

図2. 心筋細胞再生による心機能改善の模式図

期して収縮することはないが、心筋梗塞後の心室の拡大、心室瘤の形成といったいわゆる心室リモデリングの改善に有効であった。さらに骨格筋の場合、細胞が心筋細胞化するとされ、ある程度心収縮能の改善に有用であったと報告されている<sup>19)</sup>。

心筋細胞の場合、初代培養を行ってある程度の収率で生きた細胞が得られるのは胎仔あるいは新生仔の心筋細胞に限られる。これまでに実験的に行われた心臓に対する心筋細胞移植はすべてラットあるいはウサギの胎仔細胞が用いられてきた<sup>20)</sup>。胎仔心筋細胞を心臓内に移植すると、移植した心筋細胞は心臓の線維化された組織中に生着できること、さらに移植したドナー細胞とホストの心筋細胞が介在板を介した電気的に連結した結合を取りうるということが報告された<sup>21)</sup>。さらに、胎仔心筋細胞の移植は心臓のポンプとしての収縮能、拡張能を改善することが報告され、一気に心筋細胞移植の臨床応用が目玉されるようになった。ヒトの骨髄細胞を冠動脈内に直接注入あるいは心筋に注入することにより心機能が改善したという報告もあるが、これは幹細胞を選別したわけではないので、心筋再生しているという確証はない。血管新生の可能性はあるが、詳細な機序の解明が必要であろう。

心筋再生を利用した治療法は、以下の2つに大別される(図2)。幹細胞を直接壊死した心臓内に注入してその部位で心筋細胞へと分化させる方法と、*in vitro*で幹細胞を心筋細胞に分化させてそれを心臓に注入する方法である。前者は現在実験動物において用いられているが、ヒトを対象とし

て心機能の回復を目指すには相当数の細胞が必要と想像される。また注入した細胞が目標とする心筋細胞へと確実に分化し、元来存在する細胞と同期して収縮するかなどの疑問点が多い。後者の生体外で幹細胞を分化させるほうがハードルを低くできると思われる。この場合ある程度の量として移植を行うので、移植細胞塊の強度や細胞塊内部への血流の確保などの問題点がある。また再生心筋細胞が生着し心機能の改善が得られたとしても、この細胞が新たな致死性不整脈の原因となる可能性もある。このような点を一步一步明らかにしながら、サイエンスとしての心筋再生を進めていくべきであろう。

また再生心筋細胞を臓器として機能させるにはtissue engineering (組織工学) の考え方が不可欠である。再生細胞を培養するスカフォールド(鋳型)の開発、複数の種類の細胞の配列、血管系・神経系の構築など解決すべき課題は多い。

これまでに再生心筋により傷害心筋の機能改善を認めた例として、ES細胞<sup>22)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>23), 24)</sup>、造血幹細胞<sup>25), 26)</sup>、血管内皮前駆細胞<sup>27)</sup>などが報告されている(図3)。残念ながらいずれの報告も移植した細胞の心筋細胞への分化を免疫染色で確認しているのみである。外見上心筋細胞に見える細胞が機能的・電気生理学的に心筋細胞となっているかに関しても今後検証する必要がある。

## おわりに

心筋細胞の再生の材料として、ES細胞と体性幹細胞のど

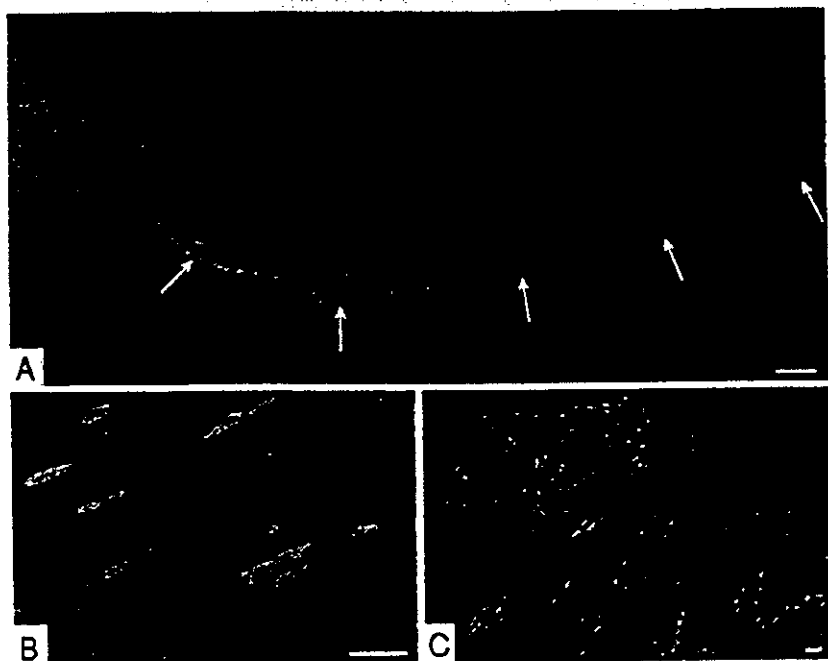


図3. 再生心筋細胞の一例

Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>の骨髄細胞を心筋梗塞領域に注入すると、心筋細胞や血管が再生する。A: 矢印は心筋梗塞後に再生した心筋細胞層を示す。B: 再生心筋細胞の強拡大像。C: 再生した血管。赤: 心筋型ミオシン (A, B),  $\alpha$ 心筋型アクチン (C)、黄緑: PI (propidium iodide) による核染色。

スケールバーは、100  $\mu$ m (A), 10  $\mu$ m (B, C)。Anversa P, et al: Nature (2002) 415: 240-243 より転載。

ちらを選択するかについては、今後さらに検討が行われるであろう。また体性幹細胞より多能性を有し上位に存在すると考えられている multipotent adult progenitor cell も忘れてはならない。

日常臨床で重症心不全患者を救命できない状況を目前にすると、早急に治療法を確立する必要性を痛感させられる。再生心筋細胞を用いた治療が心疾患治療の選択肢の1つとなる日を願ってやまない。

#### - 文献 -

- 1) Anversa P, et al: Circ Res (1998) 83: 1-14
- 2) Kajstura J, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95: 8801-8805
- 3) Beltrami A, et al: N Engl J Med (2001) 344: 1750-1757
- 4) Anversa P, et al: Nature (2002) 415: 240-243
- 5) Tamamori-Adachi M, et al: Circ Res (2003) 92: e12-e19
- 6) Laflamme MA, et al: Circ Res (2002) 90: 634-640
- 7) Deb A, et al: Circulation (2003) 107: 1247-1249
- 8) Kehat I, et al: J Clin Invest (2001) 108: 407-414
- 9) Prockop DJ: Science (1997) 276: 71-74
- 10) Pittenger MF, et al: Science (1999) 284: 143-147
- 11) Barry FP, et al: Biochem Biophys Res Commun (1999) 265: 134-139
- 12) Jackson KA, et al: J Clin Invest (2001) 107: 1395-1402
- 13) Mierliby AM, et al: FEBS Lett (2002) 530: 239-243
- 14) Makino S, et al: J Clin Invest (1999) 103: 697-705
- 15) 福田恵一: 細胞工学 (2000) 19: 420-424
- 16) Hakuno D, et al: Circulation (2002) 105: 380-386
- 17) Dorfman J, et al: J Thorac Cardiovasc Surg (1998) 116: 744-751
- 18) Murry CE, et al: J Clin Invest (1996) 98: 2512-2523
- 19) Taylor DA, et al: Nat Med (1998) 4: 929-933
- 20) Leor J, et al: Circulation (1996) 94: II332-336
- 21) Li RK, et al: Circulation (1997) 96: II179-186
- 22) Min JY, et al: J Appl Physiol (2002) 92: 288-296
- 23) Tomita S, et al: Circulation (1999) 100: II247-256
- 24) Wang JS, et al: J Thorac Cardiovasc Surg 122 (2001): 699-705
- 25) Orlic D, et al: Nature (2001) 410: 701-705
- 26) Wagers AJ, et al: Science (2002) 297: 2256-2259
- 27) Takahashi T, et al: Nat Med (1999) 5: 434-438

#### - for beginners -

- "Stem cells for myocardial regeneration" Orlic D, et al: Circ Res 91, 1092-1102 (2002)
- "Myocyte renewal and ventricular remodelling" Anversa P, et al: Nature 415, 240-243 (2002)

# フローサイトメトリー (FCM)

真鍋知宏 (慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科)  
 福田恵一 (慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学)

フローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) は、単一の細胞の複数の特徴を同時に高速で測定する技術である。細胞表面に発現している分子を利用して、細胞の性質を解析することができる。これを応用して、目的の細胞を生きた状態で採取することも可能である (ソーティング)。当初は血液学、免疫学の分野で利用されていたが、再生医学の進歩とともに、循環器領域においても、幹細胞や前駆細胞を選択するための手法として用いられるようになってきている。

FCMと並列してFACS (fluorescence activated cell sorter) という言葉が使われているが、FACSはBecton Dickinson社の商品名である (Beckman Coulter社の商品名はEPICSという)。

## ● ● ● 原理

FCMのシステムは流路系、光学系、電気系の3つの系から成り立っている (図1)。シース液 (サンプル流を鞘状に包んで流れるリン酸緩衝液) の層流中に細胞を流して、細胞の散乱光と蛍光を検出する。検出された光から細胞の相対的な大きさ、内部構造、細胞膜・細胞質・核内に存在するさまざまな抗原、核酸の量などの情報を得ることができる。細胞にレーザービームを当てると、レーザー光は散乱して、細胞

が蛍光物質で染色されていると蛍光を発する。散乱光と蛍光はレンズにより集光され、光学フィルターを通過し、検出器に入る。その後、電気信号に変換されて解析データが得られる。

散乱光は散乱する方向により前方散乱光 (forward scattered light; FSC) と側方散乱光 (side scattered light; SSC) の2種類に分類される (図2)。前者は細胞の表面積や大きさを表し、後者は細胞の核、顆粒など細胞内部構造を表している。

