

blood,⁷ placenta,⁹ and amniotic membrane, and gestation is one of the best circumstances for immunologic tolerance.

Because pretreatment of hAMCs with IL10 before coculture was essential for the increase in cardiomyogenic transdifferentiation efficiency, the main effect of IL10 should be on the hAMCs. IL10 increased the HLA-G expression in hAMCs and the effect on the cardiomyogenic transdifferentiation was blocked by the administration of anti-IL10 antibody or anti-HLA-G antibody, suggesting IL10-induced HLA-G expression plays a pivotal role in increasing the efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation. Administration of IL10 without coculture did not cause any cardiomyogenic transdifferentiation in vitro; therefore, the HLA-G-dependent increase in the cardiomyogenesis required the feeder cardiomyocyte culture. The fact that treatment with FK506 or hydrocortisone significantly attenuated the cardiomyogenic transdifferentiation efficiency strongly suggests that inflammation activity in feeder cultures plays a pivotal role in cardiomyogenic transdifferentiation of mesenchymal cells. The different responses in cardiomyogenesis by the same immunologic suppressant may be caused by the different mechanisms of the agents. FK506 and hydrocortisone suppress every immunologic process, whereas HLA-G is known to suppress natural killer cells³⁸ and activate immunosuppressive regulatory T cells.³⁰ The process of HLA-G-dependent induction of immunologic reaction may be a clue to understanding cardiomyogenic transdifferentiation of hAMCs in vitro and vivo. Further experimentation should be performed.

Clinical Contributions

Amniotic membrane can be obtained at every delivery. Because it is usually considered as medical waste, it is an easily accessible cellular source without ethical problems. Our established hAMCs can transdifferentiate into cells of various organs, especially into functioning cardiomyocytes. For safety concerns (ie, neoplasm formation), hAMCs may be superior to the iPS cells, because hAMCs do not require any genetic or epigenetic modifications. We did not observe tumor and/or teratoma formation (also see the Online Data Supplement) in the present study. The noncardiomyogenic transdifferentiation efficiency of hAMCs in vitro was low and hAMCs are subject to contact inhibition and anchorage dependence during multiplication. These cellular characteristics might contribute to the low incidence of neoplasm formation of hAMCs. Regarding immunologic rejection, hAMCs may have an equivalent potential to iPS cells. Because pretreatment with IL10 significantly increased cardiomyogenic transdifferentiation efficiency and immunologic tolerance, we may be able to use hAMCs as an allograftable stem cell source for cardiac stem cell therapy. Compared to the other human mesenchymal cells,^{6–9} only hAMCs can be immunologically tolerated and transdifferentiate into cardiomyocytes in vivo. Because they can be used as an allograft, hAMCs can be used for clinical patients immediately without establishing a stem cell bank system.

Acknowledgments

We thank S. Hiroi for technical advice in the FISH experiment. EGFP transgenic mice were obtained by courtesy of Dr M. Okabe.

Sources of Funding

The research of H.T. and Y.I. was partially supported by a grant from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan. A part of this work was undertaken at the Keio Integrated Medical Research Center.

Disclosures

None.

References

- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*. 2002;91:189–201.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448:313–317.
- Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002;357:405–417.
- Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94:92–95.
- Hou M, Yang KM, Zhang H, Zhu WQ, Duan FJ, Wang H, Song YH, Wei YJ, Hu SS. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *Int J Cardiol*. 2007;115:220–228.
- Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, Kiyono T, Gojo S, Miyoshi S, Hida N, Ita M, Segawa K, Ogawa S, Sakamoto M, Nakamura S, Umezawa A. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J Gene Med*. 2004;6:833–845.
- Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 2008;26:1695–1704.
- Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical cord blood-derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem Cells*. 2007;25:2017–2024.
- Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res*. 2007;313:2550–2562.
- Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1449–1457.
- Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1441–1448.
- Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li X, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell*. 2005;16:1491–1499.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73:1919–1926.
- Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation*. 2005;79:528–535.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005;23:1549–1559.
- Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, Hashizume R, Strom SC, Wagner WR, Keller BB, Tobita K. Naive rat amnion-derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of postinfarcted heart. *Cell Transplant*. 2009;18:477–486.
- Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential

- autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:664–673.
18. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997;407:313–319.
 19. Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res.* 2006;98:705–712.
 20. Fukuda Y, Miyoshi S, Tanimoto K, Oota K, Fujikura K, Iwata M, Baba A, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Mitamura H, Ogawa S. Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces early afterdepolarization and decreases in K-channel density in rabbits. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1090–1100.
 21. Hagiwara Y, Miyoshi S, Fukuda K, Nishiyama N, Ikegami Y, Tanimoto K, Murata M, Takahashi E, Shimoda K, Hirano T, Mitamura H, Ogawa S. SHP2-mediated signaling cascade through gp130 is essential for LIF-dependent I CaL, [Ca²⁺]_i transient, and APD increase in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:710–716.
 22. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB, Solter D. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* 1983;2:2355–2361.
 23. Brulport M, Schormann W, Bauer A, Hermes M, Elsner C, Hammersen FJ, Beerheide W, Spitkovsky D, Hartig W, Nussler A, Horn LC, Edelmann J, Pelz-Ackermann O, Petersen J, Kamprad M, von Mach M, Lupp A, Zulewski H, Hengstler JG. Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers. *Hepatology.* 2007;46:861–870.
 24. Gnechi M, He H, Liang O, Melo L, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt R, Ingwall J, Dzau V. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11:367–368.
 25. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2003;288:51–59.
 26. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430–436.
 27. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237–244.
 28. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:11520–11525.
 29. Pazmany L, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science.* 1996;274:792–795.
 30. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008;26:212–222.
 31. Yoshizawa A, Ito A, Li Y, Koshiba T, Sakaguchi S, Wood KJ, Tanaka K. The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37:37–39.
 32. Fernandez N, Cooper J, Sprinks M, Abdelrahman M, Fiszler D, Kurpisz M, Dealtry G. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation development and fetomaternal interactions. *Hum Reprod Update.* 1999;5:234–248.
 33. Hutter H, Hammer A, Blaschitz A, Hartmann M, Ebbesen P, Dohr G, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B. Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast. *Cell Tissue Res.* 1996;286:439–447.
 34. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081–2095.
 35. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.
 36. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- τ . *J Immunol.* 1995;154:4261–4268.
 37. Piccinini MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.* 1995;155:128–133.
 38. Falk CS, Steinle A, Schendel DJ. Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells. *J Exp Med.* 1995;182:1005–1018.

Novelty and Significance

What Is Known?

- The amniotic membrane is believed to play an important role in fetomaternal tolerance during normal pregnancy.
- Cardiomyogenic transdifferentiation efficiency of human marrow-derived mesenchymal stem cells are extremely low ($\approx 0.3\%$).
- There is no proven, ready-to-use cellular source for cardiac stem cell-based therapy.

What New Information Does This Article Contribute?

- Cardiomyogenic transdifferentiation efficiency of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells is $\approx 33\%$.
- Amniotic membrane, which can be obtained from every delivery, can be a good, ready-to-use cellular source for cardiac stem cell-based therapy in other patients.
- It is possible that these cells will be immune-privileged.
- Immunologic tolerance and cardiomyogenic transdifferentiation of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are significantly increased by pretreatment with IL10 or progesterone.

