

intestine, etc. In this study we first aimed to clarify the adverse effects of G-CSF to other organs. We found that GFP-BMC migrated into heart, intestine, liver, kidney, lung, and spinal cord, suggesting that GFP-BMC might migrate into those areas injured by radiation.

There were several limitations in this study. Due to the incomplete chimerism, the role of other stem cell origins (host myocardium) for regenerated cardiomyocytes remains unclear. The mobilization of BMD-GFP might vary dose dependently. In the present study, we injected G-CSF before and after onset of acute myocardial infarction (AMI) (15) to magnify the effect of G-CSF. In future studies, G-CSF needs to be injected after infarction. Moreover, it is necessary to evaluate heart function after G-CSF treatment in a further study. We also hope that G-CSF is suitable treatment for chronic ischemic heart disease.

In conclusion, G-CSF improved the survival rate. G-CSF enhanced BMD-GFP to migrate into the infarcted area, and the mobilized BMD-GFP differentiated into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells. Bone marrow was one of the origins of the regenerated myocardium.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank Dr. H. Jiang (the Department of Bioscience of the National Cardiovascular Center, Japan) for technical advice on generating a chimeric mouse. We thank Ms. K. Hattori for help in breeding the GFP mice. This study was partially supported by the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Health Sciences Research Grants, Research for Cardiovascular Diseases (13C-1), Research on the Human Genome, Tissue Engineering Food Biotechnology (12-007), Japan Society for the Promotion of Science, Grant-in-Aid for Scientific Research (A), and Grand-in-Aid for Exploratory Research.

## REFERENCES

- Asahara, T.; Masuda, H.; Takahashi, T.; Kalka, C.; Pastore, C.; Silver, M.; Kearne, M.; Magner, M.; Isner, J. M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85: 221–228; 1999.
- Beltrami, A. P.; Urbaneck, K.; Kajstura, J.; Yan, S.M.; Finato, N.; Bussani, R.; Nadal-ginard, B.; Silvestri, F.; Leri, A.; Beltrami, A.; Anversa, P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 344:1750–1757; 2001.
- Bittner, R. E.; Schöfer, C.; Weipoltshammer, K.; Ivanova, S.; Streubel, B.; Hauser, E.; Freilinger, M.; Höger, H.; Elbe-Bürger, A.; Wachtler, F. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.* 199:391–396; 1999.
- Cody, D. T.; Funk, G. F.; Wagner, D.; Gidley, P. W.; Graham, S.; Hoffman, H. T. The use of granulocyte colony stimulating factor to promote wound healing in a neutropenic patient after head and neck surgery. *Head Neck* 21:172–175; 1999.
- Dührsen, U.; Villeval, J. L.; Boyd, J.; Kannourakis, G.; Morstyn, G.; Metcalf, D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72:2074–2081; 1998.
- Fukuhara, S.; Tomita, S.; Nakatani, T.; Yamashiro, S.; Morisaki, T.; Yutani, C.; Kitamura, S. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is a key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 125:1470–1480; 2003.
- Ikawa, M.; Yamada, S.; Nakanishi, T.; Okabe, M. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44:1–19; 1999.
- Jackson, K. A.; Majka, S. M.; Wang, H.; Pocius, J.; Hartley, C.; Majesky, M. W.; Entman, M. L.; Michael, L. H.; Hirschi, K. K.; Goodell, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 107:1395–1402; 2001.
- Jiang, H.; Hidaka, K.; Sawamura, T.; Arai, Y.; Takihara, Y.; Ota, A.; Morisaki, H.; Morisaki, T. Regeneration of cardiac muscle in normal adult C57BL/6 mice. *Card. Vas. Regen.* 1:26–273; 2001.
- Kachinsky, A. M.; Dominov, J. A.; Miller, J. B. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: Nestin in the developing mouse heart. *J. Histochem. Cytochem.* 43:843–847; 1995.
- Kajstura, J.; Leri, A.; Finato, N.; Di Loreto, C.; Beltrami, C. A.; Anversa, P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8801–8805; 1998.
- Menasche, P.; Hagege, A. A.; Sorsin, M.; Pouzet, B.; Desnos, M.; Duboc, D.; Schwartz, K.; Vilquin, J. T.; Marolleau, J. P. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279–280; 2001.
- Okabe, M.; Ikawa, M.; Kominami, K.; Nakanishi, T.; Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407:313–319; 1997.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A.; Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701–705; 2001.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Limana, F.; Jakoniuk, L.; Quaini, F.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A.; Anversa, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10344–10349; 2001.
- Quaini, F.; Urbaneck, K.; Beltrami, A. P.; Finato, N.; Beltrami, C. A.; Nadal-ginard, B.; Kajstura, J.; Leri, A.; Anversa, P. Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.* 346:5–15; 2002.
- Sata, M.; Saiura, A.; Kunisato, A.; Tojo, A.; Okada, S.; Tokuhsa, T.; Hirai, H.; Makuuchi, M.; Hirata, Y.; Nagai, R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* 8:403–409; 2002.
- Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* 182:311–322; 2000.
- Taylor, D. A.; Atkins, B. Z.; Hungspreugs, P.; Jones, T. R.; Reedy, M. C.; Hutcheson, K. A.; Glower, D. D.; Kraus, W. E. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat. Med.* 4:929–933; 1998.
- Tomita, S.; Li, R. K.; Weisel, R. D.; Mickle, D. A. G.; Lim, E. J.; Sakai, T.; Jia, Z. Q. Autologous transplantation

- of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100:II247-II256; 1999.
21. Tomita, S.; Mickle, D. A.; Weisel, R. D.; Jia, Z. Q.; Tumiati, L. C.; Allidina, Y.; Liu, P.; Li, R. K. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 123:1132-1140; 2002.
  22. Vaillant, P.; Muller, V.; Martinet, Y.; Martinet, N. Human granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors are chemotactic and "competence" growth factors for human mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:879-885; 1993.
  23. Wang, J. S.; Shum-Tim, D.; Galipeau, J.; Chedrawy, E.; Eliopoulos, N.; Chiu, R. C. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120:999-1006; 2000.

# Endogenous Bone-Marrow-Derived Stem Cells Contribute Only a Small Proportion of Regenerated Myocardium in the Acute Infarction Model

Shinya Fukuhara, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Shinji Tomita, MD, PhD, FAHA,<sup>a,c</sup> Takeshi Nakatani, MD, PhD,<sup>d</sup> Chikao Yutani, MD, PhD,<sup>b</sup> and Soichiro Kitamura, MD, PhD<sup>c</sup>

- Background:** Our recent study showed that granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) promoted bone-marrow cells (BMC) to migrate into the infarcted heart and that they differentiated into cardiomyocytes. However, we still do not know to what degree bone-marrow-derived cardiomyocytes contribute to myocardial regeneration after injury. In this study, we verified the proportional contribution of cells from bone marrow (BM) and from non-bone marrow (n-BM) in regenerating neomyocardium after myocardial infarction.
- Methods:** Eight C57BL/6 mice were irradiated (900 cGy), and green fluorescent protein (GFP) mouse-derived BMCs (GFP-BMC,  $1 \times 10^6$  cells) were injected. Four weeks later, the left descending coronary artery was ligated. Recombinant human G-CSF (200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , 8 days) was injected. At 4 weeks after ligation, hearts were fixed for histology. We calculated the proportions of cardiomyocytes derived from BM and n-BM after taking the chimeric rate into consideration.
- Results:** The chimeric rate was  $54.6\% \pm 5.9\%$ . At the infarcted border area, the total cell number was  $1000.3 \pm 56.5/\text{mm}^2$ , and mobilized BM-derived GFP-BMC was  $103.3 \pm 13.1/\text{mm}^2$ . After compensation with the chimeric rate, we found BM-derived troponin I-positive cells at  $23.9 \pm 4.1/\text{mm}^2$ , nestin-positive cells at  $12.9 \pm 2.6/\text{mm}^2$ , and Ki67-positive cells at  $18.3 \pm 2.6/\text{mm}^2$ , respectively. We found significant differences in the contribution of troponin I- ( $6.7\% \pm 1.7\%$  vs  $93.3\% \pm 1.7\%$ ), nestin- ( $2.4 \pm 0.5$  vs  $97.6 \pm 0.5$ ), and Ki67-positive ( $3.9 \pm 1.0$  vs  $96.1 \pm 1.0$ ) cells derived from BM and n-BM.
- Conclusions:** Bone marrow was one of the origins of regenerated cardiomyocytes; however, the contribution of cells from BM was very small compared with those of n-BM origin in the infarction model. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:67-72. Copyright © 2005 by the International Society for Heart and Lung Transplantation.

