

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462089

研究課題名(和文)細胞シートによる再生医療の汎用性向上を目指した細胞シート凍結方法の開発

研究課題名(英文)The Development of Cryo-Vitrification Method in Human Myoblast Cell Sheet for Propagation of Regeneration Therapy

研究代表者

吉川 泰司 (Yoshikawa, Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40570594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋芽細胞シートおよびiPS細胞由来心筋細胞シートの臨床応用可能な凍結保存方法に関して探索を行った。その結果、ガラス化凍結された骨格筋芽細胞シートは保存後もシートの形態や機能の維持していた。また、心筋梗塞ヌードラットに保存後の細胞シートを移植した後に心機能改善効果が認められた。また、iPS細胞由来心筋細胞を凍結保存後にも心筋細胞純度は凍結前とほぼ同じ結果を再現でき、同期拍動する心筋細胞シートを作成できた。さらに心筋梗塞ヌードラットに移植し、凍結心筋細胞を移植しても非凍結心筋細胞と同程度の有効性を有することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We explored the clinically applicable cryopreservation method of skeletal myoblast sheet and iPS cells-derived cardiomyocytes (CMs) sheet. As a result, the vitrified frozen human skeletal myoblast sheet maintained the functionality and structure of cell-sheet. In addition, transplantation of the thawed human myoblast sheet from the vitrified cryopreservation induced the improvement of cardiac function in the myocardial infarction (MI) nude rat. In the iPS cell-derived CMs, the purity of CMs did not change by the vitrified frozen and the thawing process. The thawed CMs sheet showed spontaneous synchronized beatings. To check the impacts on cardiac performance in vivo, we transplanted the cell sheets of non-cryopreserved CMs and cryopreserved CMs into nude rats with MI. There was no significant difference in the efficiency between the non-cryopreserved and cryopreserved groups, indicating that the efficiency of cryopreserved CMs in vivo was comparable to that of freshly prepared CMs.

研究分野：再生医療

キーワード：細胞シート ガラス化凍結 骨格筋芽細胞 iPS細胞由来心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

再生医療は次世代型の治療としてあらゆる治療再生医療は次世代型の治療としてあらゆる疾患治療分野において発展が期待されている。再生医療には様々なアプローチがあるが、障害臓器あるいは障害部位に体外にて増幅した自己あるいは他家細胞を移植するという細胞移植療法はその中心的役割を果たす治療と考えられている。しかしながら、細胞移植の欠点として、移植された細胞が障害臓器あるいは障害部位において、長期間にわたって生存し機能を維持しないことが挙げられ、この移植された細胞の生存効率には細胞投与方法が深く関わっていることが知られている (Fukushima et al. Future Cardiol 2013)。一方、多くの機能的な細胞を移植し、生存させる手法として、細胞シート移植法が本邦において開発された。この細胞シート移植療法は、難治性疾患に対する再生医療との位置づけにて臨床試験が実施され、様々な疾患においてその安全性および治療効果が証明されつつある (Sawa et al. Surgery Today 2012, Nishida et al. N Eng J Med 2004)。とはいうものの、本細胞シート治療法は未だ臨床における標準治療としては確立されていないのが現状である。中でも最も重要な臨床上的問題点として、汎用性に優れないことが挙げられている。そこで、細胞シートの輸送及び保存の最適化により、汎用性は向上するものと考えられるが、そのためには輸送や保存に関わる侵襲が細胞及び細胞シートに及ぼす影響を、基礎的研究をもって明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

細胞シート移植療法は本邦発の再生医療であり様々な難治性疾患への臨床応用がされつつある。本治療法を標準的治療とするためには、細胞採取、培養、細胞シート作成などの手順を簡素化することで汎用性を高めることが必要である。中でも、細胞シートの凍結保存技術の開発は、細胞シート移植の汎用性を飛躍的に向上させるものである。当科では、重症心不全を対象疾患として、細胞シート療法を、基礎研究によって開発し、自己骨格筋芽細胞シートで薬事承認を受けている。本研究の目的は、iPS 細胞由来心筋細胞シート、骨格筋芽細胞シートの臨床応用可能な長期間凍結保存方法を、基礎研究的手法をもって探索することである。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞由来心筋細胞の凍結保存方法の検討

分化誘導した心筋細胞を凍結保存液で懸濁し、緩慢凍結保存した。その後、凍結融解前後の細胞生存率や回収率、純度の変化、調製した心筋細胞シートを微小電極アレイ (MEA) で電気生理学的解析および免疫染色評価をした。さらに心筋梗塞モデルのヌード

