

## IV. 本文

### 1. 総論

#### 1-1. 循環器系の再生医療の最先端

京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器病制御学 松原弘明先生

#### 1-2. 国内と海外の再生医療調査

Harefield Heart Science Centre, Imperial College London, UK 鈴木 憲先生

#### 1-3. 心筋の再生医療の最先端

長良医療センター心臓血管外科 富田伸司先生

#### 1-4. PAD に対する血管新生療法——世界の現状と今後の展望——

名古屋大学大学院医学系研究科血管外科学 古森公浩先生

### 2. 各論

#### 2-1. 細胞培養の問題点 —心臓領域での再生細胞療法にむけて

大阪大学心臓血管外科 澤芳樹先生

#### 2-2. 心臓領域での細胞移植 (とくに Myoblast) :ドナー年齢による培養成績の違いなど

京都大学心臓血管外科 丹原圭一先生

#### 2-3. 心臓領域での細胞移植—移植細胞と治療成績—

埼玉医科大学総合医療センター 心臓血管外科 五條理志先生

#### 2-4. 心臓領域での細胞移植:移植細胞のカクテル化と治療成績

大阪大学心臓血管外科 澤芳樹先生

#### 2-5. 心臓領域での細胞移植

千葉大学循環器内科 小室一成先生

#### 2-6. 心臓領域での細胞移植 (とくに Myoblast) : 今後の課題など

京都大学医学部心臓血管外科 長澤淳先生

### 3. 調査事項

#### 3-1. 骨格筋芽細胞シート作成のための温度応答性培養皿

菊池明彦委員

#### 3-2. 細胞シート製造過程について

松山晃文委員

#### 3-3. 前臨床と臨床をつなぐ大動物レベルについて

永谷憲歳委員

#### 3-4. 臨床段階 (移植後、有効性など) について

永谷憲歳委員

#### 3-5. ISO および ASTM 国際動向等について

国立医薬品食品衛生研究所療品部 土屋利江

#### 3-6. まとめ (現制度の問題点と将来への提言を含めて)

米田正始座長

#### IV-1-1. 循環器系の再生医療の最先端—心筋再生と血管新生治療の現状と展望—

京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器病態制御学

京都大学医学部 探索医療センター「重症心不全への細胞移植プロジェクトリーダー」

松原 弘明

**キーワード**;骨格筋由来多能性幹細胞、心筋由来多能性幹細胞、心筋再生、幹細胞, 血管新生療法

#### はじめに

循環器領域の再生医療は血管新生治療と心筋再生治療に分けられる。血管新生治療は虚血性心臓病の虚血部位への血流改善を目的とする。広範囲の梗塞巣を持つ虚血性心臓病や特発性心筋症による重症心不全には血管新生では不十分であり、再生心筋の補充（心筋再生治療）による心筋ポンプ運動の改善が必要である。血管新生治療は患者さん自身の骨髄単核球を心筋に移植（急性心筋梗塞では冠動脈注、陳旧性心筋梗塞では心筋内注射）することにより、内皮前駆細胞と血管新生因子を補給し網細血管レベルの新生血管が再生され、局所血流が増加する。米国では陳旧性心筋梗塞への自家骨髄単核球の心筋内移植臨床試験を FDA が許可している。FGF ビーズやHGF 遺伝子を用いた血管新生治療が虚血下肢患者へ本邦で進行中であるが、欧米ではVEGF や FGF 遺伝子・蛋白を利用した二重盲検試験では虚血性心臓病・虚血下肢とも有意な効果は認めていない。

心筋再生は今最も注目を浴びているところであるが、心筋分化効率の高い幹細胞株が確立しておらず、世界中でまだ心筋再生治療を受けた患者さんは

いない。しかし、重症心不全への細胞移植療法として自家骨格筋由来の myoblast と呼ばれる筋芽細胞が心筋梗塞巣に移植されると、まったく心筋細胞に分化しないにも関わらず、液性因子の分泌によるものかもしれないが、心機能改善が少し認められているとの報告を受け、大規模試験 (MAGIC trial) が欧州で実施されている。しかし、本邦では京都大学医学部 探索医療センターにてヒト骨格筋より多能性幹細胞が発見され、高率に心筋分化し増殖能力も高いことが報告され、myoblast より明らかに優れている。心筋シートに利用される細胞として最も有用であり、臨床応用に最も近いと評価されている。その他、ヒト心筋より心筋分化する多能性幹細胞を我々も含めて世界で3グループが発見したが、心筋分化高率、細胞増殖能力がまだ低いこともあり、臨床応用には利用されるにはまだ問題が多い。

本稿では、すでに臨床応用され、その有用性が確立されつつある骨髄由来細胞と造血性サイトカインを用いた血管新生療法と、今後、新たな治療法として発展の期待されるヒト骨格筋あるいはヒト心筋からの多能性幹細胞を用いた心筋再生療法につき概説する。

## 1) 心不全への血管新生療法

### 虚血性心臓病への治療的血管新生療法 (血管内皮増殖因子と G-CSF)

虚血性心疾患治療における、ひとつのゴールは当然虚血の解除であるが、血管新生によりこれを達成しようという試みは1992年に Yanagisawa-Miwa らの bFGF 蛋白を心筋梗塞モデルに投与することにより血管新生が引き起こされ梗塞サイズの縮小、心機能の改善が見られるという報告 (1) で注目を浴びた。その後、上述したような血管新生因子の蛋白・遺伝子を用いた多くの動物実験での検討が行われ、その成績をもとに、比較的大規模数の冠動脈疾患患者での二重

盲検試験が行われたが、VEGF 蛋白、bFGF 蛋白のいずれも冠動脈内投与による血管再生治療は偽薬投与と比較して効果なしと結論づけられた (2, 3)。一方、タフツ大学の研究グループは VEGF165 の遺伝子を含む発現プラスミドベクターを 19 人の冠動脈疾患患者に投与して狭心痛の発現や運動機能の有意な改善を報告している (4)。しかしながら、同様のアデノ bFGF の遺伝子心筋内注入は二重盲検試験で有効性がないと結論づけられ、さらにアデノ VEGF121 を用いた末梢性血管疾患 (閉塞性動脈硬化症・バージャー病) 患者に対する二重盲検試験でも有効性がみられないことが最近報告されている (5)。

Orlic らによる造血性幹細胞 (Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>) のラット梗塞心筋内移植が豊富な心筋再生現象を誘導するとの報告 (6) の後、G-CSF+SCF 投与による循環血中の造血系幹細胞増加も心筋再生に有効であるとの動物実験結果をもとに、慢性冠動脈疾患患者に対して臨床試験が実施された。NIH グループは G-CSF (10mg/kg. day, 5 日間) 16 人に対して実施し、壁運動スコア、局所血液灌流、運動耐容能は有意に改善したが、CRP は上昇し、G-CSF 投与 8 時間後に心筋梗塞発症が 1 人、17 日後に心筋梗塞を発症し死亡例が 1 例出現したために、中止された (7)。スイスのグループは GM-CSF (10mg/kg. day, 14 日間) を無作為、二重盲検で計 14 人に投与した (8)。側副血行血流の有意改善が見られたが、投与群 7 例中 2 例で急性冠症候群発症が見られた。このように、慢性冠動脈疾患患者に対して G-CSF、GM-CSF を投与することは血管での炎症を増悪させ急性冠症候群の発症を惹起する可能性があり、その副作用に十分注意して使用量や適応患者は慎重に議論されるべきであると考えられる。その後、急性心筋梗塞患者への経皮的血行再建術成功後に G-CSF (10mg/kg. day, 5 日間) を投与する無作為二重盲検臨床試験 (FIRSTLINE-AMI, REVIVAL 2) が 2 つのグループにより実施された。いずれも再狭窄増強などの有害事象はなかった。FIRSTLINE-AMI

(9)ではEF 6%改善、LVEDD, wall thickening の改善が見られたが、REVIVAL 2 (10)では心機能改善効果は見られなかった。このように、全く対照的な結果が得られ、現在さらに大きな規模での臨床試験が実施されており、その結果が期待される。

### 陳旧性心筋梗塞への骨髄細胞移植治療

骨髄単核球移植を用いた血管新生療法、生命予後に直結する虚血性心疾患における可能性を検討するために、我々を含め、大動物を用いた実験的検討が行われ、慢性虚血心モデルにおいても、その有効性が明らかとなり (11)、また電氣的活動を示す部位と機械的運動を示す部位がリアルタイムに同定可能である NOGA mapping システムを用いて不一致領域である虚血冬眠心筋に経カテーテル的に骨髄単核球を移植する検討においても、その有用性が示され、これらの基礎的研究に基づき、私達はこれまでに、本邦において 4 例 (関西医科大学 3 例・京都府立医科大学 1 例) の重症狭心症の方に外科バイパスと併用しない経カテーテル的 (NOGA mapping システム)あるいは開胸下での虚血冬眠心筋への骨髄細胞移植のみの治療を行なった。これらの症例では、狭心症状の改善、左室駆出率を含む心機能の改善、心筋シンチで評価される心筋血流の改善が見られ、不整脈の出現など特異的な副作用は現在まで見られていない (12)。

これまでに報告された虚血性心臓病に対する細胞移植再生医療を表 1 に示す。Stamm らは心筋梗塞発症後 3 ヶ月以内の 6 人の患者に他の領域へのバイパス手術と併用して  $1.5 \times 10^6$  個の AC133<sup>+</sup>自家骨髄単核球細胞を梗塞境界領域に移植し、心筋血流分布とともに左室駆出率による心機能の改善がみられたことを報告した (13)。また Tse らは 8 人の狭心症患者に NOGA mapping システムを用いて経カテーテル的に自家骨髄単核球細胞を移植し、私達と同様に狭心痛の軽

減、MRI で評価した心筋血流分布や局所壁運動の改善を報告している (14)。米国では同じく経カテーテル的に重症の虚血性心不全患者 21 人に自家骨髄単核球を移植する治療が行われ、安全性とともに虚血部血流増大や心機能の改善が認められている (15)。この成績をベースに米国 FDA は慢性虚血性心筋症の患者への自家骨髄単核球の心筋内移植治療の臨床応用を 2004 年 3 月許可した。現在、NOGA ナビゲーションのもとでの MYOSTAR カテーテルを用いた移植治療が米国で実施されている。

