

respectively, exhibited valvular regurgitation of grade III or higher by echocardiography, and the relative risk for regurgitation of the aortic valve, mitral valve, and tricuspid valve was 4.2–7.3. Although the precise mechanism by which ergot dopamine agonists affect cardiac valves remains to be clarified, these degenerate valves resembled those of serotonin-secreting carcinoid tumors, the expression level of the 5-HT(2B) receptor was the highest among the 5-HT(2) subtypes in the cardiac valve [59], and the ergot dopamine agonists, but not the non-ergot dopamine agonists, stimulated the 5-HT(2B) receptor. For these reasons, some investigators [60] have raised the possibility that the ergot dopamine agonists activate 5-HT(2B) signaling pathway through $G\alpha_q$, ERK1/2, Src, and protein kinase C, leading to hyperplasia of valvular interstitial cells, valve degeneration, and eventually, regurgitation.

Pathologic angiogenesis and aortic valve degeneration

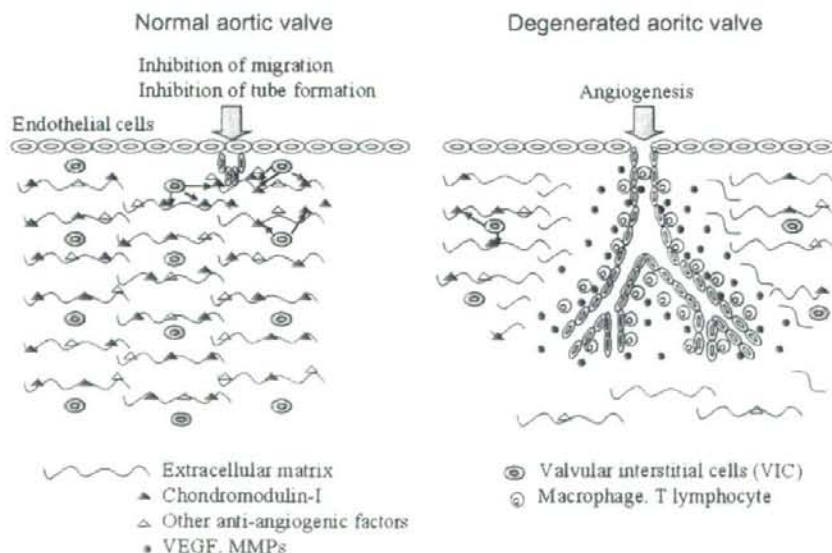
The cartilage and eye are recognized as representative avascular tissues. They have specific protective mechanisms to inhibit pathologic angiogenesis [61], and once avascularity is lost and pathologic vascular invasion occurs in these tissues, severe diseases, such as arthritis and loss of eyesight, may ensue. In contrast, histopathologic analyses of tissues from human calcified aortic valves typically show the expression of the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF), numerous blood vessels growing into these valves, and the expression of bone substrate proteins, such as osteopontin and osteocalcin [62]. Moreover, α -smooth muscle actin, Tie-2, and VEGFR-2 are

co-expressed in many more cells of the human calcified aortic valve than of the normal valve, so that the angiogenic potential of these cells is augmented [63, 64]. Furthermore, significant numbers of endothelial progenitor cells and dendritic cells localize predominantly within the valvular fibrosa of calcified native and bioprosthetic aortic valves, suggesting that cells of extra-valvular origin contribute to aortic valve degeneration [65].

We hypothesize that cardiac valves possess angioinhibitory mechanisms similar to those in the cartilage and eye and that aortic valve degeneration is initiated by pathologic angiogenesis, which is followed by destruction of the valvular tissue. In a screen for angiogenesis inhibitors that are normally expressed in the cartilage and eye, we identified high-level expression of *chm-1* in normal cardiac valves [66]. The *chm-1* gene was cloned from fetal bovine cartilage [67], and its precursor protein undergoes cleavage of the C-terminal intracellular portion by furin protease to generate the mature 25-kDa glycoprotein [61]. The mature *chm-1* protein is secreted into the extracellular matrix, where it binds to exert its physiologic functions, which include chondrocyte proliferation and angiogenesis inhibition of the retinal vascular endothelial cells by blocking proliferation and migration [61, 68]. However, the regulation and signal transduction of *chm-1* remain largely unknown.

RT-PCR, Western blotting, and immunohistochemistry have revealed that *chm-1* is expressed specifically in all four types of cardiac valves (aortic, mitral, pulmonary, and tricuspid valves) of the adult mouse, rat, and human. In contrast, VEGF and angiogenic factors MMP-1, MMP-2, MMP-13 expression [69, 70], angiogenesis, and calcification are observed in the areas of downregulation of *chm-1* in

Fig. 2 Conceptual framework for the role of *chm-1* in aortic valves. VICs produce *chm-1*, which binds to the extracellular matrix and remains bound for extended periods. Since *chm-1* exerts inhibitory effects on endothelial cell migration and tube formation, the endothelial cells cannot infiltrate or migrate into the valvular interstitium in the normal cardiac valve. In degenerative aortic valve disease, *chm-1* expression is decreased, possibly by mechanical stress or inflammation, thereby allowing the infiltration of endothelial cells and inflammatory cells, which leads to the proliferation of microvessels and fibroblasts



degenerate valves. To clarify the physiologic role of chm-I, we performed primary culturing of rat valvular interstitial cells using the explant culture method [71], collected the conditioned media, and analyzed its effect on the angiogenesis of human coronary artery endothelial cells in vitro. The angiogenic capacity of endothelial cells was inhibited by incubation with conditioned media from the valvular interstitial cells, as assessed in the tube formation assay [72] and migration assay, and this effect was almost completely reversed in cells that were transfected with chm-I-specific small interfering RNA, demonstrating the angioinhibitory action of chm-I. Furthermore, the aortic valves of chm-I knockout mice of advanced age showed VEGF expression, angiogenesis, lipid accumulation, and calcification. At 90 weeks of age, the murine aortic valves were significantly thickened and showed turbulent blood flow by echocardiography, indicating early stage aortic stenosis. These findings demonstrate that the angiogenesis inhibitor chm-I is expressed in healthy aortic valves so as to maintain normal valvular function, while the downregulation of chm-I by unknown factors (possibly inflammation or mechanical stress) permits pathologic angiogenesis, which leads to degenerative aortic valve disease. Figure 2 summarizes the newly proposed mechanism for the onset of aortic valve degeneration. It is conceivable that our work is unique and important with regard to identifying a novel, cardiac-valve-specific angioinhibitory molecule and in pointing out the similarity between cartilage and valves and the role of pathologic angiogenesis in degenerative valve disease.

Conclusions

This review has focused on the current evidence for the molecular mechanisms underlying aortic valve degeneration. The mechanism of valvular heart disease remains largely unknown compared to our understanding of the mechanisms underlying heart failure and atherosclerotic diseases, and the development of new pharmacologic therapies or prophylaxis for this disease requires a clearer understanding of the mechanisms of disease onset. Further studies are needed, including those into the mechanisms of regulation and signal transduction of chm-I, as well as the identification of additional aggravators and inhibitors of cardiac valve degeneration from the perspectives of angiogenesis, calcification, and extracellular matrix remodeling.

References

- Freeman RV, Otto CM (2005) Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 111:3316–3326
- Mohler ER 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103:1522–1528
- Rajamannan NM, Gersh B, Bonow RO (2003) Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside—emerging clinical and cellular concepts. *Heart* 89:801–805
- Rajamannan NM, Otto CM (2004) Targeted therapy to prevent progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 110:1180–1182
- Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH (2006) Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation* 114:547–552
- Rajamannan NM, Bonow RO, Rahimtoola SH (2007) Calcific aortic stenosis: an update. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4:254–262
- Skowasch D, Steinmetz M, Nickenig G, Bauriedel G (2006) Is the degeneration of aortic valve bioprostheses similar to that of native aortic valves? Insights into valvular pathology. *Expert Rev Med Devices* 3:453–462
- Maganti K, Rajamannan N (2008) Slowing the progression of aortic stenosis. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 10:18–26
- Mohler ER 3rd, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103:1522–1528
- Kim KM (1976) Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc* 35:156–162
- Kim KM, Chang SH, Trump BF, Spurgeon H (1986) Calcification in aging canine aortic valve. *Scan Electron Microsc* 3:1151–1156
- Ortolani F, Bonetti A, Tubaro F, Petrelli L, Contini M, Nori SL, Spina M, Marchini M (2007) Ultrastructural characterization of calcification onset and progression in subdermally implanted aortic valves. Histochemical and spectrometric data. *Histol Histopathol* 22:261–272
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 107:2181–2184
- Lee YS, Chou YY (1998) Pathogenetic mechanism of senile calcific aortic stenosis: the role of apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 111:934–939
- Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT (2007) Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* 18:483–491
- Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R (2007) Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* 115:377–386
- O'Brien KD (2006) Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1721–1728
- Hinton RB Jr, Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, Yutzey KE (2006) Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res* 98:1431–1438
- Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, Schemper M, Binder T, Maurer G, Baumgartner H (2004) Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation* 110:1291–1295
- Rosenhek R (2005) Statins for aortic stenosis. *N Engl J Med* 352:2441–2443
- Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA (2005) A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med* 352:2389–2397
- Antonini-Canterin F, Zuppiroli A, Popescu BA, Granata G, Cervesato E, Piazza R, Pavan D, Nicolosi GL (2003) Effect of

