

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、細胞の精製方法や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)	Hendrikx, 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	2.5×10^9	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細胞) 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囲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氣的に接合せず、骨格筋が存在するとリエント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プ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ってよい。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ない。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-

- diomyocyte lineages. *Nature* **433** : 647-653, 2005
- 6) Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, et al : Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* **170** : 1135-1146, 2005
 - 7) Fukuda K, Yuasa S : Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* **98** : 1002-1013, 2006
 - 8) 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
 - 9) Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al : Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* **109** : 1215-1218, 2004
 - 10) Tateno K, Minamino T, Toko H, et al : Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* **98** : 1194-1202, 2006
 - 11) Folkman J : Angiogenesis ; an organizing principle for drug discovery ? *Nat Rev Drug Discov* **6** : 273-286, 2007
 - 12) Meluzin J, Janousek S, Mayer J, et al : Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* **29** : 2007 [Epub ahead of print]
 - 13) Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, et al : Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair ; a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* **167** : 989-997, 2007
 - 14) Meluzin J, Mayer J, Groch L, et al : Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction ; the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* **152** : 975.e9-e15, 2006
 - 15) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al : Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction ; final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* **27** : 2775-2783, 2006
 - 16) Tatsumi T, Ashihara E, Yasui Y, et al : Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* **71** : 1199-1207, 2007
 - 17) Choi JH, Choi J, Lee WS, et al : Lack of additional benefit of intracoronary transplantation of autologous peripheral blood stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* **71** : 486-494, 2007
 - 18) Ahmadi H, Baharvand H, Ashitiani SK, et al : Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133⁺ enriched bone marrow cells after myocardial infarction. *Curr Neurovasc Res* **4** : 153-160, 2007
 - 19) Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al : Intramyocardial delivery of CD133⁺ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease ; safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* **133** : 717-725, 2007
 - 20) Losordo DW, Schatz RA, White CJ, et al : Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina ; a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* **115** : 3165-3172, 2007
 - 21) Cleland JG, Coletta AP, Abdellah AT, et al : Clinical trials update from the American Heart Association 2006 ; OAT, SALT 1 and 2, MAGIC, ABCD, PABA-CHF, IMPROVE-CHF, and percutaneous mitral annuloplasty. *Eur J Heart Fail* **9** : 92-97, 2007
 - 22) Gavira JJ, Herreros J, Perez A, et al : Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction ; 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* **131** : 799-804, 2006
 - 23) Ince H, Petzsch M, Rehders TC, et al : Transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in postinfarction patients with severe left ventricular dysfunction. *J Endovasc Ther* **11** : 695-704, 2004
 - 24) Chen S, Liu Z, Tian N, et al : Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* **18** : 552-556, 2006
 - 25) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126** : 663-676, 2006
 - 26) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
 - 27) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26** : 101-106, 2007

心臓の再生

田村 雄^{1,2} 福田 恵²

The review of basic studies about the cardiac stem cell and regenerative medicine

^{1,2}Yuichi Tamura, ²Keiichi Fukuda

¹Cardiopulmonary Division, Department of Internal Medicine,

²Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics,
Keio University School of Medicine

Abstract

The availability of enough cardiomyocytes to transplant as a cardiac tissue is able to read the achievement of regenerative cardiac medicine. Tissue derived stem cells, embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells are all potential cell sources. Several types of cardiac tissue stem cells have already been reported, and we describe about the characteristics and multipotency of these tissue stem cells with an accurate comparison. ES cells and iPS cells are highly proliferative and suitable for mass production, and efficient protocols for selective cardiomyocyte induction using ES cells and iPS cells are also significant. On the other hand, these cells still have several issues about purification and safety as well as ethical problems.

Key words: cardiac tissue stem cell, ES cell, iPS cell, side population cell

はじめに

近年 LVAD などの機械的心臓補助装置が内科治療に抵抗性の重症心不全患者や心筋症の予後を改善する手段として目覚ましい進歩を遂げているが、根本的な治療法は心臓移植に限られてしまうため、我が国においてはドナーの絶対的な不足が依然として大きな問題である。そこで末期心不全に対する新たなブレイクスルーとして期待されているのが心筋再生医療であり、京都大学の山中らによる iPS 細胞作成などを契機として近年より一層の盛り上がりを見せている。

本稿では心筋再生医療の基盤的研究ともいえ

る心筋前駆細胞および ES/iPS 細胞の心筋分化誘導に関する研究の現状と展望に関して触れていきたい。

1. 心筋前駆細胞

近年まで永らくの間、成体における心臓は再生する能力をもたない臓器であるとされてきた。しかし 2001 年 Orlic らにより、マウスの心筋梗塞周辺部に移植された骨髓造血幹細胞が心筋細胞や血管内皮細胞および血管平滑筋に分化して梗塞後の心筋を再生する¹⁾こと、更に骨髓幹細胞を末梢血に動員する作用をもつ G-CSF や SCF を心筋梗塞モデルマウスに投与することで、死

¹慶應義塾大学医学部 循環器内科 ²同 再生医学教室

表 1 各心筋前駆細胞の特徴

	多分化能	自己拍動能	マーカー
SP/神経堤由来細胞	あり	確認	c-kit ⁻ , Sca-1 [±]
Sca-1 陽性細胞	あり	確認	CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , Lin ⁻
c-kit 陽性細胞	あり	未確認	c-kit ⁻ , CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , Lin ⁻
isl-1 陽性細胞	なし	未確認	Sca-1 ⁻ , c-kit ⁻

亡率の減少および心機能の改善を認めることが報告された²⁾。これらの報告により、体性幹細胞を傷害心筋に移植・動員することで心筋細胞が再生される可能性が示唆され、心筋に分化する能力をもつ内在性の前駆細胞の研究が進められた。その結果、生体内においてはこれまでのところ①SP(side population)細胞、②Sca-1陽性細胞、③c-kit陽性細胞および④islet-1(isl-1)陽性細胞の4種類が内在性心筋前駆細胞の特性をもっていることが示されている(表1)。各々は心筋前駆細胞としての特性をもちつつ、相互に異なる性質の独立した細胞群であり、現在までのところ造血幹細胞のように1つの細胞集団に集約はされていない。

a. SP細胞

SP細胞は細胞表面にATP binding cassette transporter (Abcg2)をもちHoechst33342に非染色性の細胞群であり、Pfisterの報告³⁾によるとCD31⁻のSP細胞を心筋細胞と共培養することで高率に心筋に分化させることができる。またTomitaらは心臓内のSP細胞を無血清・EGF/FGF-2存在下で培養するとcardiosphereを形成し、神経前駆細胞の特性として認知されているNestin・Musashi-1・MDR-1・p75NGFR受容体のいずれも陽性であるという特徴をもつ細胞群が得られることを報告した⁴⁾。更にこれらの細胞群は発生段階において神経堤より動脈幹および流出路に遊走し(図1)、心筋のみならず神経ニューロン・グリア・血管平滑筋に分化する多分化能をもっており、神経堤由来の多能性幹細胞としての性質を維持している。また成獣の心筋組織内において神経堤由来の細胞群が心筋として存在することが認められることから、生体内においても心筋の前駆細胞として機能し

