

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4336821号

(P4336821)

(45) 発行日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月10日(2009.7.10)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 N 5/06 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E

請求項の数 7 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2005-516710 (P2005-516710)	(73) 特許権者	803000023 有限会社金沢大学ティ・エル・オー 石川県金沢市角間町ヌ7番地金沢大学内
(86) (22) 出願日	平成16年12月21日(2004.12.21)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/019666	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02005/063967	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(87) 国際公開日	平成17年7月14日(2005.7.14)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
審査請求日	平成18年7月13日(2006.7.13)	(74) 代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
(31) 優先権主張番号	特願2003-429088 (P2003-429088)		
(32) 優先日	平成15年12月25日(2003.12.25)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織を利用した心筋細胞の誘導

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物から単離された骨髄細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することにより、遺伝子操作を施すことなく、該骨髄細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および/または心筋細胞に分化させる方法。

【請求項 2】

牛血清またはヒト血清、もしくはこれらの代替物を含む培養液を用いて少なくとも1日間以上培養することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも1種類以上のサイトカインを培養液中に添加して培養を行うことを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

サイトカインが、EGF、TGF- α 、HB-EGF、FGF、およびHGFを含むEGFファミリー、TGF- β を含むTGF- β ファミリー、LIFを含むILファミリー、VEGF-Aを含むVEGFファミリー、PDGF-ABおよびPDGF-BBを含むPDGFファミリー、エフリンBを含むエフリンファミリー、およびSCFから選ばれる、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

骨髄細胞が間葉系幹細胞あるいは造血幹細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

臍帯血由来細胞が単核球である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

得られる心筋前駆細胞および/または心筋細胞が、sarcomeric actin陽性である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、哺乳動物の骨髄細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織を利用した心筋細胞の分化誘導技術に関する。

【背景技術】

心筋細胞は成体になるとその増殖を停止するため、一度心筋梗塞に陥った心臓領域では心筋細胞の回復は望めず、心臓は再生不可能な組織と考えられてきた。しかし、近年心臓内に心筋細胞の前駆/幹細胞が存在し、その分裂や心筋細胞への分化も一部では認められることがわかってきた (Beltrami A. P., et al., "Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration", Cell, Vol. 114, p 763 - 776, 2003)。また、心筋細胞に分化可能な異所性の細胞を心筋細胞に分化誘導する技術が開発されれば、これまで困難とされてきた心筋梗塞の治療が可能になる。

胎児期の万能細胞である胚性幹細胞 (ES細胞) は、容易に心筋細胞に分化可能である。しかしながら、各患者のES細胞を作製することは倫理的に問題があり、また無差別に作製されたES細胞から分化した心筋細胞は免疫拒絶を生じるため、実際の医療に使用することはできない。

骨髄間質には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在し、この間葉系幹細胞を用いた組織再生については、従来より多くの報告がなされてきた。例えば、骨髄由来の筋細胞を利用した骨格筋再生 (Ferrari G. et al., "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." Science, 1998, 279 (5356): p 1528 - 30.)、心臓へのc-kit陽性骨髄幹細胞投与による心機能改善 (Orlic D, et al., "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium", Nature Vol. 410 No. 5 2001 p 701 - 705)、骨髄由来細胞による心筋再生 (特表2002-511094号公報、WO01/048151号、特表2002-521493号公報) 等が知られている。この間葉系幹細胞に脱メチル化酵素を添加して、一度細胞をリセットすることにより、心筋細胞への分化が可能になることも報告されている (Makino S. et al., "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro", The Journal of Clinical Investigation 103: p 697 - 705 (1999))。しかし、この方法で作製された心筋細胞は、脱メチル化という処理が施されているため、将来的に奇形発生の恐れがあるなど、臨床応用にはハードルが高い。

一方で、間葉系幹細胞を用いた組織再生には、使用される骨髄の量的限界の問題があり、組織再生の材料としてより豊富なソースが望まれている。脂肪組織は入手容易な組織であるが、最近、ヒト脂肪組織から多分化能を有する細胞が単離され、神経細胞への分化が確認された (Zuk P. A. et al., "Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies", Tissue Engineering, Vol. 7, No. 2, 2001, p 211 - 228; Zuk P. A. et al., "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells" Molecular Biolo

10

20

30

40

50

gy of the Cell, Vol. 13, p4279-4295, 2002)。また、マウスで心筋細胞に分化可能な筋芽細胞由来細胞株も単離されている（特開2003-325169号公報、特開2003-259863号公報）。しかしながら、特殊な細胞株であったり、分化誘導に複雑な培養工程を必要とするなど、いずれも現実的とはいえない。

【発明の開示】

本発明の課題は、*in vitro*で簡便に心筋細胞を分化誘導する技術を提供することにある。

発明者らは、脂肪組織中の間葉系細胞を通常の牛血清を含む培養液中で心筋細胞に分化誘導できることを見出した。さらに、骨髓細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することにより心筋細胞に分化誘導できることを見出した。

本発明は、哺乳動物の骨髓細胞または臍帯血由来細胞を、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清とともに培養することにより、該骨髓細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および/または心筋細胞に分化させる方法を提供する。

前記方法において、培養液中には、牛血清のほか、分化増殖を促すサイトカインが含まれることが好ましい。そのようなサイトカインとしては、例えば、EGF、TGF- β 、HB-EGF、FGF、HGF等のEGFファミリー、TGF- β 等のTGF- β ファミリー、LIF等のILファミリー、VEGF-A等のVEGFファミリー、PDGF-AB、PDGF-BB等のPDGFファミリー、エフリンB等のエフリンファミリー、SCF (Stem cell factor)などを挙げるができる。