- statins on the progression of bioprosthetic aortic valve degeneration. *Am J Cardiol* 92:1479–1482
23. Colli A, Gherli T, Mestres CA, Pomar JL (2007) Degeneration of native and tissue prosthetic valve in aortic position: do statins play an effective role in prevention? *Int J Cardiol* 116:144–152
 24. Rajamannan NG, Sangiorgi G, Springett M, Arnold K, Mohaaci T, Spagnoli LG, Edwards WD, Tajik AJ, Schwartz RS (2001) Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve. *J Heart Valve Dis* 10:371–374
 25. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, Singh RJ, Stone NJ, Bonow RO, Spelsberg TC (2002) Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation* 105:2660–2665
 26. Drolet MC, Arsenaault M, Couet J (2003) Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 41:1211–1217
 27. Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR, Spelsberg TC (2005) Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway. *Circulation* 112:1229–234
 28. Guerraty M, Mohler ER 3rd (2007) Models of aortic valve calcification. *J Investig Med* 55:278–283
 29. Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, Hirata Y, Nagai R (2005) Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol* 46:134–141
 30. Drolet MC, Roussel E, Deshaie Y, Couet J, Arsenaault M (2006) A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* 47:850–855
 31. Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER 3rd, Schoen FJ, Levy RJ (2001) Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol* 159:321–327
 32. Mohler ER 3rd, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR (1997) Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:547–552
 33. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM (2002) Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 161:2035–2046
 34. Ghazvini-Boroujerdi M, Clark J, Narula N, Palmatory E, Connolly JM, DeFelicis S, Xu J, Jian B, Hazelwood S, Levy RJ (2004) Transcription factor Egr-1 in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis* 13:894–903
 35. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, Hvass U, Couetil JP, Henin D, Michel JB, Vahanian A, Jacob MP (2005) Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J* 26:1333–1341
 36. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kilic R, Sarikoc A, Pinol R, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggreffe M (2005) Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 14:80–87
 37. Hanada K, Verneij M, Garinis GA, de Waard MC, Kunen MG, Myers L, Maas A, Duncker DJ, Meijers C, Dietz HC, Kanaar R, Essers J (2007) Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice. *Circ Res* 100:738–746
 38. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor L, Lynch SA, Newbury-Ecob R, Tran V, Young I, Trochu JN, Le Marec H, Schott JJ (2007) Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 115:40–49
 39. Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM (2006) Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* 47:1707–1712
 40. Johnson ML, Rajamannan N (2006) Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 7:41–49
 41. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA (2004) Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 95:253–260
 42. Mohler ER 3rd, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, Gannon FH (1999) Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* 8:254–260
 43. Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER 3rd, Gorman JH 3rd, Gorman RC, Levy RJ (2007) Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *Ann Thorac Surg* 83:946–953
 44. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Vahl CF, Hagl S, Brueckmann M, Haase KK, Dempfle CE, Borggreffe M (2004) Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 13:560–566
 45. Choi M, Stottmann RW, Yang YP, Meyers EN, Klingensmith J (2007) The bone morphogenetic protein antagonist noggin regulates mammalian cardiac morphogenesis. *Circ Res* 100:220–228
 46. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA Jr, Falb D, Huszar D (2000) A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 24:171–174
 47. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL (2004) Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18:99–115
 48. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D (2005) Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437:270–274
 49. Garg V (2006) Molecular genetics of aortic valve disease. *Curr Opin Cardiol* 21:180–184
 50. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmil AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J (2006) Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun* 345:1460–1465
 51. Lange AW, Yutzy KE (2006) NFATc1 expression in the developing heart valves is responsive to the RANKL pathway and is required for endocardial expression of cathepsin K. *Dev Biol* 292:407–417
 52. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggreffe M (2004) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 36:57–66
 53. Kaden JJ, Dempfle CE, Kilic R, Sarikoc A, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggreffe M (2005) Influence of receptor activator of nuclear factor kappa B on human aortic valve myofibroblasts. *Exp Mol Pathol* 78:36–40
 54. Osman L, Chester AH, Sarathchandra P, Latif N, Meng W, Taylor PM, Yacoub MH (2007) A novel role of the sympathetic-adrenergic system in regulating valve calcification. *Circulation* 116:1282–287
 55. Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Skowasch D, Schild H, Bauriedel G (2006) p21WAF1/CIP1 and 14-3-3 sigma gene expression in degenerated aortic valves: a link between cell cycle checkpoints and calcification. *Amino Acids* 31:309–316
 56. Yeghiazaryan K, Skowasch D, Bauriedel G, Schild H, Golubnitschaja O (2007) Could activated tissue remodeling be considered as early marker for progressive valve degeneration? Comparative analysis of checkpoint and ECM remodeling gene expression

- in native degenerating aortic valves and after bioprosthetic replacement. *Amino Acids* 32:109–114
57. Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesi S, Pezzoli G (2007) Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 356:39–46
58. Schade R, Andersohn F, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E (2007) Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med* 356:29–38
59. Fitzgerald LW, Burn TC, Brown BS, Patterson JP, Corjay MH, Valentine PA, Sun JH, Link JR, Abbaszade I, Hollis JM, Largent BL, Hartig PR, Hollis GF, Meunier PC, Robichaud AJ, Robertson DW (2000) Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol Pharmacol* 57:75–81
60. Roth BL (2007) Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med* 356:6–9
61. Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y (2005) Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 333:299–307
62. Rajamannan NM, Nealis TB, Subramaniam M, Pandya S, Stock SR, Ignatiev CI, Sebo TJ, Rosengart TK, Edwards WD, McCarthy PM, Bonow RO, Spelsberg TC (2005) Calcified rheumatic valve neo-angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression and osteoblast-like bone formation. *Circulation* 111:3296–3301
63. Chalajour F, Treede H, Gehling UM, Ebrahimnejad A, Boehm DH, Riemer RK, Ergun S, Reichenspurner H (2007) Identification and characterization of cells with high angiogenic potential and transitional phenotype in calcific aortic valve. *Exp Cell Res* 313:2326–2335
64. Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, Lauke H, Reichenspurner H, Ergun S (2004) Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res* 298:455–464
65. Skowasch D, Schrempf S, Werner N, Steinmetz M, Jabs A, Tuleta I, Welsch U, Preusse CJ, Likungu JA, Welz A, Lüderitz B, Bauriedel G (2005) Cells of primarily extra-valvular origin in degenerative aortic valves and bioprostheses. *Eur Heart J* 26:2576–2580
66. Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, Shukunami C, Okada Y, Mukai M, Shin H, Yozu R, Sata M, Ogawa S, Hiraki Y, Fukuda K (2006) Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* 12:1151–1159
67. Hiraki Y (1991) [Molecular cloning of a novel cartilage-specific functional matrix, chondromodulin-I, and its role in endochondral bone formation]. *Seikagaku* 63:1449–1454
68. Hiraki Y, Shukunami C (2005) Angiogenesis inhibitors localized in hypovascular mesenchymal tissues: chondromodulin-I and tenomodulin. *Connect Tissue Res* 46:3–11
69. Davis GE, Senger DR (2005) Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97:1093–1107
70. Zijlstra A, Aimes RT, Zhu D, Regazzoni K, Kupriyanova T, Seandel M, Deryugina EI, Quigley JP (2004) Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). *J Biol Chem* 279:27633–27645
71. Lester W, Rosenthal A, Granton B, Gotlieb AI (1988) Porcine mitral valve interstitial cells in culture. *Lab Invest* 59:710–719
72. Oshima Y, Shukunami C, Honda J, Nishida K, Tashiro F, Miyazaki J, Hiraki Y, Tano Y (2003) Expression and localization of tenomodulin, a transmembrane type chondromodulin-I-related angiogenesis inhibitor, in mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1814–1823



10. ES細胞からの心筋分化

湯浅慎介, 福田恵一

末期心不全の根本的治療法として心臓移植が唯一であるが、常に臓器提供者は不足している。近年、幹細胞をさまざまな細胞に分化・移植する再生医療が期待されている。胚性幹 (ES) 細胞は分化能・増殖能において他の幹細胞より優れている。ES細胞由来心筋細胞移植をモデル動物へ行った研究も報告されているが満足できるものではなく、最も重要でありかつ未解決な点は心筋細胞への分化誘導方法を確立する点である。われわれは、ES細胞を用いた心筋細胞分化誘導方法の確立を目的に研究を開始し、NogginをES細胞に処理すると心筋細胞を高率に分化誘導し得ることを発見したので紹介する。

はじめに

循環器領域においても、他の臓器と同様に治療不能な疾患が数多くある。特に問題となるのは末期心不全であり、内科的治療にきわめて抵抗性を示す。根本的治療方法は現在のところ心臓移植しかないが、心臓移植にも多くの問題点があり、満足のいく治療法とはいえない。近年、治療不能とされてきたさまざまな疾患が再生医療により治療可能となるのではないかと期待されている。しかし再生医療を一般臨床医療として実現するためには、まださまざまな壁が存在している。