There is no definitive ready-to-use cellular source for cardiac stem cell therapy. Our present study showed that xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells (hAMCs) transdifferentiated into cardiomyocytes and were tolerated >80 days in situ. This finding suggested that hAMCs could be an ideal allograftable cardiac stem cell source. Because hAMCs do not cause immunologic rejection in the host, we do not need to adjust donor-host immunologic matching of human leukocyte antigens. Therefore, we can use freshly isolated hAMCs immediately in allogenic combination without establishing stem cell bank systems. Moreover, the precise mechanism of cardiomyogenic transdifferentiation is unclear. We showed close relationships between the mechanisms of cardiomyogenic transdifferentiation and the process of causing immunologic tolerance. This may be a key to understanding of the mechanism of cardiomyogenic transdifferentiation. Consequently, we may be able to manipulate the cardiomyogenic transdifferentiation efficiency. Our findings are important to advance clinical cardiac stem cell therapy.

Supplemental materials

Figure Legends for supplemental material

Online Fig. I. Flow cytometric analysis of hAMCs

(A) Flow cytometric analysis of hAMCs with FITC-coupled antibodies against human surface antigens. Vertical axis denotes cellular number and horizontal axis denotes fluoroscopic intensity (full scale = 4 log). Gray histogram corresponds to FITC positive population. (B) Summary of flow cytometric analysis of hAMCs. We measured the shift of peak histogram value of flow cytometric data. We defined each result by the following criteria (-, negative; \pm , 0.5 log shift from negative control; +, 1 log shift from negative control; ++, 2 log shifts from negative control; +++, 3 log shifts from negative control) (n=4).

Online Fig. II. Laser confocal microscopic view of immunocytochemistry of differentiated hAMCs 1.

EGFP-labeled hAMCs (A; green) were co-cultivated with MitoTracker® Red-stained murine cardiomyocytes (B; Mit, red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Merged image of DAPI, EGFP, Mit is shown in C. There is no overlap of Mit and EGFP. Both Mit positive cell and EGFP positive cells express cardiac troponin-I (D,E, Trop-I, white). On the other hand the MitoTracker® Red-labeled hAMCs (G, red) were co-cultivated with EGFP-transgenic murine cardiomyocytes (F, green). Merged image of DAPI, EGFP, Mit is shown in H. There is no overlap of Mit and EGFP. Both Mit positive cells and EGFP positive cells express Trop-I (I,J, white). Staining pattern of Trop-I showed clear striation (D). Scale bar denotes 20 μ m

Online Fig. III. Laser confocal microscopic view of immunocytochemistry of transdifferentiated hAMCs 2.

Suppl 1

Unmerged images of Fig. 2F are shown. Please see detail in the legend of Fig. 2. Striation pattern of differentiated hAMCs in the white box of panel D were expanded and shown in panel F-H. Clear striation pattern of α -actinin (red; F) is observed. α -actinin and EGFP-staining (green; G) were observed alternately in striated manner, suggesting α -actinin is expressed in EGFP positive cell. Scale bar denotes 20 μ m

Online Fig. IV. Haemodynamic parameter in myocardial infarction model of nude rat in vivo

Measured LV parameters by echocardiogram are averaged and shown at 2 weeks and 4 weeks after the myocardial infarction (MI). (A) The left ventricular end-diastolic dimension (LVEDd) and (B) end-systolic dimension (LVESd) tended to improve; however, there was no statistical significance. There was no difference in the diameter of (C) the anterior left ventricular wall thickness (AW), and (D) posterior left ventricular wall thickness (PW). Measured (E) left ventricular systolic pressure (LVSP), (F) left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), (G) maximum positive developed left ventricular pressure (LV dP/dt), are averaged and shown. The MI+hAMC group showed slight improvement in LVSP and LV dP/dt. There is, however, no statistical significance.

Online Fig V. Evidence of long term survival of EGFP-positive cardiomyocytes in Wistar rat heart

(A) Number of injected cells, detected EGFP-positive/cardiac troponin-I positive cardiomyocytes, and % surviving cells as a function of the number of days after the transplantation are shown. (B-G) Representative confocal laser microscopic view of the immunohistochemical analysis using anti-cardiac troponin-I (Trop-I) antibody at the day after transplantation. Although fluorescent intensity of EGFP was decayed as a function of the time after

transplantation, there is no significant decrease in % surviving cells. Scale bars denote 50 μm .

Online Fig VI Massive survival of EGFP-positive hAMCs and transdifferentiation into cardiomyocytes in Wistar rat heart.

Laser confocal microscopic view of immunohistochemistry with anti-cardiac troponin-I antibody (Trop-I; red, C). Nuclei were stained with DAPI (blue, A). Many EGFP-positive (EGFP; green, B) rod-shaped cells expressed Trop-I and were survived in the Wistar rat heart even at 2 weeks after the transplantation. Images of A-C were superimposed and shown in D. Scale in panel A denotes 50 μm .

Online Fig VII. Laser confocal microscopic view of immunohistochemistry of transdifferentiated hAMCs in the Wistar rat heart.

Unmerged images of Fig 4 C and Fig 4 D are shown in A-F and F-J, respectively. Please see detail in the legend of Fig. 4.

Online Fig VIII. Laser confocal microscopic view of immunohistochemistry of transdifferentiated hAMCs in the EGFP-transgenic mouse heart.

Non EGFP-labeled hAMCs were transplanted into myocardial infarction area of EGFP-transgenic mouse heart. Two weeks after the transplantation, laser confocal microscopic view of immunohistochemistry with anti- α -actinin (α -actinin; red C). Nuclei were stained with DAPI(blue, A). Many EGFP-negative (EGFP-I; green, B) rod-shaped cell expressed α -actinin were survived in the mouse heart even at 2 weeks after the transplantation. Images of A-C were superimposed and shown in D. White box area in D was expanded and shown in E. Clear striation staining pattern of α -actinin was observed in EGFP-negative hAMCs derived cells. Scale in panel C denotes 50 μm .

Online Fig IX. Laser confocal microscopic view of immunohistochemistry of

regulatory T cells in the Wistar rat heart.

Unmerged images of Fig 5 E are shown. Please see detail in the legend of Fig. 5.

Online Fig X. In vitro transdifferentiation ability of hAMCs to the other organs.

Laser confocal microscopic view of immunocytochemistry. Hepatogenic differentiation (A,D), pancreogenesis (B), osteogenesis (C), and neurogenesis (E,F) were examined (See also supplemental Material and Method 3). Transdifferentiated hAMCs expressed organ specific antigens, however, failed to show organ specific morphology in vitro (A,D,E,F). Scale bars denote 50 μ m.

Online Fig XI. Effect of hAMCs transplantation on capillary density in vivo

Immunohistochemistry using antibody against CD34 was used to detect capillary density. % CD34 (+) area in Non-MI area and MI area in the MI-group and MI+hAMCs group were calculated and averaged and shown in A. There is no difference in capillary density. Scale bars denote 50 μ m.

