

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6241893号
(P6241893)

(45) 発行日 平成29年12月6日 (2017. 12. 6)

(24) 登録日 平成29年11月17日 (2017. 11. 17)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/077 (2010. 01)
 C 1 2 N 5/071 (2010. 01)
 A 6 1 L 27/38 (2006. 01)
 C 0 7 K 16/28 (2006. 01)

C 1 2 N 5/077
 C 1 2 N 5/071
 A 6 1 L 27/38 1 0 0
 C 0 7 K 16/28

請求項の数 15 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2015-138613 (P2015-138613)
 (22) 出願日 平成27年7月10日 (2015. 7. 10)
 (65) 公開番号 特開2016-27797 (P2016-27797A)
 (43) 公開日 平成28年2月25日 (2016. 2. 25)
 審査請求日 平成29年6月23日 (2017. 6. 23)
 (31) 優先権主張番号 PCT/JP2015/050028
 (32) 優先日 平成27年1月5日 (2015. 1. 5)
 (33) 優先権主張国 世界知的所有権機関 (WO)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-142804 (P2014-142804)
 (32) 優先日 平成26年7月11日 (2014. 7. 11)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

特許法第30条第2項適用 第4回グローバルCOE公
 開シンポジウム 開催日 平成26年1月11日

(73) 特許権者 516200404
 株式会社メトセラ
 山形県鶴岡市末広町5番22号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (74) 代理人 100151596
 弁理士 下田 俊明
 (72) 発明者 岩宮 貴紘
 東京都豊島区池袋4-17-3サンコート
 池袋413号室
 (72) 発明者 松浦 勝久
 東京都新宿区河田町8番1号 学校法人東
 京女子医科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓細胞培養材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

線維芽細胞を含み、全線維芽細胞中に占めるVCAM-1蛋白質を発現している線維芽細胞の割合が66.57%超である、心臓細胞培養材料。

【請求項2】

線維芽細胞を含み、全線維芽細胞中に占めるVCAM-1蛋白質を発現している線維芽細胞の割合が80%以上である、請求項1に記載の心臓細胞培養材料。

【請求項3】

心臓組織を構築するための培養に使用されるものである、請求項1又は2に記載の心臓細胞培養材料。

【請求項4】

前記線維芽細胞が、心臓由来のものである、請求項1～3のいずれかに記載の心臓細胞培養材料。

【請求項5】

前記線維芽細胞が、心外膜由来のものである、請求項1～4のいずれかに記載の心臓細胞培養材料。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養するステップを含む、人工臓器材料の製造方法。

【請求項7】

抗 V C A M - 1 抗体を含む、心臓細胞培養材料用線維芽細胞のスクリーニング用試薬。

【請求項 8】

線維芽細胞群を準備するステップ、

準備した線維芽細胞群から V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞をソーティングするステップ、及び

ソーティングされた V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞を回収するステップを含む、V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞を含む心臓細胞培養材料の製造方法。

【請求項 9】

線維芽細胞群を準備するステップ、

準備した線維芽細胞群から V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞をソーティングするステップ、

ソーティングされた V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞を回収するステップ、及び

回収された V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞と心筋細胞とを共培養するステップ、を含む、心筋組織の製造方法。

【請求項 10】

線維芽細胞群を準備するステップ、

準備した線維芽細胞群から V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞をソーティングするステップ、

ソーティングされた V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞を回収するステップ、及び

回収された V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞と、V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞の維持または保存のための成分とを混合し、組成物を調製するステップを含む、組成物の製造方法。

【請求項 11】

V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞と、V C A M - 1 蛋白質を発現している細胞の維持または保存のための成分と、を含み、全線維芽細胞中に占める V C A M - 1 蛋白質を発現している線維芽細胞の割合が 66.57% 超である、組成物。

【請求項 12】

心筋細胞の細胞増殖を促進するため、心筋細胞の遊走を促進するため、及び心筋組織を構築するため、からなる群から選択されるいずれかの目的で用いられる、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 11 または 12 に記載の組成物と、心臓細胞との混合物。

【請求項 14】

V C A M - 1 蛋白質またはこれをコードする遺伝子の、心筋細胞の細胞増殖を促進するため、心筋細胞の遊走を促進するため、及び心筋組織を構築するため、からなる群から選択されるいずれかを目的とする線維芽細胞に対する、使用。

【請求項 15】

全線維芽細胞に占める V C A M - 1 蛋白質発現線維芽細胞の割合が 66.57% 超である、線維芽細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

線維芽細胞はほぼ全ての脊椎動物に存在し、組織が外傷や虚血で傷ついたときに、傷ついた領域が、線維芽細胞増殖と豊富な細胞外マトリックス付着により、線維性の組織に置

10

20

30

40

50

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

【0003】

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

【0004】

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

しかし、線維芽細胞は、その機能が良く分かっておらず、形態学的に分類されているほぼ唯一の細胞であるため、線維芽細胞の中から、ある特定の機能を持つものだけを選別することは困難である。

【0005】

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

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

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

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

【非特許文献3】 Shimizu T, et al., Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. Biomaterials. 2003;24:2309-2316 10

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

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

【非特許文献6】 Kwee L, et al., Defective development of the embryonic and extra embryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (vcam-1) deficient mice. Development (Cambridge, England). 1995;121:489-503

【非特許文献7】 Yang JT, et al., Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. Development (Cambridge, England). 1995;121:549-560 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、心臓細胞に特異的に働きかける心臓細胞培養材料、および、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面を、当該心臓細胞培養材料でコーティングした細胞培養基材を提供することを目的とする。また、当該心臓細胞培養材料を使用して心臓細胞を培養したことにより得られる人工臓器材料及びその製造方法を提供することを目的とする。 30

【課題を解決するための手段】

【0008】

心臓細胞培養において、VCAM-1蛋白質を含む心臓細胞培養材料を使用することにより、機能的な心臓組織が良好に構築されることが明らかとなった。よって、当該心臓細胞培養材料を、壁面及び/又は底面を有する培養基材の壁面及び/又は底面にコーティングし、細胞培養基材として使用することができる。当該心臓細胞培養材料を使用して培養した心臓細胞は、人工臓器材料として使用可能である。

【0009】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1] VCAM-1蛋白質を含む、心臓細胞培養材料。 40

[2] 上記VCAM-1蛋白質が、動物材料から分離精製したVCAM-1、VCAM-1組み換え蛋白質、又は、VCAM-1蛋白質を発現している細胞である、[1]に記載の心臓細胞培養材料。

[3] 心臓組織を構築するための培養に使用されるものである、[1]または[2]に記載の心臓細胞培養材料。

[4] 前記VCAM-1蛋白質を発現している細胞が、VCAM-1蛋白質を発現している線維芽細胞である、[2]または[3]に記載の心臓細胞培養材料。

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

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

[7] [1]～[6]のいずれか1に記載の心臓細胞培養材料で、壁面及び/又は底面を有する 50

培養基材の壁面及び/又は底面がコーティングされた、細胞培養基材。

[8] [1] ~ [6] のいずれか 1 に記載の心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養するステップを含む、人工臓器材料の製造方法。