幹細胞とは、自己増殖能と多分化能を有する細胞と定義されている。幹細胞は成体の中でも体性幹細胞と

して存在し、組織の修復と維持に関与していると考えられている。幹細胞を分離・選別し、体外で増殖・分化させた後に、病的臓器に移植する細胞移植医療を確立しようとする試みが世界中でなされている。一方で体性幹細胞は成体に存在する幹細胞であるが、存在する割合、増殖能や分化能が低いといった問題点が存在している。それに対して初期胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES細胞) は、増殖能や多分化能などが非常に秀でていることが知られている。1998年にヒトES細胞が樹立され、また核移植技術も進み、患者が自己のES細胞を樹立し細胞移植医療に用いることができる可能性が高まっている¹⁾。

ES細胞は心筋細胞に分化し得る魅力的なcell sourceである。心筋細胞への分化能はマウスES細胞がはじめて樹立された数年後にはすでに報告されている。しかしながら、効率的な心筋細胞分化誘導法が確立しないことなどにより、臨床応用にはまだ多くの時間がかかると考えられている。一般的にES細胞の分化は正常の発生機構を模倣しているといわれている。BMP

【キーワード&略語】

胚性幹細胞, 心筋細胞, 分化, BMP, Noggin

ES細胞: embryonic stem cell (胚性幹細胞)

BMP: bone morphogenetic protein

RA: retinoic acid (レチノイン酸)

FAK: focal adhesion kinase

Cardiomyocyte differentiation from embryonic stem cells

Shinsuke Yuasa/Keiichi Fukuda: Cardiopulmonary division, Department of Internal Medicine/Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University school of Medicine (慶應義塾大学医学部循環器内科・再生医学講座)

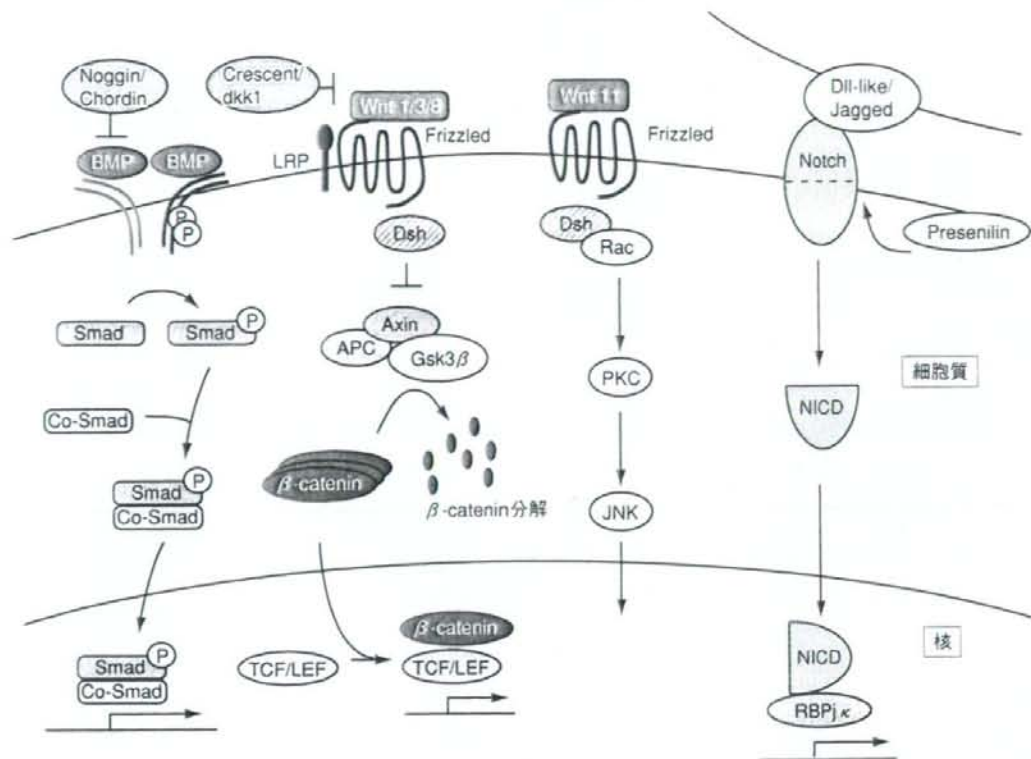


図1 心臓発生に關したシグナル

BMPシグナルはBMPがダイマーを形成しBMPレセプターに結合する。するとBMPレセプターがリン酸化され、続いてSmadがリン酸化される。リン酸化されたSmadはCo-Smadと結合し核内に移行し、転写を活性化する。またBMPシグナルの阻害因子として知られているNogginやChordinは細胞外においてBMPを阻害し、そのシグナル伝達を阻害している。Wntシグナルはβ-cateninを介したcanonical pathwayと介さないnon-canonical pathwayが知られているが、共に心臓発生には重要であると考えられている。Wnt1/3/8などはレセプターであるFrizzledに結合し、Gsk3βを介してβ-cateninの分解を阻害することにより、β-cateninは蓄積・核内移行して核内に存在する転写因子TCF/LEFと結合し転写を活性化する。一方Wnt11はレセプターFrizzledに結合し、JNKを活性化することにより、そのシグナルを伝えていることが知られている。NotchはDil-likeなどのリガンドを介して細胞内ドメインが切断される。続いて、細胞内ドメインが核内移行し転写を活性化する

(bone morphogenetic protein). WntやNotchなどのさまざまな分子が心臓発生・維持に關与していることは広く知られているが(図1)、心筋細胞の最も初期の発生に關する詳細な機構は未だ解明されていない²⁾。この機構を解明しES細胞から心筋細胞への有効な分化誘導方法を確立することにより、ヒトES細胞を用いた心筋再生医療を確立するための足がかりとなり得ると期待している。

■ 胚性幹細胞から心筋細胞への分化誘導

ES細胞樹立が報告されてから約4年後の'85年に

Doetschmanらにより、ES細胞から心筋細胞が分化し得ることが報告された³⁾。'90年代中盤に入ると心筋細胞へ分化誘導後に細胞移植を行うことを念頭に研究が進められていくこととなった^{4)~6)}。2001年になると、ヒトES細胞もまた心筋細胞に分化し得ることが判明した。さらにES細胞より分化した心筋細胞を移植することにより、さまざまな病気が治療し得る可能性があることがわかってきた。

ES細胞から心筋細胞への分化誘導方法に關する研究はさまざまなものが行われており、そのいくつかを紹介する(表)。RA (retinoic acid: レチノイン酸)

表 過去に報告されたES細胞から心筋細胞への誘導方法

添加された因子	報告者	文献
retinoic acid	Wobus, A. M. et al.	J. Mol. Cell Cardiol. 29 : 1525-1539, 1997
transforming growth factor β 1	Behfar, A. et al.	Faseb J. 16 : 1558-1566, 2002
fibroblast growth factors	Dell'Era, P. et al.	Circ. Res. 93 : 414-420, 2003
dynorphin B	Ventura, C. et al.	Circ. Res. 92 : 623-629, 2003
ascorbic acid	Takahashi, T. et al.	Circulation. 107 : 1912-1916, 2003
nitric oxide	Kanno, S. et al.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 12277-12281, 2004
fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2	Kawai, T. et al.	Circ. J. 68 : 691-702, 2004
Wnt11	Terami, H. et al.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 325 : 968-975, 2004
PP2 (a Src family kinase inhibitor)	Hakuno, D. et al.	J. Biol. Chem. 280 : 39534-39544, 2005
Wnt3a/Wnt inhibitor	Naito, A. T. et al.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 19812-19817, 2006
Wnt3	Ueno, S. et al.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 9685-9690, 2007
Wnt3	Kwon, C. et al.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 10894-10899, 2007

はビタミンAの誘導体であり、レチノイン酸レセプターの欠損マウスでは心奇形が認められることが古くから知られていた。また発生時期にビタミンAが不足していると心奇形を生ずることより、ビタミンAが心臓の発生に強く関与していることが予測されていた。また'80年代前半より、初期発生のモデルとして用いられていたEC (embryonic carcinoma) 細胞の分化誘導において、RAをさまざまな濃度・分化時期に投与することにより、多種多様な細胞に分化し得ることがわかってきた。心筋細胞においても、EC細胞にRAを特異的な時期・濃度で用いることにより分化誘導されると報告されていた。これらのことより、'97年にWobusらはES細胞にレチノイン酸を投与することにより心筋細胞の分化効率を上げることに成功している⁷⁾。また、彼らは心筋細胞の中でも特に心室筋の分化誘導効率が上がると報告していることも興味深い点であるといえる。'03年、TakahashiらはFDAに認可されている15,000の薬剤があるcompound libraryから、特異的な機能があり、ヒトに用いることができる880種類のcompoundを用い、ES細胞の分化スクリーニングを行った。その結果、ascorbic acidが心筋細胞分化を促進することがわかった⁸⁾。'05年、Hakunoらは、従来の方法としてES細胞から心筋細胞を分化させる際には胚様体を形成する必要があること、そのためには分化初期には浮遊培養をする必要があることより、

接着に関するシグナルが重要ではないかと考えた。接着系のシグナルとしてSrc family kinase inhibitorであるPP2はfocal adhesion kinase (FAK)を抑制してES細胞から心筋細胞を分化誘導することを報告した⁹⁾。