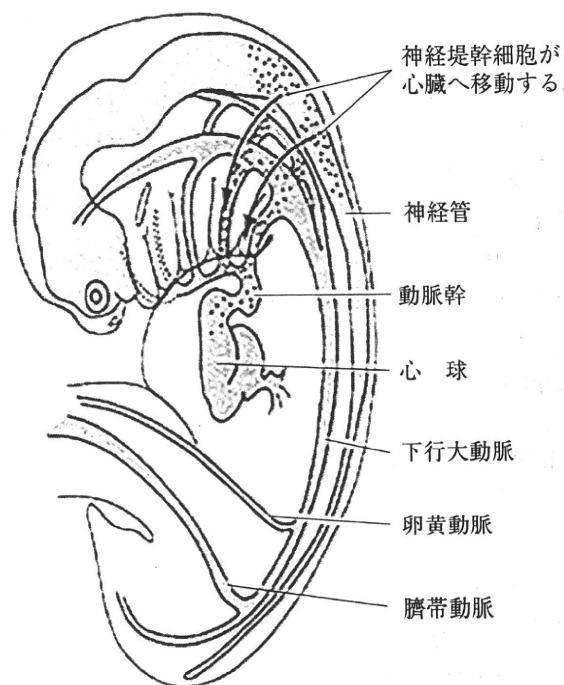


図1 心臓神経堤細胞の心臓への遊走

ていることが示されている(図2)。今後の課題としては、この神経堤由来の細胞群が心筋障害時の心筋細胞再生にどのように関与しているかを解析していくことで、この細胞群の生体内における役割を明確にしていくことがあげられる。

b. Sca-1陽性細胞

Sca-1陽性細胞はOhらの報告によると^{5,6)}、c-kit⁻・CD34⁻・CD45⁻の特性をもち、成獣マウスの心臓内に存在する細胞群で、心筋転写因子を発現している。また*in vitro*で5-azacytidine処理やオキシトシン添加を行うことによって心筋収縮タンパク質の発現が認められるようになるという性質をもつ。更にマウスの心筋虚血再灌流モデルにおいてSca-1陽性細胞を経静脈的に投与したところ、梗塞巣境界領域にhoming

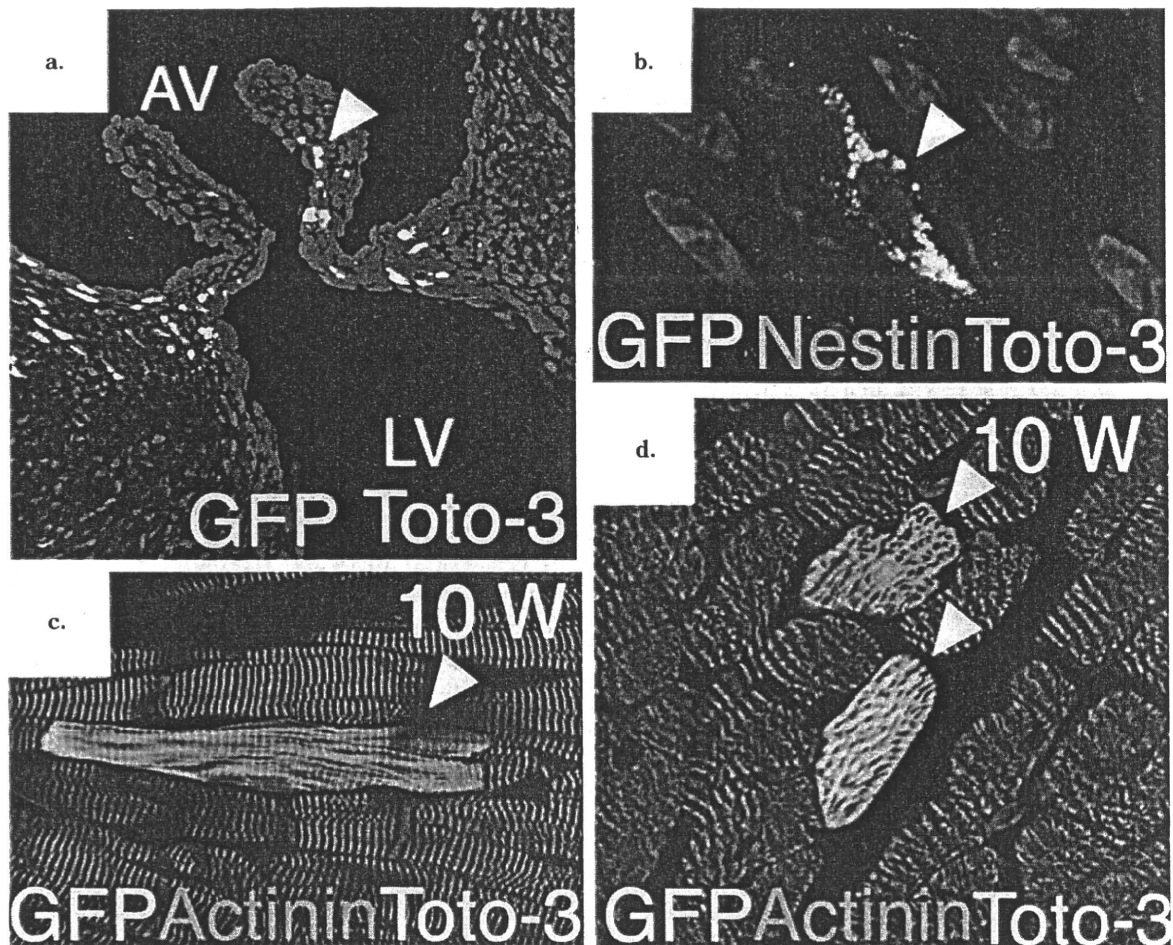


図2 Cre-Lox法を用いた神経堤細胞の標識化と心筋への局在

神経堤由来細胞がaのように心臓弁に、もしくはc, dのように成熟心筋において存在しており、またbのように心臓内において神経堤幹細胞マーカーを発現しているものも認められる。(文献⁴⁾より引用)

することで生着したと報告されている。しかしヒトにおいてはSca-1に相当するマーカーは発現しておらず、ヒトでの応用は期待できないという問題点をもつ。

c. c-kit 陽性細胞

c-kit 陽性細胞は生体の心筋間質内に存在するc-kit・Sca-1・MDR-1 陽性の特徴をもつ細胞群であり、成獣ラットにおいて心筋細胞10万個に1個ほどの割合で存在するとBeltramiらは報告している⁷⁾。またこの細胞群をフローサイトメトリーを用いて単離したものは継代可能であり、心筋構造をもつ細胞に分化する能力をもつ。c-kitはヒトでも存在するため、臨床応用に期待がもたれるが、分化効率および自己拍

動能が得られないなどの問題もあり、現在のところヒトでの応用には至っていない。

d. islet-1 陽性細胞

islet-1(isl-1)はもともとLIMホメオドメイン転写因子として同定されたものであり、isl-1 陽性細胞は胎仔期に2次心臓発生領域に存在し、c-kit・Sca-1 陰性でSP細胞の特性ももたない細胞群である。Laugwitzらは新生仔マウスよりisl-1 陽性細胞を単離して心筋細胞と共培養することで心筋に分化すると報告している⁸⁾。isl-1 陽性細胞はこれまで報告されている細胞群とはオーバーラップしない細胞群であるため、その特性に関する更なる解析が期待されるが、一方で出生後には急速に減少して成獣にはほとんど

表2 これまでに報告された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ら	J Mol Cell Cardiol 29 : 1525-1539, 1997.
transforming growth factor β_1	Behfarら	FASEB J 16 : 1558-1566, 2002.
fibroblast growth factors	Dell'Eraら	Circ Res 93 : 414-420, 2003.
dynorphin B	Venturaら	Circ Res 92 : 623-629, 2003.
ascorbic acid	Takahashiら	Circulation 107 : 1912-1916, 2003.
nitric oxide	Kannoら	Proc Natl Acad Sci USA 101 : 12277-12281, 2004.
fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2	Kawaiら	Circ J 68 : 691-702, 2004.
Wnt11	Teramiら	Biochem Biophys Res Commun 325 : 968-975, 2004.
PP2(a Src family kinase inhibitor)	Hakunoら	J Biol Chem 280 : 39534-39544, 2005.
Wnt3a/Wnt inhibitor	Naitoら	Proc Natl Acad Sci USA 103 : 19812-19817, 2006.