[9] 抗VCAM-1抗体を含む、心臓細胞培養材料スクリーニング用試薬。

[1 0] VCAM-1蛋白質を発現している心臓由来線維芽細胞。

[1 1] 培養した細胞を培養基材から剥離し回収するステップをさらに含む、[8]に記載の人工臓器材料の製造方法。

[1 2] 前記培養基材が温度応答性培養皿であり、前記剥離が温度変化により行われる、[1 1]に記載の人工臓器材料の製造方法。

[1 3] 全細胞に占めるVCAM-1を発現する心臓線維芽細胞の割合が 5 0 % 以上である、人工臓器材料。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

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

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

20

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

【図 2】線維芽細胞と共培養したmESC由来心臓細胞シートの特性の違い（写真）。(A) 剥離前、自律拍動する多くの細胞塊が、NCFとACF共培養シートにおいて観察された。温度降下後、mESC由来心筋細胞及び線維芽細胞（-）では細胞シート形成は観察されなかった。(B) 各々の細胞シートにおける細胞外活動電位。ACFまたはNCF共培養シートにおける活動電位は各々のチャンネルにて観察された。しかし、ADF共培養シートにおいて、活動電位は単発的であった（囲み線は細胞シートの形を示す）。(c) 共焦点顕微鏡を使用した各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。YFPは緑色（黄色）の蛍光（YFP：励起波長514 nm、蛍光波長527 nm）を、ビメンチンは赤色の蛍光（cy3：励起波長512 nm、蛍光波長552 nm）を発し、核はヘキスト33258（青色）（ヘキスト33258：励起波長352 nm、蛍光波長461nm）で染色された。共焦点顕微鏡観察は、線維芽細胞（-）またはADFとの共培養における細胞と比較して、NCFまたはACFと共培養した細胞においてYFP(+)の細胞が多いことを示唆した。(D) 共焦点顕微鏡を使用した各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。cTnTは緑色の蛍光（FITC：励起波長488 nm、蛍光波長530 nm）を、ビメンチンは赤色の蛍光（cy3：励起波長512 nm、蛍光波長552 nm）を発し、核はヘキスト33258（青色）（ヘキスト33258：励起波長352 nm、蛍光波長461 nm）で染色された。共焦点顕微鏡観察は、線維芽細胞（-）またはADFとの共培養における細胞と比較して、NCFまたはACFと共培養した細胞においてcTnT(+)の細胞が多いことを示唆した。(E) 棒グラフは、各々の細胞培養皿におけるYFP(+)またはcTnT(+)の細胞数の増加を示す。線維芽細胞（-）におけるYFP(+)またはcTnT(+)の細胞数を 1 とした。YFP(+)及びcTnT(+)細胞は、ADF共培養または線維芽細胞（-）における培養皿よりも、NCFまたはACF培養皿においてより多く観察された。加えて、NCFとACFにおける心筋細胞数の間に有意な関連はない。（N = 3, ** P < 0.01）

30

40

【図 3】各々の細胞培養皿における細胞培養開始 1 日目と 5 日目の心筋細胞数（写真）。

(A) 共焦点顕微鏡を使用した培養開始 1 日目での各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。YFPは緑色（黄色）の蛍光（YFP：励起波長514 nm、蛍光波長527 nm）を、cTnTは赤色の蛍光（cy3：励起波長512 nm、蛍光波長552 nm）を発し、核はヘキスト33258（青色）（ヘキスト33258：励起波長352 nm、蛍光波長461 nm）で染色された。(B) 共焦点顕微鏡を使用した培養開始 5 日目での各々の細胞培養皿における免疫蛍光染色。YFPは緑色（黄色）

50

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

【図4】心筋細胞増殖の免疫蛍光染色による評価 (写真)。(A)共焦点顕微鏡を使用した各々の共培養皿におけるKi67陽性心筋細胞の免疫蛍光染色観察。cTnTは緑色の蛍光 (FITC: 励起波長488 nm、蛍光波長530 nm) を、Ki67は赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(B)各々の培養皿におけるKi67(+)又はリン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)(+)心筋細胞のパーセンテージ(N = 4, ** P < 0.01)。(C)共焦点顕微鏡を使用した各々の培養皿におけるリン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)陽性心筋細胞の免疫蛍光染色観察。cTnTは緑色の蛍光 (FITC: 励起波長488 nm、蛍光波長530 nm) を、リン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)は赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(D)各々の培養皿におけるリン酸化ヒストン3 (phosphor S10; Phh3)(+)心筋細胞のパーセンテージ(N = 4, ** P < 0.01)。(E)(F)各々の培養皿における心筋細胞のBrdU FACSアッセイ (N = 3, ** P < 0.01)。(G)共焦点顕微鏡を使用した、インサートカルチャーディッシュにおける培養開始1日目と5日目でのYFP(+)とcTnT(+)の心筋細胞の免疫蛍光染色の観察。YFPは緑色 (黄色) の蛍光 (YFP: 励起波長514 nm、蛍光波長527 nm) を、cTnTは赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm) で染色された。(H)棒グラフは、1日目と5日目との間でのYFP(+)とcTnT(+)の細胞数の増加を示す。1日目でのYFP(+)とcTnT(+)の細胞数を1とした。心筋細胞増殖は5日目において観察された(N = 4, ** P < 0.01)。

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

【図6】免疫蛍光染色解析による心臓増殖因子の同定 (写真)。(A-B) 5日目の心筋細胞に対する中和抗体の効果についての免疫蛍光染色観察。YFPは緑色 (黄色) の蛍光 (YFP: 励起波長514 nm、蛍光波長527 nm) を、cTnTは赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起波長352 nm、蛍光波長461 nm) で染色された。VCAM-1中和抗体を用いてNCFと心筋細胞とを共培養すると、5日目で心筋細胞数が減少した。それに対して、アイソタイプコントロールを用いた場合は、5日目の心筋細胞数に影響はなかった(N = 3, ** P < 0.01)。(C-D) 5日目の心筋細胞に対するVCAM-1可溶性蛋白質の効果についての免疫蛍光染色観察。YFPは緑色 (黄色) の蛍光 (YFP: 励起波長514 nm、蛍光波長527 nm) を、cTnTは赤色の蛍光 (cy3: 励起波長512 nm、蛍光波長552 nm) を発し、核はヘキスト33258 (青色) (ヘキスト33258: 励起

10

20

30

40

50

波長352 nm、蛍光波長461 nm)で染色された。VCAM-1可溶性蛋白質(10 µg/mL)との培養により、心筋細胞増殖効果が得られた。NCFとの共培養と、NCF(-)におけるVCAM-1可溶性蛋白質との共培養との条件の間で、心筋細胞数に有意差はなかった (N = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01)。

