

Otomo K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S	Unique electrophysiological characteristics of atrioventricular nodal reentrant tachycardia with different ventriculo-atrial block patterns: Effects of slow pathway ablation and insights into location of reentrant circuit.	Heart Rhythm	3	544-554	2006
Otomo K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S	Site-specific influence of transversal conduction across crista terminalis on recognition of isthmus block.	PACE	29	589-599	2006
Otomo K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S	“Left-variant” atypical atrioventricular nodal reentrant tachycardia: Electrophysiological characteristics and effect of slow pathway ablation within coronary sinus.	J Cardiovasc Electrophysiol	17	1177-1183	2006
Yokokawa M, Takaki H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Kamakura S, Shimizu W	Spatial distribution of repolarization and depolarization abnormalities evaluated by body surface potential mapping in patients with Brugada syndrome.	PACE	29	1112-1121	2006
Kandori A, Miyashita T, Ogata K, Shimizu W, Yokokawa M, Kamakura S, Miyatake K, Tsukada K, Yamada S, Watanabe S, Yamaguchi I	Magnetocardiography study on ventricular depolarization-current pattern in patients with Brugada syndrome and complete right-bundle branch blocks.	PACE	29	1359-1367	2006
Ohashi J, Yasuda S, Miyazaki S, Shimizu W, Morii I, Kurita T, Kawamura A, Kamakura S, Nonogi H	Prevention of life-threatening ventricular tachyarrhythmia by a novel and pure class III agent, nifekalant hydrochloride.	J Cardiovasc Pharmacol	48	274-279	2006

Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoike H	Sex hormone and gender difference. - Role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome.	J Cardiovasc Electrophysiol			2007 (in press)
Shimizu W, Aiba T, Kamakura S	Mechanism and new findings in the Brugada syndrome.	Circ J			2007 (in press)
Miyamoto K, Yokokawa M, Tanaka K, Nagai T, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, Shimizu W	Diagnostic and prognostic value of type 1 Brugada electrocardiogram at higher (third or second) V1 to V2 recording in men with Brugada syndrome.	Am J Cardiol	99	53-57	2007
Haruna Y, Kobori A, Makiyama T, Yoshida H, Doi T, Tsuji K, Ono S, Nishio Y, Shimizu W, Inoue T, Murakami T, Tsuboi N, Yamanouchi H, Ushinohama H, Nakamura Y, Yoshinaga M, Horigome H, Aizawa Y, Kita T, Horie M:	Genotype-phenotype corelations of <i>KCNJ2</i> mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome.	Hum Mutat	28	208-	2007
Ohgo T, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, Ohe T, Shimizu W	Acute and chronic management in patients with Brugada syndrome associated with electrical storm of ventricular fibrillation.	Heart Rhythm			2007 (in press)

<p>Otomo K, Suyama K, Okamura H, Noda T, Satomi K, Shimizu W, Kurita T, Aihara N, Kamakura S</p>	<p>Participation of a concealed atrio-Hisian tract in the reentrant circuit of the slow-fast type atrioventricular nodal reentrant tachycardia.</p>	<p>Heart Rhythm</p>			<p>2007 (in press)</p>
<p>M. Suenaga, Y. Kaneko, J. Kadokawa, T. Nishikawa, H. Mori, M. Tabata,</p>	<p>Amphiphilic Poly(<i>N</i>-propargylamide) Having Galactose and Lauryloyl Groups</p>	<p>Macromolecul ar Chemistry and Physics</p>	<p>6</p>	<p>1009-1018</p>	<p>2006</p>

## 特集

## 心臓血管系の再生医学：最近の進歩と今後の動向

骨髄細胞移植による  
心不全治療\*

永谷 憲 歳\*\*

Key Words : heart failure, mesenchymal stem cells, angiogenesis, myogenesis

## はじめに

昨今の医療技術の進歩に伴い、傷害を受けた組織や臓器の治療方法として幹細胞を用いた再生療法の応用が期待されている。循環器領域の再生医療には血管再生治療と心筋再生治療があるが、拡張型心筋症などの重症心不全には、心筋と血管の両者を再生させることが理想である。近年、心不全に対する再生医療として、骨髄単核球(mononuclear cells : MNC)、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells : MSC)などのさまざまな細胞系を用いた細胞移植治療が試みられるようになってきた。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た再生医療、とくに骨髄由来の幹細胞や前駆細胞を用いた細胞移植治療が注目されている。本稿では、骨髄細胞、とくに自己の骨髄間葉系幹細胞を用いた心不全治療の可能性について述べる。

## 骨髄単核球移植

心不全治療に用いる細胞種として、これまで動物実験では、新生児心筋細胞、皮膚線維芽

細胞、胚性幹細胞(embryonic stem cell : ES細胞)など、さまざまな種類の細胞が移植源として研究されてきた。現在、臨床応用に向けて研究の進んでいるものとしては、骨髄単核球<sup>1)</sup>、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells : EPC)<sup>2)</sup>、骨格筋芽細胞<sup>3)</sup>、間葉系幹細胞<sup>4)</sup>、心臓由来幹細胞<sup>5)</sup>など、成体内に存在する体性幹細胞を用いた再生医療である。骨髄細胞は造血幹細胞が多数をしめているが、EPCやMSCが一部存在する。1997年にAsaharaらは、EPCが虚血心筋での脈管新生(vasculogenesis)や血管新生(angiogenesis)を促進させることを報告した<sup>2)</sup>。Shintaniらは、MNCが虚血肢での血管新生をもたらすことを報告した<sup>6)</sup>。また、MNC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が報告された<sup>7)</sup>。さらに、虚血心筋に対してもMNCを注入する方法が臨床応用され、成果をあげている。Tseらは8人の狭心症患者に自己骨髄由来のMNCを経カテーテル的に移植し、心筋血流と局所壁運動の改善を報告している<sup>8)</sup>。骨髄細胞から分泌されるVEGF, bFGF, HGFなど多く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ている。また、拡張型心筋症に対するMNCの治療効果を検討するために、Ishidaらはドキシソルビシン投与不全心ラットを用いてMNC移植を行い、心機能改善効果を証明した<sup>9)</sup>。しかし、実際の臨床において、虚血

\* Bone marrow cell transplantation for heart failure.