Online Table I. Primer sets to detect cardiomyocyte-specific and associated genes

Supplemental Material and Methods

1. The isolation of the amniotic membrane-derived mesenchymal cells

Amniotic membrane consists of fetal amniotic membrane and maternal deciduas. Deciduas are a part of uterine endometrium, which also contains a lot of cardiac precursor-like cells (Hida et al., Stem Cells, 2008; 26(7): 1695-1704). The speed of population doubling of maternal endometrial cells was significantly greater than hAMCs (18.2 ± 1.7 PDs at 40 days in endometrial cells vs 6.68 ± 1.67 PDs at 40 days in hAMCs). Therefore, in our preliminary data, even if there was a small amount of contamination of maternal cells at the start of the culture, they quickly overcame the hAMCs and, finally, the majority of the cells became the maternal endometrial cells. Therefore, a human amniotic membrane was collected after delivery of a male neonate in order to check the maternal cell contamination in culture by the karyotype. At the 2nd passage and 10th passage of hAMCs, the CEP X/Y DNA Prove Kit (Vysis) was used to determine the proportion of XX and XY cells in accordance with the manufacturer's suggestions.

hAMCs were isolated according to the method previously described¹ with slight modification. Avascular transparent amniotic membrane was peeled off from maternal placenta and deciduas, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), chopped into small pieces, and incubated in 2.4 U/mL dispase II (Roche Diagnostics, 4942078) at 37°C for 55 minutes. The membranes were then incubated in 0.75mg/mL type-II collagenase (Worthington Biochemical, NJ, USA) for 60 minutes at 37°C. Isolated cells were rinsed and seeded on a 10 cm culture dish with Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM, LONZA, PT-3238). After two or three days, the cultured dishes became subconfluent in a humidified and

特集

難治性心不全に対する
非薬物療法の最前線

治す

13

心筋再生医療の現状 —細胞移植療法を用いた再生医療—

▷ *Toward cardiac regeneration using cell transplantation—Current status and future perspective*

上 大介 (横浜国立大学工学研究院)

五條理志 (東京都健康長寿医療センター心臓外科/東京大学大学院医学系研究科重症心不全治療開発講座)

梅澤明弘 (国立成育医療センター生殖医療研究部)

心疾患患者に対する新しい治療法として、幹細胞生物学の知見に基づいた細胞移植療法が注目されている。細胞移植療法とは、幹細胞もしくは前駆細胞を含む細胞分画を機能不全に陥った臓器・組織になんらかの方法で移植することで機能回復を期待した療法である。現在、幹細胞の特性や分化のメカニズム、個体発生に関する理解が急速に進んだことにより、この細胞移植療法に役立つ技術の開発も進んでいる。特に、心臓血管系は再生医療への臨床応用で牽引車として、非常に多くの臨床研究がすでに行われ、メタアナリシスも報告され始め、揺籃期から成長期に入った感がある。細胞移植による再生医療が1つの確立した治療法として成熟するためには、心筋再生に適した「細胞源の選択」、高い機能回復を期待した「分化誘導効率の向上」、機能を有した状態での「移植の方法」といった技術の開発がきわめて重要である。

本稿では、この新しい心筋再生医療をめざした細胞移植療法についてのUp-to-Dateな知見を概観したい。

日本人の高齢化と食生活の欧米化は生活習慣病をまねき、心疾患を原因とする死亡者数は年々増加している。末期の重症心不全患者に対して最も有効な治療法は心臓移植であることが確立されているが、ドナー数の不足、拒絶反応や感染といったリスクも存在する。そこで近年、新たな治療法として注目されているのが、幹細胞の特徴を利用した細胞移植療法である。細胞移植療法は、患者体内から取り出した細胞を、幹細胞・前駆細胞を含む細胞分画に濃縮する、もしくは、体外での細胞培養で増殖、あるいは分化・修飾してから体内へ移植し、機能回復を期待するという治療方法である(図1)。幹細胞移植としては、同種間の組み合わせ

になるが、造血幹細胞を用いた骨髄移植がすでに臨床治療として確固たる地位を築いている。現在の心臓血管系再生医療のマイルストーンといえる臨床研究が、2001年に日本から発表された。細胞移植としては最もシンプルな自己骨髄細胞・閉鎖系のシステムで、閉塞性動脈硬化症の患者に患部への直接注入による移植によって、虚血に陥った組織に血管新生と臨床症状の改善をもたらした¹⁾。心臓に対しては、人工心臓装着を受けた末期心不全に対して骨髄単核球移植(埼玉医科大学総合医療センター)や骨格筋芽細胞移植/細胞シート移植(大阪大学未来医療センター)による回復例が報告されており、今後、ますますの発展が期待される医

療方法である²⁻⁴⁾。この細胞移植療法を実用化するためには解決すべき3つの課題が存在すると考えられている。今回は細胞移植療法に向けた、この3つの課題「細胞源の選択」、「分化誘導効率の向上」、「移植の方法」についてそれぞれ解説する。

細胞源の選択

現在、細胞移植療法のための細胞源として、embryonic stem (ES)細胞、induced pluripotent stem (iPS)細胞は研究ツールとして、心筋組織幹細胞、間葉系幹細胞、骨髄細胞は臨床応用を念頭に置いた前臨床としてきわめて

