

得ていない。

このように、メカニズムの詳細に関しては更なる研究が必須となっているが、骨髄由来の細胞の注入療法が血管新生を促進することや心機能を改善することは数多くの報告で確認されており、すでにわが国をはじめ多くの国々で自己骨髄由来の細胞注入療法が臨床応用されているのが現状で、その症例数は数百例に及ぶ¹⁰⁾。これまでの報告では臨床試験として不十分なものが多く、骨髄由来細胞の移植の明確な有効性は示されていないが、近年、ドイツのグループが急性心筋梗塞後にステントを留置した60人の症例を無作為に2群に分け、骨髄単核球の経冠動脈注入をした群としない群の6ヵ月後における心機能を比較検討した。その結果、コントロール群で左室駆出率が51.3→52.0%であったのに対し、治療群では50.0→56.7%と心機能の有意な改善効果認め、骨髄細胞移植の有用性が示された¹¹⁾。またAsaharaらが示したように、末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が存在し、生体内の血管新生に寄与していることから、虚血心筋部位の血管新生促進を目的として、骨髄ではなく末梢血から採取したEPCを使った血管再生療法も追究され、その有効性が示されている^{12) 13)}。

これら骨髄由来の細胞に対し、筋芽細胞を不全心筋に移植する研究も行われてきた。筋芽細胞は自己の筋肉組織から採取が可能であり、虚血に対して耐性があることから使用され、心機能

が改善することが報告されてきた。Menascheらはこれを初めて臨床応用し、自己骨格筋より採取した筋芽細胞の移植と冠動脈バイパス術との併用により心機能が回復することを報告した¹⁴⁾。筋芽細胞の場合は、採取後増殖のため一定の培養期間を要することから、いくつかのベンチャー企業が参画し、筋芽細胞の培養技術の産業化が試みられている。現在、米国、欧州などで治験が進行中である。筋芽細胞移植による心機能の改善効果は、不全心筋のひ薄化およびリモデリングによる心拡大の阻止、サイトカイン分泌による血管新生に起因するものと考えられている。しかしながら、臨床では不整脈により死亡した症例があったため、抗不整脈薬や植え込み型除細動装置の併用が必須となっており、大きな課題となっている。今後、長期遠隔成績を検討するとともに、不整脈発生の機序やその抑制法に関する研究も必須であろう。

一方、将来的な心筋組織再生の細胞ソースとして、ES細胞を使った研究が盛んに行われている¹⁵⁾。これまでにヒトES細胞から拍動する心筋細胞を分化誘導できることは数多く報告され、動物モデルではES細胞から分化誘導した心筋細胞がホストの心臓に生着することも示されている¹⁶⁾。さらにNogginという物質がES細胞をより高率に心筋細胞に分化させ得ることが報告されるなど、ES細胞に対する期待は高まっている¹⁶⁾。ES細胞の使用に関しては、倫理的問題、免疫拒絶、奇

形腫の形成など解決すべき問題も多く、臨床応用に至るには十分な基礎研究と社会的なコンセンサスが必須であるが、その研究は飛躍的に発展しており、将来的に不全心筋に対する細胞移植治療に用いられる日が来るかもしれない。

近年、新たなトピックスとして注目されているのは、心臓に存在する心筋幹細胞である。AnversaおよびSchneiderら2つのグループが、心臓内に心筋細胞に分化増殖する幹細胞が存在し、それを虚血傷害部位に移植すると心筋細胞に分化することを報告した^{17) 18)}。これらの報告はこれまでの常識を覆すものであり、事実であるとする、再生医療のみならず心臓のさまざまな病態のメカニズムについても心臓内幹細胞の関与を検討する必要がある。この心臓内幹細胞の臨床応用に関しては心臓そのものからの採取が必要であり、バイオプシーなど少量のサンプルからいかに分離増殖させるかが課題であろう。

以上、細胞浮遊液の注入療法に関しては、種々の細胞ソースの可能性が示されている。その中で骨髄由来の細胞や筋芽細胞の臨床応用はすでに行われているが、今後さらに大規模なstudyでの有効性・安全性の確認が必要である。さらに細胞種・細胞の単離法(表面マーカーによる選択、単核球や間葉系細胞、培養の有無)・注入法(開胸による心外膜からの注入、NOGAシステムなどを用いた心内膜側からの注入、カテーテルによる冠動脈への注

入)の違いによる有効性の比較検討を行い、最適な治療法を追究していくことが重要と考えられる。

サイトカインを用いた幹細胞の動員

前記したように、骨髄には心筋細胞をはじめ血管内皮細胞、平滑筋細胞など種々の細胞に分化し得る多能性の幹細胞が存在し、必要に応じて流血中に動員され組織の再生に貢献し得ることが示されてきた。そこで、近年、これらの細胞を採取して心筋組織に移植する代わりに、granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)を用いて流血中への幹細胞の動員を増大し、心筋組織の再生を促進させる非侵襲的な治療法が追究されている。すでにG-CSF皮下投与単独による心機能改善効果も報告されている¹⁹⁾。メカニズムに関しては、骨髄からの幹細胞の動員に加え、病変部の心筋細胞そのものに作用し、アポトーシスを抑制することで心機能を改善し得ることが最近になって報告された²⁰⁾。今後の臨床試験における治療効果の評価と併行して、基礎的なメカニズムの解明も重要となっている。

組織工学による心筋再生組織

細胞浮遊液の移植療法では、細胞が互いに解離した状態で組織内に注入されるため、移植場所の制御が困難なことや、流出・壊死により細胞が損失することが新たな課題となっている。また、単離した細胞の移植では、先天性

心疾患など欠損組織に対する治療は不可能である。そこで近年、組織工学の技術を用い、体外で心筋組織を再構築し移植する研究が始まっている²¹⁾。これまでに報告されている方法としては、①生体吸収性高分子からなる支持体を作製し、それを足場として細胞を播種する手法(図2A)、②溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合する手法(図2B)、③シート状の細胞を積層化することで支持体を用いずに三次元組織を作製する方法(図2C)がある。

①の方法としては、生体吸収性高分子の支持体としてメッシュあるいはス

ポンジ状のポリグリコール酸、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸を用いた研究が報告されている。ゼラチンあるいはアルギン酸を使った心筋再生組織に関しては不全心筋モデルへの移植実験が行われ、その生着と心機能の改善が報告されている²²⁾²³⁾。

②に関しては、Zimmermannらがコラーゲン溶液と心筋細胞を混和しシリコーンモールド内で培養することにより、三次元心筋組織を再構築する研究を展開してきた。この研究では、*in vitro*での張力測定ならびに伸展負荷による組織配向性の付与を実現している²⁴⁾。

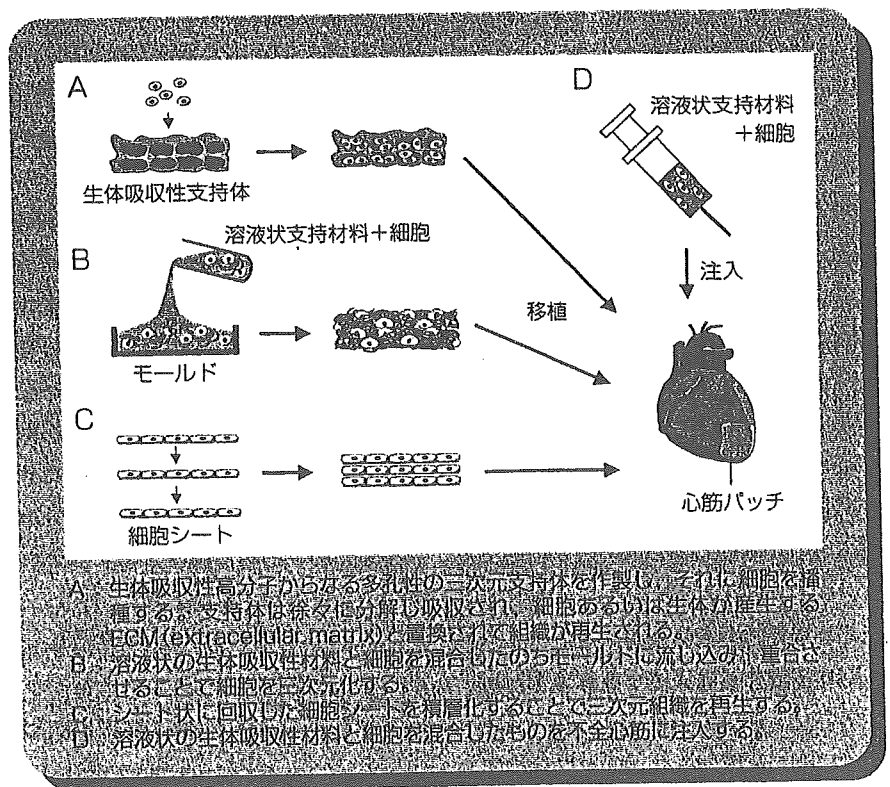


図2 組織工学による心筋組織の再生

A: 生体吸収性高分子からなる多孔性の三次元支持体を作製し、それに細胞を播種する。支持体は徐々に分解・吸収され、細胞あるいは生体が産生するECM(extracellular matrix)が骨格となり組織が再生される。
 B: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したものをモールドに流し込み、重合させることで細胞を三次元化する。
 C: シート状に回収した細胞シートを積層化することで三次元組織を再生する。
 D: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したものを不全心筋に注入する。

