

Figure 3. Transmission electron micrograph of CMG cells. A. Differentiated CMG cells had well-organized sarcomeres. Abundant glycogen granules and a number of mitochondria were observed. B. Ultrastructural analysis revealed atrial granules measuring 70-130 nm in diameter in the sarcoplasm that were especially concentrated in the juxtannuclear cytoplasm. Bar indicates 1 μ m.

ventricular-myocyte-like action potentials were first recorded after 4 weeks, and their percentage gradually increased thereafter.

The observation of several distinct patterns of action potential in CMG cells may reflect different developmental stages. Yasui et al studied action potentials and the occurrence of one of the pacemaker currents, $I(f)$, by the whole-cell voltage and current-clamp technique at the stage when a regular heartbeat is first established (9.5 days post coitum) and at 1 day before birth.¹⁹ They showed a prominent $I(f)$ in mouse embryonic ventricles in the early stage, and that it decreased by 82% before birth in tandem with the loss of regular spontaneous activity by the ventricular cells. They concluded that the $I(f)$ current of the sinus node type is present in early embryonic mouse ventricular cells. Loss of the $I(f)$ current during the second half of embryonic development is associated with a tendency for the ventricle to lose pacemaker potency. Our findings in CMG cells may reflect the developmental changes in the action potentials that occur in embryonic ventricular cardiomyocytes.

Expression of α_1 - and β -Adrenergic Receptor mRNA in CMG Cells

In the heart in vivo, α and β adrenergic receptors play a key role in modulating cardiac hypertrophy and cardiac function, such as heart rate, contractility, and conduction velocity. CMG cells expressed all the α_1 receptor subtypes (α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D}) before 5-azacytidine exposure (Fig. 6A),¹² and their expression in undifferentiated CMG cells may be explained by their ubiquitous or wide expression in vivo.²⁰ A low level of expression of α_{1A} was observed before 5-azacytidine exposure, and it increased markedly after exposure. Expression of α_{1B} was unaffected by 5-azacytidine. A high level of expression of α_{1D} was detected before 5-azacytidine exposure, but it decreased considerably after exposure. This transcriptional switch may be attributable to the CMG cells having acquired the cardiomyocyte phenotype. The ventricular cardiomyocytes in vivo mainly expressed α_{1A} and α_{1B} , and expressed a low level of α_{1D} receptor. The temporal changes in expression of α_1 adrenergic receptor subtypes in CMG cells are very similar to the postnatal changes observed in neonatal rat heart.^{21,22}

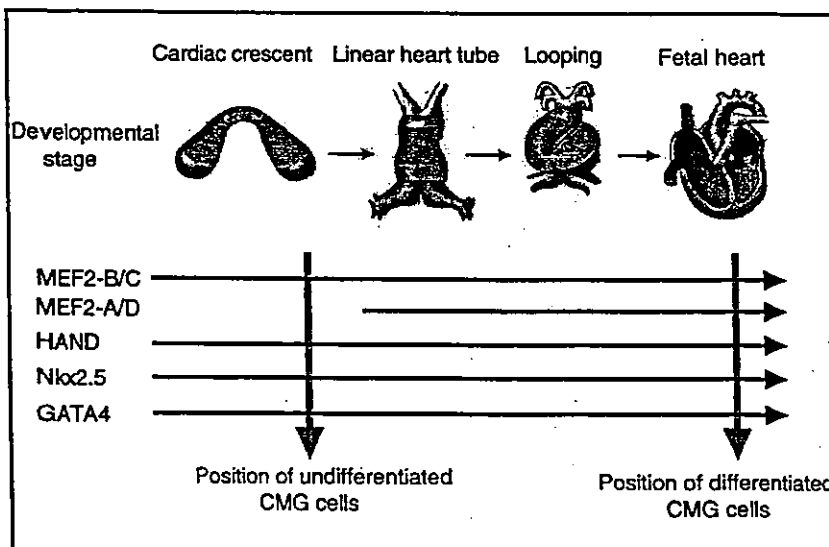


Figure 4. Expression of cardiac-specific transcription factors in the developing heart and in CMG cells. The horizontal arrows indicate the time course of the expression of cardiac-specific transcription factors in the developing fetal heart. The dotted vertical arrows indicate the expression of these factors in undifferentiated and differentiated CMG cells. CMG cells expressed MEF2-A and MEF2-D after 5-azacytidine exposure, when they acquired a cardiomyocyte phenotype.

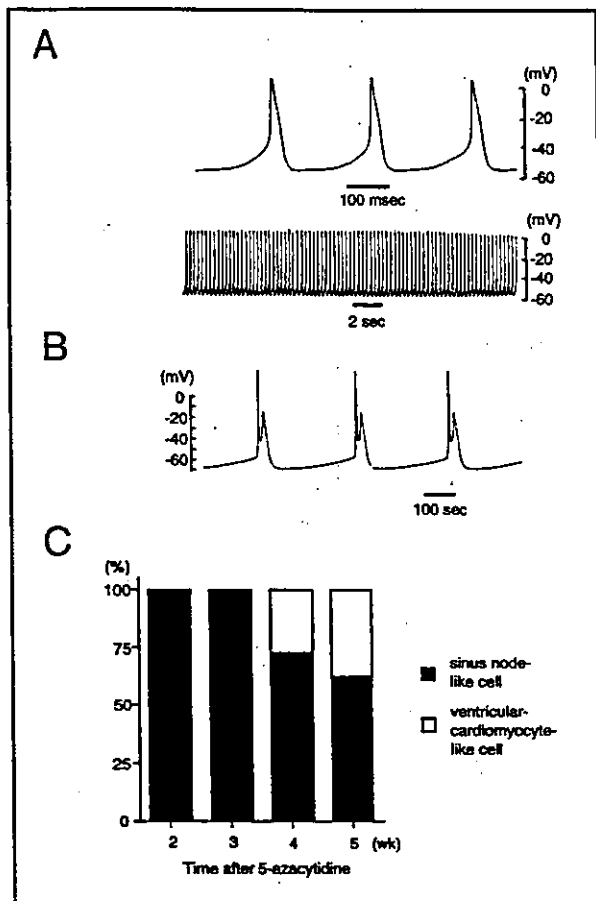


Figure 5. Representative tracing of the action potentials of CMG myotubes. Action potential recordings from spontaneous-beating cells were obtained with a conventional microelectrode at day 28 after 5-azacytidine exposure. The action potentials were classified into two groups: A. sinus-node-like action potentials and B. ventricular-cardiomyocyte-like action potentials. C. Percentages of CMG cells exhibiting sinus-node-like and ventricular-cardiomyocyte-like action potentials after 5-azacytidine exposure. A ventricular cardiomyocyte-like action potential was first recorded 4 weeks after 5-azacytidine exposure, and it rapidly became more prevalent thereafter.

The cardiomyocytes of the mammalian hearts express both β_1 and β_2 -adrenergic receptors, the β_1 receptor being the predominant subtype (approximately 75–80% of total β receptors).²³ CMG cells did not express β_1 and β_2 receptor transcripts before 5-azacytidine exposure, but RT-PCR showed expression of their mRNAs forward day 1 after exposure onward, and expression was stable after 1 week (Fig. 6B).¹² CMG cells expressed β_1 and β_2 mRNA after acquiring the cardiomyocyte phenotype. The temporal pattern of expression of these receptors differed from that of α_1 .

Phenylephrine Induces Activation of ERK1/2 and Hypertrophy in CMG Cells Via α_1 Receptors

ERK1/2 was activated by phenylephrine, an α_1 stimulant, within as little as 5 minutes, and the activation peaked at 10 min-