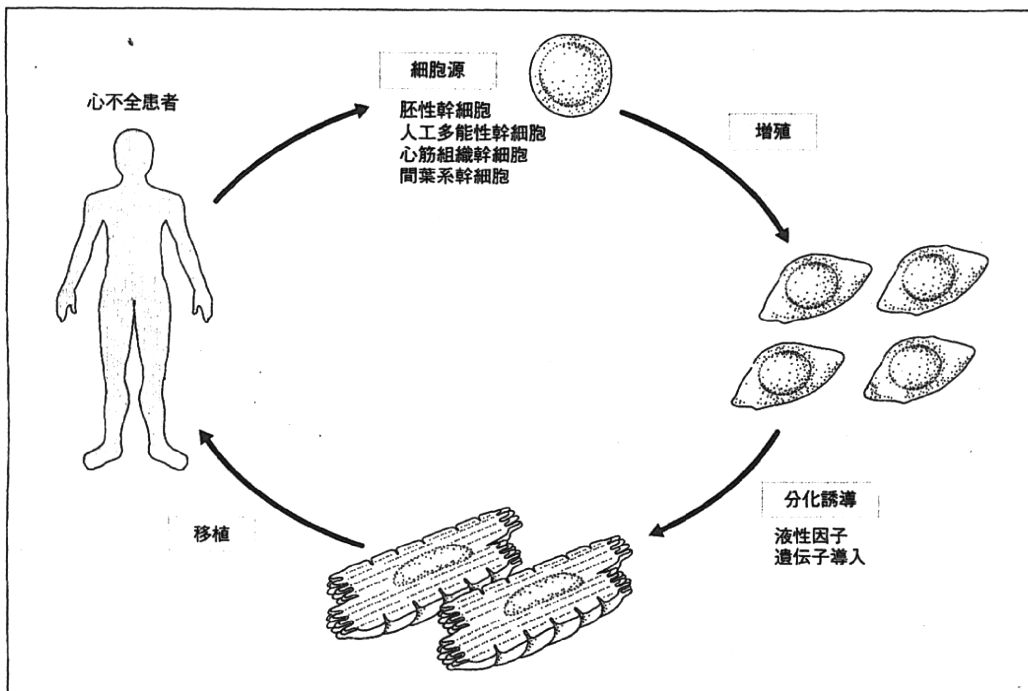


図1 細胞移植療法

ホットに研究されている。前者のES細胞やiPS細胞は、stemnessを維持しながら分裂による細胞増殖が永続的に可能な細胞で、特性として、細胞塊としての胚様体を介することで心筋細胞への分化が報告されている^{5,6)}。特にiPS細胞は、患者由来の体細胞を用いることで拒絶反応を回避できるうえに、ES細胞と同様の技術で心筋分化誘導も可能なため、心筋再生を目的とした細胞移植療法に有効な新たな細胞源として期待されている。一方、後者のいずれの細胞群にも共通する点は、幹細胞の条件を満たしている細胞を高率に含んでいて、分裂による自己複製を伴った細胞増殖が可能なことと、心筋細胞への分化が可能なことである。ES細胞が倫理的問題で研究が進まなかった2000年ごろから体性幹細胞の代表格として熱心に研究された骨髄間葉系幹細胞は、薬剤による心筋分化誘導が

より有効に行えるようになり、また、さまざまな前処置による移植後の生存率の向上も報告されている⁷⁾。さらに近年、成体の心臓にも組織幹細胞・前駆細胞が存在し、培養系あるいは生体内で心筋細胞に分化して不全心の修復にかかわると報告され、臨床研究が昨年よりアメリカで開始されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、いずれの細胞源も生体内での心筋細胞への分化誘導効率は低く、現状では細胞移植療法に最適化されていない。このため、心筋細胞への分化誘導効率の向上が重要な課題となっている。

分化誘導効率の向上

心筋再生を目的とした細胞移植療法を実現させるには、分化誘導効率を向上させる技術の開発が必要不可欠となる。近年の心臓の発生機構の解析から、心

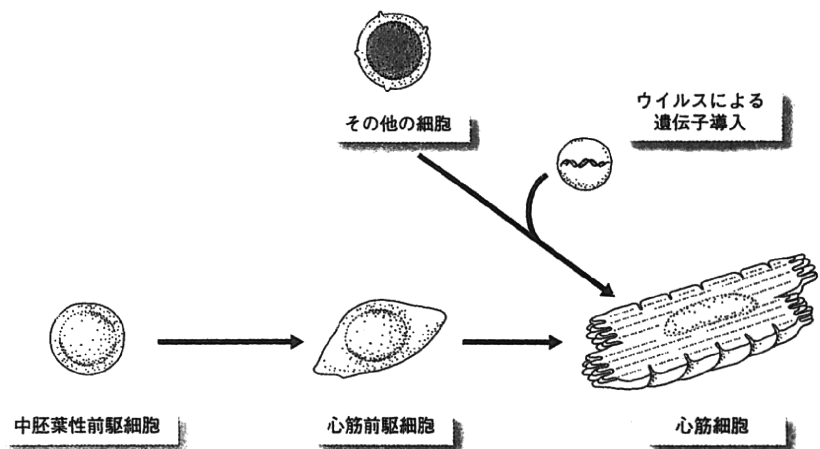


図2 ダイレクト・リプログラミングによる心筋分化誘導

筋細胞への発生・分化に多種多様な液性因子の関与が明らかとなった¹¹⁻¹⁷⁾。特にBmp, Noggin, Wnt, Dkk1, Igfbp-4といった液性因子は幹細胞から心筋細胞への分化誘導に重要な役割を果たしており、細胞の分化状態によって、心筋分化誘導の促進にも抑制にも働くことが報告されている。例えばBmpは胚性幹細胞の心筋分化誘導初期には抑制的に働き、後期には促進的に働く^{18,19)}。同様にWntは分化誘導初期で促進的に働き、後期では抑制的に働くことが知られている²⁰⁾。このように複数の液性因子を適当なタイミングに適量加えることで*in vitro*の心筋分化誘導効率は向上すると考えられる。

(1)ダイレクト・リプログラミング

近年、従来の液性因子を用いた手法とは異なったダイレクト・リプログラミングを用いた心筋分化誘導法が注目されつつある。ダイレクト・リプログラミングは、iPS細胞作製と同様に体細胞に特定の遺伝子を発現させ、特定機能を有する細胞へ分化誘導する概念である(図2)。発生7日前後のマウス胚から中胚葉分化予定領域を取り出して3つの遺伝子(クロマチン・リモデリング因子*Baf60c*, 転写因子*Gata4*と*Tbx5*)を導入したところ、この領域の一部が拍動し始め、心筋特異的な遺伝子が発現した²¹⁾。しかし、中胚葉分化予定領域以外の部位に3つの遺伝子を導入しても拍動は観察されなかった。このことから、この3つの遺伝子は中胚葉性細胞のみを心筋分化誘導する能

力を有すると予想される。しかし、現在のところリプログラミングの分子メカニズムは明らかにされておらず、細胞の癌化に対する安全性は不明である。1990年代に脚光を浴びた遺伝子治療は利益相反という大きな課題を投げかけたが、真摯な研究者によって粛々と歩が進められてきた。その技術が再び不全臓器再生という領域で大きな役割を果たす可能性があるという報告が続いている。

(2)心筋細胞の電気生理を

どうするか

しかし、心臓は力学的機関としての特性とともに、電気生理学的構造を有しており、ドナー細胞とホスト細胞間に伝導障害が生じた場合は、不整脈を引き起こす可能性があり、骨格筋芽細胞移植においては持続性心室細動の有害事象がきわめて高い確率で発生し、ICDの植込みがプロトコール上必須となったという事実がある。このような経緯からも、心筋細胞のみを純化する技術の開発が望まれている。

その1つがtetramethylrhodamine, methyl ester, perchlorate (TMRM)である。TMRMはミトコンドリアを特異的に染色できる。そこで心筋細胞に

多量に存在するミトコンドリアをこのTMRMで染色し、陽性細胞のみをマウス心臓に移植したところ、99%が心筋細胞に分化した²²⁾。この手法以外にも心筋細胞の特性を活かした純化方法が考案されつつある。

移植の方法

従来、心臓への細胞移植は、トリプシンなどで剥がした培養細胞を心筋梗塞部位にシリンジで打ち込んできた。トリプシン処理した培養細胞はバラバラに分離してしまうため、細胞間相互作用が消失してしまう。この結果、梗塞部位に生着した細胞には心筋特異的に発現する機能蛋白質gap junctionが観察されず、期待するほどの回復が望めなかった。そこで温度応答性培養皿*を用いて細胞間相互作用を維持したまま移植する技術が考案された。この結果、トリプシン処理した細胞より、高い機能回復が示された²³⁾。現在、すでに温度応答性培養皿上で培養した細胞の移植は行われており、優れた移植技術として国内外で評価されている。

用語解説

温度応答性培養皿

温度応答性ポリマー[Poly(N-isopropylacrylamide)]を培養皿の表面に固定したもの。この温度応答性ポリマーは、32℃以上で疎水性、32℃以下で親水性になるため、培養後32℃以下にすることによりトリプシン処理を行わず細胞をシート状に剥離できる。このため、細胞外基質の保持が可能となる。