一方、③の方法は、我々が独自に開発した細胞シート工学の技術を用いたもので、温度応答性培養皿から温度降下処理のみで回収した細胞シートを積層化することで、支持体を用いることなく三次元組織を再構築できる。この技術により、支持体を用いた場合には作製困難であった細胞密度の高い組織再生が可能であり、支持体の分解に伴う炎症反応を避けることができる。心筋細胞シートを重層化すると、細胞シート間には1時間以内にギャップジャンクションが形成され、同期して拍動することが明らかとなっている²⁵⁾。さらに、積層化により肉眼レベルで同期して自律拍動する心筋組織の再生が*in vitro*および*in vivo*で実現している²⁶⁾。また、積層化心筋細胞シートのラット心筋梗塞モデルへの移植実験により、グラフト-宿主間にギャップジャンクションが形成され、心機能が改善することも確認している(大阪大学大学院医学系研究科 臓器制御外科との共同研究)。

このようなシート状の細胞を積層化することで三次元組織を再生する細胞シート工学は、今まで不可能であったことを可能としており、特に細胞密度が高く細胞が互いにギャップジャンクションを介して連結している心筋組織の再生には極めて有用と考えられ、今後心筋組織の再生に大きく貢献するものとする。実際、細胞シート工学のコンセプトは世界的にも注目を集めており、我々の温度応答性高分子を用いた手法に加え、異なる手法により細胞

シートを回収し心筋組織再生に応用する試みも報告されている。これらの研究も含め我々の提唱してきた細胞シート工学が、再生医療における要素技術として発展するものと考えられる。

上記した三つの手法は、いずれも生体外でパッチ状に心筋再生組織を形成した上で移植しようとするものであるが、細胞浮遊液の移植と心筋再生組織の移植の中間に位置するアプローチとして、溶液状の支持材料と細胞を混合したものを直接不全心筋部に注入する方法も報告されている(図2D)。これにより、細胞浮遊液の移植時に問題となる細胞の損失を軽減できる可能性があり、これまでにフィブリンあるいはコラーゲン溶液と細胞を混和後、不全心筋部に注入することで、心機能が改善することが示されている^{27) 28)}。

心筋の再生学における課題

前記したように、組織工学的手法を用いて三次元的な心筋組織を再構築することは可能となっているが、今後の臨床応用に向けていくつかの課題がある。第一は細胞ソースである。細胞浮遊液の移植同様、ヒトに移植可能な心筋細胞を何らかの幹細胞から分化誘導し、十分量にまで増殖させる技術は未確立であるため、自律拍動して心臓のポンプ機能を補助するような心筋組織を再生するには、心筋細胞のソースに関してブレイクスルーを待たなければならない。現段階では、臨床応用を目指して平滑筋細胞、筋芽細胞、間葉系

幹細胞を代替として心筋再生組織を作製し移植することが試みられている。細胞シート移植に関しては、筋芽細胞を用いた治療法の可能性が追究されている。これまでにラット心筋梗塞モデルならびに心筋症ハムスターモデルへの筋芽細胞シート移植の有効性が確認されており、現在ブタを用いた前臨床試験が進行中である(大阪大学臓器制御外科との共同研究)。また、これら細胞シート移植の心機能改善効果のメカニズムとしては、細胞が互いに連結した組織として損失なく移植されることで、細胞浮遊液の注入に比べより効果的に心筋壁のひ薄化・心室の拡大を防止し、また種々のサイトカインの安定かつ持続的な分泌により、より強力な血管新生促進やリモデリング抑制をもたらすものと考えられている。

次に、より効果的な組織の再生に向けて課題となっているのが、いかに血管網を新生し再生組織のスケールアップを実現するかである。心筋組織では血管が約10%の体積を占有しており、毛細血管相互の距離も約15 μ mと極めて高密度な血管網が形成されている。実際、毛細血管網を伴わず培地や間質液の拡散のみで生存できる心筋組織の厚さは50~100 μ mと考えられており、それ以上の厚みのある心筋組織の再生には新たな技術開発が必要となっている。多くの場合、再生組織内の血管網形成は、移植後宿主からの血管新生を待つことになる。そこで、より厚い組織を作るアプローチとして、移植後の血管新生を促進する方法がある(図

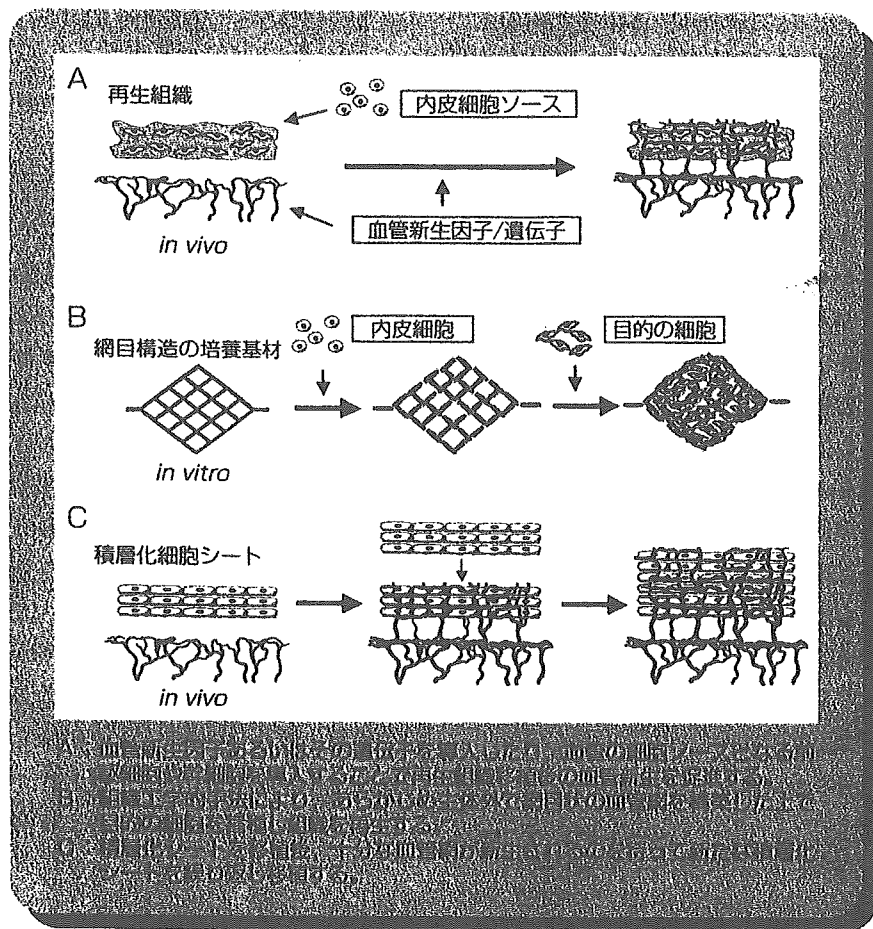


図3 再生組織内血管網の新生法

3 A)。VEGFなど血管新生を促進する因子あるいはそれらの遺伝子を再生組織の移植の際に導入することにより血管新生を促進することが可能であろう。また、内皮細胞あるいはその幹・前駆細胞を組織再生時に共培養することで、それらの細胞が*in vivo*での血管網構築の構成成分として寄与し、血管網の新生を促進する可能性が示されている。一方、*in vivo*での血管新生に対し、*in vitro*であらかじめ毛細血管網を含有した組織を再構築した上で移

植するアプローチが追究されている(図3 B)。すでに種々の微細加工技術を用い、培養基材や高分子材料をマイクロオーダーで加工することが実現しており、網目状に内皮細胞をパターン化して培養することも可能となっている。三次元的な網目構造の材料開発も行われており、これらの基材に内皮細胞を播種し周囲に目的の細胞を培養することで、毛細血管網を伴った組織を再生する試みがなされている。我々も細胞シートを用いた組織再生の技術を

