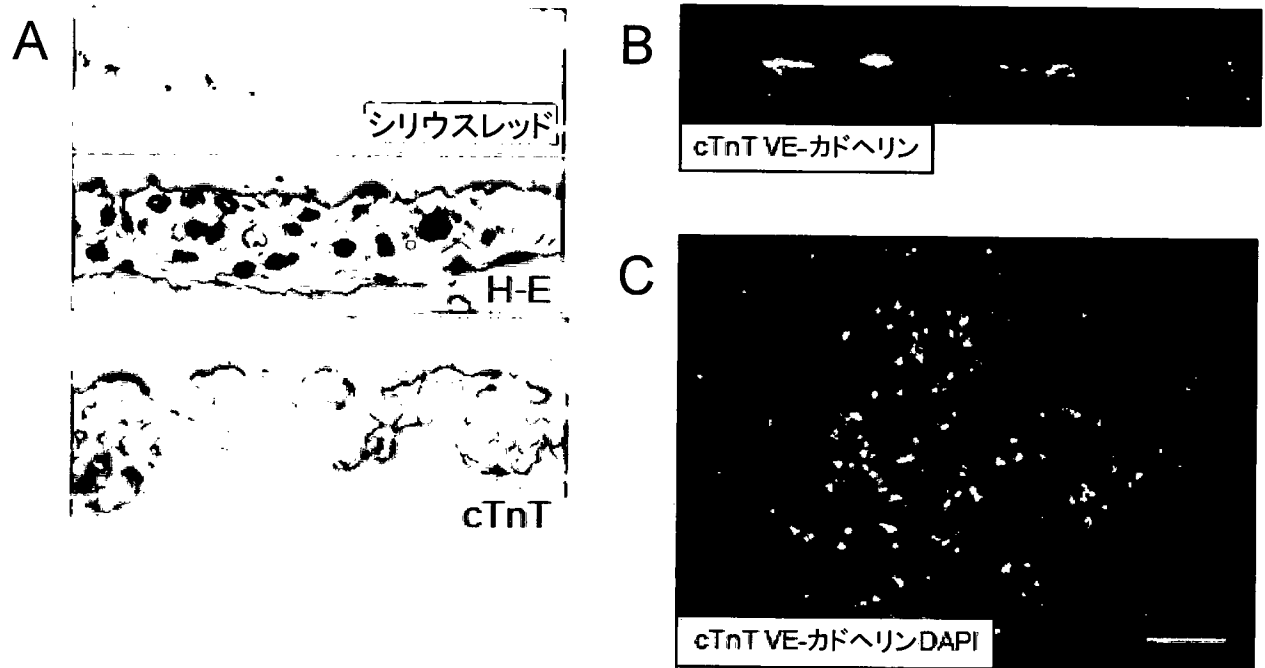


図3

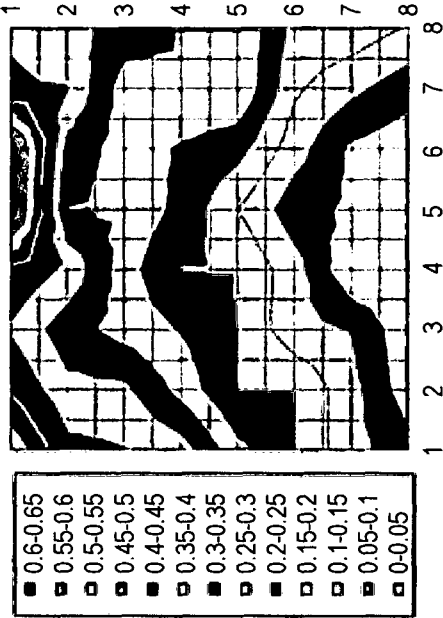
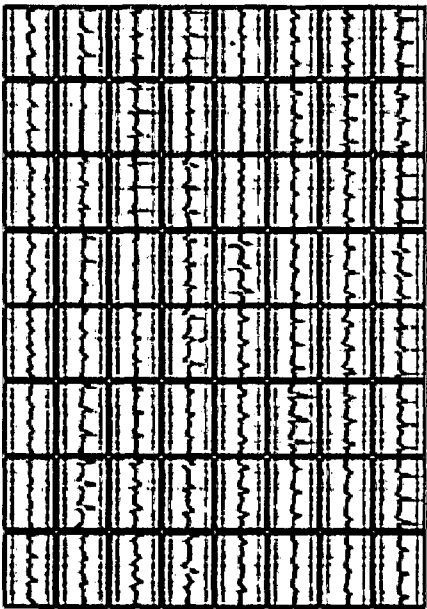
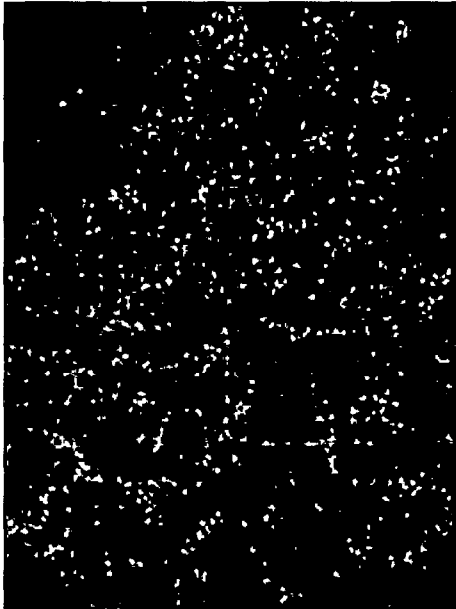