Several reports suggest that bone marrow can provide stem cells capable of myocardial regeneration.<sup>1-3</sup> More recently, the possibility of self-renewing adult myocytes was reported.<sup>4</sup> Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) treatment has been shown to improve post-

infarct cardiac dysfunction.<sup>5</sup> Our recent study showed that G-CSF promoted bone-marrow cells to migrate into infarcted myocardium and that they differentiated into cardiomyocytes.<sup>6</sup> However, we still do not know to what degree bone-marrow-derived cardiomyocytes contribute to regeneration of injured myocardium.

This study answers this question by verifying the proportional contribution of cells from bone marrow and from non-bone-marrow (host myocardium) in regenerating neomyocardium after acute myocardial infarction.

From the <sup>a</sup>Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, <sup>b</sup>Department of Pathology, <sup>c</sup>Department of Cardiovascular Surgery, and <sup>d</sup>Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan.

Submitted August 27, 2003; accepted September 19, 2003.

This research was supported in part by a Health Science Research Grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare (Research for Cardiovascular Diseases, 13C-1, and Research on the Human Genome, Tissue Engineering Food Biotechnology, 12-007) and by the Grant-in-Aid for Scientific Research (B) and for Exploratory Research from the Japan Society for the Promotion of Science.

Reprint requests: Takeshi Nakatani, MD, Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan. Telephone: 81-6-6833-5012, ext. 2221. Fax: 06-6872-8160. E-mail: [tnakatani@res.nccvc.go.jp](mailto:tnakatani@res.nccvc.go.jp)

Copyright © 2005 by the International Society for Heart and Lung Transplantation. 1053-2498/05/\$-see front matter. doi:10.1016/j.healun.2003.09.032

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

All animals received humane care in compliance with the *Principles of Laboratory Animal Care*, formulated by the National Society for Medical Research, and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1985). All procedures were approved by the Animal Care Committee of the National

**Table 1.** Comparing the Contribution of Bone-marrow-Derived Cells with Non-bone-marrow-Derived Cells

---

Actual cell number of respectives.

Total cell number = total = A + B = X + Y

A = Total GFP-positive cells

B = Total GFP-negative cells = total - A

C = GFP-positive and troponin I-positive cells

D = GFP-negative and troponin I-positive cells

E = Bone-marrow-derived and GFP-negative cells = A ÷ R - A

F = GFP-negative cells and troponin I-positive cells = E × C ÷ A

X = Bone-marrow-derived and troponin I-positive cells = C + F

Y = Non-bone-marrow-derived and troponin I-positive cells = D - F

The percentage of the contribution of bone marrow to form troponin I-positive cells at the infarcted border area =  $X \div (X + Y) \times 100$  (%)

---

GFP, green fluorescent protein; R, Chimeric rate.

Cardiovascular Center, Osaka, Japan. We purchased C57BL/6 mice from a licensed vendor. Dr. Okabe provided transgenic mice expressing green fluorescent protein (C57BL/6Tg14[act-EGFP] OsbY01; GFP mouse).<sup>7</sup> Animals were housed in an air-conditioned room with free access to food and water at all times.

#### Bone-marrow Cells of GFP Mice (GFP-BMC)

GFP mice were anesthetized with diethylethanol.<sup>6</sup> The bone-marrow plugs of the femora and tibiae each were flushed using a 27-gauge needle and a syringe filled with phosphate-buffered saline solution (PBS). The bone-marrow cells were suspended in a tube containing PBS and centrifuged at 1,000g for 5 minutes. This cell pellet was then resuspended in PBS to make a cell density of  $1 \times 10^7$  cells/2 ml. The cell suspension was preserved in ice until use.

#### Myocardial Infarction

Eight C57BL/6 mice at 8 weeks of age were irradiated (900 cGy), and GFP-BMC ( $1 \times 10^6$  cells) were injected through a tail vein.<sup>6</sup> At 4 weeks after transplantation, splenectomy was performed. Two weeks later, the left descending coronary artery was ligated. Recombinant human G-CSF (200 µg/kg/day, Chugai; Tokyo, Japan) was injected intraperitoneally for 3 days before ligation and for 5 days after ligation. At 4 weeks after ligation, the mice were killed, and their hearts were collected. They were washed at once in cold PBS to remove residual blood and clots and fixed with 4% paraformaldehyde for histologic study.<sup>8</sup>

#### Immunohistochemistry

We performed immunostaining as described in our previous study.<sup>6</sup> Briefly, we incubated the heart sections with antibodies at 4°C overnight and identified cells as follows: Mature cardiomyocytes were identified by a mouse monoclonal antibody against cardiac-specific troponin I (TnI; Hytest, 4C2; Euro, Finland). Stem cells were recognized by a mouse monoclonal antibody

against nestin (BD Biosciences, USA).<sup>9</sup> Cell proliferation was identified using a rabbit polyclonal antibody against Ki67 (DAKO, CA, USA).<sup>4</sup> Primary antibodies were detected with a goat anti-mouse immunoglobulin-G antibody or anti-rabbit immunoglobulin-G antibody (Alexa Fluor 568, Molecular Probes, Wako; Osaka, Japan). The cells then were evaluated and photographed with a FLUOVIEW FV300 confocal laser scanning microscope (Olympus; Tokyo, Japan).

Nuclei of the cells in each section were labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).<sup>10</sup> Briefly, DAPI (Sigma; St Louis, MO) was added at a final concentration of 50 µg/ml and washed with PBS. We viewed DAPI-labeled migrated cells under fluorescent microscopy with appropriate excitation (330 nm) and emission (450 nm) spectra.

#### Quantitative analysis

We calculated the relative contribution of bone marrow to several protein-specific cells at the infarction border (most distant from the center of scarred myocardium and adjacent to normal myocardium). Regarding TnI, for example, we counted raw numbers as follows: total number of nuclei of all cells (total); GFP-positive cells (A); GFP-negative cells (B); TnI-positive cells, GFP-positive and TnI-positive cells (C); GFP-negative and TnI-positive cells (D); and chimeric rate (R), Table 1, Figure 1. Using all these raw data, we calculated bone-marrow-derived and GFP-negative cells (E):

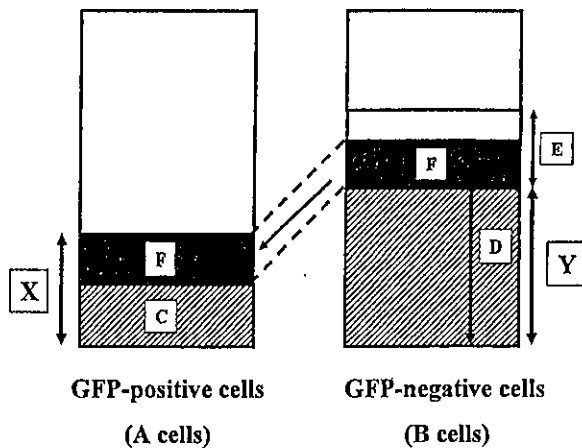
$$\text{Bone-marrow total cells} \times R = A$$

$$\text{Bone-marrow total cells} = A/R$$

$$\text{Bone-marrow-derived and GFP-negative cells} = A/R$$

$$- A = E$$

We calculated the proportion of the TnI-positive cells derived from bone marrow (X) and those derived from non-bone marrow (Y) and made pie charts. We also calculated the proportions of 2 derivations of nestin- and Ki67-positive cells using this method.