基盤として、多面的なアプローチで再生組織内の血管網新生に取り組んでいる。すでに内皮細胞と他細胞のパターン化共培養シートの作製を可能とし、その重層化を試みている。また、共培養細胞シート内での血管内皮細胞網の形成も確認している。さらに*in vivo*における新たなアプローチとして、最初に移植した重層化細胞シートに十分な血管が新生されるのを待って新たな重層化細胞シートを繰り返し移植することにより、血管網を伴ったより厚い組織を構築することを試み、厚さ約1 mmの心筋組織の再構築にも成功している(図3 C)。さらに既存血管上に移植を反復することにより血管付きの心筋グラフトを作製し、異所性に移植することも可能とした。このように、再生組織内へ血管網を導入する研究は急速に発展しており、近い将来に心筋再生組織のスケールアップが実現するものと予測される。

500

心筋再生医療の研究開発は、多面的なアプローチにより飛躍的に進んでおり、近い将来、重症心不全に対する治療法の一つとして多くの患者を救うことが期待される。しかしながら、その急速な発展ゆえに新たな知見やその有効性に関してコントラバーシャルな結果が報告され、またメカニズムに関して未解明な点も多いことから、基礎研究者と臨床医が互いに協調的にフィードバックをかけ合いながら、基礎と臨

床が解離しないような形で心筋の再生医療を進展させていくことが必要であろう。さらに、細胞から組織、さらには臓器へと心筋再生医療が発展していく過程においては、細胞ソースの開発、機能的な心筋組織の再構築法、心筋組織内の血管網新生法、再生組織の保存法、移植法、さらにその安全性と有効性の確保に関し、多分野にまたがる研究開発が必要であり、既存のコンセプトにこだわらないフィールドを越えた研究者間の連携と融合を推進することも肝要であろう。

●文 献

- 1) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98 : 2800-2804, 1998
- 2) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, et al: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 105 : 1291-1297, 2002
- 3) Ahmet I, Sawa Y, Yamaguchi T, et al: Gene transfer of hepatocyte growth factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart. *Ann Thorac Surg* 75 : 1283-1287, 2003
- 4) Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K, et al: Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness. *J Artif Organs* 7 : 58-61, 2004
- 5) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264 : 98-101, 1994
- 6) 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
- 7) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
- 8) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428 : 664-668, 2004
- 9) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428 : 668-673, 2004
- 10) Mathur A, Martin JF: Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 364 : 183-192, 2004
- 11) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al: Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364 : 141-148, 2004
- 12) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 13) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al: Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103 : 634-637, 2001
- 14) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357 : 279-280, 2001
- 15) Caspi O, Gepstein L: Potential applications of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1015 : 285-298, 2004
- 16) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23 : 607-611, 2005
- 17) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114 : 763-776, 2003
- 18) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 12313-12318, 2003
- 19) Minatogushi S, Takemura G, Chen X, et al: Myocardial infarction itself induces cardiomyocyte regeneration from bone marrow cells and post-ischemic G-CSF treatment improves cardiac dysfunction via acceleration of the process. *Circulation* 106 (Suppl II) : II-132, 2002
- 20) Harada M, Qin Y, Takano H, et al: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11 : 305-311, 2005
- 21) Zandonella C: Tissue engineering: The beat goes on. *Nature* 421 : 884-886, 2003
- 22) Leor J, Aboulaia-Etzion S, Dar A, et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102 (19 Suppl 3) : III56-61, 2000
- 23) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al: Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100 (19 Suppl): II63-69, 1999
- 24) Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al: Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90 : 223-230, 2002
- 25) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 :

110-117, 2002

26) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al :
Fabrication of pulsatile cardiac tissue
grafts using a novel 3-dimensional cell
sheet manipulation technique and tem-
perature-responsive cell culture sur-

faces. *Circ Res* 90 : e40-e48, 2002

27) Christman KL, Fok HH, Sievers RE, et
al : Fibrin glue alone and skeletal
myoblasts in a fibrin scaffold preserve
cardiac function after myocardial infarc-
tion. *Tissue Eng* 10 : 403-409, 2004

28) Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al :
Injectable bioartificial myocardial tissue
for large-scale intramural cell transfer
and functional recovery of injured heart
muscle. *J Thorac Cardiovasc Surg* 128 :
571-578, 2004

心筋再生

2) 組織工学による心筋再生

清水 達也

要約：重症心不全に対する再生医療として細胞浮遊液の注入療法が臨床応用されているが次世代の再生医療として組織工学的手法を用い細胞から心筋組織を再生し不全心筋部に移植する治療も追究されている。世界的にはコラーゲンやゼラチンなどの生体吸収性の高分子支持体に細胞を播種して組織を再構築する手法が広く用いられている。一方、われわれは細胞をシート状に回収する技術を開発し、心筋細胞シートを積層化することで支持体を用いずに3次元心筋組織を再構築することに成功した。積層化した細胞シートは同期して拍動し、生体心筋と同様の形態を呈した。これら再生心筋組織の臨床応用には細胞ソース、血管新生によるスケールアップなどいくつかの課題があるが研究開発が加速しており近い将来臨床応用されることが期待される。

はじめに

種々の細胞への分化増殖能力を持つ幹細胞を研究対象とする幹細胞生物学 (stem cell biology) や細胞からの組織再構築を目指す組織工学 (tissue engineering) の発達により再生医療が現実のものとなっている。救急・集中医療の現場でもすでに重症熱傷患者に対して培養皮膚が使用されているが、今後熱傷以外の種々の疾患に対して、損傷あるいは欠損部に細胞移植や組織工学的手法により作製された組織の移植が行われることが予測される。前項にもあるように特に循環器領域においては細胞浮遊液を心筋梗塞部に注入する治療法やG-CSFを用いて骨髄由来の細胞を不全部に動員する治療法が臨床応用されており他の組織・臓器よりも早期に再生医療が普及する可能性がある。さらに次世代の再生医療として組織工学的な技術を用い生体外で心筋再生組織を再構築し

たうえで移植するという治療も追究されておりより効果的な治療法として期待されている。そこで本総説では組織工学ならびにそれを用いた虚血性心疾患や拡張型心筋症に伴う重症心不全に対する再生医療にポイントをしぼり、その現状ならびに今後の展望について概説する。

組織工学 (tissue engineering)

細胞浮遊液の移植療法では、細胞を互いに解離した浮遊液として組織内に注入するため流出・壊死により細胞が損失することが新たな課題となっている。また、先天性心疾患など欠損組織に対する治療は不可能である。そこで次世代の再生医療として、組織工学の技術を用い体外で心筋組織を再構築し移植組織を作製する研究が始まっている¹⁾。組織工学は1993年工学者であるLangerおよび医師であるVacantiが共同で提唱した概念であり、医学と工学の融合により生まれた新たな

Tissue Engineering for Myocardial Regeneration

東京女子医科大学先端生命医学研究所(〒162-8666 新宿区河田町 8-1)

ICUとCCU 29(7):539~546, 2005

表1 組織工学において支持体に用いられる生体材料

無機材料	炭酸カルシウム・リン酸カルシウム ハイドロキシアパタイト
天然高分子	コラーゲン・ゼラチン・アルギン酸・ セルロースキチン・キトサン・ フィブリン・ヒアルロン酸
合成高分子	ポリグリコール酸 (PGA) ポリ乳酸 (PLA) 乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) ポリε-カプロラクトン (PCL) ポリシアノアクリレート

学問領域である²⁾。実際には細胞から組織を再構築する研究は皮膚の再生を目指した研究として以前より行われていたが、マウスの背部でヒト軟骨芽細胞を用いて耳を再生させたことにより彼らは組織工学を世界に知らしめた。彼らは組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM: Extracellular matrix)、細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場の ECM の代替としてポリグリコール酸 (PGA) やポリ L 乳酸 (PLLA) およびその共重合体 (PLGA) からなる生体吸収性の 3 次元支持体を用いた。この支持体に細胞を培養し生体内に移植することにより支持体が徐々に分解・吸収され、生体がつくりだす ECM と置換され生体類似の組織が再構築されるというコンセプトである。実際、この手法で軟骨組織が再生され製品化されるに至っている。現在、あらゆる組織に関して細胞の足場として生体吸収性の 3 次元生体材料を用いた組織再生の研究が行われているといっても過言ではなく、軟骨に加え、骨や血管に対しても臨床応用が始まっている。

組織工学に用いられている生体材料を表 1 に示した。骨の再生に用いられるハイドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムなどの無機材料などは例外として多くは生体吸収性の高分子が用いられている。これには天然高分子と合成高分子がある。いずれも酵素分解あるいは加水分解によって高分子主鎖が切断され吸収される。天然高分子の中で最も多く利用されているのは生