図4

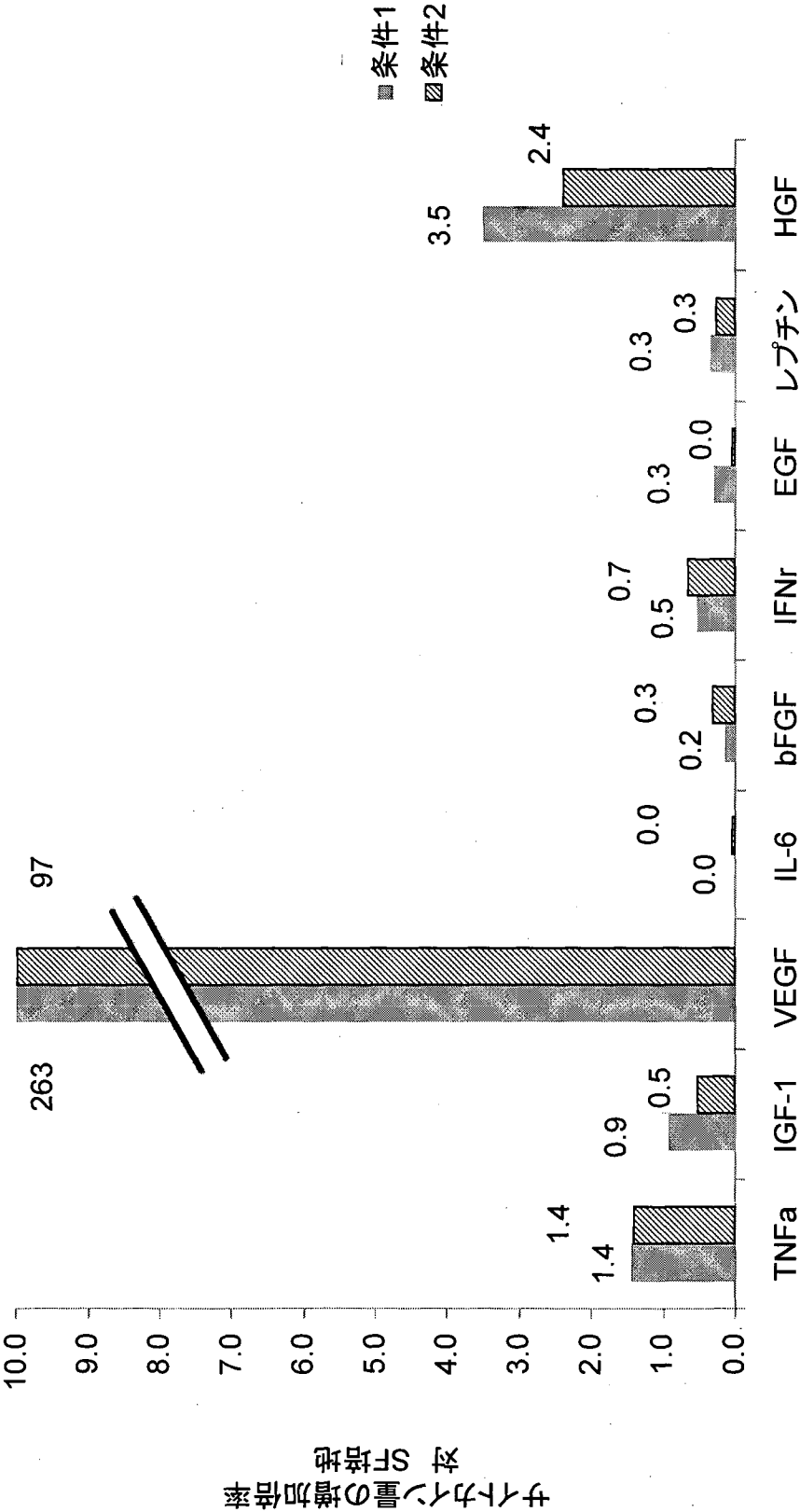


図 5

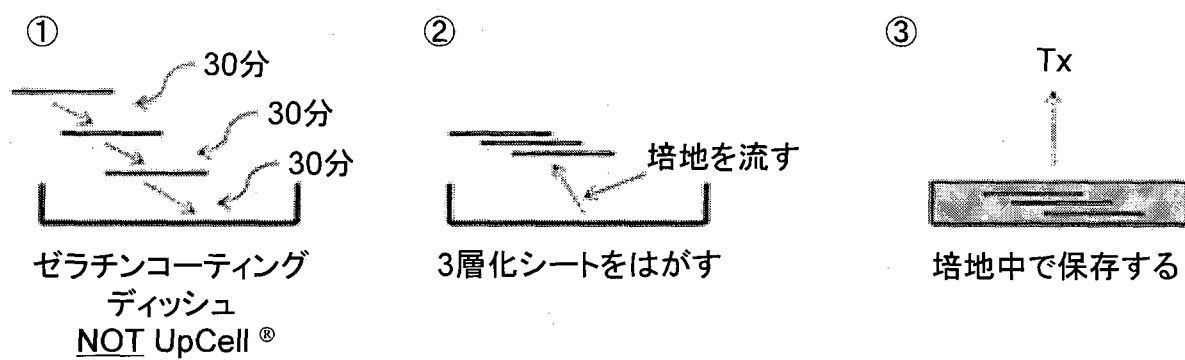


図 6

