

Derivation of iPSCs with the use of non-viral gene delivery using PEI max MNPs should provide a powerful tool for treating diseases such as Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's by autologous cell transplantation. Reprogramming cells requires the action of multiple transcription factors. Our studies demonstrate that MNP-mediated transfection efficiently introduces at least three genes in a single cell. This indicates the feasibility of our system for one-step reprogramming.

References

1. Chouly, C.; Pouliquen, D.; Lucet, I.; Jeune, J.J.; Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **1996**, *13*, 245–255.
2. Schlorf, T.; Meincke, M.; Kossel, E.; Gluer, C.C.; Jansen, O.; Mentlein, R. Biological properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *12*, 12–23.
3. Yoo, B.; Pagel, M.D. An overview of responsive MRI contrast agents for molecular imaging. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 1733–1752.
4. Sun, C.; Fang, C.; Stephen, Z.; Veiseh, O.; Hansen, S.; Lee, D.; Ellenbogen, R.G.; Olson, J.; Zhang, M. Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine (Lond. UK)* **2008**, *3*, 495–505.
5. Medarova, Z.; Rashkovetsky, L.; Pantazopoulos, P.; Moore, A. Multiparametric monitoring of tumor response to chemotherapy by noninvasive imaging. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1182–1189.
6. Wu, Y.L.; Ye, Q.; Sato, K.; Foley, L.M.; Hitchens, T.K.; Ho, C. Noninvasive evaluation of cardiac allograft rejection by cellular and functional cardiac magnetic resonance. *JACC Cardiovasc. Imaging* **2009**, *2*, 731–741.
7. Wu, Y.L.; Ye, Q.; Foley, L.M.; Hitchens, T.K.; Sato, K.; Williams, J.B.; Ho, C. *In situ* labeling of immune cells with iron oxide particles: An approach to detect organ rejection by cellular MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1852–1857.
8. Chen, C.L.; Zhang, H.; Ye, Q.; Hsieh, W.Y.; Hitchens, T.K.; Shen, H.H.; Liu, L.; Wu, Y.J.; Foley, L.M.; Wang, S.J.; *et al.* A New Nano-sized Iron Oxide Particle with High Sensitivity for Cellular Magnetic Resonance Imaging. *Mol. Imaging Biol.* **2010**, doi:10.1007/s11307-010-0430-x.
9. Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
10. Maeda, H.; Matsumura, Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1989**, *6*, 193–210.
11. Oh, K.T.; Baik, H.J.; Lee, A.H.; Oh, Y.T.; Youn, Y.S.; Lee, E.S. The reversal of drug-resistance in tumors using a drug-carrying nanoparticulate system. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3776–3792.
12. Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Roland, F. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 413–419.

13. Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Veverka, P.; Goglio, G.; Demourgues, A.; Portier, J.; Pollert, E.; Duguet, E. Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Prog. Solid State Chem.* **2006**, *34*, 237–247.
14. Kim, D.H.; Kim, K.N.; Kim, K.M.; Lee, Y.K. Targeting to carcinoma cells with chitosan- and starch-coated magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2009**, *88*, 1–11.
15. Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. Heat-inducible TNF-alpha gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy. *Cancer Gene Ther.* **2001**, *8*, 649–654.
16. Tang, Q.S.; Zhang, D.S.; Cong, X.M.; Wan, M.L.; Jin, L.Q. Using thermal energy produced by irradiation of Mn-Zn ferrite magnetic nanoparticles (MZF-NPs) for heat-inducible gene expression. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2673–2679.
17. Salloum, M.; Ma, R.H.; Weeks, D.; Zhu, L. Controlling nanoparticle delivery in magnetic nanoparticle hyperthermia for cancer treatment: Experimental study in agarose gel. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 337–345.
18. Wust, P.; Gneveckow, U.; Johannsen, M.; Bohmer, D.; Henkel, T.; Kahmann, F.; Sehouli, J.; Felix, R.; Ricke, J.; Jordan, A. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy—feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int. J. Hyperth.* **2006**, *22*, 673–685.
19. Ito, A.; Honda, H.; Kobayashi, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: A novel concept of “heat-controlled necrosis” with heat shock protein expression. *Cancer Immunol. Immunother.* **2006**, *55*, 320–328.
20. Tanaka, K.; Ito, A.; Kobayashi, T.; Kawamura, T.; Shimada, S.; Matsumoto, K.; Saida, T.; Honda, H. Intratumoral injection of immature dendritic cells enhances antitumor effect of hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Int. J. Cancer* **2005**, *116*, 624–633.
21. Ito, A.; Tanaka, K.; Honda, H.; Abe, S.; Yamaguchi, H.; Kobayashi, T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 364–369.
22. Muggia, F.M. Doxorubicin-polymer conjugates: Further demonstration of the concept of enhanced permeability and retention. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 7–8.
23. Gabizon, A.; Chemla, M.; Tzemach, D.; Horowitz, A.T.; Goren, D. Liposome longevity and stability in circulation: Effects on the *in vivo* delivery to tumors and therapeutic efficacy of encapsulated anthracyclines. *J. Drug Target.* **1996**, *3*, 391–398.
24. Sakakibara, T.; Chen, F.A.; Kida, H.; Kunieda, K.; Cuenca, R.E.; Martin, F.J.; Bankert, R.B. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes is superior to free drug or drug-containing conventional liposomes at suppressing growth and metastases of human lung tumor xenografts. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3743–3746.
25. Harrington, K.J.; Mohammadtaghi, S.; Uster, P.S.; Glass, D.; Peters, A.M.; Vile, R.G.; Stewart, J.S. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 243–254.
26. Noe, L.L.; Becker, R.V., III; Gradishar, W.J.; Gore, M.; Trotter, J.P. The cost effectiveness of tamoxifen in the prevention of breast cancer. *Am. J. Manag. Care* **1999**, *5* (Suppl. 6), S389–S406.