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

【図8】VCAM-1(+)心臓線維芽細胞の形態及び免疫蛍光染色。(A)磁気細胞分離装置(MACS)で単離したVCFs(VCAM-1(+))とVNCFs(VCAM-1(-))の位相差画像(写真)。(B)磁気細胞分離装置(MACS)で単離したVCFs(VCAM-1(+))とVNCFs(VCAM-1(-))の蛍光画像(写真)。VCAM-1は赤色の蛍光を発し、Hoechst 33258は青色の蛍光を発する。scale bar = 200 µm。

【図9】VCFsの至適配合比率の評価。(A)GFPを発現する心筋細胞と、ADFs、NCFs、又は、VCFs及び/若しくはVNCFsとを共培養した結果を示す蛍光画像(写真)。ADFs = マウス成体由来皮膚線維芽細胞、VCFs = VCAM-1陽性新生仔心臓線維芽細胞、VNCFs = VCAM-1陰性新生仔心臓線維芽細胞、NCFs = 新生仔心臓線維芽細胞。GFP心筋細胞は緑色の蛍光を、Ki67は赤色の蛍光を、cTnTは紫色の蛍光を発する。倍率 x20。(B)GFPを発現する心筋細胞と、ADFs、NCFs、又は、VCFs及び/若しくはVNCFsとを共培養した結果を示す棒グラフ。心筋細胞とADFsをそれぞれ80%と20%の割合で共培養したときのGFP(+)とcTnT(+)の細胞数を1とした。N = 4, **P < 0.01。

【図10】心筋細胞80%、VCFs 20%の濃度で作成した組織のDay5での心筋細胞と線維芽細胞の局在評価(N = 4)。

【図11】NCFsおよびADFs共培養下における培養5日間での心筋細胞の分裂効果とネットワーク構築能の評価(写真)。YFP発現心筋細胞は緑色蛍光を発し、DsRed線維芽細胞は赤色蛍光を発する。倍率 x200。

【図12】Aは、VCFs(VCAM-1(+))またはVNCFs(VCAM-1(-))とES由来心筋細胞の共培養時における培養3日間での心筋細胞の分裂を示す蛍光画像(写真)。GFP発現心筋細胞は緑色の蛍光を発する。倍率 x100。BはVCFsまたはVNCFsとES由来心筋細胞の共培養時における培養3日間での総移動距離を算出し、遊走能の評価を行った結果を示す。N = 5, *P < 0.05。

【図13】CD31およびVCAM-1陽性の心臓線維芽細胞の局在をFACSで解析した結果。

【図14】(A)生体心臓内におけるVCFsの局在(N = 3)。(B)心臓線維芽細胞におけるVCFsの局在(N = 3)。(C)生体心臓内におけるCD31陽性線維芽細胞の局在(N = 3)。(D)心臓線維芽細胞におけるCD31陽性線維芽細胞の局在(N = 3)。

【発明を実施するための形態】

【0012】

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

【0013】

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

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

【0014】

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

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

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

また、本発明における心臓細胞培養材料には、VCAM-1蛋白質の発現の有無に拘わらず、線維芽細胞を含めることができる。当該線維芽細胞としては、最終的に線維芽細胞または筋線維芽細胞となる全ての細胞が含まれる。すなわち、分化又は成熟段階の途中の細胞であって、その時点では線維芽細胞または筋線維芽細胞と同定できないものであっても、最終的に線維芽細胞または筋線維芽細胞となるものであれば制限なく使用可能である。その例としては、CD31（血管内皮細胞マーカー）を発現している線維芽細胞が挙げられる。VC

10

20

30

40

50

AM-1蛋白質としてVCAM-1蛋白質を発現している線維芽細胞を用いる場合、VCAM-1蛋白質発現細胞 (cell number) : CD31発現細胞 (cell number) は、例えば、5 : 5 ~ 9 : 1の範囲で適宜設定可能であり、5 : 5 ~ 8 : 2、6 : 4 ~ 8 : 2、または7 : 3 ~ 8 : 2としてもよい。

【0020】

本発明は、全細胞に占めるVCAM-1を発現する心臓線維芽細胞の割合が50%以上である、人工臓器材料に関する。当該心臓線維芽細胞の割合は、50%以上であり、60%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、80%以上がさらにより好ましく、90%以上が最も好ましい。当該人工臓器材料は、VCAM-1を発現する心臓線維芽細胞と心筋細胞を共培養することにより得ることができ、当該心臓線維芽細胞の共培養開始時の割合は、通常3%以上であり、4%以上が好ましく、6%以上がより好ましく、8%以上が更に好ましく、9%以上が特に好ましい。一方で、当該心臓線維芽細胞の共培養開始時の割合は、30%以下が好ましく、20%以下がより好ましく、20%が最も好ましい。また、本発明は、上記心臓細胞培養材料と共に、心臓細胞を培養することにより得られる、人工臓器材料の製造方法に関するものである。すなわち、本発明における心臓細胞培養材料は、心筋細胞等の心臓細胞と共に培養することにより、再生医療や組織モデルにおいて使用可能な、機能的な心臓組織を構築することができる。当該心臓組織は、人工臓器材料として使用可能である。当該人工臓器材料は、どのような形態であってもよい。たとえば、シート状にして心臓等の臓器の損傷部へ付着させてもよいし、シートを積層したり、スキャフォールドを用いてある程度の厚みを持たせた塊状にし、臓器欠損部へ移植してもよい。当該スキャフォールドの材質としては、ハイドロキシアパタイト、アテロコラーゲン又はゲル等

【0021】

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

【0022】

本発明における人工臓器材料またはその製造方法において使用される心臓細胞には、心筋細胞、平滑筋細胞、ペースメーカー細胞及び血管内皮細胞等の心臓を構成する全ての細胞が含まれる。当該心臓細胞の由来は、人工臓器材料としての使用目的に合わせて、適宜設定することが可能である。たとえば、ヒトへの移植を目的とする場合には、ヒト由来の心臓細胞を用いればよいし、マウス実験における組織モデルの構築を目的とする場合には、マウス由来のものをを用いればよい。また、心臓細胞は、胎児、新生児、小児、成体のいずれの時期のものを用いてもよく、特に制限はない。本発明における心臓細胞は、ES細胞、iPS細胞またはミューズ細胞等の多能性幹細胞や、間葉系幹細胞などの成体幹細胞から作製することが好ましい。

【0023】

本発明における「培養」とは、心臓細胞培養材料と心臓細胞とが一つの培養容器内に存在する状態、または同一の培養液に浸っている状態である限り、その培養条件に制限はなく、公知の細胞培養方法により行うことができる。心臓細胞培養材料がVCAM-1蛋白質を発

現している細胞である場合、心臓細胞に対するVCAM-1蛋白質を発現している細胞 (cell number) の混合割合は、3 ~ 20 % の範囲で適宜使用し得る。

【 0 0 2 4 】

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

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

10

【 0 0 2 5 】

本発明における製造方法には、さらに、培養した細胞を回収するステップを含めてもよい。当該「培養した細胞」とは、線維芽細胞と心臓細胞の両方を含むものであっても、心臓細胞のみを含むものであってもよい。細胞を回収するステップとしては、トリプシン等のプロテアーゼにより細胞を剥離して回収してもよいが、細胞外マトリックス等を保持したまま細胞の剥離が可能である温度応答性培養皿を使用して、温度変化により細胞を剥離させ、回収するのが好ましい。