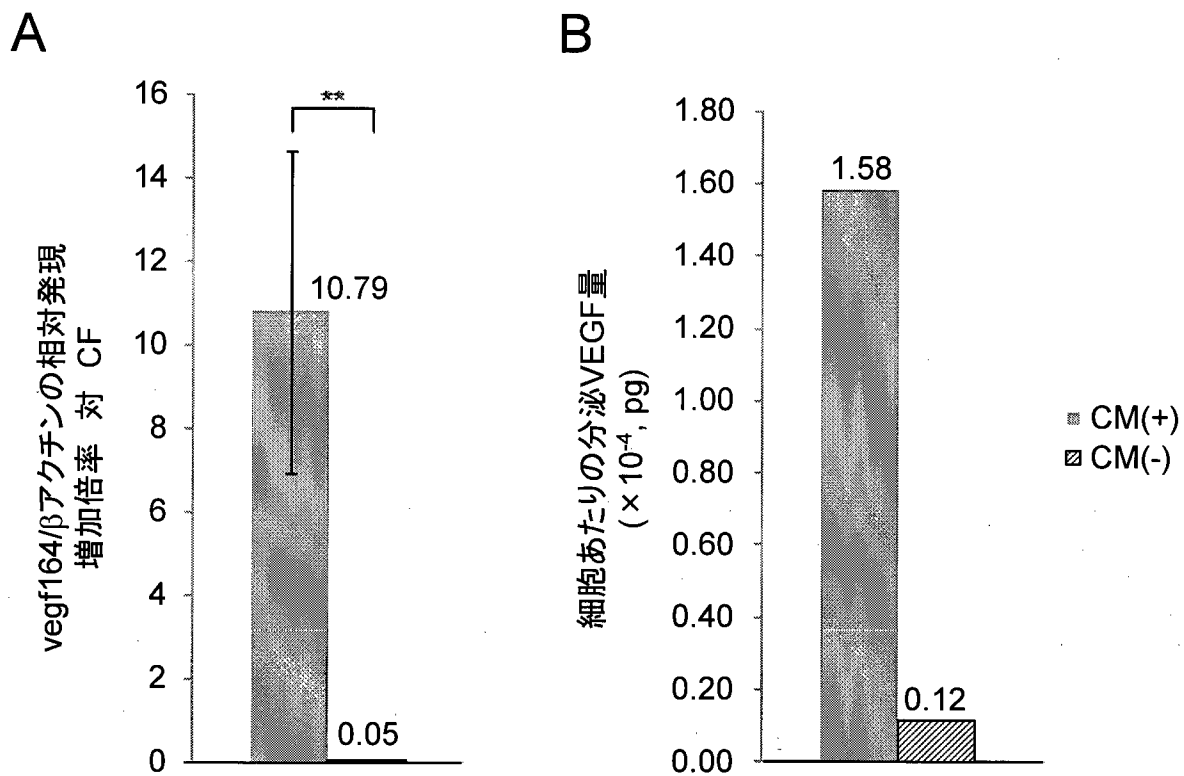


図 7

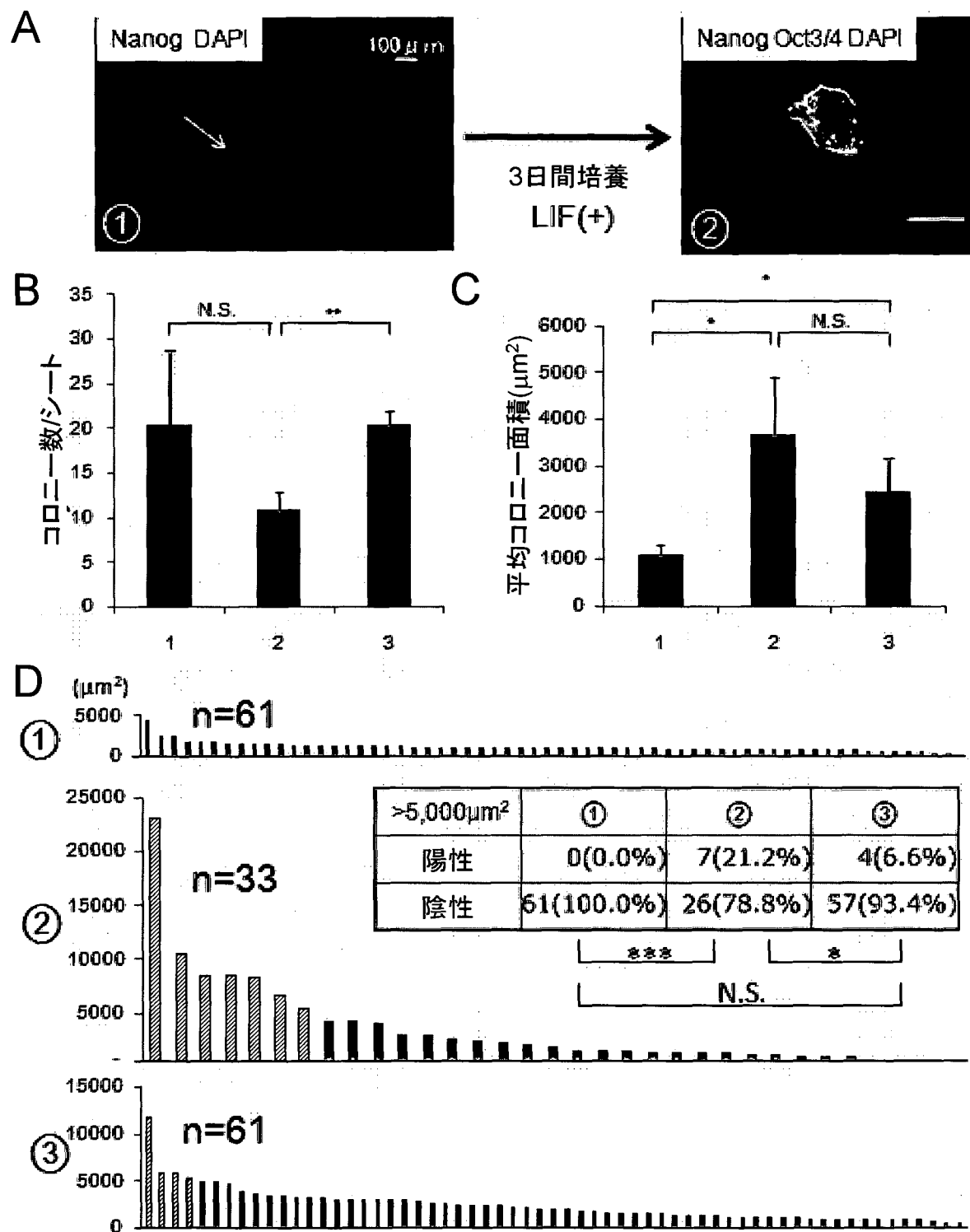
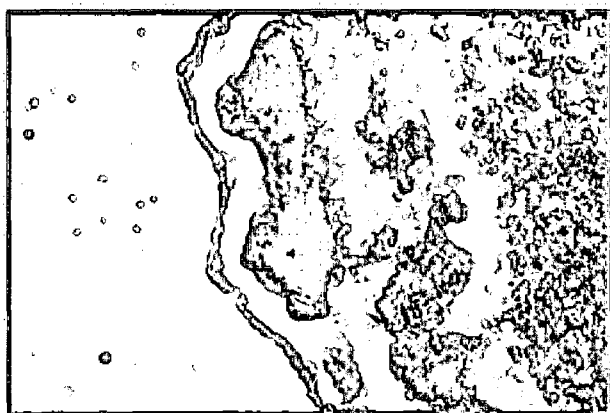


