

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 \pm 8.4*	10.0 \pm 1.9†	13.8 \pm 2.4†	37.6 \pm 1.9‡
cell motion (μ m)	5.0 \pm 0.3	6.8 \pm 0.7*	5.6 \pm 0.8‡	5.3 \pm 0.6‡	ND
% shortening (%)	6.9 \pm 0.5	8.5 \pm 1.2*	7.2 \pm 0.8‡	5.6 \pm 0.6‡	ND
contractile velocity (μ m/s)	71.1 \pm 5.2	100.9 \pm 11.0*	71.3 \pm 8.8‡	70.6 \pm 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/G₀/Gz and activated phospholipase C β via Gi $\beta\gamma$, 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.

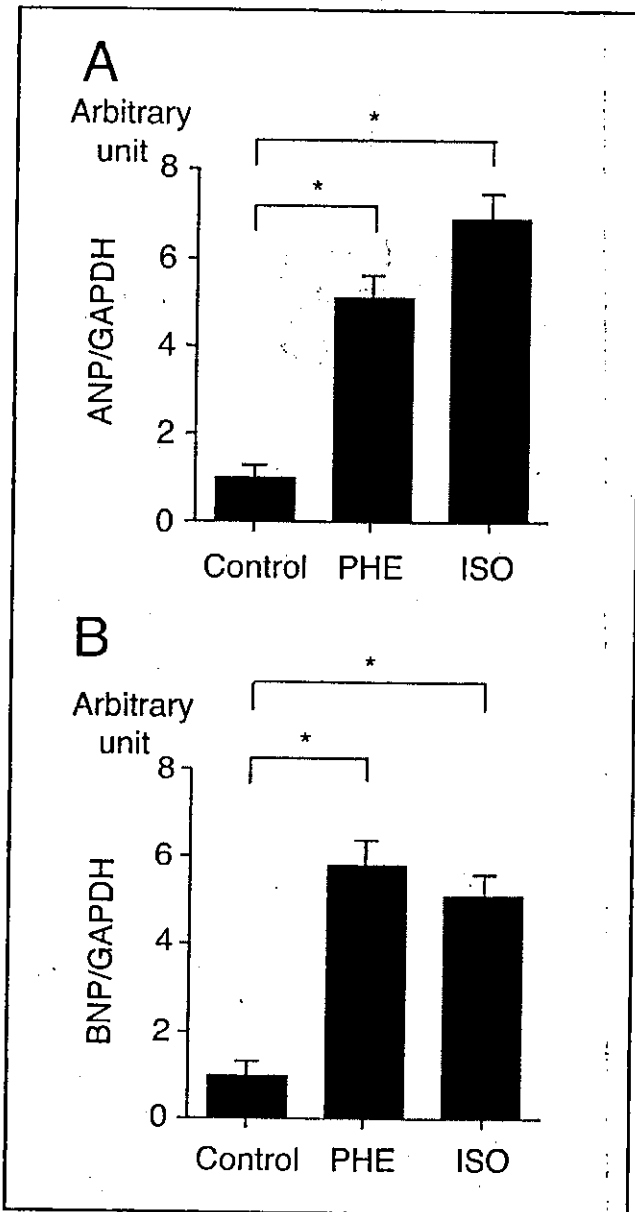


Figure 9. Both α and β stimulation induced mRNA expression of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) genes. CMG cells were serum depleted for 24 hours and pretreated with propranolol and stimulated with phenylephrine (PHE) (50 μ M) or isoproterenol (ISO) (100 μ M). RNA was 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