細胞の培養期間は特に限定されないが、少なくとも1日間は培養することが好ましい。

本発明で用いられる骨髓細胞としては、骨髓間質細胞、特に間葉系幹細胞、あるいは造血幹細胞分画の細胞が好ましい。また、臍帯血由来細胞としては、臍帯血中の単核球が好ましい。

共培養する骨髓細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から単離された細胞との混合比率は特に限定されないが、0.1:1~1:10程度が好ましい。特に骨髓細胞の場合であれば、脂肪組織から単離された細胞に対して約1:4程度が好適である。

さらに本発明は、上記のいずれかの方法で作製される心筋前駆細胞および/または心筋細胞を提供する。これらの心筋前駆細胞および/または心筋細胞は、材料となる脂肪組織や骨髓細胞として、移植すべき哺乳動物由来のものを用いれば、移植後の拒絶反応の危険性を抑えることができる。

本発明はまた、心筋前駆細胞および/または心筋細胞に被験物質を添加することにより、心筋前駆細胞および/または心筋細胞に対する該被験物質の効果を評価する方法を提供する。この方法は、心筋細胞の薬剤感受性試験や心疾患治療薬のスクリーニングに利用することができる。

本発明によれば、哺乳動物の骨髓細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から簡便に心筋細胞を得ることができる。得られる心筋細胞は、遺伝子操作を施していないため安全性が高く、心筋細胞に特徴的な遺伝子発現や表現形質を呈する。したがって、本発明で得られる心筋前駆細胞および心筋細胞は、心再生や心筋細胞に作用する薬剤の評価に利用することができる。

現在、心筋梗塞に対する虚血領域への血管再生医療は大量の骨髓液から得られた血管幹細胞の局所への移植により行なわれている。骨髓液採取は、全身麻酔下で行なわれ、高齢者においては、その手技自体にリスクがかかる行為である。脂肪組織の採取は皮膚の単純な局所麻酔で可能であり、生命を脅かすリスクは極めて稀である。したがって、本発明は医療業界に多大な貢献をもたらす。

【図面の簡単な説明】

図1は、脂肪組織の培養結果（心筋細胞への分化）を示す（A：培養開始時、B：培養7日後、C：培養14日後、D：培養28日後）。

図2は、培養14日後の脂肪組織の免疫染色結果を示す（A：anti-sarcom

10

20

30

40

50

eric actin (SA) 抗体、B: anti-cardiac actin 抗体)。

図3は、フローサイトメトリーでの分画(左)と、分画回収したLin陰性 1インテグリン陽性細胞を試験管内で培養し、抗SA抗体で免疫染色した結果(右)を示す。

図4は、脂肪組織から分化した細胞の遺伝子発現解析(RT-PCR)の結果を示す。

図5は、脂肪組織から分化した細胞の核内転写遺伝子解析(RT-PCR)の結果を示す。

図6は、脂肪組織由来の細胞と骨髄細胞との共培養結果を示す(A: 脂肪組織由来細胞と骨髄細胞との共培養結果、B: 骨髄細胞の単独培養結果)。

図7は、脂肪組織由来の細胞に対して、共培養する骨髄由来の細胞数(横軸: cells)を変化させたときの、得られる心筋細胞コロニー数(縦軸: colony/well)の変化を示すグラフである。棒グラフ上部は、骨髄由来細胞から得られた心筋細胞コロニー数、下部は心筋組織から得られた心筋細胞コロニー数を示す。

図8は、ヒト脂肪組織からの心筋細胞の分化誘導結果を示す。A: 抗SA抗体による免疫染色の結果(上: 矢印は心筋細胞を示す。下: ネガティブコントロール)、B: 全接着細胞数に対するSA陽性細胞数率%(右: PDGF-AB添加、左: PDGF-AB非添加)

図9は、ヒト臍帯血中単核球(hCBMNC)からの心筋細胞の分化誘導結果を示す。A: hCBMNC(下)とマウス脂肪組織(上)をCell culture insert(矢印)で隔てた共培養方法、B: 抗SA抗体を用いた免疫染色結果(右: 共培養、左: hCBMNCのみ培養)、C: 全接着細胞数に対するSA陽性細胞数率%(右: 共培養、左: hCBMNCのみ培養)

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2003-429088号の明細書に記載された内容を包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

1. 脂肪組織から単離された細胞を心筋細胞に分化させる方法

脂肪組織中の間葉系細胞を通常の牛血清を含む培養液中で心筋細胞に分化誘導することができる。

1.1 脂肪組織から単離された細胞

本発明の方法で用いられる脂肪組織は、哺乳動物由来のものであれば特に限定されない。すなわち、哺乳動物の胎児、新生児、成体の任意の部位の脂肪組織を使用することができる。細胞は、例えば実体顕微鏡下で、正確に脂肪組織のみを回収し、機械的処理および/またはコラゲナーゼ処理やディスパーゼ処理等の酵素処理を施すことにより、個々の単一の細胞として単離することができる。

こうして脂肪組織から単離された細胞中には、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、体性幹細胞等も含まれるが、本発明で用いられる脂肪組織由来の細胞には、そのような細胞が含まれていてもよい。これらの細胞は、Lin陰性、c-Kit陰性~弱陽性、および1インテグリン陽性であることが確認されている。