**Figure 1.** The contribution of cells of bone-marrow origin and those of non-bone-marrow origin to constitute certain protein-positive cells. Actual cell numbers are as follows: A, the number of green fluorescent protein (GFP)-positive cells. B, the number of GFP-negative cells. C, The number of GFP-positive and certain protein-positive cells. D, the number of GFP-negative and certain protein-positive cells. E, the number of bone-marrow-derived and GFP-negative cells. F, the number of GFP-negative and certain protein-positive cells. X, the number of certain protein-positive cells derived from bone marrow. Y, the number of certain protein-positive cells derived from non-bone marrow. E, F, X, Y were calculated using the equations in Table 1.

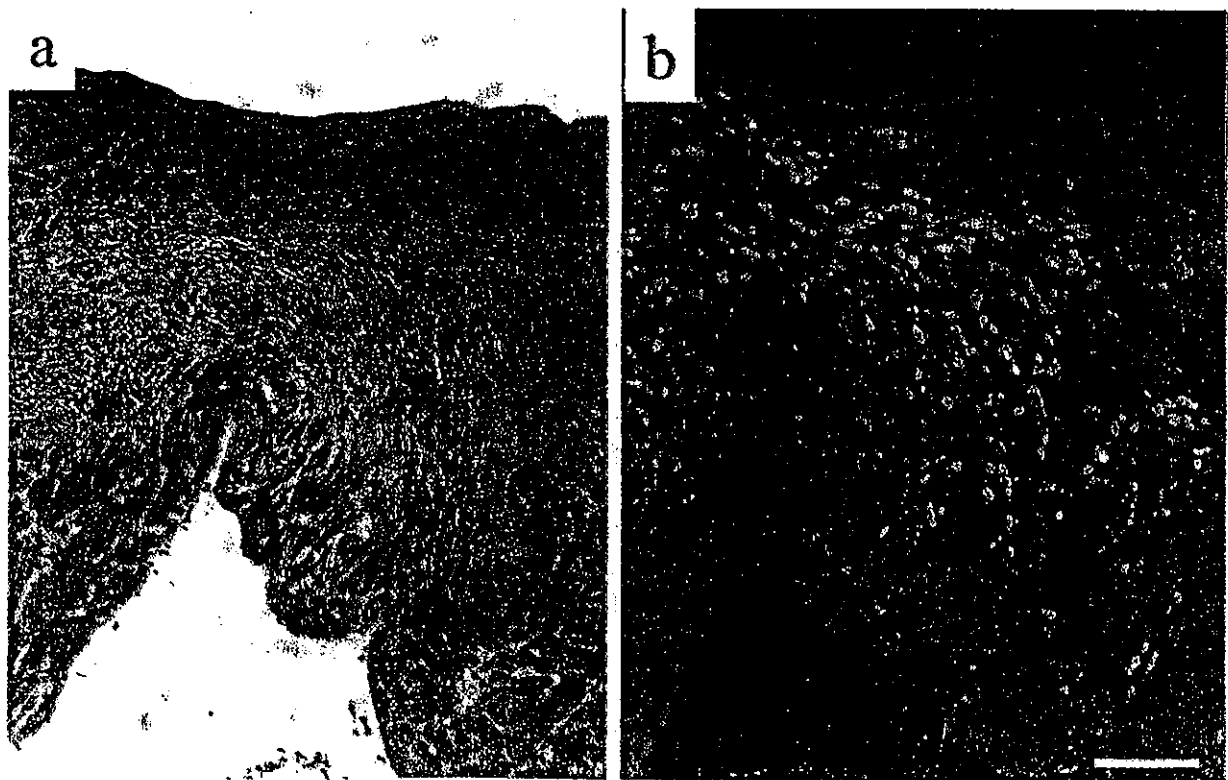
## RESULTS

### Migration of Bone-marrow-Derived GFP-positive (BMD-GFP) cells.

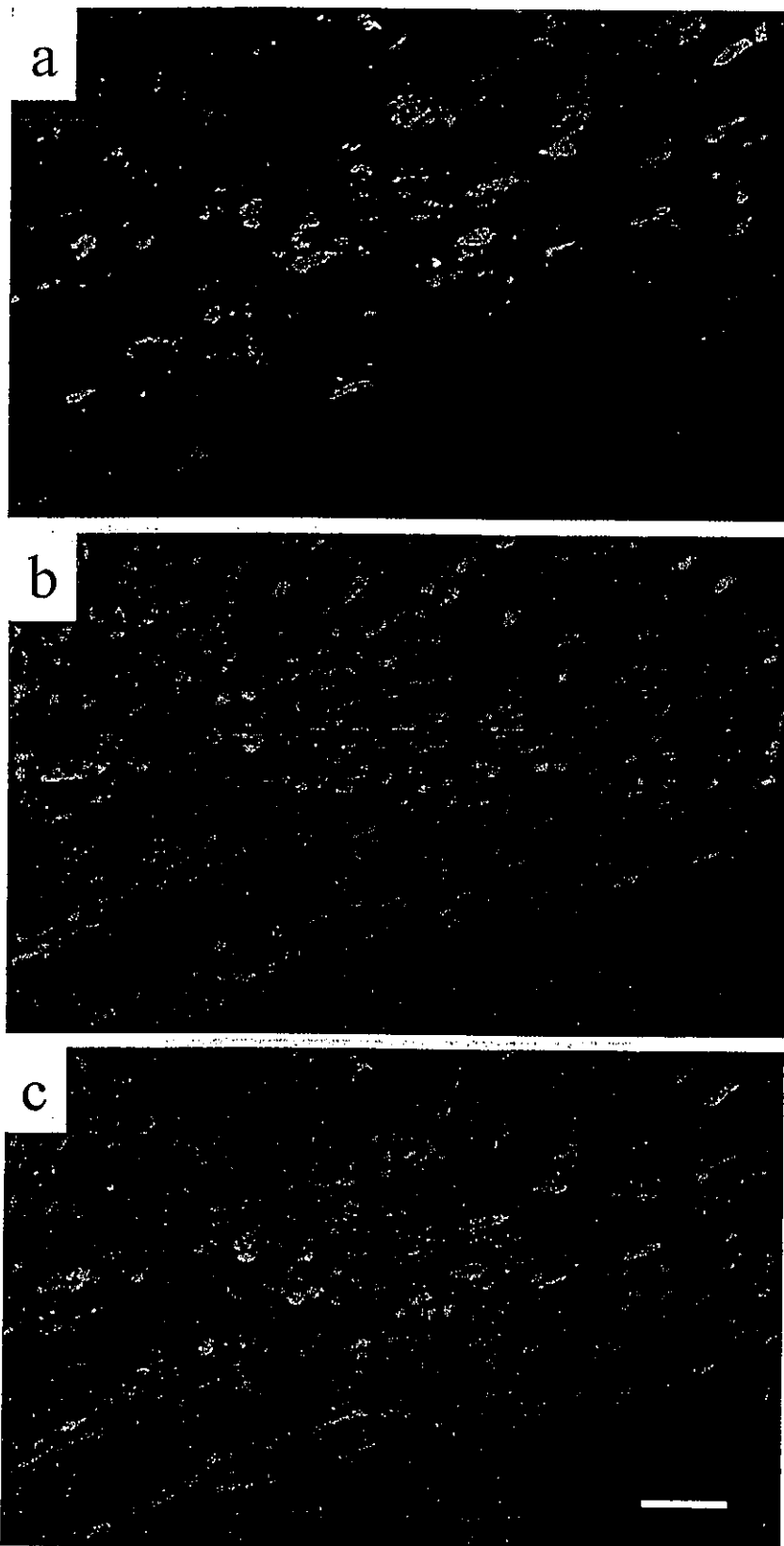
All values were expressed as means  $\pm$  SE. We compared BMD-GFP cell migration into the infarction border with the center of the infarcted area (Figure 2). The total cell number at the infarction border was  $1000.3 \pm 56.5/\text{mm}^2$ . Bone-marrow-derived GFP cells constituted a relatively large number of cells at the infarction border,  $103.3 \pm 13.1/\text{mm}^2$  (Figure 3). The migrated BMD-GFP cells were spindle shaped or cylindrical shaped. The BMD-GFP cells differentiated into TnI-, nestin-, and Ki67-positive cells (Figure 4).