図 8

A



B



C

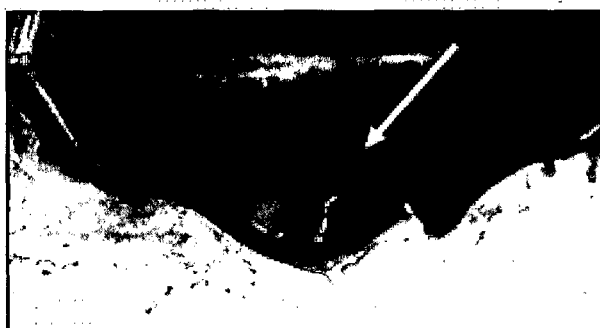


図 9

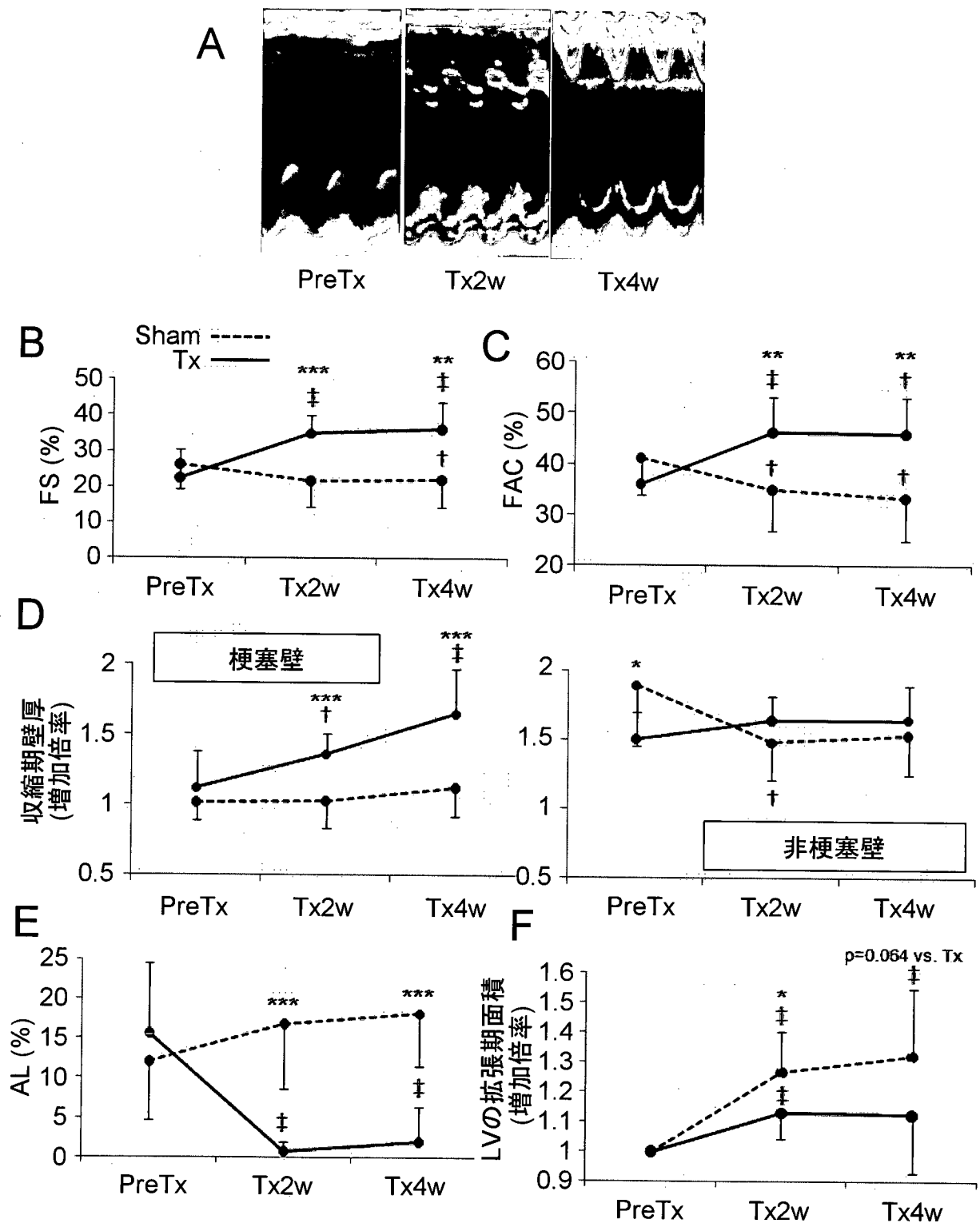