1.2 培養条件

単離された細胞の培養液としては、DMEM培養液、MEM培養液、 α -MEM培養液、RPMI培養液、DMEM/F12培養液等、通常哺乳動物の脂肪細胞の培養に用いられる培養液に適量の牛血清を添加したものを使用する。添加される牛血清の量は、特に限定されず、細胞の起源や種類に応じて適宜設定される。好ましくは0%~20%、より好ましくは5%~10%程度の牛血清を添加するとよい。牛血清に代えて、ニュートリドマ(Behringer製)、ヒト血清等を使用してもよい。

培養は、市販の培養皿上を用いて2次元的に行う。温度やCO₂等の条件は、用いる細胞の性質に応じて適宜設定されるが、一般に4~6%CO₂、33~37℃、特に5%CO₂、37℃程度で行われる。細胞の培養期間も特に限定されず、必要とされる心筋細胞の発現が認められるまで、適宜培地交換を行いながら培養を行えばよい。発明者らの実験結果では、培養開始から3日後より、ビートニングする心筋細胞が発現し、同時に球形の

10

20

30

40

50

心筋前駆細胞（心筋幹細胞）の増殖が開始した。

培養に際しては、細胞の分化増殖を促すサイトカインを適宜培養液に添加してもよい。そのようなサイトカインとしては、例えば、EGF、TGF- β 、HB-EGF、FGF、HGF等のEGFファミリー、TGF- β 等のTGF- β ファミリー、LIF等のILファミリー、VEGF-A等のVEGFファミリー、PDGF-AB、PDGF-BB等のPDGFファミリー、エフリンB等のエフリンファミリー、SCF (Stem cell factor)などを挙げるができる。特に、LIF、HB-EGF、PDGFが好ましい。

添加されるサイトカインの量は、用いるサイトカインや細胞の性質に応じて適宜設定される。マウスの脂肪組織から単離された細胞を用いた場合、LIFであれば1000u/ml ~ 5000u/ml程度、HB-EGFであれば100ng/ml ~ 1 μ g/ml程度添加するとよいが、これに限定されるものではない。

10

2. 骨髄細胞または臍帯血由来細胞の心筋細胞への分化誘導

骨髄細胞または臍帯血由来細胞に、哺乳動物の脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清を添加して、牛血清を含む培養液中で培養することにより、該骨髄細胞または臍帯血由来細胞を心筋前駆細胞および/または心筋細胞に分化させることができる。

2.1 脂肪組織から単離された細胞またはその培養上清

前記方法において、脂肪組織からの細胞の単離は、前項1にしたがって行えばよい。培養上清としては、単離された脂肪組織由来細胞を前項1と同様の条件で適当期間培養して得られる培養物の上清を用いることができる。培養期間は特に限定されないが、少なくとも1日以上培養した培養物の上清を用いることが好ましい。

20

2.2 骨髄細胞

前記方法で用いられる骨髄細胞は、哺乳動物由来のものであれば特に限定されない。すなわち、哺乳動物の胎児、新生児、成体の骨髄由来の任意の細胞を用いることができるが、骨髄間質細胞、特に間葉系幹細胞、あるいは造血幹細胞分画の細胞が好ましい。これら骨髄細胞の哺乳動物からの採取は、周知の方法にしたがって行われる。骨髄細胞としては初代培養細胞を用いることが好ましいが、凍結保存されている骨髄細胞を用いてもよい。

前記骨髄細胞と脂肪組織は同じ種に由来するものであることが好ましい。つまり、マウス骨髄細胞にはマウス脂肪組織由来の細胞を使用し、ラット骨髄細胞にはラット脂肪組織由来の細胞を使用することが好ましい。

30

2.3 臍帯血由来細胞

前記方法で用いられる臍帯血由来細胞は、哺乳動物由来のものであれば特に限定されないが、臍帯血中の単核球が好ましい。臍帯血からの細胞の採取は、周知の方法にしたがって行われる。また前項同様、臍帯血由来細胞と脂肪組織は同じ種に由来するものであることが好ましい。

2.4 培養条件

細胞の培養液としては、DMEM培養液、MEM培養液、 α -MEM培養液、RPMI培養液、DMEM/F12培養液等、通常哺乳動物の細胞培養に用いられる培養液に適量の牛血清を添加したものを使用する。添加される牛血清の量は、特に限定されず、細胞の起源や種類に応じて適宜設定される。好ましくは0% ~ 20%、より好ましくは5% ~ 10%程度の牛血清を添加する。牛血清に代えて、ニュートリドーム (Behringer製)、ヒト血清等を使用してもよい。

40

培養は、脂肪組織から単離された細胞を骨髄細胞または臍帯血由来細胞に添加して、市販の培養皿上で2次元的に共培養するか、あるいは両者の液性因子が往来できる環境下で共培養する。骨髄細胞または臍帯血由来細胞と脂肪組織から単離された細胞との混合比は（細胞数比）、0.1 : 1 ~ 1 : 10、特に骨髄細胞の場合であれば1 : 4程度が好適である。

脂肪組織由来細胞の培養上清を骨髄細胞または臍帯血由来細胞に添加する場合は、上記したように適当期間、少なくとも1日以上培養した細胞の培養上清を骨髄細胞または臍帯血由来細胞に加えて2次元的に共培養する。添加する培養上清の量は特に限定されず、用

50

いる細胞の種類に応じて適宜調整されるが、マウス骨髄細胞の場合であれば、骨髄細胞に対して1～10倍、好ましくは4倍の数の脂肪組織由来細胞を培養して得られる培養上清を用いることが好ましい。