\*\* Noritoshi NAGAYA, M.D., Ph.D.: 国立循環器病センター研究所再生医療部(☎565-8565 吹田市藤白台5-7-1); Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita 565-8565, JAPAN

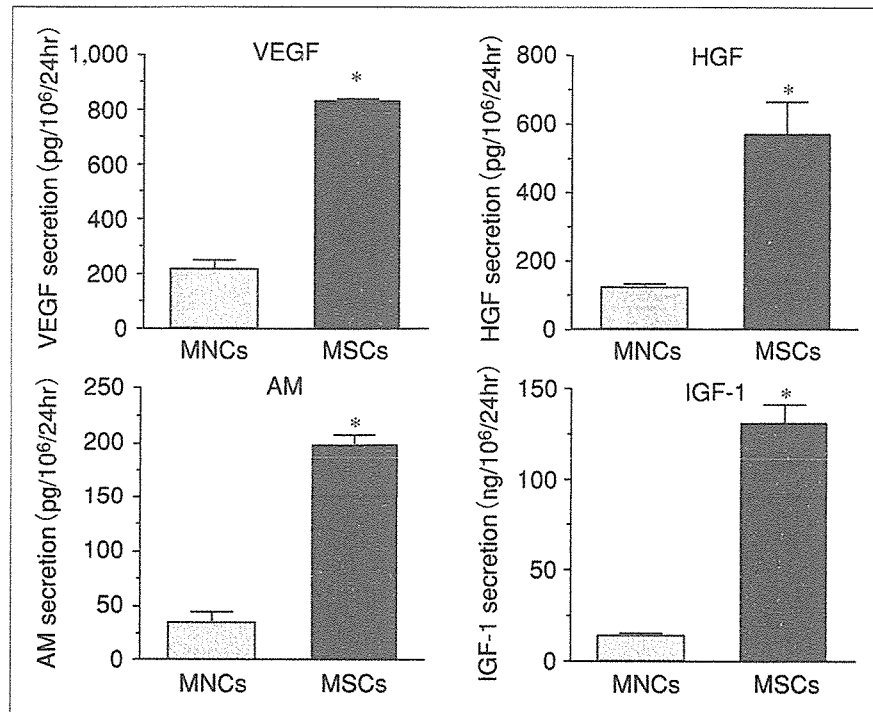


図1 MSCとMNCから分泌される血管新生因子・成長因子の比較  
MSCはMNCと比較して多量のVEGF, HGF, AM, IGF-1を分泌した。\* $p < 0.05$   
vs. MNC

を有さない拡張型心筋症や陳旧性心筋梗塞などによる慢性心不全に対してMNCが有効か否かは今のところ明らかではない。また、MNCは培養が困難であるため、全身麻酔により多くの骨髓液を採取しなければならないという問題点もある。

### 間葉系幹細胞移植

自己の細胞を少量の組織より採取培養し、また保存できれば、比較的低侵襲で繰り返し細胞移植ができる可能性があり、理想的である。MSCは自己複製能と多分化能を有する細胞であり、体性幹細胞の一つとして分類され、成体組織においては骨髓間質や真皮・骨格筋・脂肪組織などに存在する<sup>4)</sup>。組織の修復や恒常性の維持、造血幹細胞の増殖や分化の制御に機能するだけでなく、骨・軟骨・骨格筋・脂肪・靭帯などに分化しうるが、血管内皮、平滑筋、心筋にも分化する能力をもっている<sup>10)11)</sup>。MSCは骨髓中に存在するため採取が比較的容易であり、また増殖能力が高いことから生体外でも大量に培養することが可能である。すなわち、患者の少量の骨

髄より分離したMSCを培養し、必要な数に増殖させたあとに患部へ移植するという治療が可能である。

MSCは脱メチル化によって<sup>10)</sup>、また心筋細胞との共培養によって<sup>12)</sup>、拍動する心筋細胞に分化することが報告されてきた。われわれはこのMSCを体外で分化させることなく未分化な状態で増殖させ心筋内へ移植することにより、わずかではあるが心筋と血管が同時に再生されることを報告した<sup>13)</sup>。MSCの心筋への移植によってラット拡張型心筋症の心機能は有意に改善した。また、病理学的検討では心筋のコラーゲン含量の減少を確認した。また、心筋内に注入したMSCの一部は免疫組織染色により心筋組織の指標であるtroponin T・Desmin・Connexin43陽性であった。さらにMSCは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、Silvaらは虚血性心筋症によるイヌ慢性心不全モデルにMSCを移植し、心機能改善効果を確認した<sup>14)</sup>。しかしながら、実際にこれらの成熟細胞に移植したMSCが分化する率はきわめて低い。