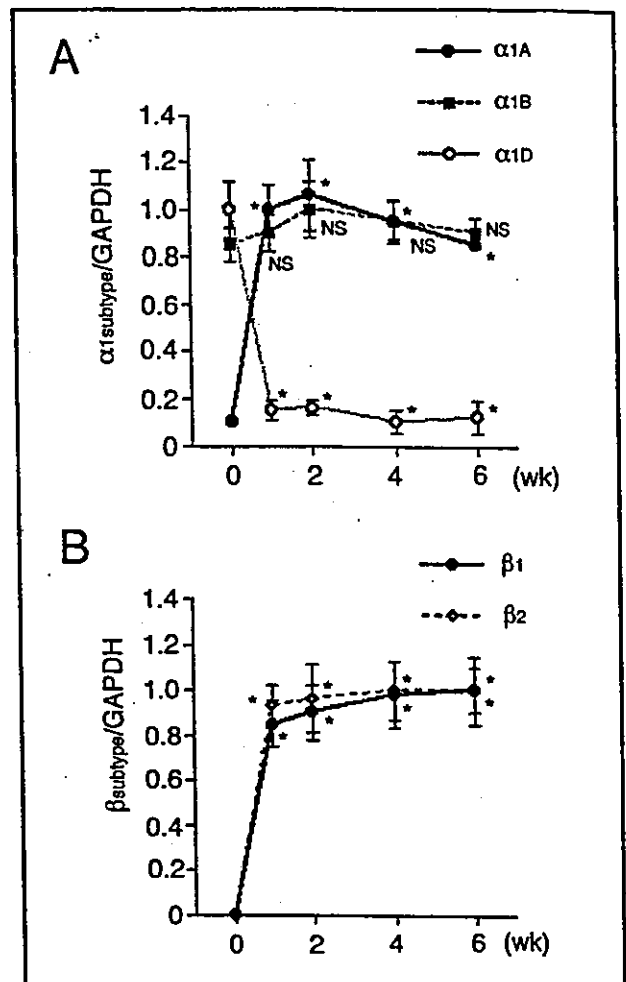


Figure 6. Temporal expression of α_1 - and β -adrenergic receptor subtype messenger ribonucleic acid (mRNA) in CMG cells. A. Densitometric analysis was performed, and the ratio of the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) product of α_1 subtype (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) receptors to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is shown. Data were obtained from 5 separate experiments and are shown in arbitrary units compared to the controls. Values are mean \pm SE. * = $p < 0.01$ vs. controls (before 5-azacytidine exposure). NS = not significant. B. Densitometric analysis was performed, and the ratio of the RT-PCR product of β subtype (β_1 and β_2) receptors to that of GAPDH is shown.

utes (Fig. 7A,B). The phenylephrine-induced phosphorylation was completely inhibited by prazosin (Fig. 7C), and phenylephrine increased the cell area and perimeter of the CMG cardiomyocytes (Fig. 7D,E). These findings indicated that CMG cells express functionally active α_1 -adrenergic receptors.¹²

Isoproterenol Increases the cAMP Content, Spontaneous Beating Rate, and Contractility of CMG Cells

Isoproterenol, a β stimulant, increased the cAMP content of CMG cells, and propranolol completely inhibited the isoproterenol-induced cAMP accumulation (Fig. 8A,B). Isoproterenol

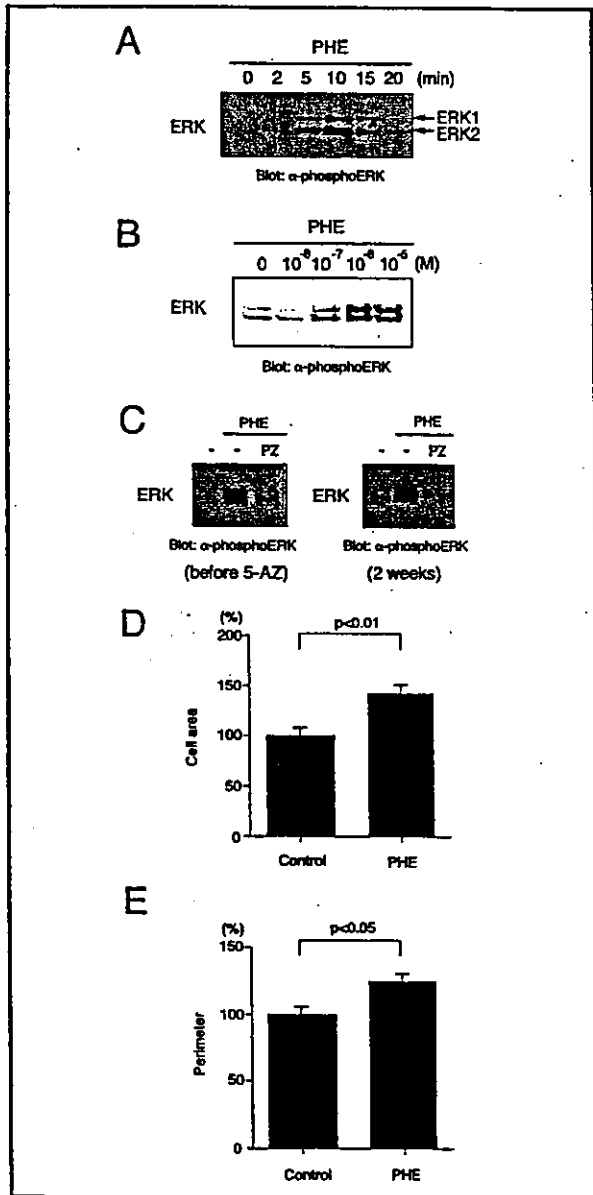


Figure 7. Effect of phenylephrine on phosphorylation of ERK1/2 and cell size in CMG cells. A-C. A. Cells at 2 weeks after 5-azacytidine exposure were stimulated with phenylephrine (PHE) (10^{-6} mol/L), and Western blot analysis was performed to detect phosphorylation of ERK1/2. B. Cells were stimulated with phenylephrine (10^{-7} - 10^{-5} mol/L) for 10 minutes, and phosphorylation of ERK was detected. C. Prazosin (10^{-6} mol/L) was added to cells 20 minutes before stimulation with phenylephrine (10^{-6} mol/L). PHE= phenylephrine; PZ= prazosin. D-E. Cells were serum depleted for 24 h, stimulated with phenylephrine for 24 h, and stained with anti-sarcomeric myosin antibody. Cell area (D) and perimeter (E) were quantitated with NIH Image software. (n= 100) * = $p < 0.01$ vs. control.

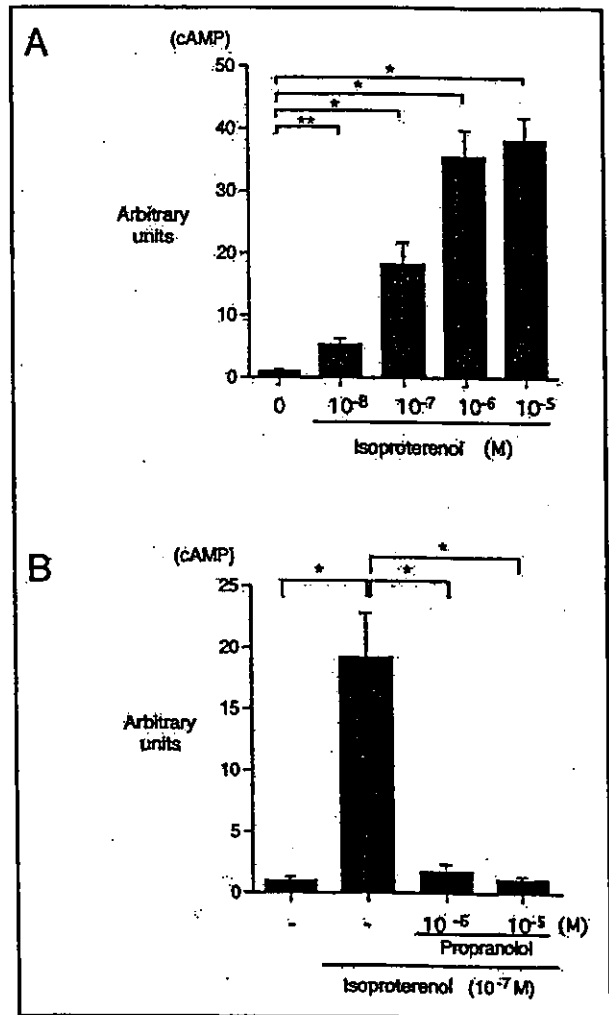


Figure 8. β receptor-mediated cyclic 3'5' adenosine monophosphate (cAMP) accumulation in CMG cells. A. Effect of isoproterenol on cAMP accumulation in CMG cells at 2 weeks after 5-azacytidine exposure. B. Cells were preincubated with propranolol (10^{-6} or 10^{-5} mol/L) for 20 minutes and stimulated with isoproterenol (10^{-7} mol/L) for 10 minutes. Data were obtained from 5 separate experiments and are shown as arbitrary units compared with the controls. * = $p < 0.01$, ** = $p < 0.05$ vs. controls.

was applied to the cells to determine whether it would increase the spontaneous beating rate (Table 2), and the results showed that it increased it significantly to 48% over the rate in the control cells.¹² Preincubation with propranolol (non-selective β blocker), CGP20712A (β_1 -selective blocker) strongly reduced the isoproterenol-induced increase in beating rate, and preincubation with ICI118551 (β_2 -selective blocker) only slightly decreased the beating rate. The increase in beating rate was similar to that of adult murine cardiomyocytes and ES cell-derived cardiomyocytes.