FCMで用いられる抗体は、蛍光色素で標識したモノクローナル抗体で、用途に合わせて各社がさまざまな製品を出している。よく用いられる蛍光色素にはFITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), PerCP (peridinin chlorophyll protein), Cy5, TR (Texas red), APC (Allophycocyanin) などがある。前4者は488nmの吸収域を、後2者は598nmの吸収域を有している。それぞれの励起波長は図3のとおりである。

ソーティング法には水滴荷電方式とセルキャプチャー方式がある。前者はFACS Ariaなどで採用されている方式で、荷電した水滴に電圧をかけることにより目的の細胞を得る。水滴を+と-に帯電できるので、同時に複数の細胞群をソートできる。後者はFACS Caliburなどで採用されている方式である。レーザー光照射により細胞

情報をキャッチされた水流は一定の時間後、圧電振動子により移動した管により捕集される。水滴荷電方式のように機器の細かい設定が不要ではあるが、回収率が低いことや時間がかかることが欠点である。

## ● ● ● FACSの利用法

### (1) 細胞表面抗原解析

hematological malignancyの診断に利用されている。CD (cluster of differentiation) 抗原により細胞の性質を分類できる。蛍光色素のついたモノクローナル抗体を用いて、特定のCD抗原が発現しているかがわかる。

### (2) 細胞周期


propidium iodide (PI) はDNA二重鎖に架橋結合する色素である。したがって蛍光強度がDNA量を反映しており、G0/G1, S, G2/M期の3つに分類される。PIは固定した細胞に用いる際には単にDNA量を判定するものであるが、生細胞を用いる際には細胞膜を通過しないので、死細胞を選別することが可能となる。

### (3) 稀有な細胞の単離

複数の蛍光色素抗体で標識した細胞から、目的の抗原陽性、あるいは陰性の細胞だけ選択する (ソーティング)。



矢印は488nmのアルゴンレーザーの波長、598nmのdyeレーザーの波長を示す。FITC、PE、CyChrome、PerCPは488nmの吸収域を有し、TR、APCは598nmの吸収域をもつ。

 まとめ

- 1) FACSCalibur Training Manual: Becton Dickinson, 2000.
- 2) 中内啓光監修：フローサイトメトリー自由自在。秀潤社、東京、1999。

# 心筋再生研究の現状

真鍋 知宏・福田 恵一\*

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科  
慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師\*

## はじめに

心臓は再生しない臓器と考えられていたが、日進月歩の再生医学研究により、心筋細胞は再生可能であることが示されている。胚性幹細胞や骨髄体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が現実のものとなり、再生心筋細胞移植を利用した心機能の改善に関する報告もある。また幹細胞を壊死した心筋梗塞領域周辺に注入すると、心筋細胞へと分化しうることも報告されている。いまだ実験動物段階ではあるものの、再生心筋細胞を利用した心不全治療への試みも開始されている。近年心臓内にも心臓幹細胞のようなSP細胞(side population cell)の存在に関する報告も出されている。これらを用いた心筋再生による心機能の改善も報告され、心臓領域における再生医学は、臨床応用に向けて着実に前進している。

本稿ではいくつかの心筋細胞再生方法を述べ、これらの心機能回復への応用法や問題点を概説する。

## 心筋細胞再生に関する最近の知見

心筋細胞は胎生期には細胞分裂を

行うが、生後まもなく最終分化して細胞増殖を停止するものと考えられてきた。一方で頻度は低いものの、心筋梗塞巣周囲のごく一部の心筋細胞が細胞分裂することが報告されており、既存の概念に対する再検討が必要となってきた<sup>1,2)</sup>。この分裂像様の形態を示す細胞の起源は明確になっていないが、これのみで生理学的に心機能の代償を期待することはできない。In vitroの実験ではあるが、細胞周期調節蛋白の1つであるcyclin D1やサイクリン依存性キナーゼCDK4を制御することにより、最終分化した心筋細胞を細胞分裂させたという報告があり<sup>3)</sup>、今後の発展が期待される。

心臓移植後の症例検討から興味深い報告がなされている<sup>4)</sup>。女性ドナーから男性レシピエントに移植された心臓内に、Y染色体を有する心筋細胞が認められたというものである。このY染色体を有する心筋細胞は心臓以外の部位から幹細胞あるいは前駆細胞のような形で心臓に到達したと推測されている。ヒトの骨髄移植患者4例を検討した最近の報告<sup>5)</sup>ではその由来を骨髄としているが、今後詳細な検討が必要である。

心筋細胞の再生には幹細胞を用い

る方法以外に、非心筋細胞を心筋細胞に形質転換させる方法も以前から検討されていた。骨格筋のマスター遺伝子であるmyoDと同様な“心臓版myoD”遺伝子の単離が試みられた。しかしmyoDのように単一遺伝子で他の細胞を心筋細胞に形質転換しうる遺伝子は現在のところ同定されていない。その過程において心臓特異的に発現される転写因子として、Nkx2.5, GATA4, dHAND, eHAND, HRTなどがクローニングされてきた。現在も“心臓版myoD”をクローニングする研究は継続されている。

以上のような取り組みは精力的になされているものの、近年最も注目されているのは、幹細胞を利用した心筋細胞再生であろう。幹細胞はES細胞(embryonic stem cell)と体性幹細胞に大別される。これら2種類を用いた心筋細胞再生の現状を紹介する。

## 胚性幹細胞を用いた心筋再生

ES細胞は受精直後の早期胚(胚盤胞の内部細胞塊)から取り出された細胞である。そして、すべての臓

器・組織に分化しうる多分化能を有している。またES細胞を*in vitro*で大量に増殖させることが可能となっており、多分化能を維持しながら培養する技術も確立している。現在、ES細胞を用いて血液、血管内皮、神経、心筋、インスリン分泌細胞などの再生が行われている。ES細胞を培養条件下で未分化状態を維持するには、マウスではLIF(白血球抑制因子)を培養液に入れておくだけでよいが、ヒトES細胞ではLIFに依存せず、マウス胎児フィーダー細胞との共培養が必要となる。ES細胞を心筋細胞に分化させるにはLIFを除去し、細胞を凝集塊(胚様体)にして培養すると一部の細胞が心筋細胞となり、拍動を開始する。ヒトES細胞から心筋細胞が分化できるとの報告がすでになされている<sup>9)</sup>。

ES細胞を用いた再生にはいくつかの問題点がある。第1にES細胞は第3者の細胞であるため、移植後に免疫抑制剤の投与を必要とすることである。第2に、ES細胞から分化させた細胞を実際に移植する際に、未分化状態の細胞が混入すると奇形腫を形成してしまう点である。第3に、発生段階の早期に分化してくる細胞は得やすいが、発生後期に出現する細胞を得るのは難しいことである。問題点はあるものの、国内においてもヒトのES細胞作製が成功しており、さらなる発展が期待される。

## 体性幹細胞を用いた心筋再生

近年の研究により、これまで再生能力がないと考えられていた神経や心筋細胞にも生体内にある程度の幹細胞が存在することが明らかにされた。中胚葉由来の臓器では幹細胞は骨髓に存在すると考えられている<sup>9)</sup>。骨髓は元来造血の場であり、そこには造血幹細胞を頂点とした血球系細胞の増殖分化が営まれている。しかし、骨髓には骨髓間質細胞や造血支持細胞と呼ばれる血球系以外の細胞も存在する。骨髓間質細胞は多彩なサイトカインや細胞増殖因子を分泌し、血球系細胞の再生増殖分化を維持しており、その一部が骨や軟骨にも分化しうることは以前より知られていた。現在は骨髓間質細胞すべてが多分化能をもつのではなく、これらに含有される間葉系幹細胞と呼ばれる一部の細胞が多分化能を有することが知られ、中胚葉由来の多くの細胞の幹細胞となりうると考えられている。

間葉系幹細胞は骨髓中にわずかに存在する細胞で、ヒト新生児骨髓中の細胞の10000個に1個が間葉系幹細胞であり、その頻度は出生後急速に減少し高齢者では新生児の200分の1程度に減少する。従来、間葉系幹細胞の同定は骨髓間質細胞に種々の方法により分化誘導を行い、他の細胞に分化すればretrospectiveに間葉系幹細胞が含有されていたのであろうとされてきた。間葉系幹細胞の同定は、現在ではある程度表面抗原が同定されてきたが、報告者により

異なっており<sup>10)11)</sup>、さらなる研究が必要とされる。

## 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

われわれは骨髓間葉系幹細胞が中胚葉のさまざまな臓器の細胞に分化することより、同じ中胚葉由来の心筋細胞にも分化するのではないかと考え、間葉系幹細胞に各種の分化誘導剤を投与する実験を施行した。その結果、自己拍動を開始する心筋細胞に分化しうることを明らかにした<sup>12)</sup>。マウス骨髓初代培養を行い、付着系の細胞である骨髓間質細胞を分離した。分離した骨髓間質細胞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脱メチル化剤である5-azacytidineを負荷し、さらに2週間程度培養を続けると非常に少ない確率ではあるが、自己拍動する細胞が得られる。この周囲の細胞を採取して同様の操作をくり返した。自己拍動を開始した細胞自体は継代不可能であるが心筋芽細胞と考えられる細胞は分裂、増殖をくり返すことができる。自己拍動する割合の高いクローンを最終的にCMG(cardiomyogenesisより命名)細胞株として樹立した。CMG細胞は5-azacytidineにより最終的に分化誘導を行うと心筋細胞の表現型を獲得するが、最終分化誘導後に自己拍動を開始する比率は約30%であった。CMG細胞は培養条件下において毎分120~250回程度の速さで規則的に収縮した。電顕では典型的な横紋構造に加え心房顆粒を多数認め

表1 心筋収縮蛋白のアイソフォームからみた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	
$\alpha$ -アクチン	skeletal	cardiac	skeletal>cardiac	skeletal	cardiac	skeletal>cardiac
ミオシン重鎖	$\alpha$ 型> $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型> $\alpha$ 型	$\alpha$ 型> $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型> $\alpha$ 型
ミオシン軽鎖	2a	2a	2v	2v	2v	2v