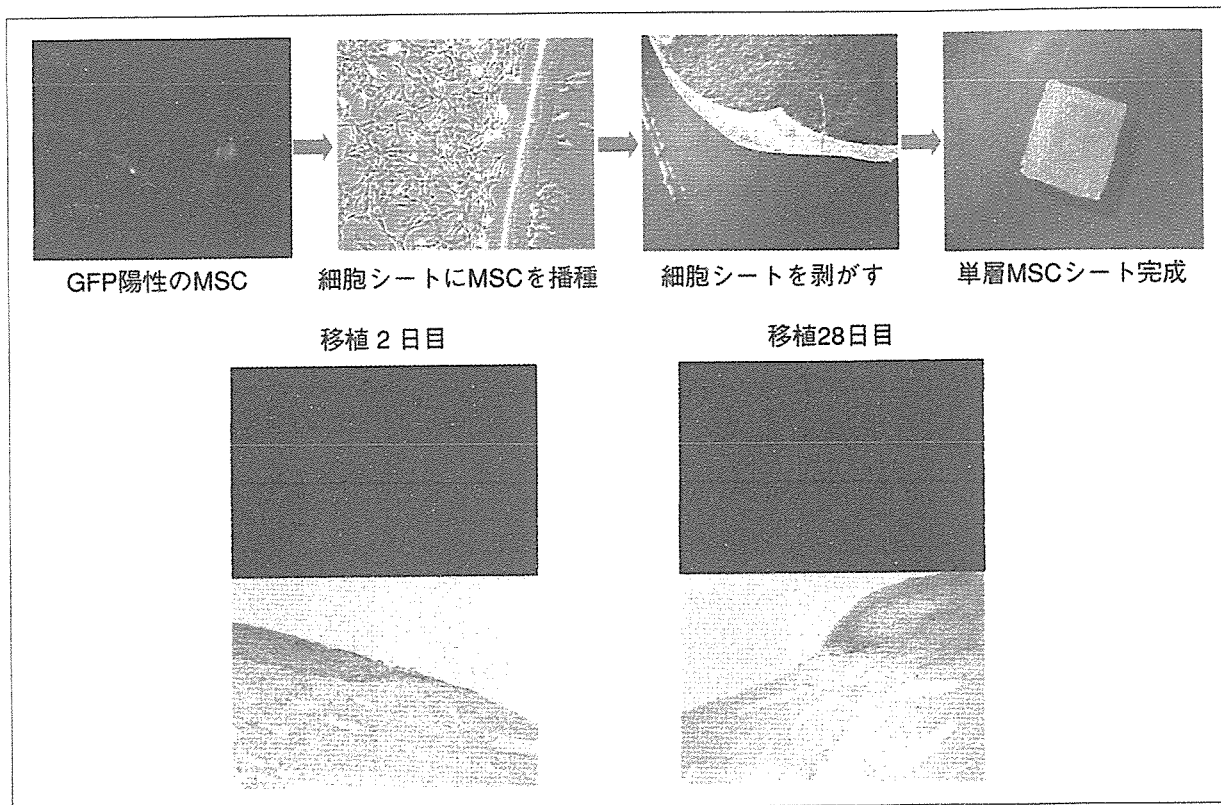


図2 単層間葉系幹細胞シートによる心筋様組織再生

単層間葉系幹細胞シートは、移植後にシート内に多くの血管網を構築しながら成長し、1か月後には厚い心筋様組織を形成した。

### 間葉系幹細胞のパラクライン効果

興味深いことに、培養したMSCはMNCと比較して大量のVEGFやHGFを分泌することが明らかとなった<sup>13)</sup>(図1)。これらの因子は血管新生、アポトーシス抑制、線維化抑制に働くことが知られている。また、MSCはgrowth hormone(GH)の下流にあり、心筋や骨格筋の成長を促すinsulin like growth factor-1(IGF-1)を分泌する。Dzauらのグループは、急性心筋梗塞ラットの心筋にAkt遺伝子を導入したMSCを移植し、72時間後にはすでに梗塞範囲の縮小と心機能の改善が得られることを示した<sup>15)</sup>。このような早期の機能改善はMSCの心筋への分化では説明がつかない。さらに*in vitro*において、低酸素条件下で得られたMSCの培養上清液が心筋細胞のアポトーシスを抑制する心保護作用を示すことを明らかにした。また、同様の方法で得た培養上清液を前下行枝結紮後の心筋梗塞境界部位に注入するのみで、梗塞範囲が縮小することを示した。これら一連の結果から、MSCの移植の効果はMSCの心筋への

分化ではなく、MSCのパラクライン効果によりもたらされたと考えられる。

一方、Kinnirdらは、マイクロアレイを用いた網羅的解析の結果、MSCsは低酸素条件下でVEGF-A, fibroblast growth factor(FGF)-2, 7, interleukin(IL)-1, 6, placental growth factor(PIGF), transforming growth factor-β(TGF-β)などのサイトカインを多量に産生することを示した<sup>16)</sup>。また、MSCの培養上清液が*in vivo*において、血管内皮細胞、平滑筋細胞の増殖と遊走を促進させることを示した。さらに、ラットの大腿動脈を摘出して下肢虚血モデルを作成し、虚血部位周辺の4か所に計50μlの培養上清液を3日間連続投与したところ、コントロール群に比べ虚血肢の血流、運動能を著明に改善させることを示した。このように移植されたMSCはパラクライン因子として血管の再生、心筋の保護に関与すると考えられる。

### ハイブリット再生治療

組織再生には適切な細胞と細胞が成育する環

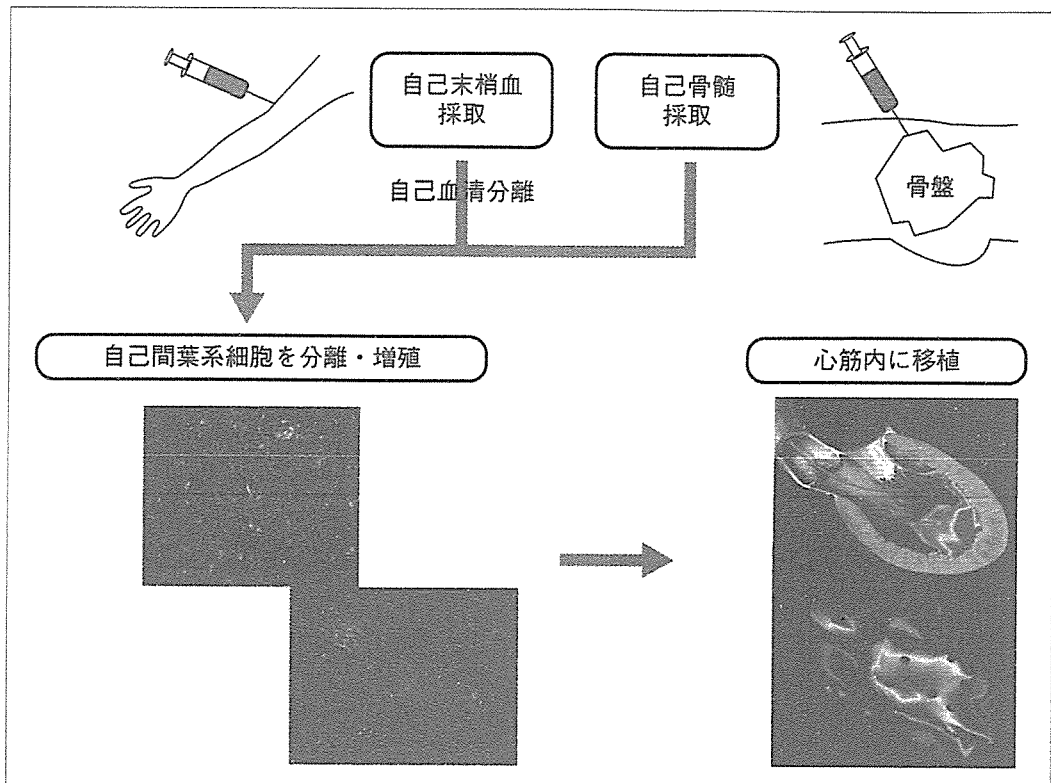


図3 慢性心不全に対するMSC移植の臨床応用  
少量の自己骨髄を採取し、自己血清を用いて培養し、カテーテルにより心内膜側より移植する。

境(生着のための足場と成長因子)が必要である。心筋内に移植した細胞の生存率はきわめて低いことが知られている。このためMangiらは、生存因子として知られているAkt遺伝子をMSCに導入したあとに細胞移植を行っている<sup>17)</sup>。その結果、MSCの生存率が高まり、治療効果を高めることに成功した。われわれは、多分化能をもつMSCを細胞源とし、adrenomedullin (AM)やIGF-1によって細胞の生存や増殖を促す、または細胞シートなどの足場材料を用いて、いわゆる組織再生のためのハイブリット治療を開発した。抗アポトーシスに働く内因性ペプチドであるAMやIGF-1を細胞と併用投与することで、MNCやMSCの生存率をあげて治療効果を高めることに成功した<sup>18)19)</sup>。そのメカニズムとしてMSCのAktリン酸化によるアポトーシス抑制が大きく関与していた。

従来、薬物および手術治療に抵抗性の重症心不全に対して、細胞懸濁液の心筋内直接注入による細胞移植治療が行われてきた。しかし、移植細胞が心筋組織内で散乱し、その多くが長期間生存できないため、心機能改善効果が少なく、

また厚みのある心筋組織再生は不可能であった。これらの問題を解決するために、われわれはMSCを用いて単層の細胞シートグラフトを作製し、心不全治療効果を検討した<sup>20)</sup>。間葉系幹細胞シートはVEGFやHGFなどの血管新生および抗アポトーシス因子を分泌するため、自身の血管組織への分化能のみならず、ホスト由来の細胞をグラフト内に誘導することで、高密度の血管網を構築する。この血管形成により豊富な血流供給を受けることで、生存および増殖能を維持し、移植時には厚さわずか20 $\mu$ m程度の細胞シートが、4週間で約600 $\mu$ mの実質組織に成長した(図2)。その結果、菲薄化した前壁の梗塞巣の厚みが増し、拡張期のwall stressが減少することで心機能が改善したと考えられる。われわれがMSCのソースに用いた皮下脂肪は、心血管疾患をもつ患者には不要な組織であり、脂肪吸引などの低侵襲な手技で採取できるため、理想的な再生治療法といえる。