### 急性心筋梗塞への骨髄細胞移植治療

急性心筋梗塞の際には急性期 7 日目をピークとして骨髄から末梢血に血管内皮前駆細胞が動員されることや (16)、幹細胞の homing factor である stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) が心筋に発現し、SDF-1 を導入した線維芽細胞を移植しておくことと梗塞心に骨髄幹細胞の homing が促進され、血管新生効果と心機能改善効果が増強されることが示されている (17)。最近、心筋梗塞急性期に骨髄単核球細胞または末梢血内皮前駆細胞を採取し、さらに梗塞責任冠動脈より低圧バルーン拡張カテーテル先端より注入移植することで心筋血流分布、冠予備能や左室駆出率が改善されるという興味ある結果が報告された (18-20)。ST 上昇型急性心筋梗塞の経皮的冠動脈形成術による再還流成功後に責任冠動脈よりカテーテルを介して骨髄単核球を注入する治療が欧州を中心に実施されている。最初の報告では 6 ヶ月後の心臓収縮機能の有意な改善 (10% 前後、 $P < 0.001$ ) が発表され、世界中の注目が集まり、症例数を増やして、無作為臨床研究が実施された。このうち、二重盲検 (骨髄採取を全例に実施し細胞・生食投与の 2 アーム) は Frankfurt (ドイツ、REPAIR-AMI, 2005 AHA), Leuven (ベルギー、2005, ACC) の 2 つの臨床研究だけであるが、前者は 2.5% 左

室駆出率改善、後者は有意差なしと報告している。ただし、REPAIR-AMI では経皮的冠動脈形成術 5 日以降の移植や左室駆出率 49%未満の症例では 5 %とその効果は倍増していることが報告され、心機能低下例や心筋リモデリング開始時への移植が有効であることは興味深い。私達も左冠動脈前下行枝を責任病変とする ST 上昇型急性心筋梗塞の経皮的冠動脈形成術再還流成功例に対する骨髓と末梢血由来単核球を用いた血管新生治療の臨床研究を 2004 年 2 月より開始している。細胞移植時期は急性心筋梗塞後 3 日以内であるが、海外と類似の臨床成績が得られている。

急性心筋梗塞に対して幹細胞移植を行うことで心機能が改善するメカニズムとしては、細胞移植により血管新生や心筋細胞の抗アポトーシス効果が生じる結果、心筋の保護が促されたり、血管新生や線維芽細胞からのコラーゲン産生が梗塞巣の拡張を抑制することで、梗塞心のリモデリングが抑制され心機能が改善する可能性が考えられている。移植骨髓細胞からの心筋再生の可能性については未だ明らかではないが、骨髓間葉系幹細胞からの分化転換や細胞融合の問題とともに今後解明されなければならない課題が残っていると見える。

## 2) 心筋再生アプローチ (ヒト骨格筋または心筋由来多能性幹細胞の発見)

### 骨格筋芽細胞 myoblast 移植による心筋再生療法

1990 年代初めごろより培養心筋細胞や胎児、新生仔、あるいは成体心筋細胞を用いた心臓への移植実験が行われ、心臓への生着、心機能の改善などが報告されてきたが、その後、移植された細胞の生着率の極端な悪さが報告され、さらに倫理的な問題、免疫拒絶反応などの問題もあり臨床応用されなかった。その後、心筋とも相似点が多く自己再生能をもつ骨格筋に着目し、生検組織からの培養により増幅可能で自己組織から得ることが出来、さらに虚血に強く、

またある程度その運命が規定されている細胞種であるため腫瘍原性の可能性が低く細胞移植療法のドナー細胞として適していると考えられる骨格筋芽細胞を用いた細胞移植の実験的研究が報告された。

これらの検討では移植された骨格筋芽細胞は心臓への生着し、そこで多核の骨格筋繊維に分化し、周囲心筋との間に電気生理学的な同期を起こすことはなかったが、心機能の改善が報告された (21)。こういった実験的成功を受け、ヒトにおいて冠動脈バイパス術時に梗塞周囲部への自家骨格筋芽細胞移植が行われた (22)。これらの症例では心機能の改善が報告されたが、バイパス術を同時に施行されており、細胞移植の効果の判定は困難であり、さらに重症の心室性不整脈の発生がみられた。前述したように移植された細胞はすべて骨格筋か線維芽細胞に分化し、心筋細胞へは全く分化せず、不整脈は電気生理学的な不均一さによる可能性が指摘されており、その不均一さの発生機序として骨格筋芽細胞と心筋細胞が細胞融合することにより、不安定な電気生理学的同期を持つ細胞が出現するという機序も指摘されている。その後、いくつかの外科的、あるいはカテーテルを用いた骨格筋芽細胞移植の臨床試験が欧米で行われ (23-26)、心不全症状、左室駆出率、局所壁運動などの改善が報告され、またアミオダロンを投与することにより心室性不整脈を少なくともある程度予防できることも示されたが、これらはいずれも無作為比較試験ではなく、現在、植え込み型除細動器植え込みを伴った重症心不全への骨格筋芽細胞移植の多施設無作為二重盲検試験が欧米で200人以上に実施されほぼ終了している (MAGIC trial, CABG と併用、Genezyme がスポンサー)。

骨格筋由来 myoblast と呼ばれる筋芽細胞はまったく心筋細胞に分化しない。本邦では京都大学医学部 探索医療センターにてヒト骨格筋より多能性幹細胞が発見され、高率に心筋分化することが報告され、myoblast より心筋が



ンブ機能改善の点で明らかに優れていることが証明された。心筋シートに利用される細胞として臨床応用に最も近いと評価されている。国際特許をすでに取り得しているため、京都大学探索医療センターを通じて、myoblast にかわる次世代細胞ソースとして Genezyme 社との交渉も進行している。

### ヒト心臓由来多能性幹細胞の単離と心筋再生療法

2003 年ごろからいくつかのグループによって成体の心臓内に幹細胞が存在するという報告がなされている。その特徴として、c-kit あるいは Sca-1 を表面マーカーとする細胞、side population 細胞といわれるヘキスト 33324 色素を排出する能力を持った細胞、さらに islet-1 という転写因子を発現する細胞などが報告されている (27-30)。報告間で幹細胞を特徴付ける形質に違いがある。直接、比較検討した報告はないが、報告されている限りオーバーラップは大きくなさそうであり、また、生理的な役割など不明な点も多いが、最近の体性幹細胞が他の分化系列の細胞になる分化転換の頻度は当初思われていたより低いのではないかという意見を考えると、注目される細胞種である。

私たち京都大学医学部 探索医療センターも最近、マウスのみならずヒト成体心から、心臓由来幹細胞を単離することに成功しており、心筋、血管細胞を含む多分化能を確認しており、小動物における検討では、細胞移植により心機能が改善されることを確認しており (図 1)、その増殖、分化の分子機構の解明と共に、臨床応用に向け大動物を用いて、その細胞移植の効果、不整脈源性、拒絶反応あるいは腫瘍源性などの検討を行っていく予定である。

### 胚性幹細胞 (ES 細胞) による心筋再生

最も確立された多能性幹細胞である ES 細胞も心筋細胞に分化できる。

ES 細胞は、受精卵（胚盤胞）の内部細胞塊より分離される、あらゆる細胞種に分化できる全能性幹細胞であり、特定の培養条件下において心筋細胞にも分化し、この心筋細胞は動物実験で心臓への細胞移植により残存心筋に機能的に組み込まれ傷害心臓の心機能を改善させ、さらに、ヒト ES 細胞も心筋細胞に分化しうることを示されている。倫理的な問題が議論され、さらに単純に ES 細胞より分化させた心筋細胞を用いた場合、同種移植となるため免疫的な拒絶反応が生じる可能性があるなどといった問題はあるが、再現性良く心筋細胞に分化し、さらに心臓への移植により生着し機能的に同期することも示されている。また単純に収縮単位としての心筋細胞補充のみならず、心臓の電気伝導傷害に対して ES 細胞由来心筋細胞を用いて治療するという実験的検討も有効であったと報告されており、治療対象の拡大のみならず、ES 細胞由来心筋細胞の機能的な確かさを示すものと考えられる。さらに理論的には無限に増幅可能であり、他の候補細胞種にはない利点も多い。臨床応用に向けて克服しなければならない点として、倫理的・社会的な問題を除いても、分化効率の改善、分化した細胞群から心筋細胞のみの純化の方法の開発、拒絶反応の制御などが挙げられる。分化効率の改善については、分化の分子機構の解明が進められており、ここで明らかとなる知見を用いて分化効率の改善が期待される。私たちが心筋分化を指標としたスクリーニングシステムを開発しており (31)、現在このシステムを用いてさらに効率的に心筋分化を誘導する化学物質や遺伝子の探索を行っている。心筋細胞の純化については、現在までに遺伝子改変を伴う抗生剤耐性遺伝子や蛍光タンパク遺伝子の導入による心筋細胞純化が可能であることは示されているが、今後、遺伝子改変を伴わない臨床応用可能な方法の開発が望まれる。また、免疫拒絶反応については核移植・治療的クローニングを用いたテイラーメイド ES 細胞、免疫反応を起こさないように改変されたユニバーサル ES 細胞な

どが議論されている。ただ現在行われている心臓移植においても、免疫抑制剤投与により免疫反応のコントロールは可能で、また拒絶反応の主体は血管炎であり実質に存在する心筋細胞はある程度免疫反応から隔離されているとも考えられ、細胞移植と免疫抑制のメリット・デメリットとバランスから考える必要がある。

## おわりに

京都大学医学部 探索医療センターにてヒト骨格筋より多能性幹細胞が発見され、高率に心筋分化し増殖能力も高いことが報告され、欧米で臨床試験されているmyoblastより明らかに優れている。心筋シートに利用される細胞として最も有用であり、臨床応用に最も近いと評価されている。国際特許をすでに取得しているため、実際、すでに京都大学探索医療センターを通じて、myoblastにかわる次世代細胞ソースとして欧米でmyoblast臨床試験しているGenezyme社との交渉が進行している。

## 文献

1. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C, et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*. 1992;257:1401-1403.
2. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. 2003;107:1359-1365.
3. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*. 2002;105:788-793.
4. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2002;105:2012-2018.
5. Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*. 2003;108:1933-1938.
6. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10344-10349.
7. Hill JM, Syed MA, Arai AE, Powell TM, Paul JD, Zalos G, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Horne M, Csako G, Dunbar CE, Waclawiw MA, Cannon RO, 3rd. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1643-1648.
8. Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C. Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *J Am Coll*

*Cardiol.* 2005;46:1636-1642.

9. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Korber T, Schumichen C, Freund M, Nienaber CA. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation.* 2005;112:3097-3106.
10. Zohlhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schomig A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *Jama.* 2006;295:1003-1010.
11. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation.* 2001;104:1046-1052.
12. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for cardiac and peripheral vascular diseases by autologous bone marrow cell transplantation. In: Kipshidze N, Serruys PW, eds. *Handbook of cardiovascular cell transplantation.* Martin Dunitz, NY; 2003:275-287.
13. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet.* 2003;361:45-46.
14. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet.* 2003;361:47-49.
15. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003;107:2294-2302.
16. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation.* 2001;103:897-903.
17. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M,

- Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703.
18. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-3017.
  19. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106:1913-1918.
  20. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;108:2212-2218.
  21. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998;4:929-933.
  22. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280.
  23. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1078-1083.
  24. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzell K, Edge AS, Jacoby DB, Dinsmore JH, Wright S, Aretz TH, Eisen HJ, Aaronson KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:879-888.
  25. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J*. 2004;148:531-537.
  26. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee

- CH, Maat AP, Serruys PW. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2063-2069.
27. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-776.
  28. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12313-12318.
  29. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol.* 2004;265:262-275.
  30. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal *isl1*+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature.* 2005;433:647-653.
  31. Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation.* 2003;107:1912-1916.

表1 虚血性心疾患への細胞移植療法の報告

図1 ヒト成人心筋より単離した心筋幹細胞

ヒト成人心筋組織より単離した心筋幹細胞は *in vitro*、*in vivo* において心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞へと分化し、マウス心筋梗塞モデルへの細胞移植により心機能を改善した。



表1. 虚血性心疾患への細胞移植療法の報告

Authors	Delivery	Cells	Disease	Timing	Results	
Strauer BE, et al.	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	5-9 d	Perfusion ↑ Function ↑	Circulation 2002;106:1913
Assmus BA, et al.	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	4.3 d	Perfusion ↑ Function ↑	Circulation 2002;106:3009
Perin EC, et al.	Catheter (NOGA)-based transplantation	BMCs	ICM	—	Perfusion ↑ Function ↑	Circulation 2003;107:2294
Stamm C, et al.	Transplantation with CABG	BMCs	MI	10 d-3 m	Perfusion ↑ Function ↑	Lancet 2003;361:45
Tse H-F, et al.	Catheter (NOGA)-based transplantation	BMCs	AP OMI	—	Perfusion ↑ Function ↑	Lancet 2003;361:47
Kang H-J, et al.	Intracoronary transplantation	Peripheral blood stem cells mobilized with G-CSF	AMI OMI	6 d	Perfusion ↑ Function ↑	Lancet 2004;363:751
Wollert KC, et al.	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	4.8 d	Function ↑	Lancet 2004;364:141

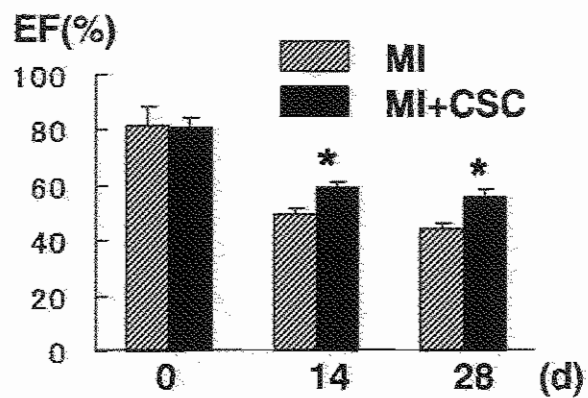
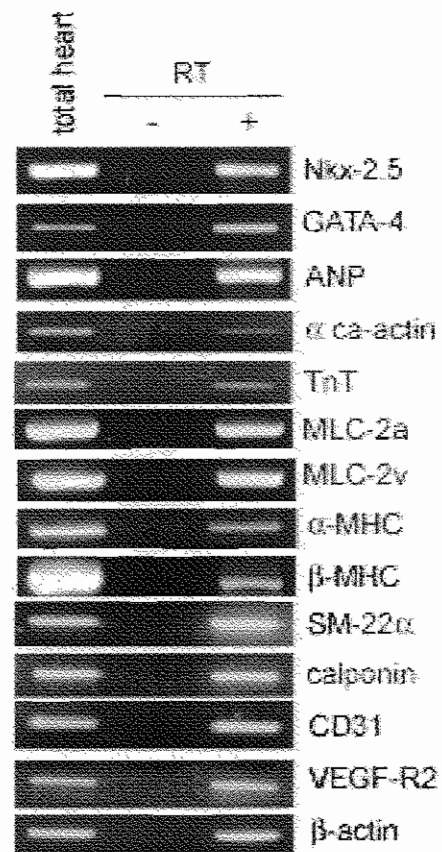
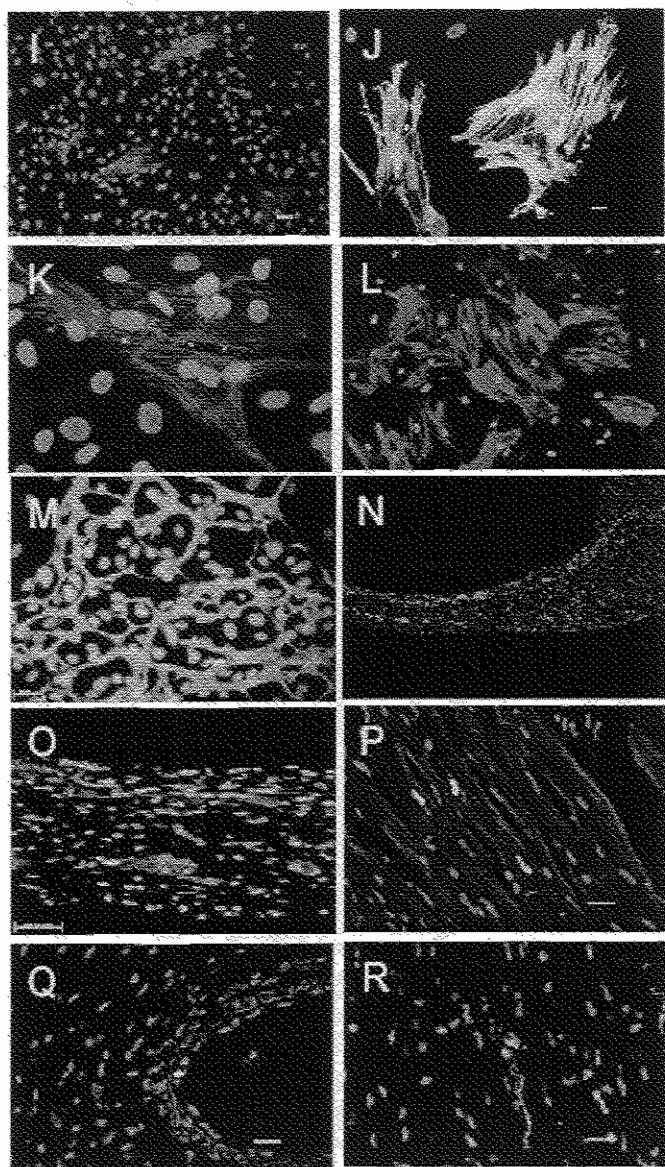


図1. ヒト成人心筋より単離した心筋幹細胞

## IV-1-2. ヨーロッパ、特にイギリスにおける心臓領域での細胞移植療法臨床応用への取り組み

Harefield Heart Science Centre, Imperial College London, UK  
鈴木 憲

### はじめに

心不全は先進国における死亡・障害の主要な原因であり、それに対する有効な治療法の確立は日本・欧米にとっての急務である。近年、細胞移植療法がひとつの有効なオプションとして注目を浴びている。なかでも骨格筋芽細胞あるいは骨髄由来細胞は自家グラフトとしての使用が可能で、免疫抑制が必要でなく、また倫理面の問題も無いため、これらを用いた心疾患に対する細胞移植療法の臨床応用が世界各国で積極的に行われている。本稿ではヨーロッパ、特にイギリスにおける、この新たな心疾患治療法の臨床応用への取り組みを紹介する。

### ヨーロッパにおける取り組み

心疾患に対する細胞移植療法の臨床応用は、2000年6月に Menasche (フランス) の率いる心臓外科チームが世界に先駆けて自家骨格筋芽細胞を心筋梗塞後慢性心不全患者に心筋内直接注入法により移植することにより幕を開けた(1)。この最初の症例を含む10例からなる臨床試験は、骨格筋芽細胞移植が不全心の機能を向上させるという多施設(彼ら自身を含む)からの基礎実験データに基づいたものであったが、その治療効果の機序が明らかではなかったことなどから開始当初は冒険的とも言われ否定的な意見もあった。しかし彼らのこの意欲的な取り組みが細胞移植療法の臨床応用にスポットライトを当て、この治療法のその後短期間での急速な発展に大きく貢献したのは間違い無い。この画期的な取り組みを皮切りに、現在もヨーロッパは特にフランス・ドイツに引っ張られて、心臓への細胞移植療法の臨床応用において世界をリードしている。