温度やCO₂等の条件は、用いる細胞の性質に応じて適宜設定されるが、一般に4～6%CO₂、33～37℃、特に5%CO₂、37℃程度で行われる。培養期間も特に限定されず、必要とされる心筋細胞の発現が認められるまで、適宜培地交換を行いながら培養を行えばよい。発明者らの実験結果では、培養開始から7日後より、ピーティングする心筋細胞が発現し、同時に球形の心筋前駆細胞(心筋幹細胞)の増殖が開始した。さらに培養開始後1～2週間の間には20～60コロニーくらいの心筋細胞と思われるコロニーが生成した。

10

培養に際しては、細胞の分化増殖を促すサイトカインを適宜培養液に添加してもよい。そのようなサイトカインとしては、例えば、EGF、TGF-β、HB-EGF、FGF、HGF等のEGFファミリー、TGF-β等のTGF-βファミリー、LIF等のILファミリー、VEGF-A等のVEGFファミリー、PDGF-AB、PDGF-BB等のPDGFファミリー、エフリンB等のエフリンファミリー、SCF(Stem cell factor)などを挙げるができる。特に、LIF、HB-EGF、PDGFが好ましい。

添加されるサイトカインの量は、用いるサイトカインや細胞の性質に応じて適宜設定される。マウスの脂肪組織から単離された細胞を用いた場合、LIFであれば1000μ/ml～5000μ/ml程度、HB-EGFであれば100ng/ml～1μg/ml程度、PDGF-ABであれば1ng/ml～50ng/ml程度添加するとよいが、これに限定されるものではない。

20

3. 脂肪組織、骨髄細胞、臍帯血由来細胞から分化誘導された心筋細胞

本発明は、上記のいずれかの方法で作製される心筋前駆細胞および/または心筋細胞を提供する。ここで心筋前駆細胞とは、心筋細胞に分化する能力をそなえた細胞であって、心筋幹細胞を包含する。

これらの細胞は、その起源となる細胞とは異なり、心筋細胞に特徴的な形態的特性、タンパク発現、遺伝子発現を示す。例えば、電子顕微鏡下、心筋細胞はミトコンドリアに富み、ANP顆粒を含有し、Z帯を有し、倒立顕微鏡下、ピーティングする紡錘形をした細胞で、徐々に集合してシートを形成し、同調してピーティングする細胞として観察される。また、心筋前駆細胞はそれよりも丸い球形の細胞で、徐々に紡錘形となり、ピーティングする細胞として観察される。一方、タンパク発現においては、心筋細胞に特徴的なsarcomeric actin(β-Sarcomeric Muscular Actin(Sr-1))およびcardiac actinの発現がみられ、遺伝子発現では心筋細胞に特徴的なβ-MHC、MLC-2v、BNPの発現や、転写因子GATA-4やNKX2.5の発現がみられる。これらの特徴から、分化誘導された細胞は心筋細胞または心筋前駆細胞であることが確認できる。

30

4. 脂肪組織、骨髄細胞、臍帯血由来細胞から分化誘導された心筋細胞の用途

4.1 再生医療への応用

本発明において、脂肪組織、骨髄細胞または臍帯血由来細胞から得られる心筋細胞および心筋前駆細胞は、電子顕微鏡下、それぞれ心筋細胞および心筋前駆細胞の特徴を有し、遺伝子やタンパクの発現も心筋細胞および心筋前駆細胞と一致する。したがってこれら心筋前駆細胞または心筋細胞を心筋梗塞のモデルラットに移植すると、移植された宿主の中で、宿主の心筋細胞と同調して機能する心筋細胞として組み込まれる。特に、材料となる脂肪組織や骨髄細胞、臍帯血由来細胞として、移植すべき哺乳動物個体のものを用いれば、当該哺乳動物において拒絶反応を起こすことなく移植可能な心筋前駆細胞や心筋細胞を得ることができる。すなわち、本発明の方法で得られる心筋前駆細胞および心筋細胞は、心再生に好適に利用することができる。

40

現在、心筋梗塞に対する虚血領域への血管再生医療は大量の骨髄液から得られた血管幹細胞の局所への移植により行なわれている。骨髄液採取は全身麻酔下で行なわれ、高齢者

50

においては、その手技自体にリスクがかかる行為である。脂肪組織の採取は皮膚の単純な局所麻酔で可能であり、生命を脅かすリスクは極めて稀である。しかも材料として豊富に存在する。したがって、本発明による心再生は医療業界に対する多大な貢献をもたらす。

4.2 スクリーニング系への応用

本発明において、脂肪組織、骨髄細胞、臍帯血由来細胞から得られる心筋細胞および心筋前駆細胞は、電子顕微鏡下、それぞれ心筋細胞および心筋前駆細胞の特徴を有し、遺伝子やタンパクの発現も心筋細胞および心筋前駆細胞と一致する。したがって、これら心筋前駆細胞および/または心筋細胞に被験物質を添加して培養し、生じる表現上の変化(形態やタンパク発現の変化)あるいは遺伝的变化(遺伝子発現の変化)を、非添加の場合と比較することにより、心筋細胞の当該被験物質に対する感受性や、当該被験物質の心筋細胞 10
に対する効果を評価することができる。この評価系は薬剤感受性試験や、心疾患治療薬のスクリーニングに利用することができる。

【実施例】

[実施例1] 脂肪組織からの心筋細胞の分化

マウスおよびラットの頸部あるいは腹部の脂肪組織約1.5mlを眼科手術用ハサミで細切し、37℃、15分、1mlのディスペラーゼ液に浸透して、細胞をほぐす。ついで、細胞を40ミクロンのナイロンメッシュに通し、 1×10^6 /mlの濃度で播種し、D MEM + 10% FCSの培地を用いて、5% CO₂、37℃にて24 well culture dish (直径約1.3cm)上で2次元培養を行なう。