### 間葉系幹細胞移植の臨床応用

われわれはこれまでの動物実験の結果をふま

え、間葉系幹細胞移植による難治性心不全治療の臨床試験を行っている。本臨床試験は、国立循環器病センターと産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門との共同研究として行われている。この細胞移植治療は、虚血性心疾患や拡張型心筋症などが原因で心不全を有し、既存の治療(利尿剤, ACE阻害薬,  $\beta$ 遮断薬, 両室ペーシング, 外科的治療など)に抵抗性を示す症例を対象に行っている。まず、患者自身の骨髓液約20mlと自己末梢血400mlを採取する(図3)。末梢血から分離した血清を用いて骨髓液を培養する。MSCの特異的抗原は存在しないことや、培養の操作過程を簡略化するために、MSCの接着性を用いて浮遊系細胞との分離を行う。こうしてMSCを体外で3週間培養増殖させ、カテーテルを用いて心内膜側より心筋内へ移植する。この方法で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、また少量の骨髓液で治療に十分な細胞を確保できるという点が今までの細胞移植治療と大きく異なる点である。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。

### おわりに

心不全に対する再生医療として、骨髓単核球、間葉系幹細胞などの自己骨髓細胞を用いた細胞移植治療が試みられるようになってきた。また、移植細胞の生着率と治療効果を高めるために、成長因子の併用や細胞シートを用いて、組織再生のためのハイブリット治療の開発が行われている。拡張型心筋症などの難治性心不全に対する治療として、どの細胞がもっとも有効であるのか、また細胞移植でどの程度心機能や生命予後が改善されるのか、今後さらなる検討が必要である。

### 文 献

- 1) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001 ; 104 : 1046.
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 ; 275 : 964.
- 3) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, et al. Cell transplantation for myocardial repair : an experimental approach. *Cell Transplant* 1992 ; 1 : 383.
- 4) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284 : 143.
- 5) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003 ; 114 : 763.
- 6) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001 ; 103 : 897.
- 7) 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* 2002 ; 360 : 427.
- 8) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003 ; 4 : 47.
- 9) Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* 2004 ; 23 : 436.
- 10) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 697.
- 11) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002 ; 105 : 93.
- 12) Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage *in vitro*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 ; 125 :

1) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion



- 1470.
- 13) Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005 ; 112 : 1128.
  - 14) Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005 ; 111 : 150.
  - 15) Gneccchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006 ; 20 : 661.
  - 16) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004 ; 94 : 678.
  - 17) Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1195.
  - 18) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, et al. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2005 ; 111 : 356.
  - 19) Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, et al. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke* 2005 ; 36 : 853.
  - 20) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006 ; 12 : 459.

\*            \*            \*

## 骨髓細胞移植による心不全治療

永谷憲歳\*, 清水 渉\*<sup>2</sup>, 野田 崇\*<sup>2</sup>, 野口輝夫\*<sup>2</sup>, 土井 香\*<sup>3</sup>,  
石田良雄\*<sup>4</sup>, 鎌倉史郎\*<sup>2</sup>, 北風政史\*<sup>2</sup>, 中谷武嗣\*<sup>5</sup>, 寒川賢治\*<sup>6</sup>,  
盛 英三\*<sup>7</sup>, 友池仁暢\*<sup>8</sup>, 北村惣一郎\*<sup>9</sup>

### Key word

ischemic heart disease  
heart failure  
stem cells  
angiogenesis

Therapeutic potential of bone marrow cells for the treatment of heart failure

\*Noritoshi Nagaya :

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,  
National Cardiovascular Center Research Institute  
国立循環器病センター研究所 再生医療部

\*<sup>2</sup>Wataru Shimizu, Takashi Noda, Teruo Noguchi, Shirou

Kamakura, Masashi Kitakaze :  
The Division of Cardiology and CCU,  
National Cardiovascular Center  
国立循環器病センター 心臓血管内科

\*<sup>3</sup>Kaori Doi :

Assistant Nurse, Department of Nursing,  
同 看護部

\*<sup>4</sup>Yoshio Ishida :

Department of Radiology and Nuclear Medicine,  
同 放射線診療部

\*<sup>5</sup>Takeshi Nakatani :

Department organ transplant, 同臓器移植部

\*<sup>6</sup>Kenji Kangawa :

Deputy Director, National Cardiovascular Center  
Research Institute  
同 研究所 副所長

\*<sup>7</sup>Hidezo Mori :

Department of Cardiac Physiology,  
同 研究所 心臓生理部

\*<sup>8</sup>Hitonobu Tomoike :

Director General, National Cardiovascular Center  
国立循環器病センター 院長

\*<sup>9</sup>Soichiro Kitamura :

President, National Cardiovascular Center  
国立循環器病センター 総長

### はじめに

昨今の医療技術の進歩に伴い、傷害を受けた組織や臓器の治療方法として幹細胞を用いた再生療法への応用が期待されている。循環器領域の再生医療には血管再生治療と心筋再生治療があるが、拡張型心筋症などの重症心不全には、心筋と血管の両者を再生させることが理想である。近年、心不全に対する再生医療として、骨髓単核球(mononuclear cells: MNC)、骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)などの様々な細胞系を用いた細胞移植治療が試みられるようになってきた。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た再生医療、特に骨髓由来の幹細胞や前駆細胞を用いた細胞移植治療が注目されている。

本稿では、骨髓細胞、特に自己の骨髓間葉系幹細胞を用いた心不全治療の可能性について述べる。

### I. 骨髓単核球移植

心不全治療に用いる細胞種として、これまでに動物実験では、新生児心筋細胞、皮膚線維芽細胞、胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)など、さまざまな種類の細胞が移植源として研究されてきた。現在、臨床応用に向けて研究の進んでいるものとしては、骨髓

単核球<sup>1</sup>，血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells : EPC)<sup>2</sup>，骨格筋芽細胞<sup>3</sup>，間葉系幹細胞<sup>4</sup>，心臓由来幹細胞<sup>5</sup> など，成体内に存在する体性幹細胞を用いた再生医療である。骨髄細胞は，造血幹細胞が多数を占めているが，EPCやMSCが一部存在する。1997年にAsaharaらは，EPCが虚血心筋での脈管新生 (vasculogenesis) や血管新生 (angiogenesis) を促進させることを報告した<sup>2</sup>。Shintaniらは，MNCが虚血肢での血管新生をもたらすことを報告した<sup>6</sup>。また，MNCを用いた血管再生療法は，わが国において初めて臨床応用され，末梢動脈閉塞症の治療として，その安全性と有効性が報告された<sup>7</sup>。さらに，虚血心筋に対してもMNCを注入する方法が臨床応用され，成果を挙げている。Tseらは8人の狭心症患者に自己骨髄由来のMNCを経カテーテル的に移植し，心筋血流と局所壁運動の改善を報告している<sup>8</sup>。骨髄細胞から分泌されるVEGF，bFGF，HGFら多くのサイトカインが血管新生に関与する可能性がある。また，移植されたMNCは筋組織での血管新生因子 (IL-1 $\beta$ ，VEGFなど) の産生を促進することで血管新生を誘発することが明らかとなってきた<sup>9</sup>。