骨格筋芽細胞移植では、Menascheらの最初のシリーズに、Prosper (スペイン) や Siminiak (ポーランド) の心臓外科チームが続いた(2,3)。これらはいずれも心筋梗塞後慢性心不全の患者に対する冠動脈バイパス手術併用下心筋内直接注入法による小規模第I相試験であり治療効果の評価には問題があるものの、左心室機能・心筋局所還流の一応の向上を認め、この治療法が臨床においても実行可能でかつ有効であることを示唆した。さらに、オランダの Serruys のグループは NOGA-guided catheter system を用いた骨格筋芽細胞移植の有用性を示し、ポーランドの Siminiak のチームはカテーテルを用いた経冠静脈洞心筋内直接注入を試みている(4,5)。現在では Menasche らの舵取りにより、虚血性慢性心不全患者を対象とした large-scale, multicenter, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging, randomised の第II相試験: MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) が、企業 (Genzyme) 提携のもと多くのヨーロッパ諸国 (フランス、ドイツ、イタリア、イギリス、ベルギー、スイスなど) の施設の参加を集めて進行中である。骨格筋芽細胞移植の問題点として特記すべきは、上記第I相試験の結果、それまで動物実験では全く報告の無かった不整脈、特に心室性頻拍の発生が危険な合併症として指摘されたことである(6)。しかしながらこの合併症の発生は治療プロトコル(細胞の培養方法、移植細胞数、注入箇所など)や患者の心筋の状況によっても異なるようであり、これが果たして本当に移植された骨格筋芽細胞に起因するかどうかは今後の大規模 randomised, double-blind の臨床試験の結果及びさらなる基礎実験のデータにより明らかにされるであろう。

Menasche らの骨格筋芽細胞移植のすぐ後、Strauer (ドイツ) らの循環器内科グループは世界で初めて自家骨髄由来細胞を急性心筋梗塞患者に経冠動脈的に移植した(7)。しかしながらこの時期には骨髄細胞移植の心疾患治療の有効性・安全性に関しては十分な基礎研究データが揃っておらず、彼らの試みは時期早尚の売名行為との強い批判

をヨーロッパにおいても受けた。とはいえ、幸い治療結果が良かったこと、骨格筋芽細胞移植で見られた不整脈発生などの合併症が無かったこと、さらにこの治療法の有効性を示す基礎実験のデータが急速に集積されたことなどから、彼らに追随して骨髄由来細胞を患者に移植する施設が次々と現れた。なかでも、Zeiger (ドイツ) らは基礎実験から臨床応用までを効率よく進められる大規模な集学的グループをいち早く組織し、TOP-CARE (Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement) と名づけられた、急性および慢性心筋梗塞患者に対する自家骨髄細胞あるいは circulating progenitor cells の経冠動脈的細胞移植療法の臨床試験を多角的・包括的に極めて効率よく進めながら、この治療法の安全性・効果を示す多くの有用な情報を得ている(8)。また Drexler ら別のドイツグループも BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) と名づけた急性心筋梗塞患者に対する自家骨髄由来細胞を用いた細胞移植療法の randomised, controlled study を展開してこの治療法の有効性を示し、今なお更なる進展を見せている(9)。さらに近年では、ベルギーでも同様に急性心筋梗塞患者に対する自家骨髄由来細胞移植療法の double-blind, randomised, placebo-controlled の臨床試験が進められており、そのほかにもイタリア、スペイン、他のドイツチームを含めヨーロッパにおける骨髄細胞 (多くは経冠動脈的注入) を用いた急性心筋梗塞 (一部慢性心不全を含む) に対する細胞移植療法の臨床研究は枚挙に暇が無い。

### イギリスにおける取り組み

イギリスは歴史的に再生医療、特にクローン作成や胚性幹細胞の基礎研究において著しい功績を挙げてきたが、心臓領域の細胞移植療法の臨床応用に関しては他のヨーロッパ諸国に遅れを取っているようである。これは多くの臨床家・研究者の間に実験的治療の安易な臨床応用を望まない学究的な雰囲気・慎重な態度が強く、作用機序がいまだに明らかではない細胞移植療法の患者への応用に抵抗があったためであろう。しかしながら、前述のごとくヨーロッパ諸国などで臨床および基礎研究が進み、自家骨髄由来細胞移植療法に関してはその安全性や効果はかなり確実であることがわかってきたため、イギリス国内でもいくつかの病院が独自の基準、独自のプロトコールでその臨床応用を開始した。なかでも Galinanes ら University of Leicester の心臓外科グループは比較的早期から自家骨髄細胞を用いた慢性虚血性心不全の治療の臨床応用を開始し第 I 相臨床試験による有望な結果を報告している(10)。ただし、これらの臨床研究は各施設が全く別々に独自のプロトコール・患者選択・基準により、施設間の連携も無く小規模で行われてきた。これは日本における細胞移植療法のこれまでの状況とも比較的似ているといえるかもしれない。なお骨格筋芽細胞に関しては、心室性不整脈発生の危険に対する危険が強く、前述の MAGIC に参加しているわずかの施設以外イギリスではほとんどの施設でその使用は敬遠されているようである。

その中で注目すべきは、2004年に University College London の John Martin の呼びかけにより発足した、British Collaborative on Stem Cell Repair of the Heart という医師・研究者主導の非営利協力機構の設置であろう。これは、汎イギリス多施設協力体制を立ち上げ、国内統一の規律・目標・プロトコールのもとで施設間の足並みをそろえ大規模多施設臨床試験を迅速に効率的に行うことと、それに関する基礎研究を組織的に集学的・効果的に行うことにより、細胞移植療法を含む再生医療の基礎研究から臨床応用までの発展を促進することを目的とする。Martin 教授は再生医療の専門家ではないが、他の循環器病領域の臨床・基礎研究で多大の功績を残した循環器内科のいわゆる big name である。彼は彼自身の長い経験の中で、旧来の多くの医学研究分野においては政治的・伝統的なしがらみ・競争・縄張り意識が根強く施設間の機能的な相互協力が難しいことを遺憾に思ってきた。それに対し、再生医療という近年新たに急速に出現した分野こそはこれまでの既成の枠組みから外れて国家レベルの包括的な共同研究を組織する極めて良い機会・マテリアルであると見出し、この British Collaborative の立ち上げに献身的に取り組み無償の尽力でリーダーシップを発揮している(11, 12)。この機構にはイギリス国内 (イングランドのみならずウェールズ、スコットランド、北ア

イルランドを含む)の主要大学(Oxford University, Cambridge University, Imperial College London, King's College, University College Londonなど)や主要病院の循環器内科・心臓外科・基礎研究施設のみならず輸血関係機関(National Blood Service;通常輸血はもちろん臍帯血・骨髄移植を行う)など主だった施設はほぼすべて参加しており、2004年11月の第一回ミーティングは80名を越える参加者を集めた。その後も2-3ヶ月に1度のミーティング(臨床応用グループと基礎研究グループの二つのグループに分かれる)が行われ、臨床グループではMartin自身、研究グループは胚性幹細胞の研究で著名なStephen Minger(King's College)が司会を務め、相互理解・役割分担・調整・方針決定などについてフランクで活発な討論・調整が行われている。またZeiger(ドイツ)などの先進施設の主要メンバーから講演を受けたり、British Collaborativeを成功させるためのアドバイスを求めたりもしている。さらにBritish Heart Foundation、Medical Research Councilなどといった主要な研究財団を会議に招待し資金面(この5年で20-40億円が目標)での協力要請をしたりすることも積極的に行われている。

しかしながらイギリスでは現在なおImperial College London, University College of London, University of Leicesterなど少なくとも4施設によるそれぞれ独自のプロトコル(細胞の選択、移植ルートなど)を用いた骨髄由来細胞による急性心筋梗塞あるいは慢性心不全の臨床試験(第I-II相)がon-goingである。したがって、当面のBritish Collaborativeの臨床面での方針は、密な連絡・情報交換・相互サポート・宣伝活動・資金調達・データの公開などを行いながらこれらの進行中のtrialを統合・収束させていき、イギリス国家的なスケールでの大規模多施設臨床試験に移行することである。そして更にZeigerのグループなどとの提携を含めヨーロッパ全体を一括した巨大組織を構成し、急性心筋梗塞に対する骨髄由来細胞移植治療のdefinitive randomised, double-blind, multicentreの臨床試験を行うことも現実的な方針として視野に入れている。今後どのような施設間・国家間調整が行われどのように発展していくのか楽しみである。

### おわりに

細胞移植療法のような新たな実験的治療の臨床試験は、確固たるエビデンスに基づいたプロトコルで、十分な設備と経験を持った集学的なチームにより、正当な方法で行われることが必要であることは言うまでも無い。必要条件を満たさない軽率な臨床試験はこの有望な治療法の発展の妨げにさえなりかねない。今後イギリス・ヨーロッパ各国が細胞移植療法・再生医療の臨床応用を効率よくかつ慎重に進めていくためにどのような制度・体制を作りどのように発展させていくのかは大変興味深い。日本においても遅れを取らないためには(競争する必要は無いが)、日本オリジナルのアイデアを持った上で、国内のみならず汎アジアでのネットワークへの取り組み、欧米との協力体制、世界的な包括的プログラムへの参加を積極的に考えていくことが必要であろう。歴史的文化的背景や医療・研究制度などに大きな違いがあるのですべてを直接当てはめることは難しいが、日本における再生医療の統合・包括的発展のために、本稿で取り上げたイギリス・ヨーロッパでの体制作り・取り組みがの参考になれば幸いである。また最後に、本稿では細胞移植療法の臨床応用のみ焦点を当てたが、この治療法の将来的な成功はさらなる基礎研究の積み重ねなしではありえないことを強調したい(13)。

### 参考文献

1. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280.
2. Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sanchez PL, Canizo C, Rabago G, Marti-Climent JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gonzalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E. Autologous

- intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2003;24:2012-2020.
3. Siminiak T, Kalawski R, Fiszler D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J.* 2004;148: 531-537.
  4. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH, Maat AP, Serruys PW. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2063-2069.
  5. Siminiak T, Fiszler D, Jerzykowska O, Rowadowska N, Grygielska B, Majewski M, Kalmucki P, Kurpisz M. Percutaneous transvenous transplantation of autologous myoblasts in the treatment of postinfarction heart failure. The POZNAN trial. *Eur Heart J.* 2004;25(abstract suppl):264.
  6. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1078-1083.
  7. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106: 1913-1918.
  8. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1690-1699.
  9. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-148.
  10. Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant.* 2004;13:7-13.
  11. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet.* 2004;364:183-192.
  12. Martin J. Collaboration in cardiovascular stem-cell research. *Lancet.* 2005;365:2070-2071.
  13. Yacoub MH, Suzuki K, Rosenthal N. The future of regenerative therapy in patients with chronic heart failure. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine in press.*

### IV-1-3. 心筋再生の最先端

独立行政法人 国立病院機構 長良医療センター 心臓血管外科  
富田伸司

#### 1. はじめに

薬剤抵抗性の重症末期的心不全患者に対して、心臓移植は有効な治療法であるが、ドナー不足のために手術例数は著しく制限されている。これまでドナー不足解消のためさまざまな研究がなされてきた。例えば、人工心臓は bridge use の有効性は認められるものの、血栓性や感染の問題が存在し心臓移植に替わるものはまだない。また、異種移植では免疫制御や異種一人間のウイルス移行の問題など解決すべき難問が存在する。左心室部分切除（パチスタ）手術では、2年生存率が55%であるなど一般的手術というのには問題が残る。新生血管治療としては、レーザー治療（TMLR: Transmyocardial Laser Revascularization）や血管新生因子（VEGF, FGF, HGF など）が研究されている。レーザー後の炎症反応が局所の血流改善に寄与している可能性はあるが、狭心痛の消失は血管新生というよりむしろ denervation による影響が大きいと考えられている。一方、慢性虚血犬モデルで冠動脈に VEGF を投与した場合、毛細血管の増加することなどが報告された。Naked DNA またはウイルスベクターを使用する際に、DNA の安定性の問題や免疫応答や腫瘍発現などの問題が存在する。

1980年代に、広背筋をフラップとし不全心の周囲に巻き付け、骨格筋をトレーニングし心筋を補助する、いわゆる Dynamic Myoplasty の研究が盛んに行なわれた。その後、臨床研究では目立った成果は上がっていない。そのような状況下で、この広背筋のような骨格筋を細胞レベルに細分し心筋内へ移植した場合、移植細胞が心筋化し、心機能が改善するのではないかという仮説のもとに、重症不全心に対する細胞移植の研究がスタートした<sup>(1)</sup>。さまざまな障害で心筋細胞が死滅し減少した障害心に対して、Exogenous (外因性)な筋(源)細胞を補充してやることにより、新生組織を解剖学的に構築し、host と電気生理学的 (機能的)に結合させることで同期収縮させ、全体の心機能を改善させることが目標である。これがもともとの“心筋再生”の概念である。脱落した皮膚を新たな皮膚で覆うように、新たな心筋組織を作り出すことが、心筋再生と考えられた。再生医療の中では、心臓は重要臓器であるが、他分野よりも、やや後発に進歩することとなった。

Murryらはラット骨格筋細胞と新生児心筋や成熟心筋と co-culture した場合、connexin43 を発現し、gap junction を介して同期的収縮することを証明したが<sup>(2)</sup>、組織学的(in vivo)に心筋細胞へ分化するか否かに関する結論はまだ出ていない。しかし、他の細胞種に比べて筋肉組織を形成しやすいことや、培養技術の発達などにより、十分量をえることができるようになったことから、現在でも世界中多くの施設で研究されている。

また、ラット胎児心筋細胞 (fetal cardiomyocyte) も盛んに研究されている。心筋の性

質を維持しつつ比較的容易に培養できることや、心筋細胞であるためホストとの関係も良好ではないかという想定などに基づき、研究材料として有用である。1992年に心筋内への移植細胞の生着とホストと組織学的に電気生理学的結合が示され<sup>(3)</sup>、1994年頃から、細胞移植による心機能改善効果が示された<sup>(4)</sup>。しかし、いざ、同様の細胞種が臨床用に入手できるかという点、現状では不可能である。理想的には胎児心筋細胞のように、心筋の性格を持ちつつ増殖可能なものが望まれる。その候補として、ES細胞由来心筋細胞がある。倫理的問題が、臨床応用への障害となっているが、心筋分化などを解析するモデルとして重要であることに変わりはない。免疫拒絶の有無、対処法についても今後解決されるべき課題が存在する。

## 2. 骨髄細胞 (Bone marrow cell)

もう一つの細胞移植の大きな潮流として、Tufts大でAsaharaらがEPCを開発し<sup>(5)</sup>、Muroharaらが骨髄単核球細胞移植を導入し<sup>(6)</sup>、虚血性心疾患に対するEPCまたは骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生という概念が、国内外へ急速に広がった。

1999年に、骨髄から心筋細胞分化誘導されるという報告がなされ<sup>(7,8)</sup>、心筋新生の源を骨髄へ求める動きが活発となった。さらに筆者らは、ブタ心筋梗塞モデルにおいて細胞移植後移植細胞が心筋様組織を構築することや、左心室全体と局所の心筋収縮能の改善や、血流改善などをMIBI (<sup>99m</sup>Tc sestamibi SPECT imaging)にて確認した<sup>(9)</sup>。他報告ではdystrophic mdx mouseの抹消血管から骨髄細胞を移植した場合、心筋組織へ移植細胞が取り込まれ、心筋細胞へ分化することが示された<sup>(10)</sup>。全骨髄細胞から移植細胞分画を特に選別しない場合、骨や軟骨などの不要なphenotypeへ分化することが危惧される。細胞側の条件(分画、濃度、数)やホスト側の条件により状況は変わりうるものと考えられ、詳細な検討が待たれる。骨髄の中には造血幹細胞とともに間葉系幹細胞が存在するとされ、適切な条件により骨・軟骨・脂肪細胞へ分化誘導が可能となった<sup>(11)</sup>。骨髄細胞は経代培養していくと通常接着能の弱い造血幹細胞は自然に除去され、繊維芽細胞に似た細胞となり、いわゆる”間葉系幹細胞”と呼ばれている。間葉系幹細胞に対する抗体が存在しないことが、この分野の進歩を遅らせている原因といえる。骨髄細胞の中で、間葉系幹細胞よりさらに上流のES細胞と同等の内・外・中胚葉系細胞に分化しうる細胞(成人幹細胞: Adult stem cell)の存在が報告されつつある。標識された移植骨髄細胞が一度ホストの骨髄へhomingし、さらに下肢虚血部へ遊走し血管<sup>(5)</sup>や骨格筋へ分化してゆくことなど報告された。その反面、その後、造血幹細胞は心筋細胞に分化しないという報告などがなされ、骨髄由来幹細胞の心筋細胞分化に関する研究は、未だ混沌としている。

細胞移植のソースとして骨髄細胞を考えた場合、他細胞に比べ多くの利点を有する。骨髄穿刺は臨床上通常手技としてすでに確立されており、自己細胞であるため免疫拒絶反応を回避しえ、倫理的に問題なく利用が可能になると考えられたため、爆発的に国内、国外で臨床応用が進んでいった。最近の報告では、急性心筋梗塞後の骨髄細胞冠動脈注入療法は、



有効性なしであっても改善効果は微々たるものであるとされ、新たな方向性が模索される可能性がある。

### 3. 心臓内環境因子

Chiu らは、骨髄細胞の心筋分化誘導に対する Cardiac Milieu(環境因子)の重要性や、connectin43 の発現などを報告し、骨髄細胞が骨格筋芽細胞に比してより心筋細胞に近く機能する可能性を示した<sup>(12)</sup>。ヒト間葉系幹細胞を羊胎児に移植すると site-specific differentiation が起きることや<sup>(13)</sup>、C-kit+細胞が心筋内で心筋細胞・平滑筋細胞・血管内皮細胞に分化することが報告された<sup>(14)</sup>。これらの background には、環境因子の存在が推察されている。しかし、細胞間情報伝達・電気刺激・圧刺激などのさまざまな因子が複雑に絡み合った in vivo の現象を解析するのは現状では困難である。

もし、この現象を in vitro で模擬化することができれば、心筋分化誘導の現象の把握とその利用に大きく貢献すると著者らは考えた。ラット新生児心筋細胞をホストの心筋(CM)と見立て、Green Fluorescent protein 発現遺伝子組み替えマウス(GFP マウス)由来の骨髄細胞(GFP-BMC)を移植細胞と見立てて、共培養実験系を考案した。GFP-BMC 単独培養や GFP-BMC と CM を隔壁を置いた double chamber 培養では、GFP-BMC に特に変化は見られなかった。それに対し、GFP-BMC と CM を混合した共培養系では、ある GFP-BMC は、2日後から CM と同期収縮を開始するものが現れた<sup>(15)</sup>。また、免疫組織染色では、Myosin Heavy Chain-slow (1日後から)、Connexin43 と ANP (2日後から)、Troponin I (4日後から)が経時的に発現し漸増した。5日後には Myosin Heavy Chain-slow 陽性細胞はおよそ 2.5% になった<sup>(16)</sup>。この結果、幹細胞の心筋分化には、ホストの心筋細胞との直接接着が重要な役割を果たしていることが判明した。今後、このシステムを用いることにより、心筋分化誘導因子の発見、単離することが可能になれば、心筋再生の分野で大きく貢献することが期待される。

### 4. 自己再生能のコントロール、心臓内幹細胞

成人の心筋細胞は一度障害を受け死滅した場合、増殖再生をしないと長い間信じられてきた。1998年頃から Anversa らが、C-kit(+)細胞が心筋内に存在し、成人心筋細胞再生し分裂増殖するという有力な証拠を報告した<sup>(17)</sup>。この報告は、Endogenous な幹細胞による自己再生能という新たな分野を開くものとして注目された。心臓の場を十分認識した状態で Endogenous な細胞を人為的に賦活化することができれば、もはや Exogenous な細胞移植という方法論が不要になる可能性を秘めている。