27. Ibrahim, N.K.; Desai, N.; Legha, S.; Soon-Shiong, P.; Theriault, R.L.; Rivera, E.; Esmaeli, B.; Ring, S.E.; Bedikian, A.; Hortobagyi, G.N.; *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 1038–1044.
28. Ibrahim, N.K.; Samuels, B.; Page, R.; Doval, D.; Patel, K.M.; Rao, S.C.; Nair, M.K.; Bhar, P.; Desai, N.; Hortobagyi, G.N. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 6019–6026.
29. Pinder, M.C.; Ibrahim, N.K. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel for treatment of metastatic breast cancer. *Drugs Today* **2006**, *42*, 599–604.
30. Hamaguchi, T.; Kato, K.; Yasui, H.; Morizane, C.; Ikeda, M.; Ueno, H.; Muro, K.; Yamada, Y.; Okusaka, T.; Shirao, K.; *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 170–176.
31. Hamaguchi, T.; Matsumura, Y.; Suzuki, M.; Shimizu, K.; Goda, R.; Nakamura, I.; Nakatomi, I.; Yokoyama, M.; Kataoka, K.; Kakizoe, T. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 1240–1246.
32. Muggia, F.M.; Hainsworth, J.D.; Jeffers, S.; Miller, P.; Groshen, S.; Tan, M.; Roman, L.; Uziely, B.; Muderspach, L.; Garcia, A.; *et al.* Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: Antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 987–993.
33. Kikumori, T.; Kobayashi, T.; Sawaki, M.; Imai, T. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *113*, 435–441.
34. Johannsen, M.; Thiesen, B.; Wust, P.; Jordan, A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int. J. Hyperth.* **2010**, *26*, 790–795.
35. Rao, W.; Deng, Z.S.; Liu, J. A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 101–116.
36. Yallapu, M.M.; Othman, S.F.; Curtis, E.T.; Gupta, B.K.; Jaggi, M.; Chauhan, S.C. Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1890–1905.
37. Chen, B.; Wu, W.; Wang, X. Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 184–189.
38. Zhang, H.; Lee, M.Y.; Hogg, M.G.; Dordick, J.S.; Sharfstein, S.T. Gene delivery in three-dimensional cell cultures by superparamagnetic nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4733–4743.
39. Pickard, M.R.; Barraud, P.; Chari, D.M. The transfection of multipotent neural precursor/stem cell transplant populations with magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2274–2284.
40. Lee, J.H.; Lee, K.; Moon, S.H.; Lee, Y.; Park, T.G.; Cheon, J. All-in-one target-cell-specific magnetic nanoparticles for simultaneous molecular imaging and siRNA delivery. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 4174–4179.