拡張型心筋症に対するMNCの治療効果を検討するために，Ishidaらはドキシソルピシン投与不全心ラットを用いてMNC移植を行い，心機能改善効果を証明した<sup>10</sup>。しかし，実際の臨床において，虚血を有さない拡張型心筋症や陳旧性心筋梗塞などによる慢性心不全に対してMNCが有効か否かは今のところ明らかではない。また，MNCは培養が困難であるため全身麻酔により多くの骨髄液を採取する必要がある。

## Ⅱ. 間葉系細胞移植

自己の細胞を少量の組織より採取培養し，また保存できれば，比較的低侵襲で繰り返し

細胞移植ができる可能性があり，理想的である。MSCは自己複製能と多分化能を有する細胞であり，体性幹細胞の1つとして分類され，成体組織においては骨髄間質や真皮・骨格筋・脂肪組織などに存在する<sup>4</sup>。組織の修復や恒常性の維持，造血幹細胞の増殖や分化の制御に機能するだけでなく，骨・軟骨・骨格筋・脂肪・靭帯などに分化し得るが，血管内皮，平滑筋，心筋にも分化する能力を持っている<sup>11,12</sup>。MSCは骨髄中に存在するため採取が比較的容易であり，また増殖能力が高いことから生体外でも大量に培養することが可能である。すなわち，患者の少量の骨髄より分離したMSCを培養し，必要な数に増殖させた後に患部へ移植するという治療が可能である。

MSCは，脱メチル化によって<sup>13</sup>，また心筋細胞との共培養によって<sup>14</sup>，拍動する心筋細胞に分化することが報告されてきた。我々はこのMSCを体外で分化させることなく未分化な状態で増殖させ心筋内へ移植することにより，わずかではあるが心筋と血管が同時に再生されることを報告した<sup>14</sup>。MSCの心筋への移植によって，ラット拡張型心筋症の心機能は有意に改善した。また，病理学的検討では心筋のコラーゲン含量の減少を確認した。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・Connexin43陽性であった。さらにMSCは，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，Perinらは虚血性心筋症によるイヌ慢性心不全モデルにMSCを移植し，心機能改善効果を確認した<sup>15</sup>。しかしながら，実際に移植したこれらの成熟細胞にMSCが分化する率は極めて低いと考えられている。

## Ⅲ. 間葉系幹細胞のパラクライン効果

興味深いことに，培養したMSCはMNCと

比較して大量の VEGF や HGF を分泌することが明らかとなった(図1)<sup>14</sup>。これらの因子は血管新生, アポトーシス抑制, 線維化抑制に働くことが知られている。また MSC は growth hormone (GH) の下流にあり, 心筋や骨格筋の成長を促す insulin like growth factor-1 (IGF-1) を分泌する。Dzau らのグループは, 急性心筋梗塞ラットの心筋に Akt 遺伝子導入した MSC を移植し, 72 時間後にはすでに梗塞範囲の縮小と心機能の改善が得られることを示した<sup>16</sup>。このような早期の機能改善は, MSC の心筋への分化では説明がつかない。さらに *in vitro* において, 低酸素条件下で得られた MSC の培養上清液が心筋細胞のアポトーシスを抑制する心保護作用を示すことを

明らかにした。また同様の方法で得た培養上清液を前下行枝結紮後の心筋梗塞境界部位に注入するのみで, 梗塞範囲が縮小することを示した。これら一連の結果から, MSC の移植の効果は MSC の心筋への分化ではなく, MSC のパラクライン効果によりもたらされたと考えられる。Kinnird らはマイクロアレイを用いた網羅的解析の結果, MSCs は低酸素条件下で VEGF-A, Fibroblast growth factor (FGF)-2,7, Interleukin (IL)-1,6, Placental growth factor (PlGF), Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) などのサイトカインを多量に産生することを示した<sup>17</sup>。また, MSC の培養上清液が *in vivo* において, 血管内皮細胞, 平滑筋細胞の増殖と遊走を促進させることを

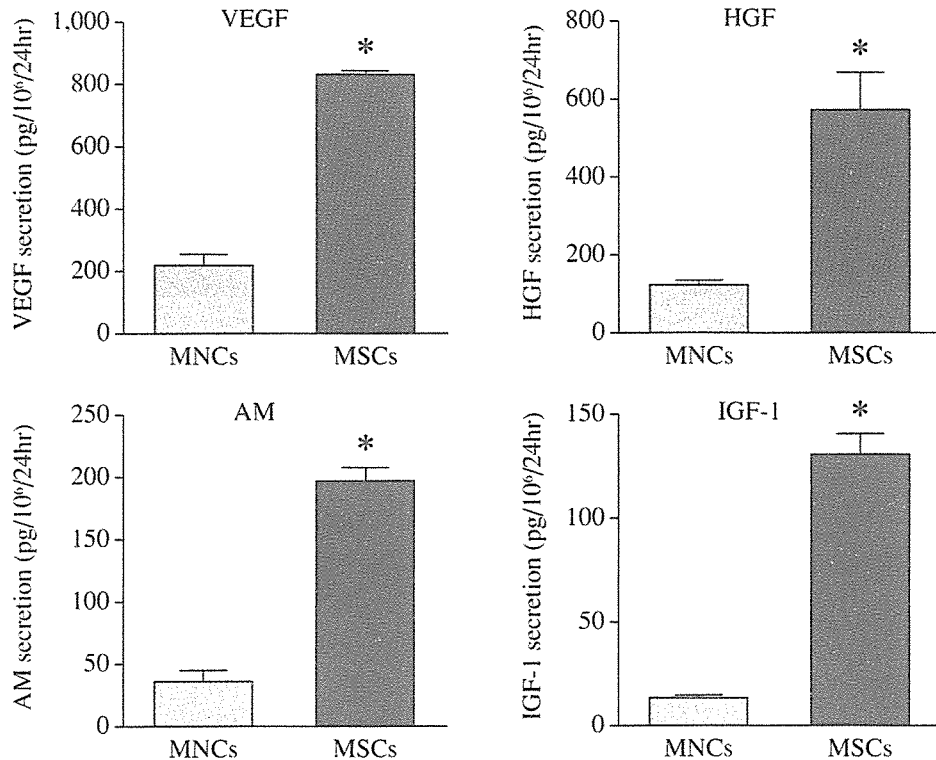


図1. 間葉系幹細胞 (MSC) と骨髄単核球 (MNC) から分泌される血管新生因子・成長因子の比較  
MSC は MNC と比較して多量の VEGF, HGF, AM, IGF-1 を分泌した。  
\* p < 0.05 vs MNC

示した。さらに、ラットの大腿動脈を摘出して下肢虚血モデルを作成し、虚血部位周辺の4カ所に計50 $\mu$ Lの培養上清液を3日間連続投与したところ、コントロール群に比べ虚血肢の血流、運動能を著明に改善させることを示した。このように移植されたMSCはパラクライン因子として血管の再生、心筋の保護に関与すると考えられる。

#### IV. ハイブリット再生治療

組織再生には、適切な細胞と細胞が成育する環境(生着のための足場と成長因子)が必要である。心筋内に移植した細胞の生存率は極めて低いことが知られている。このため、Mangiらは生存因子として知られているAkt遺伝子をMSCに導入した後に細胞移植を行っている<sup>18</sup>。その結果、MSCの生存率が上がり、治療効果を高めることに成功した。