体の ECM の主成分で細胞接着性も良好なコラーゲンである。皮膚真皮、血管壁、軟骨、肝臓など種々の組織の再構築に用いられている。フィブリン、多糖類のキチン、アルギン酸、セルロースなども天然の吸収性高分子として支持体に用いられている。一方、合成高分子としては、ポリ乳酸 (PLLA)、ポリグリコール酸 (PGA)、およびそれらの共重合体 (PLGA) が最も盛んに使用されている。これは、生体吸収性の縫合糸の材料として FDA (米国食品医薬品局) が臨床応用を以前から認めていたことに起因している。分解生成物である乳酸やグリコール酸は生体内における代謝物として存在し最終的に水と二酸化炭素として排泄される。また組成によりその強度・生体吸収性を制御できる。実際にこれらの合成高分子は軟骨、骨、皮膚、血管、腱、靭帯の再生に使用されている。合成高分子は天然高分子と比較して硬いものが多いが、近年、柔軟性のある素材も追究されている。これらの生体吸収性の支持体は目的に応じて繊維、メッシュ、スポンジ、ゲル状にして用いられ、組織の再生促進を目的に細胞接着因子やサイトカインの修飾が付加される場合もある。

組織工学による心筋組織再生

このように 3 次元生体吸収性の高分子支持体を用い組織再生を行うのが組織工学の主流であり、心筋組織再生に関してもいくつかの研究が報告されている。具体的にはあらかじめ多孔性の支持体を作成したのちにそれを足場として細胞を播種する手法 (図 1 A) と溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合・ゲル化する手法に分けられる (図 1 B)。前者の手法としては、PGA、ゼラチン、アルギン酸を用いた研究が報告されている。Brusac らは PGA 製の多孔性支持体に心筋細胞を播種した。回転式培養装置を用いることにより接着心筋細胞を増大させた。この手法により表層部に構築された心筋組織が生体心筋組織と同様の形態ならびに電気伝達速度を有することを示している³⁾。Li らはゼラチンを使った心筋パッチ作製の研究を展開している。メッシュ状のゼラチンに心筋細胞を一様に播種し培養することで心筋パッチを作製、心筋梗塞モデルへの生着を確認すると

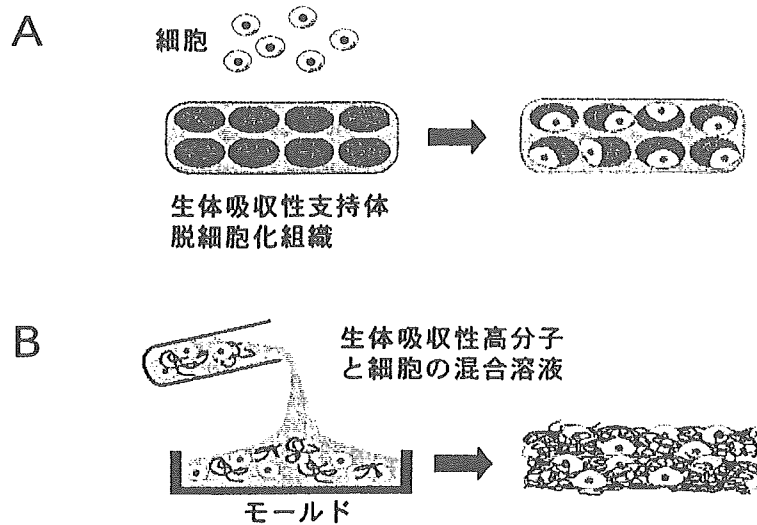


図1 生体吸収性高分子を用いた心筋組織の再構築

A：生体吸収性高分子からなる多孔性の3次元支持体を作製し、それに細胞を播種する。支持体は徐々に分解し吸収され細胞あるいは生体が産生するECMと置換されて組織が再生される。支持体として脱細胞化した生体組織が用いられることもある。

B：溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したのちモールドに流し込み、重合させることで細胞を3次元化する。

ともに、右心系心筋欠損部への移植によりゼラチンが分解した後も組織として残存し欠損部を補完することを示した⁴⁾⁵⁾。また Leorらは多孔性のアルギン酸を用いた心筋パッチを心筋梗塞モデルへ移植、その結果心拡大が抑制され、心機能が維持されると報告している⁶⁾。支持体として脱細胞化した生体組織を用いる研究も報告されている。一方②の方法として Zimmermannらは足場となる材料と心筋細胞を混合して培養する研究を行っている。彼らは支持体の材料として、生体内ECMの主成分であるコラーゲンを用い、その溶液と培養心筋細胞を混和しシリコン製のモールド内で培養することにより3次元心筋組織を再生した。組織モデルとして *in vitro* での張力測定を可能とし、種々の薬剤に対して生体心筋組織と同様に張力が変化することを示した。また反復伸展刺激により細胞が配向性を獲得し肥大することも報告している⁷⁾。さらに近年、細胞浮遊液単独移植における細胞損失の問題を軽減する目的でフィブリン溶液と細胞を混和し直接不全心筋部に注入することで心機能がより改善するという示されている⁸⁾。このように培養心筋細胞と生体吸収性材

料を用いた心筋組織再生の研究が世界的に行われている。

細胞シート工学

前記したように組織工学は細胞・細胞の足場・増殖因子の三つの条件を整えることにより組織を再生するというコンセプトで展開し、その足場として生体吸収性高分子を使うのが主流である。しかしながらこの手法に関しては支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことやまた移植後支持体の分解に伴い炎症反応が生じることなどが課題となっている。さらに支持体はECMに置換されるため結果的に細胞密度の低い組織となるため骨、軟骨などの組織再生は可能であるが、肝臓や心筋のように細胞密度の高い組織の再生には新たな技術革新が必要となっている。そこで、われわれは温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御し細胞をシート状に回収できる温度応答性培養皿を開発、この細胞シートを単独あるいは積層化し、不全・欠損部に組織として移植するという独自のコンセプト「細胞シート工学」で組織工学に取り組んでいる⁹⁾。

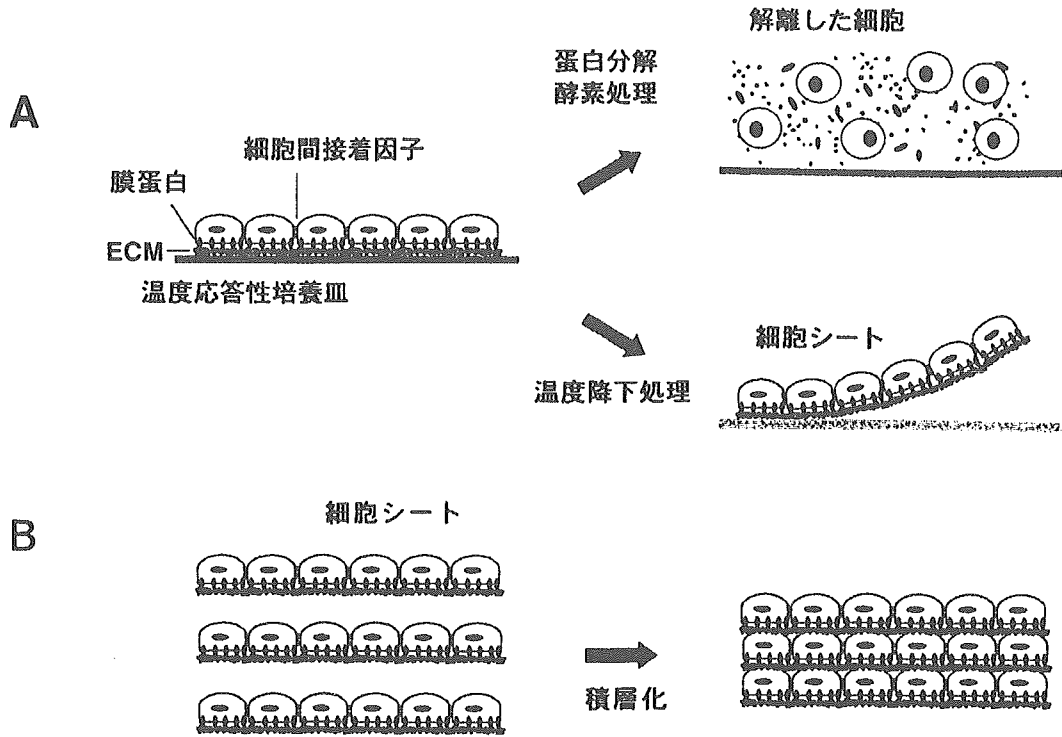


図2 温度応答性培養皿からの細胞シートの脱着と細胞シートの積層化

A：細胞を密に培養した場合は細胞と細胞が細胞間接着因子により互いに接着する。トリプシンなどの蛋白分解酵素を用いた場合は細胞と培養皿の接着が解離するとともに、細胞間接着因子も破壊されるため、それぞれの細胞は解離して浮遊することになる。これに対し、温度応答性培養皿を使った温度降下処理においてはこの細胞間接着は全く影響を受けずに、シート下面のECM培養皿表面の接着のみ解離するため細胞がシート状に脱着する。