### Contribution of Bone Marrow

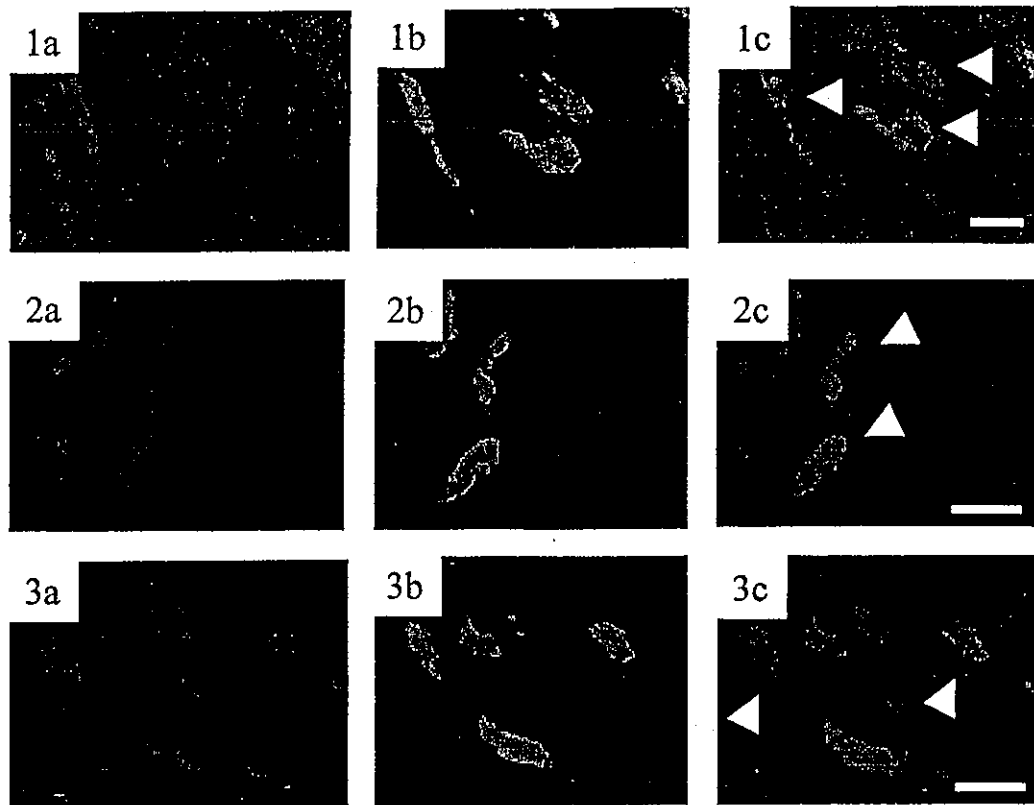
We calculated the contribution of bone-marrow-derived TnI-, nestin-, and Ki67-positive cells at the infarction border. The chimeric rate was  $54.6\% \pm 5.9\%$ . After compensation for the chimeric rate, the number of bone-marrow-derived and TnI-positive cells was  $23.9 \pm 4.1/\text{mm}^2$ , the number of nestin-positive cells was  $12.9 \pm 2.6/\text{mm}^2$ , and the number of Ki67-positive cells was  $18.3 \pm 2.6/\text{mm}^2$ . We found large differences in the contribution of TnI- ( $6.7\% \pm 1.7\%$  vs  $93.3\% \pm 1.7\%$ ), nestin- ( $2.4\% \pm 0.5\%$  vs  $97.6\% \pm 0.5\%$ ), and Ki67-positive ( $3.9\% \pm 1.0\%$  vs  $96.1\% \pm 1.0\%$ ) cells between



**Figure 2.** The bone-marrow-derived green fluorescent protein (BMD-GFP) at the infarcted border area. The BMD-GFP migrated into the infarcted border area under fluorescent microscopy (a, hematoxylin-eosin; b, GFP). Scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3.** The distribution of bone-marrow-derived green fluorescent protein (BMD-GFP) at the infarcted border area. The total number of cells was that of the 4',6-diamidino-2-phenylindole-positive nuclei. Many BMD-GFP migrated into the infarcted border area under fluorescent microscopy (a, GFP; b, DAPI; c, merged image). Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4.** Several differentiations of bone marrow–derived green fluorescent protein (BMD-GFP) at the infarcted border area. Each picture is a red (a), green (b), and merged (c) picture under fluorescent microscopy. Yellow cells (arrowheads) indicate BMD-GFP expressing a certain protein. Troponin I–positive BMD-GFP (1c), nestin–positive BMD-GFP (2c), and Ki67–positive BMD-GFP (3c) were observed at the infarcted border area. Scale bar represents 30  $\mu$ m.

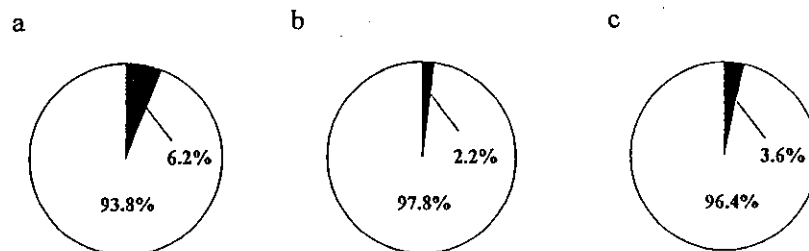
those of bone-marrow origin and those of non–bone-marrow origin, respectively (Figure 5).

**DISCUSSION**

Recently Anversa’s group reported that adult cardiomyocytes re–entered the cell cycle in the injured heart<sup>4</sup> and that G-CSF promoted the migration of primitive cells into the infarcted heart.<sup>5</sup> This finding suggested that the injured heart may possess self–renewal ability or that a chemokine may be able to draw primitive cells into the infarcted heart. The primitive–cell origin was uncertain. We confirmed that bone marrow was one of the origins

of these migrated cells and that they differentiated into cardiomyocytes after myocardial infarction.<sup>6</sup> In several recent studies, host cells have been shown to contribute to some degree to the regeneration of neomyocardium in transplanted hearts (0.04%–16%).<sup>11–13</sup> However, we still do not know to what degree bone-marrow–derived cardiomyocytes contribute to regenerating neomyocardium in myocardial infarction. Therefore, in this study, we investigated this issue using GFP–tagged bone-marrow cells in the infarction model.

After myocardial infarction, necrosis of cardiomyocytes results in cardiac dysfunction. Some believe that



**Figure 5.** Pie charts of the contribution of bone-marrow cells and non–bone marrow cells (black, bone-marrow origin; white, non–bone-marrow origin). The percentage of cells of bone-marrow origin was very small compared with that of cells of non–bone-marrow origin in 3 immunohistochemistry expression (a, troponin I; b, nestin; c, Ki67).

neocardiomyocytes could compensate for this loss of myocytes and improve cardiac function. Orlic et al<sup>5</sup> suggest that G-CSF induces stem cells to mobilize into areas of myocardial infarction. Our findings clarify the proportional contribution of cells from these 2 sources. The proportion of bone-marrow-derived cardiomyocytes was only 6% at the border zone. Only 2% of the nestin-positive cells (stem cells) were of bone-marrow origin. In contrast, 98% of those cells were derived from non-bone marrow, maybe host myocardium. Ninety-six percent of Ki67-positive cells were derived from non-bone-marrow cells. Although we showed that bone marrow was 1 of the origins of neomyocardium,<sup>6</sup> their relatively minor contribution suggests that bone-marrow-derived cardiomyocytes may not be a major factor in the support of cardiac function after infarction, at least not directly. Instead, these observations suggest that G-CSF could directly affect the host myocardium to mediate the preservation of cardiac function. We now are investigating this direct effect of G-CSF on host myocardium in another study.