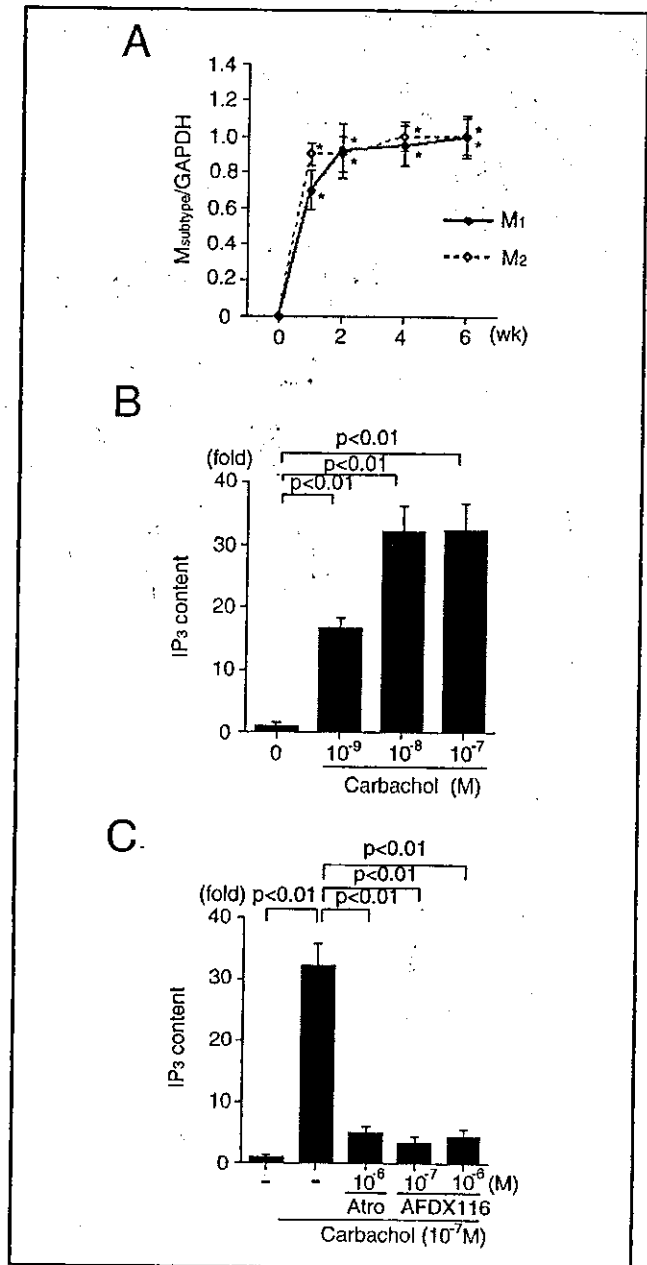


Figure 10. Expression and function of M_1 - and M_2 -muscarinic receptors in CMG cells: A. The ratio of the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) product of muscarinic subtype to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is shown. Data were obtained from 5 separate experiments and are shown as arbitrary units over controls. * = $p < 0.01$ vs. controls. B. Effect of carbachol on IP_3 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 (IP_3) 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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, Urbanek 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. Nkx-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, Opthof 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. Alpha 1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha 1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and *in vivo*. Repression of alpha 1B and alpha 1D but induction of alpha 1C. *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.

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年頃にさかのぼらねばならない。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)