B：回収した細胞シートを積層化することにより3次元組織を再構築できる。

この温度応答性培養皿は通常のポリスチレン製の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線を用いて20~30nmの厚さに共有結合させたもので、培養温度である37°Cでは疎水性表面となり細胞接着性であるが、32°C以下の温度降下処理で親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿の使用により、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく温度変化のみで細胞膜蛋白や接着因子を維持したまま脱着させることが可能である¹⁰⁾。細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、温度降下処理により細胞と培養表面の接着が解離し細胞がその下面のECMとともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるためトリプシンを用いたときのように細胞をばらばらにするこ

となく、シート状に回収できる。また細胞シート下面のECMが新たな培養表面や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため速やかな移動・積層化が可能である。既に種々の細胞シートの移動や積層化を可能としている(図2)。細胞シートを利用した組織再構築法としては①単層シート移植、②同一細胞シートの積層化による均一な組織の再構築、③数種の細胞シートの積層化による層状構造を呈する組織の再構築がある。

単層シート移植の例として角膜上皮細胞シートの移植がある。自己の健常側角膜輪部より採取した角膜上皮の幹細胞を温度応答性培養表面上で培養して細胞シートを作製、これを損傷した病変角膜部に移植することで視力の回復を実現した¹¹⁾。さらに、両眼性疾患に対しては、自己の口腔粘膜

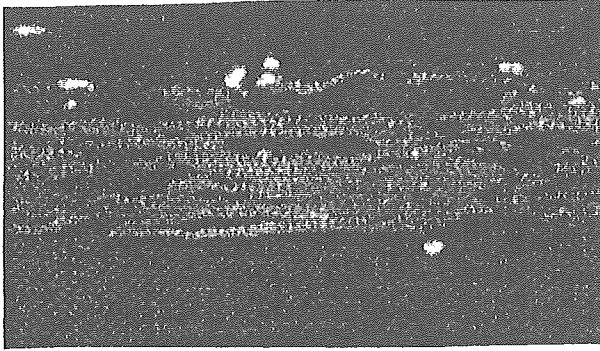


図3 積層化心筋細胞シートの組織切片像
積層化心筋細胞シートを移植後3週間の時点での組織切片像（アクチニン染色）を示す。皮下組織内の層状の心筋組織内には伸展した心筋細胞および細胞内の横紋を認める。

から採取した細胞を用いて細胞シートを作製し移植する方法も確立し臨床応用にて良好な結果を得ている（大阪大学眼科との共同研究¹²⁾。また泌尿器科領域において、膀胱機能不全や悪性腫瘍などによる膀胱の欠損に対して自己の消化管を使用した再建が行われているが、消化管粘膜の残存に起因する電解質異常、結石の形成などの合併症が大きな問題となっている。これらの問題を解決するために尿路上皮細胞シートを作製し、消化管粘膜を切除した消化管平滑筋層上に移植したところ、尿路上皮シートは消化管平滑筋層上に生着し、膀胱組織と同様の尿路上皮組織層が再生された¹³⁾。この粘膜置換型フラップは従来の手術方法に細胞シート技術を融合した新規の手法であり、早期の臨床応用が期待されている。異なる細胞シートの積層化の例としては肝組織の再生が挙げられる。肝細胞シートと内皮細胞シートの重層化共培養を行ったところ、アルブミン合成能を維持した2ヵ月以上にわたる肝細胞の長期培養が可能となっている¹⁴⁾。肝実質細胞は、通常の培養環境ではその分化機能を著しく低下させ、長期培養が困難であることが知られているが、肝細胞と内皮細胞との層状の接着により生体に似た環境を再現し、細胞相互間のコミュニケーションを可能にしたことにより長期培養が可能になったと考えられる。この手法を基盤として、3次元的な肝組織を再生・移植するための技術開発が行われている。

以上に挙げた組織の他、皮膚・網膜・歯周組

織・食道・尿管・血管・腎臓などに関しても細胞シートの技術を使った研究を進めている。

細胞シート工学による心筋組織の再生

前述したように世界的には3次元支持体を用いた心筋組織再生の研究が報告されているがわれわれは心筋細胞シートを重層化することで支持体を用いずにより細胞密度の高い心筋組織の再生を追求してきた。心筋組織においては心筋細胞同士がギャップジャンクションを介し直接細胞内イオンの濃度変化を伝播することで組織全体が同期して拍動する。したがって機能的な心筋組織の再生には心筋細胞シート間に電気的結合ができるかが重要となってくる。そこで新生仔ラット心筋細胞シートを重層化したところ心筋細胞シートは30分以内というきわめて短時間の間に電気的に同期することが明らかとなった。さらにこの時、細胞シート間にはギャップジャンクションを形成するコネキシン43蛋白の発現も認められた¹⁵⁾。次に *in vitro* で心筋細胞シートを4枚まで積層化したところ肉眼レベルで同期して拍動する心筋組織が再生された。さらにこの積層心筋細胞シートをヌードラット背部皮下組織へ移植したところホストの心電図とは異なる積層心筋細胞シート由来の電位が確認された。また背部の積層心筋細胞シートは肉眼レベルで拍動しており、組織切片上十分な毛細血管網が発達し、円柱状に伸びた心筋細胞がギャップジャンクションを介して密に接着している組織像が観察された（図3）¹⁶⁾。このように細胞シートの重層化により支持体を用いない細胞密度の高い機能的な心筋組織の再生が可能となった。すでに移植後1年まで、積層心筋細胞シートが拍動を維持したまま生着しうることを確認している。さらに積層心筋細胞シートを心筋梗塞モデルへ移植したところ心機能が改善することが示された（大阪大学臓器機能制御外科との共同研究）。また心筋虚血モデルへの自己筋芽細胞を用いた細胞シート移植の有効性も示されつつあり今後の臨床応用が期待されている。細胞シート移植では細胞浮遊液に比べ細胞の損失は殆どなく細胞同士が接着因子により互いに繋がった状態で移植されることで、不全心筋部を覆うような層状の組

織が再生される。この再生組織による心臓のリモデリングの物理的な抑制ならびにその組織から恒常的に分泌される種々のサイトカインの効果により心機能が改善するものと考えられる。

このように細胞シート工学はシート状の細胞の回収、細胞シートと細胞シート、そして組織と積層化細胞シートの直接的な接着を可能とする独自の組織工学的手法であり既存の技術では不可能であったことを可能としており、生体吸収性支持体を用いない新たな組織工学的手法として心筋組織の再生に大きく貢献するものとする。

組織工学による心筋再生の課題と展望

組織工学的手法を用いた心筋組織再生の技術は飛躍的に進み、研究者人口も増え、動物モデルでの有効性が示されつつある。しかしながら細胞浮遊液の移植と同様、用いる細胞ソースが課題のひとつとなっている。これまでにヒトに移植可能な心筋細胞の分化誘導・増殖法は確立していないが、今後骨髄由来の細胞や間葉系幹細胞などから心筋細胞への分化誘導法が確立すれば自己細胞を用いた心筋パッチも作製可能かもしれない。ES細胞の使用に関しては、倫理的問題、免疫拒絶、奇形腫の形成など解決すべき問題が多くあり臨床応用に至るには十分な基礎研究と社会的なコンセンサスが必要であるが多くの研究者がES細胞の心筋細胞への分化誘導を試みており将来的に不全心筋に対する細胞移植治療に用いられる日が来るかもしれない。一方、心筋細胞の代替として筋芽細胞を用いたり、血管新生を目的に骨髄由来の幹細胞を用いてパッチ状の組織を再生し移植することも追究されており近々に臨床応用されることが期待されている。

心筋組織の再生のみならず組織工学共通の課題となっているのが再生組織のスケールアップを目的とした組織内血管網の再生技術である。栄養・酸素の透過性の限界のため血管が無い場合、再生可能な組織厚は100~200 μ mとされている。この限界を克服する手法として増殖因子の徐放により血管新生を促進する方法や微細加工技術を用いてあらかじめ血管網を構築したうえで目的の細胞を周囲に播種する方法などが追究されているがい

まだ十分な成果は報告されておらず、今後さらなる研究・技術開発が必要である。われわれもいくつかのアプローチでこの課題に取り組んでいるが積層細胞シートを血管新生を待って繰り返し移植するという手法（多段階移植法）により少なくとも生体内では虚血の限界を越えたより厚い（~1mm）組織の再生が可能となっており今後の発展が期待されている。

急性期の治療としての細胞および再生組織の移植に関しては、事前に自己の細胞ソースを確保しておくことが困難なため、あらかじめ準備された他家の細胞あるいは組織が必要になるかもしれない。この場合、移植後の自己組織再生が期待できないとすると免疫抑制剤を使用することとなる。不全心筋に対する治療の場合、これに対する解決策として、人工心臓あるいは補助人工心臓をブリッジとして用い、その間に自己細胞を採取・培養し移植する治療法が可能となるかもしれない。また、移植後、細胞や組織が生着し機能するようになるまでのあいだ補助として機械的な人工心臓を用いることも有効と考えられる。実際これら combined therapy の研究も始まっている。