おわりに

臨床応用をめざした細胞移植療法の「細胞源の選択」, 「分化誘導効率の向上」, 「移植の方法」についてそれぞれ述べてきた。これまで述べた知見や技

術は, 細胞移植療法におけるより安全でより効率のよい臨床プロトコルの改善へとつながり, そこで得られた知見はさらなる病態や分子メカニズムの理解へと進むポジティブ・フィードバックとなって, さらに新しい治療法

の開発へとつながっていくと期待される。最後にこの分野の研究の発展が心不全病態のさらなる理解につながり, ひとりでも多くの心不全患者の予後の改善と発病の予防, 新たな治療法の開発に結びつくことを切望する。

文献

- 1) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002.
- 2) Miyagawa S, Matsumiya G, Funatsu T, et al: Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation: report of a case. *Surg Today* 39: 133-136, 2009.
- 3) Sawa Y: Surgical regeneration therapy using myoblast sheets for severe heart failure. *Kyobu Geka* 60: 355-361, 2007.
- 4) Gojo S, Kyo S, Nishimura S, et al: Cardiac resurrection after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg* 83: 661-662, 2007.
- 5) Akutsu H, Cowan CA, Melton D: Human embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 418: 78-92, 2006.
- 6) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
- 7) 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.
- 8) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-776, 2003.
- 9) Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, et al: Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265: 262-275, 2004.
- 10) 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.
- 11) Frasch M: Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal *Dpp* in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374: 464-467, 1995.
- 12) Shiojima I, Komuro I: Cardiac developmental biology: from flies to humans. *Jpn J Physiol* 55: 245-254, 2005.
- 13) Wu X, Golden K, Bodmer R: Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene *wingless*. *Dev Biol* 169: 619-628, 1995.
- 14) Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, et al: Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 15: 316-327, 2001.
- 15) Schneider VA, Mercola M: Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15: 304-315, 2001.
- 16) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al: Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19: 1534-1536, 2005.
- 17) Zhu W, Shiojima I, Ito Y, et al: IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 454: 345-349, 2008.
- 18) Kami D, Shiojima I, Makino H, et al: Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE* 3: e2407, 2008.
- 19) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 607-611, 2005.
- 20) Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, et al: Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19812-19817, 2006.
- 21) Takeuchi JK, Bruneau BG: Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-711, 2009.
- 22) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al: Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 7: 61-66, Jan.
- 23) Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, et al: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium. *Transplantation* 80: 1586-1595, 2005.

細胞移植：心臓病における 臨床応用への潮流

五條理志^{1)*, 2)} 許俊賢^{1)**}

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科重症心不全治療開発講座 *特任准教授 **特任准教授

²⁾ 東京都健康長寿医療センター心臓外科

Summary

再生医療という用語は、2000年に使われ始めたばかりであるが、今や生物学や医療の世界にとどまらず、広く一般の方々にまで知られるようになっていく。なかでも心臓病への再生医療の臨床研究は非常に活発に行われており、1,000例を超える方々が臨床研究に参加している。しかし、細胞移植という方法による心臓再生療法は、研究によってはその効果が認められないものもあり、まだまだ解決されなければならない問題が数多く存在していることが明らかとなり、再生医療への過剰な期待が収まったようである。現在、臨床研究のsystemic reviewが複数行われ、安全性・実施可能性・有効性は確認され、継続して検討すべき項目が具体化されてきている。対象とされる疾患も、急性心筋梗塞から重症心不全にまで広がっている。

本稿では、世界および日本における心臓病に対する再生医療の臨床試験の現況を概観し、現在、筆者らがプロトコールを作成している再生医療と人工心臓治療を組み合わせた臨床研究の現状を報告する。

はじめに

細胞移植で心臓病を治療する研究が行われ始めて久しい。その間に、幹細胞生物学の著しい進歩があり、移植ドナー細胞として多くの細胞が候補にあげられている。再生不可能と考えられてきた心臓にも心筋幹細胞の存在が示唆され、実験レベルでは種々の細胞移植による不全心の機能改善が数多く発表されている。骨髄由来幹細胞・前駆細胞や骨格筋芽細胞においては、数多くのrandomized controlled trial (RCT)が行われている。ドナー細胞としては、体性幹細胞・ES細胞・iPS細胞があげられる。iPS細胞は開発されたばかりで、しばらくは研究が慎重に行われる必要がある。また、ヒトES

細胞は倫理上の問題の存在のため、日本では臨床に使用するための枠組み整備が行われているところである。アメリカではFDAが2010年7月30日にGeron Corp.からのヒトES細胞を用いた急性骨髄損傷に対するphase Iの臨床試験を承認し、大きな変化が現れている。一方、体性幹細胞には、骨髄および末梢血由来の幹細胞・前駆細胞、骨髄および脂肪組織由来の間葉系幹細胞、骨格筋芽細胞、心臓幹細胞・前駆細胞などがあげられる。NIHが提供する臨床研究登録サイトである“Clinical Trial Gov”にintervention: stem Cellを入力し、リクルートが進行中のchronic heart failureへの介入試験を

表1 現在進行中のchronic heart failureへの介入試験

研究者	試験デザイン	n	病態	左室駆出率	移植細胞		方法	相
R Simari	無作為プラセボ比較二重盲検	87	ICM	≤.40	BM-MNC	自己	Ten	II
N Noiseux	無作為プラセボ比較二重盲検	20	ICM	≥.25, ≤.45	BM-CD133*	自己	DI	II
J S de Lezo	非無作為非盲検	30	DCM	<.50	BM-MNC	自己	IC	II
A Zeiher	無作為プラセボ比較二重盲検	100	IHD	<.50	BM-MNC	自己	IC	I/II
W Sherman	無作為プラセボ比較二重盲検	20/150	CHF	≤.35	筋芽細胞	自己	Ten	II/III
G Gerstenblith	無作為容量比較二重盲検	45	ICM	≥.15, ≤.50	BM-MSC	自己	DI	I/II
A Hajula	無作為プラセボ比較二重盲検	60	ICM	≥.15, ≤.45	BM-MSC	自己	DI	II
J Roncalli	非盲検	10	ICM	<.35	BM-MSC	自己	Ten	I
D Skerrett	無作為単盲検	60	CM	<.40	BM-MSC	同種	Ten	II
J Hare	無作為プラセボ比較二重盲検	60	ICM	≥.20, ≤.50	BM-MNC or MSC	自己	Ten	I/II
J Hare	無作為非盲検	30	ICM	≥.20, ≤.50	BM-MSC	自己/同種	Ten	自己: I, 同種: II
E Marban	無作為容量比較非盲検	30	CHF	≥.25, ≤.45	CSC	自己	IC	I
R Botti	無作為非盲検	40	ICM	<.40	CSC	自己	IC	I
H Matsubara	非無作為非盲検	6	ICM	≥.15, ≤.35	CSC	自己	DI	I
D Aschelm	無作為プラセボ比較二重盲検	80	LVAD適応患者	N.D.	BM-MSC	自己	DI	II
G Raveendran	無作為プラセボ比較二重盲検	24	LVAD適応患者	<.30	BM-MNC	自己	DI	I