【 実施例 】

【 0 0 2 6 】

20

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

【 0 0 2 7 】

[実施例 1]

1. 材料と方法

< 動物と試薬 >

ワイルドタイプのC57BL/6マウスは、日本SLC (静岡) から購入した。全ての実験プロトコルは、東京女子医科大学の動物実験委員会に承認された。後述する抗体は、免疫細胞化学、ウエスタンブロット及びフローサイトメトリー解析に用いた：ウサギポリクローナル抗ディスコイジンドメインレセプターチロシンキナーゼ2 (DDR2) (GeneTex, Irvine, CA) ; モルモットモノクローナル抗ビメンチン (Progen, Heidelberg, Germany) ; マウスモノクローナル抗NG2 (Millipore, Temecula, CA) ; ウサギポリクローナル抗平滑筋アクチン (Abcam, Cambridge, UK) ; マウスモノクローナル抗心筋型トロポニンT (cTnT) (Thermo Scientific, Rockford, IL) ; マウスモノクローナル抗サイトケラチン11 (EXB10, Nad Safinou, CZ) ; ウサギポリクローナル抗Ki67 (Abcam, Cambridge, UK) ; ウサギポリクローナル抗ヒストンH3 (phosphor S10) (Abcam, Cambridge, UK) ; ラットモノクローナル抗インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ (Abcam, Cambridge, UK)。組み換えマウスVCAM-1/CD106 Fc キメラ (R&D systems, Minneapolis, MN) 特に指定がない限り、全ての試薬はシグマアルドリッチから購入した。二次抗体はJackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) から購入した。

30

40

【 0 0 2 8 】

< マウスES細胞培養 >

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

【 0 0 2 9 】

50

< 線維芽細胞分離 >

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

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

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

10

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

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

【 0 0 3 0 】

20

< 細胞シート作製 >

細胞を播種する前に、温度応答性培養皿(UpCell; セルシード)の表面を、FBSで2時間コートした。mESC由来心筋細胞とそれぞれの種類の線維芽細胞とは、8:2の割合で、10% FBS添加DMEMにて共培養した(3.2 x10⁵細胞/cm²)。培養5日後、細胞シートを剥離するために、細胞を20 で培養した。サンプルの明視野像はNikon ECLIPSE Tiにより得られた。

【 0 0 3 1 】

< 電気生理学的解析 >

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

30

【 0 0 3 2 】

< 免疫細胞化学 >

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

【 0 0 3 3 】

< FACS解析 >

培養細胞(5 x 10⁵細胞)は、細胞培養液中の最終濃度が10 μMでBrdU染色された。FACS解析用のBrdU 染色は、BrdU Flow Kits Instruction Manual (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)に記載のとおりに行われた。簡潔に言うと、細胞は固定され、BD Cytofix/Cytoperm バッファーにて細胞膜透過処理された。それから取り込まれたBrdUをDNaseに曝した。BrdU染色は、APC-anti-BrdU antibody (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)を使用して行われた。サンプルはGallios (Beckman Coulter, Brea, CA)で解析された。下記の試薬が解析に使用された: BD Cytofix/Cytoperm Buffer (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); BD Perm/Wash Buffer (10X) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); BD Cytoperm Plus Buffer (10X) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); BrdU (10 mg/mL) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ); DNase (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)。

40

【 0 0 3 4 】

50

< タイムラプス撮影 >

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

【 0 0 3 5 】

< RNA抽出及び網羅的遺伝子解析 >

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

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

【 0 0 3 6 】

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

【 0 0 3 7 】

cDNA産物はそれから、蛍光性cRNAを作製するためのインビトロトランスクリプションにおいて、テンプレートとして使用された。cDNA産物は、T7 RNAポリメラーゼとCy3標識CTPの存在下で、transcription master mixと混合し、40 °Cで2時間インキュベートした。標識cRNAはQIAGEN's RNeasy mini spin columnsを用いて精製し、30 µlのヌクレアーゼフリー水で抽出した。増幅とラベリングの後、cRNAの量とシアニン取り込みを、Nanodrop ND-1000分光光度計とAgilent Bioanalyzerを使用して決定した。試料のハイブリダイゼーションのために、Cy3標識cRNA 1.65 µgがフラグメント化され、Agilent Mouse GE 4x44K v2 Microarray (Design ID: 026655)に65 °Cで17時間ハイブリダイズした。洗浄後、マイクロアレイはAgilent DNA microarray scannerを使用してスキャンされた。マイクロアレイのデータ解析では、各々のスキャンされたフィーチャーの強度値を、バックグラウンド低減を行うAgilent feature extraction software version 10.7.3.1を使用して定量した。

【 0 0 3 8 】

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

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

【 0 0 3 9 】

< 定量的リアルタイムPCR解析 >

相補的DNAは、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)を用いて、トータルRNAから作製された。PCR関連プライマーとしては、VCAM-1 Gene Expression Assays(life Technologies)が使用された。各々のRT-PCRは、iCycler (BIO-RAD)にて、10分25 °C、120分37 °C、及び5秒85 °Cにて行われた。各々の試料から、cDNAテンプレート（1 µg）が使用された。TaqManプローブリアルタイムPCR実験は、TaqMan Gene Expression Assays (Applied biosystems)を用いて行われた。全ての実験は三重測定で行わ

れた。試料は7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)にて40回のサイクルで、以下のように行われた。50 2分、95 10分、その後95 15秒及び60 1分の40サイクルが続いた。相対的な定量は、内在性コントロールとしてのGapDH遺伝子を使用した定量的リアルタイムPCRのための CT法に従って計算された。

【 0 0 4 0 】

< ウエスタンブロット >

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

【 0 0 4 1 】

< 中和抗体アッセイ >

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

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

【 0 0 4 2 】

< 統計解析 >

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

【 0 0 4 3 】

2 . 実験結果

< mESC由来心筋細胞及び線維芽細胞を使用した細胞シート作製 >

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

【 0 0 4 4 】

特定範囲の量の線維芽細胞が、mESC由来心筋細胞を使用した細胞シートの構築に必要であり、心筋細胞と線維芽細胞との最適比は8:2であるという以前の発見に基づいて(Biomaterials. 2011;32:7355-7362)、mESC由来心筋細胞と3種の線維芽細胞(ACF、ADF及びNC

F)を使用して、温度応答性培養皿UpCellにおいて心臓細胞シートの作製を試みた。心筋細胞をACF又はNCFと共培養すると、全ての範囲にわたって拍動する心臓が等しく分布していた。それに対して、心筋細胞をADFと共培養すると、拍動する細胞は凝集していた。5日間の培養後に、37 から20 に培養条件を変更する温度降下処理を行うと、線維芽細胞と共培養したものは全て単層細胞シートとなったが、線維芽細胞と共培養しなかったものは、単層細胞シートにはならなかった(図2A)。