Orlic らは、G-CSF と SCF をマウス急性心筋梗塞モデルに投与し、心機能を改善することを報告した<sup>(18)</sup>。われわれは、心筋梗塞モデル<sup>(19)</sup>、ドキシソルピシン投与心不全モデル<sup>(20)</sup>に対して、骨髄細胞を GFP で標識し、より多くの骨髄由来細胞の心臓への集積を報告した。心筋組織がより健常の状態に近づくことを報告した。しかしながら、骨髄由来心筋細胞は大

変少なく<sup>(21)</sup>、それ自体が、ポンプ機能を改善したとは考えにくく、その他の作用が検討された。ヒト拡張型心筋症でも、GCSF-receptor は心筋細胞上に発現し、GCSF が直接作用する可能性が示唆された<sup>(22)</sup>。その他、心筋細胞肥大、繊維化抑制効果に参与していることが報告された<sup>(23)</sup>。

また、Salaらは、造血幹細胞が動脈硬化に寄与するという警鐘を鳴らす報告をした<sup>(24)</sup>。今後さらに体内で行なわれている生命現象の解明を行い、その上で適切にコントロールすることが重要である。すでに、心筋梗塞に対する GCSF の臨床応用が進行中であり、結果が待たれる。

また、王らは、Scal(+)細胞が、心臓幹細胞として、心臓骨格内に存在し、体外で増幅できることを報告し、ヒトでの抽出、培養を行っている<sup>(25)</sup>。

## 5. 新たな細胞ソース

また、骨髄細胞に替わり得るものとして、脂肪由来幹細胞の研究もさかんである<sup>(26)</sup>。これは、骨髄よりも、非侵襲的に採取が可能であり今後の動向が注目される。また、動物実験では、舌から幹細胞が採取されたという報告もなされた。今後も、さまざまな、可能性のある細胞ソースが出現してくるものと思われる。そのような細胞種が出た場合に、臨床応用化していくための必要条件として、何らかの世界基準が作られることが望まれる。

## 6. 心機能改善のメカニズム

梗塞心モデルでは癒痕部と左心室腔が拡大を続けるのに対し、心筋細胞移植では、4週間後有意に減少した<sup>(4)</sup>。Langendorff 灌流装置により移植群で収縮期、developed pressure の高値を認めた。これは Laplace の原理によると考えられている ( $t=Pr/w$ ,  $t=$  wall stress,  $P=$  左心室内圧,  $r=$  左心室腔径)。移植細胞が癒痕部の壁厚を増大させ、左心室腔の縮小が左心室全体の wall stress の低下をもたらし、心機能の改善を起こしたことが推測される。換言すれば、癒痕部の細胞密度を高めることで物理的に compliance を低下させ、癒痕部の伸展が制御されたことが予想される。

さらに病巣部局所の収縮機能および拡張能が細胞移植後に改善したという報告もある<sup>(27)</sup>。これには、細胞移植に起因する血管新生による残存心筋の賦活化と移植細胞そのものの機能化が考えられるが、この2者を完全に分けて分析することは不可能である。癒痕部中央部に移植細胞が存在したとしても繊維組織によりホストと隔絶され、電気生理学的にホストと同時収縮しているかどうかは疑わしい。

ホストとドナーの電氣的結合は細胞移植の最終目標である。胎児心筋細胞や骨格筋芽細胞とホストの心筋細胞との間に gap junction の証明が病理学的になされた。しかし in vivo で細胞間の連結状態が電気生理学的検査では明らかになっていない。Gap junction を介して不整脈を生じることが危惧されるが、現在までその詳細な研究報告はない。

細胞移植による血管新生に起因する局所の血流量の増大は、1) hibernation を起こして

いる心筋細胞の機能を回復させる可能性、2) 移植細胞そのものの長期生存のためになると考えられる。虚血領域における移植部位の新生血管の由来としては、もともと潜在する血管内皮細胞・循環型血管内皮前駆細胞<sup>(5)</sup>・移植細胞自体<sup>(8)</sup>からきたものなどが考えられている。

autocrine あるいは paracrine 作用のある growth factor の可能性が予想されるが詳細は不明である。どの細胞種でも心機能改善効果があることなどからも、移植細胞そのものよりホストに与える影響の方が心機能全体に寄与する割合が多いのかもしれない。細胞移植により障害心の心機能が回復したという報告は多い。心機能改善の因子は多岐にわたり、それぞれがどのような比率で心機能に関与しているか今後明らかにされれば、患者の病態に応じた細胞の選択も可能になるであろう。

## 7. 細胞移植全般における諸問題

細胞移植における研究で明らかにされるべき問題は、数多くある。移植細胞種、自家移植と他家移植、異種移植、免疫拒絶反応、移植細胞数、移植後の細胞数減少の防止、移植方法、細胞の移植後の分化能や増殖能の自然歴とコントロール、移植された場（心臓）の変化、移植細胞と心臓との細胞の関係、移植細胞の paracrine, autocrine 作用、細胞移植による心機能改善のメカニズム、患者の年齢の問題、病態の違いによる移植細胞の質的相違など多岐にわたる。

移植法としては、手術時に直視下に病的部位を同定し、直接針によって注入する方法が実験、臨床の両面で行われている。さらに、非侵襲的なカテーテル操作による心室内からの注入法も行われている。しかし、注入された移植細胞はどこに存在するのかといえば、本来細胞の指定席ではない間質の部分にひっかかっている状態であり、それが、あるものは、冠静脈へのドレナージにより急速に減少することが報告された<sup>(28, 29)</sup>。Intracoronary からの注入においても、同様で、多くは脾臓などに集積し、心臓にとどまるものは、10-20% である。これまで、移植細胞を病的心筋内にいかに効率よく生存させるために、抗アポトーシス効果などをねらった報告が多数見られたが、その以前の問題として、移植細胞は物理的にその大多数が移植の場から消失してしまっていることを示唆している。今後も、病巣部の同定や確実な注入に関しては研究を積み重ねる必要がある。

癒痕部を再生組織で置換することで心機能を改善することが目標であるが、そのために必要な細胞数の決定には多因子が考えられる。まず、虚血部への細胞移植時には、移植された細胞は十分な血流や栄養のない状態で生存生着することが必要である。この細胞生着率をあげることは、移植後の構築の面からも大変重要な問題である。最近移植前に preconditioning する方法などが研究されている<sup>(30)</sup>。また移植細胞の in vivo での増殖能の動向がいかなるものか詳細は不明である。本来、正常細胞であれば、他の細胞と接地することで、増殖はストップするのが通例である。もし、接地してもなお無制限に増殖すれば、

腫瘍化を意味することになる。ES 細胞は、多能性、増殖性において、癌と共通の遺伝子を持つことが知られるようになってきた。

他には、実際の適正な移植細胞量の問題も存在する。仮にラット全心臓重量に対し、0.06ml の細胞を注入した場合、ヒトに換算すると、約 6ml の細胞液が必要となる。しかし、現実的には一度に 6ml 相当を注入した場合、周囲の収縮により心臓から外部へ漏出するか、塞栓症を引き起こす危険性がある。このような多くの因子を考慮したうえでの、移植細胞量の決定が必要であろう。

臓器再生の新たなステップとして、機能的な”組織”の構築が必要であると考えられている。臨床応用の可能性としては心筋梗塞後の左心室瘤症例がある。現行の手術法では術後低拍出量症候群などの問題が危惧される。病巣部を機能的な人工心筋組織で置き換えることで、予後の改善を期待できる。この技術が確立されれば、先天性心疾患の外科治療への応用や新しい心臓補助装置の開発にもつながる。Li らは、ラット胎児心筋細胞を、組織を作る“場”としての生体材料に播種することで、自己拍動能を有するパッチを開発し、In vitro および in vivo で機能を有することを示した<sup>(31)</sup>。また Leor らは多孔性の生体材料にラット胎児心筋細胞を播種し血管新生と左心室の拡大の抑制を示した<sup>(32)</sup>。しかし現実の問題として、生体材料が吸取消失した時点での人工組織が、心臓内圧に耐えられるのかなど課題も多い。

2000年6月からフランスの Menasche らによって、自己骨格筋芽細胞を用いた虚血心筋への細胞移植臨床第1例が施行され、phase I 臨床研究が終了した<sup>(33)</sup>。10例中4例のVTに対してAICD埋め込み術を施行した。これまで、細胞移植の研究分野において、詳細な細胞移植による不整脈の副作用は報告されていない。その後、さらに多施設の新たな研究報告によれば、移植自体による不整脈の問題はないとする報告も見られ、今後も更なる検討が必要である。

細胞移植による心機能の回復は、多々報告されているが、実際の病理組織所見では、ブロックのような新たな心筋組織からは、程遠いほどのまばらな新組織ばかりである。そのような現状から、心筋再生とは、“心機能を回復（再生）させる”。というコンセプトへ変化がみられるようになってきた。心機能を再生の範疇には、抗線維化作用<sup>(34)</sup>、血管新生<sup>(30)</sup>、細胞外基質の健常化など多くの研究分野も含めることになった。各 growth factor の投与、徐放投与の研究、さらに、外科的治療との併用<sup>(35)</sup>など、あらゆる組み合わせで、重症心不全に対しての戦略が模索されている。そこへ、本当の意味でポンプ機能としてのベストの移植細胞種が囑望されるが、それに見合うものは、まだ確立されていないのが、現状である。

## 8. 拡張型心筋症への細胞移植の応用

拡張型心筋症 (Idiopathic dilated cardiomyopathy: DCM) への細胞移植に関する研究は虚

血性心疾患に対するものと比し極端に少ない。これは、虚血性心疾患は世界で増加傾向であり、最大の課題のひとつであるということ、また、各種動物モデルが存在することなどがその理由に上げられる。

一方、DCMは心臓移植適応患者の主なものとして大変重要な疾患であるが、未だ原因が特定されないこと、擬似モデルは動物で存在するが、ヒト DCM と全く同等のものは存在しないことなどから、細胞移植の非虚血性心筋症に対する研究は大変少ない。Scorcinらはdoxorubicinによるマウス心不全モデルに対し胎児心筋細胞移植を施行し、1ヵ月後エコーにて移植群で良好な心機能を確認した<sup>(36)</sup>。Yooらは、BI053.58ハムスターDCMモデルに対して心室筋細胞移植を行い、移植群においてLangendorff灌流装置で良好な心機能を得た<sup>(37)</sup>。移植細胞は筋肉組織を構築し、左心室腔の拡大を制限した。しかしながら、虚血モデルと同じく心機能改善のメカニズムは不明である。

国立循環器センターでは左心補助人工心臓(LVAS)を装着している心臓移植待機患者が常時十名前後いるが、そのほとんどがDCMであり、これまでに6例の離脱例を経験した<sup>(38)</sup>。このような重症疾患群に対するLVASと細胞移植併用療法を臨床応用化することを目標にして蓄積的研究を進めている。細胞移植の臨床応用を現実考えた場合、術後早期に細胞移植手技そのものの治療効果を期待することはできない。むしろ、悪影響(不整脈・心機能低下)が懸念される。その際に、LVASのバックアップにより安全性が確保されるという面は、大きな利点である。また、細胞移植の効果が見られるまでの3ヶ月から6ヶ月間をLVASの補助のもとに経過観察できることから、方法論として十分現実可能性があると考えられる。

#### Reference List

- (1) Marelli D, Desrosiers C, el Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992; 1(6):383-390.
- (2) Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; 149(3):731-740.
- (3) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264(5155):98-101.