ど存在しないという性質ももっており、その分化能や増殖能力に関する更なる検討が期待される。

e. 今後の課題

このように心筋前駆細胞として各々に特徴的な4種類の細胞群が提唱されているが、いずれの細胞群も現在のところ唯一絶対的なものではなく、各々に問題点も持ち合わせている。一方でHsiehらは前駆細胞が正常に老化するマウスの心筋細胞の形成に寄与することはないが、損傷後の新しい心筋細胞形成には参加していることを報告⁹⁾しており、確かに生体においても心筋細胞がturn overを行っていることが示されている。したがってこれらの前駆細胞群の中で、どの分画のものが各々どのように心筋細胞の再生に関与しているのかを明らかにしていくことが今後の課題であると考えられる。

2. ES細胞

胚性幹細胞(ES細胞)は1981年にEvansらによってマウスのES細胞として初めて樹立された。初期のES細胞はノックアウトマウスを作成するために用いられていたが、一方でES細胞を移植すると奇形腫を生じ、*in vitro*で様々な組織の細胞に分化する能力があることから、その多彩な分化能に注目が集まるようになり、1998年のヒトES細胞の樹立を契機に心筋細胞再生・移植への期待が急速に高まってきた。そ

の後様々な薬剤・因子を添加することでES細胞から心筋細胞への分化誘導が試みられてきた(表2)が、いずれも満足のいく分化誘導効率を得ることができなかった。

Yuasaら¹⁰⁾は心臓発生における重要なシグナルであるBMPシグナルに着目した。BMPファミリーは心臓発生の初期より細胞の分化・増殖・移動・アポトーシスに関与しており、BMPファミリーの各因子が発生段階においてantagonistにより制御を受けることで、適切なタイミングで適切な刺激を与えられるように調整されている。そしてこのBMP antagonistによる各BMPシグナルのon/offを心臓発生の各段階で詳細に検討した結果、BMP antagonistの一種であるNogginが心臓発生の際に強く発現していることがわかった(図3)。そこでES細胞においても分化誘導の初期段階で一過性にNogginを添加し、生体と同様にBMPシグナルを低下させたところ、自己拍動する心筋細胞を高率に分化誘導することができた。またNoggin以外のBMP antagonistでも同様の結果を得ることができ、これらのことからBMPシグナルは心臓発生において重要な因子であるが、一方で一過性に抑制されることも心筋細胞への分化誘導には必要であると考えられる。

以上のようにES細胞からの効率的な分化誘導法が発見されたことに加え、2001年にWakayamaらにより体細胞由来の核を用いた核

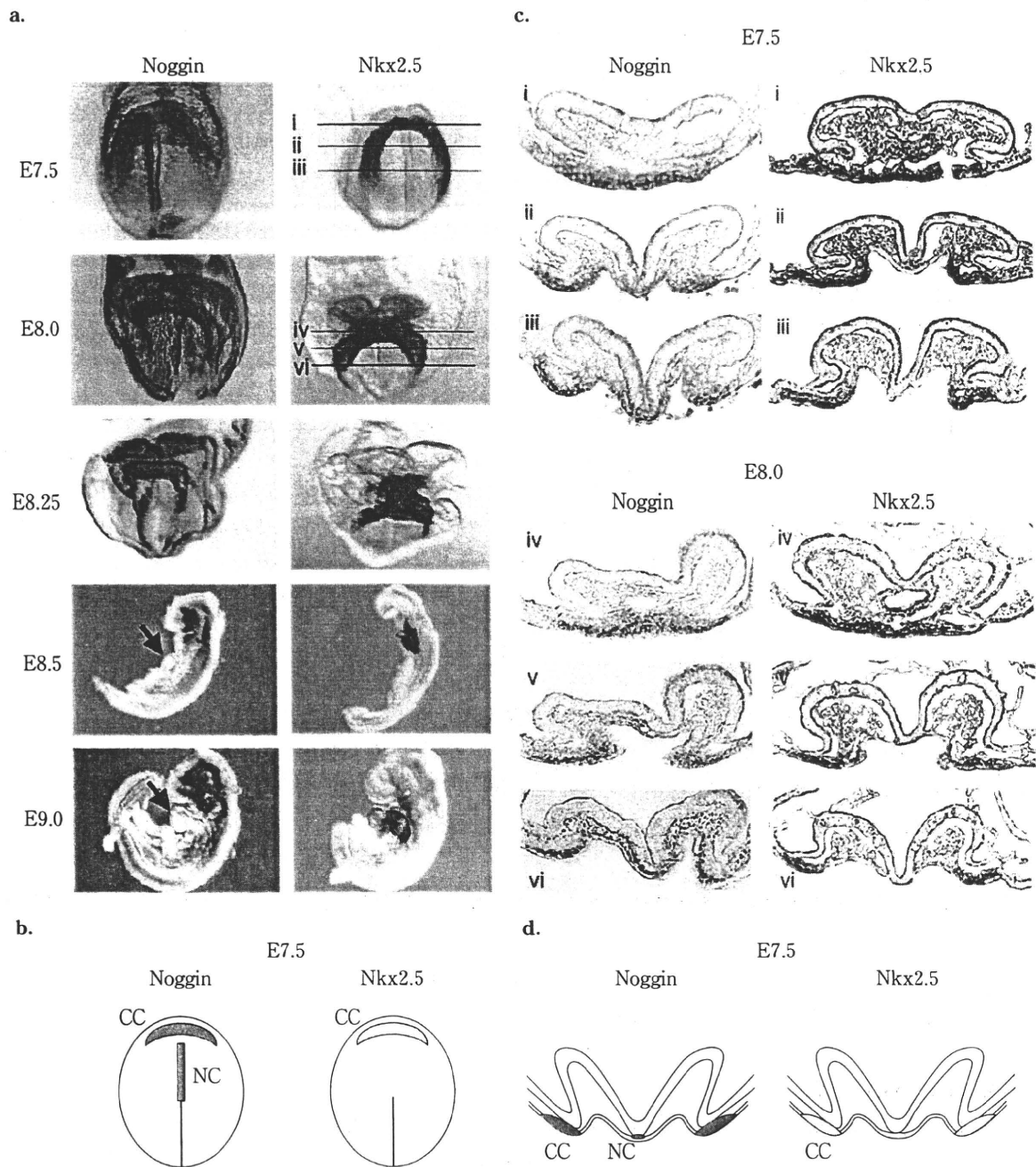


図3 心筋細胞の発生領域におけるNogginの発現(文献¹⁰⁾より引用)

移植の手法によるマウスES細胞の作成方法が報告された¹¹⁾ため、ES細胞による心筋細胞移植における懸案であった拒絶反応の問題も克服されることが期待される。

臨床応用に向けた今後の課題としては、多分化能をもつES細胞が心筋細胞移植時に残留している場合に移植後奇形腫を起こす可能性が懸念されるため、心筋細胞に分化誘導したES細胞