ラットに凍結保存していない心筋細胞 (非凍結群) と凍結した心筋細胞でそれぞれ調製した細胞シート (凍結群) を移植し、sham オペ群と移植後の心機能を比較した。

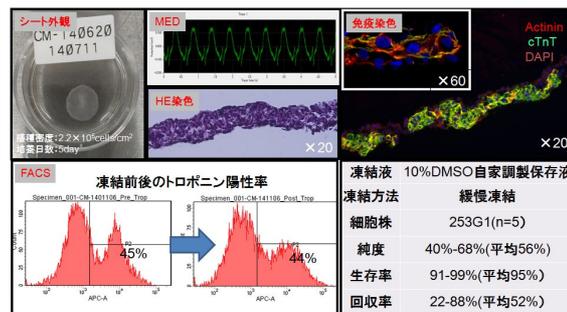


(2) 骨格筋芽細胞シートのガラス化凍結法の検討

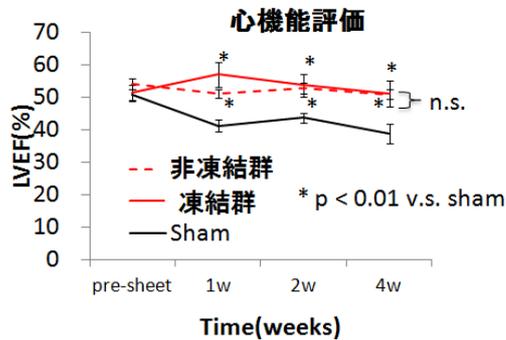
骨格筋芽細胞シートを急速凍結液浸漬し、耐低温フィルムで密閉して液体窒素の液面上で急速凍結した。急速融解したシートの外観や構造を観察し、細胞生存率やサイトカインの産生量を評価した。更に保存後のシートをヌードラットの心筋梗塞モデルに移植し心機能改善効果を検証した。

4. 研究成果

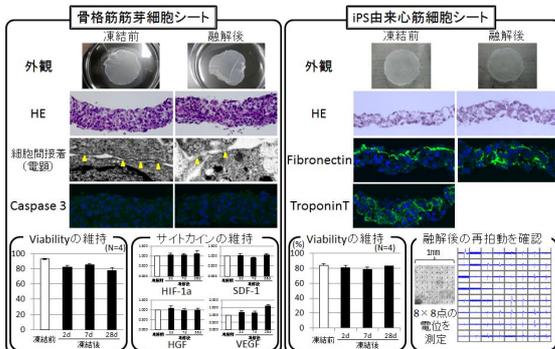
iPS 細胞由来の心筋細胞の機能を維持したまま、凍結保存する方法を検討した。ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を含む胚様体から解離した細胞を 10% DMSO 及び凍害保護剤を含む凍結保存液中で緩慢凍結した。解凍した細胞を 10% 血清含有培地に懸濁し、シート培養を行い、生存率、心筋細胞マーカー発現率、MED システムでの同期拍動性の評価を行った。その結果、回収率は平均 52%、生存率は平均 95%、FACS 解析によるトロポニン陽性率は凍結前とほぼ同じ結果を再現でき、MED システムでは同期拍動する心筋細胞シートを作成できた。



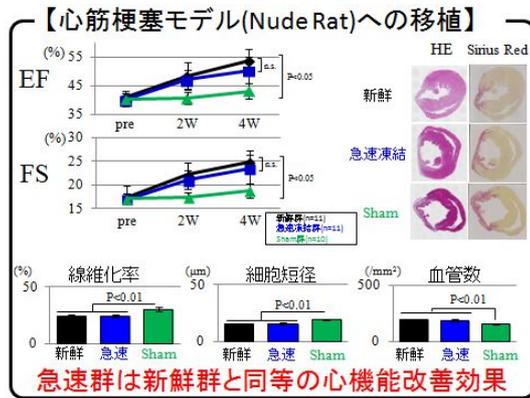
さらに心筋梗塞モデルのヌードラットに凍結保存していない心筋細胞 (非凍結群: n = 6) と凍結した心筋細胞でそれぞれ調製した細胞シート (凍結群: n = 7) を移植し、sham 群 (n = 7) と移植後の心機能を比較した。移植 4 週間後、ヌードラットの左室駆出率は sham 群 (39±1%) と比較して、非凍結群 (51±3%) 及び凍結群 (51±5%) で有意に高く (p < 0.01) 非凍結群と凍結群では有意な差は見られなかった。以上より、本凍結保存技術により、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が長期保存や輸送が可能となることから、臨床応用に向けた有効な凍結保存法であることが示唆された。