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

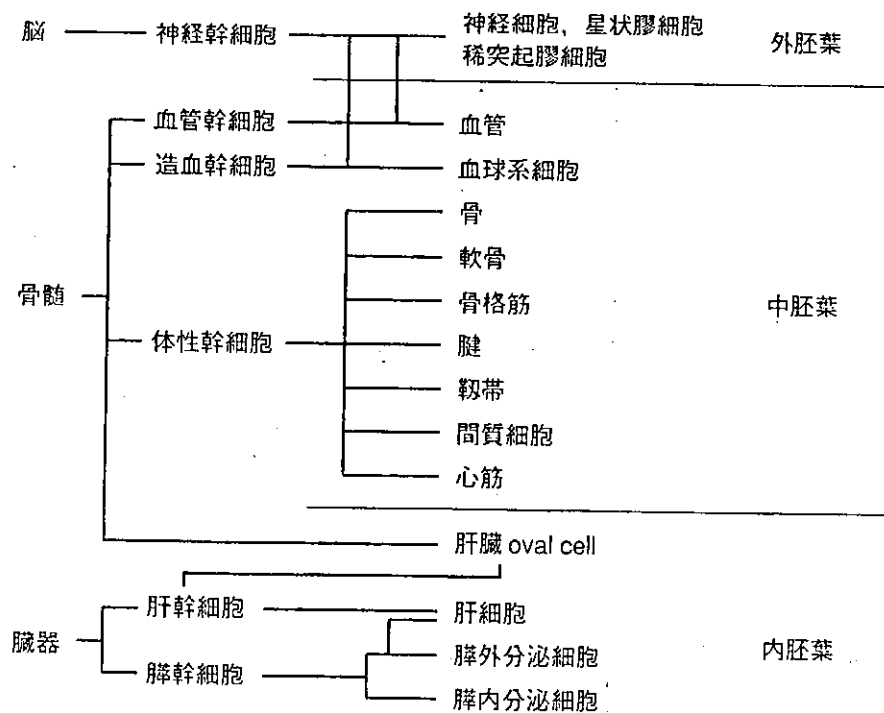


図 1-5-1 成人における幹細胞の分類

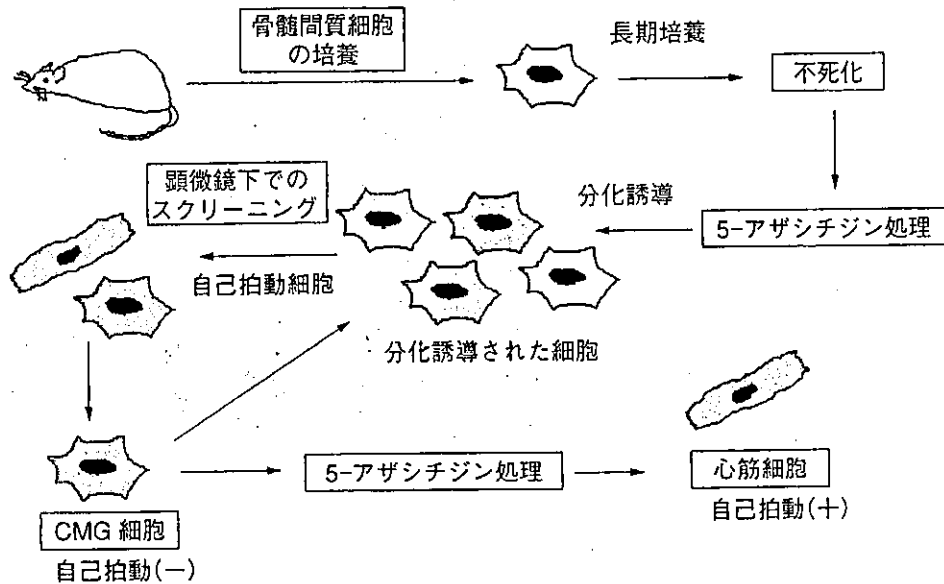


図1-5-2 CMG細胞の作製手順

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
	胎児型	成獣型	胎児型	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が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ろうと考えた。

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

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齊藤能彦助教授(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、今後どのように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ふ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はほかならない。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見たときには、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と、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いないであろう。

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。

参考文献

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

心筋の再生療法

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

これまで重症難治性心不全に対する治療法としては心臓移植が唯一の治療法であった。しかしドナー不足により、一般に普及する治療にはいたっていない。

これに対し、近年の再生医学の発達により心筋細胞を再生し、これを移植することにより治療する方法が模索されている。発生学や幹細胞に関する研究が飛躍的に進み、これらを応用して心筋細胞を再生することが現実的になってきた。本稿では心筋再生の現状を概説する。

胚性幹細胞(ES細胞)の利用

受精卵は身体のすべての組織に分化することができるが、この受精卵が胚盤胞に分化した段階で取り出したものがES細胞である。ES細胞は *in vivo* ではすべての組織の細胞に分化できるが、*in vitro* では一部の発生早期に出現する細胞に関しては分化誘導できるようになりつつある。心筋細胞は胎性早期に出現する細胞であり、ES細胞からも比較的容易に得ることができる。ヒトのES

細胞からも心筋細胞が得られたことがすでに報告されている。ES細胞からの心筋再生の利点として、①大量培養が可能なこと、②すでに心筋細胞を得る方法がある程度確立していること、があげられる。

これに対し、欠点は①同種移植となるため免疫抑制薬の使用が必要となること、②未分化細胞を除去しない場合には移植後に奇形腫を作製してしまう危険のあること、③倫理的問題が残されていること、などがあげられる。しかし、これらの問題はいずれ解決できる問題であり将来的には臨床応用されることが期待される。

体性幹細胞の利用

近年の研究により、骨髄中には造血幹細胞以外にも間葉系幹細胞が存在し、血液以外のさまざまな体細胞に分化することが明らかとなった。間葉系幹細胞は当初、中胚葉系の細胞(骨、軟骨、脂肪など)に分化すると考えられていたが、最近の研究では外胚葉由来の神経細胞にも分化することが明らかとなり、体性幹細胞(成体幹細胞)と呼ばれるようになった。われわれは体性幹細胞が心筋細胞に分化するのではないかと推測し、分化誘導を行ったところ心筋細胞に分化することに成功した。Table 1 に体性幹細胞由来の性質のまとめを示した。