NIHが提供する臨床試験登録サイト“Clinical Trial Gov”に、search term: chronic heart failure, intervention: stem cellで検索し、現在進行中のtrialをまとめたものである。

ICM: 虚血性心筋症, DCM: 拡張型心筋症, BM: 骨髄, MNC: 単核球, MSC: 間葉系幹細胞, CSC: 心筋幹細胞, IC: 経冠状動脈, DI: 心外膜よりの心筋内注入, Ten: 心内膜よりの心筋内注入, LVAD: 左室補助人工心臓。

検索したものを表1に示す。初期の頃は、細胞分画の採取に引き続いて閉鎖系での処理を行ったうえで細胞移植を行うというスキームが、臨床研究として主流であった。最近では、移植可能な細胞の培養に必要な cell processing center の整備がどこの施設でも整ってきたことから、ドナー細胞は骨髄山由来単核球細胞から間葉系細胞へ、さらには心筋幹細胞・前駆細胞へとシフトしている。

対象となる心臓病は、初期の頃は急性心筋梗塞がほとんどを占めていた。その治療はカテーテルインターベンションとの併用を基本としていたが、プロトコルはまちまちで、幹細胞・前駆細胞移植の安全性・実行可能性は確認できたものの、効果に関しては有意差をもって有効と判定できないものも報告され、ブームとしての再生医療の熱を冷ますこととなったように思われる。その後、数多く行われてきたRCTのsystemic review

が複数の施設より報告され¹⁻³⁾、心機能改善の有効性が確認されたことは大きなmilestoneであった。最近では、心不全を対象とした細胞移植の臨床研究も大規模なRCTとして行われ始めており、重症の補助人工心臓(ventricular assist device: VAD)装着患者に対しても、最終的にはVADからの離脱を目指してのRCTが複数始められている。このような潮流のなかで、投与方法も初期には経冠動脈注入が多くを占めていたが、より有効な細胞の定着を目指して、カテーテルを用いた心内膜側からもしくは外科手術での心外膜よりの心筋内注入を用いるプロトコルが多くなっている。

本稿では、まず現在までの急性心筋梗塞における細胞治療の結果を概観し、現在進行中である慢性心不全を対象にしたRCTの状況をまとめ、最後に日本での心臓病への細胞移植プロトコルの具体例を提示したい。

I 急性心筋梗塞における再生医療

1 骨髄・末梢血由来幹細胞・前駆細胞移植

血液幹細胞や神経幹細胞の研究から体性幹細胞に関する多くの知見が蓄積され、幹細胞がその存在する臓器以外の機能細胞へ分化(可塑性)することが報告されるや、体性幹細胞を用いた細胞移植が多くの臓器で研究され始めた。心臓病を治療するには、骨髄もしくは末梢血に由来する単核球もしくはCD133⁺細胞、骨髄由来の間葉系幹細胞がRCTとして実施されてきた。急性心筋梗塞に対しての細胞移植は報告も多く、2006年頃よりそれらの試験を統合した形で解釈するために、systemic reviewが報告され始めている^{1~3)}。心機能の評価として、収縮期末期容量・拡張期末期容量・心筋障害面積・左室駆出率を、加重平均の差を使って統合シフォレストプロットで評価されており、収縮末期容量・拡張末期容量・心筋障害面積は均質なデータであり、細胞移植群が有意に有効な変化をもたらしたことを示していた。一方、左室駆出率はばらつきが大きいものの、細胞群におい

て3%程度の有意な改善があったことが、いずれのmeta-analysisでも示された。この左室駆出率のばらつきの大きさから、サブグループ解析が行われた結果、投与細胞数と改善率には有意な相関がみられ、加重平均の差は細胞数が多いほど駆出率の改善が大きいとの報告³⁾や、投与容量とも有意な相関があるとの報告²⁾もされている。もう一つの因子として、梗塞発症後から細胞移植までの時間は7日以前と以後での検討が行われているが、加重平均の差は7日以後のほうが大きな値を示した³⁾。これらは、まだより多くの事例の蓄積が必要であろう。安全性に関しては、どのreviewでも急性心筋梗塞における骨髄もしくは末梢血由来幹細胞・前駆細胞移植は6ヵ月のfollow-up期間におけるmobility/mortalityに有意な変化をもたらすことなく、心不全による再入院や心筋梗塞再発を減少させる傾向が指摘されている。骨格筋芽細胞移植にみられた不整脈の問題は、どのRCTにおいても報告されておらず、実験レベルで有害事象として懸念されていた細胞移植に伴う梗塞や異所性分化(骨化など)も報告されていない。

II 慢性心不全における再生医療

1 骨格筋芽細胞移植

心臓への細胞移植として最初に臨床応用されたのが骨格筋芽細胞である。臨床応用に至るまでに、動物実験において細胞の生着・筋管細胞への分化が確かめられ、不全心モデルにおいては移植局所およびグローバルな心機能の改善が、複数の施設から報告された。一方、移植された細胞が心筋細胞へ分化することはなく、ホスト心筋細胞とは構造的にも機能的にも独立した形で存在することが認められ、骨格筋芽細胞移植後に不整脈が生

じることが指摘されていた。2000年6月に培養自己骨格筋芽細胞移植の臨床第1例が施行され、続いて8つのphase I clinical trialが虚血性心疾患に対して行われ、多くの情報が提供された。いずれの研究でも有効性が示唆されたが、安全性に関しては致死性不整脈の問題がクローズアップされた。その後、左室駆出率が35%以下の重症心不全の虚血性心疾患の患者を対象に、多施設による二重盲検のRCT:MAGIC trialがヨーロッパで行われた⁴⁾。術早期の不整脈がコントロールに対して約2倍の発症率で、有効性に関しても有意な

改善を認められなかった。このRCTはGenzyme Corp.がスポンサーを務めて行われていた。現在、Bioheart Inc.がスポンサーとなっている虚血性心疾患への骨格筋細胞移植のRCTが進行中である。Phase IIのpart Iが終了し良好な結果が出ているとして、phase II/IIIへ進捗しているとホームページ上には記載されている。

2 間葉系細胞移植

中胚葉に由来する組織は、血球系細胞・血管・心臓・骨・軟骨・脂肪組織・骨格筋・腱・組織間充織（繊維芽細胞）などがあり、約130年も前にCohnheimによって間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の概念は提唱されている。再生医療という言葉が使われるようになってからは、ES細胞が倫理的問題で臨床応用への距離があり過ぎることを背景に、体性幹細胞の代表として間葉系幹細胞の大きなポテンシャルがクローズアップされ、それにかかわる報告が著しく増加した。MSCは、主に骨髄由来が対象となることが多かったが、最近では臍帯・羊膜などの胎児関連組織からの報告も増加している⁵⁾。これらの細胞は、骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞、さらには心筋細胞・血管内皮細胞・肝細胞・神経細胞にも分化することが可能で、細胞移植による効果もさまざまな臓器で報告されるようになった。安全性に関しては、間葉系細胞が多分化能を有していることより、異所性分化や細胞外マトリックスの過剰産生が危惧されてきたが、dose escalation studyの結果は移植細胞数に依存する異所性分化が起こることが示され、適正な細胞数を設定することで異所性分化は回避できると報告されている⁶⁾。現在のところ、慢性心不全に対する間葉系細胞移植のRCTが数多く現在進行中であり、表1に示している15のRCTのなかで7つが間葉系幹細胞を用いたRCTであった。