- (4) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996; 62(3):654-660.
- (5) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302):964-967.
- (6) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; 103(6):897-903.
- (7) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103(5):697-705.
- (8) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl):II247-II256.
- (9) Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123(6):1132-1140.
- (10) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199(5):391-396.
- (11) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-147.
- (12) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120(5):999-1005.
- (13) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6(11):1282-1286.

- (14) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701-705.
- (15) Tomita S, Fukuhara S, Nakatani T, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S. Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a co-culture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;50:321-324
- (16) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S. Bone marrow stromal cells can differentiate into cardiac lineage and contract synchronously with cardiomyocytes by direct cell-to-cell interaction in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125: 1470-1480, 2003
- (17) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344(23):1750-1757.
- (18) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(18):10344-10349.
- (19) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C et al. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant.*;13(7-8):741-8. 2004
- (20) Tomita S, Ishida M, Nakatani T, Fukuhara S, Hisashi Y, Ohtsu Y et al. Bone Marrow is a Source of Regenerated Cardiomyocytes in Doxorubicin-Induced-Cardiomyopathy, and GCSF Enhances Migration of Bone Marrow Cells and Attenuates Cardiotoxicity of Doxorubicin Under Electronmicroscopy. *J Heart Lung Transplant* 23(5) 577-584 2004
- (21) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S. Endogenous bone marrow-derived stem cells reconstituted myocardium only in the small proportion after acute myocardial infarction. *J Heart Lung Transplant* 24/1 67-72 2005
- (22) Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Yamashiro S, Sueda T et al. Granulocyte-colony stimulating factor directly enhances the proliferation of human adult heart cells derived from idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* Vol 23/12 1430-1437, 2004

- (23) Okada H, Takemura G, Li Yiwen, Maruyama R, Kanamori H, Li L et al. GCSF displays its beneficial effects on postinfarction cardiac function by cardiomyocyte hypertrophy and anti-fibrosis, but not by angiogenesis, regeneration, or anti-apoptosis of cardiomyocytes. *Circulation* Vol 112, No 17, II-244 2005
- (24) Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8(4):403-409.
- (25) Tateishi K, Takahashi T, Nomura T, Yamagishi M, Yaku H, Matsubara H et al. Single cardiac stem cells from adult mammalian heart are multipotent and can regenerate ischemic myocardium. *Circulation* Vol 112, No 17, II-51
- (26) Premaratne GU, Takaba K, Nemoto S, Tambara K, Nagasawa A, Yan Peishi et al. Autologous stromal vascular fraction transplantation induces angiogenesis and functional recovery in chronic myocardial infarction. *Circulation* Vol 112, No 17, II-443 2005
- (27) Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, Annex BH, Lilly RE, Glower DD et al. Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109(3):245-253.
- (28) M. Ishida, S. Tomita, T. Nakatani, K. Kagawa, T. Yamaguchi, M. Suga, Y. Ohtsu, H. Yazawa, T. Yagihara, S. Kitamura. Acute Effects of Direct Cell Implantation into the Heart- Analysis of Cardiac Function by Pressure-Volume Study- *J Heart Lung Transplant* 23(7) 881-888 2004
- (29) Teng CJ, Luo J, Chiu RC, Shum-Tim D. Myocardial cell therapy: massive mechanical loss associated with direct intramyocardial implantation in the beating heart. *Circulation* Vol 112, No 17, II-92
- (30) Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K, Yamamoto M, Lu F, Tabata Y et al. prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J thorac Cardiovasc surg.* 124(1):50-6 2002



- (31) Li RK, Yau TM, Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A et al. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119(2):368-375.
- (32) Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A et al. Bioengineered cardiac grafts : A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; 102(19 Suppl 3):III56-III61.
- (33) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357(9252):279-280.
- (34) Tambara K, Kanemitsu N, Hasegawa K, Premaratne GU, Lin X, Komeda M. Control-released hepatocyte growth factor markedly enhances cardiac performance in dilated cardiomyopathy: In vivo evidence of anti-apoptotic and anti-fibrotic function of HGF. *Circulation* Vol 112, No 17, II-401 2005
- (35) Sakakibara Y, Tambara K, Lu F, Nishina T, Sakaguchi G, Nagaya N et al. Combined procedure of surgical repair and cell transplantation for left ventricular aneurysm: an experimental study. *Circulation* Vol 106(12 Suppl 1), I-193-7 2002
- (36) Scorsin M, Hagege AA, Dolizy I, Marotte F, Mirochnik N, Copin H et al. Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? *Circulation* 1998; 98(19 Suppl):II151-II155.
- (37) Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation* 2000; 102(19 Suppl 3):III204-III209.
- (38) Nakatani T, Sasako Y, Kobayashi J, Komamura K, Kosakai Y, Nakano K et al. Recovery of cardiac function by long-term left ventricular support in patients with end-stage cardiomyopathy. *ASAIO J* 1998; 44(5):M516-M520.

#### IV-1-4. PAD に対する血管新生療法 ——世界の現状と今後の展望——

名古屋大学大学院医学系研究科血管外科学

古森公浩

〈要約〉重症虚血肢に対する治療は血行再建術が第一選択であるが、バイパス術が困難な症例や、血行再建術の適応にならない症例については将来的に下肢切断に至る可能性が高く、新しい治療法が望まれる。血管新生を誘導することにより血流改善を促す血管新生療法(therapeutic angiogenesis)は重症虚血肢や虚血性心疾患に対する新しい治療法として臨床応用されるようになってきた。本稿では、末梢動脈閉塞症(PAD)に対する血管新生療法として現在実際に臨床応用されている細胞移植法と遺伝子治療について解説する。

##### 〈はじめに〉

末梢動脈閉塞症(PAD)に対する血行再建術において大動脈腸骨動脈領域の閉塞性病変に対するバイパス術の5年開存率は90%以上と良好である。一方、鼠径部以下の膝窩動脈領域、あるいは膝下、下腿三分枝へのバイパス術ではいまだに20~30%の晩期閉塞がみられるのが現状であり、解決すべき問題点である<sup>1)</sup>。とくに閉塞症例の再手術が困難な症例や、あるいは血行再建術の適応とならない重症虚血肢は下肢切断に至る可能性が高く、新しい治療法が望まれるところである。血管新生を誘導することにより側副血行路の発達を促す治療的血管新生療法(therapeutic angiogenesis)はPADや虚血性心疾患に対する新しい治療法として最近注目を集めている。この治療法には細胞移植法と遺伝子治療の2つのアプローチがあり、本稿ではそれぞれについて概説する。

##### 〈細胞移植療法〉

広義の血管新生には血管新生部位へ流血細胞が付着し血管が出来上がるという胎児型の脈管形成(vasculogenesis)と既存血管の内皮細胞が増殖して管腔を形成することで新しい血管が完成するという成人型の血管新生(狭義の血管新生:angiogenesis)とに分類される。成熟個体では前者の頻度は低いが双方の機序を利用した血管新生機序が想定されている。骨髓移植された白血病患者の虚血心筋の血管内皮細胞がドナー型の遺伝子を示したこと<sup>2)</sup>、男性レシピエントに移植された女性ドナーの心臓の内皮細胞がY染色体を有したことなどから血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPCs)が存在する可能性が示され、Asaharaらにより骨髓液中から分離同定された<sup>3)</sup>。

以上の知見の下に、自己骨髓由来細胞を虚血肢に注入するという、細胞移植による血管新生療法が開始された。現時点では細胞移植療法の方法として骨髓単核球細胞移植と末梢血細胞移植の2つの方法が施行されている。

骨髓単核球移植はわが国で Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation

(TACT) study として行われた<sup>4)</sup>。全身麻酔下に腸骨から骨髓液 500ml を採取し、単核球細胞を分離した後、虚血肢へ筋注した。安静時疼痛が 45 例中 39 例で完全に消失し、虚血性潰瘍が 28 例中 21 例で治癒し、良好な血管が得られた。

名古屋大学でこれまでに施行した 7 症例の患者背景と細胞移植後の経過を表 1, 2 にまとめた。Buerger 病 3 例と ASO 4 例に施行した。ASO の 3 例が透析例であった。Buerger 病の 1 例は左足第 1 趾の虚血性潰瘍は治癒し、3 年経過した現在でも経過良好で、再発をみていない。他の Buerger 病の 1 例は安静時疼痛が少し改善したが、疼痛は完全に治癒しなかった。ASO 症例の 1 例は移植後安静時痛が軽減したが、2 例は移植直後、症状軽度改善傾向を認めたのみで、1 例は下腿切断になった。全症例とも細胞移植後、血管造影や足関節血圧比 (Ankle Brachial Pressure Index: ABPI) の変化は無かった。一部の症例でサーモグラフィ、レーザードップラーまたは経皮酸素分圧で改善がみられた。しかし、全般的に他覚摘検査では明らかな症状の改善を示唆する所見に乏しく、細胞移植療法の術前術後の信頼できる評価法の確立が望まれるところである<sup>5, 6)</sup>。