There are several limitations in this study. First, we used cell nuclei to calculate the cell number. Second, we did not investigate the relation between the dose of G-CSF and the magnitude of the contribution of bone-marrow-derived cardiomyocytes. Third, we do not know how G-CSF acts on the myocardium.

In conclusion, we identified the proportional contribution of bone-marrow-derived cardiomyocytes to the regeneration of myocardium after infarction and found it to be minor compared with that of non-bone-marrow-derived cells.

The authors thank Ms. K. Hattori for her help in breeding GFP mice. We also would like to thank Dr. Michael Byrom (Green Lane Hospital, New Zealand) for proofreading.

## REFERENCES

1. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, et al. Recruitment of bone-marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999;199:391-6.
2. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100:II247-56.
3. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
4. 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.
5. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10344-9.
6. Fukuhara S, Tomita S, Ohtsu Y, et al. G-CSF promoted bone marrow cells to migrate into infarcted heart, and they differentiated into cardiomyocytes. *Circulation* 2002;103:II-376.
7. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;407:313-9.
8. Ikawa M, Yamada S, Nakanishi T, Okabe M. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr Top Dev Biol* 1999;44:1-19.
9. Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem* 1995;43:843-7.
10. Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem* 1991;66:297-302.
11. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5-15.
12. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart; a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003;107:1247-9.
13. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 2002;90:634-40.



## 細胞療法による心筋再生を目指した 心不全治療法の開発

国立循環器病センター研究所 再生医療部 富田伸司  
国立循環器病センター 臓器移植部 中谷武嗣

### はじめに

薬剤抵抗性の重症末期的心不全患者に対して、心臓移植は有効な治療法であるが、ドナー不足のために手術例数は著しく制限されている。これまでドナー不足解消のためさまざまな研究がなされてきた。例えば、人工心臓はブリッジユースの有効性は認められるものの、血栓性や感染の問題が存在し心臓移植に替わるものはまだない。また、異種移植では免疫制御や異種-人間のウイルス移行の問題など解決すべき難問が存在する。左心室部分切除 (Batista) 手術では、2年生存率が55%であるなど一般的手術というには問題が残る。新生血管治療としては、レーザー治療 (TMLR: transmyocardial laser revascularization) や血管新生因子 (VEGF, FGF, HGF など) が研究されている。レーザー後の炎症反応が局所の血流改善に寄与している可能性はあるが、狭心痛の消失は血管新生というよりむしろ除神経による影響が大きいと考えられている。一方、慢性虚血イヌモデルで冠動脈に VEGF を投与した場合、毛細血管の増加することなどが報告された。このような血管新生因子の臨床応用化には、体全体の血管新生を誘発し、脳・網膜などで重大な出血を引き起こす危険性をはらんでいる。また腫瘍形成に影響する可能性もある。naked DNA またはウイルスベ

クターを使用する際に、DNA の安定性の問題や免疫応答や腫瘍発現などの問題が存在する。

1980年代に、広背筋をフラップとし不全心の周囲に巻き付け、骨格筋をトレーニングし心筋を補助する、いわゆる dynamic myoplasty の研究が盛んに行われた。その後、臨床研究では目立った成果は上がっていない。そのような状況下で、この広背筋のような骨格筋を細胞レベルに細分し心筋内へ移植した場合、移植細胞が心筋化し、心機能が改善するのではないかという仮説のもとに、重症不全心に対する細胞移植の研究がスタートしたり。さまざまな障害で心筋細胞が死滅し減少した障害心に対して、exogenous な筋 (源) 細胞を補充してやることにより、再生組織を構築し、ホストと電気生理学的に結合させることで同期収縮させ、全体の心機能を改善させることが目標である。

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

[Key words] 心筋再生, 細胞移植, 自己心筋再生能, 臨床応用, 拡張型心筋症

また、ラット胎児心筋細胞 (fetal cardiomyocyte) も盛んに研究されている。心筋の性質を維持しつつ比較的容易に培養できることや、心筋細胞であるためホストとの関係も良好ではないかという想定などにに基づき、研究材料として有用である。1992年に心筋内への移植細胞の生着とホストとの組織学的な電気生理学的結合が示され<sup>3)</sup>、1994年頃から、細胞移植による心機能改善効果が示された<sup>4)</sup>。しかし、いざ、同様の細胞種を臨床用に入手しようとする、現状では不可能である。理想的には胎児心筋細胞のように、心筋の性格を持ちつつ増殖可能なものが望まれる。その候補として、ES細胞由来心筋細胞などもあるが、倫理的問題が臨床応用への障壁となっている。

もう1つの細胞移植の大きな潮流として、Tufts大でAsaharaらがEPCを開発し<sup>5)</sup>、Muroharaらが骨髄単核球細胞移植を導入し<sup>6)</sup>、虚血性心疾患に対するEPCまたは骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生という概念が、日本国内の循環器内科を中心に急速に広がった。

一方は筋肉細胞を補充することによる心機能の改善を期待するものであり、一方は血管新生を目指し、虚血領域の改善をめざすものである。さらに、現在では、血管・心筋新生に貢献する成体幹細胞の開発へと流れは移りつつある。

## 骨髄細胞 (bone marrow cell)

1999年に、骨髄から心筋細胞が分化誘導されるという報告がなされ<sup>7,8)</sup>、心筋新生の源を骨髄へ求める動きが活発となった。さらに筆者らは、ブタ心筋梗塞モデルにおいて細胞移植後移植細胞が心筋様組織を構築することや、左心室全体と局所の心筋収縮能の改善や、血流改善などをMIBI (<sup>99m</sup>Tc sestamibi SPECT imaging) にて確認した<sup>9)</sup>。他報告では dystrophic mdx mouse の末梢血管から骨髄細胞を移植した場合、心筋組織へ移植細胞が取り込まれ、心筋細胞へ分化することが示された<sup>10)</sup>。全骨髄細胞から移植細胞分画を特に選別しない場合、骨や軟骨などの不要な細胞へ

分化することが危惧される。細胞側の条件 (分画、濃度、数) やホスト側の条件により状況は変わりうるものと考えられ、詳細な検討が待たれる。骨髄のなかには造血幹細胞とともに間葉系幹細胞が存在するとされ、適切な条件により骨・軟骨・脂肪細胞へ分化誘導が可能となった<sup>11)</sup>。骨髄細胞は継代培養していくと通常接着能の弱い造血幹細胞は自然に除去され、線維芽細胞に似た細胞となり、いわゆる“間葉系幹細胞”と呼ばれている。間葉系幹細胞に対する抗体が存在しないことが、この分野の進歩を遅らせている原因といえる。最近ではさらに骨髄細胞から中枢神経細胞や肝細胞に分化しうることも報告され、間葉系幹細胞よりさらに上流のES細胞と同等の内・外・中胚葉系細胞に分化しうる細胞 (成人幹細胞: adult stem cell) の存在が報告されつつある。標識された移植骨髄細胞が一度ホストの骨髄へホーミングし、さらに下肢虚血部へ遊走し血管<sup>5)</sup>や骨格筋へ分化してゆくことなど報告されており、もはや骨髄は造血系細胞と間葉系細胞という枠組みを超えて、ES cell と同等の分化能を有する細胞を含む heterogeneous な自己再生担当細胞集団といえる可能性がある。

細胞移植のソースとして骨髄細胞を考えた場合、他細胞に比べ多くの利点を有する。骨髄穿刺は临床上通常手技としてすでに確立されており、自己細胞であるため免疫拒絶反応を回避し、倫理的に問題なく利用が可能になると考えられ、大変将来性があると思われる。