41. Kievit, F.M.; Veiseh, O.; Bhattarai, N.; Fang, C.; Gunn, J.W.; Lee, D.; Ellenbogen, R.G.; Olson, J.M.; Zhang, M. PEI-PEG-Chitosan Copolymer Coated Iron Oxide Nanoparticles for Safe Gene Delivery: Synthesis, complexation, and transfection. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2244–2251.
42. Mykhaylyk, O.; Antequera, Y.S.; Vlaskou, D.; Plank, C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection *in vitro*. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2391–2411.
43. Song, H.P.; Yang, J.Y.; Lo, S.L.; Wang, Y.; Fan, W.M.; Tang, X.S.; Xue, J.M.; Wang, S. Gene transfer using self-assembled ternary complexes of cationic magnetic nanoparticles, plasmid DNA and cell-penetrating Tat peptide. *Biomaterials* **2010**, *31*, 769–778.
44. Scherer, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Kruger, A.; Gansbacher, B.; Plank, C. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 102–109.
45. Shi, Y.; Zhou, L.; Wang, R.; Pang, Y.; Xiao, W.; Li, H.; Su, Y.; Wang, X.; Zhu, B.; Zhu, X.; Yan, D.; Gu, H. *In situ* preparation of magnetic nonviral gene vectors and magnetofection *in vitro*. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 115103.
46. Ang, D.; Nguyen, Q.V.; Kayal, S.; Preiser, P.R.; Rawat, R.S.; Ramanujan, R.V. Insights into the mechanism of magnetic particle assisted gene delivery. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1319–1326.
47. Morishita, N.; Nakagami, H.; Morishita, R.; Takeda, S.; Mishima, F.; Terazono, B.; Nishijima, S.; Kaneda, Y.; Tanaka, N. Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1121–1126.
48. Namgung, R.; Singha, K.; Yu, M.K.; Jon, S.; Kim, Y.S.; Ahn, Y.; Park, I.K.; Kim, W.J. Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetoplexes for gene transfection of vascular endothelial cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4204–4213.
49. Yiu, H.H.; McBain, S.C.; Lethbridge, Z.A.; Lees, M.R.; Dobson, J. Preparation and characterization of polyethylenimine-coated Fe₃O₄-MCM-48 nanocomposite particles as a novel agent for magnet-assisted transfection. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2010**, *92*, 386–392.
50. Namiki, Y.; Namiki, T.; Yoshida, H.; Ishii, Y.; Tsubota, A.; Koido, S.; Nariai, K.; Mitsunaga, M.; Yanagisawa, S.; Kashiwagi, H.; *et al.* A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided *in vivo* gene delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 598–606.
51. Arsianti, M.; Lim, M.; Marquis, C.P.; Amal, R. Polyethylenimine based magnetic iron-oxide vector: The effect of vector component assembly on cellular entry mechanism, intracellular localization, and cellular viability. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2521–3251.
52. Kim, T.S.; Lee, S.H.; Gang, G.T.; Lee, Y.S.; Kim, S.U.; Koo, D.B.; Shin, M.Y.; Park, C.K.; Lee, D.S. Exogenous DNA uptake of boar spermatozoa by a magnetic nanoparticle vector system. *Reprod. Domest. Anim.* **2009**, *45*, e201–e206.
53. Yang, S.Y.; Sun, J.S.; Liu, C.H.; Tsuang, Y.H.; Chen, L.T.; Hong, C.Y.; Yang, H.C.; Horng, H.E. *Ex vivo* magnetofection with magnetic nanoparticles: A novel platform for nonviral tissue engineering. *Artif. Organs* **2008**, *32*, 195–204.
54. Tresilwised, N.; Pithayanukul, P.; Mykhaylyk, O.; Holm, P.S.; Holzmuller, R.; Anton, M.; Thalhammer, S.; Adiguzel, D.; Doblinger, M.; Plank, C. Boosting oncolytic adenovirus potency with magnetic nanoparticles and magnetic force. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, *7*, 1069–1089.