我々は、多分化能を持つMSCを細胞源とし、adrenomedullin (AM)やIGF-1によって細胞の生存や増殖を促す、または細胞シートらの足場材料を用いて、いわゆる組織再生のためのハイブリット治療を開発した。抗アポトーシスに働く内因性ペプチドであるAMやIGF-1を細胞と併用投与することで、MNCやMSCの生存率をあげて治療効果を高めることに成功した<sup>19,20</sup>。そのメカニズムとして、MSCのAkt磷酸化によるアポトーシス抑制が大きく関与していた。

従来、薬物および手術治療に抵抗性の重症心不全に対して、細胞懸濁液の心筋内直接注入による細胞移植治療が行われてきた。しかし、移植細胞が心筋組織内で散乱し、その多くが長期間生存できないため、心機能改善効果が少なく、また厚みのある心筋組織再生は不可能であった。これらの問題を解決するた

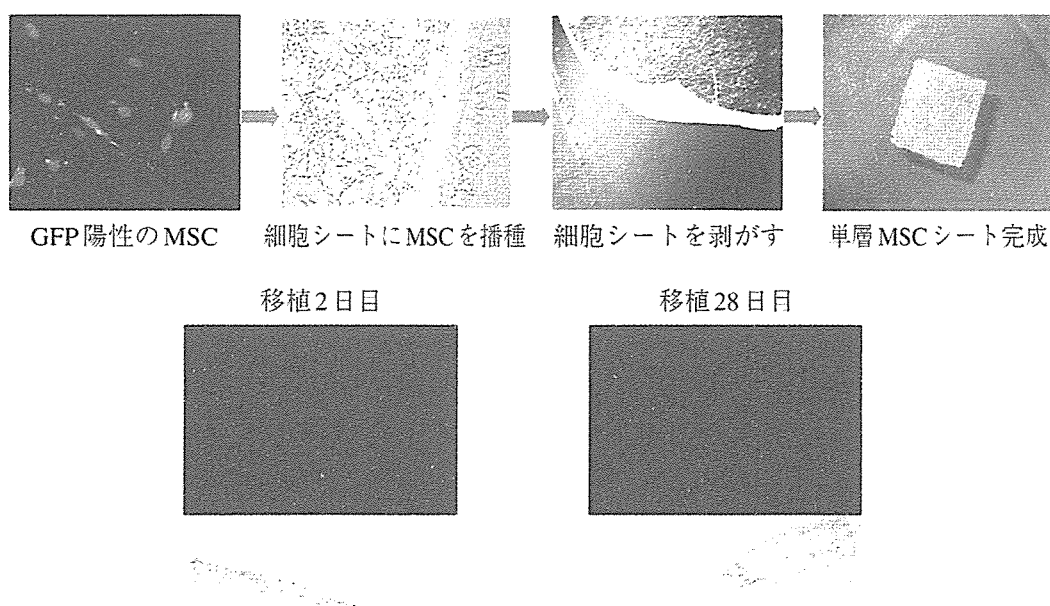


図2. 単層間葉系幹細胞シートによる組織再生  
単層間葉系幹細胞シートは、移植後にシート内に多くの血管網を構築しながら成長し、1カ月後には厚い心筋様組織を形成した。

めに、我々はMSCを用いて単層の細胞シートグラフトを作製し、心不全治療効果を検討した<sup>2)</sup>。間葉系幹細胞シートはVEGFやHGFなどの血管新生および抗アポトーシス因子を分泌するため、自身の血管組織への分化能のみならず、ホスト由来の細胞をグラフト内に誘導することで、高密度の血管網を構築する。この血管形成により豊富な血流供給を受けることで、生存および増殖能を維持し、移植時には厚さ僅か20 $\mu$ m程度の細胞シートが、4週間で約600 $\mu$ mの実質組織に成長した(図2)。その結果、菲薄化した前壁の梗塞巣の厚みが増し、拡張期のwall stressが減少することで、心機能が改善したと考えられる。我々がMSCのソースに用いた皮下脂肪は、心血管疾患を持つ患者には不要な組織であ

り、脂肪吸引等の低侵襲な手技で採取できる。また、皮下脂肪より採取したMSCは骨髄由来のものとは比べ増殖能に優れていることも報告され、新たな細胞源として期待される。

### V. 間葉系幹細胞移植の臨床応用

我々はこれまでの動物実験の結果を踏まえ、間葉系幹細胞移植による難治性心不全治療の臨床試験を行っている。本臨床試験は、国立循環器病センターと産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門との共同研究として行われている。この細胞移植治療は、虚血性心疾患や拡張型心筋症等が原因で心不全を有し、既存の治療(利尿剤, ACE阻害薬,  $\beta$ 遮断薬, 両室ペーシング, 外科的治療など)に抵抗性を示す症例を対象に行っている。ま

骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法

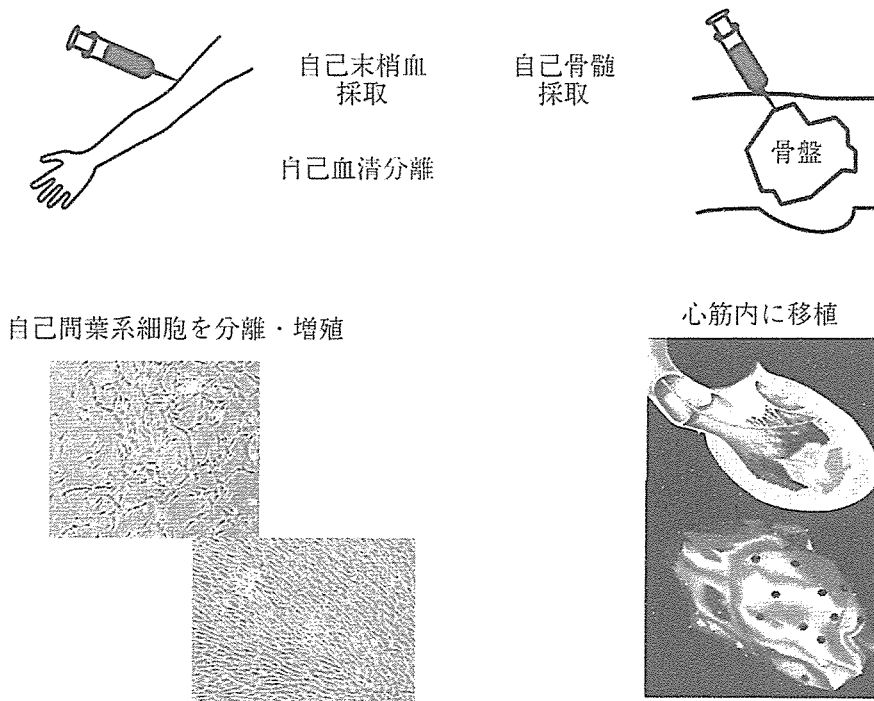


図3. 慢性心不全に対するMSC移植の臨床応用  
少量の自己骨髄を採取し、自己血清を用いて培養し、カテーテルにより心内膜側より移植する。

ず、患者自身の骨髓液約20mLと自己末梢血400mLを採取する(図3)。末梢血から分離した血清を用いて骨髓液を培養する。MSCの特異的表面抗原は存在しないことや、培養の操作過程を簡略化するために、MSCの接着性を用いて浮遊系細胞との分離を行う。こうしてMSCを体外で3週間培養増殖させ、カテーテルを用いて心内膜側より心筋内へ移植する。この方法で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、また少量の骨髓液で治療に十分な細胞を確保できるという点がこれまでの細胞移植治療と大きく異なる点である。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見られなかった。今後、更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。