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

<細胞シートにおける心筋細胞の増殖>

心臓由来の線維芽細胞と共培養した細胞シートにおける心筋細胞数と、皮膚由来の線維芽細胞と共培養した細胞シートにおける心筋細胞数が異なる原因を調べるために、共培養開始から1日目と5日目における心筋細胞数を検査した(図3A-C)。一日目においては、心筋細胞数は各条件間で同じであったことから、各々のタイプの線維芽細胞は播種後の心筋細胞の初期接着には影響しないことが示唆された。ACF又はNCFとの共培養において、5日目におけるYFP(+)とcTnT(+)の心筋細胞数は、有意に1日目よりも多かった。一方、ADFと共培養又は心筋細胞のみの条件下では、5日目の心筋細胞数は1日目と同じであった。YFP(+)心筋細胞及びDsRedマウス由来線維芽細胞の低速度撮映像解析は、NCF共培養において、心筋細胞が移動して増殖し、相互ネットワーク構成を形成することを示した。これに対してADF共培養においては、心筋細胞の増殖は少なく、ネットワーク構成を形成しなかった。これらの発見は、皮膚由来ではなく心臓由来の線維芽細胞が共培養条件下でmESC由来の心筋細胞の増殖を誘導しているかもしれないことを示唆している。

【0048】

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

【0049】

NCF共培養下での心筋細胞増殖の基礎となるメカニズムを調査するために、mESC由来心筋細胞とNCFを、セルカルチャーインサートを用いて培養した。この実験において、NCFは上層において培養され、心筋細胞は下層において培養された。NCF存在下で、5日目の心

筋細胞数は、1日目のものよりも顕著に多かった(図4G)。しかしながら、セルカルチャーインサート実験において、1日目と5日目の間の心筋細胞数の増加程度(～1.8倍)(図4H)は、共培養条件下(～2.5倍)のものよりも低かった。これらの発見は、NCFから分泌される可溶性因子と、心臓線維芽細胞と共培養した心筋細胞における細胞間相互作用が、心筋細胞増殖を促進しているのかもしれないことを、示している。

【0050】

< NCF及びADFの網羅的遺伝子解析 >

上記の効果関連のものを左右する因子を同定するために、NCFとADFとの間でマイクロアレイ解析を使用して、網羅的遺伝子解析を行った。図5Aに示されるように、遺伝子発現において多くの異なる遺伝子がNCFとADFとの間で観察された。NCFでは、500以上の遺伝子の発現が、ADFと比較して10倍以上促進されていることが示された。リストの中で心血管関連遺伝子を選択すると、20遺伝子が残った。さらに、ノックアウトマウスモデルにおいて、心臓の発生に異常をきたし、胎生致死フェノタイプを示すことが報告された遺伝子であり、可溶性因子と接着因子の2つのフォームで作用する遺伝子を選択したところ、Vcam-1が残った。定量的RT-PCRとウエスタンブロット解析により、ADF共培養と比べて、NCF共培養では、Vcam-1発現が促進されていることを確認した(図5B-D)。

【0051】

< 心臓線維芽細胞との共培養におけるVCAM-1依存的心筋細胞増殖 >

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

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

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

【0052】

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

マウスC57/BL6の新生児マウス(1日齢)から心臓線維芽細胞を、成体マウス(10-12週齢)から皮膚線維芽細胞を解剖し、回収した。各々の線維芽細胞を継代数3まで接着培養し、1条件につき 1×10^7 細胞の細胞量を得た。なお、継代数3は、細胞シートにより作製された上記心筋組織の培養条件と同一である。

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

【0053】

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

【0054】

VCAM-1陽性細胞を多く含む心臓線維芽細胞は、その発現するVCAM-1を介してマウスES由

10

20

30

40

50

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

【 0 0 5 5 】

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

10

【 0 0 5 6 】

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

20

【 0 0 5 7 】

[実施例 2]

多能性幹細胞由来の心筋組織を構築する上で、心臓線維芽細胞はその高発現する蛋白質であるVCAM-1を介して心筋細胞を細胞増殖させ、作成した心筋組織全体での拍動を促し、機能性を有意に高めることが、実施例 1 において明らかとなった。しかしながら心臓線維芽細胞は、心臓という局所領域においてもヘテロな形質を有することが明らかとなり、必ずしも全ての心臓線維芽細胞がVCAM-1を発現するわけではないことも明らかとなった。そこで、線維芽細胞を従来のように形態学的特徴により分類するのではなく、発現する蛋白質によって分子生物学的に分類した場合、VCAM-1を発現する心臓線維芽細胞（VCFs）をどの程度配合することで高機能な心筋組織を作成できるのかを解明すべく、検討を行った。

30

【 0 0 5 8 】

1. 実験方法

（ 1 ）動物と試薬

野生型C57BL/6マウスはJapan SLC（Shizuoka, Japan）から購入した。B6 Cg-Tg（CAG-DsRed*^{MST}）1Nagy/Jマウスはジャクソンラボラトリー（米国メイン州バーハーバー）から購入した。全ての実験プロトコルは慶應義塾大学動物実験委員会から承認を受けている。以下に記載する抗体は免疫蛍光染色とフローサイトメトリーに使用した。guinea pig monoclonal anti-vimentin（Progen, Heidelberg, Germany）、mouse monoclonal anti-cardiac troponin T（cTnT）（Thermo Scientific, Rockford, IL）、rabbit polyclonal anti-Ki67（Abcam）、Rat monoclonal anti-VCAM-1（Biotin）（Abcam）、Rat monoclonal anti-CD31（Abcam）、Rabbit monoclonal anti-VCAM-1（Abcam）。二次抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories（West Grove, PA）から購入した。

40

【 0 0 5 9 】

（ 2 ）マウスES由来心筋細胞の培養

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

50

-ミオシン重鎖プロモーター下にpuromycin耐性遺伝子とgreen fluorescent protein (GFP)を導入したマウスES由来心筋細胞 (Cor.At) は、AxioGenesis AG (Cologne, Germany) から購入した。2日間のpuromycin処理を行い、puromycinを含まない培地で2週間培養し、実験を行った。

【0060】

(3) VCAM-1陽性心臓線維芽細胞の単離

出生後1日の野生型C57BL/6の新生仔マウスから単離した心臓線維芽細胞を培養し、磁気細胞分離装置 (Magnetic-activated cell sorting, MACS) を用いてVCFsの単離を行った。単離したVCFsは再度培養し、死細胞を除去した後に実験を行った。

【0061】

(4) 免疫蛍光染色

細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫蛍光染色を行った。免疫蛍光染色した細胞は共焦点定量イメージサイトメーターCQ1 (Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan) で解析を行った。

【0062】

(5) フローサイトメトリー

野生型C57BL/6マウスから回収した心臓はgentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) にて組織を分散し、細胞レベルにホモジナイズを行った。得られた細胞は免疫蛍光染色した後、S3セルソーター (BIO-RAD, CA) で解析を行った。