次に、細胞シートの汎用性を向上させる目的で、明治大学の長嶋先生らが開発された細胞シートのガラス化凍結法を元に、骨格筋芽細胞シートおよびiPS細胞由来心筋細胞シートのガラス化凍結を検討した。その結果、凍結前と融解後において、外観・強度・形質に変化がなく、最大 28 日間細胞の生存率が維持されることを確認した。骨格筋芽細胞の治療効果の主たるメカニズムである、細胞シートからのサイトカインの放出も凍結前後で変化がないことが分かった。さらに、iPS 細胞由来心筋細胞シートにおいては細胞シートの融解し、再培養した後の拍動を確認し、電気生理学的特質も変化がないことを確認した。



さらに、薬事承認を受けた骨格筋芽細胞シートについてガラス化凍結保存後の in vivo その有用性を確認した。3 ヶ月間凍結保存した細胞シートと凍結前の細胞シートをそれぞれ心筋梗塞モデルのヌードラットに移植し、心機能改善効果を検証した。その結果、ヌードラットの移植前後の左室駆出率は凍結した細胞シート移植群では $40 \pm 2\%$ 、 $54 \pm 4\%$ に対し、凍結前の細胞シート移植群では $41 \pm 2\%$ 、 $50 \pm 5\%$ となり、両群間の心機能改善効果に有意な差はなかった。以上より、ガラス化凍結された骨格筋芽細胞シートはシートの形態や機能の維持および心機能改善効果が認められ、細胞シート治療の汎用性を向上する可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1: Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Toda K, Sakaguchi T, Nishi H, Yoshikawa Y, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in porcine ischemic cardiomyopathy model. J Heart Lung Transplant. 2017 Feb;36(2):237-239. doi: 10.1016/j.healun.2016.11.012. Epub 2016 Dec 6. PubMed PMID: 28159019.

2: Kashiya N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kawamura A, Yoshida S, Harada A, Watabe T, Kanai Y, Toda K, Hatazawa J, Sawa Y. Development of PET Imaging to Visualize Activated Macrophages Accumulated in the Transplanted iPSc-Derived Cardiac Myocytes of Allogeneic Origin for Detecting the Immune Rejection of Allogeneic Cell Transplants in Mice. PLoS One. 2016 Dec 8;11(12):e0165748. doi: 10.1371/journal.pone.0165748. eCollection 2016. PubMed PMID: 27930666; PubMed Central PMCID: PMC5145152.

3: Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Kawamura T, Mochizuki-Oda N, Masuda S, Sawa Y. Building A New Treatment For Heart Failure-Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cells into the Heart. Curr Gene Ther. 2016;16(1):5-13. Review. PubMed PMID: 26785736.

4: Kawamura A, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kashiya N, Ito E, Watabe T, Masuda S, Toda K, Hatazawa J, Morii E, Sawa Y. Teratocarcinomas Arising from Allogeneic Induced Pluripotent Stem

Cell-Derived Cardiac Tissue Constructs Provoked Host Immune Rejection in Mice. *Sci Rep.* 2016 Jan 14;6:19464. doi: 10.1038/srep19464. PubMed PMID: 26763872; PubMed Central PMCID: PMC4725880.

5: Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Kawaguchi N, Nakatani S, Daimon T, Okita Y, Sawa Y. Skeletal Myoblast Cell Sheet Implantation Ameliorates Both Systolic and Diastolic Cardiac Performance in Canine Dilated Cardiomyopathy Model. *Transplantation.* 2016 Feb;100(2):295-302. doi: 10.1097/TP.0000000000001014. PubMed PMID: 26636739; PubMed Central PMCID: PMC4732011.

6: Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Kashiyama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Miyagawa S, Okuyama H, Sawa Y. Structural Changes in N-Glycans on Induced Pluripotent Stem Cells Differentiating Toward Cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Nov;4(11):1258-64. doi: 10.5966/sctm.2015-0029. Epub 2015 Sep 16. PubMed PMID: 26378261; PubMed Central PMCID: PMC4622404.

7: Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Toda K, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Xenotransplantation of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cell Sheets Attenuates Left Ventricular Remodeling in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Tissue Eng Part A.* 2015 Aug;21(15-16):2272-80. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0036. Epub 2015 Jul 14. PubMed PMID: 26046810; PubMed Central PMCID: PMC4528991.