再生心筋の移植による心不全治療

再生心筋細胞を成体の心臓に移植する試みは、当初、直接心臓に心筋細胞を注射する方法で開始

Table 1. 再生心筋細胞の特徴

心筋細胞としての特徴	表現型の形式	発現タンパクなどの具体的内容
心筋収縮タンパク 活動電位	胎児心筋型 胎児期早期 (洞結節型)	α -skeletal actin, β -ミオシン重鎖, ミオシン軽鎖 2v 分化の早期 I_f , $I_{Ca,L}$, I_{K1} , I_K 分化が進むと I_{to} , $I_{K,ATP}$ など
交感神経 α_1 受容体	心筋型	α_{1A} 型, α_{1B} 型 $>$ α_{1D} 型 心肥大作用を示す
交感神経 β 受容体	心筋型	β_1 型 $>$ β_2 型 陽性変力, 陽性変時作用を有する
副交感神経ムスカリン受容体	心筋型	M_2 型 $>$ M_1 型 IP3 上昇作用を有した
自己拍動能 転写因子の発現	心筋型	毎分 120~250 Nkx2.5, GATA4, TEF1, MEF2A, MEF2C, MEF2D, HAND1, HAND2 など

された。しかし、この方法では多くの細胞が壊死により失われることから、さまざまな工学的手法により工夫がなされるようになった。

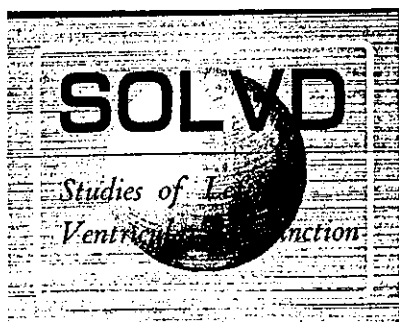
これらの中には、①生体内で溶解するポリ乳酸などの高分子化合物で鑄型となるスcaffoldを作製し、その上に心筋細胞を培養し形態をもたせる方法、②温度により疎水性・親水性が変化する *N*-イソプロピルアクリルアミドゲルを培養皿上に表層塗布し、その上で培養した心筋細胞に対し、傷害を与えることなく脱着することにより心筋シートをつくる方法などを利用し、個々の細胞でなく細胞の塊を組織として移植する技術の開発

が進められている。

厚みのある組織の作製、組織を栄養する血管の侵入など、今後解決すべき問題はあろう。しかしながら、こうした工学的手法の利用はこの領域の発展をより現実的な治療法の確立に導くものであり、さらなる発展が期待される。

参考文献

- 1) Makino S et al : J Clin Invest 103 : 697, 1999
- 2) Fukuda K et al : Artificial Organs 25 : 183, 2001
- 3) Hakuno D et al : Circulation 105 : 380, 2002
- 4) Shimizu T et al : Circ Res 90 : e 40, 2002



SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction) 研究は左室機能障害に対する ACE 阻害薬エナラプリルの効果を検討した大規模試験である。無症候性左室機能不全患者の心不全の発症を予防できるかという予防試験と、症状を有する慢性心不全患者の予後を改善できるかという治療試験の 2 つに分けられる¹⁾。いずれにおいても ACE 阻害薬の有用性が示された。

予防試験 (prevention trial)

1. 対象疾患, 対象症例

左室機能障害を有する患者を対象とした。登録時点で心不全治療を受けていない左室駆出率 35 % 以下の無症候性左室機能不全患者 4,228 例, 平均年齢 59.0 歳 (21~80 歳) を対象とし解析を行った。

2. 目的

無症候性左室機能不全患者において ACE 阻害薬エナラプリルの心不全発症, 死亡および入院頻度に及ぼす影響を検討し, 同薬剤の心不全発症に対する予防効果を明らかにする。

3. 評価項目 (エンドポイント)

全死亡 (心血管死, 心不全の悪化による死亡, 心不全悪化を伴わない不整脈死), 入院をエンドポイントとした。

4. 試験デザイン (二重盲験など)