【0063】

(6) タイムラプス撮影と解析

ネットワーク形成能の評価として、YFP陽性のES細胞由来心筋細胞と、DsRedマウスから単離した心臓線維芽細胞を共培養し、BZ-9000蛍光顕微鏡の内部を37℃、5% CO₂ 濃度に保ち、5日間のタイムラプス観察を行った (Keyence, Osaka, Japan)。単一な心筋細胞の遊走能の評価は、GFP発現型心筋細胞を 5.45×10^4 cells/cm²、MACSにより単離した線維芽細胞を 1.36×10^4 cells/cm²の濃度で、心筋組織作成時よりも薄い濃度で播種し、BZ-X700蛍光顕微鏡で3日間のタイムラプス撮影を行った。撮影したタイムラプスイメージの解析はMotion Analyzerを用いて培養3日間での心筋細胞の総移動距離 (mm) を算出し、遊走能の評価を行った (Keyence)。

【0064】

2. 結果

VCFsおよび心筋細胞の至適配合率

MACSで単離し培養したVCFsとVCAM-1陰性心臓線維芽細胞 (VNCFs) は、位相差画像において、どちらも紡錘状の線維芽細胞様の形態を示すことがわかった (図8A)。しかしながら、免疫蛍光染色により、VCFsはほぼ全ての細胞が赤色蛍光を発するVCAM-1蛋白質の発現が観察されたが、VNCFsはVCAM-1蛋白質の発現が観察されなかった (図8B)。

【0065】

次に、心臓線維芽細胞と皮膚線維芽細胞を対象に、回収したVCFsとVNCFsを各種の配合比で心筋細胞と共培養したところ (表1)、VCFsを20%、心筋細胞を80%で播種した条件で、Day5において最も心筋細胞の分裂促進効果が見られた (図9A及びB)。また、Day5におけるVCFs20%を配合した心筋組織内において、Hoechst33258陽性の総核数からcTnT/GFP/Hoechstのトリプルポジティブの細胞数を引くことで線維芽細胞の数を算出したところ、心筋細胞は9.5%、線維芽細胞は90.5%存在することが明らかとなった (図10)。

【0066】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

Sample	Compounding ratio of each type of cell				
	Cardiomyocytes	VCAM1(+) NCFs	VCAM1(-)NCFs	NCFs	ADF
A	80%	—	—	—	20%
B	80%	0%	20%	—	—
C	80%	4%	16%	—	—
D	80%	8%	12%	—	—
E	80%	12%	8%	—	—
F	80%	16%	4%	—	—
G	80%	20%	0%	—	—
H	80%	—	—	20%	—

10

【 0 0 6 7 】

心筋細胞の遊走能の評価

タイムラプス撮影により、YFP陽性のES細胞由来心筋細胞と、DsRedマウスから単離した心臓線維芽細胞を共培養すると、培養5日目において心筋細胞は細胞分裂し、強固なネットワークを構築することが明らかとなった(図11)。前述の通り、心臓線維芽細胞はその発現するVCAM-1蛋白質を介して心筋細胞の細胞分裂を促す。そこで、MACSにより単離したVCFsとVNCFsを、GFP発現型心筋細胞と共培養し、タイムラプス撮影により培養3日間における心筋細胞の総移動距離(mm)を算出し、遊走能の評価を行った。VCFsを配合すると、GFP陽性の心筋細胞数が増殖することが明らかとなり、動画解析により心筋細胞の遊走能が有意に高く、高度なネットワーク形成に参与していることが示唆された(図12)。

20

【 0 0 6 8 】

生体心臓におけるVCFsの局在の評価

VCFs20%、心筋細胞80%の濃度で5日間共培養し、心筋組織を作成すると、心筋組織内の心筋細胞が最も細胞増殖し、高い遊走能を獲得することが明らかとなった(図9、11及び12)。また、上記の条件で作成された心筋組織内には、心筋細胞が9.5%、線維芽細胞が90.5%存在することが明らかとなった(図10)。そこで、心筋細胞と線維芽細胞の局在が生体の心臓と異なるか評価を行うべく、出生後1日のマウスの心臓を回収し、酵素処理にて細胞レベルへと破碎して、心筋細胞とVCFsの局在の評価をフローサイトメトリーにより行った。すると、VCFsは心臓内に14.8%存在し、心臓線維芽細胞のうち55.6%がVCAM-1蛋白質を発現することが明らかとなった(図13、図14A及びB)。また心臓内にはCD31を発現する線維芽細胞が3.7%存在することが明らかとなり、心臓線維芽細胞のうち16.1%がCD31蛋白質を発現することも明らかとなった(図13、図14C及びD)。

30

【 0 0 6 9 】

3. 結論

本研究では、磁気細胞分離装置(Magnetic-activated cell sorting, MACS)でソーティングしたVCFsを、ES細胞由来心筋細胞と各種の濃度で配合し、心筋細胞の増殖度を評価することで、高機能な心筋組織を作成する上で求められるVCFsの至適播種濃度は20%であることを明らかにした。

40

【 0 0 7 0 】

また、培養後Day5におけるVCFs20%心筋組織内での心筋細胞と線維芽細胞の局在は、それぞれ9.5%、90.5%であることが明らかとなった。VCFsを20%、心筋細胞を80%の濃度で播種し、タイムラプスで心筋細胞の遊走能の評価を3日間行ったところ、VCFsは心筋細胞の高い遊走能を付与することが明らかとなり、心筋組織内の高度な心筋ネットワーク形成に参与することが示唆された。

【 0 0 7 1 】

フローサイトメトリーの結果から、作成したVCFs配合心筋シート的心筋細胞と線維芽細胞の局在は、生体の心臓とは大きく異なることが明らかとなり、心臓内にはVCFsの他に、

50

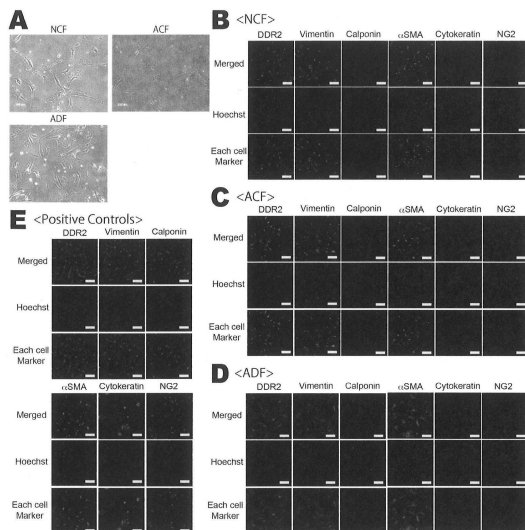
Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) を発現する線維芽細胞が局在することが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