## 心臓内環境因子

Chiuらは、骨髄細胞の心筋分化誘導に対する cardiac milieu (環境因子) の重要性や、connectin43の発現などを報告し、骨髄細胞が骨格筋芽細胞に比してより心筋細胞に近く機能する可能性を示した<sup>12)</sup>。ヒト間葉系幹細胞をヒツジ胎児に移植すると site-specific differentiation が起きることや<sup>13)</sup>、Lin-c-kit+細胞が心筋内で心筋細胞・平滑筋細胞・血管内皮細胞に分化することが

報告された<sup>14)</sup>。これらの背景には、環境因子の存在が推察されている。しかし、細胞間情報伝達・電気刺激・圧刺激などのさまざまな因子が複雑に絡み合った *in vivo* の現象を解析するのは現状では困難である。

もし、この現象を *in vitro* で模擬化することができれば、心筋分化誘導の現象の把握とその利用に大きく貢献すると著者らは考えた。ラット新生児心筋細胞をホストの心筋 (CM) と見立て、green fluorescent protein 発現遺伝子組み換えマウス (GFP マウス) 由来の骨髄細胞 (GFP-BMC) を移植細胞と見立てて、共培養実験系を考案した。GFP-BMC 単独培養や GFP-BMC と CM を隔壁を置いた double chamber 培養では、GFP-BMC に特に変化はみられなかった。それに対し、GFP-BMC と CM を混合した共培養系では、ある GFP-BMC は、2 日後から CM と同期収縮を開始するものが現れた<sup>15)</sup>。また、免疫組織染色では、myosin heavy chain-slow (1 日後から)、connexin43 と ANP (2 日後から)、tropoin I (4 日後から) が経時的に発現し漸増した。5 日後には myosin heavy chain-slow 陽性細胞はおよそ 2.5% になった<sup>16)</sup>。この結果、幹細胞の心筋分化には、ホストの心筋細胞との直接接着が重要な役割を果たしていることが判明した。今後、このシステムを用いることにより、心筋分化誘導因子の発見、単離が可能になれば、心筋再生の分野で大きく貢献することが期待される。

## 心機能改善のメカニズム

梗塞心モデルでは瘢痕部と左心室腔が拡大を続けるのに対し、心筋細胞移植では、4 週間後有意に減少した<sup>4)</sup>。Langendorff 灌流装置により移植群で収縮期、developed pressure の高値を認めた。これは Laplace の原理によると考えられている ( $t = Pr/w$ 、 $t = \text{wall stress}$ 、 $P = \text{左心室内圧}$ 、 $r = \text{左心室腔径}$ )。移植細胞が瘢痕部の壁厚を増大させ、左心室腔の縮小が左心室全体の wall stress の低下をもたらし、心機能の改善を起こしたこと

が推測される。換言すれば、瘢痕部の細胞密度を高めることで物理的にコンプライアンスを低下させ、瘢痕部の伸展が制御されたことが予想される。

さらに病巣部局所の収縮機能および拡張能が細胞移植後に改善したという報告もある<sup>17)</sup>。これには、細胞移植に起因する血管新生による残存心筋の賦活化と移植細胞そのものの機能化が考えられるが、この 2 者を完全に分けて分析することは不可能である。瘢痕部中央部に移植細胞が存在したとしても線維組織によりホストと隔絶され、電気生理学的にホストと同時収縮しているかどうかは疑わしい。

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

細胞移植による血管新生に起因する局所の血流量の増大は、(1) hibernation を起こしている心筋細胞の機能を回復させる可能性、(2) 移植細胞そのものの長期生存のためになると考えられる。虚血領域における移植部位の新生血管の由来としては、もともと潜在する血管内皮細胞・循環型血管内皮前駆細胞<sup>5)</sup>・移植細胞自体<sup>8)</sup>からきたものなどが考えられている。

autocrine あるいは paracrine 作用のある growth factor の可能性が予想されるが詳細は不明である。どの細胞種でも心機能改善効果があることなどからも、移植細胞そのものよりホストに与える影響の方が心機能全体に寄与する割合が多いのかもしれない。

細胞移植により障害心の心機能が回復したという報告は多い。心機能改善の因子は多岐にわたり、それぞれがどのような比率で心機能に関与しているか今後明らかにされれば、患者の病態に応じた細胞の選択も可能になるであろう。

## 細胞移植全般における諸問題

手術時に直視下に病的部位を同定し、直接針によって注入する方法が実験では中心である。しかし、臨床の現場を考えた場合、非侵襲的なカテーテル操作による心室内からの注入法の方が、開胸操作よりも患者に対し負担をかけずにすむ。しかし、病巣部の同定や確実な注入に関しては研究を積み重ねる必要がある。他に、骨髄細胞の特性としては末梢血管からの移植が可能である。これには、いかに病巣部へ効果的に到達させられるかなどの課題が存在する。

瘢痕部を再生組織で置換することで心機能を改善することが目標であるが、そのために必要な細胞数の決定には多因子が考えられる。まず、虚血部への細胞移植時には、移植された細胞は十分な血流や栄養のない状態で生存生着することが必要である。この細胞生着率を上げることは、移植後の構築の面からも大変重要な問題である。最近移植前に前処置する方法などが研究されている。また移植細胞の *in vivo* での増殖能の動向がいかなるものか詳細は不明である。もし、無制限に増殖した場合には腫瘍を形成することになってしまう。ほかには、実際の適正な移植細胞量の問題も存在する。仮にラット全心臓重量に対し、0.06 ml の細胞を注入した場合、ヒトに換算すると、約 6 ml の細胞塊が必要となる。しかし、現実的には一度に 6 ml 相当を注入した場合、周囲の収縮により心臓から外部へ漏出するか、塞栓症を引き起こす危険性がある。このような多くの因子を考慮したうえで、移植細胞量の決定が必要であろう。

臓器再生の新たなステップとして、機能的な“組織”の構築が必要であると考えられている。臨床応用の可能性としては心筋梗塞後の左心室瘤症例がある。現行の手術法では術後低拍出量症候群などの問題が危惧される。病巣部を機能的な人工心筋組織で置き換えることで、予後の改善を期待できる。この技術が確立されれば、先天性心疾患の外科治療への応用や新しい心臓補助装置の開

発にもつながる。Liらは、ラット胎児心筋細胞を、組織を作る“場”としての生体材料に播種することで、自己拍動能を有するパッチを開発し、*in vitro* および *in vivo* で機能を有することを示した<sup>18)</sup>。また Leor らは多孔性の生体材料にラット胎児心筋細胞を播種し血管新生と左心室の拡大の抑制を示した<sup>19)</sup>。しかし現実の問題として、生体材料が吸収消失した時点での人工組織が、心臓内圧に耐えられるのかなど課題も多い。

2000年6月からフランスの Menasche らによって、自己骨格筋芽細胞を用いた虚血心筋への細胞移植臨床第1例が施行され、phase I 臨床研究が終了した<sup>20)</sup>。10例中4例のVTに対してAICD埋め込み術を施行した。これまで、細胞移植の研究分野において、詳細な細胞移植による不整脈の副作用は報告されていない。これは検出方法やモデルに再考の余地が残しているといえる。exogenousな細胞群を突然心筋内に打ち込み、都合のいいように電気的に接合し同期収縮するのか、あるいは不完全に接合したことをきっかけにして不整脈の誘因になるのか、今後の研究を待たなければならない。

## 拡張型心筋症への細胞移植の応用

拡張型心筋症 (idiopathic dilated cardiomyopathy: DCM) への細胞移植に関する研究は虚血性心疾患に対するものと比し極端に少ない。これは、虚血性心疾患は世界で増加傾向であり、最大の課題の1つであるということ、また、各種動物モデルが存在することなどがその理由に上げられる。

一方、DCMは心臓移植適応患者の主なものとして大変重要な疾患であるが、いまだ原因が特定されないこと、擬似モデルは動物で存在するが、ヒトDCMと全く同等のものは存在しないことなどから、細胞移植の非虚血性心筋症に対する研究は大変少ない。Scorcinらはdoxorubicinによるマウス心不全モデルに対し胎児心筋細胞移植を施行し、1ヵ月後エコーにて移植群で良好な心機能