これらのなかにはバイオベンチャーがかかわっ

ていることが多いが、スポンサーとして正式に登録されているものはAngioblast System一社だけであった。この領域では、自己細胞でのビジネスモデルを作り上げることは、きわめて困難であるとの認識を反映して、同種細胞を“off-the-shelf(棚卸)の細胞製剤として販売することを目指しているようである。表には出ていないOsiris Inc.という会社は、この領域のバイオベンチャーの最古参の1つでこのモデルを最初に提唱した会社であり、骨髄移植におけるGVHDやクローン病を対象に同種MSC(商品名: prochymal)のPhase IIIのRCTを現在実施している。このprochymalは再生医療では初めての細胞製剤として、FDAからの承認に最も近いと思われる(細胞製剤としての初めての商品は、前立腺がんに対する樹状細胞製剤(商品名: provence)で、2010年4月29日にFDAによって承認された)。この製剤を用いた心臓病に対する開発も進行中で、現在は急性心筋梗塞を対象としたphase IIのRCTが動いている。一方、アカデミアでの間葉系幹細胞移植のドナー細胞としては、そのほとんどが自己であり、免疫系の関与を除外して純粹に細胞移植の安全性と有効性を確認するためのデザインとなっている。投与方法では、カテーテルを用いた心内膜側もしくは外科的な心外膜よりの心筋内注人が相半ばしていて、付着系細胞という性質より冠動脈注のプロトコルは登録されていなかった。細胞製剤という新しい概念の製剤が確立しつつある現在、自己・同種ともにドナー細胞としてRCTが進行していることは、治療の選択肢が増え、多くの異なった病態が存在する臨床においては、大きな価値があると思われる。

3 心筋幹細胞・前駆細胞移植

最近まで、心筋細胞は完全に分化し分裂を休止した細胞であるがため、心臓はダメージを受けても修復されることのない臓器だと長い間広く考え

られていた。ところが、血液・皮膚・脳・肝臓・消化管・骨格筋といったさまざまな臓器から幹細胞の存在が証明されており、心臓にも幹細胞システムが存在する可能性が熱く議論されている。マーカーとしてはc-kit, Sca-1, isl-1などが報告されている。Lin⁻/c-kit⁻細胞⁷⁾は、心房と心尖部に $1/1 \times 10^4$ 程度の頻度にみられ、適切な細胞培養下では1年以上増殖を続け、表現型も維持し続けることが可能と報告された。Sca-1陽性細胞⁸⁾は幹細胞としての特徴をもっているが、c-kit⁻, CD34⁻であり、心筋細胞のうちの約0.3%で心筋転写因子を発現しているが、心筋細胞構成タンパクは発現していない。さらに、幹細胞がsphereと呼ばれる細胞塊を形成する性質を利用し、心筋幹細胞を単離することが可能であることが複数の施設より報告された^{9, 10)}。いずれの細胞も細胞移植により心機能改善効果があると報告されている。

この最後の方法で心筋幹細胞の存在をヒトで確認した京都府立医科大学の松原らは、cardiosphereを形成する心筋幹細胞を用いた心筋再生治療を行うべく、ブタを用いたランダム化した前臨床試験を行い、8.5%の左室駆出率の改善と30%に及ぶ梗塞領域の縮小化を確認した¹¹⁾。現在、世界では松原らを除くと2つのグループがこの心筋幹細胞移植のRCTを行っている。いずれのグループも投与方法が経冠状動脈内投与であり、その生着率の低さが懸念される場所である。骨髄細胞移植に際し、投与ルートによる生着率が検討された研究によると、心筋内移植では11%、冠状動脈からの移植が2.6%、冠状静脈からの移植では3.2%であったと報告されている。しかし、生着率がよいとされている心筋内移植でも、24時間以内に移植された細胞の多くは時間とともにアポトーシスに陥り、総投与細胞数の2.1%にまで減少するとの報告もある。これに対して、松原らはbasic FGFの徐放を行うためのgelatin sheetを作成して、移植部位を被覆することで細胞生着をサポートし、

アポトーシスを有意に抑制することを可能とした。この工夫が、大動物において上記のような良好な改善効果を示した一因と考えられる。

4 心臓病への再生医療プロトコール： 日本の現状

現在、ヒト幹細胞を用いた臨床研究の指針に合致した心臓病への臨床研究は3つあり、大阪大学からCD133⁺細胞を用いたものと骨格筋芽細胞シートを用いたもの、それに松原らの心筋幹細胞を用いたもの(ALCADIA)である。共同研究者としてALCADIAに参画していることより、2010年より開始された臨床研究の概要を述べる。当該研究は文部科学省の橋渡し推進研究にてサポートされており、中核機関として京都府立医科大学、参画機関として旭川医科大学・東京大学・神戸臨床情報研究センターで構成され、CABGと細胞移植を併用するアームと左室補助人工心臓(left ventricular assist device : LVAD)装着患者を対象とするアームの2つのプロトコールを有している。現在、前者のアームの第I相(6症例)を2010年より開始している。対象は心筋梗塞後心不全でCABGを予定されている左室駆出率35~15%の患者である。スキームはCABG前にバイオプシーにて右室中隔より心筋サンプルを採取し、good manufacturing practiceに準ずるcell processing centerにて、その組織から心筋幹細胞を増殖させ、CABGの手術のときに心外膜側より心筋内注入を行うとともに、注入部位をbasic FGF gelatin sheetで被覆するものである。2010年10月現在、2症例が実施され、いずれの患者もすでに元気に退院されている。安全性はとくに慎重に検討され、移植後4週間後のデータを安全管理委員会にて審査された後に、次の症例の登録に入るといった形が取られている。現時点では有害事象は起こっていない。有効性に関しては、データ集積中であり近く報告する予定であるが、良好な結果が出始めている。

III 重症心不全への再生医療

1 VAD治療の日本の現状

1990年に体外設置型LVADである東洋紡LVADとゼオンVADが製造販売承認を受け、1994年に保険償還となっている。当初は体外循環離脱困難や術後低心拍出量症候群に適応されており、長期生存を望むことはきわめて難しかった。1996年には埋込み型VADであるNovacorLVASが臨床試験を開始し、2001年に製造販売承認を取得したが、保険償還には2004年までかかったことおよび厳しい適応基準の2点により、2006年には日本のマーケットから撤退した。また、ゼオンVADも2005年にはマーケットを形成できずに姿を消している。現時点で、日本で保険償還される長期使用可能なVADは、体外設置型東洋紡VADのみである。

このような背景をもとに、次世代型植込み型VADの臨床導入に向けて、2006年末に関連学会から厚生労働省に「医療ニーズの高い医療機器等の早期導入」として、HeartMate XVE、EVEHEART、DuraHeartおよびJarvik2000の4機種 of 植込み型VADが要望された。2001年に臨床治験が行われたThoratec HeartMateXVEは、2009年11月18日ようやく承認がなされたが、今もってVAD装着手術料の保険診療点数は低く(45,000点)、月々の維持費用も企業が収益が取れないほど低く(6,000点/月)設定されている。さらに、HeartMate XVEに関しては、すでに後継機であるHeartMate IIが世界の主流となっているというような状況で、デバイス・ラグの問題は深刻である。この状況を克服するために、関連学会を中心に7万人を超える署名による植込み型VADの早期承認を求めて、厚生労働大臣宛に嘆願書が提出された。今後、上記のEVEHEART、DuraHeart、Jarvik2000に関しては、2011年の早い時期で製造販売承認がなされ