マウス脂肪細胞の培養結果を図1に示す。3日後より、ピーティングする心筋細胞様の 20
細胞が発現し、同時に球形の心筋前駆/幹細胞様細胞の増殖開始が認められた。心筋細胞は、実体顕微鏡下、ミトコンドリアに富み、ANP顆粒を含有し、Z帯を有し、倒立顕微鏡下、ピーティングする紡錘形をした細胞という形態的特徴から識別することができる。培養開始から約1週間後には紡錘形の細胞が出現し、2~3週間後にはシート構造が観察された。培養1週間目で1wellあたり200~300くらいの心筋細胞と思われるコロニー(集団)を形成された。

[実施例2] 免疫染色

実施例1で得られた細胞が心筋細胞の特徴を備えていることを確認するために、蛍光ラベルしたanti-sarcomeric actin (Sarcomeric Muscular Actin (Sr-1)抗体(DAKO製)およびanti-cardiac actin (MBL製)を用いた免疫染色を行った。なお、sarcomeric actinおよびcardiac actinは、いずれも心筋細胞に特徴的な発現が認められているタンパクである。 30

免疫染色は、実施例1と同様の方法でマウス脂肪組織細胞を14日間培養した後、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体を添加することにより行った。結果を図2に示す。図2から明らかなように、培養後の細胞は緑色で蛍光ラベルされ、sarcomeric actinおよびcardiac actin陽性であることが確認された。

脂肪組織を実施例1と同様に分散させ、Lin抗体(CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, TER119抗体を混和したもの; 成熟した血液細胞を認識できる組み合わせ。いずれもPharmingen製)と、c-Kit抗体(Pharmingen製)あるいは 1インテグリン抗体(Pharmingen製)で染色し、フローサイトメトリー法により自動蛍光細胞回収装置(Epics Artra; Coulter製)を用いて細胞を分画回収し、得られた細胞各々 10^4 個ずつを10%牛血清を含むD MEM培養液に混和し、24穴の培養皿に実施例1と同様に培養した。その結果、Lin陰性c-Kit陰性~弱陽性、あるいはLin陰性 1インテグリン陽性細胞(図3に示す細胞集団)から効率良く実施例1と同様のsarcomeric actin陽性の心筋細胞が発生することが確認された(図3) 40

[実施例3] 遺伝子発現解析

実施例1で得られた細胞が心筋細胞であることを確認するために、RT-PCRによる遺伝子発現解析を行った。まず、実施例1と同様の方法でマウス脂肪組織細胞を14日間 50

培養した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen製)を用いてTotal RNAを抽出し、PCR Kit (Clontech製)を用いてcDNAに逆転写した。次いで、Advantage polymerase Mix (Clontech製)を利用し、以下に示す α -MHC、 β -skeletal A、 α -cardiac A、MLC-2a、2v、BNP検出用PCRプライマーによるRT-PCRを行った。

α -MHC-S 5'-tgt ctg ctc tcc acc ggg aaa atc t-3' (配列番号1)

α -MHC-AS 5'-cat ggc caa ttc ttg act ccc atg a-3' (配列番号2)

β -MHC-S 5'-aac cca ccc aag ttc gac aag atc g-3' (配列番号3)

β -MHC-AS 5'-cca act ttc ctg ttg ccc caa aat g-3' (配列番号4)

α -skeletal A-S 5'-gga gat tgt gcg cga cat caa aga g-3' (配列番号5)

α -skeletal A-AS 5'-tgg tga tcc aca tct gct gga agg t-3' (配列番号6)

α -cardiac A-S 5'-gac cac cgc ttt ggt gtg tga caa t-3' (配列番号7)

α -cardiac A-AS 5'-gcc aga atc cag aac aat gcc tgt g-3' (配列番号8)

MLC-2a-S 5'-agc agg cac aac gtg gct ctt cta a-3' (配列番号9)

MLC-2a-AS 5'-cct ggg tca tga gaa gct gct tga a-3' (配列番号10)

MLC-2v-S 5'-atg gca cct ttg ttt gcc aag aag c-3' (配列番号11)

MLC-2v-AS 5'-ccc tcg gga tca aac acc ttg aat g-3' (配列番号12)

BNP-S 5'-aaa agt cgg agg aaa tgg ccc aga g-3' (配列番号13)

BNP-AS 5'-tgc ctg agg gga aat gct cag aac t-3' (配列番号14)

(S: sense primer、AS: anti-sense primer)

結果を図4に示す。図中各ラインは、1:採取したばかりの脂肪組織、2:培養後の細胞、3、マウスの心臓由来心筋細胞、4:水を示す。図4から明らかなように、培養後の細胞では、心筋細胞特異的な α -MHC、 β -skeletal A、 α -cardiac A、MLC-2v、BNPの発現が認められた。

[実施例4]核内転写因子の解析

次に、心筋細胞特異的な核内転写因子GATA-4、およびNKX2.5遺伝子の発現解析を行った。解析は、実施例3にしたがってcDNAを取得し、以下に示すGATA-4、およびNKX2.5検出用PCRプライマーを用いたRT-PCRにより行った。

Nkx2.5-S 5'-tct ggt tcc aga acc gtc gct aca a-3' (配列番号15)

Nkx2.5-AS 5'-atc gcc ctt ctc cta aag gtg gga gt-3' (配列番号16)