また、末梢血を移植する方法として G-CSF で誘導した末梢血単核球を利用した末梢血幹細胞<sup>7)</sup> と、末梢血から単核球を分離して移植する 2 つの方法が報告されており、いずれの方法でも良好な結果が得られている<sup>8)</sup>。

以上のように、細胞移植法は症例によっては良好な結果が得られており、さらには自家移植なので、免疫系の副作用の心配がなく、また通常の遺伝子導入と異なりベクターが不要で臨床応用が容易なことがあげられる。しかし、解決すべき問題点が多数あるのが現状である。まず、どの程度の細胞数が必要なのか、あるいは一番効果が得られる細胞数の量はどのくらいなのか、また、どのような症例に効果があるのか、どの部位への注入が効果があるのか、など適応症例や注入部位の問題がある。今後さらに、本治療法の機序を明らかにすることと、従来治療に比し本治療法の有効性をもう一度見直す必要があると思われる。

最近ウサギ虚血肢モデルを用いて、骨髓単核球細胞移植とアンジオポイエチン-1 の併用療法が血管新生を増強する結果を得た。このような細胞移植療法と遺伝子治療のハイブリッド治療の臨床への応用も期待される<sup>9)</sup>。

### <遺伝子治療>

PAD に対する血管新生を目的とした遺伝子治療はあたかも薬剤を投与するかのよう血管成長因子の遺伝子を投与する治療であった点が大変注目された。血管成長因子としては VEGF (vascular endothelial growth factor) が最初に利用され、他に HGF (hepatocyte growth factor) や FGF (fibroblast growth factor) がある。これまでに報告がある PAD に対する血管成長因子を用いた治療を表 3 にまとめた。

#### 1. VEGF

VEGF は血管内皮細胞に作用する蛋白で、マクロファージ、平滑筋細胞をはじめさまざまな細胞で産生分泌される。虚血部位において VEGF の発現は増強しており、虚血に対する生理的な血管新生に重要な役割を果たしている。

VEGF 遺伝子を用いた治療は 1994 年に Isner らが VEGF のプラスミドを動注したのを最初に、多くの臨床応用が行われ難治性潰瘍の縮小、安静時疼痛の軽減など、少なくとも初期成績では有効であることが報告されている<sup>10,11)</sup>。しかし、最近のいくつかの randomized study の報告では有効ではないという結果も得られている。Makinen らは 54 例の ASO に対して、PTA(percutaneous transluminal angioplasty)の際に、経カテーテル的にプラスミドあるいはアデノウイルスベクターをもちいて VEGF を投与し、虚血部位に血管新生を認めたと報告している<sup>12)</sup>。しかし、Rajagopalan らの Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial growth factor (RAVE) trial では 105 例の間欠性跛行の患者に対してアデノウイルスベクターを用いて VEGF を虚血部位に筋注したが、歩行可能距離などにプラセボ群と差はないという結果であった<sup>13)</sup>。臨床試験によって対象患者（虚血性潰瘍や安静時疼痛を伴う重症虚血肢か、間欠性跛行肢か）や評価方法（潰瘍の縮小、疼痛軽減、動脈造影所見、歩行可能距離など）に違いがあるので、一概にはいえないが、VEGF の有効性についてはさらなる検討が必要であろう。

## 2. HGF

HGF (hepatocyte growth factor) は、肝細胞の強力な増殖因子として発見されたが、強力な内皮細胞増殖作用があることが明らかになった。また、HGF は平滑筋を増殖させず、VEGF と同様に内皮細胞の特異的な増殖因子であり、強力な血管新生作用を有することが知られている<sup>14)</sup>。

HGF の作用は HGF による直接的な作用と VEGF を介する間接的な作用の 2 つが考えられている。また、VEGF が虚血部位においてその発現が上昇するのに対し、HGF はその発現が低下しており、補充療法である点がメリットである。

2001 年 5 月から大阪大学で HGF を用いた血管新生療法が安静時疼痛、虚血性潰瘍を伴う患者を対象に行われた。2003 年 4 月までに 22 人の患者に遺伝子投与が終了し、疼痛の軽減、ABPI の改善、潰瘍の縮小が報告されている。2004 年 4 月からは全国 40 施設で第 3 相試験が開始されている。

## 3. FGF

FGF も強力な血管新生因子である。マウスの重症下肢虚血モデルでは FGF 投与群では VEGF 投与群と比べて新生血管数には有意差はないが、周皮細胞で被覆された“成熟血管”の割合は FGF 投与群で多かった。FGF は、VEGF、HGF など他の内因性血管新生因子の発現亢進も促し、“機能的”血管新生が期待されている。Comerota らは安静時痛や虚血性潰瘍を伴う重症虚血肢の患者 51 例を対象に、FGF プラスミドを筋注し、疼痛軽減や潰瘍縮小をみたと報

告している<sup>15)</sup>。また、Ledermanらは間欠性跛行の患者190例に対して、randomized trialを行った。このtrialでは遺伝子ではなく、FGF蛋白を動注しているが、FGF投与群では歩行可能距離が改善したという(TRAFFIC study)<sup>16, 17)</sup>。

著者らはウサギ慢性虚血モデルに対するFGF-2遺伝子治療の血流改善効果および自家静脈グラフト内膜肥厚抑制効果を報告している<sup>18, 19, 20)</sup>。これまでFGFは線維芽細胞や血管内皮細胞だけではなく血管平滑筋細胞の増殖作用があるといわれていたが、著者らの実験結果では平滑筋細胞の増殖を抑制するという興味ある知見を得た。これらの結果は血管外科医にとって臨床的に非常に重要な意味のある結果であると思われる。つまり、これまで長期の開存率が不良であった、また血行再建術が困難と思われていた、末梢の流れが不良である、いわゆるrun-off不良例の開存率の向上や血行再建術適応の拡大に遺伝子治療や細胞移植療法などの血管新生療法が寄与する可能性が示唆されたからである。九州大学では純国産のセンダイウイルスベクターを用いたbFGF遺伝子治療を計画し、2005年10月には厚生労働省厚生審議会科学技術部会での審査が終了し、2006年2月厚生労働大臣、文部科学大臣の認可がおりたところである。今後、FGF-2の重症虚血肢に対する臨床応用が期待される場所である。

#### <おわりに>

IsnerらがVEGFプラスミドを臨床応用以来、治療的血管新生療法は重症虚血肢に対する新しい治療法として期待されている。細胞移植療法は日本発信の治療法である。また、HGFは日本で発見され、センダイウイルスベクターも純国産であり、この領域でますます日本が世界をリードできるような、今後さらなる発展が期待される。

## 文献

- 1) Mori, E. et al.: Comparison of long-term results with surgical and conservative treatment in the patients with intermittent claudication. *Surgery*, 131:S269-S274, 2002.
- 2) Gonsilius, E. et al.: Evidence from a leukemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*, 355:1688-1691, 2000.
- 3) Asahara, T. et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275:964-967, 1997.
- 4) Tateishi-Yuyama E. et al.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 360:427-435, 2002.
- 5) 近藤隆久・他: 骨髓細胞移植による末梢性血管の治療例. *老年医学*, 41:1819-1823, 2003.
- 6) 小林光一・他: 細胞移植療法による治療的血管新生療法. *炎症と免疫*, 12:3-8, 2004.
- 7) Inaba, S. et al.: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 360:2083, 2002.
- 8) Minamino, T. et al.: P eripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 360:2083-2084, 2002.
- 9) Kobayashi K, Kondo T, Inoue N, Aoki M, Mizuno M, Komori K, Yoshida J, Murohara T: Combination of in vivo angiopoietin-1 gene transfer and autologous bone marrow cell implantation for functional therapeutic angiogenesis  
*Arterioscl Throm Vas*, in press 2006
- 10) Isner, J. M. et al.: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet*, 348:370-374, 1996.
- 11) Baumgartner, I. et al.: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 97:1114-1123, 1998
- 12) Makinen, K. et al.: Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.*, 6(1):127-133, 2002.
- 13) Rajagopalan, S. et al.: Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease -A phase II randomized, double-blinded, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*, 108:1933-1938, 2003.

- 1 4) Morishita, R. et al.: Perspective in progress of cardiovascular gene therapy. *J. Pharmacol. Sci.*, 95:1-8, 2004.
- 1 5) Comerota, A. J. et al.: Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: Preliminary results of a phase I trial. *J. Vasc. Surg.*, 35:930-936, 2002.
- 1 6) Lederman, R.J. et al.: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomized trial. *Lancet*, 359:2053-2058, 2002.
- 1 7) Dawid L. Staudacher, et al.: Cellular and molecular therapeutic modalities for arterial obstructive syndromes. *Pharmacology & Therapeutics*, 109:263-273, 2006.
- 1 8) Masaki, I. et al.: Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J.*, 15:1294-1296, 2001.
- 1 9) Masaki, I. et al.: Angiogenic gene therapy for experimental limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of VEGF165, but not of FGF2. *Circ. Res.*, 90:966-973, 2002.
- 2 0) Shoji, T. et al.: Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates endothelial dysfunction and inhibits intimal hyperplasia of vein grafts in poor-runoff limbs of rabbit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 285(1):H173-82, 2003.

表3 虚血肢に対する臨床試験

著者（報告年）	治療方法、投与方法	血管成長因子	症例数	無作為割付	効果判定
Isnerら(1996)	プラスミド、ハイドロゲル	VEGF165	1	なし	改善
Baumgartnerら(1998)	プラスミド、筋注	VEGF165	9	なし	改善
Isnerら(1998)	プラスミド、筋注	VEGF165	6	なし	改善
Lazarousら(2000)	蛋白、動注	bFGF	19	あり	改善
Comerotaら(2002)	プラスミド、筋注	aFGF	51	なし	改善
Makinenら(2002)	プラスミド、筋注、またはアデノウイルスベクター、動注	VEGF	54	あり	改善
Ledermanら(2002)	蛋白、動注	bFGF	190	あり	改善
Rajagopalanら(2003)	アデノウイルスベクター、筋注	VEGF121	105	あり	有意差なし