このように心筋の再生医療にはまだ解決すべき課題も多いがフィールドを越えた研究者・臨床医の連携により克服できるものとする。

おわりに

不全心筋に対する再生医療としては、筋芽細胞や骨髄の細胞を用いた細胞移植の臨床応用がはじまったところであるが、今後ヒトに移植可能な心筋細胞を分化誘導し大量に培養する技術が確立されればこれらの心筋細胞を注入する細胞移植療法はすみやかに行うことが可能であろう。さらに、現在研究段階である種々の組織工学的手法の有効性が示されれば、体外で作製された心筋組織の移植も可能になるかもしれない。これら大きな可能性をもつ再生医療が救急・集中医療の現場に早期に普及し多くの人命が救われることを期待したい。

文 献

- 1) Nugent HM, Edelman ER: Tissue engineer-

- ing therapy for cardiovascular disease. *Circ Res* 92 : 1068-1078, 2003
- 2) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926, 1993
 - 3) Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, et al : Cardiac muscle tissue engineering : toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 277 : H 433-444, 1999
 - 4) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al : Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100 : II 63-69, 1999
 - 5) Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al : The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 : 932-942, 2001
 - 6) Leor J, Aboulafla-Etzion S, Dar A, et al : Bioengineered cardiac grafts : A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102 : III 56-61, 2000
 - 7) Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al : Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90 : 223-230, 2002
 - 8) Christman KL, Fok HH, Sievers RE, et al : Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng* 10 : 403-409, 2004
 - 9) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 24 : 2309-2316, 2003
 - 10) Yamada N, Okano T, Sakai H, et al : Thermo-responsive polymeric surfaces ; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem* 11 : 571-576, 1990
 - 11) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379-385, 2004
 - 12) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004
 - 13) Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al : Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *BJU Int* 93 : 1069-1075, 2004
 - 14) Harimoto M, Yamato M, Hirose M, et al : Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture : overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 62 : 464-470, 2002
 - 15) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002
 - 16) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90 : e 40-e 48, 2002

Abstract

Tissue Engineering for Myocardial Regeneration

Tatsuya Shimizu

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science Tokyo Women's Medical University

8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

Regeneration therapy has currently emerged as one of the most promising treatments for the patients suffering from severe heart failure. Direct transplantation of isolated myoblasts or bone marrow mononuclear cells, and recruitment of stem cells from bone marrow by G-CSF administration have been already clinically performed. As further advanced therapy, research on fabricating three-dimensional (3-D) cardiac grafts by tissue engineering technology has also now begun. Most popular approach of tissue engineering is using 3-D biodegradable scaffolds as alternatives of extracellular matrix. By contrast, we have exploited novel cell manipulation technique to construct 3-D tissue by layering cell sheets without any biodegradable scaffolds. Confluent neonatal rat cardiomyocytes on temperature-responsive culture surfaces can be harvested as an electrically-communicated contiguous cell sheet only by lowering temperature without any enzymatic digestions. Both electrical and morphological communications are developed between layered cardiomyocyte sheets, leading simultaneous beating 3-D myocardial tissues. Layered cardiomyocyte sheets in vivo demonstrated synchronized beating, 1-year survival and characteristic structures of native heart tissue including well-differentiated sarcomeres, gap junctions and microvasculars. Cell sheet technology should have enormous potential in myocardial tissue engineering.

ICU & CCU 29(7):539~546, 2005

心筋再生

Cardiomyogenesis and myocardial angiogenesis

特集

中谷 武嗣 永谷 憲歳* 富田 伸司**
 NAKATANI Takeshi NAGAYA Noritoshi TOMITA Shinji

再生医学—クローン・幹細胞から医療へ—

Key words 細胞移植 骨髄単核球細胞 間葉系幹細胞 血管新生 環境因子

各種治療法の限界を越えた重症心不全に対し、確実な治療効果が期待できる治療手段は心臓移植である。国際レジストリーではこれまでに6.6万例以上実施され、1年生存率は82%である。わが国においても、臓器移植法施行後22例に施行され、生存率は100%で最長5年を越え、社会復帰率は70%以上と良好な成績を示している。しかし、心臓移植を必要とする症例数に対し、移植施行数が少なく、待機期間が長期に及んでいる。このため、補助人工心臓(VAS)装着数が増加し、補助期間も延長し、長期間の入院が必要となっている。

重症心不全に対する新たな治療法として、自己の広背筋を心臓周囲に巻き付け電氣的トレーニングにより骨格筋の心筋化を計り心補助を行う心筋形成術が開発され、臨床応用もなされた¹⁾。しかし、大きな手術侵襲にもかかわらず心補助効果を得るのに時間がかかり、またその補助効果も限られているため、施行されなくなった。しかし、心筋形成術を研究していたChiuらのグループは、骨格筋細胞を直接心筋へ移植する新たな心補助手段の検討を行い、その後、心臓への細胞移植の研究が本格的に行われるようになった²⁾。その後、用いる細胞源について各種の研究がなされてきた。しかし、非自己の細胞を用いる場合には拒絶反応への対応が必要であり、倫理的な問題がある。これらの問題を回避し得るものとして自己細胞を用いる方法が検討され、その採取が臨床的に広く行われている骨髄細胞が注目されている。本稿では、骨髄細胞による心筋再生を中心に述べる。

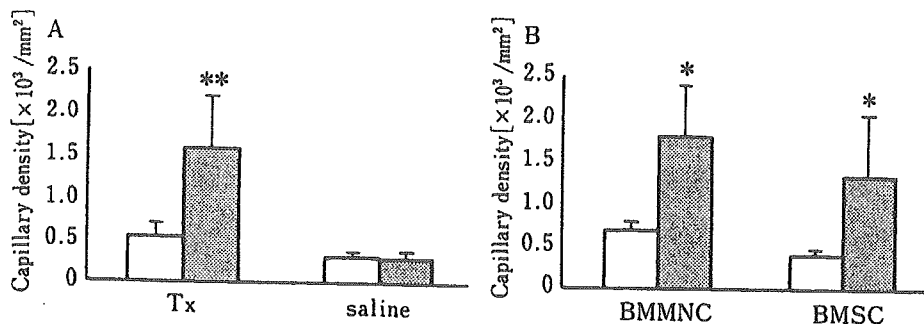


図1 梗塞作成非移植部(白柱)と梗塞作成移植部(黒柱)における capillary density
梗塞作成移植部は梗塞作成非移植部より CD が有意に高かった。しかし, mononuclear cell (BMMNC) と stromal cell (BMSC) では差を認めなかった。
(文献7より)

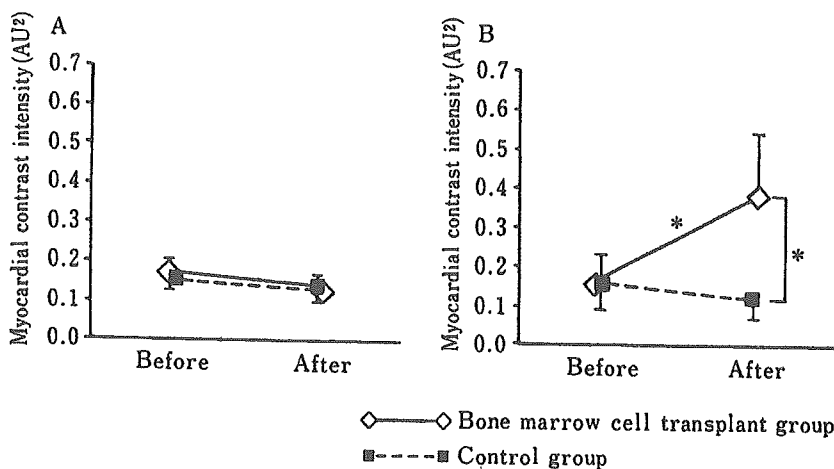


図2 移植前後における myocardial contrast intensity の変化
実線: 移植群 (BMMNC および BMSC), 破線: 非移植群
A: 梗塞作成非移植部, B: 梗塞作成移植部
B において移植群で有意に MCI の増加を認めた。
(文献7より)

I. 骨髄単核球細胞 (MNC) による心筋および血管組織の再生

骨髄細胞は, 造血幹細胞が多数をしめているが, 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) が存在し, 骨, 軟骨, 脂肪細胞へ分化誘導が可能である。また, 1997年に Asahara らは, 末梢血に骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPC) が存在し, この EPC が虚血心筋での脈管新生 (vasculogenesis) や血管新生 (angiogenesis) に貢献していると報告した³⁾。さらに, Shintani らは, 骨髄単核球細胞 (bone marrow mononuclear cell: BMMNC) が虚血肢での血管新生をもたらすことを報告した⁴⁾。この BMMNC