55. Hashimoto, M.; Hisano, Y. Directional gene-transfer into the brain by an adenoviral vector tagged with magnetic nanoparticles. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *194*, 316–320.
56. Mah, C.; Fraites, T.J., Jr.; Zolotukhin, I.; Song, S.; Flotte, T.R.; Dobson, J.; Batich, C.; Byrne, B.J. Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy. *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 106–112.
57. Basti, H.; Ben Tahar, L.; Smiri, L.S.; Herbst, F.; Vaulay, M.J.; Chau, F.; Ammar, S.; Benderbous, S. Catechol derivatives-coated Fe₃O₄ and gamma-Fe₂O₃ nanoparticles as potential MRI contrast agents. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *341*, 248–254.
58. Gamarra, L.F.; Amaro, E., Jr.; Alves, S.; Soga, D.; Pontuschka, W.M.; Mamani, J.B.; Carneiro, S.M.; Brito, G.E.; Figueiredo Neto, A.M. Characterization of the biocompatible magnetic colloid on the basis of Fe₃O₄ nanoparticles coated with dextran, used as contrast agent in magnetic resonance imaging. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 4145–4153.
59. Jung, C.W.; Jacobs, P. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: Ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn. Reson. Imaging* **1995**, *13*, 661–674.
60. Martina, M.S.; Fortin, J.P.; Menager, C.; Clement, O.; Barratt, G.; Grabielle-Madelmont, C.; Gazeau, F.; Cabuil, V.; Lesieur, S. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10676–10685.
61. Widder, D.J.; Greif, W.L.; Widder, K.J.; Edelman, R.R.; Brady, T.J. Magnetite albumin microspheres: A new MR contrast material. *Am. J. Roentgenol.* **1987**, *148*, 399–404.
62. Sun, X.; Gutierrez, A.; Yacaman, M.J.; Dong, X.; Jin, S. Investigations on magnetic properties and structure for carbon encapsulated nanoparticles of Fe, Co, Ni. *Mater. Sci. Eng. A* **2000**, *286*, 157–160.
63. Tomitaka, A.; Kobayashi, H.; Yamada, T.; Jeun, M.; Bae, S.; Takemura, Y. Magnetization and self-heating temperature of NiFe₂O₄ nanoparticles measured by applying ac magnetic field. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2010**, *200*, 122010.
64. Cho, W.S.; Duffin, R.; Poland, C.A.; Duschl, A.; Oostingh, G.J.; Macnee, W.; Bradley, M.; Megson, I.L.; Donaldson, K. Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology* **2011**, in press.
65. George, S.; Xia, T.; Rallo, R.; Zhao, Y.; Ji, Z.; Lin, S.; Wang, X.; Zhang, H.; France, B.; Schoenfeld, D.; *et al.* Use of a high-throughput screening approach coupled with *in vivo* zebrafish embryo screening to develop hazard ranking for engineered nanomaterials. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1805–1817.
66. Giri, J.; Pradhan, P.; Somani, V.; Chelawat, H.; Chhatre, S.; Banerjee, R.; Bahadur, D. Synthesis and characterizations of water-based ferrofluids of substituted ferrites [Fe_{1-x}B_xFe₂O₄, B = Mn, Co (x = 0–1)] for biomedical applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, 724–730.
67. Karlsson, H.L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Moller, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1726–1732.

68. McBain, S.C.; Yiu, H.H.; Dobson, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3*, 169–180.
69. Buyukhatipoglu, K.; Clyne, A.M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2011**, *96*, 186–195.
70. Schroder, U.; Segren, S.; Gemmefors, C.; Hedlund, G.; Jansson, B.; Sjogren, H.O.; Borrebaeck, C.A. Magnetic carbohydrate nanoparticles for affinity cell separation. *J. Immunol. Methods* **1986**, *93*, 45–53.
71. Berry, C.C.; Wells, S.; Charles, S.; Curtis, A.S. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: Influence on fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4551–4555.
72. Nitin, N.; LaConte, L.E.; Zurkiya, O.; Hu, X.; Bao, G. Functionalization and peptide-based delivery of magnetic nanoparticles as an intracellular MRI contrast agent. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 706–712.
73. Ito, A.; Ino, K.; Kobayashi, T.; Honda, H. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6185–6193.
74. de la Fuente, J.M.; Penades, S. Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 636–651.
75. McDonald, M.A.; Watkin, K.L. Investigations into the physicochemical properties of dextran small particulate gadolinium oxide nanoparticles. *Acad. Radiol.* **2006**, *13*, 421–427.
76. Mertz, C.J.; Kaminski, M.D.; Xie, Y.; Finck, M.R.; Guy, S.; Rosengart, A.J. *In vitro* studies of functionalized magnetic nanospheres for selective removal of a simulant biotoxin. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 572–577.
77. Mikhaylova, M.; Jo, Y.; Kim, D.; Bobrysheva, N.; Andersson, Y.; Eriksson, T.; Osmolowsky, M.; Semenov, V.; Muhammed, M. The Effect of Biocompatible Coating Layers on Magnetic Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Hyperfine Interact.* **2004**, *156–157*, 257–263.
78. Qiu, X.P.; Winnik, F. Preparation and characterization of PVA coated magnetic nanoparticles. *Chin. J. Polym. Sci.* **2000**, *18*, 535–539.
79. Yiu, H.H.P.; Wright, P.A.; Botting, N.P. Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 81–92.
80. Ameer, S.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Chovelon, J.-M. Sensitive immunodetection through impedance measurements onto gold functionalized electrodes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89*, 161–170.
81. Arsianti, M.; Lim, M.; Lou, S.N.; Goon, I.Y.; Marquis, C.P.; Amal, R. Bi-functional gold-coated magnetite composites with improved biocompatibility. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *354*, 536–545.
82. Williams, D.; Gold, K.; Holoman, T.; Ehrman, S.; Wilson, O. Surface modification of magnetic nanoparticles using gum arabic. *J. Nanopart. Res.* **2006**, *8*, 749–753.
83. Klabunde, K.J.; Stark, J.; Koper, O.; Mohs, C.; Park, D.G.; Decker, S.; Jiang, Y.; Lagadic, I.; Zhang, D. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12142–12153.