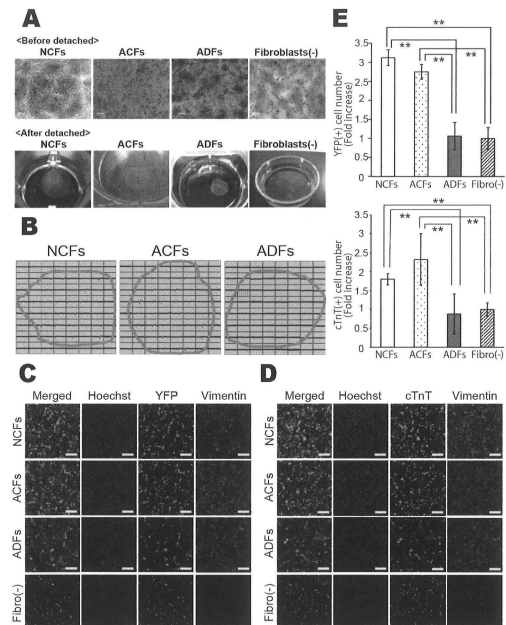
【0072】

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

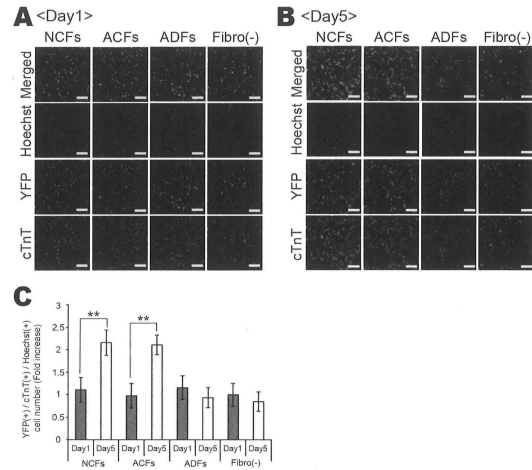
【図 1】



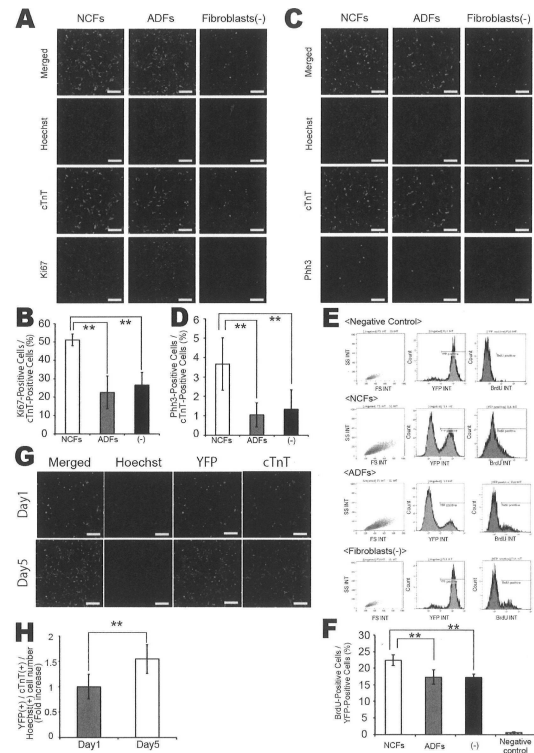
【図 2】



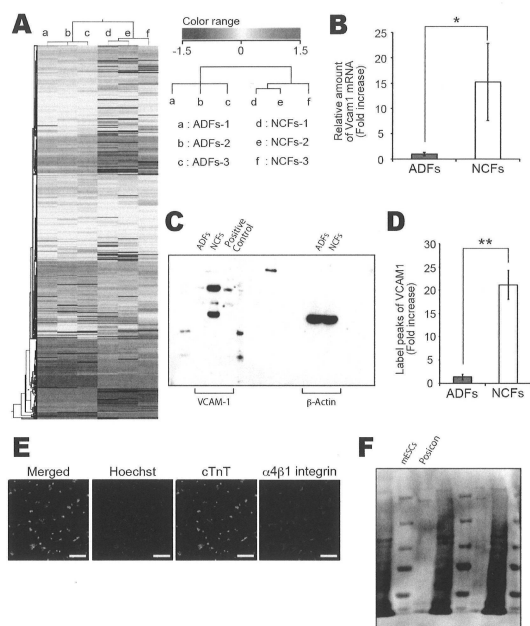
【 図 3 】



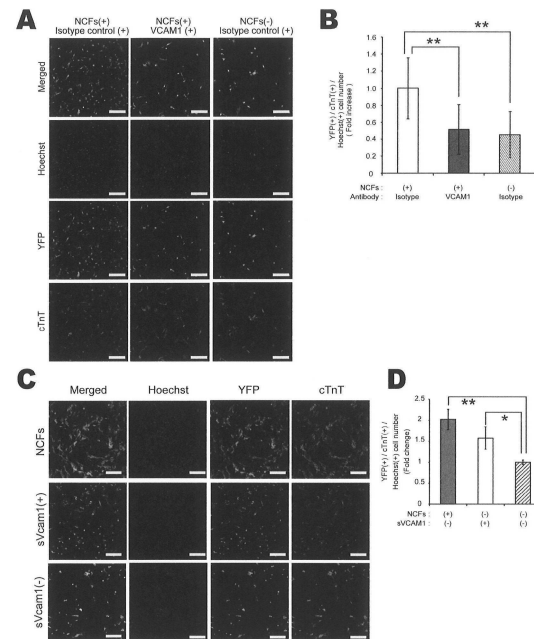
【 図 4 】



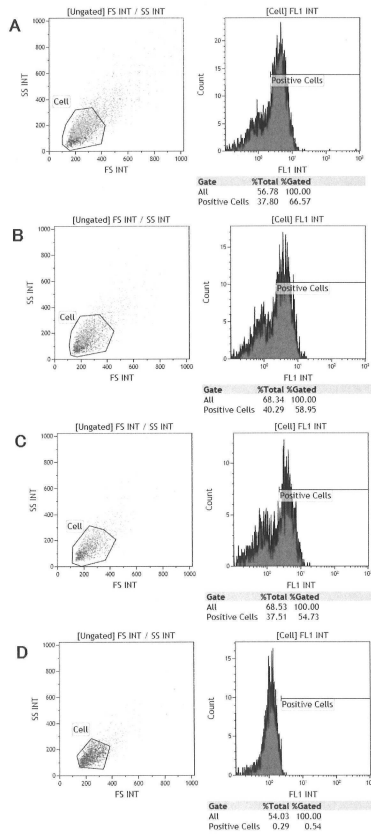
【 図 5 】



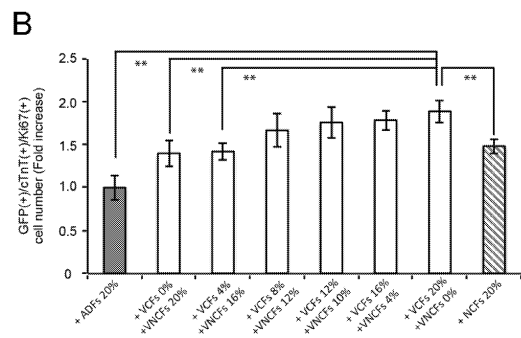
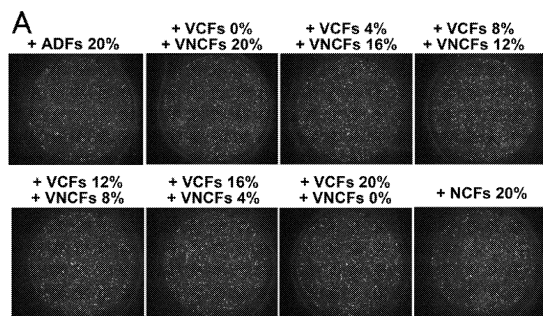
【 図 6 】