た。心筋細胞に分化したCMG細胞の収縮蛋白( $\alpha$ -アクチン, ミオシン重鎖, ミオシン軽鎖)のアイソフォームを表1に示す。心筋細胞は胎仔期, 新生仔期, 成獣期および心房, 心室で異なる収縮蛋白のアイソフォームを示すが, CMG細胞のアイソフォームを解析すると胎仔型心室筋に一致した表現型を取ることが明らかとなった。

ガラス微小電極によりCMG細胞の活動電位を記録すると洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類が観察された(図1)。両者に共通した活動電位の特徴は, ①活動電位持続時間が長いこと, ②比較的浅い静止期電位をもつこと, ③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また, 心室筋細胞型では活動電位はpeak & dome型を呈した。分化誘導後早期(2~3週後)にはすべての細胞で洞結節型が記録されたが, 分化誘導後後期(4週後)には心室筋細胞型が観察され, 次第に増加した。

CMG細胞の心筋細胞としての表現型を解析するため, 心筋細胞特異的蛋白質の発現を調べた。CMG細胞では心房利尿ホルモンANPおよびBNPを発現していた。心筋分化に関与する転写因子としてNkx2.5,

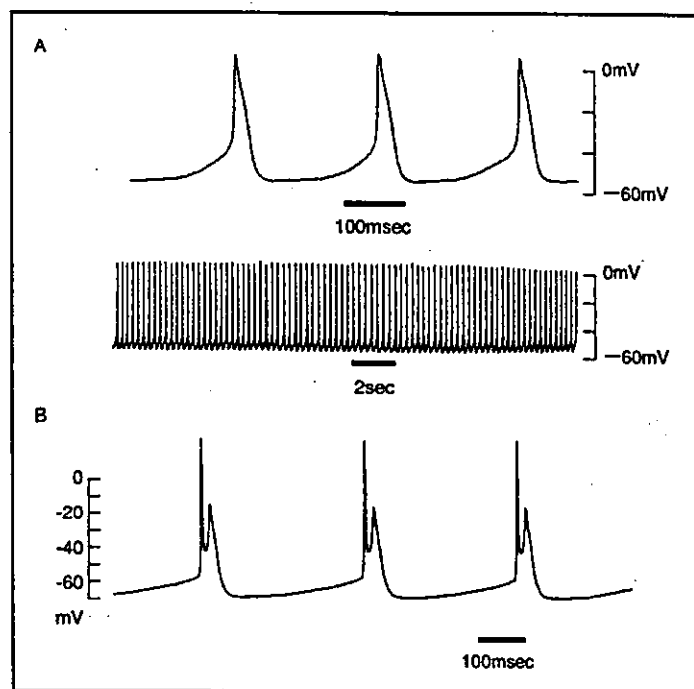


図1 骨髄由来心筋の活動電位  
A: 洞結節型, B: 心室筋細胞型

GATA4, TEF-1, eHAND, HRTなどが発現していた。MEF2 familyではMEF2A, MEF2C, MEF2Dの発現が観察された。しかし, その発現時期は3者で異なり, MEF2Cは分化誘導前で発現が認められたが, MEF2A, MEF2Dは分化誘導後に発現していた(図2)。

生体内の心筋細胞はカテコラミン $\alpha_1$ 受容体,  $\beta$ 受容体, アセチルコリンのムスカリン受容体が発現し, 心

拍数や心収縮力, 興奮伝導速度などの調節を行っている。CMG細胞では $\alpha_1$ 受容体の3つのサブクラス( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ )を発現し,  $\alpha_1$ 刺激薬フェニレフリンで刺激すると, シグナルの活性化と細胞肥大が観察された<sup>13)</sup>。一方,  $\beta$ 受容体は $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ともに発現し,  $\beta$ 刺激薬イソプロテレンールで刺激するとセカンドメッセンジャーのcAMPの上昇と拍動数の増加, 収縮速度・収縮距離の増加が観察さ

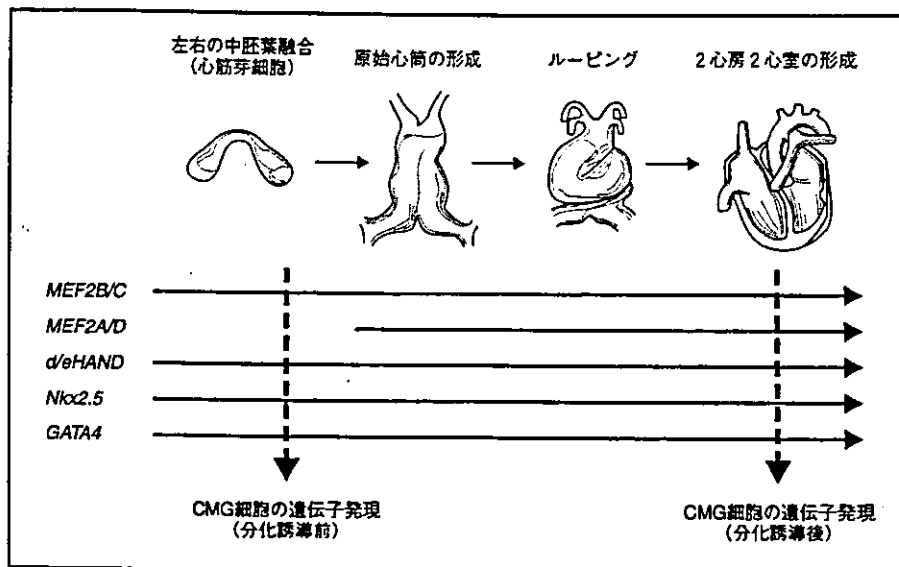


図2  
心筋細胞の分化過程における転写因子の発現とCMG細胞の関係  
前外側板中胚葉から心筋前駆細胞に分化した状態では、*Nkx2.5*、*GATA4*、*TEF-1*、*HAND*遺伝子などの心筋分化に必要な転写因子は発現している。CMG細胞も心筋分化に必要な遺伝子は最終分化誘導前にすでに発現していることがわかる。

表2 CMG細胞の受容体発現と受容体刺激薬による効果

受容体の種類	受容体のサブクラス	発現時期	シグナル伝達の確認	確認できた作用
$\alpha$ 受容体	$\alpha_{1A}$	最終分化誘導前より(漸増)	ERK活性化	細胞肥大
	$\alpha_{1B}$	最終分化誘導前より(不変)	ERK活性化	
	$\alpha_{1D}$	最終分化誘導前より(漸増)	ERK活性化	
$\beta$ 受容体	$\beta_1$	最終分化誘導後1週より	cAMP上昇	拍動数上昇、収縮力増強
	$\beta_2$	最終分化誘導後1週より	cAMP上昇	
ムスカリン受容体	M <sub>1</sub>	最終分化誘導後1週より	IP <sub>3</sub> 上昇	
	M <sub>2</sub>	最終分化誘導後1週より	IP <sub>3</sub> 上昇	

れた。ムスカリン受容体はM<sub>1</sub>～M<sub>5</sub>まで5種類あることが知られているが、CMG細胞では本来の心筋細胞と同様にM<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>の発現が認められ、ムスカリン受容体刺激薬カルバコールで刺激するとセカンドメッセンジャーのIP<sub>3</sub>が増加した(表2)。これらの性質はCMG細胞が心筋としての特徴をほぼ有していることを意味している。

### 再生心筋細胞を利用した心不全治療の試み

心筋再生を利用した治療法は、幹細胞を直接壊死した心臓内に注入してその部位で心筋細胞へと分化させる方法と、*in vitro*で幹細胞を心筋細胞に分化させてそれを心臓に注入する方法の2つに大別される(図3)。前者は現在実験動物において用いられているが、ヒトを対象として心機能の回復を目指すには相当数の細胞

が必要と想像される。また注入した細胞が目標とする心筋細胞へと確実に分化し、元来存在する細胞と同期して収縮するかなどの疑問点が多い。後者の生体外で幹細胞を分化させる方がハードルを低くできると思われる。この場合ある程度のmassとして移植を行うので、移植細胞塊の強度や細胞塊内部への血流の確保などの問題点がある。また再生心筋細胞が生着し心機能の改善が得られたとしても、この細胞が新たな致死



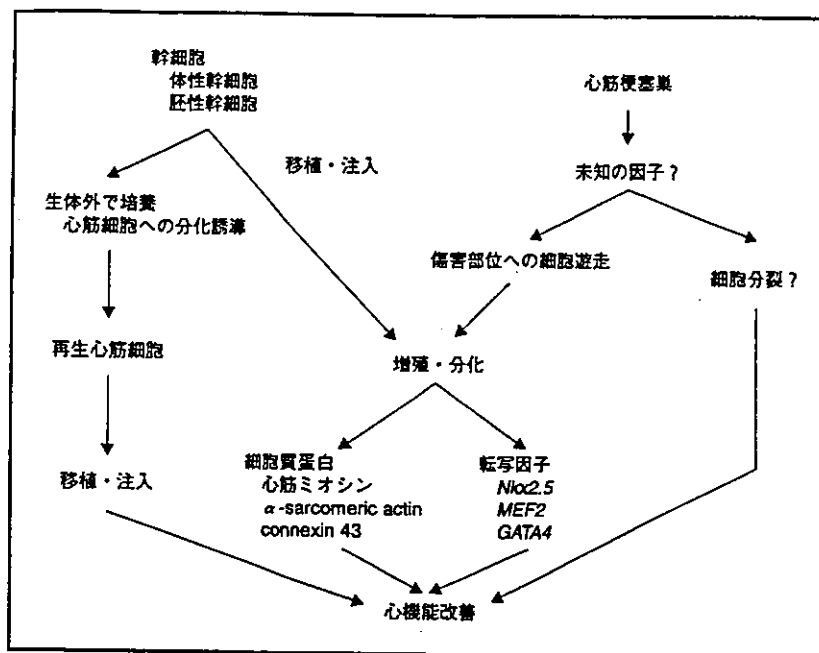


図3 心筋細胞再生による心機能改善の模式図

性不整脈の原因となる可能性もある。これらの問題点を1つ1つ検討しながら、克服していくことにより、臨床応用への道が開けるとと思われる。

また再生心筋細胞を臓器として機能させるにはtissue engineering(組織工学)の考え方が不可欠である。再生細胞を培養するスカフォールド(鋳型)の開発、複数の種類の細胞の配列、血管系・神経系の構築など解決すべき課題は多い。