84. Zhang, H.; Xia, T.; Meng, H.; Xue, M.; George, S.; Ji, Z.; Wang, X.; Liu, R.; Wang, M.; France, B.; *et al.* Differential expression of syndecan-1 mediates cationic nanoparticle toxicity in undifferentiated versus differentiated normal human bronchial epithelial cells. *ACS Nano* **2011**, *5*, 2756–2769.
85. Sunoqrot, S.; Bae, J.W.; Jin, S.E.; Ryan, M.P.; Liu, Y.; Hong, S. Kinetically controlled cellular interactions of polymer-polymer and polymer-liposome nanohybrid systems. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 466–474.
86. Schweiger, C.; Pietzonka, C.; Heverhagen, J.; Kissel, T. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly(ethylene imine)-g-poly(ethylene glycol) for potential biomedical application: Synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. *Int. J. Pharm.* **2011**, *408*, 130–137.
87. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M.A.; Mergny, M.D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297–7301.
88. Thomas, M.; Lu, J.J.; Ge, Q.; Zhang, C.; Chen, J.; Klibanov, A.M. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5679–5684.
89. Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J.P.; Demeneix, B.A. A powerful nonviral vector for *in vivo* gene transfer into the adult mammalian brain: Polyethylenimine. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1947–1954.
90. Zuo, K.H.; Jiang, D.L.; Zhang, J.X.; Lin, Q.L. Forming nanometer TiO₂ sheets by nonaqueous tape casting. *Ceram. Int.* **2007**, *33*, 477–481.
91. Ieda, M.; Fu, J.D.; Delgado-Olguin, P.; Vedantham, V.; Hayashi, Y.; Bruneau, B.G.; Srivastava, D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **2010**, *142*, 375–386.
92. Takeuchi, J.K.; Bruneau, B.G. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* **2009**, *459*, 708–711.
93. Vierbuchen, T.; Ostermeier, A.; Pang, Z.P.; Kokubu, Y.; Sudhof, T.C.; Wernig, M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **2010**, *463*, 1035–1041.
94. Zhou, Q.; Brown, J.; Kanarek, A.; Rajagopal, J.; Melton, D.A. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **2008**, *455*, 627–632.
95. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
96. Laurent, N.; Sapet, C.D.; Le Gourrierec, L.; Bertosio, E.; Zelphati, O. Nucleic acid delivery using magnetic nanoparticles: The Magnetofection™ technology. *Ther. Deliv.* **2011**, *2*, 471–482.
97. Sonawane, N.D.; Szoka, F.C., Jr.; Verkman, A.S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826–44831.
98. Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotten, M.; Saltik, M.; Wagner, E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 401–407.
99. Nishiyama, N.; Kataoka, K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 630–648.