図 10

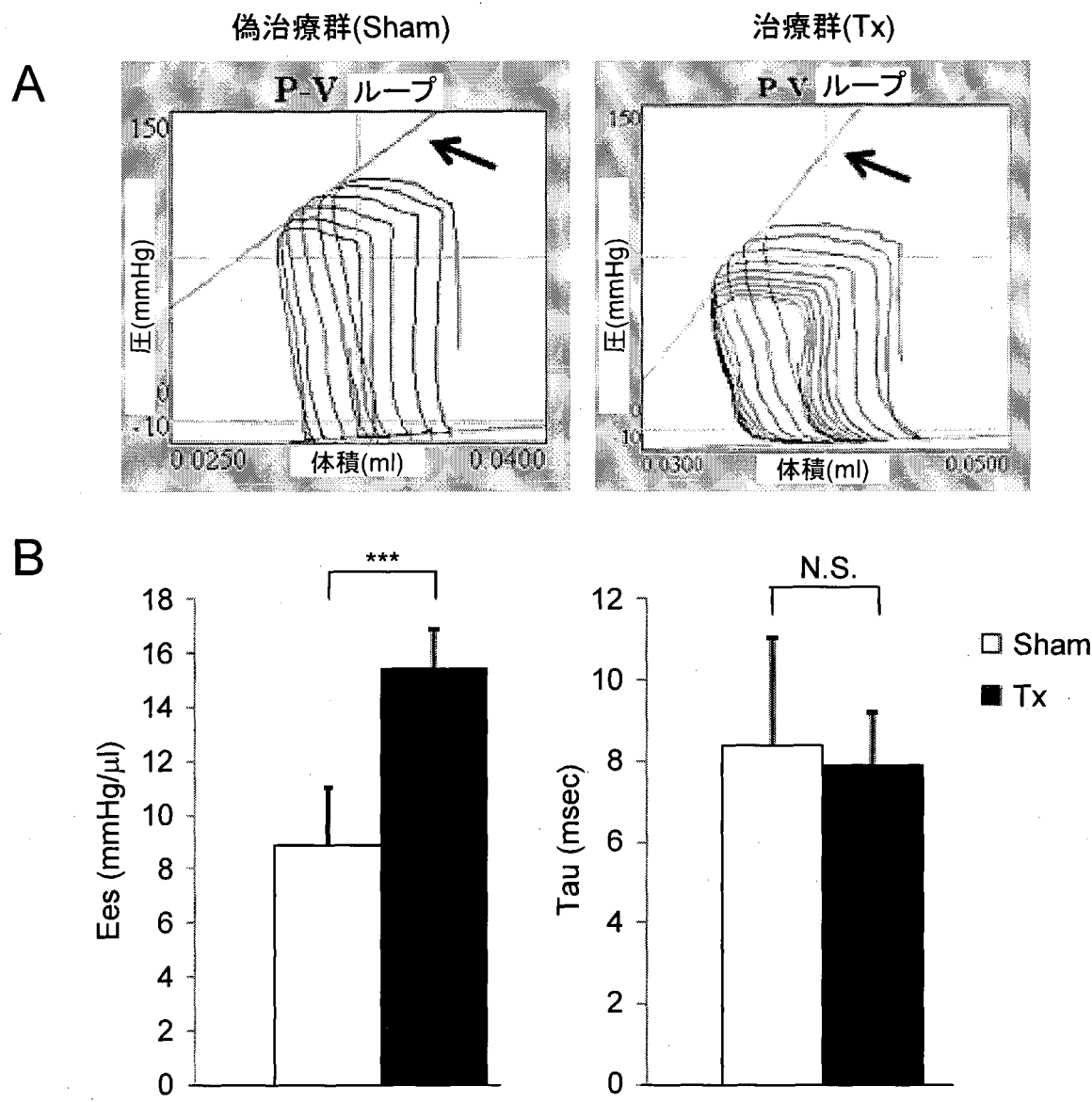


図 1-1

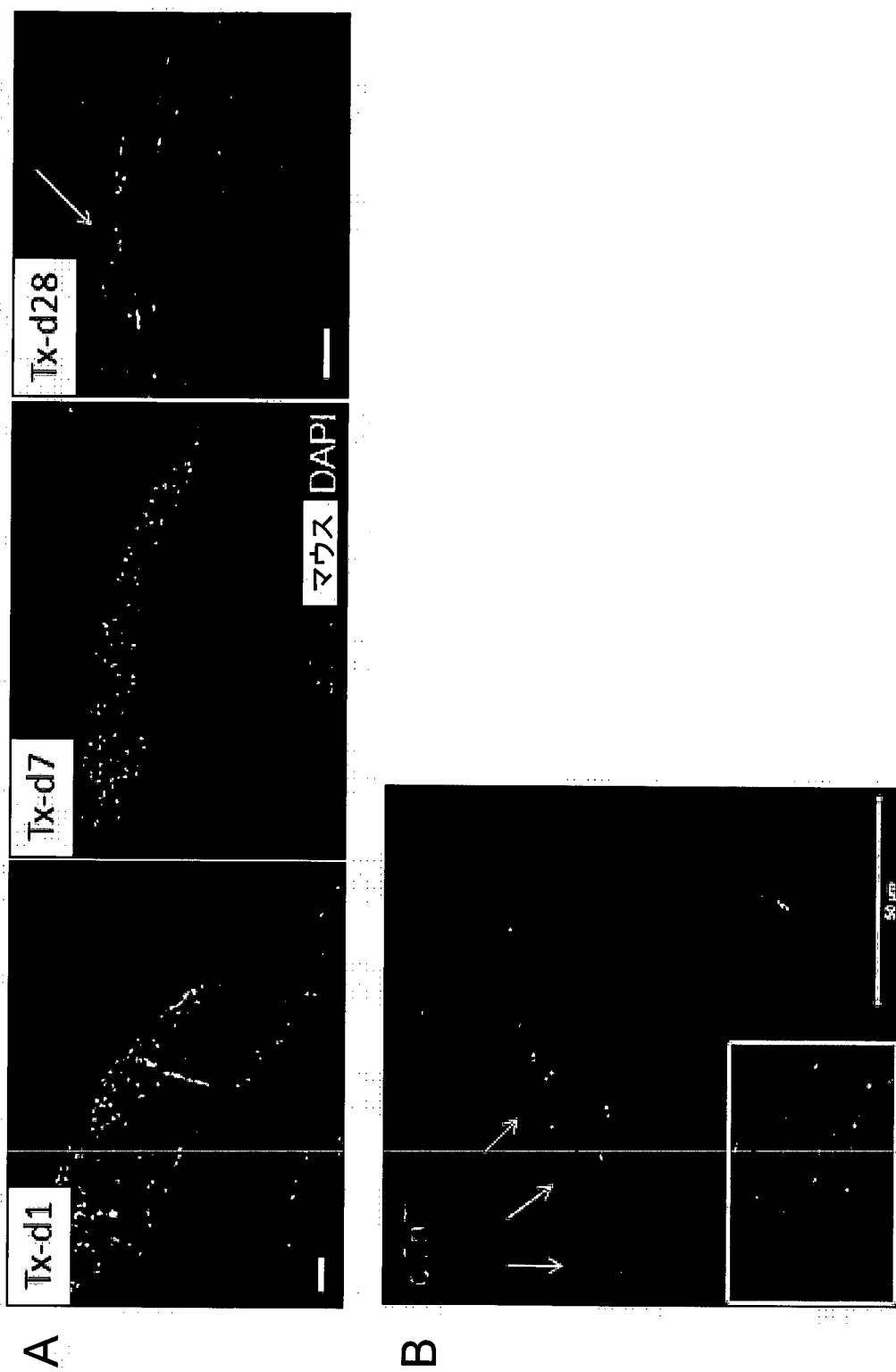