を用いた血管再生療法は, わが国において臨床応用が行われ, その安全性と有効性ととも, 骨髄細胞からのサイトカインが血管新生に大きな役割を果たしていると考えられることが報告されている⁵⁾。さらに, 虚血心筋に対しても外科的に注入する方法が試みられている⁶⁾。

しかし, この骨髄単核球細胞移植における血管新生効果の評価が困難であり, 問題であった。そこで, われわれは, 心筋コントラストエコー法を用いる方法をブタ心筋梗塞モデルに対する骨髄細胞移植により検討した⁷⁾。NIBS ブタの左前下降枝を結紮し, 心筋梗塞を作成した。1ヵ月後, 骨髄細胞を梗塞部へ直接注入し, myocardial contrast intensity (MCI) を測定した。また, 移植1ヵ月後に犠牲死させ, 組織学的に毛細血管密度

(capillary density (CD) を測定した。その結果、MCI と CD の間に正の相関を認め、多くの毛細管の直径は10 μ m 以下であった。さらに移植梗塞部の MCI と CD は、非移植梗塞部のものよりも有意に増加した(図1, 図2)。したがって、骨髄細胞移植により、心筋梗塞部位での血流は改善し、この血流改善効果はコントラストエコーにより非侵襲的にベッドサイドでの評価を行い得ることが示された。

これまでに述べた血管再生に加え、1999年には骨髄細胞に5-azacytidine 処理を行うことにより、心筋細胞が分化誘導されることが1999年に報告された⁸⁾⁹⁾。

この心筋への分化において環境因子(cardiac milieu)の重要性が指摘されていた¹⁰⁾¹¹⁾が、その詳細は不明であった。そこで環境因子のひとつとしての細胞同士の直接接触について検討を行った¹²⁾。ホスト心筋(CM)としてラット新生児心筋細胞を、移植細胞としてGFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を各々使い、共培養実験系を作成した。隔壁をGFP-BMCとCMとの間においたdouble chamber 培養では、GFP-BMCに特に変化を認めなかった。これに対し、GFP-BMCとCMを混合した共培養系では、2日後からCMと同期収縮を開始するGFP-BMCが現れた。また、免疫組織染色では、1日後からmyosin heavy chain-slow が、2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)が、4日後からはトロポニンIが各々経時的に発現し漸増した。5日後にはmyosin heavy chain-slow陽性細胞は約2.5%になった。この結果、骨髄細胞の心筋への分化において、ホストの心筋細胞との直接接触が重要な役割を果たしていることが判明した。

この共培養における問題点として、2002年に細胞融合(cell fusion)が報告された¹³⁾。この報告では、ES細胞とGFPマウス由来骨髄細胞との共培養において、GFPを発現した細胞が分化増殖するように見えるが、その細胞の核内にはES細胞

由来のDNAも含んでいたとしている。しかし、細胞融合の割合が低く、十分には解明されていない。また、前述のわれわれの実験では経時的に心筋細胞の特性を獲得しており、融合のみとは考えられない。今後さらに検討が必要である。

骨髄細胞の心筋への分化は確認されているが、心臓移植対象者の多数をしめる拡張型心筋症に対して、骨髄細胞による心筋再生療法が有効であるかの研究は少ない。そこで、ラットにおけるドキシソルピシン投与不全心に対して骨髄単核球移植を行い、心機能改善効果を検討した¹⁴⁾。ラットドキシソルピシン不全心モデルを用い、骨髄単核球移植群、生理食塩水注入群、sham手術群を作成し、移植4週間後に心エコー・Langendorff灌流装置にて心機能を測定し、さらに心重量・腹水量測定を行った。その結果、骨髄単核球移植群は、心エコーにおいて心筋壁厚が有意に維持され、心筋壁厚/内腔比は高値であった。さらに、Langendorff灌流装置による検討においても、他群に比しDeveloped pressureが有意に高値(図3)で、end-diastolic pressureが低値であった。さらに、心重量においても有意に大きく(図4)、腹水量は有意に少量であった。したがって、ラットドキシソルピシン心筋症モデルに対して骨髄単核球移植は有用であり、臨床応用への可能性が示された。

これまで外因性の細胞移植が検討されてきたが、2001年にOlicらは、マウス急性心筋梗塞モデルに対し、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)と幹細胞因子(SCF)を投与したところ、心機能の改善、生存率の改善を得られたと報告し、G-CSFとSCFによる幹細胞の賦活化を示した¹⁵⁾。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は不明であった。そこで、われわれは、この内因性幹細胞の由来を検討した。まず、放射線照射後のC57b6マウスにGFP遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を移植し、キメラマウスを作成した。心筋梗塞モデルを作成したところ、心筋梗塞1ヵ月後には、G-CSF投与群で生存率の改善傾向を認めた¹⁶⁾。また、G-CSF

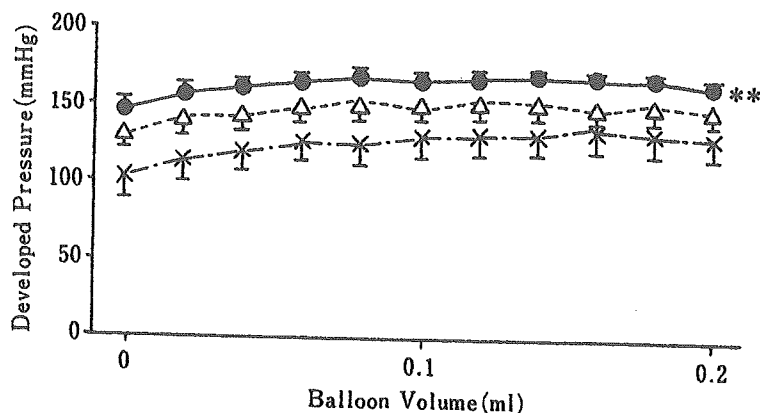


図3 Developed pressure の差
 (●:移植群, △:コントロール群, X: sham 群)
 移植群において有意に高かった。
 (文献14より)

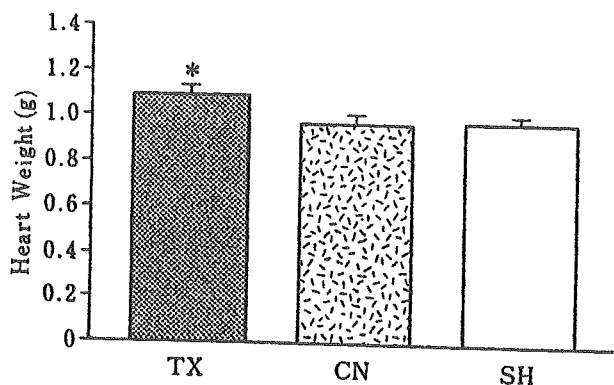


図4 心重量の差
 (TX:移植群, CN:コントロール群, SH: sham 群)
 移植群において有意に重かった。
 (文献14より)

すると高率でステント内再狭窄を認めたと報告している¹⁸⁾。内因性幹細胞は、障害された心筋とともに動脈硬化巣にも遊走する可能性があり、注意が必要である。今後、内因性幹細胞の遊走に関する生理学的メカニズムが解明できれば、心筋障害に対する効果的な内因性幹細胞を用いた治療が可能となると考えられる。

II. 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) による心筋および血管組織の再生

骨髄単核球細胞 (MNC) の利用は、培養する必要がなく用いやすい。しかし、十分な細胞数の採取には全身麻酔が必要であり侵襲が大きい。これに対し、増殖能力の高い間葉系幹細胞 (MSC) を用いると、少量の骨髄細胞の採取を採取し、生体外で大量に培養し、必要量が得られてから移植することが可能となる。

そこで、まず MSC 移植の血管再生効果を、骨髄単核球細胞 (MNC) 移植と比較検討した。ラットの左総腸骨動脈を結紮・切除し下肢虚血を作成した後に同数の MSC あるいは MNC を移植した。移植 3 週間後には両群とも未治療群と比較し有意な血流増加を認めたが、MSC 群はより高度な血流改善を示した (図 5)。また、毛細血管数の定量評価においても、MSC 群は MNC 群より増加していた。両群とも移植局所において移植細胞由来

群において、心筋梗塞境界部における GFP-BMC 数がコントロール群より有意に増加した。また、その GFP-BMC のうち約 20% がトロポニン I 陽性細胞で、ネスチン陽性細胞も多数認めた。ドキシソルピシン投与心不全モデルにおいても同様の結果が得られた¹⁷⁾。したがって、再生心筋の細胞源のひとつは骨髄で、G-CSF によりその効果が増強されることが示唆された。また、G-CSF が病的心筋に直接働き、G-CSF レセプターを介してトロポニン I 陽性細胞の増殖を増強することを確認している。しかし、骨髄由来の心筋細胞数は少なく、心臓ポンプ機能の改善効果には限界があることが示されている。