からどのようにして心筋細胞のみを高純度で抽出するかの技術の確立が期待される。更に現状においてはES細胞より誘導した心筋細胞は生体内に移植された後にほとんどが死滅してしまうことから、移植細胞が効率的にレシピエントに生着するティッシュエンジニアリングの発展も今後の大きな課題である。また胚細胞をソースとするES細胞のもつ生命倫理的問題も臨

床応用においては克服すべき懸案となっている。

3. iPS細胞

前述したようなES細胞のもつ倫理的問題を克服する技術として期待されているのがiPS細胞(induced pluripotent stem cells: 人工多能性幹細胞)である。2006年Takahashiら¹²⁾はマウスの線維芽細胞に4つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)を導入することでES細胞のように分化多能性をもつiPS細胞を樹立した。更に2007年には同グループがヒトにおいてもマウスと同様に線維芽細胞にOct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4の4つの遺伝子を導入することでiPS細胞を作成することができると報告した¹³⁾。また時を同じくしてYuら¹⁴⁾もOCT4, SOX2, NANOG, LIN28という異なる4つの遺伝子を線維芽細胞に導入することで、同様にiPS細胞を樹立することに成功しており、今後国際的競争が更に激しくなると考えられる。心筋細胞についても既に心筋構造タンパク質を発現し自己拍動能をもつ心筋細胞が誘導可能であることが報告されており、ごく近い将来にES細胞同様に分化効率の高い手法が樹立されることが期待される。

またiPS細胞の技術はES細胞において懸念されてきた胚盤胞の喪失による生命倫理的問題を克服することができるため高い国際的注目を

集めている。一方で樹立時にがん遺伝子導入を行っているため、移植後の発がんのリスクがある点に関しては依然として克服されていない。

したがって今後の臨床応用に際しては、ES細胞と同様にいかに分化誘導した心筋細胞のみを高純度で精製し移植することができるかという発がんリスクをゼロに抑える基盤的研究の発展が不可欠である。

おわりに

これまで心臓前駆細胞およびES/iPS細胞研究の現状と課題を述べてきたが、いずれの系においても再生医療として自己の心臓の代替となる大きな心臓組織を作成するまでには様々な課題を克服する必要がある。もちろん現在においても心筋細胞への分化誘導の研究に関しては、基盤的研究となる生体内の前駆細胞からES細胞およびiPS細胞の心筋分化誘導と純化技術まで様々な角度から積極的に進められている。折しも2007年の後半よりiPS細胞が世界中の注目を集めるようになり、再生医療には再び熱い視線が注がれるようになっている。それを契機として更に基盤的研究を推進していくことで、近い将来における心筋組織再生の実現を可能にしていくことができると期待できるのである。

■ 文 献

- 1) Orlic D, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001.
- 2) Orlic D, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10344-10349, 2001.
- 3) Pfister O, et al: CD31⁻ but Not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 97: 52-61, 2005.
- 4) Tomita Y, et al: Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170: 1135-1146, 2005.
- 5) Oh H, et al: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12313-12318, 2003.
- 6) Matsuura K, et al: Adult cardiac Sca-1⁺ positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279: 11384-11391, 2004.
- 7) Beltrami AP, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-776, 2003.
- 8) Laugwitz KL, et al: Postnatal isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433: 647-653, 2005.
- 9) Hsieh PC, et al: Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian

- cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 13: 970-974, 2007.
- 10) Yuasa S, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 607-611, 2005.
 - 11) Wakayama T, et al: Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292: 740-743, 2001.
 - 12) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
 - 13) Takahashi K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
 - 14) Yu J, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920, 2007.



間葉系幹細胞とRAS

田村雄一^{1,2}, 福田恵一²

¹慶應義塾大学医学部循環器内科

²慶應義塾大学医学部再生医学教室

間葉系幹細胞は多分化能や自己複製能をもつため、再生医療の実現に際して期待されている細胞である。また近年、間葉系幹細胞自身が増殖因子やケモカインなどを分泌して、周囲の組織の環境を修飾する作用をもつことが示されてきており、間葉系幹細胞の局所投与による細胞療法に根拠を与えるものとなっている。またとくに脂肪細胞への分化に関しては、間葉系幹細胞とレニン・アンジオテンシン系(RAS)が局所でクロストークをおこなっていることも明らかとなっており、ARBの新たな可能性を期待させるものである。

Key words

間葉系幹細胞, 脂肪細胞, 心筋分化, パラクライン, バルサルタン

はじめに

間葉系幹細胞は一時ES細胞に押されていたものの、近年再び脚光を浴びるようになってきた幹細胞である。その理由は間葉系幹細胞が従来考えられていた多分化能や自己複製能をもつだけでなく、内分泌器官として周辺環境を修飾する作用があるという報告が相ついできたためである。すなわち直接臓器や細胞に分化することで組織修復に関与するだけでなく、増殖因子やケモカインなどのさまざまな因子を周辺環境に応じて分泌することで、周辺組織を環境の変化に適応させるはたらきがあることがわかってきたのである。本稿では従来より知られている多分化能をもつ体性幹細胞としての役割だけでなく、パラクライン効果をもつ内分泌器官としての間葉系幹細胞にも焦点を当てていく。

間葉系幹細胞の特徴と心筋分化

昨今の再生医療の発達により、胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞をはじめとした多能性幹細胞の誘導・分化に関する知見は枚挙に暇がない。しかし胚性幹細胞のもつ

欠点として、ES細胞においては倫理的問題および非自己由来の細胞であることに起因する拒絶反応の問題があり、またES/iPS細胞に共通する問題として生体内に投与後に奇形種が生まれる可能性があることから、残念ながら両細胞とも臨床応用に関しては今後の更なる技術革新を待つよりほかない。

一方、臨床応用に向けて研究が進んでいるものとしては、骨髄単核球(mononuclear cells:MNC)や骨格筋芽細胞・血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells:EPC)などがあげられ、本稿で述べる間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells:MSC)もその1つである。

再生医療を臨床応用するにあたって重要なポイントとして、

1. 自己の組織から容易に採取・作製できること
2. 高い自己複製能力と多分化能をもつこと

があげられる。この2項を満たすことができれば、自己の組織から低侵襲下に幹細胞を取り出すことができ、さらに保存も利いて必要な時期に必要な量の細胞を得ることができるので、再生医療の実現においては理想的である。

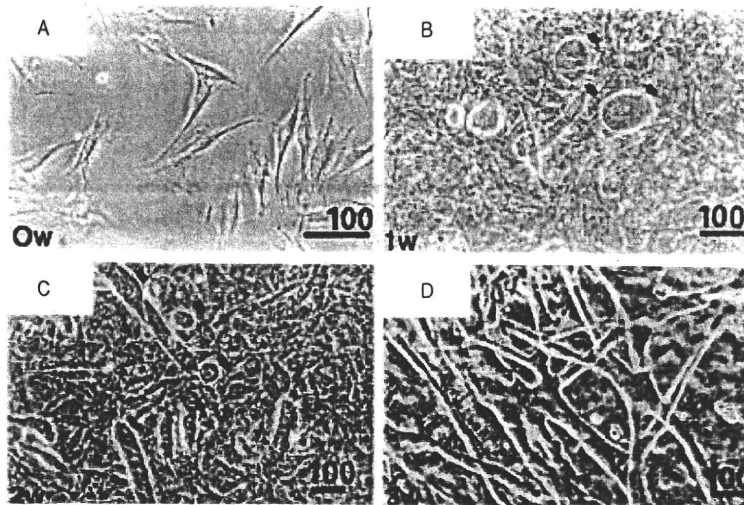


図1 脱メチル化により心筋細胞へ分化する間葉系幹細胞
 脱メチル化をおこなった間葉系幹細胞が心筋に分化していく様子
 を示している。0週から3週まで経過するに従って心筋線維が形成さ
 れていく様子がわかる。