これまでに再生心筋により傷害心筋の機能改善を認めた例として、ES細胞<sup>14)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>15)16)</sup>、造血幹細胞<sup>17)18)</sup>、血管内皮前駆細胞<sup>19)</sup>などが報告されている。残念ながらいずれの報告も移植した細胞の心筋細胞への分化を免疫染色で確認しているのみである。外見上心筋細胞に見える細胞が機能的・電気生理学的

に心筋細胞となっているかに関しても今後検証する必要がある。

## おわりに

心筋細胞の再生の材料として、胚性幹細胞と体性幹細胞のどちらを選択するかについては、今後さらに検討が行われるであろう。また体性幹細胞より多能性を有し上位に存在すると考えられているmultipotent adult progenitor cellも忘れてはならない。

日常臨床で重症心不全患者を救命できない状況を目前にすると、早急に治療法を確立する必要性を痛感させられる。再生心筋細胞を用いた治療が心疾患治療の選択肢の1つとなる日を願ってやまない。

## 文献

- 1) Anversa P, Kajstura J: Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83: 1-14, 1998
- 2) Kajstura J, Leri A, Finato N, et al: Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8801-8805, 1998
- 3) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344: 1750-1757, 2001
- 4) Anversa P, Nadal-Ginard B: Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415: 240-243, 2002
- 5) Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchankij P, et al: Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res* 92: e12-e19, 2003
- 6) Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al: Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 90: 634-640, 2002
- 7) Deb A, Wang S, Skelding KA, et al: Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart; a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107: 1247-1249, 2003
- 8) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108: 407-414, 2001
- 9) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997
- 10) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem

- cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 11) Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al : The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* **265** : 134-139, 1999
- 12) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103** : 697-705, 1999
- 13) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al : Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* **105** : 380-386, 2002
- 14) Min JY, Yang Y, Converso KL, et al : Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* **92** : 288-296, 2002
- 15) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* **100** : II 247-256, 1999
- 16) Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al : The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration ; pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* **122** : 699-705, 2001
- 17) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410** : 701-705, 2001
- 18) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al : Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* **297** : 2256-2259, 2002
- 19) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al : Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* **5** : 434-438, 1999

## 骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋再生の現状と展望

Present and future prospect of cardiomyocyte regeneration using bone marrow mesenchymal stem cells

福田恵一 (慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学教室)

Keiichi Fukuda

○1999年に著者らが骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞が誘導できると報告して以来<sup>1)</sup>,多くの研究がなされ現在に至っている。その後、いくつかの研究室でも同様に心筋細胞が得られることが確認された。骨髄細胞が自己の細胞であり、骨髄移植などの経験もあったことから、その後、臨床例も含めて骨髄細胞を直接あるいは骨髄単核球成分にした後に心筋内に注入する方法も行われている<sup>2,3)</sup>。しかし、いかなる方法が患者に有用であるか、科学的にもっとも優れているかを検証しながら基礎研究、臨床研究を進めていかねばならない。本稿では、骨髄細胞を用いた心筋再生の現状を述べることにする。



骨髄間葉系幹細胞, SP 細胞分画, 骨髄単核球

### 臓器移植患者における心臓の解析

女性ドナーより心臓移植を受けた男性患者が別の原因で死亡した症例で心臓を解析したところ、心筋細胞に Y 染色体を有する細胞が存在することが報告され、実際に生体でも骨髄由来の細胞が心筋細胞にも分化するのではないかと考えられるに至った<sup>4)</sup>。著者らも、GFP トランスジェニックマウスの骨髄を、致死量の放射線を照射した C57/BL6 マウスに骨髄移植をし、心筋梗塞を作製したモデルで解析した結果、心筋梗塞中心部および心筋梗塞境界領域に GFP 陽性の心筋細胞が観察された(図 1)。これらの結果は骨髄細胞の一部が心筋細胞に分化することを示している。それではいかなる細胞がいかなる条件で心筋細胞に分化するのであろうか。

その後の研究で、胚性幹細胞と骨髄細胞を共培養すると、まれな頻度ではあるが、細胞融合することを報告している<sup>5)</sup>。すなわち、染色体が 4 倍体の細胞が出現するというものである。細胞融合の存在は研究者に幹細胞が本当に分化するのか、それともみかけだけの分化をするのか、大きな波

紋を投げかけた。実際に特殊な肝細胞障害マウスモデルでは生体内での細胞融合が確認された例も存在する<sup>6)</sup>。しかし、細胞融合の頻度はそれほど多いものではないことも判明し、幹細胞研究の方向はさらに進むこととなった。

造血幹細胞を単離する方法として、Hoechst33342 という DNA 結合色素を用いる方法が開発され、SP 細胞分画とよばれる分画が盛んに利用されるようになった<sup>7)</sup>。SP 細胞分画(図 2)は骨髄細胞のみならず、多くの組織中にも存在し、幹細胞単離の方法として注目されるに至った。しかし、SP 細胞分画は *in vivo* では細胞増殖するが、*in vitro* では細胞増殖しない(しにくい)こともあり、完全な解明にはなお時間を要する。骨格筋細胞中の SP 細胞を用いて細胞移植を行うと、骨髄が完全に再構築できたとの報告があり、組織幹細胞が血液幹細胞になるのではないかと報告され<sup>8)</sup>、一時話題をさらったが、その後の研究で骨格筋中の SP 細胞は骨髄からきた細胞の混入であることが報告され<sup>9)</sup>、細胞の可塑性は慎重に判断されなければならないことがわかった。

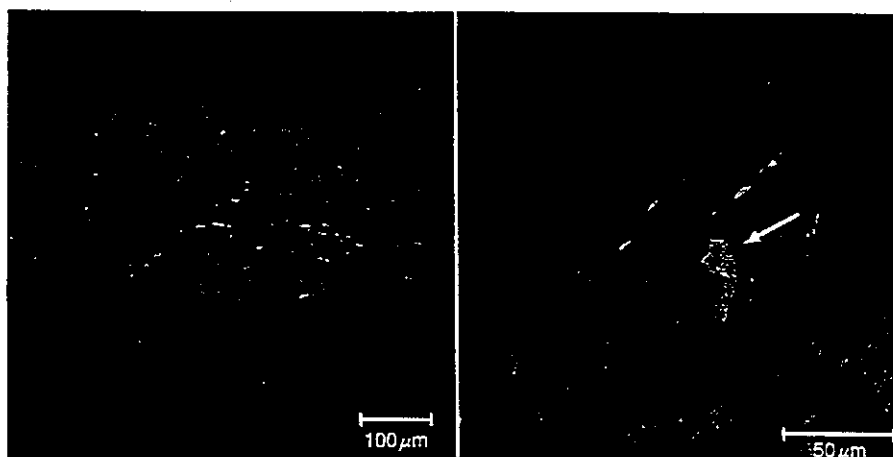


図 1

GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を健康マウスに骨髄移植し、心筋梗塞を作製した。左は心筋梗塞作製部、右は梗塞部の核大像を示す。赤はアクチニン、緑は GFP、青は TOTO3 染色で核を示す。矢印は、GFP 陽性、アクチニン陽性の再生心筋を示す。

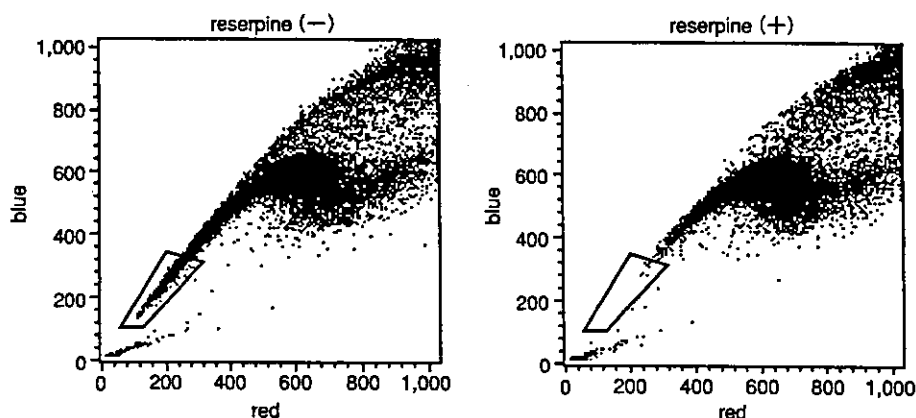


図 2 SP 細胞分画

骨髄や各種組織を Hoechst33342 dye で染色し、blue と red の 2 波長で展開させた FACS 解析を示した。四角で囲んだ領域が SP 細胞分画である。SP 細胞分画はレセルピン投与で完全に消失する特徴がある。

GFP 陽性細胞の骨髄移植の研究から、造血幹細胞の可塑性が一時期強調された時期があった。すなわち、血液幹細胞がすべての細胞になりうるのではないかというものである。血液学者の Weissman らは、GFP 陽性の 1 個の造血幹細胞(少数の分化した細胞とともに)を別のマウスに骨髄移植した実験を行った<sup>10)</sup>。全身の臓器をくまなく検索し、GFP 陽性の細胞は小脳細胞などのごく一部の臓器で観察されたのみであることを報告した。しかし、彼らの報告は心筋梗塞などの障害のないモデルでの研究であり、組織障害モデルでの研究が