ランダム化, プラセボ対照, 二重盲験比較試験。

5. 治療法

全症例をプラセボ群 2,117 例とエナラプリル群 2,111 例の 2 群に割り付けた。エナラプリルは 5 mg/日から投与を開始し, 20 mg/日を目標として漸増した。併用可能薬としては, 降圧薬としての利尿薬, 心房細動治療薬としてのジゴキシン, 狭心症治療薬としての硝酸薬の使用を許可した。

6. 追跡期間

14.6~62.0 カ月 (平均 37.4 カ月)。

7. 結果

追跡期間中の全死亡はプラセボ群で 334 例 (15.8 %), エナラプリル群で 313 例 (14.8 %) であり, エナラプリル群で有意な死亡率の低下を認めなかった (リスク低下度 8 %, 95 % 信頼区間 -8 ~ 21 %, $p=0.30$)。エナラプリル群の心血管死は 265 例 (12.6 %) で, プラセボ群 298 例 (14.1 %) に比し, 心血管死のリスクを 12 % 低下させた。この心血管死の減少には心不全悪化による死亡抑制の寄与が大きいが, 統計的に有意ではなかった。心不全の発症および入院はエナラプリル群で 37 %, 36 % のリスク低下が認められた。また, 投与前の左室駆出率が低いほど, 死亡や心不全発症に対するエナラプリルの効果が顕著であった。

8. 結論

ACE 阻害薬エナラプリルは無症候性左室機能不全患者では心不全の発症を遅らせ, 入院頻度を低下させた。また, エナラプリルの投与により心血管死を低下させる傾向にあった。

治療試験 (treatment trial)

1. 対象疾患, 対象症例

左室機能障害を有するうっ血性心不全を対象とした。心不全症状を有する左室駆出率 35 % 以下のうっ血性心不全患者 2,569 例, 平均年齢 61.0 歳 (21~80 歳) を対象として解析を行った。患者の 90 % がニューヨーク心臓病協会 (NYHA) 心機能分類 II~III 度の症例であった。

年齢 80 歳以上, 不安定狭心症, 血行再建術を必要とするような狭心症, 高度弁疾患, 1 カ月以内の心筋梗塞, 重症肺疾患, 血清クレアチニン 2.0 mg/dL 以上の腎機能障害の症例は除外した。

2. 目的

症状を有する左室駆出率 35 % 以下の慢性心不全患者の死亡および入院頻度を ACE 阻害薬エナラ

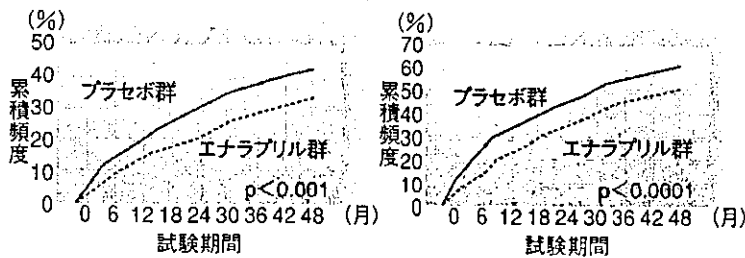


図 予防試験における心不全発症と死亡を合わせた累積頻度(左)と治療試験における心不全による死亡と入院を合わせた累積頻度(右)
(文献2, 3より引用, 改変)

プリルの投与の有無により比較解析し、本薬剤の投与が慢性心不全患者の予後を改善し得るかを検討する。

3. 評価項目(エンドポイント)

全死亡(心血管死, 心不全の悪化による死亡, 心不全悪化を伴わない不整脈死), 入院。

4. 試験デザイン(二重盲験など)

ランダム化, プラセボ対照, 二重盲験比較試験。

5. 治療法

全症例をプラセボ群 1,284 例とエナラプリル群 1,285 例の 2 群に割り付けた。エナラプリル 5 mg/日または 10 mg/日から投与開始し, 20 mg/日を目標に漸増した。その他の ACE 阻害薬以外の併用は可能とした。