(Makino S *et al.*, 1999¹⁾より改変引用)

間葉系幹細胞は生体組織のうち、脂肪組織・骨髄間質および真皮や骨格筋内に存在するとされている体性幹細胞であり、高い自己複製能をもつ点では再生医療に関して理想的といえる。またその分化能に関しても近年さまざまな組織に分化することが報告されており、骨・軟骨・脂肪・骨格筋・心筋・平滑筋・血管内皮・靭帯など実にさまざまな組織に分化する能力をもつことがつぎつぎに報告されている。

われわれの研究グループでも骨髄由来の間葉系幹細胞を脱メチル化することによって、拍動する心筋細胞に分化することを報告しており(図1)¹⁾、さまざまな刺激を加えることにより実に多彩な細胞に分化することが示されている。しかし種々の報告を紐解くと、その分化効率は決して高いものとはいえず、一般的にごく少数の間葉系幹細胞が分化しているにすぎないため、そのまま臨床応用をおこなうのは困難であると考えられてきた。

内分泌器官としての間葉系幹細胞

しかし Gneccchi らの報告²⁾によると、急性心筋梗塞モデルのラットに対して生存因子として知られている Akt 遺伝子を導入した間葉系幹細胞を移植したところ、72 時間後の時点ですでに梗塞範囲の縮小と心機能の改

善を認めることができた。このことは、前述した分化効率および早すぎる時間経過のことを考えると、一見不自然であると考えられる。しかし *in vitro* の系での検討において、低酸素負荷の培養条件では間葉系幹細胞が心筋細胞のアポトーシスによる障害を抑制することが示され、さらに培養上清を用いても同様の結果を得ることができた。このことから間葉系幹細胞が自身の分化による組織修復・再生だけでなく、パラクライン効果によっても組織修復・再生に寄与しているのではないかと考えられるようになってきている。

培養上清で検討すると、骨髄単核球と比較して間葉系幹細胞は多量の血管新生因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) や hepatocyte growth factor (HGF)/insulin-like growth factor-1 (IGF-1)/アドレノメジュリンを分泌していることが明らかとなっている(図2)³⁾。VEGF や HGF・アドレノメジュリンなどは血管新生やアポトーシスの抑制効果をもつことが知られており、低酸素刺激によって間葉系幹細胞からのこれらの因子の分泌がさらに増加することから、間葉系幹細胞がパラクライン効果によってストレス応答的に周辺組織を組織障害から保護しているのではないかと考えられている。また IGF-1 は心筋細胞の成長促進因子として知ら

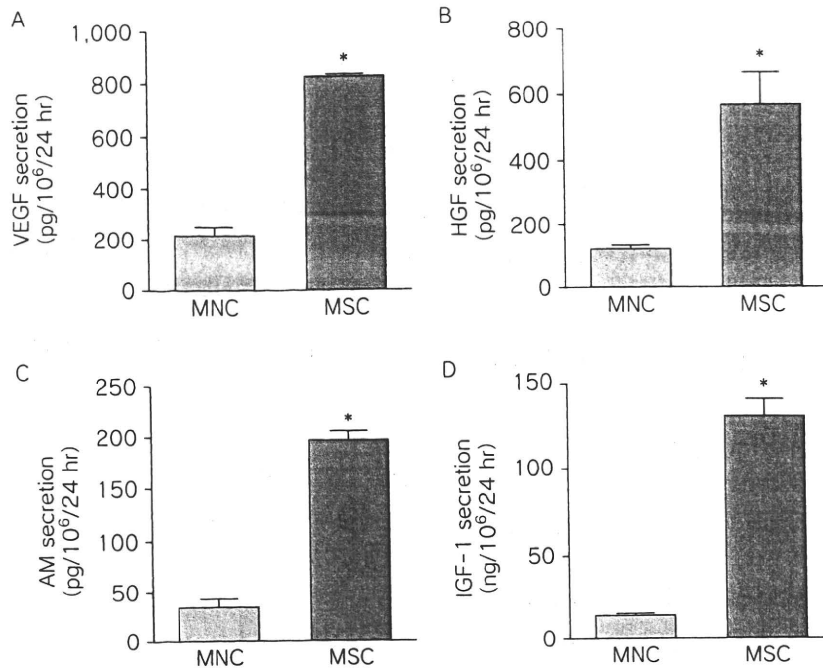


図2 間葉系幹細胞 (MSC) と骨髄単核球 (MNC) から分泌される成長因子および血管新生因子の比較
MSC は MNC と比較してこれらの因子を多量に分泌していることがわかる。

(Nagaya N *et al.*, 2005³⁾より引用)

れており、心筋障害時にはやはり間葉系幹細胞がこれらの因子を分泌することで、心筋再生に寄与しているのではないかとされている。

組織内の間葉系幹細胞とRAS

このように組織内において間葉系幹細胞が内分泌器官として周辺組織の障害抑制などに関与していることは、これまで単に体性幹細胞として理解されていた間葉系幹細胞の可能性を大きく広げるものである。すなわち間葉系幹細胞がさまざまな臓器においてストレスなどに応答して増殖因子やケモカインなどを分泌する一方で、自らも種々の因子に反応し分化することによって、その組織内の環境調整を担っているのではないかと考えられはじめています。

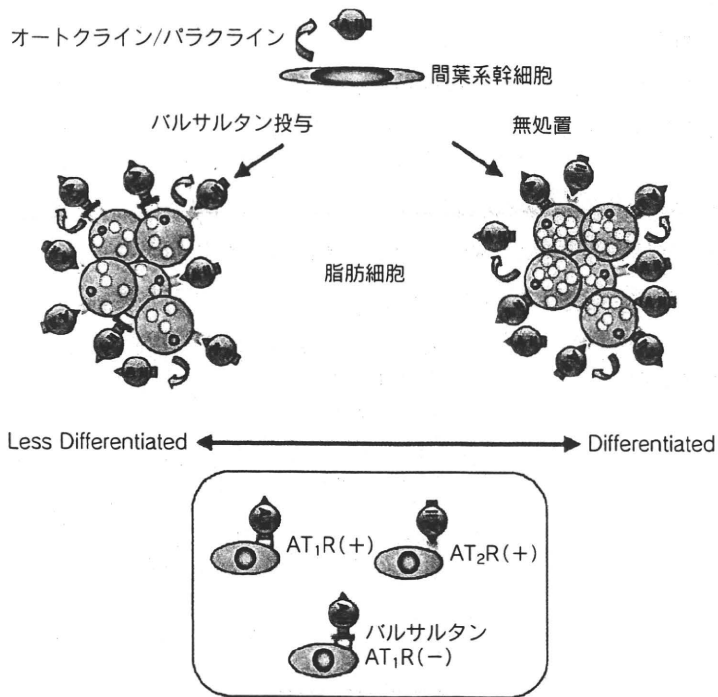
Matsushita らによる報告⁴⁾はそのなかでも特筆すべきもので、脂肪組織由来の間葉系幹細胞が脂肪細胞に分化する前後で、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) に関与する遺伝子の発現が変化することを示し、ARB の投与によってそれらが修飾されることで、メタボリックシ