最近 Kang らが、急性心筋梗塞後に冠動脈内ステント挿入術を行った患者に G-CSF 治療を併用

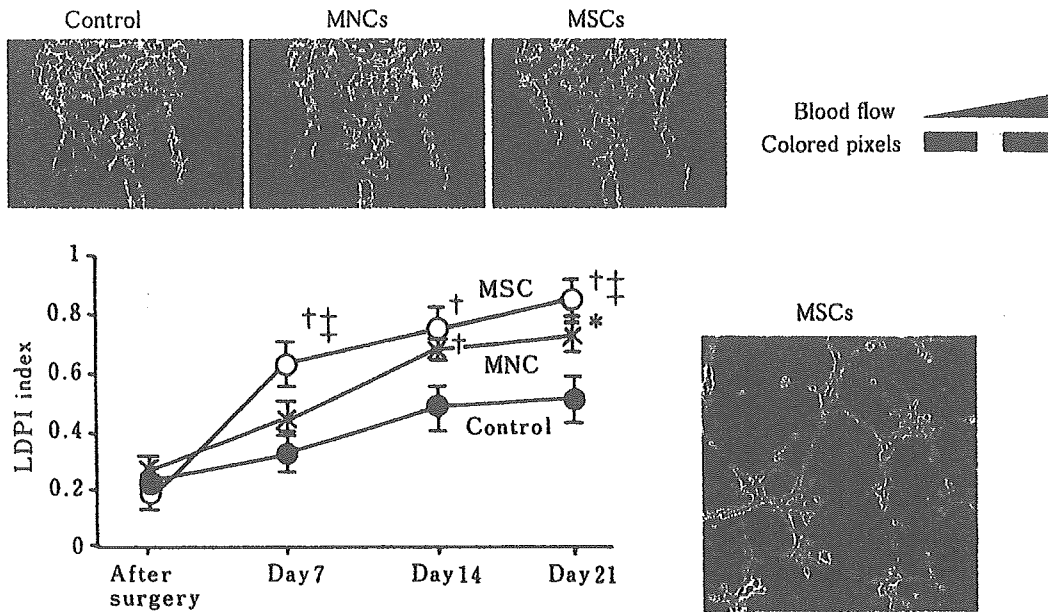


図5 レーザードブラを用いたラット下肢血流評価と *in vitro* での血管形成
MSC 移植は MNC 移植に比べ、有意に血流を改善させた。また MSCs は低酸素マトリゲル上で管腔を形成した。

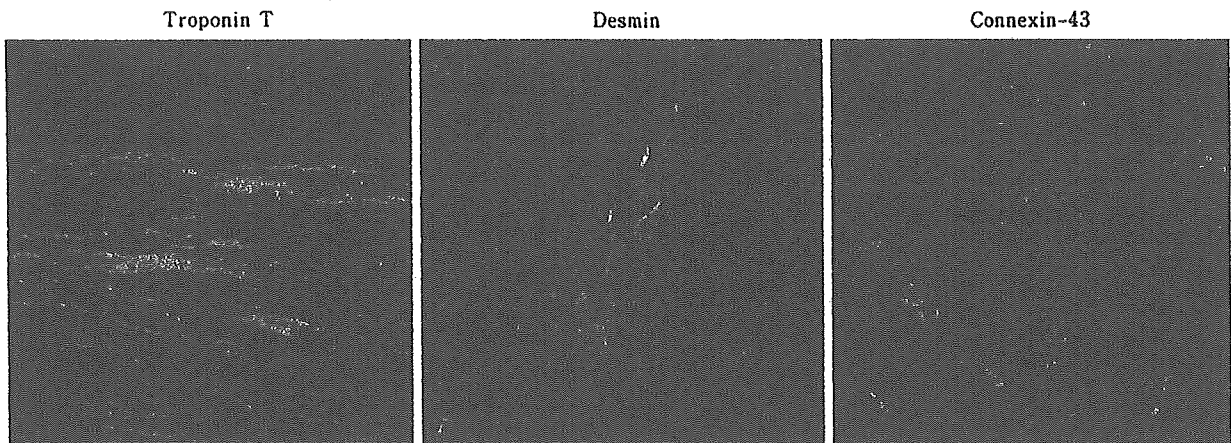


図 6
心筋内へ移植した MSC は Desmin や Troponin T 陽性を示し心筋細胞へ分化した。また移植細胞は Connexin43 陽性を示し、移植細胞と既存の心筋細胞間にギャップジャンクションを形成した。

と考えられる血管内皮細胞を認めたが、その数は MSC 群において有意に多かった。また、MSC 群において移植細胞からの血管平滑筋と壁細胞への分化が確認された。さらに、MSC は MNC と比較し Vascular endothelial growth factor (VEGF), Hepatocyte growth factor (HGF), Adrenomedullin (AM) などの血管新生因子を多量に分泌していた¹⁹⁾。また *in vitro* で MSC は低酸素下で管腔を形成した。さらに、無血清培地培養下にて低酸素の状態にしたところ、MNC は MSC に比して高

率にアポトーシスを来した。以上より、MSC が低栄養および低酸素状態である移植環境下においてより高率に生存することから、MSC 移植は MNC 移植と比較して、同等もしくはそれ以上の血管再生作用を有すると考えられた。

次に、拡張型心筋症への臨床応用を目指して、MSC 細胞移植の効果をラット心筋症モデルで検討した。近交系ラットの大腿骨より骨髓組織を取り出し、培養皿底面に付着する MSC を分離・培養した。この MSC 細胞を、ミオシン投与拡張型

心筋症モデルラットの心筋壁内に心外膜より直接注入した。4週間後における心エコーおよび心臓カテーテル検査において、MSC 移植群は未治療群と比較し左室拡張末期圧の有意にな低下および左室収縮能の有意に改善を認めた。さらに、病理学的検討において MSC 移植群は心筋コラーゲン含量の減少を認め、さらに心筋壁内で血管内皮細胞や平滑筋細胞に分化し管腔構造を形成した。また、心筋内に注入した MSC の一部は免疫組織染色にて心筋組織の指標である Troponin T, Desmin, および Connexin43 が陽性であった(図6)。さらに MSC は多くの血管新生因子やアポトーシス抑制因子を分泌した。以上より MSC は心筋細胞、血管細胞へ分化するのみならずパラクライン因子として心筋および血管再生に関与する可能性が示された。

また、MSC の心筋梗塞モデルに対する経静脈投与の効果を検討した²⁰⁾。左冠動脈結紮により作製した心筋梗塞モデルラットの頸静脈から MSC をカテーテルにより移植した。その結果、MSC の一部は梗塞巣周囲に集積し、さらに心筋細胞および血管内皮細胞に分化し、心機能を改善させた。

これらの小動物実験の結果をふまえ、ブタを用いた前臨床研究を行い、骨、軟骨、脂肪などに分化しないことや、不整脈が出現しないことなど、MSC 移植の有効性と安全性を確認した。

以上の結果より、虚血性心疾患や拡張型心筋症等による心不全を有し、利尿剤、ACE 阻害薬、 β 遮断薬などの既存の治療に抵抗性を示す症例を

対象に臨床試験は計画し、「間葉系幹細胞移植による難治性心不全治療の臨床評価」の実施を国立循環器病センター倫理委員会に申請し、承認された。MSC 移植は、患者の骨髓液15mL を採取し、体外で培養増殖させ、カテーテルを用いて心内膜側より心筋内へ注入する。数例の難治性心不全症例に対して自己 MSC 移植を行ったが、重度の不整脈やその他の副作用はみられず、患者は順調に経過している。今後、さらに症例を積み重ねることにより、安全性および有効性を検討していく予定である。また、補助人工心臓装着例への応用なども検討中である。

おわりに

心筋再生に関する細胞移植に関して、多くの研究が行われている。その中で骨髓細胞を用いる方法は、自己の細胞を用いるため拒絶反応や副作用を避けることができる。さらに MSC を用いる場合には、MNC 移植に比べ、無菌培養が必要ではあるが、少量の骨髓液で治療に十分な細胞を確保できる。また、従来からの外因性の細胞移植に加え、内因性細胞移植による心筋再生も注目されている。骨髓細胞は、倫理的側面を含み臨床応用が行いやすく、さらに心筋内に移植することで心筋と血管が同時に再生され得るため、拡張型心筋症などの難治性重症心不全に対する治療として期待される。

文 献

- 1) Carpentier A, Chachques JC, Grandjean PA, et al : Dynamic cardiomyoplasty : a seven year clinical experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106 : 42-52, 1993.
- 2) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, et al : Cell transplantation for myocardial repair : an experimental approach. *Cell Transplant* 1 : 383-390, 1992.
- 3) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275(5302) : 964-967, 1997.
- 4) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103(6) : 897-903, 2001.
- 5) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360(9331) : 427, 2002.
- 6) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al : Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone