

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
分担研究報告書

内側絨毛膜由来間葉系幹細胞による心血管保護作用の検討

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター臓器移植部 部長
分担研究者 宮武邦夫 大阪南医療センター 院長

研究要旨 我々は、出産後に廃棄される胎盤や卵膜などの胎児付属物の、再生医療資源として可能性を検討している。最近、我々はヒト卵膜から羊膜、内側絨毛膜、および外側絨毛膜それぞれに由来する間葉系幹細胞（MSC）を分離することに成功した。本研究では、3種類の卵膜由来 MSC の液性因子を介した細胞保護効果について検討した。同意を得て提供されたヒト卵膜を羊膜、内側絨毛膜、外側絨毛膜に分離し、それぞれの組織から MSC を分離・培養した。各組織由来の MSC は、その形態や表面抗原は類似し、いずれの MSC も多分化能を有していたが、増殖因子の分泌パターンは異なり、内側絨毛膜由来 MSC では HGF および IGF-1 の分泌が多く、羊膜由来 MSC では bFGF、外側絨毛膜由来 MSC では VEGF の分泌が多かった。また、内側絨毛膜由来 MSC の培養上清は、他の卵膜由来 MSC のそれと比較し、血清飢餓や低酸素のストレス刺激下において、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）およびラット胎児心筋細胞の細胞死を抑制した。卵膜由来 MSC の中でも、血管内皮および心筋細胞に対しより細胞保護的な作用を示した内側絨毛膜由来 MSC は心血管病変に対する再生医療材料としてより有用であると考えられた。

A. 研究目的

現在医療現場において分娩時に破棄されている卵膜は倫理的問題が少なく、また、細胞ソースとして再生医療材料となりうる。我々は、これまでにヒト卵膜から3種類の間葉系幹細胞（MSC）を分離することに成功している。本研究において、これら卵膜由来 MSC による細胞保護効果について検討を行った。

B. 研究方法

同意を得て提供されたヒト卵膜を酵素処理した後、羊膜、内側絨毛膜および外側絨毛膜に手法的に分離し、collagenase 処理後それぞれの組織から MSC を分離・培養した。3継代のそれぞれの MSC を用いてフローサイトメトリーにて表面抗原の発現および骨・脂肪への分化能を検討した。また、培養 MSC 上清中の増殖因子を ELISA 法にて測定した。ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）およびラ

ット胎児心筋細胞において血清飢餓または低酸素負荷における生細胞数およびカスパーゼ3活性の検討を行い、MSC の培養上清が持つ細胞保護効果について検討した。

C. 研究結果

表面抗原マーカー解析を行ったところ、得られた MSC はいずれも CD29(+), CD90(+), CD14(-), CD31(-), CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-)と、既報の骨髄由来 MSC と同様であった。また、脂肪、骨への分化能も骨髄由来 MSC 同様有していた。これら3種の MSC における液性因子分泌を検討したところ、ELISA による検討では内側絨毛膜由来 MSC では HGF および IGF-1 の分泌が多く、羊膜由来 MSC では bFGF、外側絨毛膜由来 MSC では VEGF の分泌が多かった（図1）。血清飢餓や低酸素のストレス刺激下において、羊膜由来 MSC の培養上清は HUVEC においてのみ細胞死抑制効果を示した

のに対し、内側および外側絨毛膜由来 MSC の培養上清は、HUVEC および心筋細胞両者の細胞死を抑制した。また、3種の卵膜由来 MSC において内側絨毛膜由来 MSC の培養上清のみが、HUVEC および心筋細胞のカパーゼ-3 活性上昇を抑制した。内側絨毛膜由来 MSC の培養上清において、主にアポトーシス抑制に働いていると考えられる HGF および IGF-1 に対する中和抗体を同時添加したところ、そのアポトーシス抑制が解除された。(図 2)。

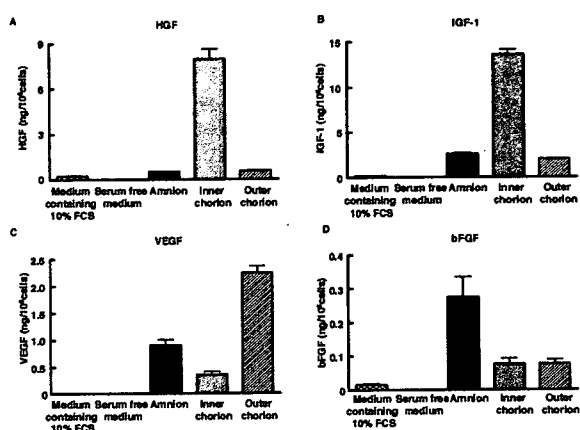


図 1. 羊膜、内側絨毛膜、および外側絨毛膜由来 MSC の増殖因子の分泌パターン

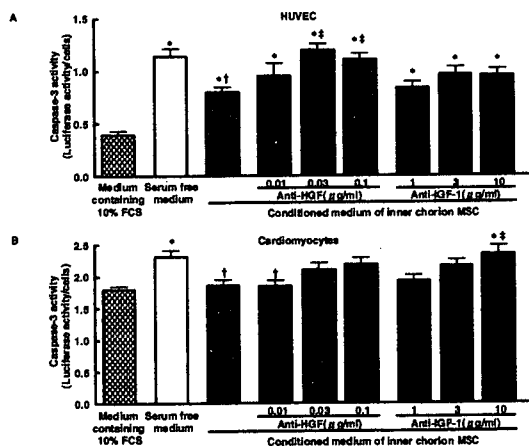


図 2. 内側絨毛膜由来 MSC の細胞保護効果における HGF と IGF-1 の重要な役割

D. 考察

卵膜は分娩時に破棄されるため倫理的に問題の少ない再生医療の材料として期待されてい

る。我々が卵膜から分離した3種の卵膜由来 MSC はいずれも骨髄由来 MSC と同様の表面抗原発現および多分化能を示したが、増殖因子の分泌に違いが認められた。このことから、細胞移植による再生療法を考える上で、MSC から分泌される液性因子を介した移植部周囲の細胞に対する保護効果に差が現れることが考えられる。今回、我々は *in vitro* において、心筋細胞と血管内皮細胞に対する各種卵膜由来 MSC の細胞保護効果について検討したところ、内側絨毛膜由来 MSC が最もその保護効果が高いことを明らかにした。また、HGF および IGF-1 中和抗体により内側絨毛膜由来 MSC の細胞保護効果が抑制されたことから、内側絨毛膜由来 MSC の心血管細胞保護効果には HGF および IGF-1 が重要な役割を果たしていることが考えられた。

E. 結論

内側絨毛膜由来 MSC は、他の卵膜由来 MSC と比較し、より心血管細胞の細胞死に対し保護的に働く傾向を示したことから、内側絨毛膜由来 MSC の心血管再生医療材料としての有用性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Harada K, Nagaya N, Ohnishi S, Sada M, Fujiwara M, Kitamura S, Ikeda T. Cytoprotective Effects of Humoral Factors Released from Inner Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* (in revision).

2. 学会発表

1) Harada K, Nagaya N, Ohnishi S, Sada M, Fujiwara M, Kitamura S, Ikeda T. Paracrine Cytoprotective Effects of Inner

Chorion-Derived Human Mesenchymal Stem Cells.
American College of Cardiology, 57th Annual
scientific session, poster, March 29-April 1, 2008,
Chicago.

2) 原田和彦, 永谷憲歳, 山中薫, 根木玲子, 尾
本暁子, 時任ゆり, 池田智明

卵膜由来間葉系幹細胞の分離・培養法の確立とバ
イオ資源としての可能性

第59日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 2007
年4月14-17日、京都

3) 原田和彦, 永谷憲歳, 大西俊介, 佐田正晴,
藤原道弘, 北村惣一郎, 池田智明

内側絨毛膜由来間葉系幹細胞による心血管細胞
の保護と血管再生効果の検討

第11回日本心血管内分泌代謝学会, 2007年11月
16-17日、東京

H. 知的財産権の出願

・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特許出願番号 2007-236122

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

重症心不全患者における間葉系幹細胞活性化阻止因子の探索

分担研究者 小林 順二郎 国立循環器病センター 心臓血管外科 部長
八木原 俊克 国立循環器病センター 副院長

研究要旨 我々は、重症心不全に対する新たな細胞治療として、自己骨髄間葉系幹細胞(MSC)移植を行っている。移植自己 MSC は自己血清を用いて培養しているが、症例によっては全く増殖しない場合が認められた。この事実に基づき、我々は *in vitro* および *in vivo* における詳細な検討により、新規 MSC 活性化抑制因子 X を同定した。DCM 症例およびモデルラットにおいて、血清中因子 X は血清 MMP 活性と正の相関を示し、DCM モデルラットへの MMP 阻害剤投与により因子 X 濃度の低下を認めた。因子 X の産生に MMP が関与していることから、MMP 阻害剤は、直接的な MMP 活性阻害による心臓リモデリング抑制以外に、因子 X 産生抑制により移植あるいは内因性 MSC の活性化を促すことで、心不全の病態改善につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は、重症心不全症例に対する新たな治療法の確立を目指し、自己骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植の臨床応用を行っている。移植 MSC は自己骨髄から採取し、自己血清を用いて培養しているが、症例によっては全く増殖しない場合が認められた。このことは、重症心不全症例の患者血清に自己 MSC の増殖抑制因子が含まれている可能性を示唆している。そこで、この未知増殖抑制因子の探索およびこの因子の重症心不全における病態生理学的意義の検討を行った。

B. 研究方法

細胞は市販されているヒト骨髄 MSC(Cambrex社、継代数 5~8)を用いた。血清は国立循環器病センターに入院中の重症心不全患者(%FS:左室径短縮率<25%および血中 BNP>100pg/ml)から採取した。虚血性心筋症(ICM)5例、拡張型心筋症(DCM)5例、および対照として健常人4例から血清を採取し、実験に用いた。

C. 研究結果

患者血清を用いた MSC の細胞増殖を MTS アッセ

イ法により検討した。その結果、一部の DCM 患者由来血清に MSC の増殖抑制が認められた。この DCM 患者由来血清に含まれる増殖抑制因子の探索を、プロテインアレイ (Serum Biomarker Chip: Whatman 社) により検討した。120 個の蛋白中 23 個の蛋白が該当患者の血清において濃度増加を認めた。この中でこれまでに MSC の増殖に関し報告のない候補抑制因子 X に着目した。候補抑制因子 X は血管新生抑制作用を持ち、血管内皮や平滑筋細胞の増殖・遊走抑制、アポトーシス促進作用が報告されている。実際、この因子 X の患者由来血清における濃度を ELISA 法により測定したところ、該当 DCM 患者において 1657-405ng/ml と、健常人(63-277ng/ml)に比べ増加していた。リコンビナント X を用いた *in vitro* における検討では、培養 MSC (ウシ胎児血清 1~10%存在下) の増殖および遊走抑制を因子 X の濃度依存性(0~10ug/ml)に認めた。更に、caspase-3/7 活性測定により、因子 X による MSC におけるアポトーシス誘導を濃度依存性に認めた。次に、重症心不全における候補抑制因子 X の病態生理学的意義を明らかにするために、DCM モデルラットを作製した。モデルは自己免疫性心筋炎後 DCM ラットを用い

た。Lewis ラット (200-220g, 雄) にブタ心筋ミオシン (4mg/body) を complete Freund' s adjuvant と共に皮下注射し、7 週間後に心エコーにより心機能低下を確認の後、採血を行った。心エコー上、対照群と比べ、DCM モデル群において、明らかな心筋の菲薄化並びに心内腔の拡張を認め、%FS は対照群の $47\pm 2\%$ に対し、DCM 群では $37\pm 2\%$ と悪化していた。Western blot 法によりこれらラットの血清 X 濃度を比較したところ、DCM モデル群において有意な増加を認めた。既報では因子 X の産生に MMP が関与していることが報告されている。血清検体を用いたザイモグラフィーの結果から、血清中の pro-MMP2 および 9 活性は対照群に比べ DCM モデル群において有意に増加していた。更に、DCM モデルラットに MMP 阻害剤 (doxycycline) を投与したところ、血清 pro-MMP2 および 9 活性の抑制、並びに因子 X の血中濃度の減少を認めた。このことは、患者血清における候補因子 X 濃度と MMP-9 活性に相関が認められたことと一致した。

D. 考察

最近、骨髄由来 MSC が心筋梗塞モデルにおいて梗塞層に recruit され、心臓の修復に関与している可能性が示めされている。DCM 症例の一部において患者血清に MSC の活性化を抑制する因子 X が多く存在する事実は、因子 X は骨髄由来 MSC の心臓への動員を抑制することで、DCM の病態進展に関与している可能性を示唆している。

重症心不全症例においては、心筋、心嚢水、および血清の MMP-2, 9 活性の増加が報告されており、左室リモデリングとの関連が指摘されている。血清 MMP 活性と因子 X 濃度の間において正の相関を DCM 症例およびモデル動物において認めたことから、因子 X は MMP と共に心不全増悪に関与している可能性がある。

因子 X は、これまでに少なくとも 5 つの異なる細胞表面結合部位が報告されており、その作用機序には未だ不明な点が多い。現在、因子 X による MSC 増殖抑制に関し、血管内皮細胞において報告のある、同様のメカニズムの関与を示唆するデータを得ている。

E. 結論

重症心不全の DCM 症例から採取した血清サンプルから、MSC 活性化抑制因子 X を同定した。内因性・移植 MSC の活性化を介した心不全治療を考える上で、因子 X の産生を抑制する MMP 阻害剤投与が有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. FEBS Lett. 2007; 581: 3961-6.
2. Yamahara K, Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart disease. Regen Med. 2007; 2: 107-9.

2. 学会発表

山原研一、永谷憲歳、北村惣一郎
重症心不全患者における間葉系幹細胞活性化阻止因子の探索
生活習慣病科学カンファランス
2007年12月、京都

H. 知的財産権の出願

・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

抗酸化ストレス蛋白遺伝子を導入した間葉系細胞による細胞治療の試み：
ラット心筋梗塞モデルにおける検討

分担研究者 山岸正和 金沢大学大学院臓器機能制御学・循環器内科

研究要旨 骨髄由来の間葉系細胞(MSC)は虚血心筋障害後の修復過程において優れた治療的能力を有するものと推定されるが、移植時における忍容性と移植細胞の生存率の低さにより、心機能改善効果に限界があることが指摘されている。そこで我々は移植早期の酸化ストレスを軽減するため、代表的な内因性抗酸化因子ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)を一過性に強発現する事による、移植 MSC の生着、分化効率の向上を図り、病理組織学のおよび心機能的検討にて確認した。その結果、HO-1 発現 MSC は酸化ストレスに抵抗性を示し、心筋梗塞モデルにおける梗塞サイズを縮小させることが明らかとなった。

A. 研究目的

HO-1 遺伝子の一過性強発現による MSC の生着効率の向上及び心機能改善効果を検討する事

B. 研究方法

雄のルイスラットの骨髄腔から髄液を採取し培養。造血系の細胞を除去、残った MSC を培養増殖、その細胞にリポフェクション法にてヒト HO-1 ベクターを遺伝子導入した上で心筋梗塞モデルラット心筋に移植し、病理組織学のおよび心機能的評価を行った

(倫理面への配慮)

本研究では遺伝子組み換えは行なわない

C. 研究結果

HO-1強発現MSCにより、MSC自体が高ストレス性を示した。本細胞の心筋梗塞モデルへの移植により、心機能改善および心筋肥薄化阻止効果増強、および病理学的に血管造成亢進効果が確認された

D. 考察

HO-1 のレトロウイルスによる持続発現の効果については既に検討があるが長期的な HO-1 過剰発現は NOS 抑制などにより組織再生には好ましくないと考えられていた。今回の検討で HO-1 の一過性発現により、酸化ストレスに対する抵抗性

の獲得およびかかる抵抗性から移植後の認容性の増大が得られる可能性が推察された。

E. 結論

HO-1 一過性強発現による MSC の高機能による病理および心機能への改善効果が認められた。今後臨床応用を睨んで薬剤的 HO-1 誘導による MSC 高機能化を検討する。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

① Sakamoto A, Ishibashi-Ueda H, Sugamoto Y, Higashikata T, Miyamoto S, Kawashiri MA, Yagi K, Konno T, Hayashi K, Fujino N, Ino H, Takeda Y, Yamagishi M. Expression and function of ephrin-B1 and its cognate receptor ephB2 in human atherosclerosis: from aspect of chemotaxis. Clin Sci (Lond). 2007 Dec 19; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

① 坪川俊成, 八木邦公, 野原淳, 藤野陽, 川尻剛照, 井野秀一, 山岸正和, 中西千明, 永谷 憲歳, 植田初江: 抗酸化ストレス蛋白遺伝子を導入した間葉系細胞による細胞治療の試み-ラット心筋梗塞モデルにおける検討、日本心臓病学会総会シンポジウム、舞浜、Sept 11, 2007

- ② Tsubokawa T, Yagi K, Nohara A, Fujino N, Kawashiri M, Ino H, Yamagishi M, Nakanishi C, Nagaya N, Ueda H: Transient Overexpression of Human Heme Oxygenase-1 in transplanted Mesenchymal Stem cells Results in Enhanced Repair of Myocardial Infarction. 57th Annual Scientific Sessions, American College of Cardiology, Chicago, Mar 30, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
特になし

間葉系幹細胞による心筋血管再生療法 -NOGA システムを用いた臨床成績-

分担研究者 清水 渉 国立循環器病センター 心臓血管内科 医長

研究要旨 間葉系幹細胞による心筋血管再生療法を、NOGA システムを用いて重症心不全を合併した拡張型および虚血性心筋症患者 6 例において施行した。NOGA システムと細胞注入用 Myostar カテーテルを用いて、間葉系幹細胞の左室心筋への移植を施行した。NOGA システムで左室壁運動と左室心内膜電位を評価し、虚血性心筋症患者では、電位(起電力)は保たれているが収縮性が低下し解離を認め、心室筋の viability を認めると考えられた領域を中心に、拡張型心筋症患者では、左室全体に均一に、細胞注入を施行した。NOGA システムによる 3 次元表示ガイド下で、細胞注入用 Myostar カテーテルを用いることにより、合併症なく安全に細胞移植をすることが可能であった。

A. 研究目的

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法は、重症心不全患者の心機能を改善する方法として注目されているが、細胞移植を安全に施行するシステムについては十分に評価されていない。本研究では、NOGA システムと細胞注入用 Myostar カテーテルを用いた細胞移植の安全性と有効性を検討した。

B. 研究方法

(対象) 薬物および非薬物治療抵抗性の重症心不全を合併した拡張型心筋症患者 4 例および虚血性心筋症患者 2 例の計 6 例。

(方法) NOGA システムにより、左室壁運動と左室心内膜電位を評価し、細胞注入用 Myostar カテーテルを用いて、左室心内膜側から間葉系幹細胞移植を施行した。

(倫理面への配慮)

間葉系幹細胞移植および NOGA システムの使用は、国立循環器病センター倫理委員会の承認を得て行った。研究成果の発表においては、患者のプライバシーを考慮し、人権擁護を保持する。

C. 研究結果

心臓カテーテル検査室において、NOGA システムを用い、左室心内膜側を 100 点以上マッピングした。

各点の左室壁運動と左室心内膜電位を 3 次元表示し、Voltage map で左室の電位(起電力)を、Linear local shortening map で左室収縮性を示した。拡張型心筋症患者では、左室全体に均一に、虚血性心筋症患者では、起電力は保たれているが収縮性が低下し解離を認め、心室筋の viability を認めると考えられた領域を中心に、計 40 回の間葉系幹細胞の注入を施行した。NOGA システムによる 3 次元表示ガイド下に、細胞注入用 Myostar カテーテルを用いることにより、急性期および慢性期の合併症なく、安全に細胞移植をすることが可能であった。

D. 考察

NOGA システムは、電極カテーテル先端に入った磁石を 3 点からの磁場が感知することにより、カテーテル先端の位置情報を認識し、さらに同時に電極カテーテルから電位情報を非透視下にリアルタイムで記録する新しいマッピングシステムである。このシステムにより、心筋各部位の壁運動(収縮性)と電位(起電力)を同時に 3 次元表示することが可能である。本研究では、NOGA システムと細胞注入用の Myostar カテーテルを用いることにより、合併症なく安全に細胞移植が施行可能であった。特に虚血性心筋症患者では、起電力は保たれているが収縮性が低下し、心室筋の viability を認め、細胞移植がより有効と思われる。

る領域を同定することが可能であった。今後、症例を蓄積し、安全性とその臨床的有用性をさらに検討していくとともに、長期予後についても検討する予定である。

E. 結論

NOGA システムを用いて、間葉系幹細胞による心筋血管再生療法を安全に施行することができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(国外原著論文)

1. Shimizu W, et al: J Cardiovasc Electrophysiol 18: 415-421, 2007
2. Shimizu W, et al: Circ J 71: (Suppl A) A32-A39, 2007
3. Shimizu W, et al: Heart Rhythm 4: 1487-1488, 2007
4. Moss AJ, Shimizu W, et al: Circulation 115: 2481-2489, 2007
5. Miyamoto K, Shimizu W, et al: Am J Cardiol 99: 53-57, 2007
6. Haruna Y, Shimizu W, et al: Hum Mutat 28: 208, 2007
7. Ohgo T, Shimizu W, et al: Heart Rhythm 4: 695-700, 2007
8. Yokokawa M, Shimizu W, et al: Am J Cardiol 100: 649-655, 2007
9. Crotti L, Shimizu W, et al: Circulation 116:

2366-2375, 2007

10. Horigome H, Shimizu W, et al: J Cardiovasc Electrophysiol, 2008 (in press)
11. Suimitomo N, Shimizu W, et al: Heart Rhythm, 2008 (in press)

(国外著書)

1. Shimizu W, et al: Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention, Springer, UK, 424-433, 2007
2. Shimizu W: Electrical Diseases of the Heart: Genetics, Mechanisms, Treatment, Prevention, Springer, UK, 719-728, 2007

2. 学会発表

(国際学会のみ)

1. Shimizu W: CardioRhythm 2007, Hong Kong, China, 2007. 2.
2. Shimizu W: Heart Rhythm 2007, Denver, USA, 2007. 5.
3. Shimizu W, et al: The 80th American Heart Association (AHA) meeting, Orland, USA, 2007. 11.
4. Shimizu W, et al: 16th Asian Pacific Congress of Cardiology 2007, Taipei, Taiwan, 2007. 12.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

研究協力者: 里見和浩、野田 崇

多孔性高分子フィルムを用いた心筋組織・末梢血管組織の再生

分担研究者 西川 雄大 国立循環器病センター研究所

研究要旨 これまで、延伸多孔性フィルムのパターンによりヒト骨髄由来間葉系幹細胞の形態および配向性を制御し、細胞シートが得られることを明らかとした。末梢血管組織の再生に関する新たな手法として、一酸化窒素 (NO) を刺激とする血管内皮細胞の管腔組織形成に着目した。今年度は、血管内皮細胞へのナノ粒子の取込みにより NO 産生が誘導されることを見出した。

A. 研究目的

心筋組織の再生において、心筋細胞供給源および細胞培養基材の確保は重要な問題である。これに対し、多孔性高分子薄膜を用いた細胞培養法により、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の心筋細胞への分化誘導と心筋組織の形成を同時に行えることが期待される。これまで、多孔性高分子フィルムの微細表面形状と細胞との相互作用に基づき、間葉系幹細胞 (hMSC) からなる配向化細胞シートが得られることを見出した。シート形成後の hMSC の分化誘導については、通常の成長培地では心筋細胞に特異的なタンパク質の発現が見られなかったものの、各種成長因子を添加した誘導培地中での培養により、 α -アクチニンからなる筋原繊維様の構造が形成されることを明らかとした。今年度は、末梢血管組織の再生について DDS 的手法の可能性を検討した。即ち、一酸化窒素 (NO) による血管内皮細胞の管腔組織形成に着目し、血管内皮細胞における NO 産生調節をナノ粒子の細胞へのデリバリーにより行う手法を検討した。

B. 研究方法

両親媒性ポリシロキサンは水中に分散することで、分子間会合によりナノ粒子（粒径：50nm～100nm）を形成する。今回は、ヒト大動脈由来血管内皮細胞 (HAECs) によるナノ粒子の取込み挙動および取込みに伴う一酸化窒素 (NO) 産生への影響を検討した。HAECs をポリスチレンディッ

シユに細胞播種後、インキュベーター内で培養を開始した。培養開始より 48 時間後、ディッシュの培地を取り除き、蛍光ラベル化両親媒性ポリシロキサン分散液を加え、ナノ粒子の細胞への取込みの観察を開始した。ポリマー含有培地に交換後、ポリマーとの相互作用を行った。所定時間経過後、細胞を PBS 緩衝液で洗浄後、パラホルムアルデヒドにより固定化し、蛍光顕微鏡観察を行った。一酸化窒素産生の評価は細胞内 NO 検出指示薬 (DAR-4M AM) を用い、ナノ粒子取込み後の NO 産生の変化を検討した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

蛍光ラベル化したナノ粒子と免疫染色されたカベオリン-1との共局在より、ナノ粒子が細胞膜ミクロドメインであるカベオラを経由するエンドサイトーシスにより細胞内に取込まれることが明らかとなった。ナノ粒子の取込みが細胞機能に与える影響を検討するために、HAECs による一酸化窒素 (NO) 産生を細胞内 NO 検出プローブにより評価した。ナノ粒子取込み後の HAECs による NO 産生は生理活性物質であるブラジキニンが HAECs に作用して場合に見られる NO 産生と同程度の産生レベルであることが明らかとなった。

D. 考察

血管内皮細胞におけるNO産生は膜ミクロドメインであるカベオラに集積するシグナル伝達系により一酸化窒素合成酵素の活性調節により制御されている。このカベオラは種々の生理活性物質に対するレセプターを有し、このシグナルを細胞内に伝達する。また、カベオラは物質取込みの経路としての役割を担っており、生体分子の取込みに伴うNO産生の亢進が報告されている。本研究ではナノ粒子の細胞への送達に伴うNO産生の亢進の可能性を検討した。糖鎖のみがコンジュゲートされた親水性ポリシロキサンは血管内皮細胞により細胞内に取込まれる。しかし、この親水性ポリシロキサンの取込みに伴うNO産生の亢進は観察されなかった。一方、両親媒性ポリシロキサンが形成するナノ粒子も血管内皮細胞に取込まれ、これに伴いNO産生の亢進が見られた。この結果は、血管内皮細胞に対してナノ粒子を血管内皮細胞の膜ミクロドメインを経路として送達させることが刺激(シグナル)となり、NO産生が誘導される可能性があることを示唆する。

E. 結論

一酸化窒素(NO)が血管内皮細胞における血管新生に関わるシグナルカスケードを引き起こす種々の成長因子の下流メディエーターであることが示されている。このことから、虚血組織における血管新生の発生を促す因子としてNOが注目されている。本研究では、ナノ粒子の血管内皮細胞への送達を行うことにより、NO産生が亢進することを見出した。この結果より、虚血組織周辺部における血管内皮組織へのナノ粒子のデリバリーによるNO産生の亢進、NO産生をトリガーとする虚血部分における血管新生の可能性が拓かれた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

①Beppu K, Kaneko Y, Kadokawa J, Mori H, Nishikawa T, "Synthesis of Sugar-Polysiloxane Hybrids Having Rigid Main-Chains and Formation of Their Nano Aggregates" *Polymer Journal*, 39: 1065-1070, 2007

2. 学会発表

- ①西川雄大、岩切規郎、別府孝太郎、金子芳郎、門川淳一：「血管内皮細胞を標的とする両親媒性ナノ会合体の創製」第56回高分子学会年次大会、京都、平成19年5月29日
- ②西川雄大、岩切規郎、別府孝太郎、金子芳郎、門川淳一：「ナノ粒子の取込みによる血管内皮細胞における一酸化窒素産生誘導」第56回高分子討論会、名古屋工業大学、平成19年9月21日
- ③西川雄大、岩切規郎、別府孝太郎、金子芳郎、門川淳一：「ナノ粒子を用いた血管内皮細胞における一酸化窒素産生誘導」第29回バイオマテリアル学会大会、豊中、平成19年11月27日
- ④西川雄大：「細胞足場材料の創製」：臨床医工学・情報科学技術者再教育ユニット・バイオマテリアル学コース/先端バイオマテリアル(大阪大学臨床医工学研究教育センター、吹田、平成20年、2月16日)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特願 2007-123841「血管内皮型一酸化窒素合成酵素活性化剤、及び一酸化窒素欠乏に起因する疾病の予防または治療薬」(発明者：西川雄大、盛英三、門川淳一)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
竹下 聡	末梢動脈：内科的治療	血管診療技師認定機構/血管無侵襲診断法研究会	血管無侵襲診断テキスト	南江堂	東京	2007	197-199

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, Takeshita S, Mori H, Kodama M, Kangawa K, Aizawa Y, Nagaya N.	Single Injection of a Sustained-release Prostacyclin Analog Improves Pulmonary Hypertension in Rats.	Am J Respir Crit Care Med.	177	195-201	2008 (in press)
Ohnishi S, Ohgushi H, Kitamura S, Nagaya N.	Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure.	Int J Hematol.	86	17-21	2007
Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N.	Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions.	FEBS Lett.	581	3961-3966.	2007
Yanagawa B, Kataoka M, Ohnishi S, Kodama M, Tanaka K, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Aizawa Y, Kangawa K, Nagaya N.	Infusion of adrenomedullin improves acute myocarditis via attenuation of myocardial inflammation and edema.	Cardiovasc Res.	76	110-118	2007
Itoh T, Obata H, Murakami S, Hamada K, Kangawa K, Kimura H, Nagaya N.	Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats.	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	293	L446-L452	2007

Jo J, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y.	Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran.	Tissue Eng.	13	313-322	2007
Yamahara K, Nagaya N.	Mesenchymal stem cells for the treatment of heart disease.	Regen Med.	2	107-109	2007
Ohnishi S, Nagaya N.	Prepare Cells to Repair the Heart: Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Heart Failure.	Am J Nephrol.	27	301-307	2007
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.	18	415-21	2007
Obata H, Yanagawa B, Tanaka K, Ohnishi S, Kataoka M, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Kodama M, Aizawa Y, Kangawa K, Nagaya N.	CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis.	Biochem Biophys Res Commun.	27	356: 60-66.	2007
Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N.	Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells.	Stem Cells.	25	1166-1177	2007
寿典子 勝部好裕 加藤陽一 田所美加 廣瀬志弘 大串 始	<i>In vivo</i> survival and osteogenic differentiation of allogeneic rat bone marrow mesenchymal stem cells	Cell transplantation			2008 (in press)

Kamiya C, Sakamoto S, Tamori Y, Yoshimuta T, Higashi M, Tanaka R, Akutsu K, Takeshita S	Long-term outcome after percutaneous peripheral intervention versus medical treatment for patients with superficial femoral artery occlusive disease	Circ J			(accepted for publication)
Yoshimuta T, Akutsu K, Okajima T, Tamori Y, Kubota Y, Takeshita S	Corkscrew Collaterals in Buerger's Disease	Can J Cardiol			(accepted for publication)
Takigawa M, Akutsu K, Kasai S, Tamori Y, Yoshimuta T, Higashi M, Takeshita S	Angiographic documentation of the process of aortoiliac occlusion in Leriche's syndrome	Can J Cardiol			(accepted for publication)
Sakamoto A, Ishibashi-Ueda H, Sugamoto Y, Higashikata T, Miyamoto S, Kawashiri MA, Yagi K, Konno T, Hayashi K, Fujino N, Ino H, Takeda Y, Yamagishi M	Expression and function of ephrin-B1 and its cognate receptor ephB2 in human atherosclerosis: from aspect of chemotaxis.	Clin Sci (Lond)			2008 (in press)
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	18	415-421	2007
<u>Shimizu W</u> , Aiba T, Kamakura S	Mechanism and new findings in the Brugada syndrome.	Circ J	71	(Suppl A) A32-A39	2007

<u>Shimizu W</u>	Editorial Commentary. Proarrhythmic effect of altered ventricular activation sequence in patients with permanent pacemaker.	Heart Rhythm	4	1487-1488	2007
Moss AJ*, Shimizu W*, Wilde AAM*, Towbin JA*, Zareba Z, Robinson JL, Qi M, Vincent GM, Ackerman MJ, Kaufman ES, Hofman N, Seth R, Kamakura S, Miyamoto Y, Goldenberg I, Andrews ML, McNitt S	Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene.	Circulation	115	2481-2489	2007
Miyamoto K, Yokokawa M, Tanaka K, Nagai T, Okamura H, Noda T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, <u>Shimizu W</u>	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, <u>Shimizu W</u> , Inoue T, Murakami T, Tsuboi N, Yamanouchi H, Ushinohama H, Nakamura Y, Yoshinaga M, Horigome H, Aizawa Y, Kita T, Horie M:	Genotype-phenotype correlations 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, <u>Shimizu W</u>	Acute and chronic management in patients with Brugada syndrome associated with electrical storm of ventricular fibrillation.	Heart Rhythm	4	695-700	2007

Otomo K, Suyama K, Okamura H, Noda T, Satomi K, <u>Shimizu W</u> , Kurita T, Aihara N, Kamakura S	Participation of a concealed atrio-Hisian tract in the reentrant circuit of the slow-fast type atrioventricular nodal reentrant tachycardia.	Heart Rhythm	4	703-710	2007
Kandori A, Shimizu W, Yamada S, Kamakura S, Yamaguchi I	To the editor.	PACE	30	827-828	2007
Antzelevitch C, Sicouri S, Di Diego JM, Burashnikov A, Viskin S, Shimizu W, Yan GX, Kowey P, Zhang L	Does T(peak)-T(end) provide an index of transmural dispersion of repolarization?	Heart Rhythm	8	1114-1116	2007
Yokokawa M, Noda T, Okamura H, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S, <u>Shimizu W</u> :	Comparison of long-term follow-up of electrocardiographic features in Brugada syndrome between the <i>SCN5A</i> -positive probands and the <i>SCN5A</i> -negative probands.	Am J Cardiol	100	649-655	2007
Takigawa M, Noda T, Kurita T, Okamura H, Suyama K, <u>Shimizu W</u> , Aihara N, Nakajima N, Kobayashi J, Kamakura S	Extremely late pacemaker infective endocarditis due to <i>Stenotrophomonas</i> <i>Maltophilia</i> .	Cardiology	110	226-229	2007

Otomo K, Suyama K, Okamura H, Noda T, Satomi K, <u>Shimizu W</u> , Kurita T, Aihara N, Kamakura S	Implications of 2:1 atrioventricular block during typical atrioventricular nodal reentrant tachycardia.	J Interv Card Electrophysiol	19	109-119	2007
Crotti L, Spazzolini C, Schwartz PJ, <u>Shimizu W</u> , Denjoy I, Schulze-Bahr E, Zaklyazminskaya EV, Swan H, Ackerman MJ, Moss AJ, Wilde AM, Horie M, Brink PA, Insolia R, De Ferrari GM, Crimi G	The common long QT syndrome mutation KCNQ1/A341V causes unusually severe clinical manifestations in patients with different ethnic backgrounds: Toward a mutation-specific risk stratification.	Circulation	116	2366-2375	2007
Aiba T, Yamagata K, <u>Shimizu W</u> , Taguchi A, Satomi K, Noda T, Okamura H, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Kurita T:	Electrophysiologic study-guided amiodarone for sustained ventricular tachyarrhythmias associated with structural heart diseases.	Circ J	72	88-93	2007
Horigome H, Iwashita H, Yoshinaga M, <u>Shimizu W</u> :	Magnetocardiographic demonstration of torsade de pointes in a fetus with congenital long QT syndrome.	J Cardiovasc Electrophysiol			2008 (in press)
Sumitomo N, <u>Shimizu W</u> , Taniguchi K, Hiraoka M:	Ca ²⁺ channel blocker and adenosine triphosphate terminate bidirectional ventricular tachycardia in a patient with Andersen-Tawil syndrome.	Heart Rhythm			2008 (in press)

Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Heart Failure

Shunsuke Ohnishi,^a Hajime Ohgushi,^b Soichiro Kitamura,^c Noritoshi Nagaya^a

^aDepartment of Regenerative Medicine & Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan, ^bResearch Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Hyogo, Japan, ^cDepartment of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan.

Received March 7, 2007; accepted April 6, 2007

Abstract

Heart failure is one of the most important cardiovascular health problems throughout the world and has high mortality, and there is a need to develop more effective therapeutic strategies to replace such specialized treatment as mechanical circulatory support and cardiac transplantation. Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent plastic-adherent cells obtained from bone marrow, adipose tissue, and other tissues and can be easily expanded in culture. The ability of MSC to differentiate into a variety of cells, including cardiomyocytes and vascular endothelial cells, make them an attractive therapeutic tool for heart failure. Recent *in vitro* and *in vivo* studies have revealed the underlying mechanisms of MSC in cardiac repair. MSC exert their role in cardiac regeneration not only by differentiating into specific cell types such as cardiomyocytes and vascular endothelial cells but also through paracrine effects via secretion of a variety of angiogenic, antiapoptotic, and mitogenic factors. Endogenous MSC as well as exogenously administered MSC have also been suggested to migrate and participate in cardiac repair. On the basis of information obtained from basic and translational research, several clinical trials have recently been started to evaluate the safety and efficacy of autologous MSC for heart failure.

Int J Hematol. 2007;86:17-21. doi: 10.1532/IJH97.07041

© 2007 The Japanese Society of Hematology

Key words: Mesenchymal stem cell; Heart failure; Differentiation; Tissue regeneration; Clinical trial; Translational research; Paracrine effect

1. Introduction

Heart failure is a major cardiovascular health problem worldwide. Approximately 5.2 million patients in the United States have heart failure, and there are nearly 550,000 new diagnoses of heart failure every year [1]. The mortality in 2004 was 57,700, and the estimated direct and indirect costs of heart failure in the United States for 2007 is \$33.2 billion [1]. Coronary artery disease is the most common cause of heart failure, followed by idiopathic dilated cardiomyopathy and valvular heart disease [2,3]. The accumulation of scar causes loss of cardiac function, ventricular remodeling, and progressive dysfunction leading to congestive heart failure [4-6].

Drugs commonly used for the treatment of chronic heart failure include loop diuretics, angiotensin-converting enzyme

inhibitors, β -adrenergic receptor blockers, aldosterone antagonists, angiotensin II receptor blockers, and digitoxin, whereas patients with end-stage disease require specialized treatment strategies, such as mechanical circulatory support, continuous inotropic infusion, cardiac transplantation, or hospice care [7-9]. Therefore, there is a need to develop more effective therapeutic strategies for heart failure.

Unlike pharmacologic and surgical approaches, cell-based therapy for heart failure has the potential to restore cardiac function by enhancing angiogenesis, regenerating viable cardiomyocytes, and protecting the myocardium from cell death [4]. Bone marrow-derived cells present an attractive source of cells for heart failure therapy. Bone marrow-derived mononuclear cells (MNC) and endothelial progenitor cells have been applied for therapeutic angiogenesis in ischemic cardiovascular disease [10-12]. Recently, mesenchymal stem cells (MSC), a subpopulation of MNC, have emerged as a new therapeutic cell source. MSC possess multipotency, can be easily expanded in culture, and are thus attracting attention as a new tool for cell therapy [13]. This article focuses on MSC and reviews the therapeutic potential of MSC for heart failure.

Correspondence and reprint requests: Noritoshi Nagaya, MD, PhD, Fujishirodai 5-7-1, Suita, Osaka 565-8565, Japan; 81-6-6833-5012; fax: 81-6-6833-9865 (e-mail: nnagaya@ri.ncvc.go.jp).

2. Distribution of MSC and Their Behavior

MSC reside not only in bone marrow [14] and adipose tissue [15] but also in other tissues, such as synovium [16], periosteum [17], muscle [18], dental pulp [19], periodontal ligament [20], placenta [21], and umbilical cord blood [22]. A recent study suggested that MSC reside in virtually all postnatal organs and tissues and may be localized to vessel walls [23]. MSC can differentiate not only into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes but also into cardiomyocytes and vascular endothelial cells [13,24]. Bone marrow-derived MSC, which have been the most thoroughly investigated, are a subpopulation of bone marrow cells (approximately 0.001%-0.01%) [13]. Bone marrow MSC have been demonstrated to mobilize and differentiate into cardiomyocytes in a murine model of myocardial infarction, suggesting the importance of bone marrow MSC in cardiac regeneration [25]. Moreover, when cultured MSC were administered intravenously to rats with myocardial infarction, these cells were preferentially engrafted into the infarcted, but not the noninfarcted, myocardium, and a small fraction of the transplanted MSC differentiated into cardiomyocytes and vascular endothelial cells [26].

3. Differentiation of MSC into the Myocardial Lineage

In vitro studies have demonstrated that MSC can differentiate not only into adipocytes and osteocytes but also into cardiomyocytes and vascular endothelial cells [27-30]. The differentiation of MSC into cardiomyocytes has been induced in vitro both in cultures containing MSC alone treated with either 5-azacytidine or a cocktail of growth factors and in coculture with cardiomyocytes. Such differentiation has been demonstrated by evidence of spontaneous beating and the detection of cardiomyocyte-specific markers [27-29,31-38], although there is no clear definition of which markers constitute evidence for full differentiation into functional cells [39]. After MSC were injected directly into infarcted myocardium in an in vivo pig model, the engrafted MSC differentiated toward a myogenic lineage and the expression of muscle-specific proteins, and the animals' cardiac dysfunction and pathologic thinning improved [40]. Furthermore, we and others have demonstrated in animal models of myocardial infarction that directly or intravenously injected MSC differentiated into endothelial cells and were involved in angiogenesis as well as myogenesis [26,41,42].

4. Paracrine Effects Produced by MSC

MSC exert their effect on cardiac regeneration not only by differentiation into specific cell types but also through paracrine actions. In vitro studies have demonstrated that MSC can secrete a variety of angiogenic, antiapoptotic, and mitogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor, adrenomedullin, and insulin-like growth factor 1 [43,44]. An interesting observation is that administration of conditioned medium obtained from MSC culture exerted cytoprotective effects on the myocardium in an animal model of myocardial infarction [45]. We have recently demonstrated that cultured adult

rat cardiomyocytes are injured in response to monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), which plays an important role in myocarditis, whereas this effect is significantly attenuated by conditioned medium derived from MSC cultures [46]. These results suggest a cardioprotective effect of MSC acting in a paracrine manner and demonstrate the importance of secreted factors in cardiac repair.

5. Gene Expression in MSC

MNC have been shown in human studies to induce therapeutic neovascularization in critical limb ischemia and myocardial infarction [10,11]. Similarly, many studies have demonstrated the therapeutic potential of MSC; however, MSC and MNC might be different with respect to the underlying mechanisms contributing to cardiovascular protection. The gene expression profiles under normoxia and hypoxia are largely different for MSC and MNC [47]. MNC express a number of genes involved in inflammatory response and chemotaxis (Table 1). On the other hand, MSC express a number of genes involved in development (eg, transgelin, actin γ 1), morphogenesis (eg, bone morphologic protein 2, transforming growth factor β 3), cell adhesion (eg, neural cell adhesion molecule 1, cadherin 11), and proliferation (eg, connective tissue growth factor, platelet-derived growth factor A) under normoxia. Furthermore, with respect to the genes encoding secretory proteins in response to hypoxia, up-regulated genes in MSC include those encoding several molecules involved in cell proliferation and survival, such as VEGF-D, placenta growth factor (PGF), pre-B-cell colony-enhancing factor 1 (PBEF1), heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), whereas the up-regulated genes in MNC under hypoxia include those for proinflammatory cytokines, such as chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) and interleukin 1 α [47]. These results suggest that transplanted MSC may act to promote cell proliferation (including angiogenesis) and cell survival in response to hypoxia, and MNC may induce an inflammatory response followed by angiogenesis. In fact, implantation of MNC into ischemic limbs has been reported to lead to local inflammatory reactions [48].