このように世界中でさまざまな観点から、ES細胞から心筋細胞を分化誘導しようとする試みがなされてきた。主には正常発生より類推された重要な因子の応用あるいは大規模なスクリーニングによる分化因子の探索といったことによる。しかしながら、多くの研究では分化誘導効率も満足のいくものではなかった。今後のヒトES細胞を用いた研究・臨床へ応用するためには、よりよい分化誘導方法を開発する必要があると考えられた。

2 Wntによる胚性幹細胞より心筋細胞への分化

近年、特に心筋細胞分化誘導を調節する因子として注目されているものにWntがある。Wntは20種類からなる、脂質により修飾された分泌型糖タンパク質であり、さまざまな組織の発生に重要な役割を果たしている。心臓発生においても、さまざまなモデル動物を用いた検討からWntの役割が判明している。ショウジョウバエを用いた検討では、Wntが心臓発生を促進することが知られている。一方で、鳥類や両生類では、Wntを抑制することで心臓発生が進むと考えられ

心臓の初期発生因子：哺乳類の心臓は4心房4心室よりなる単一の臓器であり、最も早く発生する臓器の1つである。マウスの胎生7.5日目頃より心臓の原器となる前側板中胚葉からなる。同部位においては、接している内胚葉・外胚葉組織よりさまざまな分泌タンパク質を介して心臓発生が成立するとされており、その中でも特にBMP, Wnt, BMPアンタゴニストが知られている。

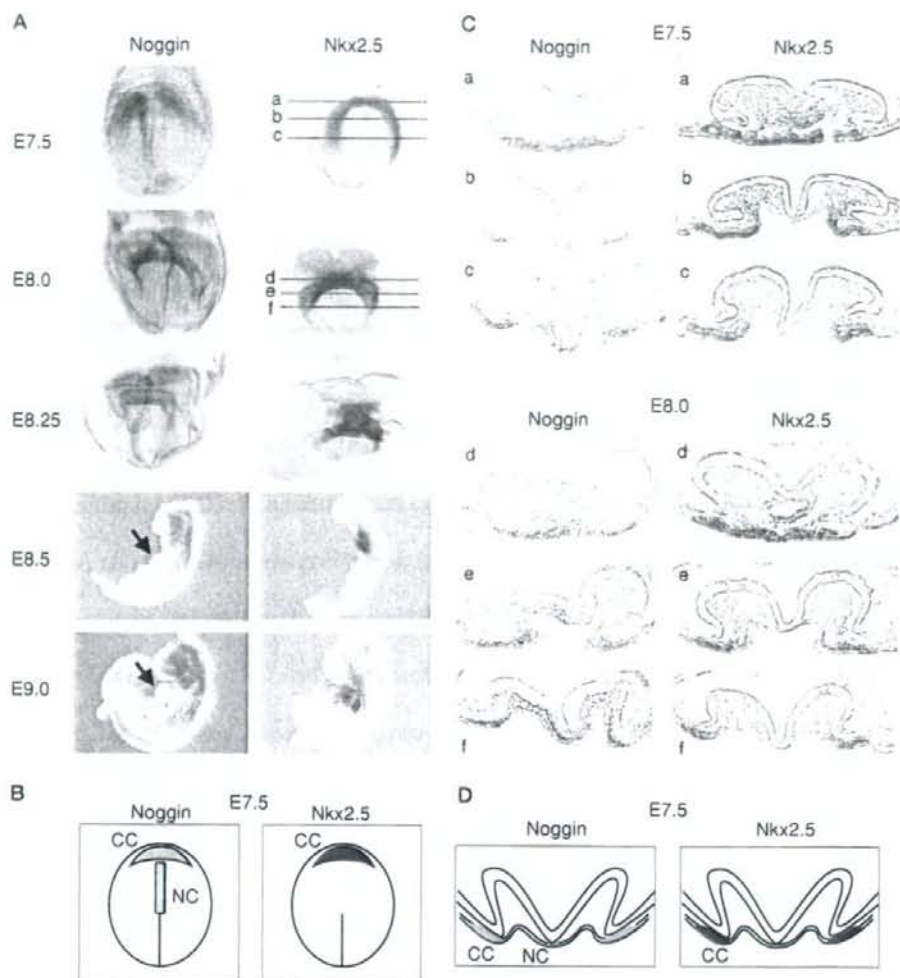


図2 マウス胎仔におけるNkx2.5およびNogginの発現部位 (巻頭カラー図31参照)
 マウス胎仔E7.5～E9.0におけるNkx2.5およびNogginの発現部位を、DIGでラベルしたRNAプローブによる *in situ* hybridization で検討した。A) 心臓発生領域において心臓のマーカーであるNkx2.5はanterolateral plate mesoderm (cardiac crescent) において発現が始まり、その後心臓領域において発現は持続する。一方、NogginはE7.5～E8.0の間はNkx2.5と同部位において強く発現しているが、その後は心臓領域において発現は消失している。C) A)にて示した胎仔の切片であり、Nogginの発現部位はNkx2.5の発現部位に一致して、初期心臓予定領域において発現が認められる。B, D) Noggin (○), Nkx2.5 (■) の発現部位を示している。前述の通りE7.5マウス胎仔においてNogginはNkx2.5の発現部位と同様にCCに発現を認め、その切片においても同様の層に発現を認める (CC: cardiac crescent, NC: notochord)

ていた。

canonical Wnt シグナル (β -catenin を介する経路) は Brachyury T の上昇を介し中胚葉誘導を促進することは広く知られていた^{10)~12)}。また、non-canonical Wnt である Wnt11 は心筋細胞誘導を促進する¹³⁾。

canonical Wnt が哺乳類心臓発生に必要であるという現象は、EC細胞による検討で当初は示唆されてい

た¹⁴⁾。ES細胞を用いた検討では、canonical Wnt は心臓発生のごく初期において造血系や血管発生を抑制し心臓発生を促進するとされている¹⁵⁾。また、後期の Wnt シグナルは心臓発生を抑制する¹⁶⁾。canonical Wnt である Wnt3 を中胚葉誘導後、心筋細胞分化のごく初期に添加することにより心筋細胞分化誘導が上昇し、またインヒビターである Dkk-1 を添加することに

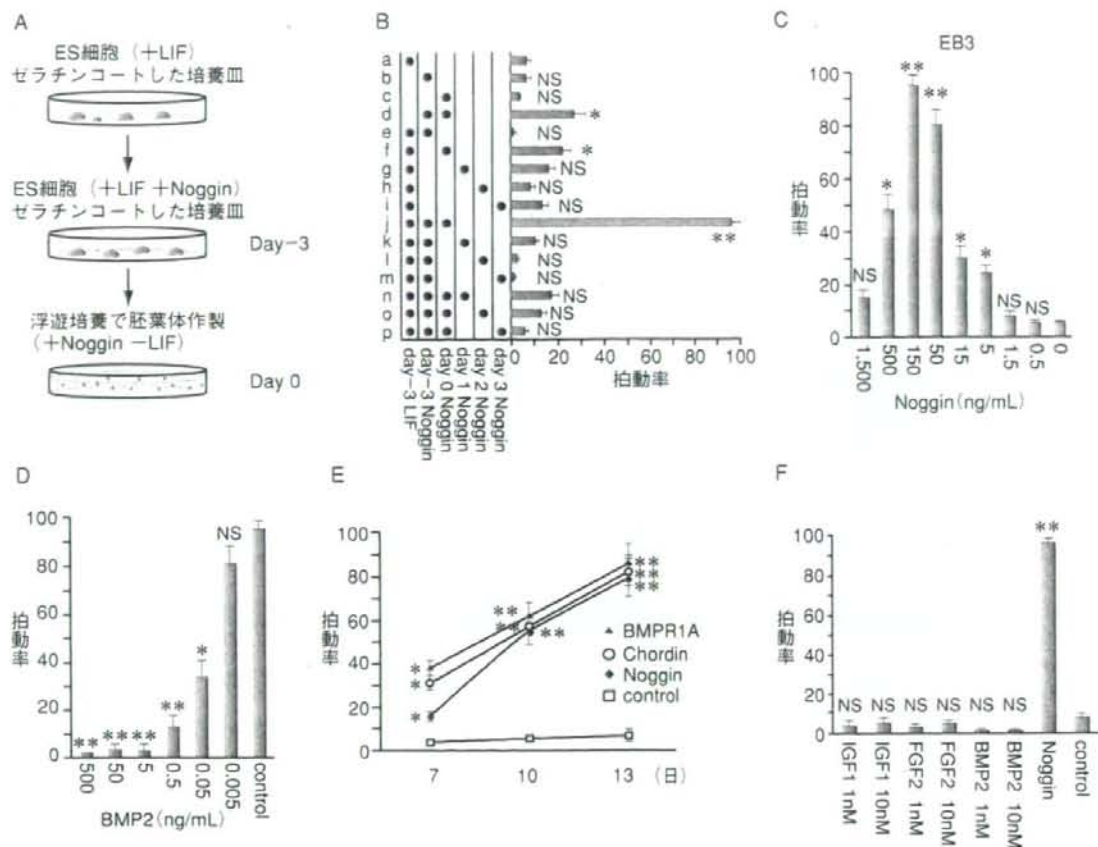


図3 ES細胞のNoggin添加による分化誘導方法

A) ES細胞はゼラチンコートした培養皿上LIF存在下で維持する。心筋細胞誘導の初期には、接着状態、LIF存在下においてNogginを加え、その後Noggin存在下において浮遊系に移し培養を続ける。その後、形成された胚様体が自己拍動するものの割合を検討することとした。なお、浮遊系に移す日を0日目と考え表記している。B) Nogginを添加する時期を検討した結果、接着状態から浮遊状態初期まで添加することにより最も効率的に分化誘導が可能となることがわかった。NS：有意差なし。C) Nogginの至適投与濃度を検討した結果、150ng/mLが最適であることがわかった。D) Nogginの至適投与条件下においてBMPを加え、Nogginの効果がBMPを阻害していることによることが確認された。E) Nogginの心筋細胞分化誘導効果がBMPを阻害することによることを確認するため、他のBMP阻害物質であるChordin、BMPR1Aを添加し検討した結果、Nogginと同様の効果が得られた。F) 心筋細胞の分化に有利に働くと思われるFGF2、IGF1、BMP2を同様のプロトコルで添加し分化誘導を行ったが、ES細胞からの心筋細胞分化誘導効果は確認し得なかった。

より心筋細胞分化誘導が減少する¹⁷⁾。近年のWntと心筋細胞発生に関するES細胞を用いた検討から、Wntが心臓発生に重要なことが数多くの実験結果から示唆されており、さらにその時間空間的制御の重要性もまた示されている。

図4 BMPおよびNogginによる胚性幹細胞より心筋への分化の調節¹⁸⁾

ES細胞に、心臓発生に必要とされている因子を加

えただけでは十分な分化誘導効率を得られない。そこで、まず心筋細胞の発生過程を見直す必要があると考えた。心筋細胞は、原腸陥入が始まり三胚葉が形成され始めるマウスの胎生7.0日目周辺に発生は始まる。心筋細胞の運命決定が成されるその付近において、心筋細胞発生領域に発現する因子を各種検討することとした。

BMP (bone morphogenetic protein) は心筋細胞の発生において重要な因子であるが、BMPをES細胞

に添加した際に心筋細胞の分化を促進することは確認し得なかった。それどころか、むしろ心筋細胞分化は低下する傾向にあった。そこでBMPシグナルは発生初期において、心筋細胞の発生においては不利に働いている可能性があるのではと考えた。BMPシグナルを抑制するBMPアンタゴニストは生理的にさまざまなものがあり、発生ごく初期から強く発現しており形態形成に強く関与していることが知られている。これらのBMPアンタゴニストが心筋細胞の初期発生に関与しているか否かを検討した結果、心筋細胞の発生領域においてBMPアンタゴニストであるNogginが一過性であるが非常に強く発現していることがわかった(図2)。Nogginは、E7.5~8.0の時期における心筋細胞特異的転写因子であるNkx2.5の発現と同様の部位、すなわち内胚葉層と中胚葉層において発現していることが判明した。

この結果より心筋細胞の発生にはNogginによる一過性のBMPの抑制が重要と類推できた。ES細胞から心筋細胞への分化誘導に種々検討を重ねた結果、分化誘導の初期においてのみ、培養液中にNogginを添加することにより、自律拍動能を有する心筋細胞が選択的かつ高率に産生されることを見出した(図3B)。

過去のBMPシグナルの心筋細胞発生における検討から、BMPシグナルは心筋細胞の発生に必須な因子であると考えられ、NogginはBMPシグナルをブロックする以外の機能があるのではないかと当初は考えた。しかしながら、ES細胞の分化ではNoggin存在下においてBMPを添加すると心筋細胞の発生は著明に抑制され(図3D)、またNoggin以外のBMPをブロックする物質(Chordin, soluble BMP receptor 1A)を培養液中に添加した際にもNogginと同様に心筋細胞分化誘導効率を上昇させることがわかった(図3E)。これは、Nogginによる心筋発生促進作用はBMPを阻害することによることを示すと考えられる。また、過去に心筋細胞の発生を促進する因子として報告されているIGF1, FGF2やBMP2を同様のプロトコールでES細胞に添加したが、Nogginと同様の効果は得られなかった(図3F)。

おわりに

現在、再生医療においてES細胞(もしくはそれと

同等の多分化能と増殖能を有するiPS細胞)が最も期待されたcell sourceである。ES細胞は初期発生に準じた分化様式を呈するため、効率的な分化誘導には発生学的な知見が有用となる。今後は、さらなる心筋細胞分化誘導効率の上昇をめざし、他の分化誘導因子を探索すると同時にヒトES細胞における分化誘導を念頭に研究を行っていく必要がある。

文献

- 1) Thomson, J. A. et al.: Science, 282: 1145-1147, 1998
- 2) Fukuda, K. & Yuasa, S.: Circ. Res. 98: 1002-1013, 2006
- 3) Doetschman, T. C. et al.: J. Embryol. Exp. Morphol. 87: 27-45, 1985
- 4) Klug, M. G. et al.: J. Clin. Invest. 98: 216-224, 1996
- 5) Kehat, I. et al.: J. Clin. Invest. 108: 407-414, 2001
- 6) Kehat, I. et al.: Nature Biotechnol. 22: 1282-1289, 2004
- 7) Wobus, A. M. et al.: J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 1525-1539, 1997
- 8) Takahashi, T. et al.: Circulation. 107: 1912-1916, 2003
- 9) Hakuno, D. et al.: J. Biol. Chem., 280: 39534-39544, 2005
- 10) Lindsley, R. C. et al.: Development, 133: 3787-3796, 2006
- 11) Yamaguchi, T. P. et al.: Genes & Dev., 13: 3185-3190, 1999
- 12) Arnold, S. J. et al.: Mech. Dev., 91: 249-258, 2000
- 13) Pandur, P. et al.: Nature, 418: 636-641, 2002
- 14) Nakamura, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 5834-5839, 2003
- 15) Naito, A. T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 19812-19817, 2006
- 16) Ueno, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104: 9685-9690, 2007
- 17) Kwon, C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104: 10894-10899, 2007
- 18) Yuasa, S. et al.: Nature Biotechnol., 23: 607-611, 2005

<筆頭著者プロフィール>

湯浅慎介: 1974年生まれ。'99年、慶應義塾大学卒業。2005年、慶應義塾大学大学院医学研究科博士課程修了。同年より現職。専門:循環器内科、心臓の発生・再生、心肥大・心不全の機構解明。

万能細胞 (iPS 細胞) のメリットと 再生医療への応用

田中 智文^{1,2)}, 福田 恵一¹⁾

1) 慶應義塾大学医学部再生医学教室, 2) アスビオファーマ株式会社生物医学研究所

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地 Tel 03-5363-3874 Fax 03-5363-3875

E-mail: kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp

1 はじめに

難治性重症疾患に対する治療法としてこれまで体性幹細胞や胚性幹 (Embryonic stem: ES) 細胞を用いた治療が注目され、多くの研究が為されてきた。これらの幹細胞のうち前者は免疫拒絶が無い点、後者は無尽蔵に増殖できる点が利点としてあげられてきたが、換言すればそれぞれの細胞は弱点を持っていた。これに対し、2006 年京都大学山中教授らの研究グループは誘導多能性幹 (Induced pluripotent stem: iPS) 細胞を樹立した。iPS 細胞はこの両者の利点を持ち、かつ胚使用に伴う倫理的な問題を回避できる細胞として注目されている。iPS 細胞は疾患モデルへの応用や創薬ツールとして実用化が期待されていることに加え、患者自身の細胞から作製することが可能であることから、自己の iPS 細胞由来の分化誘導細胞が移植細胞源にもなり得る。この iPS 細胞と従来から研究が進められている ES 細胞との相違点を説明し、また再生医療への応用と可能性について概説する。

2 これまでの再生医療のアプローチ

心筋梗塞や糖尿病、パーキンソン病をはじめとする種々の疾患は現在、医薬品では完治させることができないものも数多く存在する。こうした難治性疾患の根治療法を図るため再生医療が注目されている。再生医療と一口に言っても様々なアプローチがあり、多くの研究

者がその具現化に向け取り組んでいる。まず第一に挙げられるのは体内に存在する体性幹細胞の利用である。血液・骨髄をはじめとする組織には体性幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、患者からそれらの細胞を取り出し、*in vitro* で増殖させ、治療に利用しようという試みである。心筋組織幹細胞や神経幹細胞も存在するがその数は極めて少なく、それらの単離法、増殖法が研究されているが、患者からそれらの細胞を取り出し治療に使用することは現在の技術では未だ困難と考えられている。

そこで第二のアプローチとして ES 細胞を用いた再生医療研究が進められてきた。ES 細胞は、胚盤胞と呼ばれる段階の内部細胞塊を取り出して樹立される幹細胞である。ES 細胞は身体を構成する三胚葉系由来のすべての細胞へ分化できる能力をもち、未分化状態を維持したまま無限に増殖させることができる。しかし、ES 細胞は患者自身の細胞からは樹立できないことから免疫拒絶の問題が残されている。また、受精卵を破壊して作製しなければならないため、倫理的問題を払拭することができない。倫理的問題から、ヒト ES 細胞は体外受精時の余剰卵からのみしか作製が認められていない。現時点では国産のヒト ES 細胞として京都大学のグループが作成した 3 株 (KhES-1, -2, -3) が存在するのみである。さらに日本ではヒト ES 細胞研究を始めるためには、海外に比べ厳格な審査体制が敷かれており、使用が認められるまでには長時間を要する。そのため、ヒト ES 細胞研究に取り組む国内の企業は数社しかなく、基礎研究レベルでも使用が認められている研究室は限られている。

また、ヒト ES 細胞由来の各種組織を用いた臨床応用には今少しの時間がかかるであろう。

第三のアプローチとしては核移植、すなわち体細胞のリプログラミング技術による幹細胞の樹立である。以前からカエルや哺乳類の卵子の中には、多能性誘導因子 (Pluripotency inducing factor : PIF) が存在していることが知られており、哺乳類ではドリーの誕生により、PIF の存在が実証された。また ES 細胞にも、体細胞核をリプログラミングする活性が存在すること、すなわち PIF が存在することが知られている¹⁾。また、体細胞から核を取り出し、除核した未受精卵に導入、そこから ES 細胞を樹立しようという試みがある。マウス・サルのレベルでは成功を収めているが、現時点でヒトでは胚盤胞の段階までしか成功しておらず、ES 細胞は樹立されていない²⁾。

3 iPS 細胞の樹立とメリット

そこで、まったく新しいアプローチとして山中らは、ES 細胞に発現し、体細胞では発現していない遺伝子を体細胞に導入すれば、ES 細胞のような幹細胞を作製できるのではないかと考えた。コンピューターによるスクリーニングで ES 細胞のみで発現する 24 遺伝子を絞り込み、その中の Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 という 4 つの遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてマウスの体細胞に導入すれば、ES 細胞と同様の性質をもつ幹細胞になることを明らかにした³⁾。2006 年のマウス iPS 細胞樹立の発表で世界中の研究者を驚かせたが、それから 1 年後、早くも山中らはヒト iPS 細胞の樹立に成功した⁴⁾。さらに、世界中の研究者がほぼ同時期にヒト iPS 細胞樹立の再現性を確認し、ヒト ES 細胞を樹立した Thomson のグループでは上記の 4 因子の組み合わせとは異なる、Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 という 4 因子からヒト iPS 細胞が樹立できることを発表した⁵⁾。また山中らは c-Myc は必ずしも iPS の樹立に必須ではなく、3 因子だけでも iPS が樹立できることをヒト iPS 樹立発表から即座に報告した⁶⁾。これらの知見から推測すると、体細胞から iPS 細胞を樹立するために必要

な遺伝子は複数の組み合わせがあることが予想される。

マウス iPS 細胞は ES 細胞と同様の分化能をもち、生殖系列への伝播も確認されている。ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に、母体に戻ることができないため生殖伝播能を確認することはできないが、三胚葉分化能や奇形腫の形成能が確認されている。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と形態だけでは区別することができないほど類似しており、ヒト ES 細胞と同じ方法で未分化維持ができ、また胚様体を形成させることにより分化誘導することができる (図 1)。マウス iPS 細胞ではすでに、心血管系や神経細胞への分化誘導のみならず、iPS 細胞を用いた鎌状赤血球貧血症モデルの治療⁷⁾ やラットのパーキンソン病の改善に成功した⁸⁾ と報告されている。これらのグループはいずれも ES 細胞の研究を行っており、それらの経験により iPS 細胞を早期に各組織へと分化誘導することに成功できたと言えるであろう。我々もこれまでにマウス ES⁹⁾、コモンマウス ES¹⁰⁾、そしてマウス iPS 細胞から効率よく心筋分化する方法、そして ES 細胞由来心筋細胞を高純度に精製する系を構築している。それらの技術を応用することにより、効率よくヒト ES 細胞を心筋細胞へと分化誘導し、高純度に精製することに成功している。さらに現在、ヒト ES 細胞で確立した効率的な心筋分化誘導法ならびに精製法を、ヒト iPS 細胞を用いて検討している。

iPS 細胞は受精卵を用いずに体細胞から樹立することができることから、ES 細胞のような倫理的問題を回避することができる。また、患者自身の細胞から樹立することも可能であるために免疫拒絶の問題も回避することができる。このように iPS 細胞はこれまでの再生医療のアプローチではなし得なかった様々な問題を解決できる可能性を秘めている。

iPS 細胞の問題点として懸念されているのは、①がん遺伝子 c-Myc を導入する点、②ウイルスベクターを使用している点、③ 4 因子による体細胞の初期化機構が不明である点、④ iPS 細胞が遺伝的に安定な細胞なのか不明である点等が挙げられる。①に関しては、山中らは c-Myc 無しでも iPS 細胞が樹立できることを示しており、この点は解決されたと言って良いであろう。②~④に関しても世界中の研究者が精力的に研究を進めている。②

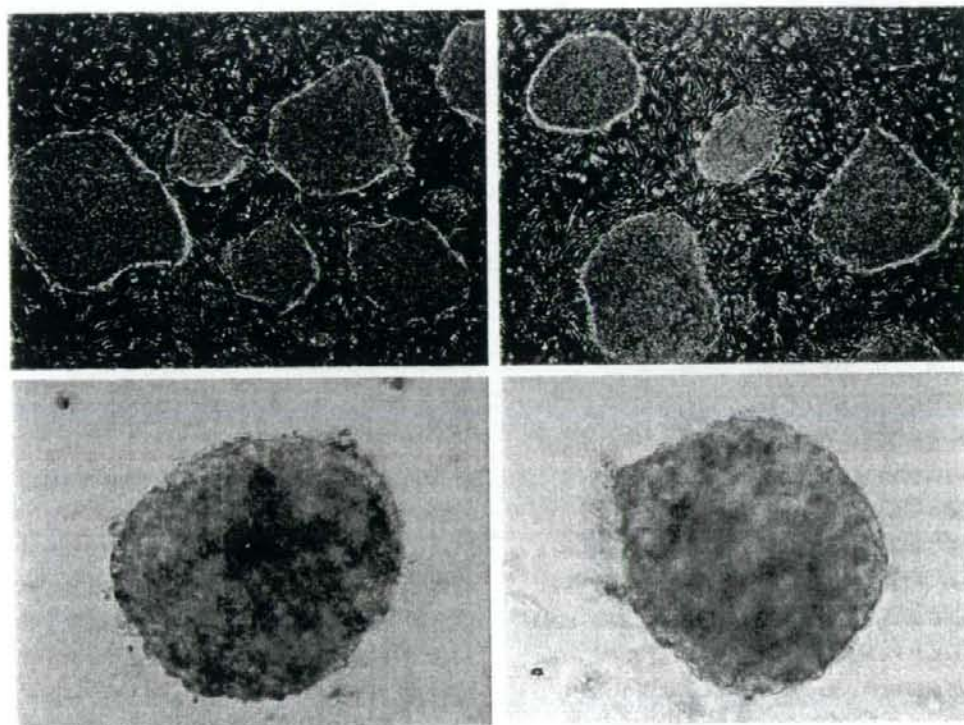


図1 ヒトES細胞 (Khes-3株)とヒトiPS細胞 (201B7株)の形態
 左上:ヒトES細胞未分化コロニー
 右上:ヒトiPS細胞未分化コロニー
 左下:ヒトES細胞から作製した胚様体
 右下:ヒトiPS細胞から作製した胚様体

に関してはごく最近、米国 Scripps 研究所のグループが低分子化合物により4因子のうち数種を代替できる可能性を報告¹¹⁾しており、目覚ましい進歩が見られ今後解決されていくだろう。

4 iPS細胞の再生医療への応用

現在、少なくとも日本において創薬研究にヒトES細胞を利用することは、前述のごとく倫理的問題が残されていることから困難であると考えられてきたが、ヒトiPS細胞は、このような問題点がないことに加え、②～④の問題が解決される前でも、医薬品のスクリーニングや安全性の評価に利用するには問題が少なく、創薬ツールとしてiPS細胞の実用化が期待されている。ヒトiPS

細胞を用いた種々の分化した細胞を用いることにより近い将来、動物実験の数も減少すると予測される。また、各種疾患を持つ患者からiPS細胞を樹立すれば、病因の解明や病態進行のメカニズムの解析を行うことが可能となり、創薬標的の同定も行えると考えられる。こうした知見を用いた創薬も、広義のiPS細胞を利用した再生医療と言えるであろう。さらに上記課題を解決することができれば、将来的にはiPS細胞由来の分化細胞そのものが移植細胞源にもなり得る。しかし当然のことではあるが、ヒトiPS細胞をそのまま臨床応用することはできず、目的とする細胞へ分化誘導する技術の開発、目的の細胞だけを純化する技術の開発が必要不可欠である。

ヒトiPS細胞が報告されてからまだ半年しか経過していないが、世界中の研究室がiPS細胞の実用化に向け

を削っており、毎週のようにヒト iPS 細胞に関する新たなブレイクスルーが発表されている。近い将来、iPS 細胞の臨床応用はいくつものハードルを乗り越え、確実に実用化されることは間違いのないであろう。

参考文献

- 1) Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. *Curr Biol*. 11, 1553-8(2001)
- 2) French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. *Stem Cells*. 26, 485-93 (2008)
- 3) Takahashi K, Yamanaka S. *Cell*. 126, 663-76 (2006)
- 4) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. *Cell*. 131, 861-72 (2007)
- 5) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. *Science*. 318,1917-20 (2007)
- 6) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S. *Nat Biotechnol*. 26, 101-6(2008)
- 7) Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. *Science*. 318, 1920-3(2007)
- 8) Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 5856-61 (2008)
- 9) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K. *Nat Biotechnol*. 23, 607-11 (2005)
- 10) Chen H, Hattori F, Murata M, Li W, Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, Sano M, Makino S, Ogawa S, Fukuda K. *Biochem Biophys Res Commun*. 369, 801-6(2008)
- 11) Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. *Cell Stem Cell*. 2, 525-8 (2008)

心血管病における再生療法の展望

—臨床研究の観点から—

The perspectives of regenerative medicine for cardiovascular disease— from the viewpoint of clinical research

福田 恵一

Keiichi Fukuda

慶應義塾大学医学部再生医学教室・教授

Professor, Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics,
Keio University School of Medicine

bone marrow stem cell, cardiac stem cell, regenerative medicine,
cell transplantation, cardiomyocyte, cell differentiation

Summary

Since existence of endothelial progenitor cell (EPC) and cardiomyocyte-differentiation potential of mesenchymal stem cells have been reported, various clinical trials on the regeneration and neovascularization of the cardiovascular system had been examined. Although intracoronary administration of bone marrow mononuclear cells and/or EPC had a tendency to improve the ejection fraction (EF) in patients with acute myocardial infarction, most of the results indicated that their improvements in EF were less than 5 %, and could not obtain the statistical significance. Some reports suggested that the cell number, timing of cell administration, selection of the patients, cell preparation methods were critically important to get the good results. Application of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells were also examined in patients with acute myocardial infarction. Intramyocardial injection of skeletal myoblasts had a tendency to improve cardiac functions, but this caused fatal ventricular arrhythmias in some cases. Future application of cardiomyocytes obtained from ES cells or inducible pluripotent stem cells (iPS cells) are awaited.

Bone marrow contains endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. Administration of bone marrow mononuclear cells into the calf muscle improved lower limb ischemia.

はじめに

1990年後半に浅原らが骨髄中から血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)が流血中に動員され、傷害された血管内皮の修復や血管新生に関与することを報告¹⁾し、また骨髄間葉系幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化することをわれわれが報告²⁾して以来、世界中で心血管領域の再生医学研究が展開され、臨床研究されるに至った。この間、さらに身体の中にはその他にもさまざまな体性幹細胞が存在することが報告された^{3)~6)}。また、発生分化に関わる重要なシグナルが次々に解明され、幹細胞の研究とともに21世紀の中心となるべき研究が進展している⁷⁾。われわれもこうした流れを受け、骨髄間葉系幹細胞、組織幹細胞、ES(embryonic stem)細胞、iPS(inducible pluripotent stem)細胞から心筋分化誘導を行い、すでにヒトの心筋細胞を分化誘導する技術を着実に進歩させつつある。こうした基礎研究は時間もかかり、すぐには臨床応用されないが、実際の臨床の場では比較的臨床応用可能な領域から種々の研究が試行錯誤で展開され、取捨選択されている。本稿ではこのような臨床研究の流れを紹介し、今後の再生医療の進むべき道を考えていくこととする。

1 骨髄細胞を用いた 下肢虚血に対する細胞移植治療

骨髄細胞は造血幹細胞を頂点とする造血系の細胞がヒエラルキーを形成している。この中にはそのどの部分に属するかは不明であるが、EPCが含まれているとされ、血管新生に貢献することが知

られている。また、これとは別にわれわれが報告したように、骨髄間葉系幹細胞が含まれ、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、一部心筋細胞に分化することができる。骨髄細胞を直接的に、あるいは遠心分離により分葉核球を除いた単核球成分として細胞移植する取り組みがなされた。閉塞性動脈硬化症(athelosclerosis obliterans: ASO)やBuerger病などの下肢の血管閉塞性疾患に対する取り組みは、本邦で実用化され臨床応用されるに至っている⁸⁾。下腿筋の筋肉に骨髄単核球成分を注射投与することにより血管新生を惹起するもので、潰瘍形成や指の切断などが軽減できた例が多数報告されている⁹⁾。臨床的に効果が認められる本治療法もその機序に関しては諸説あり、まだ完全に解明されたわけではない。注入された細胞のほとんどは投与1週間後にはその部位から消失してしまい、血管新生に関与するものはごく一部であることが示された。その後の研究で、この作用は投与された骨髄細胞からのパラクリン作用や、投与部位の骨格筋の新生作用であることが報告されている¹⁰⁾が、まだ詳細は完全に解明されていない。投与骨髄中に含まれる血小板から大量の細胞増殖因子や血管新生因子が分泌されることもその機序の1つとされている。また、末梢血中の単核球を用いても同様の成績が報告されている¹¹⁾。

1 骨髄細胞を用いた 心筋梗塞に対する細胞移植治療

こうした成績を踏まえ、骨髄単核球を心筋梗塞後の心臓に投与する治療法が試みられている^{12)~15)}。骨髄単核球とは全骨髄細胞を遠心分離し、赤血球と分葉核球を除いた成分であり、多種の細胞の集

Intracoronary administration of bone marrow mononuclear cells had a tendency to improve cardiac ejection fraction, but it was minimal and not statistically significant.

合体と考えてよい。急性心筋梗塞後の直後から1週間後ぐらいまでに冠動脈内にカテーテルを用いて、あるいは心腔内からNOGA™カテーテルを用いて注射により細胞を投与する方法である。その結果を表1に示した。この方法はドイツを中心としたヨーロッパ諸国で研究が開始され、開始当初のコホート研究ではいくつかの報告で有意に駆出率が上昇したと報告された。しかし、その後の症例数を増やした単盲検研究および二重盲検研究では、改善傾向はあるもののその差が小さいため有意差が認められない試験が多かった。さらにその後の研究では、心筋梗塞急性期の際の駆出率が低い症例を選んで、細胞数を 10^8 以上投与し、細胞の精製方法及び投与時期を適切に選べば有効であるとの報告があり、今後のさらなる研究の進展が望まれる。いずれにせよ、骨髄単核球の冠動脈内投与では細胞が局所にとどまる確率が著しく低

く、多くは肺と脾臓に集積すると報告されており、投与方法を含めた今後のさらなる解析が重要となるであろう。

バイパス手術や冠動脈インターベンションが困難な狭心症症例に対する骨髄細胞移植療法はすでに行われており、有効性を報告する論文があるが、その最終的な評価は二重盲検試験の結果を待つことになるであろう。

III 血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた心筋梗塞に対する細胞移植治療

EPCは末梢血中から細胞を採取して得られるため、骨髄穿刺を必要としない。EPCは本来血管内皮に分化すると考えられている細胞であり、冠動脈内に投与した場合に血管新生を促進することは考えられるが、心筋再生することは望めない。考えられる作用機序は血流改善に伴う二次的な効果で

表1 骨髄単核球成分を用いた心筋梗塞後に対する臨床研究成績

デザイン	症例数	平均観察期間	細胞数	投与方法	駆出率の変化	報告者
R-SB	60	12	10^8	冠動脈内	+7.0(p=0.03)	Meluzin, et al, 2007
R-SB	51	3	2×10^8	冠動脈内	+4.1(p=0.001)	Assmus, et al, 2006
R-SB	66	3	10^8	冠動脈内	+3.0(p=0.04)	Meluzin, et al, 2006
R-SB	204	12	2.4×10^8	冠動脈内	致死率低下	Schachinger, et al, 2006
R-SB	20	6	4×10^7	冠動脈内	+6.7(NS)	Ge, et al, 2006
R-SB	20	4	6×10^7	心内腔から筋注	+2.5(NS)	Hendriks, et al, 2006
R-DB	67	4	1.7×10^8	冠動脈内	+1.2(NS)	Janssens, et al, 2006
R-SB	100	6	8.7×10^7	冠動脈内	-3.0(p=0.05)	Lunde, et al, 2006
R-SB	60	18	2.5×10^8	冠動脈内	+2.8(NS)	Meyer, et al, 2006
コホート	36	3	3×10^8	心内腔から筋注	+4.0(NS)	Mocini, et al, 2006
R-SB	204	4	2.4×10^8	冠動脈内	+2.5(p=0.01)	Schachinger, et al, 2006
コホート	36	3	9×10^7	冠動脈内	+7.0(p=0.02)	Strauer, et al, 2005
コホート	20	12	2.6×10^7	心内腔から筋注	+8.1(NS)	Perin, et al, 2004
コホート	20	3	2.8×10^7	冠動脈内	+1.0(NS)	Strauer, et al, 2002

R: ランダム化試験, SB: 単盲検試験, DB: 二重盲検試験

Intracoronary administration of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction slightly increased ejection fraction, but it was not statistically significant.