る見込みのようであり、関係の方々の多大なる努力があって、大きな一歩が踏み出された。


2 VAD装着患者への再生医療

2005年から2007年にかけて、筆者らは前任の埼玉医科大学で4例の骨髄単核球移植をLVAD装着患者に行った¹²⁾。いずれも虚血性心筋症で、LVAD装着から全身状態が回復した時期に骨髄が採取され、閉鎖系にて単核球が分離濃縮され、カテーテルを用いてLVAD装着手術のときになされたCABGのバイパスグラフトより経冠状動脈にて投与された。6カ月のfollow-up期間において、細胞移植にかかわる有害事象はなかった。埼玉医科大学において、それ以前には12例の虚血性心筋症に対してLVADが装着されたが、1例も自己心の自然回復を認められていなかった。細胞移植を実施した4症例のなかで1症例で著明な心機能回復を認め、LVADからの離脱が可能であった。その患者は5年を経過して左室駆出率は40%弱で安定して推移しており、外来通院を行いながら元気に日常生活を送っておられる。

上記臨床研究からは、有効性に関しては何ら結論的なものを語るようなものではなく、よりよい再生医療のプロトコルが必要であると考え、現在、心筋幹細胞をドナー細胞としてbFGF gelatin sheetを併用して、LVAD装着患者へのプロトコルを作成中である。基本的なスキームは上記臨床研究と同様で、LVAD装着と細胞移植を同時ではなく十分な時間において、ステップバイステップで心機能評価を行いながらプロトコルを進めることとし、それによって細胞移植の有効性を明確に示すことができるアームにしていきたいと考えている。脳死移植が法改正後、著明に増加はしているが、心臓移植で重症心不全の患者数を賄えることは到底なく、また、LVAD治療の

なかで心臓移植の適応から外れた患者などへの、
自己心回復によるVAD離脱(bridge to recovery)

の重要な方法として、細胞移植による再生医療が
果たす役割は大きいと考えている。

 参考文献

- 1) Hristov M, Heussen N, Schober A, et al: Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J Cell Mol Med*. 10: 727-733. 2006.
- 2) Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, et al: Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 50: 1761-1767. 2007.
- 3) Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, et al: Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J*. 29: 1807-1818. 2008.
- 4) Menasche P, Alfieri O, Janssens S, et al: The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 117: 1189-1200. 2008.
- 5) Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, et al: Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res*. 106: 1613-1623. 2010.
- 6) Gojo S, Gojo N, Takeda Y, et al: *In vivo* cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 288: 51-59. 2003.
- 7) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 114: 763-776. 2003.
- 8) Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al: Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 279: 11384-11391. 2004.
- 9) Messina E, De Angelis L, Frati G, et al: Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 95: 911-921. 2004.
- 10) Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, et al: Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 352: 635-641. 2007.
- 11) Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, et al: Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 52: 1858-1865. 2008.
- 12) Gojo S, Kyo S, Nishimura S, et al: Cardiac resurrection after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg*. 83: 661-662. 2007.

組織工学と再生医療

*1 東京大学大学院医学系研究科重症心不全治療開発講座, 東京都健康長寿医療センター病院心臓外科,

*2 東京都健康長寿医療センター研究所老年病研究チーム血管医学研究,

*3 国立成育医療研究センター研究所生殖・細胞医療研究部

五條 理志*1, 豊田 雅士*2, 梅澤 明弘*3

Satoshi GOJO, Masashi TOYODA, Akihiro UMEZAWA



1. はじめに

疾患は、生体内の細胞や臓器の機能が障害されたり破綻したりした状態である。この障害された、もしくは欠損した組織や臓器に対して、その機能を補ったり、すべてを代行したりできないかと、長年にわたり研究が進められてきたのが人工臓器である。ここにヒトの細胞や組織を用いて臓器を再生する新しい「再生医療」研究の進展が加わり、組織工学として新たな局面が起こってきている。

ヒトの体は約60兆個の細胞からなるが、元々は卵と精子が出会い受精した一つの受精卵に由来する。その受精卵が細胞分裂を繰り返しながら様々な細胞を生み出し、それらがお互いに連携しながら様々な組織・臓器を形作り、一つの個体を築き上げていく。ゲノム情報がほぼ解読され、体の仕組みづくりに関与する遺伝子も明らかになりつつも、この壮大な発生過程は未だ不明な点が多く残されており、完全に理解するところまでには至っていない。しかし、この発生機構は臓器・組織の恒常性維持・再生機構と強く関連しており、その機構を疾患の治療に利用する再生医療は大きな広がりを見せている。

2. 組織工学

生体組織は細胞のみから構成されているわけではなく、生体での細胞の機能や恒常性を保つためには細胞周囲の環境が重要となる。中でも細胞外マトリックスは、動的で機能的な役割を担っており、例えば細胞接着における足場(基底膜やファイブロンectin)や増殖因子などの保持・

提供する役割(ヘパラン硫酸)が知られている。こうした細胞外マトリックスを操作することによって組織や細胞を制御し、再生医療などへ応用する技術開発が進められている(図1)。

最近、各種の細胞増殖因子が創傷治癒過程に重要な役割を果たしていることが明らかになり、難治性の皮膚潰瘍に対する有効性が期待されている。一部の増殖因子については実際に臨床使用もされている。

一方、増殖因子の作用は非持続性でもある。ここで注目されたのが組織損傷に伴って創部に必ず放出されるフィブリンであり、これを組織再生材料として応用する研究が最近増えている。例えばフィブリン結合ドメインと上皮細胞増殖因子(EGF)との融合タンパク質を、表皮創傷モデルとした培養システムに添加することで、そこから放出されたフィブリンと結合した増殖因子が、周囲の細胞を刺激して増殖することによって創傷部位を治癒することが報告されている。このような治癒過程は増殖因子が単独で働くよりも、フィブリンと結合することで安定化し、持続的に細胞を刺激することによって起こったと考えられる。このことは、細胞外マトリックスと増殖因子の組み合わせを変えることによって、様々な状況に対応した治療薬として応用可能であることを示唆していると言える。

また、人工血管のうち、冠動脈などの小口径人工血管は血栓で閉塞しやすく、その開発が遅れている。これを防ぐには早期の内皮化で血栓が付着しない移植用血管が必要となるが、ここでも細胞外マトリックスの一つであるコラーゲンと結合するドメイン(CBD)と増殖因子との融合タンパク質の利用が考えられ、CBD-HGF(肝細胞増殖因子)が内皮細胞の増殖を促進して有効に働くことが示されている²⁾。さらに、こうした融合タンパク質は細胞外マトリックスの生分解性のシート上に載せることも可能であり、創

■ 著者連絡先

東京大学大学院医学系研究科重症心不全治療開発講座

(〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1)

E-mail. satoshigojo-tky@umin.ac.jp