Table 1.

Gene Expression in Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Mononuclear Cells (MNC) under Normoxia and Hypoxia [47]*

	MSC	MNC
Normoxia	Morphogenesis (90), development (195), cell proliferation (61)	Inflammatory response (35), chemotaxis (24)
Hypoxia	VEGF-A, VEGF-D, AM, MIF, PGF, PBEF1, HB-EGF, MMP-9	VEGF-A, AM, MIF, IL-1 α , CXCL2

*Numbers in parentheses represent the number of genes highly expressed in terms of the Gene Ontology. VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; AM, adrenomedullin; MIF, macrophage migration inhibitory factor; PGF, placenta growth factor; PBEF1, pre-B-cell colony-enhancing factor 1; HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; IL-1 α , interleukin 1 α ; CXCL2, chemokine (C-X-C motif) ligand 2.

Both exogenously administered MSC and endogenous MSC have been postulated to migrate and participate in wound repair. In healthy animals, intravenously administered MSC preferentially engraft in the bone marrow cavity; however, a significant number of xenogeneic MSC in rats subjected to ischemia/reperfusion could be identified in the circulation and subsequently in the infarcted region of the heart [49]. These findings taken together indicate that MSC induce cardiac repair by a variety of mechanisms.

6. MSC for Treatment of Heart Failure

6.1. In Vivo Studies

Injection of MSC into the myocardium improved cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy, a myocardial disease characterized by a loss of cardiomyocytes and an increase in fibroblasts [50,51]. This improvement possibly occurred through induction of angiogenesis and myogenesis, as well as by inhibiting myocardial fibrosis [44]. In this study, MSC transplantation significantly increased capillary density and decreased the collagen volume fraction in the myocardium. In addition, intravenous administration of MSC improved inflammatory changes and cardiac function in rats with acute myocarditis, suggesting an anti-inflammatory effect of MSC [46]. Recently, we have demonstrated that adipose tissue-derived MSC monolayers generated by cell sheet technology using temperature-responsive culture dishes repair scarred myocardium after myocardial infarction in rats [52]. Interestingly, the engrafted MSC sheet gradually grew after transplantation to form a thick stratum that included undifferentiated MSC as well as newly formed vessels, which were composed of graft-derived cells, host-derived cells, or both. Unlike a fibroblast cell sheet, the monolayered MSC reversed wall thinning in the scar area, thereby contributing to a reduction in left ventricle wall stress and improvement of cardiac function. Therefore, this new technology may overcome problems associated with needle injection of bone marrow cells into scar areas, ie, the difficulty in reconstructing a sufficient cardiac mass.

6.2. Clinical Studies

Few reports have described the results of clinical studies for the treatment of heart failure, but several studies are ongoing. Intracoronary administration of autologous bone marrow-derived MSC has been reported to improve cardiac function in patients with acute myocardial infarction [53] and chronic ischemic cardiomyopathy [54]. Katritsis et al reported that intracoronary transplantation of bone marrow-derived MSC may contribute to regional regeneration of myocardial tissue early or late following myocardial infarction [55] and that intracoronary transplantation of these cells did not appear to be arrhythmogenic [56].

The National Institutes of Health in the United States provides information on the current clinical trials using MSC (www.clinicaltrials.gov). In December 2005, the Rigshospitalet in Denmark started a phase I/II safety and efficacy study (NCT00260338) to evaluate the clinical effect of autologous bone marrow-derived MSC therapy for patients with severe

chronic myocardial ischemia. In October 2006, Helsinki University started a prospective double-blind trial (NCT00418418) of intraoperative transmyocardial autologous bone marrow-derived MSC transplantation versus placebo in patients with heart failure scheduled to undergo coronary bypass operation. In October 2006, the National Heart, Lung, and Blood Institute in the United States started a phase II study (NCT00383630) to evaluate the effect of injected autologous bone marrow cells to improve cardiac function in individuals with a left ventricular assist device (LVAD) awaiting heart transplantation. This study is enrolling individuals who are to undergo surgery to receive an LVAD, and patients are randomly assigned to one of the following 3 groups: Group 1 patients receive injected MSC while undergoing LVAD implantation; group 2 patients receive injected immunoselected CD34⁺ hematopoietic stem cells while undergoing LVAD implantation; group 3 patients undergo LVAD implantation. We also have started a pilot study of intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived MSC in patients with end-stage heart failure (Figure 1). Twenty milliliters of bone marrow cells are aspirated from the ilium, and MSC are cultured and expanded for 3 weeks with medium containing autologous serum. A large number of MSC are directly injected via a catheter into the myocardium at 40 sites.

7. Conclusions

MSC have emerged as a new therapeutic tool for cell therapy in heart failure and exert their effects both by differentiating into specific cell types and through paracrine actions such as angiogenic, cytoprotective, anti-inflammatory, and antifibrotic effects. Whether autologous MSC have significant value in the treatment of heart failure is currently being explored in clinical trials.

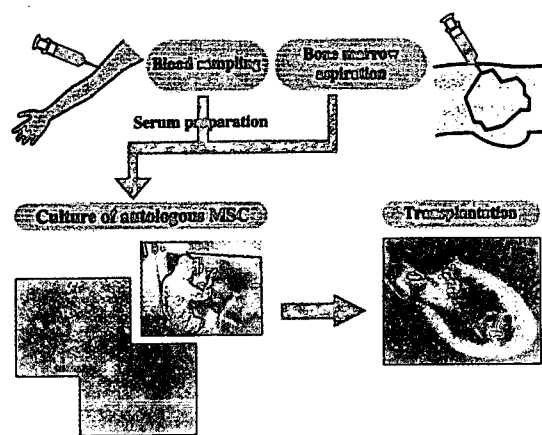


Figure 1. Protocol for the clinical trial using mesenchymal stem cells (MSC) for the treatment of heart failure. Twenty milliliters of bone marrow cells are aspirated from the ilium, and MSC are cultured and expanded for 3 weeks with medium containing autologous serum. A catheter is used to inject a large number of MSC directly into the myocardium at 40 sites.