We also investigated the effect of isoproterenol on the contractile function of CMG cells and found that it increased cell motion distance, % shortening, and contractile velocity. The isoproterenol-induced increase in contractility was almost completely inhibited by both propranolol and CGP20712A. Collectively,

Table 2. Isoproterenol increased the spontaneous beating rate and contractility of CMG cells, mainly via β_1 receptors

	Control	Isoproterenol (10^{-7} mol/L)			
		Vehicle	Propranolol (10^{-7} mol/L)	CGP20712A (10^{-7} mol/L)	ICI118551 (10^{-7} mol/L)
% increase in beating rate	-	47.6±8.4*	10.0±1.9†	13.8±2.4†	37.6±1.9‡
cell motion (μ m)	5.0±0.3	6.8±0.7*	5.6±0.8‡	5.3±0.6‡	ND
% shortening	6.9±0.5	8.5±1.2*	7.2±0.8‡	5.6±0.6‡	ND
contractile velocity (μ m/s)	71.1±5.2	100.9±11.0*	71.3±8.8‡	70.6±6.6‡	ND

CMG cells at 4 weeks after 5-azacytidine exposure were initially exposed to prazosin (10^{-6} mol/L) for 30 minutes to block α_1 -adrenergic receptors. Cells were then preincubated for 20 minutes with vehicle (PBS), propranolol, CGP20712A, or ICI118551, and then stimulated with isoproterenol. The beating rate was counted 3 minutes after stimulation. Contractile parameters were analyzed 90 seconds after stimulation. Each contractile parameter value was calculated as the mean of 3 randomly selected beats in one cell. PBS was added to the control. Values are means \pm SE (n= 100, each). * = $p < 0.05$ vs. control; † = $p < 0.01$ vs. vehicle (isoproterenol only); ‡ = $p < 0.05$ vs. vehicle; ND = not determined.

these results indicated that the β_1 and β_2 -adrenergic receptors expressed in CMG cells are functional, and that the isoproterenol-induced increase in spontaneous beating rate and contractility is mainly mediated by β_1 receptors. The β_1 receptor was the predominant subtype that mediated changes in the beating rate in CMG cells, and the beating rate and the contractility were significantly increased by isoproterenol, and completely inhibited by propranolol and CGP20712A. β_1 -Receptors played a critical role in mediating the isoproterenol-induced signaling in differentiated CMG cells. This expression pattern was consistent with that of cardiomyocytes in vivo.

Phenylephrine and Isoproterenol Induce Atrial Natriuretic Peptide (ANP) and Brain Natriuretic Peptide (BNP) mRNA Expression

Hypertrophic stimuli are well known to induce reprogramming of gene expression in cardiomyocytes. Phenylephrine and isoproterenol significantly induced expression of the ANP (24 hour) gene, and they also induced the BNP (1 hour) gene (Fig. 9). These findings demonstrated that α and β adrenergic signal transduction systems in CMG cells are linked to the gene expression that induces cardiac hypertrophy.

CMG Cells Express Muscarinic Receptor mRNA after 5-Azacytidine Exposure

Heart rate, conduction velocity, and contractility were negatively regulated by the parasympathetic nervous system in cardiomyocytes, and muscarinic (cholinergic) receptors play an important role in mediating this function. To date, 5 subtypes (M_1 - M_5) of muscarinic receptors have been cloned. The expression of the muscarinic receptors is tissue-specific, and cardiomyocytes mainly express M_2 receptors in the mouse and human.²² The M_1 receptor subtype is also expressed in murine neonatal and adult cardiomyocytes. Figure 10A shows the temporal expression pattern of M_1 and M_2 receptor mRNA. Neither re-

ceptor was detected prior to 5-azacytidine exposure. CMG cells began to express these receptors when they acquired the cardiomyocyte phenotype.

M_1 receptors coupled to Gq/G₁₁ and activated phospholipase C β via Gq α , leading to inositol triphosphate (IP₃) production, and M_2 receptors coupled to Gi/G_o/Gz and activated phospholipase C β via Gi β , leading to IP₃ production.^{25,26} Carbachol, an acetylcholine homologue, increased the content of a second messenger, IP₃ (inositol triphosphate), in CMG cells (Fig. 10B), and preincubation with atropine (non-selective muscarinic blocker) and AFDX116 (M_2 -selective blocker) inhibited the carbachol-induced IP₃ production (Fig. 10C). These findings indicated that muscarinic receptors can transduce their signals, and that M_2 receptors play a critical role in this carbachol-induced IP₃ production in CMG cells. This expression pattern is similar to that of cardiomyocytes in vivo.

Significance of Expression of Adrenergic and Muscarinic Receptors in CMG Cells

Cardiomyocytes in vivo respond to stimulation by both sympathetic and parasympathetic nerves, and such stimulation alters the heart rate, conduction velocity, and contractility, enabling the cells to adapt to rapid changes in systemic oxygen demand. To date, and to our knowledge, ES cells and mesenchymal-stem-cell-derived CMG cells are the only possible candidates for regeneration of cardiomyocytes. We have already transplanted these cells into normal adult mouse hearts, and have observed that transplanted cells survived in recipient hearts for at least several weeks. Regenerated cardiomyocytes must express functional adrenergic and muscarinic receptors to be useful for transplantation, and although we did not investigate all signaling pathways and their functions, CMG cells are potential candidates for cardiomyocyte cell transplantation, because they possess such receptors.

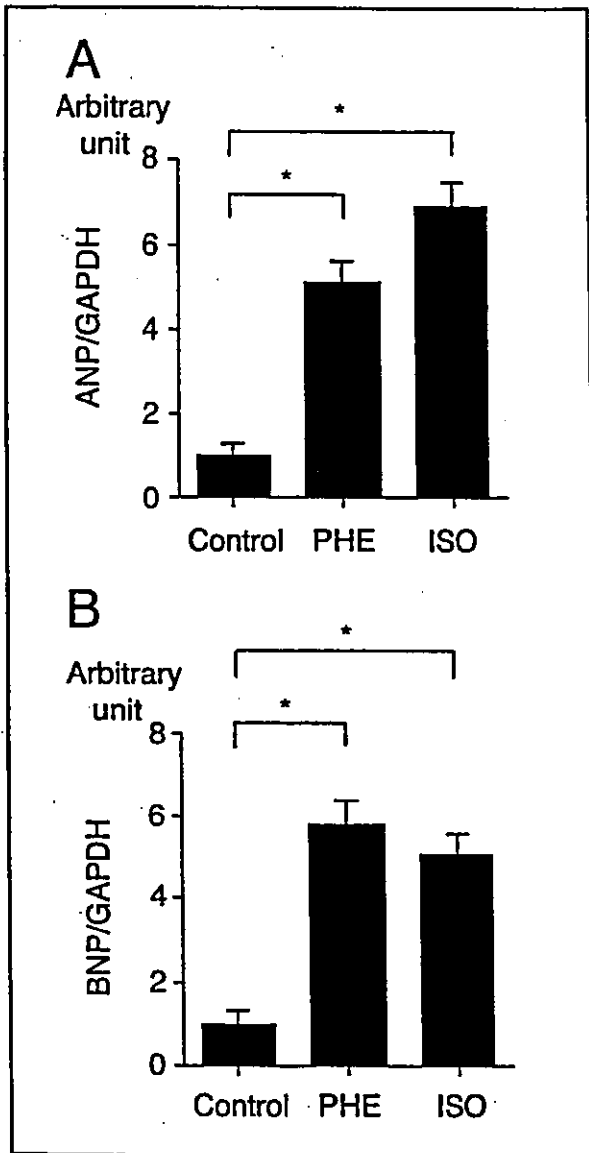


Figure 9. Both α and β stimulation induced mRNA expression of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) genes. CMG cells were serum depleted for 24 hours and pretreated with propranolol and stimulated with phenylephrine (PHE) (50 μ M) or isoproterenol (ISO) (100 μ M). RNA was extracted for 1 hour (BNP) and 24 hours (ANP), and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was examined. All values were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). * = $p < 0.01$ vs. control.