図 1 2

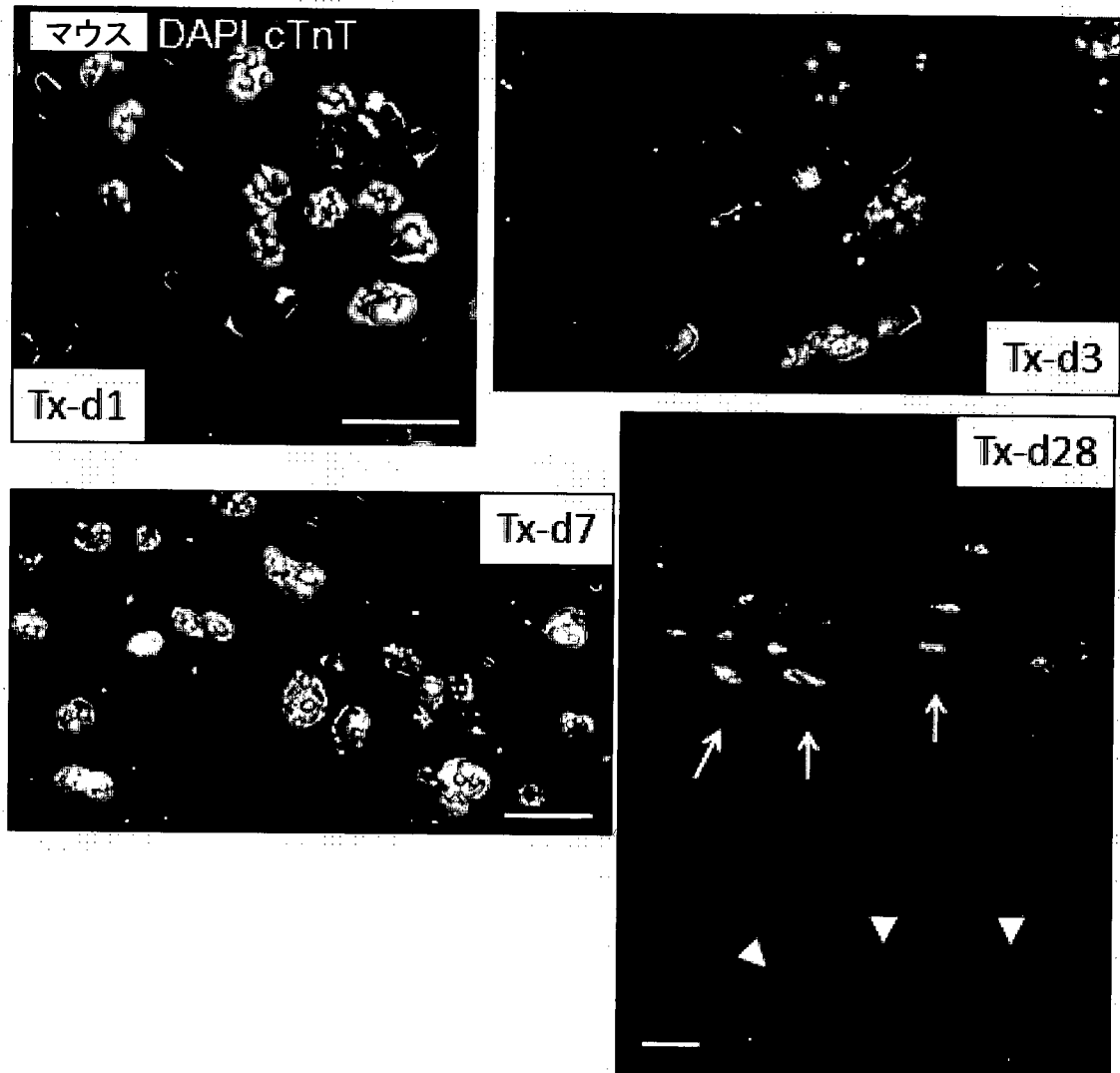


図 1 3

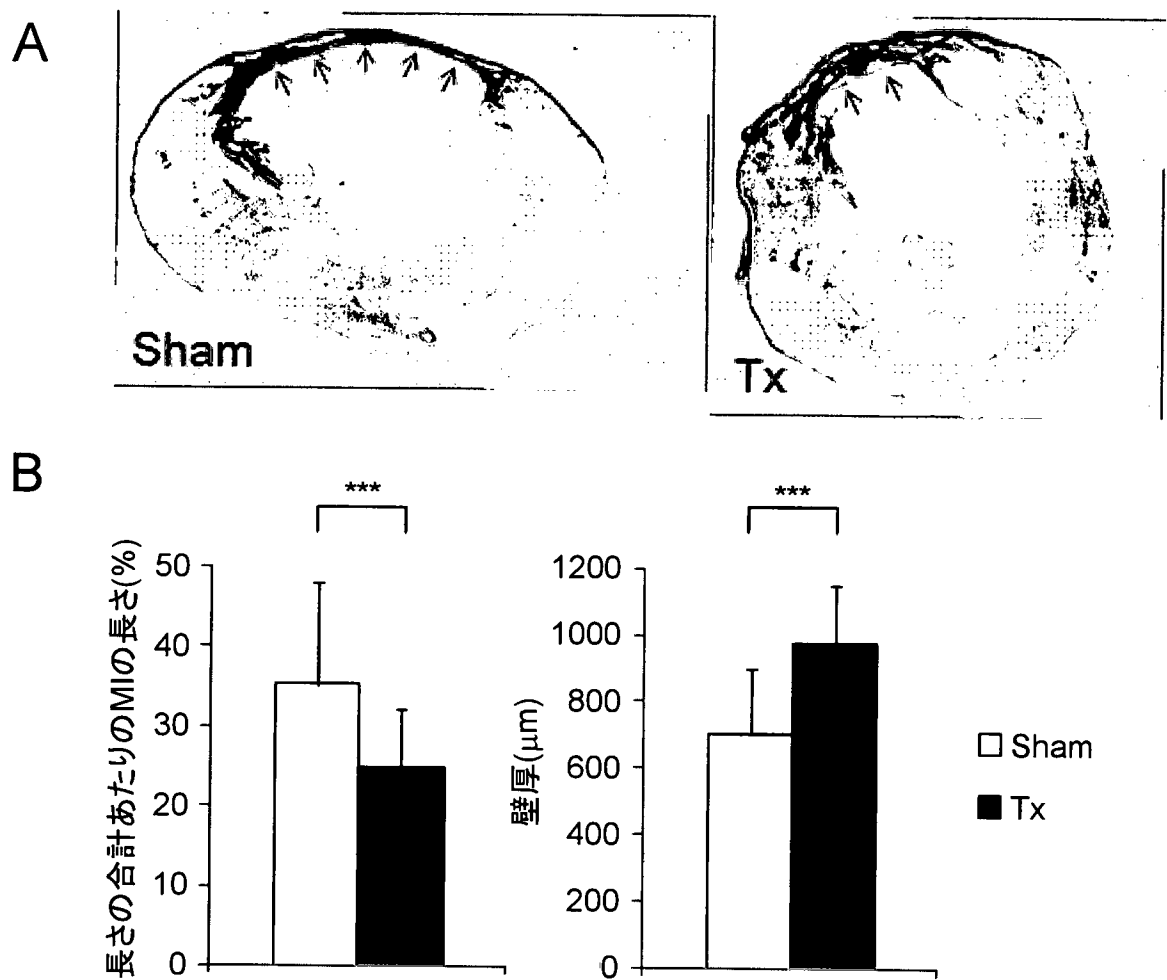