6. 追跡期間

22~55 カ月(平均 41.4 カ月)。

7. 結果

追跡期間中の全死亡はプラセボ群で 510 例(39.7%), エナラプリル群で 452 例(35.2%)であり, エナラプリル群で死亡率の低下を認めた(リスク低下度 16%, 95%信頼区間 5~26%, $p=0.0036$)。死亡例のなかでも特に心不全の悪化による死亡頻度が低下した(プラセボ群 251 例(19.5%), エナラプリル群 209 例(16.3%), リスク低下度 22%, 95%信頼区間 6~35%, $p=0.0045$)。死亡頻度に最大の差が生じたのは追跡開始後 24 カ月の時点であった。心不全の悪化により死亡または入院した患者はプラセボ群 736 例(57.3%), 実薬群 613 例(47.7%)と, エナラプリル群で低下した(リスク低下度 26%, 95%信頼区間 18~34%, $p<0.0001$)。一方, 心不全を伴わない不整脈死には差を認めなかった。また, 投与前の血清 Na 値, 血管拡張薬の使用, 左室駆出率によらず, 死亡や心不全発症に対してエナラプリルは有効であった。

8. 結論

左室駆出率の低下した慢性心不全患者では, 従来の心不全治療薬にエナラプリルを追加投与することにより, 死亡および入院頻度が減少した。ACE 阻害薬エナラプリルの投与は慢性心不全患者の予後を改善した。

SOLVD-X

SOLVD 予防試験と治療試験における生存者を 12 年間にわたり追跡調査し, エナラプリルによる延命効果について検討したもので, 2002 年欧州心臓病学会において報告された⁴⁾。エナラプリル群ではプラセボ群に比して生存期間が有意に長く, 平均生存期間は予防試験では 9.2 カ月(95%信頼区間 0~19.2 カ月, $p=0.05$), 治療試験では 8.6 カ月(95%信頼区間 1.0~17.3 カ月, $p=0.03$)それぞれ延長していた。

References

- 1) The SOLVD investigators : Am J Cardiol 66 : 315-322, 1990
- 2) The SOLVD investigators : N Engl J Med 325 : 293-302, 1991
- 3) The SOLVD investigators : N Engl J Med 327 : 685-691, 1992
- 4) Coletta AP et al : Eur J Heart Fail 4 : 661-666, 2002

関連事項

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 ▶▶ 58 頁

慢性心不全 ▶▶ 296 頁

第1章 心臓病診療の課題と展望(トピックス)

1. 再生医学による心臓病治療

1.1 はじめに

ここ10年の心臓病の治療を振り返る時、カテーテル治療や植え込み型除細動器の開発、アンジオテンシンⅡ受容体遮断薬の一般臨床への普及、マルチスライスCTによる画像診断の進歩など、その目覚ましい発展には驚かされるものが多い。しかし、この10年間で著しい進歩がみられなかったものに、難治性重症心不全の治療が挙げられよう。この疾患に対してはこれまで心臓移植が根本治療とされてきたが、ドナーの不足は如何ともしがたく、補助人工心臓による一時的な延命がはかれるのみであった。これに対し、細胞生物学、遺伝子工学の発達は新たな展開をもたらそうとしている。未分化幹細胞を心筋細胞に分化誘導し、これを移植治療の材料として使うという、いわゆる再生医学である。本稿では再生医学による心臓病治療というテーマをいただいたが、そのなかでも特に心筋細胞に分化可能な多能性幹細胞に焦点をあて、現状を解説することとした。

1.2 心筋細胞に分化が可能な多能性幹細胞

近年の精力的な研究により、さまざまな幹細胞が明

らかにされている。このうち心筋細胞に分化可能なことが報告され、将来的に臨床応用可能と考える細胞は胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞、心筋内組織幹細胞であろう。それぞれに利点・欠点を有しており、現時点ではどの細胞が有望であるかについて結論は出ていない。以下、各々の細胞の特徴と現状につき説明する。

1.2.1 胚性幹細胞

胚性幹細胞 (ES 細胞) は受精早期の胚盤胞という時期の内部細胞塊という将来胎児になる部分より得られた細胞 (図 1.1.1) で、身体のすべての細胞に分化し得るという意味で万能幹細胞とも呼ばれる。しかし、*in vitro* で実際に分化することができるのは、胎生早期の段階で分化が達成される細胞である。心筋細胞は胎児期の早期に分化する細胞であり、胚性幹細胞からは比較的得られやすい。マウスの場合には培養液中に LIF (白血病阻止因子) を入れておくことにより、未分化機能が維持されることが知られている。多くの細胞株では feeder layer として MEF (マウス胎児線維芽細胞) の上に胚性幹細胞を重層して培養することが多いが、近年は技術の向上により feeder layer を必要としない培養も可能になった。ヒトの胚性幹細胞もす