Cell Transplantation Therapy for the Treatment of Heart Failure

We have already transplanted CMG cells into normal adult mouse hearts, and observed that the transplanted cells could survive in the recipient heart for at least several months. Fibroblasts, smooth muscle cells, and skeletal muscle cells were the first cells used for transplantation into scar tissue secondary to experimental

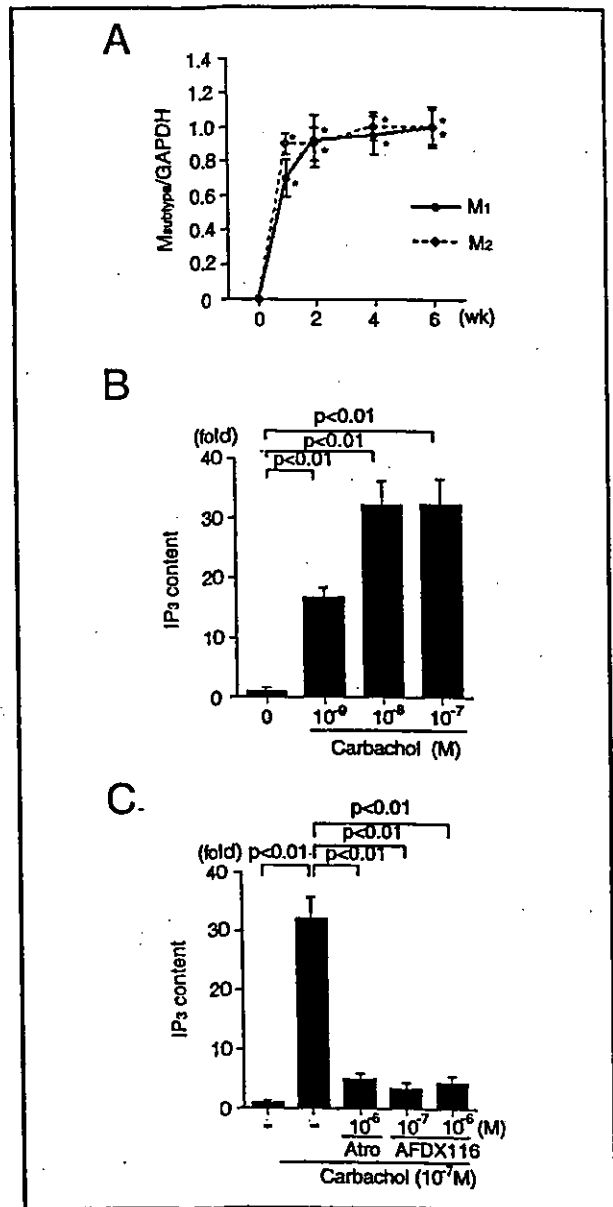


Figure 10. Expression and function of M_1 - and M_2 -muscarinic receptors in CMG cells. A. The ratio of the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) product of muscarinic subtype to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is shown. Data were obtained from 5 separate experiments and are shown as arbitrary units over controls. * = $p < 0.01$ vs. controls. B. Effect of carbachol on IP₃ production in CMG cells at 2 weeks after 5-azacytidine exposure. C. Effect of atropine (10⁻⁶ mol/L) and AFDX116 (M_2 -selective blocker) (10⁻⁷ or 10⁻⁶ mol/L) on carbachol-induced inositol triphosphate (IP₃) production. Data were obtained from 5 separate experiments and are shown as arbitrary units compared with the controls. * = $p < 0.01$ vs. controls. Atro = atropine.

myocardial infarction in the heart *in vivo*. While transplantation of these cells into scar tissue might improve cardiac remodeling or diastolic function, it is unlikely to improve systolic function. Transplantation of cardiomyocytes, however, might rescue systolic function. The only potential sources of regenerated cardiomyocytes available to date are embryonic stem (ES) cells and mesenchymal stem cells. ES cells differentiate into cardiomyocytes *in vitro* and have both advantages and disadvantages for cardiomyocyte regeneration. Transplanted ES cells may form teratomas if some undifferentiated totipotent cells are still present, and recipients must take immunosuppressants, because ES cells are allogeneic. By contrast, since mesenchymal stem cells do not carry any inherent risks of tumor formation and are syngeneic, it is reasonable to use autologous mesenchymal stem cell to treat heart disease. Nevertheless, there is a need to improve both the current methods for identification and culture of mesenchymal stem cells, and for induction of CMG cell differentiation, which are still inefficient and slow. Identification of specific growth factors, cytokines, or extracellular matrix factors that regulate cardiomyocyte differentiation may help to accelerate this process faster and make it more efficient.

In Vivo Evidence that Marrow Cells Can Generate Functional Cardiac Tissues

Recent studies have revealed that bone-marrow-derived cells differentiate into various types of cells *in vivo*. Shimizu et al reported that smooth-muscle-like cells (SMCs) in graft-vs-host arterial lesions could arise from circulating bone-marrow-derived precursors. They used murine aortic transplants to formally identify the source of SMCs in lesions in grafted arteries.²⁷ Allografts in beta-galactosidase transgenic recipients showed that intimal SMCs arose almost exclusively from host cells, and bone-marrow transplantation of beta-galactosidase-expressing cells into aortic allograft recipients demonstrated that the intimal cells included those of marrow origin.

Kocher et al showed that bone marrow from adult humans contains endothelial precursors with phenotypic and functional characteristics of embryonic hemangioblasts and that they can be used to directly induce new blood vessel formation in the infarct-bed (vasculogenesis) and proliferation of preexisting vasculature (angiogenesis) after experimental myocardial infarction.²⁸ The neoangiogenesis resulted in decreased apoptosis of hypertrophied myocytes in the peri-infarct region, long-term salvage and survival of viable myocardium, reduction in collagen deposition, and sustained improvement in cardiac function.

We also observed that transplanted bone marrow cells differentiated into cardiomyocytes in the recipient heart *in vivo* (unpublished observation). These findings provided direct evidence that bone marrow cells can regenerate various types of cells in cardiac tissue. We expect cardiac tissues damaged by myocardial infarction or other diseases to be repaired by bone-marrow-derived stem cells in the near future, and the precise mechanism should be investigated to achieve this goal.

References

1. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG et al. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1997; 264:98-101.
2. Delcarpio JB, Claycomb WC. Cardiomyocyte transfer into the mammalian heart. Cell-to-cell interactions *in vivo* and *in vitro*. *Ann NY Acad Sci* 1997; 52:267-285.
3. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. *Differentiation* 1991; 48:173-182.
4. Wobus AM, Kleppisch T, Maltsev V et al. In: Cardiomyocyte-like cells differentiated *in vitro* from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca^{2+} channels. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 1994; 30:425-434.
5. Roy NS, Wang S, Jiang L et al. *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 2000; 6:271-277.
6. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-74.
7. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ et al. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Bio* 1994; 161:218-228.
8. Friedenstein AJ, Chailakhyan R, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:263-272.
9. Ferrari G, Angelis GC, Colleta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
10. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop* 1980; 151:294-307.
11. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705.
12. Hakuno D, Fukuda K, Makino S et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; 15:380-386.
13. Beltrami AP, Urbank K, Kajstura J et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344:1750-7.
14. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs* 2001; 25:183-193.
15. Linnets TJ, Parsons LM, Harley L et al. Nlx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993; 119:419-431.
16. Arceci RJ, King AA, Simon MC et al. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 1993; 13:2235-2246.
17. Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF et al. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 1994; 120:1251-1263.
18. Chen Z, Friedrich GA, Soriano P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev* 1994; 8:2293-2301.
19. Yasui K, Liu W, Ophof T et al. I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ Res* 2001; 88: 536-42.
20. Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Casanova E et al. Molecular cloning of alpha 1d-adrenergic receptor and tissue distribution of three alpha 1-adrenergic receptor subtypes in mouse. *J Neurochem* 2001; 65:2387-2392.
21. Stewart AF, Rokosh DG, Bailey BA et al. Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2001; 75:796-802.
22. Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC et al. Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and *in vivo*. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *J Biol Chem* 1996; 271:5839-5843.
23. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Cardiac function in genetically engineered mice with altered adrenergic receptor signaling. *Am J Physiol* 1997; 272:H1553-H1559.
24. Sharma VK, Colecraft HM, Rubin LE et al. Does mammalian heart contain only the M2 muscarinic receptor subtype? *Life Sci* 1997; 60:1023-1029.

25. Nakamura F, Kato M, Kameyama K et al. Characterization of Gq family G proteins GL1 alpha (G14 alpha), GL2 alpha (G11 alpha), and Gq alpha expressed in the baculovirus-insect cell system. *J Biol Chem* 1995; 270:6246-6253.
26. Berstein G, Blank JL, Smrcka AV et al. Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, Gq/11, and phospholipase C-beta 1. *J Biol Chem* 1995; 267:8081-8088.
27. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med* 2001; 7:738-741.
28. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-436.