図 14

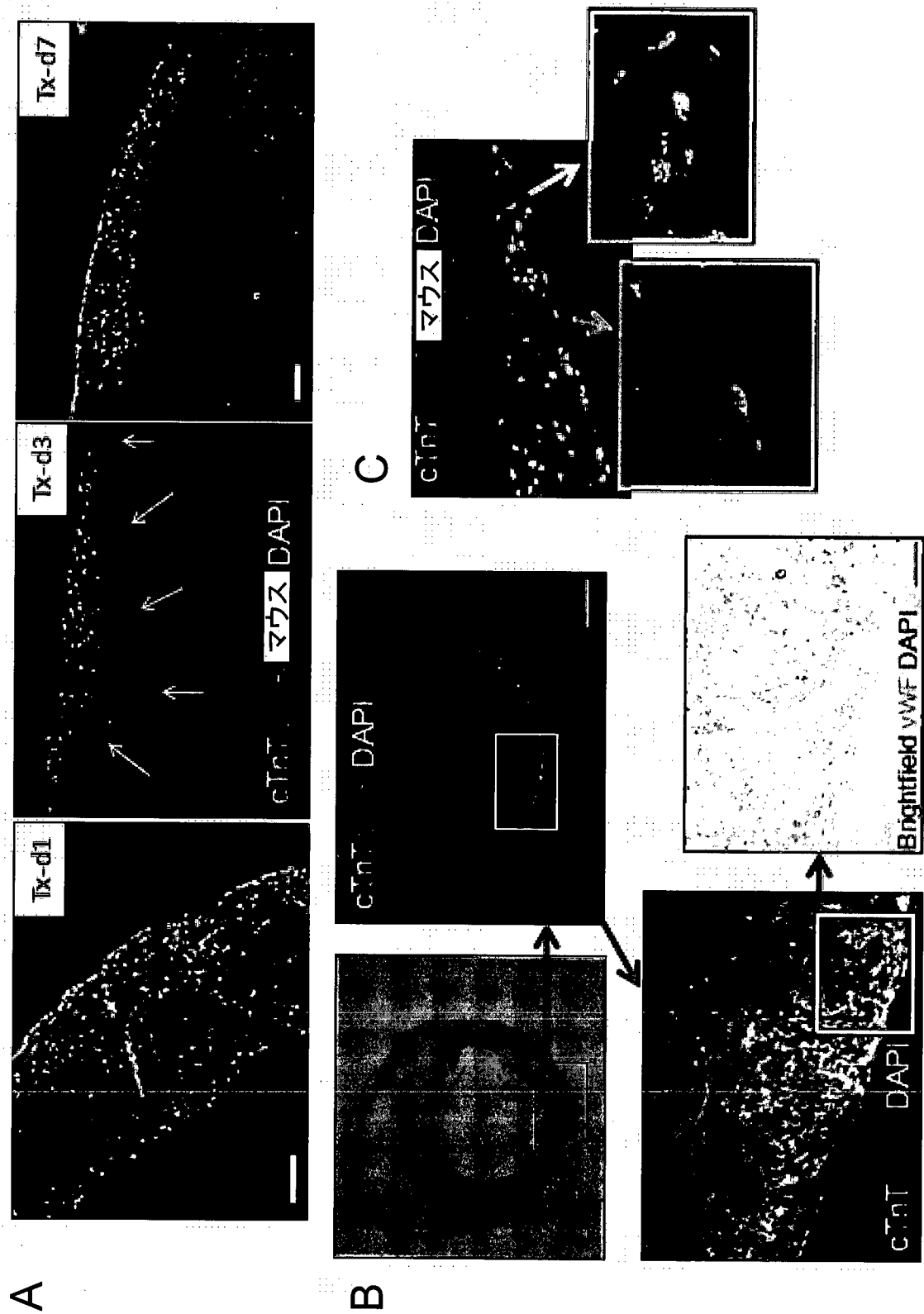
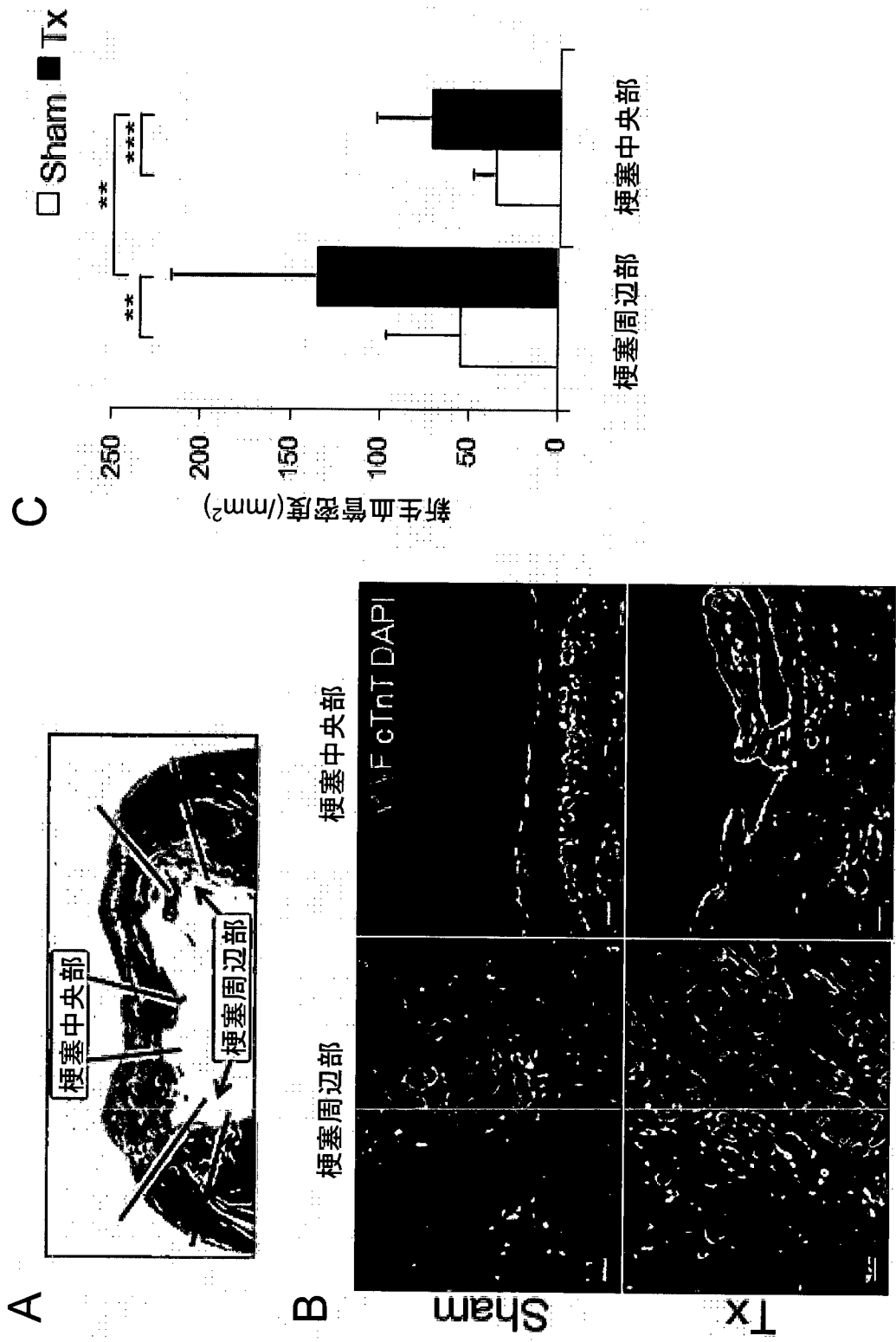