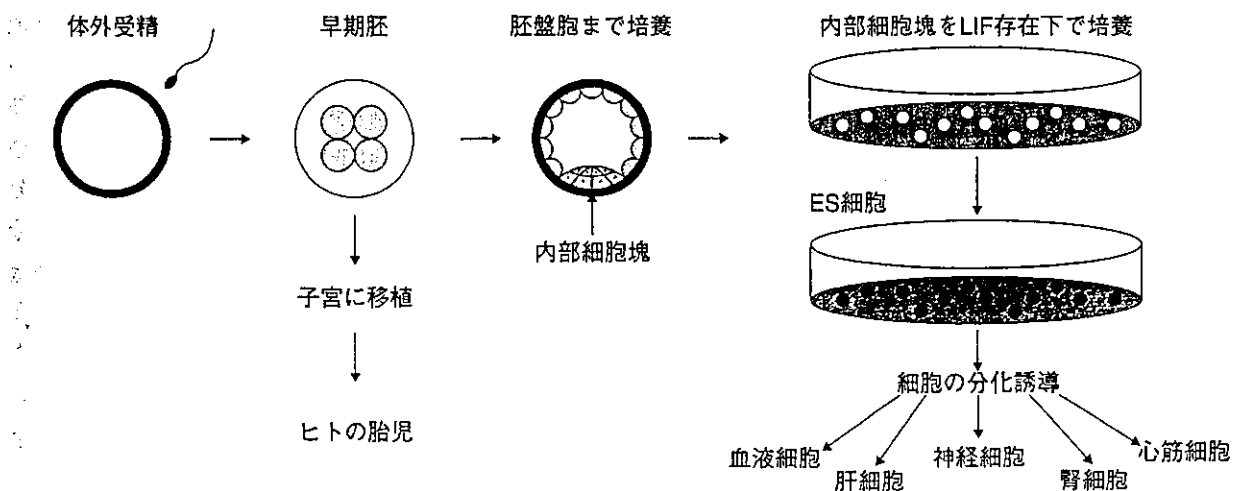


図 1.1.1 胚性幹細胞の樹立と利用
受精早期の胚盤胞より内部細胞塊を取り出し、胚性幹細胞を作成する。

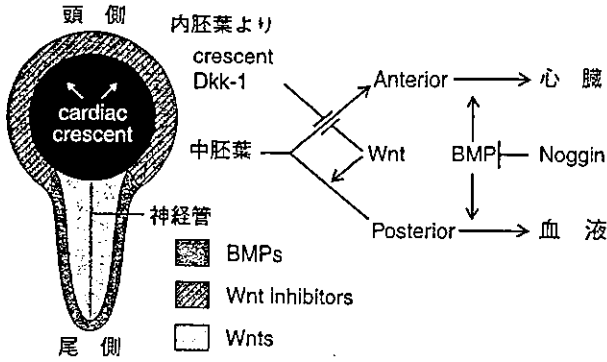


図 1.1.2 中胚葉より心筋細胞への分化経路(文献3より改変)