GATA4-S 5'-gag tgt gtc aat tgt ggg gcc atg t-3' (配列番号17)

GATA4-AS 5'-tgc tgc tag tgg cat tgc tgg agt t-3' (配列番号18)

(S: sense primer、AS: anti-sense primer)

結果を図5に示す。図中各ラインは、1:採取したばかりの脂肪組織、2:培養後の細胞、3、マウスの心臓由来心筋細胞、4:水を示す。図5から明らかなように、培養後の細胞では、心筋細胞特異的な転写因子GATA-4、およびNKX2.5遺伝子の発現が確認された。

10

20

30

40

50

[実施例5] 培養条件の最適化(脂肪組織からの心筋細胞分化)

DMEM + 10% FCSの培養液に、それぞれLIF (leukemia inhibitory factor) 2000 U/ml HB-EGF 0.5 µg/ml、LIF 2000 U/ml + HB-EGF 0.5 µg/mlを添加し、実施例1と同様にして培養を行った。培養後の細胞を - sarcomeric actinおよびcardiac actinに対する抗体を用いて実施例2と同様の方法で免疫染色し、その蛍光強度から心筋細胞の発現数を蛍光顕微鏡(1×70、Olympus)を用いて未添加の場合と比較評価した(各々4サンプル)。

その結果、LIF単独では心筋細胞の分化は促進傾向にはあったが、添加しない場合と比較して有意差は認められなかった。一方、HB-EGF単独では、添加しない場合と比較して $p < 0.05$ の有意差で心筋細胞の分化が促進された。さらに、LIF + HB-EGFでは、 $p < 0.05$ の有意差で、最も心筋細胞の分化が促進された。

10

[実施例6] 心筋梗塞モデルラットへの移植実験

雄性SDラット(N=19)は動脈結紮により心筋梗塞を誘導し、心筋梗塞モデルラットを作製した。実施例1にしたがいラット脂肪組織由来の細胞を単離し、10% FCSを含むDMEM培養液にて培養して脂肪組織由来心筋細胞を得た。得られた脂肪組織由来心筋細胞(2×10^6 個/ml濃度の細胞を0.1mlずつ5ヶ所)を心筋梗塞モデルラット(N=9)の心筋梗塞巣に注入し、試験群とした。また、比較群および対象群として、それぞれPBSを注入した心筋梗塞モデルラット(N=10)、および梗塞処置を施していないシャムオペレーションラット(N=6)を用意した。それぞれの群について、注入28日後の心機能の改善を心超音波検査にて解析し、

20

その結果、PBSを注入した比較群では正常ラットの約1/5まで心機能の低下が認められたが、脂肪組織由来心筋細胞を注入した試験群では、正常ラットの約4/5までしか心機能の低下は認められなかった。

[実施例7] 脂肪組織由来細胞と骨髄由来細胞の共培養

実施例1にしたがって単離したマウス脂肪組織の細胞 1×10^6 個をPKH67 Green Fluorescent cell Linker Kit(SIGMA製)で蛍光標識した骨髄細胞 1×10^5 個/mlと混合し、DMEM + 10% FCSの培養液1ml中に混和し、24 well culture dish(直径約1.3cm)上で培養した。比較として、PKH67で蛍光標識した骨髄細胞を同様の条件で単独培養した

30

結果を図6に示す。心筋組織の細胞と共培養を行った骨髄細胞では、培養開始後1~2週間間に20~60コロニーくらいの心筋細胞と思われるコロニーが生成した。この心筋細胞コロニーにはPKH67で蛍光標識された骨髄由来の細胞が含まれていた(図6A)。一方、単独培養した骨髄細胞では、心筋細胞への分化は認められなかった(図6B)。

[実施例8] 共培養条件の最適化

1×10^6 脂肪組織の細胞に対して、共培養する骨髄由来の細胞数を 5×10^4 、 1×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 と変化させ、その影響を検討した。結果を図7に示す。図7から明らかなように、 2.5×10^5 個の骨髄細胞を混合した場合、つまり、脂肪組織:骨髄細胞=4:1の割合で共培養した場合に、最も多くのPKH67で蛍光標識された骨髄細胞由来心筋細胞が得られることがわかった。

40

[実施例9] 骨髄細胞の分化に影響を与える因子

次に、骨髄細胞の分化に影響を与える因子を検討するために、脂肪組織の細胞と骨髄細胞を0.4ミクロンのポアを有する膜(Cell culture insert: FALCON製)で隔てて、実施例8と同様に培養を行った。その結果、細胞間の接着が抑制され、液性成分のみが作用し合う条件下においても、骨髄細胞の心筋細胞への分化が認められることが確認された。このことは、脂肪組織の心筋細胞への分化培養系から得られる培養上清中に、骨髄細胞を心筋細胞に分化誘導する液性分子が含まれていることを意味する。

50

【実施例10】ヒト脂肪組織からの心筋細胞の分化

ヒトの心臓、大動脈周囲および大網部に存在する脂肪組織から細胞を単離し、37℃、30分、5mlのディスペラーゼ液に浸透して細胞をほぐした後、細胞を40ミクロンのナイロンメッシュに通した。この細胞 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ をDMEM+10%FCSの培地に播種し、5%CO₂、37℃にて24well culture dish(直径約1.3cm)上で2次元培養を行った。

培養2週間後の細胞をanti-sarcomeric actin(SA)抗体を用いた免疫染色を行った。ネガティブコントロールとして二次抗体である抗-マウス免疫グロブリンのみを用いて同様に染色を行った。その結果、ヒト脂肪組織からSA陽性の心筋細胞の誘導が確認された(図8(A)上)。