VI. 血管新生・再建療法

心筋再生療法

Cardiomyocyte regenerate therapy

板橋裕史¹ 福田恵一²

Key words : 心筋細胞, 再生医療, 体性幹細胞, 胚性幹細胞, 移植治療

はじめに

広範囲に及ぶ心筋梗塞の最終病像は、心筋細胞の喪失や機能低下に伴う収縮力不足による心不全である。種々の薬物療法では十分な心機能の改善が望めないほどの重篤な心不全では、根本的な治療は心臓移植に頼らざるを得ないのが現状である。しかし、米国においても年間7万例の心臓移植対象患者がいるものの移植の恩恵にあずかれるのは2,000例にとどまっております。慢性的なドナー不足が深刻な問題となっている。また、心臓移植には免疫拒絶、感染症、発癌などの解決せねばならない問題も多い。

このような現状を踏まえ自己細胞あるいは第三者の細胞を用いた再生医学に大きな期待が寄せられているが、心筋細胞は生体内で最終分化した細胞であり、今日に至るまで心筋細胞の再生は困難とされてきた。近年、骨髄細胞や胚性幹細胞(ES細胞)をはじめとした各種の幹細胞から心筋細胞を分化誘導する報告が相次いでなされるようになり、著者らも骨髄間葉系幹細胞を用いることにより心筋細胞が再生されることを報告している。

本稿では心筋梗塞による心不全への治療として期待される、様々な幹細胞を用いた心筋再生、再生心筋細胞移植の実際について今後の展望を踏まえ述べる。

1. 心筋細胞再生のための治療戦略

心筋細胞は生後2週間ぐらまでは細胞分裂を行うが、それ以後は細胞分裂を行わず個々の細胞が大きくなることにより成人の心臓が形成される。発生の段階における遺伝子発現解析の結果、骨格筋細胞でMyoDという転写因子が単離され¹⁾、この遺伝子は他の細胞に導入し強制発現させるとその細胞が骨格筋細胞に形質転換するという性質をもつことから、マスター遺伝子と呼ばれた。MyoDの発見以来、心筋細胞におけるマスター遺伝子を単離する試みがなされたが、その結果マスター遺伝子こそ単離されはしなかったものの、心筋細胞の発生に重要な遺伝子としてNkx2.5, GATA4, MEF2C, eHAND, TEF-1などが次々に発見され²⁻⁶⁾、心筋細胞の発生メカニズムの解明へ大きく貢献した。これら心筋細胞に特異的な遺伝子の導入により生理的な発生分化のプログラムを再現できれば非心筋細胞の心筋細胞への分化誘導が実現できるのではないかと考えられている¹⁰⁾。

心筋再生の次の方法として、一度最終分化に至った生体の心筋細胞に再び細胞分裂能を獲得させるという試みがある。細胞の分裂増殖にはサイクリン、CDKなどの細胞周期調節遺伝子、癌抑制遺伝子などの細胞周期にかかわる遺伝子が関与しているが、これまで細胞周期調節遺伝

¹Yuji Itabashi: Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科 ²Keiichi Fukuda: Department of Advanced Cardiac Therapeutics 同心臓先進治療学

表 1 心筋細胞再生のための戦略

心筋細胞再生法	方法	課題
心筋細胞特異的転写因子の遺伝子導入	<p>マスター遺伝子の導入</p> <p>非心筋細胞 → 心筋細胞</p>	心筋細胞分化過程の解明 心筋のマスター遺伝子の単離 遺伝子導入のためのベクターの開発
心筋細胞の細胞分裂能獲得	<p>細胞周期調節遺伝子</p> <p>心筋細胞 → 分裂可能な心筋細胞</p>	心筋細胞の終末分化機序の解明 遺伝子導入のためのベクターの開発
未分化幹細胞から心筋細胞への分化誘導	<p>分化誘導</p> <p>未分化幹細胞 (骨髄間葉系幹細胞) → 心筋細胞</p>	未分化幹細胞の単離 効率的な分化誘導法の確立 (分化に必要な細胞増殖因子などの同定)

子や発癌ウイルスの腫瘍抗原 (SV40 large T 抗原など) を心筋細胞に遺伝子導入することで分裂増殖可能な心筋細胞を作製する研究がなされている⁷⁾。

第3の方法として幹細胞から心筋細胞を分化誘導させる方法があげられるが、幹細胞としては体性幹細胞としての骨髄間葉系幹細胞と胚性幹細胞 (ES 細胞) に期待が寄せられている。現在心筋細胞の再生法として最も現実的な方法としては、この分化誘導による方法であると考えられている。

2. 心筋細胞の再生

a. 体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生

近年の研究により成人の組織においても未分化幹細胞が残存していることが明らかになり、中胚葉由来の細胞としては骨髄中の幹細胞が注目されている。骨髄の細胞は将来血球に分化する造血幹細胞とこれに由来する各種の血球系細胞、そしてこの血球系細胞を支持するための骨髄間質細胞より構成される。最近の研究によれば骨髄間質細胞中には間葉系の未分化体性幹細胞

が含まれており、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、靭帯、腱などの中胚葉系の様々な細胞に分化することが報告されている。

著者らはマウス骨髄の初代培養を行い付着系の細胞である骨髄間質細胞を分離した後、これを長期培養することで不死化した細胞株を作製した。この多クローン細胞株に DNA の脱メチル化剤である 5-アザシチジンを添加し、更に 2 週間程度培養を続けると、少ない確率ではあるが自己拍動する細胞が得られる。こうして得られた細胞株のうち、自己拍動する割合の高いクローンを CMG (cardiomyogenesis) 細胞株として樹立した。CMG 細胞は 5-アザシチジンにより最終的に分化誘導を行うと約 30% の細胞が自己拍動を開始するようになった⁸⁾。患者の骨髄間葉系幹細胞を *in vitro* で心筋細胞に分化誘導できれば拒絶反応や倫理的問題もなく細胞移植が可能となるため、骨髄細胞を利用した心筋細胞の分化誘導法の研究に大きな期待が寄せられている。今後はヒト骨髄間葉系幹細胞からの心筋細胞の分化誘導を可能とするために心筋細胞分化の機序を更に明らかにする必要がある。

b. 胚性幹細胞(ES細胞)

マウス ES細胞は LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下で細胞塊を作らせると胚様体(embryoid body)と呼ばれる構造を形成する。胚様体では外胚葉、中胚葉、内胚葉の細胞が分化し、1週間ほどで自律拍動する心筋細胞のクラスターが観察できるようになる。

1998年にはヒト ES細胞の樹立が報告され、自己拍動し Csx/Nkx2.5や GATA4 など、心筋に特異的な転写因子や遺伝子を発現した細胞への分化が報告されている⁹⁾。ES細胞を移植へ利用するためには心筋細胞への分化効率をいかに高めるかが問題となるが、心筋の発生に関与する遺伝子の導入や培養条件に蛋白質や薬剤を添加することにより心筋細胞への分化を誘導したり、心筋に特異的なプロモーターとネオマイシンなどの薬剤耐性遺伝子を導入することで心筋へ分化した細胞のみを選別する試みがなされている¹⁰⁾。これらの試みにより ES細胞が効率よく心筋へ誘導されれば移植治療への応用が期待される。しかし、ES細胞の心筋への移植は他家移植であり、HLAの問題、移植細胞に少しでも未分化な細胞が残っていた場合、将来癌や奇形腫が発生する可能性があるなど、解決すべき問題

は多い。

おわりに

胚性幹細胞、および体性幹細胞の正体が明らかになるにつれ、これらは組織再生の有力な材料であり、これまで不可能と考えられていた心筋組織の再生が実現の可能性を帯びてきた。しかし心筋の再生に関してはまだ動物モデルのみの報告も少なくなく、ヒトに臨床応用するにはまだ解決すべき課題も多く残されている。

循環器領域における再生医療の分野では、ASO に対する血管新生療法が既に臨床段階に入り実績をあげており、少し遅れて心筋に対する再生治療も着実に研究が進んでいる。実際に骨髄細胞、筋芽細胞などの体性幹細胞を用いた臨床試験が欧米では次々に行われているが、これらの結果が良好であれば CABG や PTCA に細胞移植やサイトカインによる治療が併用されるようになり、移植に代わる心筋再生治療が実現される日も夢ではなくなった。

しかし再生医学の進歩には技術的な点のほか倫理的な側面もあり、その研究は慎重に進めなければならない。

文献

- 1) Runicki MA, et al: MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359, 1993.
- 2) Komuro I, Izumo S: Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8145-8149, 1993.
- 3) Lints TJ, et al: Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cell and their myogenic descendants. *Development* 119: 969, 1993.
- 4) Kuo CT, et al: GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and tube formation. *Genes Dev* 11: 1061-1072, 1997.
- 5) Lin Q, et al: Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276: 1404-1407, 1997.
- 6) Firulli AB, et al: Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet* 18: 266-270, 1998.
- 7) Leferovich JM, et al: Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9830-9835, 2001.
- 8) Makino S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999.
- 9) Kehat I, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108: 407-414, 2001.
- 10) Klug MG, et al: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98: 216-224, 1996.