8: Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Sougawa N, Okimoto K, Tada C, Saito A, Sawa Y. Eliminating residual iPSC cells for safety in clinical application. *Protein Cell.* 2015 Jul;6(7):469-71. doi: 10.1007/s13238-015-0170-4. PubMed PMID: 26040624; PubMed Central PMCID: PMC4491051.

9: Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Yagi N, Astolfo A, Shirai M, Sawa Y. Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem

Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart. *Cell Transplant.* 2015;24(12):2479-89. doi: 10.3727/096368914X685799. Epub 2015 Jan 20. PubMed PMID: 25606821.

10: Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Saito A, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y. Targeted delivery of adipocytokines into the heart by induced adipocyte cell-sheet transplantation yields immune tolerance and functional recovery in autoimmune-associated myocarditis in rats. *Circ J.* 2015;79(1):169-79. doi: 10.1253/circj.CJ-14-0840. Epub 2014 Nov 5. PubMed PMID: 25373489.

11: Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiyama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One.* 2014 Oct 30;9(10):e111064. doi: 10.1371/journal.pone.0111064. eCollection 2014. PubMed PMID: 25357199; PubMed Central PMCID: PMC4214687.

12: Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kashiyama N, Saito A, Sawa Y. Regulating ES or induced pluripotent stem cells by innate lymphoid cells. *Transplantation.* 2014 Sep 15;98(5):e38-9. doi: 10.1097/TP.0000000000000353. PubMed PMID: 25171529.

13: Masuda S, Miyagawa S, Fukushima S, Sougawa N, Ito E, Takeda M, Saito A, Sawa Y. Emerging innovation towards safety in the clinical application of ESCs and iPSCs. *Nat Rev Cardiol.* 2014 Sep;11(9):553-4. doi: 10.1038/nrcardio.2014.9-c1. Epub 2014 Aug 5. PubMed PMID: 25093434.

14: Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng Part A.* 2014 Feb;20(3-4):728-39. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0534. Epub 2014 Jan 3. PubMed PMID: 24164292; PubMed Central PMCID:

PMC3926175.

〔学会発表〕(計 6 件)

1:発表表題: ガラス化凍結法を用いた骨格筋筋芽細胞シート長時間保存の検討

発表者: 大河原 弘達 福嶋 五月

学会名: 第 14 回日本再生医療学会
2015/3/19-2015/3/21 パシフィコ横浜 横浜

2:発表表題: ガラス化凍結法による iPS 細胞由来心筋細胞シート長時間保存の検討

発表者: 大河原 弘達 福嶋 五月

学会名: 第 15 回日本再生医療学会
2016/3/17-2016/3/19 大阪国際会議場

3:発表表題: The Development of Cryo-Vitrification Method in Human Myoblast Cell Sheet for Propagation of Regeneration Therapy

発表者: Hirotsu Ohkawara Satsuki Fukushima

学会名: American Heart Association Scientific Sessions 2016
2016/11/12-2016/11/16 USA

4:発表表題: A Practical Freezing Method of Human-Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes Toward a Clinical Application

発表者: Fumiya Ohashi Satsuki Fukushima

学会名: American Heart Association Scientific Sessions 2016
2016/11/12-2016/11/16 USA

5:発表表題: ガラス化凍結法を用いた骨格筋筋芽細胞シート長時間保存の検討

発表者: 大河原 弘達 福嶋 五月

学会名: 第 16 回日本再生医療学会
2017/3/7-2017/3/9 仙台

6:発表表題: 臨床応用に向けたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の凍結保存法の開発

発表者: 大橋 文哉 福嶋 五月

学会名: 第 16 回日本再生医療学会
2017/3/7-2017/3/9 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

出願状況(計 2 件)

名称: シート状細胞培養物の凍結保存方法
発明者: 大河原 弘達 福嶋 五月、他 3 名

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-085447

出願年月日: 2015/04/17 (国内)

2016/4/22 (国外)

国内外の別: 国内および国外

名称: 多能性幹細胞または脂肪組織もしくは骨髄由来の間葉系幹細胞由来の心筋細胞の凍結保存方法

発明者: 大橋 文哉 福嶋 五月、他 4 名

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-141181

出願年月日: 2015/07/15 (国内) 2016/7/14 (国外)

国内外の別: 国内および国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 泰司 (YOSHIKAWA, Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・寄付講座准教授

研究者番号: 40570594

(2) 研究分担者

今西 悠基子 (IMANISHI, Yukiko)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員 研究者番号: 10707582

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター病院・医長

研究者番号: 80596867

秦 広樹 (HATA, Hiroki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 80638198