ンドロームにおけるRAS抑制の効果の根拠を間葉系幹細胞に見出したものである。

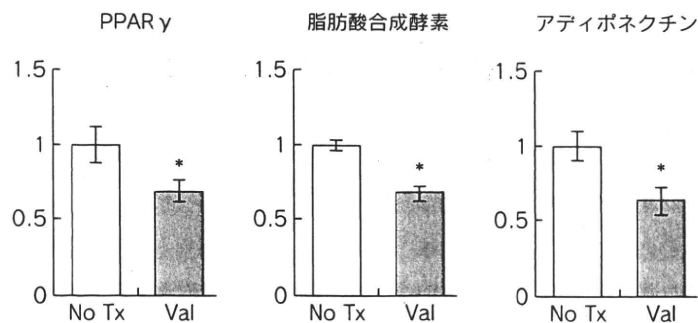
具体的には図3に示すように局所の脂肪組織において間葉系幹細胞から脂肪細胞に分化する際に間葉系幹細胞自身がアンジオテンシンII (AII) を分泌し、それが局所でオートクラインないしパラクラインの効果でAII受容体 type 1 へ結合する。するとそれが刺激となって間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化が起こるというものである。さらにそれに対してAII受容体 type 1 に対する拮抗薬であるバルサルタンの投与により間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化が抑制され、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ・脂肪酸合成酵素およびアディポネクチンの生合成やそれに伴い脂肪滴の産生が抑制されるのである (図4・図5)。

このように近年注目されている組織の局所のRASの活性と、間葉系幹細胞の分化は密接に関与しており、またお互いにパラクライン的にクロストークしていることが明らかになっているのである。

このように体性幹細胞としての間葉系幹細胞の概念は



図③ 間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化における RAS 抑制の効果
 間葉系幹細胞は脂肪組織局所におけるレニン・アンジオテンシン系の刺激によって脂肪細胞に分化するが、アンジオテンシンII受容体 type 1 を抑制することによって分化は抑制される。
 (Mogi M *et al.*, 2006⁶⁾より改変引用)



図④ ARB による脂肪細胞への分化抑制
 間葉系幹細胞に対してバルサルタン (Val) を投与すると、投与しなかったときと比較して有意に PPAR γ ・脂肪酸合成酵素およびアディポネクチンの生合成が抑制され、脂肪細胞への分化が抑制されることが示唆された。
 * $p < 0.05$

(Matsushita K *et al.*, 2006⁴⁾より改変引用)

近年急速に広まりつつあり、純粋に分化する能力をもつ細胞という特性だけでなく、パラクラインの効果で周囲の環境に影響を与える細胞としてその存在意義がより重要なものとなっているのである。

おわりに

本稿では間葉系幹細胞の最新の知見としてサイトカインなどを分泌する機能をもつ細胞であるという点を中心に、RAS の関与に関して述べてきた。再生医療への応

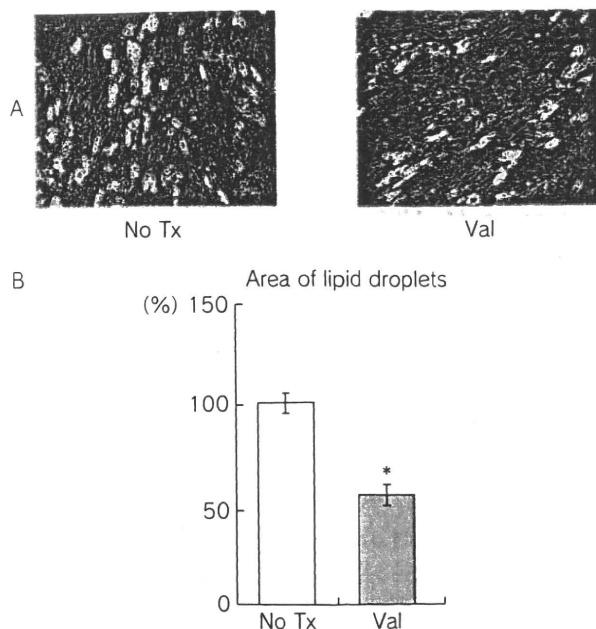


図5 ARB投与による脂肪組織の分化度の調節

間葉系幹細胞にバルサルタン (Val) を投与した場合、間葉系幹細胞から脂肪細胞に分化した後に分泌される脂肪滴の合成も抑えられていることから、脂肪細胞の分化度も抑えられていることが示唆された。

(Matsushita K *et al*, 2006⁴⁾より改変引用)

用もさることながら、ARBなどの新規の治療のターゲットとなることも期待されており、その可能性は年々拡大している。一方で間葉系幹細胞についてはその起源をは

じめとしていまだはっきりと解明されていない点も多く、実際には胚葉を跨いだ広範な分化能をもつ細胞であるといった報告もされている⁵⁾ので、今後の更なる解析が新しい再生医療の分野の扉を開けることも期待される。

文献

- 1) Makino S *et al* : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 2) Gnecci M *et al* : Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 20 : 661-669, 2006
- 3) Nagaya N *et al* : Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112 : 1128-1135, 2005
- 4) Matsushita K *et al* : Local renin-angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension* 48 : 1095-1102, 2006
- 5) Jiang Y *et al* : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (6893) : 41-49, 2002
- 6) Mogi M *et al* : Emerging concept of adipogenesis regulation by the renin-angiotensin system. *Hypertension* 48 : 1020-1022, 2006

Cardiac Innervation and Sudden Cardiac Death

Masaki Ieda and Keiichi Fukuda*

Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Abstract: The heart is extensively innervated and its performance is tightly controlled by the nervous system. Cardiac innervation density varies in diseased hearts leading to unbalanced neural activation and lethal arrhythmia. Diabetic sensory neuropathy causes silent myocardial ischemia, characterized by loss of pain perception during myocardial ischemia, which is a major cause of sudden cardiac death in diabetes mellitus (DM). Despite its clinical importance, the mechanisms underlying the control and regulation of cardiac innervation remain poorly understood.

We found that cardiac innervation is determined by the balance between neural chemoattractants and chemorepellents within the heart. Nerve growth factor (NGF), a potent chemoattractant, is induced by endothelin-1 upregulation during development and is highly expressed in cardiomyocytes. By comparison, Sema3a, a neural chemorepellent, is highly expressed in the subendocardium of early stage embryos, and is suppressed during development. The balance of expression between NGF and Sema3a leads to epicardial-to-endocardial transmural sympathetic innervation patterning. We also found that downregulation of cardiac NGF leads to diabetic neuropathy, and that NGF supplementation rescues silent myocardial ischemia in DM. Cardiac innervation patterning is disrupted in Sema3a-deficient and Sema3a-overexpressing mice, leading to sudden death or lethal arrhythmias. The present review focuses on the regulatory mechanisms underlying cardiac innervation and the critical role of these processes in cardiac performance.

Keywords: Cardiac nerve, nerve growth factor, Sema3a, arrhythmia, silent myocardial ischemia, sudden cardiac death.