第5章

心臓の再生

—骨髄細胞から心筋細胞を作る—

「先生、大変です。見に来てください。細胞が拍動しています。」この言葉を聞いてからもう8年ぐらいになる。最初に骨髄の細胞が拍動を開始したとき、当時大学院生の牧野伸司君が大声であわてふためいたように私を呼びにきた。私も書きかけの原稿を放り出して、培養室の扉をあけた。顕微鏡を覗くとまさしく細胞は動いていた。

新生児ラット心筋の初代培養で拍動する細胞を見慣れている私も、骨髄の細胞が実際に拍動するようになるのを目にするのは初めてで、顕微鏡のレバーを持つ手に思わず力が入っていたのをよく覚えている。骨髄に存在する幹細胞がいろいろな機能の細胞になる多分化能を持ち、骨や軟骨や脂肪細胞になることはすでに知られていた。これらの細胞は胎児期の中胚葉由来の細胞だから、同じ中胚葉由来の心筋細胞になるかもしれないと思って実験を始めてはみたものの、なかなか成功しない。実験を初めて1年近く経っていたので、もう駄目かもしれないと諦めかけていた。それが突然の報告に思わず、それを続けさせていた自分自身が「そんなことがあっていいのか?」と思いながら顕微鏡を覗いていた。細胞の方はそんなこととは知らずに、ただ坦々と規則正しく拍動を続けていた。こうして、骨髄細胞由来の心筋再生の幕は開けたのである。

1. 心筋再生の夜明け前

心筋細胞再生の研究の歴史は1990年頃にさかのほらねばならない。最初の研究は心筋でなく骨格筋細胞の研究から始まった。米国のある研究者が骨格筋細胞に発現するある1つの遺伝子を単離した。その名をmyoD(マイオディー)といい、転写因子の1つである。転写因子とは細胞の中で遺伝子発現を調節するもので、マイオディーを骨格筋以外の細胞に入れて強制的に発現することにより、その細胞が骨格筋細胞になってしまうというものである。こうした最上流の遺伝子をマスター遺伝子と呼ぶ。この事実をみて私たちは驚き、心筋が骨格筋に似ていることから、心筋版のマイオディーを探すことに奔走した。しかし、10年以上経ったいまも心筋のマスター遺伝子は取られていない。

次に考えたのは胎児心筋細胞を取り出し、一定条件下で細胞分裂させることだった。1990年代前半には細胞が分裂するしくみが次々と明らかになってきた。サイクリンという何種類かのたんぱく質とCDKと呼ばれるリン酸化酵素(これらを細胞周期関連遺伝子という)

第一部 再生医療の最前線

が組み合わさって、順番に発現すると細胞は分裂を始める。この細胞周期関連遺伝子を胎児の心筋細胞に入れて分裂させようと試みた。しかし、残念ながらこの方法でも心筋細胞の分裂は起きず、心筋細胞再生の試みは来る日も来る日も失敗の連続だった。

2. 骨髄幹細胞の利用

こうした失敗を繰り返すうちに、幹細胞を使うことを思い立った。幹細胞を分化させて心筋細胞を得ようというわけである。1980年代にすでに受精卵の早期胚から得られた胚性幹細胞(ES細胞)が多くの細胞に分化する多分化能を持ち、一部が心筋細胞に分化することが知られていた。しかし、私は元来負けず嫌いなので、「ES細胞自体は再生医学の材料として優れているかもしれないが、他の人と同じことをやってもおもしろくない。ES細胞を凌ぐ幹細胞はないのであろうか?」と考えた。そこで、いろいろな情報を集め、骨髄の細胞ならあるいは心筋細胞になるのではないかと考えた。というのも、論文を調べたり情報を集めたりしてみると、1990年代前半までに骨髄の間質細胞がさまざまな細胞に分化するということが明らかだったからである。

骨髄が血球細胞をつくる造血の場であることは周知の事実である。実際に骨髄細胞を採取して、骨髄細胞の表面に認められる表面抗原というものを解析してみると、実に99%以上の細胞が血液細胞あるいは造血幹細胞由来である。しかし、1%以下の頻度だが、血液細胞系以外の細胞も認められる。こうした細胞を従来は骨髄間質細胞と呼んでいた。

骨髄間質細胞は血液系の細胞とは異なり、培養皿に接着する性質がある。微量で生理活

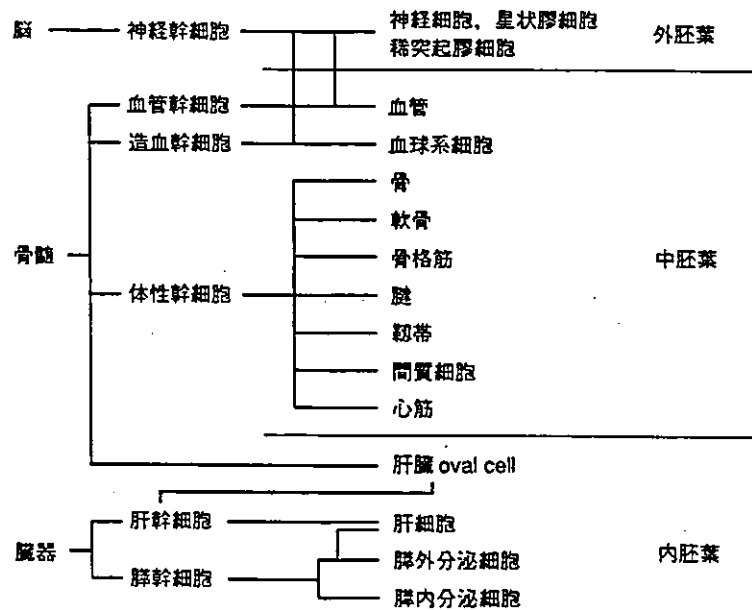


図 1-5-1 成人における幹細胞の分類

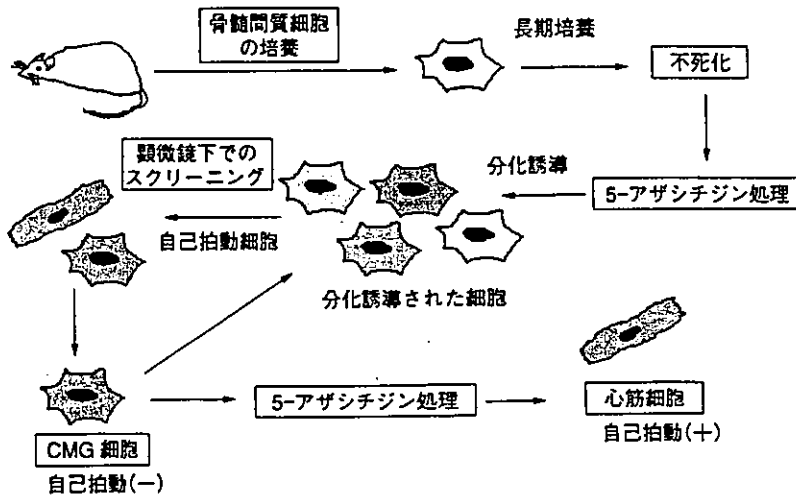


図1-5-2 CMG細胞の作製手順

性作用を発現するサイトカインが発見される以前は、造血幹細胞を培養する際に分化を抑制する因子を持ったフィーダー細胞として用いられていたことから分かるように、血液系の細胞の細胞増殖、分化を調節・支持する細胞と考えられていた。

骨髄間質細胞を培養してみると、その一部がさまざまな形態を取り、分化能をもつことが分かる。それまでの報告で骨髄間質細胞は骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞になることが知られていた。また、その後の研究で間質細胞すべてが多分化能をもつわけではなく、この中に存在する一部の細胞が多分化能をもつことが分かってきた(図1-5-1)。当初、この細胞は中胚葉系の細胞に分化することから、間葉系幹細胞と呼ばれるようになった。その後の研究で神経細胞や肝臓の細胞に分化することから、最近では成体幹細胞あるいは体性幹細胞と呼ばれている。

3. 骨髄細胞から心筋細胞へ

私たちが行った研究では、まず10から20匹の生後8週(青年期に相当)のマウスを麻酔した後、両側の大腿骨を切除した。大腿骨の両端を切断すると骨髄細胞を採取できる。採取した骨髄を培養皿にまき、骨髄細胞の初代培養を行った(図1-5-2)。血球系の細胞は培養皿に接着しないので、培養液を交換するだけで取り除くことができる。培養皿に接着した骨髄間質細胞をさらに培養し、長期培養し、細胞株を樹立した。樹立した細胞株にさまざまな分化誘導剤と呼ばれる薬剤を投与し、細胞を観察した。2-3週間くらい培養を続けると、一部の細胞がいろいろな形態を取るようになる。その中で心筋細胞は電気的刺激を与えなくても自律的に拍動することから、容易に見分けることができる。こうした拍動する細胞あるいは拍動する手前の細胞を集めてくれればよいわけである。このようにして単離してきた細胞をわれわれはCMG細胞と名付けた。CMGとは「心筋細胞の素になる」ある