を確認した<sup>21)</sup>。Yooらは、BIO53.58ハムスター DCM モデルに対して心室筋細胞移植を行い、移植群において Langendorff 灌流装置で良好な心機能を得た<sup>22)</sup>。移植細胞は筋肉組織を構築し、左心室腔の拡大を制限した。しかしながら、虚血モデルと同じく心機能改善のメカニズムは不明である。

当センターでも左心補助人工心臓 (LVAS) を装着している心臓移植待機患者が常時十名前後いるが、そのほとんどが DCM であり、これまでに 6 例の離脱例を経験した<sup>23)</sup>。このような重症疾患群に対する LVAS と細胞移植併用療法を臨床応用化することを目標にして蓄積的研究を進めている。細胞移植の臨床応用を現実と考えた場合、術後早期に細胞移植手技そのものの治療効果を期待することはできない。むしろ、悪影響 (不整脈・心機能低下) が懸念される。その際に、LVAS のバックアップにより安全性が確保されるという面は、大きな利点である。また、細胞移植の効果がみられるまでの 3 ヶ月から 6 ヶ月間を LVAS の補助のもとに経過観察できることから、方法論として十分現実可能性があると考えられる。

## 自己再生能のコントロール

成人の心筋細胞は一度障害を受け死滅した場合、増殖再生をしないと長い間信じられてきた。1998 年頃から Anversa らが、成人心筋細胞もまた分裂増殖するという有力な証拠を報告した<sup>24)</sup>。この報告は、endogenous な幹細胞による自己再生能という新たな分野を開くものとして注目されている。心臓の場を十分認識した状態で endogenous な細胞を人為的に賦活化することができれば、もはや exogenous な細胞移植という方法論が不要になる可能性を秘めている。

しかし、現在も心筋内で再生像 (増殖) を持つ心筋細胞が、心筋または骨髄由来なのか、その両方なのか、そしてその現象は病的な心筋が機能的に回復するだけの能力があるのかなど、これから解決されるべき問題は多い。

また、Sata らは、造血幹細胞が動脈硬化に寄与するという警鐘を鳴らす報告をした<sup>25)</sup>。今後さらに体内で行われている生命現象の解明を行い、その上で適切にコントロールすることが重要である。

## おわりに

exogenous な細胞移植の研究が盛んである。また、endogenous な自己心筋再生の研究も始まった。この再生医学という新たな分野は急速な進歩が推測されるが、その健全な発展がなされるためにも、倫理面・法律面の整備が急がれるべきであろう。

## 文 献

- 1) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy et al: Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992; **1**(6): 383-390
- 2) Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD et al: Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; **149**(3): 731-740
- 3) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG et al: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; **264**(5155): 98-101
- 4) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD et al: Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996; **62**(3): 654-660
- 5) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**(5302): 964-967
- 6) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; **103**(6): 897-903
- 7) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; **103**(5): 697-705
- 8) Tomita S, Li RK, Weisel RD et al: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; **100**(19 Suppl): II247-II256
- 9) Tomita S, Mickle DA, Weisel RD et al: Improved heart

- function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **123**(6): 1132-1140
- 10) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K et al: Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999; **199**(5): 391-396
  - 11) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**(5411): 143-147
  - 12) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J et al: Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; **120**(5): 999-1005
  - 13) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF et al: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; **6**(11): 1282-1286
  - 14) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**(6829): 701-705
  - 15) Tomita S, Fukuhara S, Nakatani T et al: Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **50**(80): 321-324
  - 16) Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S et al: Bone marrow stromal cells can differentiate into cardiac lineage and contract synchronously with cardiomyocytes by direct cell-to-cell interaction in vitro. 82nd AATS Annual Meeting 2002: F16
  - 17) Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP et al: Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; **109**(3): 245-253
  - 18) Li RK, Yau TM, Weisel RD et al: Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; **119**(2): 368-375
  - 19) Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; **102**(19 Suppl 3): III56-III61
  - 20) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; **357**(9252): 279-280
  - 21) Scorsin M, Hagege AA, Dolizy I et al: Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? *Circulation* 1998; **98**(19 Suppl): II151-II155
  - 22) Yoo KJ, Li RK, Weisel RD et al: Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation* 2000; **102**(19 Suppl 3): III204-III209
  - 23) Nakatani T, Sasako Y, Kobayashi J et al: Recovery of cardiac function by long-term left ventricular support in patients with end-stage cardiomyopathy. *ASAIO J* 1998; **44**(5): M516-M520
  - 24) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J et al: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; **344**(23): 1750-1757
  - 25) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; **8**(4): 403-409

## ● 本 論

骨髄由来外因性および内因性幹細胞  
による心筋分化

\*<sup>1</sup> 国立循環器病センター 再生医療部 室長 \*<sup>2</sup> 同 臓器移植部 部長  
富 田 伸 司\*<sup>1</sup> 中 谷 武 嗣\*<sup>2</sup>

## || 要 旨 ||

重症心不全に対する新たな治療戦略として細胞療法が注目を集めている。外部から細胞を心筋内に移植する外因性幹細胞移植と、内在する幹細胞により心筋再生を目指す内因性幹細胞のコントロールの2法が考えられている。その中で、心臓内環境因子は重要な役割を果たしていることが予想されるが詳細は不明である。本稿では自験例を交えてこれら3点について述べる。

## は じ め に

薬剤抵抗性の重症末期的心不全患者に対して、心臓移植は有効な治療法であるが、ドナー不足のために手術例数は著しく制限されている。これまでドナー不足解消のためさまざまな研究がなされてきたが、完全なものはない。

骨格筋を細胞レベルに細分し心筋内へ移植した場合、移植細胞が心筋化し、心機能が改善するのではないかという仮説のもとに、重症心不全に対する細胞移植の研究がスタートした<sup>1)</sup>。成人心筋細胞の大量培養は不可能であることから、それに代わる細胞種の探索が盛んである。

キーワード：心筋再生，骨髄細胞，外因性幹細胞移植，内因性幹細胞，  
環境因子

### 外因性幹細胞移植（exogenous - stem - cell transplantation）

細胞移植のソースとして骨髄細胞を考えた場合、他細胞に比べ多くの利点を有する。骨髄穿刺は臨床上通常手技としてすでに確立され、自己細胞であるため免疫拒絶反応を回避しえ、倫理的に問題なく利用が可能である。

骨髄の中には造血幹細胞とともに間葉系幹細胞が存在するとされ、適切な条件により骨・軟骨・脂肪細胞へ分化誘導が可能となった<sup>3)</sup>。骨髄細胞は経代培養していくと、通常接着能の弱い造血幹細胞は自然に除去され、線維芽細胞に似た、いわゆる“間葉系幹細胞”を含む集団となるが、経時的に表面抗原が変化することや、間葉系幹細胞に対する抗体が存在しないことなどから、この分野の進歩が遅れている。

1999年に、骨髄細胞から心筋細胞へ分化誘導されるという報告がなされ<sup>34)</sup>、心筋再生の源を骨髄へ求める動きが活発となった。さらに筆者らは、ブタモデルで左心室全体と局所の心筋収縮能の改善や、血流改善などを MIBI (<sup>99m</sup>Tc sestamibi SPECT imaging) にて確認した<sup>5)</sup>。他報告では末梢血管から骨髄細胞を移植した場合、心筋組織へ移植細胞が取り込まれ、心筋細胞へ分化することが示された<sup>6)</sup>。全骨髄細胞から移植細胞分画を特に選別しない場合、骨や軟骨などの不要な表現型（phenotype）へ分化することが危惧される。細胞側の条件（分画、濃度、数）やホスト側の条件により状況は変わりうるものと考えられ、詳細な検討が待たれる。

最近ではさらに特定の細胞群である Lin-C-kit<sup>+</sup>細胞<sup>7)</sup>や SP（side population）細胞<sup>8)</sup>による心筋分化が報告され、骨髄全体から狭い範囲に絞られてきた。しかし現段階では、ヒト骨髄細胞から効率良く心筋芽細胞、あるいは幹細胞を選択し培養する技術は確立されていない。

ホストとドナーの電気的結合によりポンプ機能を改善することは細胞移植の最終目標であるが、不完全に接合したことをきっかけにして不整脈の誘因になるという問題点も指摘されている。フランスの Menasche らは、自己骨格筋芽細胞を用いた虚血心筋への細胞移植に関する第 I 相臨床試験を終了したが、10 例中 4 例に対して心室頻拍



(VT) 出現のため植込み型除細動器 (AICD) 埋め込み術を施行した<sup>9)</sup>. この結果を判断するには, さらなる詳細な研究結果を待たなければならない.