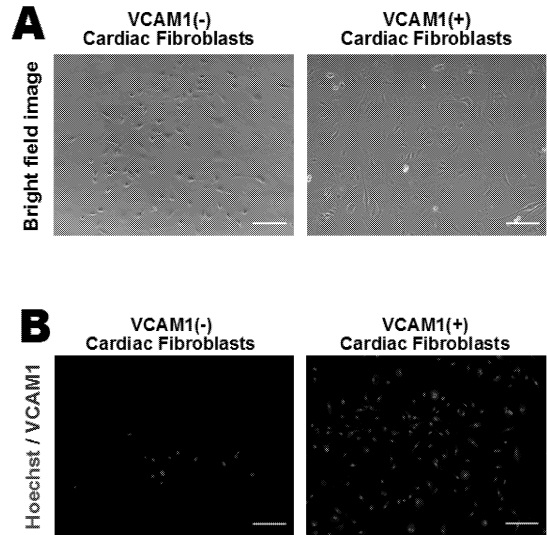
【 7 】



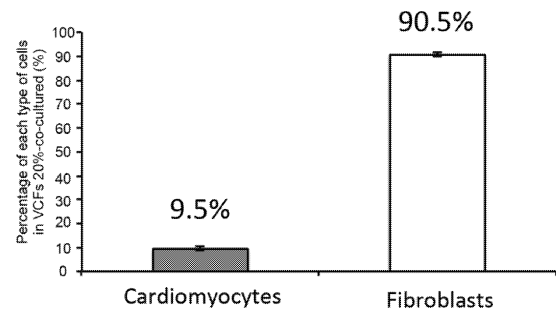
【 9 】



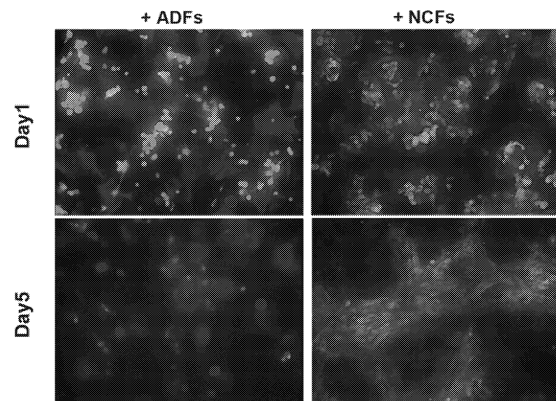
【 8 】



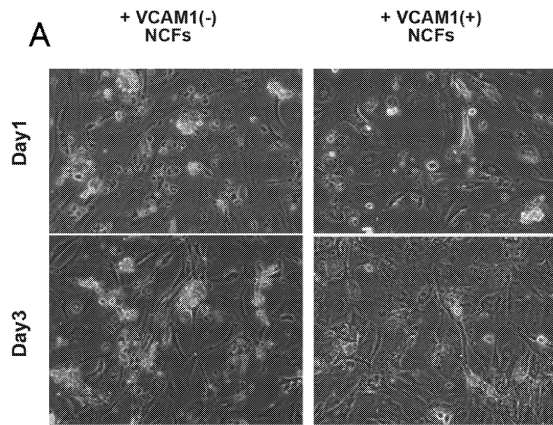
【 10 】



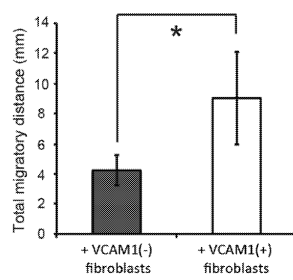
【 11 】



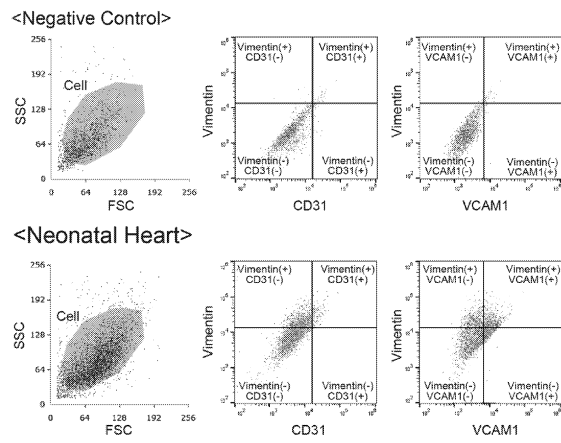
【 1 2 】



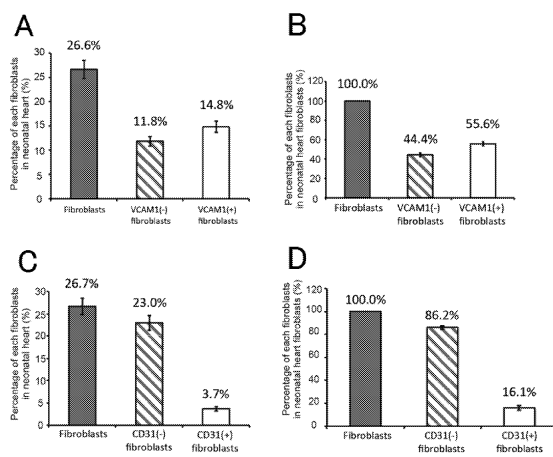
B



【 1 3 】



【 1 4 】



フロントページの続き

特許法第30条第2項適用 日本再生医療学会雑誌 再生医療 第13巻/増刊号 発行日 平成26年1月27日

特許法第30条第2項適用 第13回 日本再生医療学会総会 開催日 平成26年3月4日～6日

特許法第30条第2項適用 学位第一次審査 開催日 平成26年2月25日 東京女子医科大学学術リポジトリ 掲載アドレス <http://ir.twmu.ac.jp/dspace/handle/10470/30631> 掲載日 平成26年3月14日

早期審査対象出願

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 国際公開第2014/039804(WO, A1)

Biomaterials (2011) Vol.32, No.30, pp.7355-7362

PLoS ONE (2011) Vol.6, No.8, e23657, pp.1-9

治療学 (2009) Vol.43, No.6, pp.646-650

Stem Cells (2012) Vol.30, No.6, pp.1196-1205

Basic Res. Cardiol. (2011) Vol.106, pp.829-847

Developmental Biology (2006) Vol.299, pp.489-504

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN)

Thomson Innovation

Scopus

PubMed