ある。細胞採取の簡便性から、心筋梗塞治療においてもこの細胞の有効性を調査する研究が行われた。これらの研究をまとめたものを表2に示した^{13),16)-20)}。冠動脈内に投与した研究では全般的に改善傾向はあるものの、一部の研究で有意に改善を示したのに対し大多数の研究では有意差を証明できなかった。心筋内に直接投与した研究で有意に駆出率を増加させたという研究もあるが、細胞数が少ない研究であり、有効性に対する判断は困難であるといえるであろう。

IV 骨格筋芽細胞、間葉系幹細胞を用いた心筋梗塞に対する細胞移植治療

骨格筋芽細胞はこれまで衛星細胞 (satellite cell) と呼ばれている細胞であり、骨格筋を採取し、培養した際に比較的容易に得ることができる。骨格筋芽細胞は単核で *in vivo*, *in vitro* で容易に細胞増殖する。この細胞はある程度細胞が増殖すると周辺の骨格筋芽細胞と細胞融合し、骨格筋の成熟

型である筋管細胞に変化する。心筋が得られない現状を踏まえて、骨格筋芽細胞が代用できないかとの考えから、これを心筋内に直接注射する研究が行われた。その成果を表3に示した²¹⁾⁻²³⁾。限られた研究ながら駆出率に対する有効性はあると考えられているが、問題として起こったのは不整脈である。当初の研究では、骨格筋芽細胞を移植した例の約半数に心室頻拍などの致死的不整脈が発生し、ICD (implantable cardioverter defibrillator) が埋め込まれた。その後の基礎研究で骨格筋と心筋は電気的に接合せず、骨格筋が存在するトリエンターリーなどの不整脈の基質になることが示された。

間葉系幹細胞はわれわれが報告したように心筋細胞に分化しうる細胞である。冠動脈内に注入した試験では大量に細胞を入れた際に有効であったとの報告もあるが、その評価は定まっていない^{13),24)}。この細胞を大量に同一部位に移植した際に骨に分化する可能性があり、筋肉内注射は慎重

表2 EPC, CD133陽性細胞, CD34陽性細胞を用いた心筋梗塞後に対する臨床研究成績

細胞種	デザイン	症例数	平均観察期間	細胞数	投与方法	駆出率変化	報告者
EPC	コホート	54	6	5×10^9	冠動脈内	+6.0 (p=0.04)	Tatsumi, et al, 2007
	コホート	73	6	2×10^9	冠動脈内	+2.8 (NS)	Choi, et al, 2007
	R-SB	47	3	5×10^7	冠動脈内	+0.8 (NS)	Assumus, et al, 2006
	R	82	6	1.4×10^9	冠動脈内	-0.2 (NS)	Kang, et al, 2006
	コホート	70	6	7.3×10^7	冠動脈内	+5.5 (p=0.02)	Liet, et al, 2006
	SB	26	3	7×10^7	冠動脈内	+7.2 (NS)	Erbs, et al, 2005
CD133 ⁺	コホート	27	6	NA	心筋内	NA	Ahmadi, et al, 2007
	コホート	55	6	6×10^6	心筋内	+6.3 (p=0.02)	Stamm, et al, 2007
	コホート	35	4	1.3×10^7	冠動脈内	+2.8 (NS)	Bartunek, et al, 2005
CD34 ⁺	R-DB	24	6	3.5×10^7	心内腔から筋注	NA	Losordo, et al, 2007

Direct injection of skeletal myoblasts into myocardium improved ejection fraction in patients with myocardial infarction. However, some of them revealed fatal arrhythmias.

表3 骨格筋芽細胞, 間葉系幹細胞を用いた心筋梗塞後に対する臨床研究成績

細胞種	デザイン	症例数	平均観察期間	細胞数	投与方法	駆出率変化	報告者
骨格筋芽細胞	R-DB	97	6	NA	心筋内	+3(p<0.04)	MAGIC, 2007
	コホート	26	12	2.5×10 ⁸	心筋内	+14.5(p<0.01)	Gavira, et al, 2006
	コホート	12	12	2.1×10 ⁸	心内腔から筋注	+11.6(p<0.05)	Ince, et al, 2004
間葉系幹細胞	R	48	12	5×10 ⁶	冠動脈内	-3(NS)	Chen, et al, 2006
	R-SB	69	6	6×10 ¹⁰	冠動脈内	+12.0(p=0.01)	Chen, et al, 2004
間葉系幹細胞 +EPC	コホート	22	4	6×10 ⁶	冠動脈内	+0.3(NS)	Katritsis, et al, 2005

に行われるべきであろう。

V 心筋幹細胞を用いた移植治療

Anversaらは心筋組織中にc-kit陽性の心筋組織幹細胞が存在すること, *in vitro*で心筋細胞を含む複数の細胞に分化することを報告した³⁾。他にもSca-1やIsl-1陽性の細胞が心筋細胞に分化すると報告され⁴⁾⁵⁾。またside population法やneurosphere培養法で得られる細胞も心筋分化能があると報告されている。c-kitは細胞表面に存在する細胞増殖因子stem cell factorの受容体である。Sca-1は造血幹細胞の表面に存在するstem cell antigen-1というで蛋白であるが、その機能は不明で幹細胞以外にも発現することやヒトでは存在しないことより、現在では注目されていない。Isl-1は発生段階において二次心臓発生領域由来の幹細胞に発現するとされ、ヒトでは右心室を中心に存在する。これ以外に、われわれはside population法やsphere形成法で得られる細胞の中に発生時に神経堤から心臓に遊走してきた細胞が混在しており、これらの細胞が神経堤幹細胞として心臓内で心筋細胞に分化することを報告した。まだ

証明されていないが、心筋組織幹細胞は心臓内において心筋細胞の緩徐な新陳代謝、すなわち細胞の入れ替わりや広範な心筋壊死に伴う新たな心筋細胞の補充に関与することが推測されている。

臨床応用という面では心筋細胞のバイオブシー標本から得られた細胞をsphere形成法で増幅した細胞が臨床応用可能な細胞と考えられ、欧米を中心に前臨床から臨床応用されようとしている。*In vitro*での心筋分化は複数の研究者が証明しているものの、実際に生体外で増殖させた心筋組織幹細胞が心臓内で選択的に心筋細胞に分化し、心収縮力を改善するか否かに関しては全く未知であり、今後の試験結果が注目される。また、これらの細胞がどの程度まで増殖できるかは解析結果がなく、今後の研究の推移が注目される。

VI ES細胞やiPS細胞の利用と将来展望

2000年代に入って、細胞の増殖と分化に関係する多くの細胞増殖因子が単離され、その機能が解明された。Bone morphogenetic protein(BMP), Wnt, Hedge Hog, Notchなどがその代表である

ES cells can be induced into cardiomyocytes using the recent information of developmental biology, although they had several problems. Development of iPS cells can overcome these problems.

が、これらの生体内での役割が解明されるにつれ、細胞分化の研究も進んできた。ES細胞分化にこのようなシグナル研究を組み合わせることで、今後さまざまな細胞がES細胞から分化誘導できるようになりつつある⁷⁾。われわれもES細胞にBMPの阻害因子であるNogginを作用させることにより、心筋細胞を効率的に分化誘導させる方法を開発してきた。こうした知見を集積することによりヒトES細胞から心筋細胞を効率的に分化誘導できる時代が近未来にくることは間違いない。ただし、ES細胞には残存未分化幹細胞が惹起する奇形腫の形成と免疫拒絶、胚を使う倫理的問題などが課題として残されている。

この問題を解決するために京都大学の山中らはES細胞に発現している4つの転写因子Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4を線維芽細胞に遺伝子導入することにより、ES細胞と同等の自己複製能、細胞増殖能、多分化能を有する誘導性多能性幹細胞(iPS細胞)の開発に成功した^{25,26)}。iPS細胞は胚を使用しない点で倫理的問題がなく、自己細胞を利用できる点で免疫拒絶反応のない移植ができるので、ES細胞のもつ問題点を克服できる。このため、iPS細胞研究は世界的な競争を呼んでいる。もちろん、iPS細胞にも導入した遺伝子のうち、c-Mycの強発現が腫瘍形成を惹起する可能性が指摘されており、その対応策としてc-Mycを除いた3因子だけでiPS細胞を樹立する方法も確立されている²⁷⁾。残る課題として、3因子の遺伝子導入部位が他の遺伝子に異常を惹起する可能性があるが、樹立した細胞株ごとに安全性を確認する必要があるであろう。

iPS細胞を用いた臨床応用までには今少しの時

間がかかるであろう。しかし、国を挙げて支援している領域でもあり、今後の研究の速度は加速されると考えられる。短期間で効率的にかつ完全性の高いiPS細胞が樹立される技術が開発されれば一気に臨床応用への道が展開されると考えられる。

おわりに

再生医学の研究が開始されて以来、血管新生の面では着実に成果が生まれつつあるが、心筋再生の面ではまだまだの状態といつてよい。これは単に幹細胞さえ移植すればすべてが心筋細胞に再生されるほど単純にはいかない側面があり、当然の結果といえる。心筋再生技術は幹細胞からの心筋細胞の分化誘導、分化した心筋の精製・純化、効率的な移植法の開発といったいくつものステップを経なければならぬ。しかし、これらは着実に成果が上がり、臨床応用直前にまできている。今後のますますの発展が期待される。

References

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
- 2) 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
- 3) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-776, 2003
- 4) 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
- 5) Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al: Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated car-