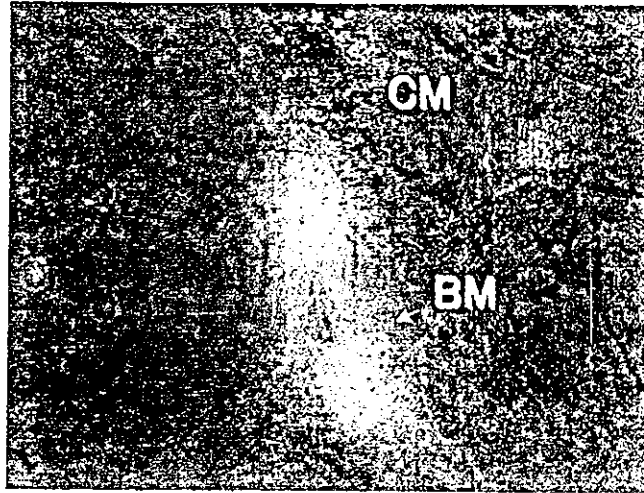
#### 内因性幹細胞 (endogenous - stem - cell) による心筋再生

成人の心筋細胞は一度障害を受け死滅した場合, 増殖再生をしないと長い間信じられてきた. 1998 年頃から Anversa らが, 成人心筋細胞もまた分裂増殖するという有力な証拠を報告した<sup>10)</sup>. この報告は, 体内に存在する幹細胞 (内因性幹細胞) による自己心筋再生能を示すものとして注目されている. 外因性細胞と異なり, 外科的手術, 体外増殖させるための施設は不要であるために, 汎用性が高いと考えられる. この内因性幹細胞の働きを人為的に賦活化することができれば, もはや外部からの細胞移植という方法論が不要になる可能性を秘めている.

Orlic らが, この幹細胞を賦活化するために, 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) と幹細胞因子 (SCF) をマウス急性心筋梗塞モデルに投与したところ, 心機能の改善, 生存率の改善を報告した<sup>11)</sup>. しかし, 再生された心筋がホストの心筋由来か骨髄由来かについての詳細は不明である. そこで我々は, この内因性幹細胞は骨髄由来であるという仮説を証明するため, GFP 遺伝子組み替えマウス由来骨髄細胞 (GFP-BMC) を放射線照射後の C57b6 マウスに移植し, キメラマウスを作成した<sup>12)</sup>. 心筋梗塞 1 ヶ月後には, G-CSF 投与群において, 生存率の改善傾向が認められた. G-CSF 投与群において, 心筋梗塞境界部には, GFP-BMC 数がコントロール群に比し有意に増加した. その GFP-BMC のうち, 約 20% がトロポニン I 陽性細胞であった. また, ネスチン陽性細胞も多数認めた. この研究結果から, 再生心筋の細胞起源の一つは骨髄であり, G-CSF によりその効果が増強されることが示唆された.

しかし, 解決されるべき課題も存在する. 骨髄細胞による心筋再生現象は事象としてとらえられたが, これらの再生心筋群が心筋全体に生理学的に心機能を回復させるだけの意味を持つものなのか不明である. また, これらの実験系は急性心筋梗塞モデルであり, 慢性の虚血

図1 骨髄細胞と心筋細胞の同期収縮



骨髄細胞（BM，緑色）が心筋細胞（CM）と共培養開始2日後同期収縮を開始した。（×200）

性心不全に対する有効性に関しては不明である。

また，Sataらは，造血幹細胞が動脈硬化に寄与すると報告した<sup>13)</sup>。本来心筋梗塞を起すような患者は，全身性に動脈硬化を伴っていることが考えられるが，仮に，内因性幹細胞が心筋を再生する反面，動脈硬化巣に遊走しプラーク破綻を来す危険性をはらんでいるのであれば，大きな問題である。

内因性幹細胞の応用は，このような体内での生命現象の解明を行ったうえで，それをうまくコントロールしていくことが大切である。

### 心臓内環境因子

諸家の報告<sup>7)14)</sup>で，幹細胞の心筋分化における環境因子の重要性が指摘されている。しかし，詳細は不明である。

筆者らは，ラット新生児心筋細胞をホストの心筋（CM）とし，GFP-BMCを移植細胞と見立てて，環境因子の一つが細胞同士の直接接着であるという仮説を立て，共培養実験系を考案した。GFP-BMC単独培養やGFP-BMCとCMとの間に隔壁を置いたdouble chamber培養では，GFP-BMCに特に変化は見られなかった。それに対し，GFP-BMCとCMを混合した共培養系では，あるGFP-BMCは，2日後からCMと同期収縮を開始するものが現れた<sup>15)</sup>（図1）。また，免疫組織染色では，myosin heavy chain-slow（1日後から），コネキシン43と心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）（2日後から），トロポニンI（4日後から）が経時的に発現し漸増した。

5日後には myosin heavy chain - slow 陽性細胞はおよそ 2.5% になった。この結果、幹細胞の心筋分化には、ホストの心筋細胞との直接接着が重要な役割を果たしていることが判明した。

2002年に、細胞融合 (cell fusion) の問題が2研究施設から同時に報告された<sup>10)</sup>。ES細胞と GFP マウス由来骨髄細胞との共培養により、一見 GFP を発現した細胞が分化増殖するよう見えるが、その細胞の核内には ES 細胞由来の DNA も含んでいるというものである。この報告により、体性幹細胞は従来期待されたよりも、分化能、増殖能の両面において、劣るのではないかという風潮も見られるようになった。しかし、現在の情報のみで、体性幹細胞の可能性を完全否定するには時期尚早である。今後、内因性であれ外因性であれ、それらの細胞が心筋内でホスト細胞とどのようなかかわりを持って行動するのか興味のあるところである。

#### 文 献

- 1) Marelli D, et al: Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1 (6): 383-390, 1992.
- 2) Pittenger MF, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411): 143-147, 1999.
- 3) Makino S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103 (5): 697-705, 1999.
- 4) Tomita S, et al: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 (19 Suppl): II247-II256, 1999.
- 5) Tomita S, et al: Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 (6): 1132-1140, 2002.
- 6) Bittner RE, et al: Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 199 (5): 391-396, 1999.
- 7) Orlic D, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 (6829): 701-705, 2001.
- 8) Jackson KA, et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 (11): 1395-1402, 2001.
- 9) Menasche P, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357 (9252): 279-280, 2001.
- 10) Beltrami AP, et al: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344 (23): 1750-1757, 2001.

- 11) Orlic D, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (18): 10344-10349, 2001.
- 12) Fukuhara S, et al: G-CSF Promoted Bone Marrow Cells to Migrate into Infarcted Heart and Differentiate into Cardiomyocytes. *Circulation* 103 [suppl I]: A, 2002.
- 13) Sata M, et al: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8 (4): 403-409, 2002.
- 14) Wang J S, et al: Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120 (5): 999-1006, 2000.
- 15) Tomita S, et al: Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 50: 321-324, 2002.
- 16) Terada N, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 (6880): 542-545, 2002.

---

### Regeneration of Myocardium by Using Exogenous-Stem-Cells and Endogenous-Stem-Cells Derived from Bone Marrow

Shinji Tomita<sup>1</sup>, Takeshi Nakatani<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,  
National Cardiovascular Center

<sup>2</sup> Department of Organ Transplantation National Cardiovascular Center