求められる。著者らを含めて組織障害モデルでの研究は現在進行中である。

### 骨髄間葉系幹細胞研究の現状

骨髄間葉系幹細胞は骨髄中に存在するまれな細胞群で、*in vitro* でも骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などに分化する。骨髄の細胞のうち培養皿に接着するものすべてが間葉系幹細胞と考えられている方がいるが、これはよくなされる誤解である。骨髄細胞中で培養皿に接着するもののうち、その多くはマクロファージ

表 1 再生医学の材料としての ES 細胞と成体幹細胞の比較

	ES 細胞	成体幹細胞
細胞の単離, 樹立	すでに確立した方法がある。 一度樹立すれば多くの症例で使用可能	単離法はまだ未確立。 個々の症例で樹立する必要あり
細胞分裂能	無限に増殖すると考えられる	70 継代は可能とされるが, 無限かどうかは不明
分化誘導法	胚様体をつくる方法がすでに確立しているが, 効率が悪い 特異的な方法はまだ確立していない	特異的な方法はまだ確立していない
腫瘍形成	可能性あり	可能性はない, あるいは低い
拒絶反応	あり	なし
免疫抑制剤の使用	必要	不要
ドナー	ドナーは必要であるが, 一度 ES 細胞を樹立すればその後は必要ない	ドナーは不要であるが, 本人の骨髄から採取する必要あり
倫理的問題	慎重な検討が必要	なし
大量生産化	可能, 比較的安価	労力と費用がかかる
コメント	工業生産化に向いているが, オーダーメイドの細胞をつくることはできない	オーダーメイドの心筋細胞がくれるが, 時間と経費はかなりのかかると予想される

間葉系幹細胞の特徴を ES 細胞との比較により示した。

と骨髄間質細胞である。骨髄間質細胞は造血系細胞のニッチ(局所環境)をつくる細胞であり, 骨髄間質細胞すべてが多分化能をもつわけではない。間葉系幹細胞はこの分画に含まれるごく少数の細胞で表面抗原などもまったく異なるものである。

骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞の性質に関しては本誌の既刊<sup>11)</sup>にも述べているので, 詳細は省略するが, 概略すれば, 胎児期の心室筋型の表現型をとる。また, 交感神経, 副交感神経の受容体を有し, リガンド刺激にも *in vivo* の心筋と同様の動態をとる<sup>12)</sup>。胚性幹細胞から胚葉体形成を経て心筋細胞が分化することは知られているが, その機序は解明されていない(表 1)。これと同様に, 間葉系幹細胞から心筋細胞への分化の機序は現在解明されていない。著者の考えでは, この細胞は初期設定では骨, 軟骨, 脂肪細胞などに分化するようにプログラムされており, 特殊な状況下において心筋細胞への分化のスイッチがオンになるものと考えている。このため, 間葉系幹細胞から骨, 軟骨, 脂肪細胞などへは, 既知の液性因子, 細胞外基質などで容易に分化が可能であるし, ま

た長期に継代培養しているだけでこのような細胞が出現してくる。培養心筋細胞上で(間葉系幹細胞ではない)骨髄間質細胞を重層培養した研究で, これらが心筋細胞に分化したと報告されている。しかし, その後の研究で HUVEC 細胞や骨格筋芽細胞などの細胞と心筋細胞を共培養すると, 細胞融合するとの報告があり, 骨髄間質細胞を用いた場合には細胞融合か細胞の重なりを観察したものと考えられる。著者自身は心筋細胞と間葉系幹細胞の共培養では一部の細胞は心筋細胞に分化する可能性があると考えている。

今後は, 心筋細胞との共培養の何の因子(細胞増殖因子・接着分子など)が重要であるかを解明する必要がある。著者の最大の興味のひとつはこの間葉系幹細胞から分化因子の同定にある。また, 間葉系幹細胞は大きな塊で移植すると骨や軟骨になることが知られており, 心筋内に単なる細胞塊を注射しただけでは再生医学とはいえないであろう。

骨髄間葉系幹細胞の研究はマウスにおいて比較的発展しているが, ヒトの細胞での研究はあまり進んでこなかった。これはヒトの間葉系幹細胞を

細胞株化することがあまり進んでいないことに起因している。すなわち、継代培養しているうちに細胞が老化し、細胞分裂しなくなるためである。これらを克服するための研究も必要である。

### 骨髄単核球成分の心筋内注入はいかなる意味があるか

循環器領域では国内外を問わず、冠動脈内・心筋内腔からカテーテルを用いて・あるいは手術時に心筋内に注射することにより骨髄単核球成分を移植している。この治療法自体は著者は血管新生の効果があると推測している。骨髄血をFACS解析すると、その成分は赤血球系の細胞と白血球系の細胞を合わせて、99.9%の細胞が血球系の細胞である。このうち、セルセパレーターで回収される骨髄単核球成分はそのほとんどが中等度に分化した血球系の細胞であり、間葉系細胞は全骨髄中よりは多いが、基本的にはごくわずかな比率であろう。未分化な血球成分は血管新生因子を多量に含有しているので、血管新生の可能性はあるであろう。未分化な造血幹細胞あるいはそれに近い成分は骨髄中のニッチェが必要なため、心筋局所に長期にとどまる可能性は低いものと推測される。実際に骨髄移植をした際にドナー細胞はそのほとんどが骨髄にホーミングしてしまい、局所にはとどまらない。著者の考えでは、局所に注入した少量の間葉系幹細胞がかりに心筋になったとしても、それ自体が心機能を改善するほどのものではないと推測している。もちろん、血流改善に伴う冬眠心筋を活性化し、心機能を二次的に改善することを否定するものではない。したがって、血流改善と心筋再生は一体のものなければならない。心筋再生が全体的に重要である症例では、この方法のみで心機能の回復は難しいものと考えられる。

### 今後心筋再生研究に求められるもの

著者が考える間葉系幹細胞を用いた心筋再生に関しもっとも重要なものは、第1に短時間で全骨髄から間葉系幹細胞を単離する方法の開発、第2に多分化能を喪失させることなく長期間培養する方法の確立、第3に生体内にある物質あるいは人

体に無害な物質により心筋細胞に分化させる方法を確立することである。カテーテルや手術で骨髄を心臓に直接注入する方法は派手であり、人目を引く研究であるが、間葉系幹細胞を用いた心筋再生は地味で時間のかかる研究である。しかし、著者はこれらの研究こそ21世紀をブレイクスルーできる重要な研究であると考えている。近年、再生医学を志す多くの研究者が増えたことは喜ばしいことである反面、こうした地道な研究を行う研究者はそれほど増えていない。地に足のついた基礎研究を行う若い研究者が増えることを願ってやまない。

### 文献

- 1) Makino, S. et al.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 103: 697-705, 1999.
- 2) Strauer, B. E. et al.: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 106: 1913-1918, 2002.
- 3) Thompson, C. A. et al.: Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41(11): 1964-1971, 2003.
- 4) Bianchi, D. W. et al.: Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.*, 346: 1410-1412, 2002.
- 5) Terada, N. et al.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-545, 2002.
- 6) Vassilopoulos, G. et al.: Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422: 901-904, 2003.
- 7) Goodell, M. A. et al.: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 183: 1797-1806, 1996.
- 8) Jackson, K. A. et al.: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 14482-14486, 1999.
- 9) Kawada, H. et al.: Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood*, 98: 2008-2013, 2001.
- 10) Wagers, A. J. et al.: Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 297(5590): 2256-2259, 2002.
- 11) 福田恵一: 再生医学と組織工学——現状と今後の課題。医学のあゆみ, 196: 321-326, 2001.
- 12) Hakuno, D. et al.: Bone marrow-derived cardiomyocytes expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, 105: 380-386, 2002.

# Powerful and Controllable Angiogenesis by Using Gene-Modified Cells Expressing Human Hepatocyte Growth Factor and Thymidine Kinase

Yasuyo Hisaka, MS,\* Masaki Ieda, MD,† Toshikazu Nakamura, PhD,‡ Ken-ichiro Kosai, MD, PhD,§ Satoshi Ogawa, MD, PhD,† Keiichi Fukuda, MD, PhD\*†

Tokyo, Osaka, and Fukuoka, Japan

<b>OBJECTIVES</b>	This study investigated the possibility of achieving angiogenesis by using gene-modified cells as a vector.
<b>BACKGROUND</b>	Although gene therapy for peripheral circulation disorders has been studied intensively, the plasmid or viral vectors have been associated with several disadvantages, including unreliable transfection and uncontrollable gene expression.
<b>METHODS</b>	Human hepatocyte growth factor (hHGF) and thymidine kinase (TK) expression plasmids were serially transfected into NIH3T3 cells, and permanent transfectants were selected (NIH3T3 + hHGF + TK). Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in BALB/c nude mice, and cells were transplanted into the thigh muscles. All effects were assessed at four weeks.
<b>RESULTS</b>	The messenger ribonucleic acid expression and protein production of hHGF were confirmed. Assay of growth inhibition by ganciclovir revealed that the 50% (median) inhibitory concentration of NIH3T3 + hHGF + TK was 1,000 times lower than that of NIH3T3 + hHGF. The NIH3T3 + hHGF + TK group had a higher laser Doppler blood perfusion index, higher microvessel density, wider microvessel diameter, and lower rate of hindlimb necrosis, as compared with the plasmid- and adenovirus-mediated hHGF transfection groups or the NIH3T3 group. The newly developed microvessels were accompanied by smooth muscle cells, as well as endothelial cells, indicating that they were on the arteriolar or venular level. Laser Doppler monitoring showed that the rate of blood perfusion could be controlled by oral administration of ganciclovir. The transplanted cells completely disappeared in response to ganciclovir administration for four weeks.
<b>CONCLUSIONS</b>	Gene-modified cell transplantation therapy induced strong angiogenesis and collateral vessel formation that could be controlled externally with ganciclovir. (J Am Coll Cardiol 2004;43:1915-22) © 2004 by the American College of Cardiology Foundation

Growth factors isolated recently, including vascular endothelial cell growth factor, fibroblast growth factor, angiopoietin, and hepatocyte growth factor (HGF), have been found to induce strong angiogenesis (1-5). A number of studies have reported induction of angiogenesis and collateral vessel formation by gene therapy with these factors in both animal experiments and clinical trials. Plasmid or viral vectors have been used in these therapies (2,6,7), but the adenovirus vector entails some serious problems, such as allergic reactions or difficulty with repeated treatment, despite sufficiently high transfection efficiency. Moreover, although plasmid vectors have recently been used in clinical settings, have not been associated with allergic reactions, and could be used repeatedly, their transfection efficiency

has been low and has varied with the tissues injected or the patient. These gene delivery methods have the common drawbacks of not being able to choose the target cells and to selectively eliminate the transfected cells once they acquire the character of abnormal growth. Thus, new methods that would provide ideal gene delivery systems have long been awaited.