INTRODUCTION

Cardiac innervation density is altered in diseased hearts, as in cases of congestive heart failure and myocardial infarction [1-3]. Following myocardial injury, cardiac nerves undergo denervation, which may be followed by Schwann cell proliferation and reinnervation, leading to heterogeneous patterns of innervation [4, 5]. Abnormal sympathetic innervation may trigger lethal arrhythmia through ion channel modulation in cardiomyocytes [3, 6, 7]. In fact, there is circadian variation in the frequency of sudden cardiac death (SCD) that parallels sympathetic activity. β -blocker therapy prevents SCD secondary to ventricular tachyarrhythmia in ischemic heart disease or congestive heart failure [8, 9]. Immunohistochemical analysis of cardiac nerves in explanted hearts of transplant recipients reveals a positive correlation between nerve density and the clinical history of ventricular tachyarrhythmia [3]. Cardiac sensory denervation can also cause silent myocardial ischemia, characterized by loss of pain perception during myocardial ischemia and frequently leading to SCD in patients with diabetes mellitus (DM) [10]. Despite the severity of these complications, the molecular mechanism that determines innervation density in diseased hearts is poorly understood. Moreover, little is known about the anatomical distribution of cardiac nerves and the molecular mechanism regulating innervation during development [11]. The present review focuses on the

regulatory mechanisms underlying cardiac innervation and the critical role of these processes in cardiac performance.

ANATOMY OF CARDIAC NERVOUS SYSTEM

The cardiac sympathetic nerves extend from the sympathetic neurons of stellate ganglia, which are located bilateral to the vertebra. Sympathetic nerve fibers project from the base of the heart into the myocardium, and are located predominantly in the subepicardium of the ventricle [12, 13]. The central conduction system, which includes the sinoatrial node, atrioventricular node, and His bundle, is extensively innervated compared to the working myocardium [13-16]. We, and others, report that regional differences in cardiac sympathetic innervation, known as innervation patterning, are highly conserved among species [13, 14, 17].

The cardiac nervous system also involves afferent nerves. The sensory signals generated in the heart are conducted through cardiac afferent nerves, primarily thinly myelinated A δ -fibers and nonmyelinated C-fibers [18, 19]. The sensory nerve fibers project to the upper thoracic dorsal horn *via* dorsal root ganglia neurons [18, 19]. Unlike sympathetic innervation, the anatomy of cardiac sensory innervation was poorly characterized until our recent report [20]. Cardiac sensory innervation will be discussed in more detail later in this review.

NERVE GROWTH FACTOR UPREGULATION CAUSES NERVE SPROUTING AND SUDDEN CARDIAC DEATH

Nerve growth factor (NGF) is a prototypic member of the neurotrophin family, the members of which are critical for

*Address correspondence to this author at the Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics Keio University School of Medicine 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan; Tel.; +81-3-5363-3874; Fax.; +81-3-5363-3875; E-mail; kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp

the differentiation, survival, and synaptic activity of the peripheral sympathetic and sensory nervous systems [21-23]. The level of NGF expression within innervated tissues corresponds to innervation density [24].

Our recent investigations, and those of others, show that NGF expression is altered in diseased hearts [1-3, 25]. Studies in animal models by Zhou *et al.* [26] reveal that NGF is upregulated following myocardial infarction (MI), resulting in the regeneration of cardiac sympathetic nerves and heterogeneous innervation. In a previous study we report that NGF is upregulated in cardiac hypertrophy, leading to sympathetic hyperinnervation and rejuvenation [27]. NGF infusion after MI enhances myocardial nerve sprouting and results in a dramatic increase in SCD and a high incidence of ventricular tachyarrhythmia [1]. These results demonstrate that NGF-induced augmentation of sympathetic nerve sprouting in diseased hearts leads to lethal arrhythmia and SCD.

NERVE GROWTH FACTOR DOWNREGULATION IS CRITICAL FOR DIABETIC NEUROPATHY AND SILENT MYOCARDIAL ISCHEMIA

In contrast to sympathetic innervation, very little was known about sensory innervation and its alteration in diseased hearts. Visceral organs, including the heart, are believed to be rich in autonomic efferent innervation and poor in nociceptive afferent nerves [28]. Zahner *et al.* [29] report that vanilloid receptor-1-immunopositive sensory nerves are enriched in the epicardium and scarce in the myocardium. In immunohistochemical studies using anti-calcitonin gene-related peptide antibody (CGRP), a sensory marker, we demonstrated, for the first time, that cardiac sensory innervation is rich at epicardial sites and in the ventricular myocardium [20, 30]. In a screen of several neurotrophic factors, we found that the development of cardiac sensory nerves parallels the production of NGF in the heart [31]. Cardiac nociceptive sensory nerves that are immunopositive for CGRP, including the dorsal root ganglia and the dorsal horn, are markedly retarded in NGF-deficient mice and rescued in mice overexpressing NGF specifically in the heart. Thus, NGF synthesis in the heart is critical for the development of the cardiac sensory nervous system [32].

The cardiac sensory nervous system is responsible for pain perception and in the initiation of the protective cardiovascular response during myocardial ischemia [18, 19, 33, 34]. Cardiac sensory nerve impairment causes silent myocardial ischemia, a major cause of sudden death in DM patients [10]. Despite the severity of this complication, the alterations in cardiac sensory innervation and the molecular mechanism underlying sensory neuropathy in diabetic hearts is unclear [35-41]. To investigate whether NGF is involved in diabetic neuropathy, DM was induced with streptozotocin in wild-type (WT) mice and in transgenic mice that overexpressed NGF in the heart [20, 42-45]. Downregulation of NGF, CGRP-immunopositive cardiac sensory denervation, and atrophic changes in dorsal root ganglia were observed in DM-induced WT mice, whereas these deteriorations were rescued in DM-induced NGF-transgenic mice. Cardiac sensory function, measured by myocardial ischemia-induced c-Fos expression in dorsal root ganglia, was also

downregulated by DM in the WT mice, but not in the NGF-transgenic mice [19]. Direct gene transfer of NGF into the diabetic rat hearts improved cardiac sensory innervation and function according to the electrophysiological activity of cardiac afferent nerves during myocardial ischemia (Fig. 1) [46, 47]. These findings demonstrate that DM-induced downregulation of NGF may lead to cardiac sensory neuropathy.

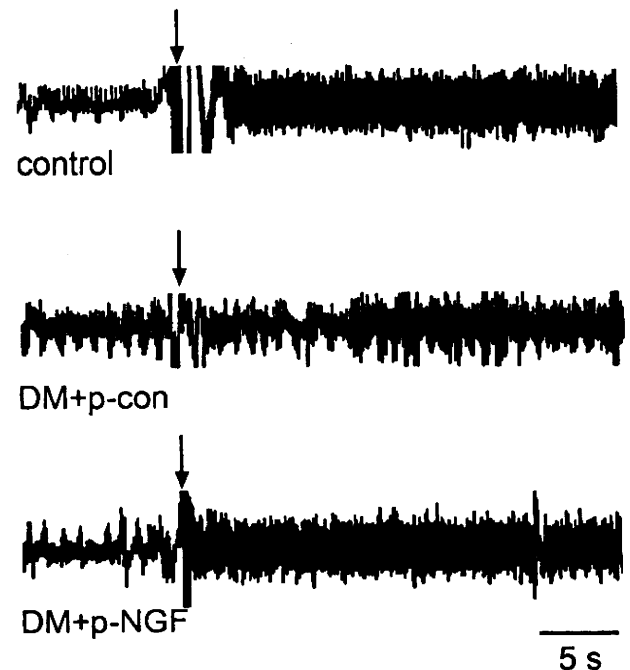


Fig. (1). NGF gene transfer restores impaired sensory innervation in diabetic hearts.