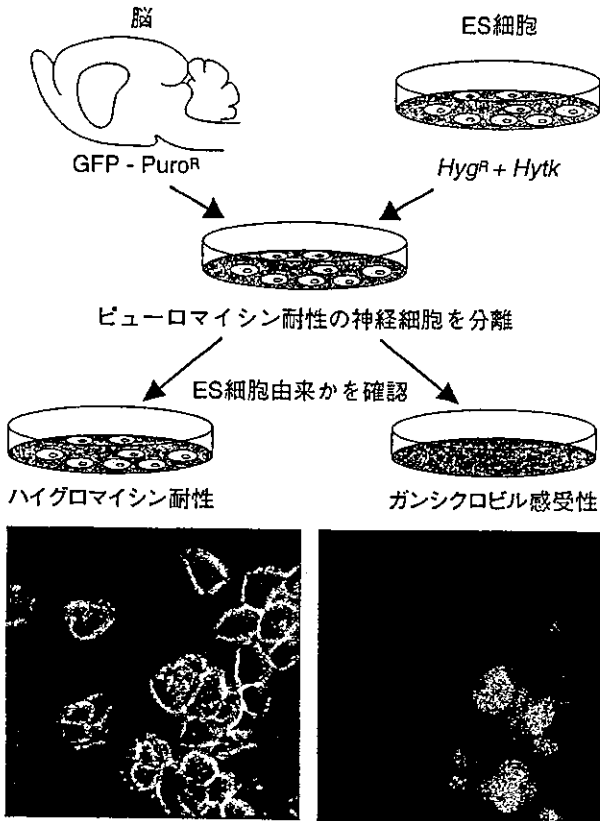


図 1.1.3 細胞融合の概念と証明 (口絵1参照)
神経細胞と胚性幹細胞の細胞融合を証明した実験の概要を示した。

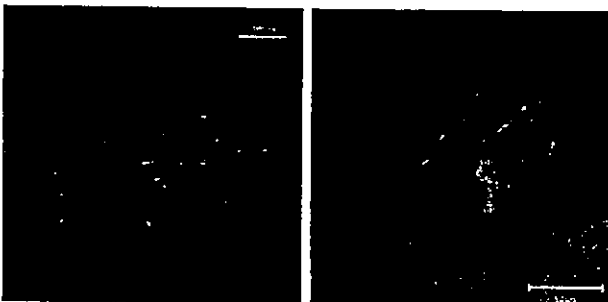


図 1.1.4 骨髄移植モデルマウスを用いた再生心筋(口絵2参照)
GFP 過剰発現マウスより得た骨髄を同系統マウスに骨髄移植し、心筋梗塞を作成した。骨髄由来細胞は GFP 陽性細胞として観察される。右図には GFP 陽性、アクチニン陽性の心筋細胞が少数観察された。

に多数樹立され、本邦においても京都大学の中辻先生により3株ほど胚性幹細胞が樹立されている⁵⁾。ヒトの胚性幹細胞はLIFにより未分化機構が維持されることはなく、MEFとの共培養が必須であるとされている。また、マウスと同様にヒトの胚性幹細胞も心筋細胞に分化することがすでに報告されている⁶⁾。胚性幹細胞から心筋細胞への分化には図1.1.2のようにBMP2やWntといったシグナル伝達経路が重要であるとされているが、その詳細は明らかではない³⁾。胚性幹細胞の臨床応用上の問題点は、①未分化機構維持のため動物細胞(MEF)と共培養が必要である点、②胚性幹細胞から心筋細胞への選択的分化誘導法の確立、③未分化細胞の混入による奇形腫形成の抑制、④同種移植であるため免疫拒絶が避けられない点、などが挙げられる。患者本人の体細胞の核を卵細胞に移植することによるクローン胚の形成は、動物レベルでは可能となった。近年、韓国よりヒトクローン胚の成功が報じられた。しかし、その場合でも100個以上の卵を用いて1個成功したとされている。先進諸国のほとんどでクローン人間の作成は禁止されているが、臓器作成を目的としたクローン胚性幹細胞は一部の国で行われる可能性はある。この点に関しては国民的な議論がなされるべきである。技術革新により、卵細胞を用いずに胚性幹細胞レベルでのクローン化ができれば、倫理的にはハードルが低くなって応用される可能性もあり、さらなる研究が望まれる。

1.2.2 骨髄間葉系幹細胞

骨髄は造血の主たる場であり、骨髄中の細胞のほとんどは造血幹細胞に由来する血液細胞である。しかし、骨髄中には間質細胞と呼ばれる接着系の細胞(培養皿に付着する細胞)が存在し、造血幹細胞の機能維持に働いている。そして、間質細胞の一部に多分化能を有する間葉系幹細胞と呼ばれる細胞が存在し、*in vitro*、*in vivo*でさまざまな細胞に分化することが知られている⁴⁾。骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に主として分化するが、一部神経細胞などの外胚葉系の細胞にも分化することが報告されている^{6,6)}。一時期造血幹細胞にも多分化能があることが報告され、造血幹細胞の多分化能が誇張された。これは心臓移植後の剖検心臓を用いた研究より始まった。すなわち、女性ドナーから提供された心臓が男性レシピエントに移植され、一定時間後に別の理由で死亡し剖検したところ、心臓内にY染色体陽性の心筋細胞が観察されたと報告された⁷⁾。この現象は男性骨髄から多能性幹細胞が心臓に移動