いは「心筋細胞を創る」という意味である。CMG細胞は分化させると毎分120から250回の割合で規則的な自律拍動を示した。

4. 骨髄由来の再生心筋細胞の特徴

このようにして再生させた再生心筋はもとの生体の心筋細胞と比べて、どのような性質の違いを持つのだろうか？。

私たちはまず、その遺伝子発現からみた細胞の性質(表現型という)を解析した。一言に心筋細胞といっても、実はその部位および一生のうちどの段階にいるのか(発生学的位置)により、さまざまな遺伝子発現を取ることが知られている。例えば心臓の収縮に関係するたんぱく質として、 α (アルファ)-アクチンとミオシン重鎖、ミオシン軽鎖などが知られているが、これらは発生学的位置が胎児期であるのか、新生児期であるのか、また心房であるのか心室であるのかなどにより異なる類似遺伝子(アイソフォームという)を発現する。したがって、これらの遺伝子の発現を調べることによって、再生心筋細胞の性質が明らかとなるわけである。CMG細胞を解析してみると、表1-5-1から胎児期の心室の心筋の性質をもつことが明らかとなった。また、心筋細胞では心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)と脳性ナトリウム利尿ペプチドを発現するが、CMG細胞でも発現していた。

表1-5-1 心筋収縮蛋白のアイソフォームから見たCMG細胞の表現型

	心房筋		心室筋			CMG細胞
	胎仔型	成獣型	胎仔型	新生仔型	成獣型	
α -アクチン	skeletal	cardiac	skeletal>cardiac	skeletal	cardiac	skeletal>cardiac
ミオシン重鎖	α 型> β 型	α 型	β 型> α 型	α 型> β 型	α 型	β 型> α 型
ミオシン軽鎖	2a	2a	2v	2v	2v	2v

心筋細胞が刺激をしなくても規則的に拍動するのは、電氣的に興奮するからである。細胞の電氣的興奮の記録を活動電位といい、心筋細胞以外にも神経細胞や骨格筋細胞でも活動電位が記録される。心筋細胞の活動電位は特徴的な形をしており、また心臓の中の部位によってもその形は異なる。活動電位の形を記録することによって、その細胞が心筋細胞の中のどのような部位の心筋なのか明らかになるわけである。

CMG細胞で活動電位を記録してみると、大きく分けて二通りの活動電位が記録された。1つは洞結節型と呼ばれるもの、もう1つは心室筋細胞型と呼ばれるものである。研究当初はいくつかの種類的心筋細胞が得られたのかと考えていたが、活動電位の時間経過を観察すると必ずしもそうではないことが分かってきた。幹細胞から心筋になった当初にはすべてが洞結節細胞型を示したが、時間が経つにつれ心室筋細胞型に変化していくのが観察された。この現象がなぜ起きるのかと考えていたところに、名古屋大学の研究者たちの研究が目にとまった。彼らはマウス胎児の心筋細胞の活動電位の研究をしており、胎児期の

早期の心室細胞はすべて洞結節型の活動電位をとるが、出生時には心室筋型の活動電位を示すというものである。つまり、心室の心筋細胞であっても、分化の早期の時には洞結節型の活動電位を示し、成長に伴って心室筋型の活動電位に次第に変わるというものである。彼らの実験事実をもとに私たちが観察した結果を判断すると、再生心筋細胞も心筋になりたての時には洞結節型を示し、培養皿の中で成熟する過程で心室筋型の活動電位に成熟するのだらうと考えた。

5. 再生心筋の交感・副交感神経刺激に対する反応

心筋細胞は交感神経と副交感神経により巧妙に支配されている臓器である。運動時や緊張時には交感神経が刺激を送り、心拍数の上昇や心臓の収縮力の増強をもたらす。また、長期的には心肥大を引き起こす。これに対し、副交感神経は交感神経に拮抗する形で、安静時に主として作用し、心拍数の低下や心収縮力を弱め、心筋細胞を休める働きをもつ。これを媒介するのは交感神経のアドレナリン受容体と副交感神経のアセチルコリン受容体である。アドレナリン受容体は心肥大のシグナルを伝える α (アルファ) 受容体と心拍数・心収縮力を伝える β (ベータ) 受容体が発現している。CMG細胞では心筋に分化する前から α_1 受容体(α_{1D} 型が主体で非心筋型)を発現していたが、心筋細胞に分化するとともに心筋型(α_{1A} 型が主体で心筋型)に発現様式が変化した。この α_1 受容体を刺激すると再生心筋細胞は心肥大反応を示し、生体の心筋細胞と同様の反応が観察された(表1-5-2)。

表1-5-2 CMG細胞の受容体発現と受容体刺激による効果

受容体の種類	α 受容体			β 受容体		ムスカリン受容体	
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	β_1	β_2	M ₁	M ₂
受容体のサブクラス							
発現時期	最終分化誘導前より(漸増)	最終分化誘導前より(不変)	最終分化誘導前より(漸減)	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より
シグナル伝達の確認	ERK 活性化	ERK 活性化	ERK 活性化	cAMP 上昇	cAMP 上昇	IP ₃ 上昇	IP ₃ 上昇
確認できた作用	肥大作用			心拍数上昇, 心収縮力増強			

また、アドレナリンの心拍数促進作用、心収縮力促進作用を伝える β 受容体は組織により発現が大きく異なることが知られている。 β 受容体は3種類存在するが、このうち心臓では主として約80%が β_1 受容体で占められ、残る20%を β_2 受容体が占めている。とくに β_1 受容体はほぼ心臓にしか発現しない受容体で、心筋細胞の機能にきわめて重要な働きをもつことが知られている。

CMG細胞では心筋細胞の表現型を得る前には β 受容体の発現はみられないが、分化して心筋細胞の性質を持つようになると β_1 、 β_2 受容体の発現がみられるようになった。ま

第一部 再生医療の最前線

た、再生心筋細胞の β 受容体を刺激すると心拍数の上昇、心筋収縮力の増強が観察された。

同様に副交感神経の M_1 , M_2 受容体も発現がみられた。このように再生心筋細胞は生体の心筋細胞の持つ受容体の性質とほぼ同等の反応を示すことが明らかとなった。これらの所見が意味するものは、再生心筋細胞を移植した際に移植した細胞とレシピエント(移植を受ける側)の心筋が、交感神経や副交感神経の刺激を受けた際に協調して反応することを意味するものであり、再生心筋細胞の兼ね備える条件として重要な所見であると考えている。

6. 再生心筋の心臓への移植

再生心筋細胞を臨床応用するためには、この細胞を心臓に移植しなければならない。そして移植した細胞が周囲の心筋細胞と協調して収縮する必要がある。私たちは再生心筋細胞を早速マウスの心臓に移植することを試みた。マウスは体重20-30g程度しかないので、心臓はさらに小さくマッチ棒の頭ほどしかない。この小さな心臓に細胞を移植するのは至難の業であった。私たちはまず、マウスを安定して開胸し移植する方法から開発しなければならなかった。私たちのところではマウスに気管内挿管し、ヒトの麻酔と同じ吸入麻酔を用いて安定した状態を保ち手術を行う方法を用いた。この方法は京都大学の斉藤能彦助教授(現奈良県立医大教授)の研究室から教えてもらった方法である。こうした方法を用いないと手術によるダメージが強すぎてマウスは手術する前に死んでしまう。

さて、前置きはこれくらいにして細胞移植の結果であるが、再生心筋細胞をマウスの心臓に移植するには、細い注射針で左心室の壁に注射する方法を用いた。移植1ヶ月後に心臓を取り出し、解析してみると興味深いことに移植した細胞はレシピエントの心筋細胞の隙間に入り込み、生着していた。これまでに他の研究者により報告された胎児心筋の移植実験や私たちが予備実験で行ったマウスの胎児の心筋細胞の移植と同様に、再生心筋細胞はマウスの心筋細胞の隙間にきちんとはまり込み、周囲の心室筋と並行して配列し、乱れることはなかった。この解析結果を見たとき、「これは再生心筋細胞の細胞移植による心不全治療はヒトでも可能かもしれない」と初めて思った。

7. 心筋再生の今後の道筋

さて、動物実験でうまくいった心筋の再生は、今後どのようなようになっていくのだろうか？。

それはヒトの骨髄から心筋細胞を分化誘導できるかにかかっている。その第一のステップが骨髄から心筋細胞をいかに迅速に取り出し、大量に増やすことができるかがキーとなる。現在、世界中でいくつかの研究グループが、骨髄から幹細胞を取り出す方法を発表している。その方法はさまざまだが、定義している幹細胞の種類は必ずしも同一のものではない。私たちのところでもさまざまな方法を試しているが、どの方法が最良で確実なのか、