さらに、PDGF-AB(Invitrogen製)10ng/mlを添加して同様に2週間培養を行い、蛍光顕微鏡下(x20)ランダムな5視野における全接着細胞数に対するSA陽性細胞数を求め、非添加の場合と比較した(図8(C))。その結果、PDGF-ABを非添加の場合には、全接着細胞のうち約1%がSA陽性であるのに対し、PDGF-ABを添加した場合にはその約2倍のSA陽性心筋細胞が出現していることが確認された。

【実施例11】マウス脂肪組織とヒト臍帯血の共培養法による、臍帯血の心筋細胞への分化

ヒト臍帯血(CB)からFicoll-Plusを用いて、単核球分画のみを分離した。実施例1にしたがい、マウスの脂肪組織から細胞を分離した。図9(A)に示すように、ヒト臍帯血由来単核球細胞(hCBMNC) $1 \times 10^6 / \text{ml}$ とマウス脂肪組織由来細胞(BATDC) $2 \times 10^5 / \text{ml}$ を、0.4ミクロンのポアを有する膜(Cell culture insert:FALCON製)で隔てて、分離共培養を行った。培養条件は、DMEM+10%FCSの培地を用い、5%CO₂、37℃で2次元培養を行った。対照として、hCBMNC $1 \times 10^6 / \text{ml}$ のみを同様の条件で24well culture dishを用いて培養した。

培養2週間後の細胞をanti-sarcomeric actin(SA)抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、hCBMNCからSA陽性の心筋細胞の誘導が確認されたが(図9(B)右)、hCBMNCのみを培養した場合には心筋細胞の誘導は認められなかった(図9(B)左)。さらに、蛍光顕微鏡下(x20)ランダムな5視野における全接着細胞数に対するSA陽性細胞数を求めたところ、共培養では全接着細胞のうち約1%がSA陽性の心筋細胞であることが確認された。

本明細書中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中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明で得られる心筋細胞および心筋前駆細胞は、表現的形質にも遺伝的形質も心筋細胞と一致する。したがって、これら細胞は、心臓領域の再生医療に好適に利用することができる。また心筋細胞の薬剤感受性評価や心疾患治療薬のスクリーニング系等に利用できる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号1 - 人工配列の説明: プライマー(-MHC-S)

配列番号2 - 人工配列の説明: プライマー(-MHC-AS)

配列番号3 - 人工配列の説明: プライマー(-MHC-S)

配列番号4 - 人工配列の説明: プライマー(-MHC-AS)

配列番号5 - 人工配列の説明: プライマー(-skeletal A-S)

配列番号6 - 人工配列の説明: プライマー(-skeletal A-AS)

配列番号7 - 人工配列の説明: プライマー(-cardiac A-S)

配列番号8 - 人工配列の説明: プライマー(-cardiac A-AS)

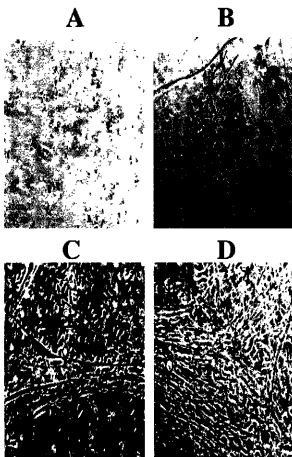
配列番号9 - 人工配列の説明: プライマー(MLC-2a-S)

配列番号10 - 人工配列の説明: プライマー(MLC-2a-AS)

- 配列番号 1 1 - 人工配列の説明：プライマー（MLC - 2 v - S）
- 配列番号 1 2 - 人工配列の説明：プライマー（MLC - 2 v - AS）
- 配列番号 1 3 - 人工配列の説明：プライマー（BNP - S）
- 配列番号 1 4 - 人工配列の説明：プライマー（BNP - AS）
- 配列番号 1 5 - 人工配列の説明：プライマー（Nk x 2 . 5 - S）
- 配列番号 1 6 - 人工配列の説明：プライマー（Nk x 2 . 5 - AS）
- 配列番号 1 7 - 人工配列の説明：プライマー（GATA4 - S）
- 配列番号 1 8 - 人工配列の説明：プライマー（GATA4 - AS）