### おわりに

心不全に対する再生医療として、MNC、MSCなどの自己骨髓細胞を用いた細胞移植治療が試みられるようになってきた。また、移植細胞の生着率と治療効果を高めるために、成長因子の併用や細胞シートを用いて、組織再生のためのハイブリット治療の開発が行われている。難治性心不全に対する治療として、どの細胞が最も有効であるのか、また細胞移植で生命予後が改善されるか否か、今後さらなる検討が必要である。

### § 文 献

- 1) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al : Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104:1046-52.
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- 3) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, et al : Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992;1:383-90.
- 4) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- 5) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.
- 6) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001;103:897-903.
- 7) 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* 2002;360:427-35.
- 8) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al : Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-9.
- 9) Tateno K, Minamino T, Toko H, et al : Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* 2006;98:1194-202.
- 10) Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al : Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart and Lung Transplantation* 2004;23:436-45.
- 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) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al : Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-8.
- 13) Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al : Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage *in vitro*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:1470-80.
- 14) Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al : Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128-35.
- 15) Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al : Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart

- function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150-6.
- 16) Gneccchi M, He H, Noiseux N, et al : Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006;20:661-9.
- 17) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al : Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-85.
- 18) Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al : Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195-201.
- 19) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, et al : Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2005;111:356-62.
- 20) Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, et al : Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke* 2005;36:853-8.
- 21) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al : Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;12:459-65.



## 8. VEGF/VEGF-E

## 末梢動脈疾患

竹下 聡 TAKESHITA Satoshi

国立循環器病センター 心臓血管内科

## I 末梢動脈疾患とは

末梢動脈疾患 (peripheral artery disease : PAD) とは、末梢動脈の狭窄や閉塞によって、四肢をはじめとする末梢組織に虚血をきたすような疾患を指す。末梢動脈疾患には、閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓血管炎 (Buerger病)、膠原病に伴う血管炎などが含まれるが、その中でも最も多いのは閉塞性動脈硬化症である。閉塞性動脈硬化症では、末梢動脈の粥状動脈硬化により血管内腔の狭窄が進行し下肢に虚血が生じる。これに伴い、しびれ、冷感、間歇性跛行 (後述)、疼痛、潰瘍、壊疽などのさまざまな症状が出現する。欧米における罹患率は人口の数%程度とされているが、わが国における確立された疫学データは残念ながら存在しない。自覚症状による病期分類としてFontaine分類が代表的である (表)。Fontaine I度の軽症患者に対しては、禁煙指導や糖尿病・高血圧など動脈硬化の危険因子をコントロールしながら経過観察するのが通常である。病状が進行してくると、Fontaine II度に見られるような間歇性跛行が出現する。間歇性跛行とは、一定距離の歩行後に下肢の疼痛が出現するが、休息により痛みは消失し、再び歩行可能

表 Fontaine分類

グレード	症状
I	なし (しびれ, 冷感)
II	間歇性跛行
III	安静時疼痛
IV	皮膚潰瘍, 壊疽

となるような状態を指す。末梢動脈疾患の症状で最も多いのは、この間歇性跛行である。間歇性跛行が軽度の場合、運動療法や抗血小板剤などによる薬物療法を行うが、重症例では狭窄した血管をカテーテルによって拡張する経皮的血管形成術（percutaneous transluminal angioplasty : PTA）や外科手術（バイパス手術）が必要となる。Fontaine III～IV度を重症下肢虚血（critical limb ischemia : CLI）と呼ぶが、このような状態にまで進行すると、安静時にも下肢疼痛が出現し、皮膚の潰瘍や壊疽もみられるようになる。重症下肢虚血を呈する患者では、痛みや壊疽のために運動療法を施行するのは困難で、薬物治療も無効のことが少なくない。また、重症下肢虚血をきたすような血管は動脈硬化性変化が強く、血管形成術やバイパス手術もしばしば困難である。このような重症例に対する治療法として考えられたのが血管新生療法（therapeutic angiogenesis）<sup>1)</sup>である。

## II 血管新生療法とは

血管新生療法は、血管増殖因子やその遺伝子あるいは骨髄や末梢血細胞を用いて血管新生を促進させ、組織虚血の改善を図る治療法で、1994年、米国のIsnerらにより初めて臨床応用された<sup>2)</sup>。Isnerらが行ったのは、vascular endothelial growth factor（VEGF）<sup>3)</sup> 遺伝子を用いた血管新生療法であり、循環器領域における初の遺伝子治療としても知られている。以後、今日までに10年以上が経過し、遺伝子以外にも増殖因子蛋白、骨髄細胞、末梢血細胞などを用いたさまざま

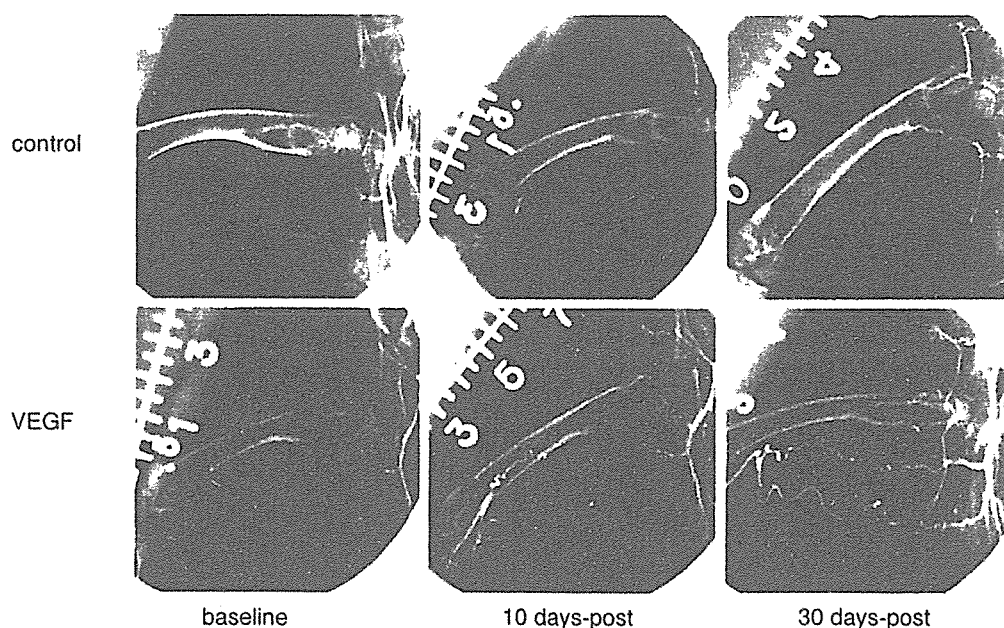


図1 VEGF蛋白投与後の血管造影所見

生理食塩水または組み換えVEGF蛋白を家兔虚血肢モデルの内腸骨動脈内へ選択的に投与し、側副路の発達を比較した。上段の対照群では、治療後30日間において側副路行路に大きな変化は認められない。これに対し、下段のVEGF治療群においては治療から10日間で側副路の著明な改善が認められる。