まだはっきりと分かっていない。

次に、幹細胞をどのように培養したら心筋細胞になるのかもまだ確定していない。胚性幹細胞から心筋細胞に分化させる方法もまだ確立していないが、骨髄細胞よりは少し進歩しているようである。私たちのところではこれらの方法を組み合わせながら研究を進めている。ここ数年の研究の進み具合からみると、そう遠い先ではない時期にこれらの技術は完成すると思っている。これからが非常に楽しみである。

また、再生心筋細胞をこれまでは注射針で移植していたが、これから先もこの方法が最良とは考えていない。現代は材料工学、医用工学がすさまじい勢いで進んでいる。例えば特殊な培養皿を用いて心筋細胞をシート状にすることや、生体内に入れると緩やかに溶解してしまう高分子材料の上で心筋細胞を培養し、思い通りの形の組織を造ることも可能になっている。これらの医用工学との融合も重要な課題であると考えている。

8. 再生心筋細胞の市場

私たちがなぜ毎日心筋再生の研究を続けているのかをもう一度考え直してみると、究極的には心臓病の患者を救いたいからにほかならない。では、この方法の治療対象となる患者はどのくらいいるのだろうか？

ここでは米国でのデータが参考になる。米国では年間約2000例の心臓移植が行われている。この数字は過去10年ほとんど変わっていない。この数字は心臓移植が必要な症例が2000例だからではなく、ドナーの提供がこの数だからだ。常にドナー不足の状態であり、心臓移植を必要とする症例はその10倍であるとされている。この数字は拡張型心筋症・肥大型心筋症を対象としたもので、心筋梗塞後の心不全を対象とすればその数はさらに10倍、すなわち20万例に達する。人口が米国の半分弱の日本でも同様な計算をすれば10万例が適応になりうる可能性があるだろう。

もちろん、これはあくまでも算盤上のことで、そんなに単純に決まるものでもない。しかし、私が慶應病院の外来で治療している患者の過去20年の変化を見ても、急性心筋梗塞はすさまじい勢いで増加している。心筋梗塞急性期の治療の成績が著しく向上していることにもあり、患者が急性期に亡くなることは大きく減少した。これはよいことには違いないが、結果として慢性期の心不全患者の数を増やすことになっている。こうした慢性期の心不全患者のクオリティ・オブ・ライフ(生活の質)を向上させるにもこうした治療を役立てることができればなによりである。これをビジネスチャンスという目からみたときには、少なく見積もって一例300万円、高く見積もったときに2000万円の経済効果があるとする、どのくらいの額になるだろうか？ 算盤勘定は医薬産業の方に任せるとして、大きな経済効果が上がりそうなことだけは間違ないであろう。

9. 医学研究のあるべき姿

21世紀に日本が進むべき経済戦略を考えたとき、バイオは大きな魅力ある領域である。しかし、これは同時にヒトの命を相手にしたものになるのはいうまでもない。先走りした基礎研究のない実験的治療は厳に慎まなければならない。日本の心臓移植の領域では過去に基礎検討のないまま患者の手術を行い、その後のバッシングのため世界に20年遅れてしまったという苦い経験をもっている。私たちは常に慎重に、しかし確実な進歩を続けるよう研究を行っていきたいと考えている。

(慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師 福田 恵 一)

心血管病の遺伝子治療

慶應義塾大学呼吸循環器内科 八木 崇
 同心臓病先進治療学 福田恵一

概 説

1990年にADA(アデノシンデアミナーゼ)欠損症に対し遺伝子治療が行われて以来、10年余りが経過した。遺伝子治療の現状は当初の期待ほど進んではいないが、現在でもさまざまな研究が行われている。心血管病の遺伝子治療の対象は虚血性心疾患、経皮的冠動脈形成術(PCI)後の再狭窄予防、虚血再灌流傷害の予防、心不全などに分類される。以下にその概説をまとめた。

虚血性心疾患に対する遺伝子治療

虚血性心疾患に対する治療法としては冠動脈バイパス術(CABG)、PCIなどが第一選択となるが、多枝病変や高度びまん性狭窄などの血行再建術が不可能な症例に対し、遺伝子治療が試みられている。遺伝子導入する因子としては、血管内皮由来細胞増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)などが用いられている。遺伝子導入するベクターとしては、当初アデノウイルスが用いられた時期があるが、抗原性のため現在は使用されていない。現在用いられているのは、プラスミド、リポフェクションが主流である。Table 1に示すように進行中のphase IIIの治験もあり、結果が待たれる。研究が先行していたVEGFの遺伝子治療は浮腫などの原因により開発が中止された。しかし本邦で進められているHGFに対しては、多くの期待が寄せられている。

Table 1. 心血管病に対する主な遺伝子治療

国	研究者	対象疾患	遺伝子	phase
Finland	Seppo Yla-Herttuala	peripheral artery disease	LacZ+VEGF	I/II
Finland	Seppo Yla-Herttuala	coronary artery disease	VEGF	I/II
multi country	Christer Sylvén	refractory angina pectoris	VEGF-A165	II/III
Sweden	Christer Sylvén	refractory angina pectoris	VEGF-A165	I/II
USA	Joon S, Lee	coronary artery disease	FGF-4	I/II
USA	Jeffrey M, Isner	peripheral artery disease	VEGF	I/II
USA	Jeffrey M, Isner	coronary artery disease	VEGF	II
USA	Duncan J, Stewart	coronary artery disease	VEGF	II
USA	Brian H, Annex	peripheral artery disease	VEGF+VEGF2-CAD-CI-009	I/II
USA	Jeffrey M, Isner	coronary artery disease	VEGF+VEGF2-CAD-CI-009	II
USA	Ran Kornowski	coronary artery disease	VEGF	II
USA	Sanjay Rajagopalan	ischemic lower limb	VEGF	II
USA	Ami E, Iskandrian	coronary artery disease	FGF	II
USA	Ronald G, Crystal	cardiovascular disease/ coronary artery disease	VEGF	I/II
USA	Cindy L, Grines	cardiovascular disease/ coronary artery disease	FGF	II/III
USA	Patrick McCarthy	cardiovascular disease/ coronary artery disease	VEGF	I/II
USA	Valentin Fuster	stenosis prevention	VEGF+VEGF D	II
USA	Anthony J, Comerota	severe peripheral artery occlusive disease	FGF	II
Japan	Morishita	peripheral artery disease	HGF	I/II

PCI 後再狭窄に対する遺伝子治療

PCI には血管傷害部位の再狭窄という問題点があり、遺伝子治療が行われている。再狭窄は傷害部位の血管内膜に平滑筋が移動・増殖するもので、これにはさまざまな成長因子、細胞周期制御遺伝子が関与している。

細胞周期調節因子サイクリン-CDK 複合体を不活化する細胞周期抑制遺伝子や、細胞増殖に関わる転写因子 E2F の DNA 結合部位に対する“おとり (decoy)”オリゴヌクレオチドを投与することにより、内膜増殖を抑制することができたという報告がある。動物実験では有効な成績が得られているが、ヒトの冠動脈病変に対する治療研究ではまだ結論は出ていない。

虚血再灌流に対する遺伝子治療

急性心筋梗塞発症時の初期治療として現在、再灌流療法は定着している。この治療法では再灌流性不整脈、no reflow 現象などの再灌流障害が臨床上問題となっている。再灌流障害はさまざまな原因により生じるが、その原因の一部に一連のサイトカインなどが活性化される結果生じるとされている。NF- κ B はサイトカインなどの活性化に重要な役割をもつ転写因子であるが、これに対す

る“おとり”オリゴヌクレオチドを導入することにより再灌流障害を軽減することができたという報告がある。

不全心筋に対する遺伝子治療

不全心筋では筋収縮能力の低下に加え、収縮力を増強させるカテコラミン類に対する反応性の低下をきたしている。その機序の一つとして、不全心筋細胞ではアドレナリン β 受容体が down regulation することが知られている。心筋細胞 β 受容体では、細胞内ドメインを β ARK (β -adrenergic receptor kinase) がリン酸化することで受容体の down regulation をきたすことが知られている。この β ARK のカルボキシル末端 (β ARK-ct) は β ARK のアンタゴニストとして作用することが知られている。 β ARK-ct を過剰発現させたマウスでは心収縮力の増強が認められることから、これを臨床応用しようという遺伝子治療の流れがある。 β ARK-ct による遺伝子治療が不全心筋での β 受容体の up regulation と、これに引き続く心機能改善、あるいは長期予後の改善につながるか、さらなる研究が待たれる。

— 文 献 —

- 1) Graham RM et al : Life 54 : 59, 2002
- 2) Khan TA et al : Gene Therapy 10 : 285, 2003