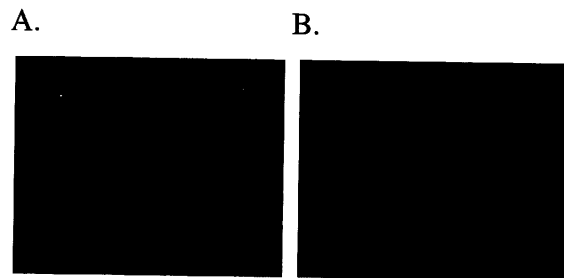
【図 1】

図 1



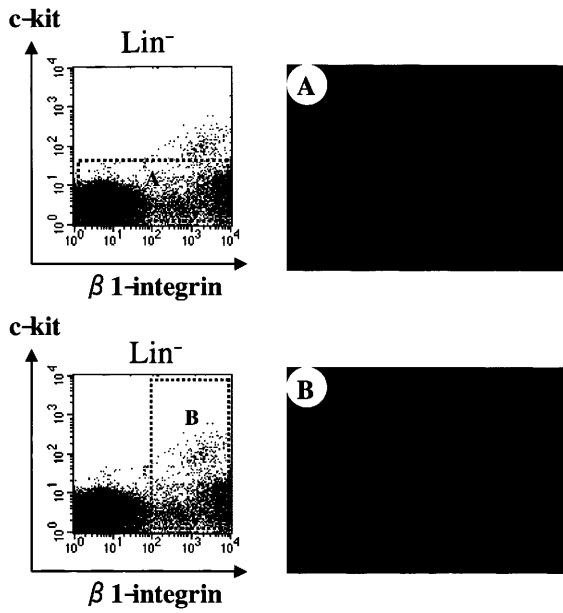
【図 2】

図 2



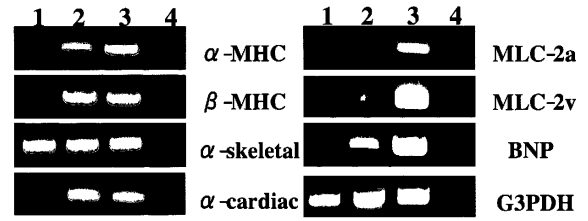
【 図 3 】

図 3



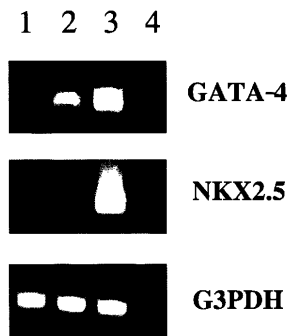
【 図 4 】

図 4



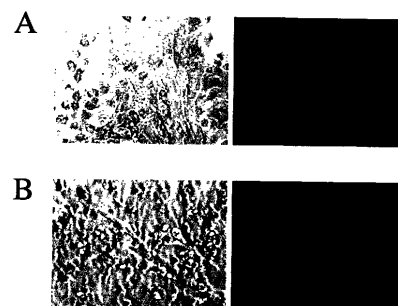
【 図 5 】

図 5

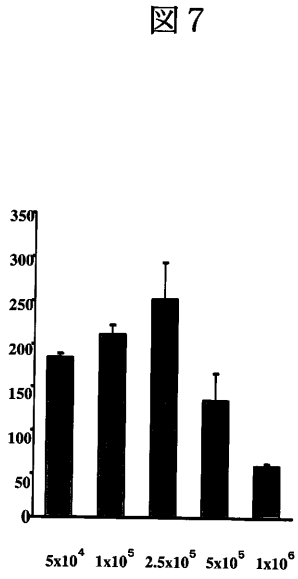


【 図 6 】

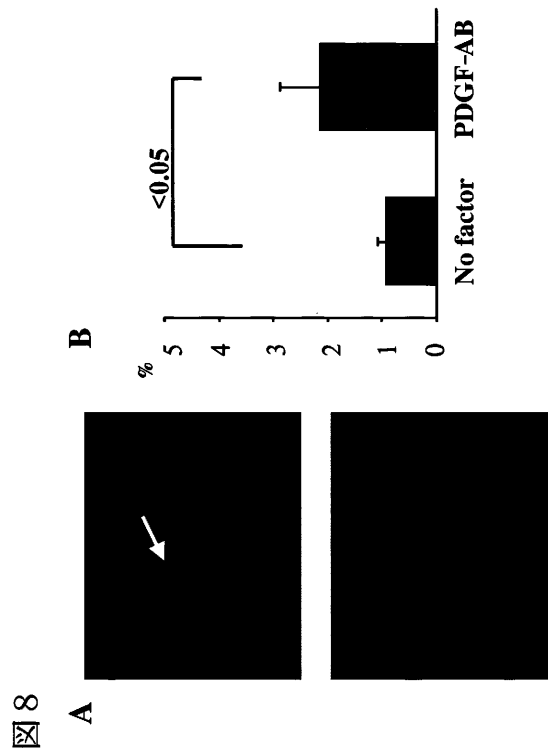
図 6



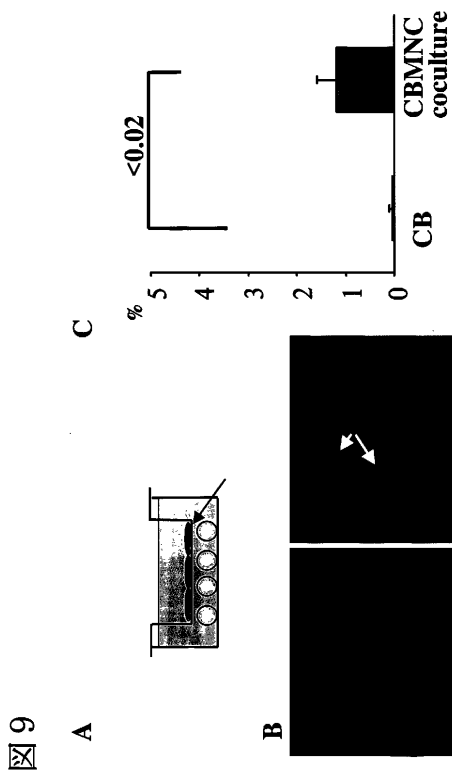
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

0004336821000001.xml

フロントページの続き

- (72)発明者 高 倉 伸幸
石川県金沢市緑が丘3 - 27 ダイアパレス緑が丘108号
- (72)発明者 山田 賢裕
石川県金沢市彦三1 - 9 - 5 - 405

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 国際公開第01/048150(WO, A1)
国際公開第01/048151(WO, A1)
特開2001-103963(JP, A)
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Vol.125, No.6, pp.1470-1479 (June 2003)
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Vol.126, No.1, pp.124-132 (July 2003)
Molecular Biology of the Cell, 2002年12月, Vol.13, pp.4279-4295

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 5/00
A61L 27/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)