Recording of impulse activity from cardiac sympathetic afferent nerves. Myocardial ischemia was induced at the time point indicated by arrows. Note that the response of cardiac afferent nerves was reduced in DM injected with p-con (control). The gene transfer of 50 μ g p-NGF preserved cardiac sensory nerve function in DM.

Phase I and phase II clinical trials of systemic administration of recombinant NGF reveal the safety and potential efficacy of this treatment for diabetic polyneuropathy, although a phase III trial showed no beneficial effects, possibly because the dosage and route of administration was suboptimal [48, 49]. It is possible that restriction of NGF dosage due to side-effects and the development of anti-NGF antibodies contributed to the lack of beneficial effects in the phase III clinical trial. To avoid these complications, gene transfer was used to directly administer the *NGF* gene into the heart. Both NGF- and CGRP-immunopositive nerves were reduced in diabetic hearts, thereby demonstrating the successful treatment of cardiac sensory neuropathy by *NGF* gene transfer. Consistent with our findings, the efficacy of *NGF* gene therapy has been reported in diabetic cystopathy and neuropathy of the footpad [49, 50]. Future studies on the reliability and efficacy of *NGF* gene therapy are required before clinical trials can proceed.

ENDOTHELIN-1-INDUCED NGF UPREGULATION IS ESSENTIAL FOR CARDIAC SYMPATHETIC INNERVATION

Although alteration in the level of NGF has a great impact on the clinical outcome in heart disease, the molecular mechanisms underlying the regulation of NGF expression and sympathetic innervation are poorly understood. To address this issue, we performed a screen of several cardiac hypertrophic factors and found that ET-1 specifically upregulates NGF expression in primary cultured cardiomyocytes [51]. Furthermore, we showed that ET-1-induced NGF augmentation was not observed in cardiac fibroblasts but was specific to cardiomyocytes, and identified signaling molecules involved in the ET-1/NGF pathway.

To study the effects of the ET-1/NGF pathway on the development of the cardiac sympathetic nervous system, we analyzed various gene-modified mouse models. NGF expression, cardiac sympathetic innervation, and norepinephrine concentration were reduced in ET-1-deficient mouse (*Edn1*^{-/-}) hearts, but not in the hearts of angiotensinogen-deficient mice (*Atg*^{-/-}). In *Edn1*^{-/-} mice, the sympathetic stellate ganglia exhibited excessive apoptosis and displayed loss of neurons at the late embryonic stage [52]. Moreover, we demonstrated that cardiac-specific overexpression of NGF in *Edn1*^{-/-} mice overcomes sympathetic nerve retardation (Fig. 2) [53]. These findings indicate that ET-1 is a key regulator of NGF expression in cardiomyocytes, and that the ET-1/NGF pathway is critical for sympathetic innervation in the heart [54]. Given that ET-1 is strongly induced in myocardial infarction and cardiac hypertrophy, the ET-1/NGF pathway may also be involved in NGF upregulation and nerve regeneration in pathological hearts.

CARDIAC SYMPATHETIC INNERVATION PATTERNING IS DETERMINED BY SEMA3A EXPRESSION

The growth-cone behavior of nerves is determined by coincident signaling between neural chemoattractants and chemorepellents, synthesized in the innervated tissue. While

NGF plays critical roles in cardiac innervation as a chemoattractant, the neural chemorepellent that induces growth-cone collapse and repels nerve axons is not found in the heart. Recently, we found that *Sema3a* inhibits neural growth and establishes appropriate innervation patterning in the heart [55].

Sema3a is a Class 3 secreted semaphorin and has been cloned and identified as a potent neural chemorepellent and a directional guidance molecule for nerve fibers [56-58]. For this reason, investigations were initiated to determine if cardiomyocytes produced *Sema3a* and if this protein played a role in sympathetic neural patterning and cardiac performance. We analyzed the kinetics and distribution of cardiac sympathetic innervation in developing mouse ventricles [55]. Sympathetic nerve endings, immunopositive for the sympathetic marker, tyrosine hydroxylase (TH), appeared on the epicardial surface at embryonic day (E)15 and then gradually increased in number in the myocardium after postnatal day (P)7 and P42. Sympathetic nerves were more abundant in the subepicardium than in the subendocardium of the ventricular myocardium, suggesting the presence of an epicardial-to-endocardial gradient that is consistent with previous reports [12, 14-16]. We analyzed heterozygous *Sema3a* knocked-in *lacZ* mice (*Sema3a*^{lacZ/+}) to investigate the expression pattern of *Sema3a* and its relationship to innervation patterning in the heart. At E12, strong *lacZ* expression was detected in the heart, especially in the trabecular components of the ventricles. By E15, *lacZ* expression was observed in the subendocardium, but not in the subepicardium, of the atria and ventricles. At P1 and P42, *lacZ* expression was reduced in certain regions and highlighted the Purkinje fiber network along the ventricular free wall [59, 60]. Quantitative RT-PCR of *Sema3a* in developing hearts revealed a linear decrease in the expression of *Sema3a* from E12 that corresponded with an increase in sympathetic innervation density. The negative correlation between the kinetics of *Sema3a* expression and sympathetic innervation indicates that *Sema3a* negatively regulates cardiac innervation in developing hearts (Fig. 3).

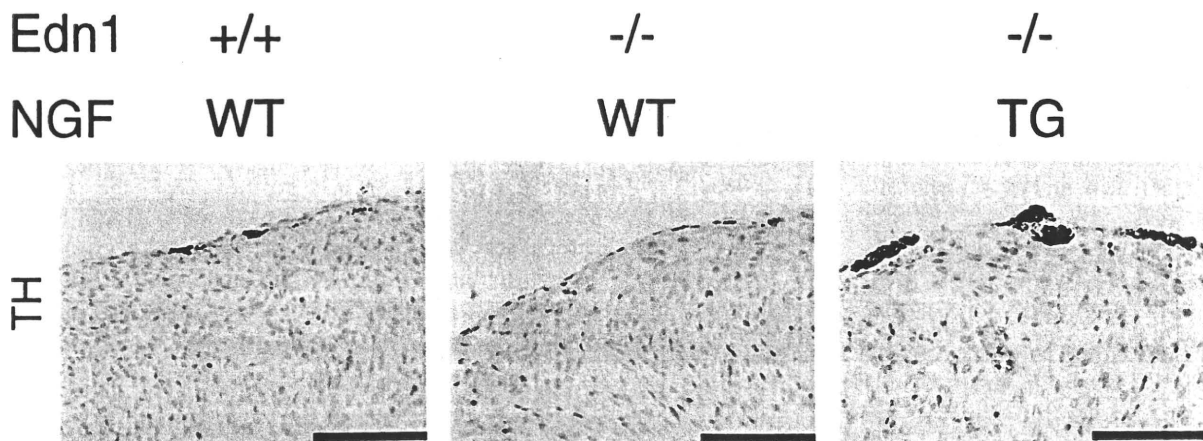


Fig. (2). Cardiac-specific overexpression of NGF overcomes the defects of cardiac sympathetic nervous system in *Edn1*^{-/-} mice. Immunostaining for TH in the hearts of *Edn1*^{+/+}, *Edn1*^{-/-} and *Edn1*^{-/-}/MHC-NGF mice. The reduced sympathetic innervation in *Edn1*^{-/-} hearts is rescued in *Edn1*^{-/-}/MHC-NGF hearts. Scale bar, 100 μ m.