Regeneration therapy has recently been performed in many tissues and organs. Various types of cells regenerate from embryonic or adult stem cells, and these cells would be transplanted into patients. Rapid and sufficient establishment of angiogenesis and collateral vessel formation to promote the survival and function of the transplanted cells are especially important in terms of blood supply. We investigated regeneration of cardiomyocytes from adult stem cells and concluded that blood vessel formation into transplanted cells is crucial to their survival (8). Because angiogenic gene therapy with plasmid vectors has been insufficient to induce the rapid and powerful angiogenesis required for transplantation of the regenerated cells, a new method has been needed to address this problem.

In the present study, NIH3T3 cells were permanently transfected with a novel angiogenic human HGF (hHGF) and thymidine kinase (TK) of herpes simplex gene and then used as a gene therapy vector. Their effect on blood flow,

From the \*Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, †Cardiopulmonary Division, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo; ‡Division of Molecular Regenerative Medicine, Course of Advanced Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka; and the §Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Disease, Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan. This study was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan, and by Health Science Research Grants for Advanced Medical Technology from the Ministry of Welfare, Japan.

Manuscript received June 28, 2003; revised manuscript received December 10, 2003, accepted January 5, 2004.

#### Abbreviations and Acronyms

DMEM	= Dulbecco's modified Eagle's medium
EGFP	= enhanced green fluorescent protein
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
hHGF	= human hepatocyte growth factor
IC <sub>50</sub>	= 50% (median) inhibitory concentration
LDPI	= laser Doppler perfusion image
RT-PCR	= reverse transcription-polymerase chain reaction
SMA	= smooth muscle actin
TK	= thymidine kinase
vWF	= von Willebrand factor

angiogenesis, and collateral formation was investigated in a murine ischemic hindlimb model (9–11). In this paper, we report that gene-modified cells expressing hHGF and TK induced strong angiogenesis and collateral vessel formation, and that they were easily controlled externally with ganciclovir.

## METHODS

**Cell culture.** The NIH3T3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin (100 µg/ml), streptomycin (250 ng/ml), and amphotericin B (85 µg/ml).

**Stable transfection of hHGF and TK genes.** The complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) of the hHGF and TK genes was inserted into the pUC-SRα and pGK expression vector plasmids, respectively (10–13). pPUR and pcDNA3.1/Hygro(+) are selection plasmids that confer puromycin resistance and hygromycin resistance, respectively. After co-transfection of pUC-SRα/hHGF and pPUR into the NIH3T3 cells, using the Effectene Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), the puromycin-nonresistant cells were removed with puromycin (3 µg/ml), and the hHGF-producing cells were clonally selected (NIH3T3 + hHGF). pGK/TK and pcDNA3.1/Hygro(+) plasmids were then similarly co-transfected into the NIH3T3 + hHGF cells; the hygromycin-nonresistant cells were removed with hygromycin (200 µg/ml); and both hHGF- and TK-producing cells were clonally selected (NIH3T3 + hHGF + TK).

**Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).** Expression of hHGF messenger ribonucleic acid was analyzed by RT-PCR using the primers that specifically detect human but not mouse HGF, as previously described (14).

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for hHGF.** Production of hHGF was determined by ELISA with anti-human-specific HGF monoclonal antibodies (Institute of Immunology, Tokyo, Japan) (6,15,16).

**Ad.CA-hHGF.** The adenoviral vector plasmid pAd.CA-hHGF, which is composed of a cytomegalovirus immediate early enhancer, a modified chicken beta-actin promoter, and hHGF cDNA, was constructed by the in vitro ligation

method (17). The pAd.CA-hHGF plasmid was partially cut with *PacI* and then transfected into 293 cells, followed by culture with 0.5% overlaid agarose-α-minimal essential medium (MEM) containing 5% horse serum for 10 to 15 days. Viral plaques, which had been confirmed by restriction enzyme analysis and ELISA for hHGF, were propagated in 293 cells, purified by CsCl<sub>2</sub> gradient ultracentrifugation twice, and desalted with a desalting column (18). Viral particles were calculated by means of optical density at 260 nm.

**Murine model of hindlimb ischemia.** All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Keio University. After anesthetizing male BALB/c nude mice (eight weeks) with diethyl ether, the femoral artery was gently isolated, and the proximal portion was ligated with 7-0 silk ligatures (19,20).

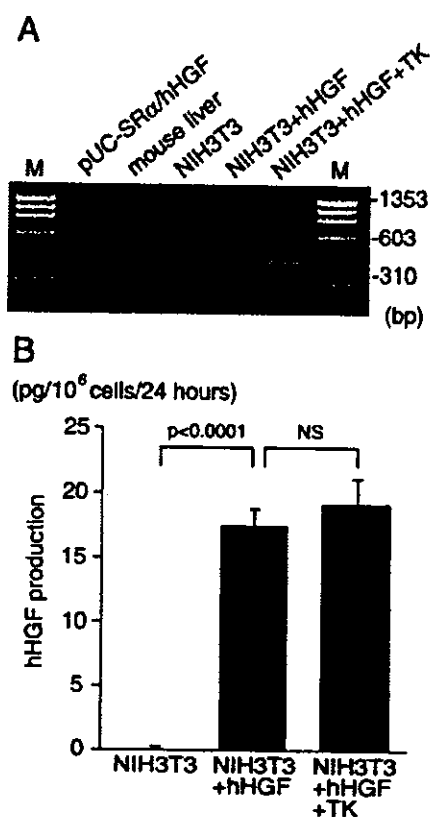
**Transplantation of continuously hHGF-producing NIH3T3 cells.** The hindlimb ischemic mice (n = 192) were randomly classified into five groups. The control groups received 0.2 ml saline only (n = 14), 500 µg pUC-SRα/hHGF plasmids in 0.2 ml saline (n = 10), 10<sup>9</sup> particles Ad.CA-hHGF in 0.2 ml phosphate-buffered saline (n = 10), or NIH3T3 in 0.2 ml DMEM (n = 14). The experimental group received NIH3T3 + hHGF + TK in 0.2 ml DMEM (n = 144). All injections were given via a 27-gauge needle (21). The numbers of cells transplanted ranged from 10<sup>4</sup> to 10<sup>7</sup>. They were injected into two different sites in the ischemic thigh (adductor) skeletal muscles on postoperative day 1. The direction of injection was parallel to the muscle fibers. Angiogenesis and collateral vessel formation were assessed at four weeks.

**Laser Doppler blood perfusion analysis.** The blood perfusion rate in the ischemic (left leg) and normal (right leg) hindlimb was measured with a laser Doppler perfusion image (LDPI) system (Moor Instruments), as described previously (20,22).

**Histopathology.** Frozen sections (4 µm) were cut from tissue specimens (23). Immunohistochemical staining for hHGF, endothelial cells, and alpha-smooth muscle actin (SMA) was carried out with anti-human HGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota), anti-human von Willebrand factor (vWF)/horseradish peroxidase (HRP), and anti-human SMA/HRP (Dakocytomation, Kyoto, Japan), respectively. Sections for staining and counterstaining were incubated with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and Mayer's hematoxylin solution, respectively. Elastic van Gieson staining was carried out by the standard method. Paraffin sections (3 µm) were cut from tissue specimens, and hematoxylin-eosin staining was carried out by the standard method.

**Assay of growth inhibition by ganciclovir in vitro.** After seeding cells on six-well plates (10<sup>5</sup> cells/well) and culturing for 24 h, they were exposed to ganciclovir in concentrations ranging from 0 to 10<sup>-3</sup> g/ml for 72 h (24,25).



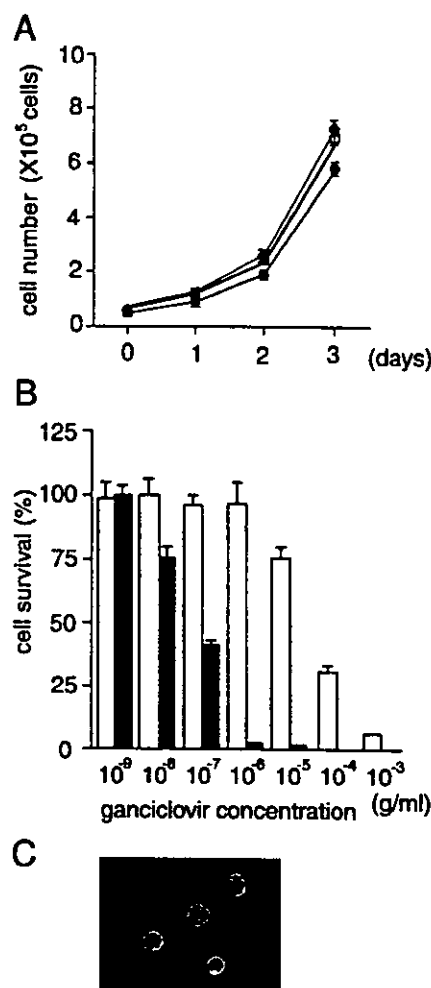


**Figure 1.** (A) Expression of human hepatocyte growth factor (hHGF) messenger ribonucleic acid in the hHGF-transfected NIH3T3 cells. The primer set of reverse transcription-polymerase chain reaction specifically detects hHGF but not mouse HGF. pUC-SRa/hHGF plasmid and mouse liver were used as a positive and negative control, respectively. M = the  $\Phi$ X174-HaeIII digest. (B) Production of hHGF protein. This ELISA system specifically detects only hHGF because of the lack of cross-reactivity by the antibodies. Data are expressed as hHGF concentrations adjusted for cell number. Both NIH3T3 + hHGF and NIH3T3 + hHGF + thymidine kinase (TK) groups expressed hHGF messenger ribonucleic acid and produced hHGF protein ( $n = 5$ ).