图 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

C12N5/071, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00, A61P43/00, C12N1/00, C12N5/0735, C12N15/09

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASUMOTO H. et al., Embryonic Stem (ES) Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiac Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction. Circulation Journal, 2011.3.1, Vol.75, No.Supplement 1, p.610, #FRS-087	1, 6, 8-16
X	YANG L. et al., Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. Nature, 2008, Vol.453, pp. 524-528	11, 12, 15-17
Y	YAN P. et al., Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, Vol.379, pp. 115-120	1-17



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
08 June, 2012 (08.06.12)

Date of mailing of the international search report
19 June, 2012 (19.06.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059427

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMASHITA J. et al., Flkl-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. <i>Nature</i> , 2000, Vol.408, pp.92-96	1-17
Y	YURUGI-KOBAYASHI T. et al., Adrenomedullin/Cyclic AMP Pathway Induces Notch Activation and Differentiation of Arterial Endothelial Cells From Vascular Progenitors. <i>Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology</i> , 2006, Vol.26, pp.1977-1984	1-17
Y	SEKINE H. et al., Endothelial Cell Coculture Within Tissue-Engineered Cardiomyocyte Sheets Enhances Neovascularization and Improves Cardiac Function of Ischemic Hearts. <i>Circulation</i> , 2008, Vol.118, No.Supplement 1, pp.S145-S152	1-17
Y	Shuichi SEKINE et al., "Naihi-Shinkin Kyobaiyo Saibo Sheet Ishoku ni yoru Saisei Shinkin Soshikinai Kekkanmo Shinsei no Sokushin to Shinkino Kaizen Koka", Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease, Heisei 18 Nendo Kenkyu Gyosekishu, 2006, pages 5 to 8	1-17
Y	Shuichi SEKINE et al., "Kyoketsusei Shinfuzen ni Taisuru Naihi-Shinkin Kyobaiyo Saibo Sheet no Ishoku", Dai 19 Kai Japanese Association of Cardiovascular Pharmacology Koen Yoshishu, 2009, vol.19, page 34	1-17
A	KOBAYASHI H. et al., Fibroblast sheets co-cultured with endothelial progenitor cells improve cardiac function of infarcted hearts. <i>Journal of Artificial Organs</i> , 2008, Vol.11, pp. 141-147	1-17
A	Tatsuya SHIMIZU, "Shinkin-Naihi Kyobaiyo Saibo Sheet o Mochiita Kekkanmo no Seigyo", Kosei Rodo Kagaku Kenkyuho Hojokin Hito Genome Saisei Iryo-to Kenkyu Jigyo, Kan'yokeyi Kansaibo o Mochiita Shinkin Kekkan Saisei Ryoho no Kiso Oyobi Rinsho Kenkyu, Heisei 17 Nendo Sokatsu Buntan Kenkyu Hokokusho, 2006, pages 17 to 18	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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. C12N5/071, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00, A61P43/00, C12N1/00, C12N5/0735, C12N15/09

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	MASUMOTO H. et al., Embryonic Stem (ES) Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiac Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction. Circulation Journal, 2011.3.1, Vol.75, No.Supplement 1, p.610, #FRS-087	1, 6, 8-16

☒ 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

0 8 . 0 6 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 6 . 2 0 1 2

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 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

伊達 利奈

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 9 6 0

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
X	YANG L. et al., Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. Nature, 2008, Vol.453, pp.524-528	11, 12, 15-17
Y	YAN P. et al., Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, Vol.379, pp.115-120	1-17
Y	YAMASHITA J. et al., Flkl-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature, 2000, Vol.408, pp.92-96	1-17
Y	YURUGI-KOBAYASHI T. et al., Adrenomedullin/Cyclic AMP Pathway Induces Notch Activation and Differentiation of Arterial Endothelial Cells From Vascular Progenitors. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006, Vol.26, pp.1977-1984	1-17
Y	SEKINE H. et al., Endothelial Cell Coculture Within Tissue-Engineered Cardiomyocyte Sheets Enhances Neovascularization and Improves Cardiac Function of Ischemic Hearts. Circulation, 2008, Vol.118, No.Supplement 1, pp.S145-S152	1-17
Y	関根 秀一 外3名、 内皮-心筋共培養細胞シート移植による再生心筋組織内血管網新生の促進と心機能改善効果. 財団法人日本心臓血圧研究振興会 平成18年度研究業績集, 2006, pp.5-8	1-17
Y	関根 秀一 外4名、 虚血性心不全に対する内皮-心筋共培養細胞シートの移植. 第19回日本循環薬理学会口演要旨集, 2009, Vol.19, p.34	1-17

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	KOBAYASHI H. et al., Fibroblast sheets co-cultured with endothelial progenitor cells improve cardiac function of infarcted hearts. Journal of Artificial Organs, 2008, Vol.11, pp.141-147	1-17
A	清水 達也、 心筋－内皮共培養細胞シートを用いた血管網の制御。 厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業 間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究 平成 1 7 年度総括・分担研究報告書, 2006, pp.17-18	1-17