（文献1より引用）

まな血管新生療法が開発されてきた。各々の治療法の有効性が臨床試験により明らかにされつつある中、その対象疾患も、末梢動脈疾患から虚血性心疾患や虚血性脳疾患などへと拡大されてきている。

### Ⅲ 血管新生療法の臨床応用まで

血管新生療法のコンセプトは決して新しいものではない。1980年代後半には、ネコの虚血肢モデルに対して大網の脂肪分画を投与し、虚血を改善させる試みが行われている。大網や脂肪細胞の再生医療への応用は最近のトピックであり、このような研究がすでに20年以上前に存在したことは興味に値する。これらの血管新生療法とIsnerらが行ったそれとの違いは、後者がVEGFという血管内皮細胞に特異的な増殖因子を用いた点にある。1990年代初頭、Isnerらは家兎の虚血肢モデルにVEGF蛋白を投与することにより下肢の側副血行発達を促進できないか検討を行った(図1)<sup>1)</sup>。VEGF蛋白の動脈投与、静脈投与、繰り返し静脈投与、ヘパリン併用などのさまざまな投与法が検討されたが、投与法の如何にかかわらず、側副血行の促進には100~1,000  $\mu$ gのVEGF蛋白が必要なことが明らかとなった。しかしながら、大量のVEGF蛋白を投与すると、投与した蛋白が全身を循環し、非目的部位へと到達するのは避け難い。血管増殖因子の全身への拡散は、糖尿病患者においては網膜症を悪化させ、癌患者では腫瘍血管の発達を促進させ得る。また、一部の血管増殖因子は一酸化窒素(NO)を介した血管拡張作用を有しており、遷延性低血圧を惹起させ得る。事実、VEGF蛋白を用いた血管新生療法の臨床試験では、低血圧を避けるためにその投与量が制限された。

大量の蛋白投与に伴う副作用を回避するために行き着いた結論が、遺伝子を用いたローカルドラッグデリバリーであった。Isnerらはカテーテルを用いてVEGF遺伝子を経皮的に血管細胞へと導入し、それらの細胞からVEGF蛋白を分泌させることに成功した。ここでは、表面が親水性ゲルでコーティングされた冠動脈形成術用バルーンカテーテル(ハイドロゲル・バルーンカテーテル)を用いて下肢血管への遺伝子導入が行われた。ハイドロゲルは、狭窄部位におけるバルーンの通過性を改善するために施されたコーティングであるが、IsnerらはこのゲルにプラスミドDNAの水溶液をしみ込ませ、遺伝子キャリアとして使用したのである。通常のPTAテクニックを用いてバルーンを目的部位へと進め、4~8気圧で1分間バルーンを拡張させることで遺伝子を血管壁へと導入する。その遺伝子導入効率はリポゾームによる遺伝子導入に比し100倍以上の高効率ではあったが、 $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた組織所見の検討では、導入部位のわずか0.1%以下の細胞にしか遺伝子発現が認められなかった<sup>4)</sup>。このわずかな細胞によって血管新生を促進することが可能なのか疑問なわけだが、遺伝子の導入効率(transfection efficiency)と治療効率(therapeutic efficiency)とは同義ではない。遺伝子産物である増殖因子が細胞外へと分泌されれば、たとえ導入効率は低くとも、パラクリン効果が期待できる<sup>5)</sup>。この仮説は動物実験によって検証された。すなわち、ハイドロゲル・バルーンカテーテルを用いて家兎虚血肢モデル

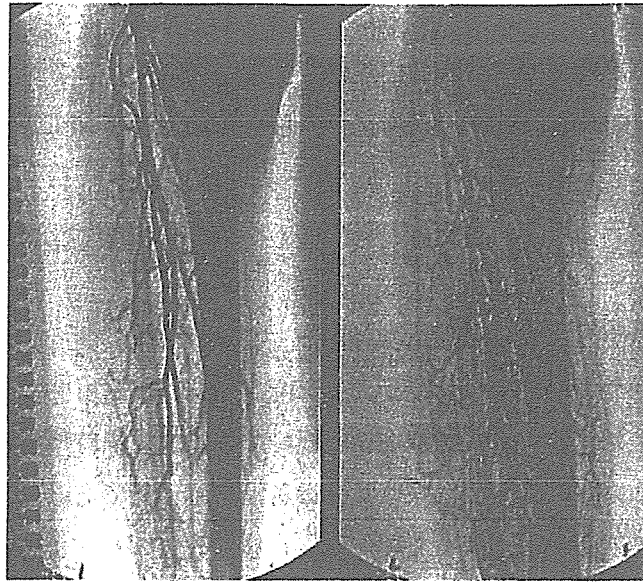


図2 遺伝子治療前後におけるDSA (digital subtraction angiography) 所見  
 左：遺伝子治療前，右：遺伝子治療1ヵ月後  
 VEGFによる遺伝子治療の1ヵ月後，下肢側副血行の著明な発達を認める。

(文献2より引用)

にVEGF遺伝子の導入を行うと，約3週間にわたりその発現が認められ，VEGF蛋白の動脈内投与と同等以上の側副路発達効果が得られたのである。一方，末梢血中のVEGF蛋白の濃度はELISAによる測定限界付近にあり極めて低値であった。つまり，遺伝子の導入効率は低くとも，局所では治療効果を得るに十分な組織濃度が維持され，逆に血中濃度は希釈効果によって低く抑えられるわけである。ここで忘れてならないのは，本法がプラスミドDNA以外には何のベクターも用いない遺伝子導入法であった点である (naked DNAアプローチ)。この研究によって，臨床応用における本法の高い安全性が裏づけられた。

#### Ⅳ VEGFを用いた血管新生療法の臨床応用

1994年，Isnerらは血管新生療法の臨床試験を開始した<sup>2)</sup>。前述のように，この試験は循環器領域における初の遺伝子治療としても知られており，内科治療や外科治療が無効な重症末梢動脈疾患患者を対象に行われた。遺伝子治療から1～2ヵ月で，血管造影上，新生血管の出現が認められ，これに伴い下肢疼痛や難治性潰瘍が消失した (図2)。副作用は下腿浮腫や良性血管腫など，一過性の軽微なものだけであった。しかしながら，バルーンカテーテルを用いた遺伝子導入は，動脈穿刺が不可能な例，動脈硬化が高度でカテーテルの標的血管へのアクセスが困難な例，遺伝子導入に際し解離などの血管損傷リスクが高い例には施行できない。そこで考案されたのが，虚血筋への遺伝子導入である。Baumgartnerらは，VEGFプラスミドの虚血下肢への筋注を行い，7～8割の症例において血管造影上の側副路発達や臨床症状改善を得ることに成功した<sup>6)</sup>。筋注