**Detection of ganciclovir-induced apoptosis with annexin V.** Annexin V is an early apoptotic marker. The NIH3T3 + hHGF + TK group was exposed to  $10^{-7}$  g/ml ganciclovir for 48 h, and the apoptotic cells were detected with an annexin V-enhanced green fluorescent protein (EGFP) apoptosis detection kit (Medical & Biological Labs Co. Ltd., Nagaya, Japan) (26).

**Regulation of transplanted cell growth with ganciclovir in vivo.** We investigated the dose-response relationship of growth inhibition by ganciclovir by transplanting NIH3T3 + hHGF + TK ( $10^7$  cells) and administering ganciclovir two weeks later. The transplanted mice received different doses (0, 1, 10, 50, or 80 mg/kg per day) of ganciclovir orally once a day for four weeks.

**Statistical analysis.** The data were processed using Stat-View J-4.5 software. Results are reported as the mean value  $\pm$  SE. Comparisons of values among all groups were performed by one-way analysis of variance. The Scheffé's  $F$  test was used to determine the level of significance. The probability level accepted for significance was  $p < 0.05$ .

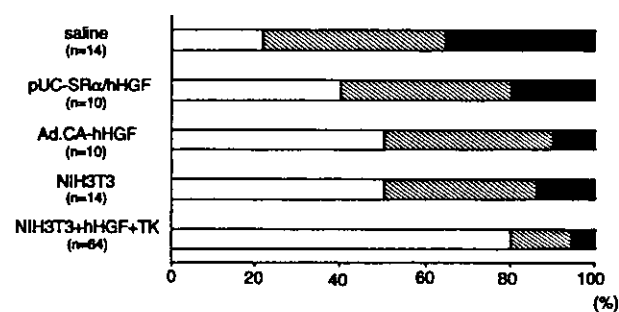


**Figure 2.** (A) Influence of hHGF and/or TK genes on cell growth in vitro. The growth rate of the hHGF-transfected NIH3T3 cells was slightly higher than that of the nontransfected cells, but TK had no effect on cell growth. (circles = NIH3T3; diamonds = NIH3T3 + hHGF; squares = NIH3T3 + hHGF + TK) ( $n = 3$ ). (B) Growth-inhibitory effect of ganciclovir. The  $IC_{50}$  of ganciclovir for the NIH3T3 + hHGF + TK group (solid bars) was  $\sim 1,000$  times lower than that for the NIH3T3 + hHGF group (open bars) ( $n = 5$ ). (C) Apoptotic cells stained with annexin V-EGFP at the cell membrane after exposure to ganciclovir. Abbreviations as in Figure 1.

## RESULTS

**Permanently hHGF-transfected NIH3T3 cells produced hHGF protein.** The NIH3T3 + hHGF cells were obtained after two weeks of exposure to puromycin, and NIH3T3 + hHGF + TK cells were obtained after two more weeks of exposure to hygromycin. We confirmed that both the NIH3T3 + hHGF and NIH3T3 + hHGF + TK groups expressed hHGF mRNA and then produced hHGF protein at a rate of  $17.3 \pm 1.4$  and  $19.1 \pm 2.0$  pg/ $10^6$  cells per 24 h, respectively (Fig. 1).

**Ganciclovir-inhibited cell growth and induced apoptotic cell death.** It is well known that HGF regulates cell growth. To determine whether transfection of hHGF affects the growth of NIH3T3 cells, we counted the numbers



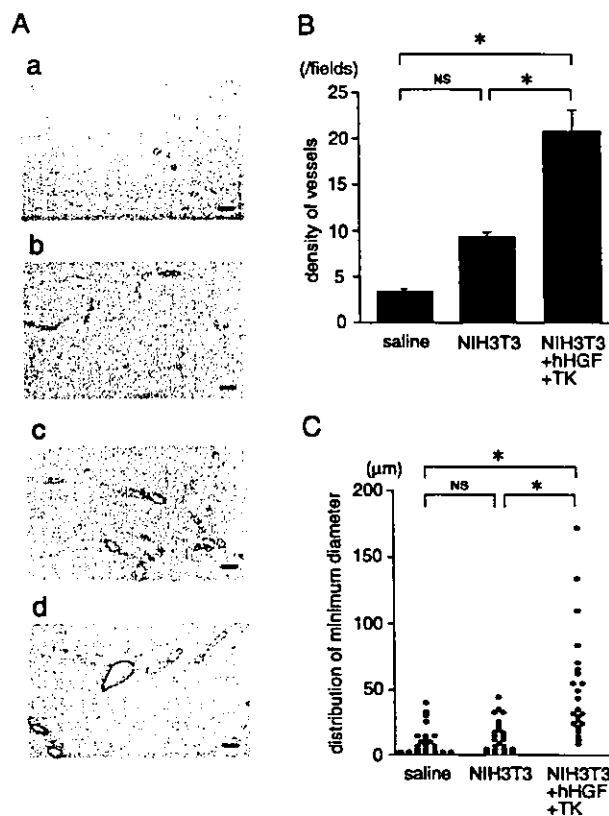
**Figure 3.** Frequency of necrosis in the ischemic hindlimbs. Severe hind-limb necrosis was significantly reduced in the NIH3T3 + hHGF + TK group. Open areas = negative necrosis; lined areas = necrosis on toes; solid areas = necrosis on foot. Abbreviations as in Figure 1.

of cells in vitro (Fig. 2A). The growth rate of the hHGF-transfected NIH3T3 cells seemed to increase slightly, but the increase was not significant on day 3. Transfection of the TK gene had no effect on their growth rate.

Next, we investigated the growth-inhibitory effect of ganciclovir on these cells (Fig. 2B). The  $IC_{50}$  of ganciclovir for the NIH3T3 + hHGF + TK group was  $\sim 1,000$  times lower than that for the NIH3T3 + hHGF group. These findings confirmed that the TK plasmid genes had been effectively transfected, and that hardly any of the cells that expressed the TK gene survived exposure to ganciclovir at a concentration of  $10^{-6}$  g/ml, which did not affect the control cells.

Enhanced green fluorescent protein fluorescence was detected at the membranes of NIH3T3 + hHGF + TK cells after ganciclovir exposure (Fig. 2C), indicating that cell death was attributable to apoptosis.

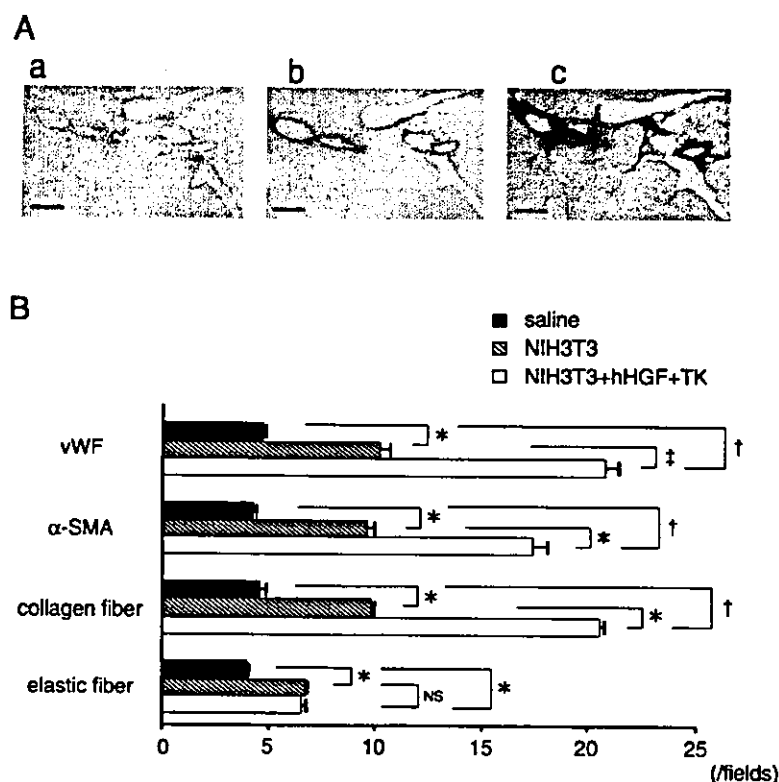
**Human HGF-producing cell therapy augmented angiogenesis and collateral vessel formation.** To evaluate whether transplantation of hHGF-producing cells improves the perfusion of ischemic hindlimbs, we first determined the rate of necrosis of the ischemic hindlimb. Necrosis was rated on a three-grade scale. The rate of necrosis of the foot and toes in the saline group was 35.7% and 42.9%, respectively. The rates in the pUC-SRα/hHGF group were 20% and 40%, respectively, and in the Ad.CA-hHGF group 10% and 40%, respectively. These therapeutic approaches were effective in comparison with the saline group, but they were not sufficient to fully prevent the necrosis. To further ameliorate limb necrosis, we examined angiogenic gene-modified cell transplantation therapy. The NIH3T3 ( $10^7$  cells) group had rates of 14.3% and 35.7%, respectively, suggesting that the vector cell transplantation itself might improve perfusion of the ischemic limb to some extent. In contrast, the rates in the NIH3T3 + hHGF + TK ( $10^7$  cells) group were 5.8% and 14.5%, respectively (Fig. 3). The rate of necrosis was surprisingly reduced in the NIH3T3 + hHGF + TK group, indicating that transplantation of hHGF-producing cells might be one of the most effective methods of improving limb ischemia.



**Figure 4.** (A, panels a to d) Immunohistochemical staining for von Willebrand factor in the triceps muscle of the left calf revealed the presence of numerous vessels. Vessels were larger and more numerous in the NIH3T3 + hHGF + TK group (panels c and d) than in the saline (panel a) and NIH3T3 groups (panel b). Scale bars = 100  $\mu$ m. (B) The number of vessels was determined by observation of 20 random fields from 10 mice (2 fields per mouse; \* $p < 0.01$ ). (C) Distribution of the minimum diameters of the von Willebrand factor-positive vessels ( $n = 25$ ; \* $p < 0.0001$ ). Abbreviations as in Figure 1.

**Vessel density and size.** Immunostaining clearly revealed the presence of numerous vessels in the NIH3T3 + hHGF + TK group (Fig. 4A, panel c) and a lower number of vessels in the saline (Fig. 4A, panel a) and NIH3T3 (Fig. 4A, panel b) groups. Quantitative analysis revealed that the vessel density in the ischemic region was significantly higher (Fig. 4B), and the minimum diameter of the vWF-positive vessels was significantly greater (Figs. 4A, panel d, and 4C) in the NIH3T3 + hHGF + TK group.

**Vessel maturation.** Maturation of the vessels was investigated by staining three consecutive frozen sections of ischemic skeletal muscle. Amazingly, most of the vessels in the NIH3T3 + hHGF + TK group were vWF/ $\alpha$ -SMA-double positive (Figs. 5A, panels a and b, and 5B). However, there was no increase in elastic fiber-positive cells, as compared with the saline and NIH3T3 groups (Figs. 5A, panel c, and 5B). These findings showed that NIH3T3 + hHGF + TK cell transplantation strongly induced angiogenesis not only at the capillary level but also at the microvessel (arteriole) level, and it caused angiogenesis at the large blood vessel level.



**Figure 5.** (A, panels a to c) Three consecutive frozen sections of NIH3T3 + hHGF + TK transplanted muscle. (panel a) Immunohistochemical staining for vWF and (panel b)  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) and (panel c) elastica van Gieson staining. Scale bars = 100  $\mu$ m. (B) Maturation of vessels was compared by using three consecutive frozen sections. Most of the von Willebrand factor (vWF)-positive vessels in NIH3T3 + hHGF + TK transplanted mice also stained with  $\alpha$ -SMA (n = 20; \*p < 0.05, †p < 0.001, ‡p < 0.01). Abbreviations as in Figure 1.

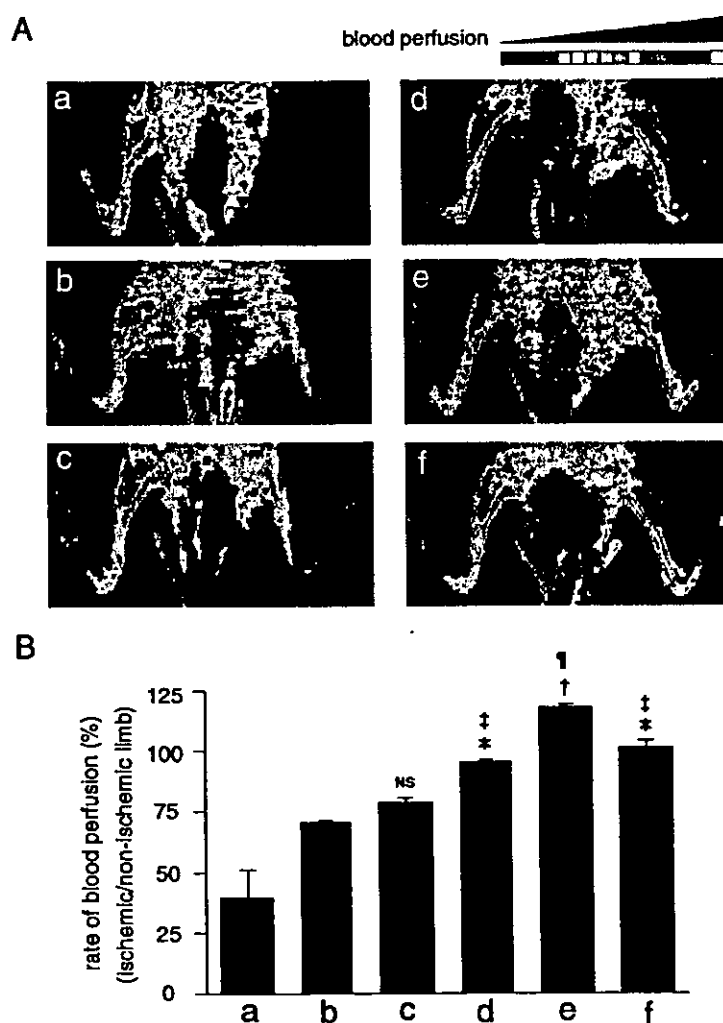
**Laser Doppler blood perfusion.** The LDPI analysis was performed to study subcutaneous blood perfusion. Representative images are shown in Figure 6A, and quantitative analysis of blood perfusion is shown in Figure 6B. No blood perfusion was observed in the hindlimb immediately after femoral artery ligation (Fig. 6A, panel a). Perfusion of the proximal part of the thigh had recovered at four weeks in the saline and NIH3T3 groups, but perfusion distal to the heel joint had markedly decreased (Fig. 6A, panels b and c). In the NIH3T3 + hHGF + TK ( $10^4$  cells) group, perfusion of the ischemic limb almost recovered to the control (nonischemic) level, but perfusion distal to the heel was slightly decreased compared with the control level (Fig. 6A, panel d). In the NIH3T3 + hHGF + TK ( $10^7$  cells) group, perfusion of the ischemic limb was 118.1% (i.e., much greater than that in the control hindlimb) (Figs. 6A and 6B, panel e). To adjust the recovery of blood perfusion in the ischemic limb to the appropriate level, we transplanted NIH3T3 + hHGF + TK ( $10^7$  cells), monitored the LDPI level, and began giving ganciclovir when blood perfusion reached the control level (two weeks). This method enabled us to adjust the blood perfusion rate in the ischemic limb to the same level as in the control limb (Figs. 6A and 6B, panel f).

When the NIH3T3 + hHGF + TK cells were transplanted into the normal nonischemic limb, the blood perfusion increased more than that in the control limb. Up

to six weeks after transplantation, no evidence of angiosarcoma or hypervascular tumor was observed in the transplanted limb or other parts of the body (data not shown).

**In vivo production of HGF protein.** Immunohistochemical staining demonstrated the production of hHGF protein in transplanted NIH3T3 + hHGF + TK cells, but not in transplanted NIH3T3 cells (Fig. 7A).

**Cell regulation with ganciclovir and TK.** Figure 7B shows a quantitative analysis of the inhibitory effect of ganciclovir on blood perfusion. At a concentration of 50 mg/kg/day of ganciclovir, the blood perfusion was adjusted in the ischemic limb to the same level as in the control limb, and no significant side effects were produced. Histologic examination revealed the natural history of the transplanted cells (Fig. 7C, panels a to c). The transplanted cells formed a mass between the skeletal muscles, which gradually increased in size but did not infiltrate into the skeletal muscle. Two weeks after transplantation of the NIH3T3 + hHGF + TK cells, we began giving ganciclovir orally every day for two to four weeks and then examined tissue samples (Fig. 7C, panels d to f). The NIH3T3 + hHGF + TK cells gradually underwent apoptosis, and by four weeks, no transplanted cells could be detected. The surrounding muscle cells and the generated vessels were unaffected by ganciclovir.



**Figure 6.** (A) Representative laser Doppler perfusion images. (B) Quantitative analysis of the rate of blood perfusion of the ischemic/nonischemic limb. Panel a = Control mouse on postoperative day 1; panels b to f = four weeks after treatment (panel b = saline injection; panel c = NIH3T3 transplantation [ $10^7$  cells]; panel d = NIH3T3 + hHGF + TK transplantation [ $10^4$  cells]; panel e = NIH3T3 + hHGF + TK transplantation [ $10^7$  cells]; panel f = beginning two weeks after transplantation of NIH3T3 + hHGF + TK ( $10^7$  cells), ganciclovir (50 mg/kg/day) was administered orally for four weeks. Oral ganciclovir administration adjusted the blood perfusion rate of the ischemic limb to the same level as that of the nonischemic limb (eight mice/group). \* $p < 0.01$ , † $p < 0.001$  vs. saline, ‡ $p < 0.05$ , § $p < 0.01$  versus NIH3T3. Abbreviations as in Figure 1.

## DISCUSSION

In this study, we assessed angiogenic gene-modified cell transplantation therapy with fibroblasts permanently transfected with hHGF and TK genes in a murine hindlimb ischemia model. This therapy had the following merits: 1) it induced angiogenesis and collateral vessel formation more effectively than with plasmid or viral vectors. 2) The combination of TK and ganciclovir allowed the angiogenesis to be adjusted by monitoring LDPI. 3) This therapy could be stopped at any time desired for any reason. 4) There was no possibility of the hHGF gene being expressed in nontarget organs or nontarget cells as a result of leakage or dispersion of the vectors. If the plasmid vector was integrated into the genome and neoplastic transformation occurred, it would be difficult to control cell growth. 5) The angiogenic effect can be easily predicted, because the trans-

fection efficiency of the gene is always 100%. 6) The cell vector will be much more effective in patients who require rapid angiogenesis, because plasmid or viral vectors require a week for maximal expression, and the duration of maximal expression is short.

Angiogenic gene-modified cell transplantation therapy has several drawbacks. One is that once the cells are transplanted into patients, their growth cannot be controlled. To solve this problem, we double-transfected the cells with the TK gene, and the results confirmed that permanently transfected cells could be killed with ganciclovir after the establishment of angiogenesis and collateral vessel formation. The finding that the  $IC_{50}$  of ganciclovir for the TK-transfected cells was 1,000 times lower than that in the nontransfected cells indicated that this system might be capable of being used in clinical settings.