100. Yu, J.H.; Quan, J.S.; Huang, J.; Nah, J.W.; Cho, C.S. Degradable poly(amino ester) based on poly(ethylene glycol) dimethacrylate and polyethylenimine as a gene carrier: Molecular weight of PEI affects transfection efficiency. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20*, 2501–2510.
101. Veisoh, O.; Kievit, F.M.; Gunn, J.W.; Ratner, B.D.; Zhang, M. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, 649–657.
102. Pan, X.; Guan, J.; Yoo, J.W.; Epstein, A.J.; Lee, L.J.; Lee, R.J. Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery. *Int. J. Pharm.* **2008**, *358*, 263–270.
103. Li, Z.; Xiang, J.; Zhang, W.; Fan, S.; Wu, M.; Li, X.; Li, G. Nanoparticle delivery of anti-metastatic NM23-H1 gene improves chemotherapy in a mouse tumor model. *Cancer Gene Ther.* **2009**, *16*, 423–429.
104. Gonzalez, B.; Ruiz-Hernandez, E.; Feito, M.J.; Lopez de Laorden, C.; Arcos, D.; Ramirez-Santillan, C.; Matesanz, C.; Portoles, M.T.; Vallet-Regi, M. Covalently bonded dendrimer-maghemite nanosystems: Nonviral vectors for *in vitro* gene magnetofection. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 4598–4604.
105. Wu, H.-C.; Wang, T.-W.; Bohn, M.C.; Lin, F.-H.; Spector, M. Novel magnetic hydroxyapatite nanoparticles as non-viral vectors for the glial cell line-derived neurotrophic factor Gene. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 67–77.
106. Zhao, D.; Gong, T.; Zhu, D.; Zhang, Z.; Sun, X. Comprehensive comparison of two new biodegradable gene carriers. *Int. J. Pharm.* **2011**, in press.
107. Kami, D.; Takeda, S.; Makino, H.; Toyoda, M.; Itakura, Y.; Gojo, S.; Kyo, S.; Umezawa, A.; Watanabe, M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J. Artif. Organs* **2011**, in press.
108. Moghimi, S.M.; Symonds, P.; Murray, J.C.; Hunter, A.C.; Debska, G.; Szewczyk, A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther.* **2005**, *11*, 990–995.
109. Zou, S.M.; Erbacher, P.; Remy, J.S.; Behr, J.P. Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J. Gene Med.* **2000**, *2*, 128–134.
110. Biswas, S.; Gordon, L.E.; Clark, G.J.; Nantz, M.H. Click assembly of magnetic nanovectors for gene delivery. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2683–2688.
111. Ahmed, M.; Deng, Z.; Narain, R. Study of transfection efficiencies of cationic glyconanoparticles of different sizes in human cell line. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 1980–1987.
112. Frohlich, E.; Kueznik, T.; Samberger, C.; Roblegg, E.; Wrighton, C.; Pieber, T.R. Size-dependent effects of nanoparticles on the activity of cytochrome P450 isoenzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *242*, 326–332.
113. McBain, S.C.; Griesenbach, U.; Xenariou, S.; Keramane, A.; Batich, C.D.; Alton, E.W.F.W.; Dobson, J. Magnetic nanoparticles as Gene delivery agents: Enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 405102.
114. Kamau, S.W.; Hassa, P.O.; Steitz, B.; Petri-Fink, A.; Hofmann, H.; Hofmann-Antenbrink, M.; von Rechenberg, B.; Hottiger, M.O. Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e40.

115. Dimos, J.T.; Rodolfa, K.T.; Niakan, K.K.; Weisenthal, L.M.; Mitumoto, H.; Chung, W.; Croft, G.F.; Saphier, G.; Leibel, R.; Golland, R.; *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **2008**, *321*, 1218–1221.
116. Ebert, A.D.; Yu, J.; Rose, F.F., Jr.; Mattis, V.B.; Lorson, C.L.; Thomson, J.A.; Svendsen, C.N. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **2009**, *457*, 277–280.
117. Okita, K.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **2007**, *448*, 313–317.
118. Okita, K.; Nakagawa, M.; Hyenjong, H.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **2008**, *322*, 949–953.
119. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–782.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

《トピックス》

心不全に対する再生医療

— 幹細胞移植・細胞シート

五條理志 許 俊鋭*

要 旨

- 急性心筋梗塞に対する体性幹細胞移植による臨床研究が数多く行われ、systematic review も複数報告され、少ないながらも心機能の回復が認められた。
- 組織工学の中で、scaffold を要しない細胞シートは大きな変革をもたらした。角膜を含めて、すでに商品化に向けて大きな一歩を踏み出している。
- 細胞移植という方法論による治療法は、ドナー細胞としては骨格筋芽細胞・骨髄由来間葉系幹細胞・脂肪由来幹細胞・心筋幹細胞などが主に使用され、急性心筋梗塞から重症心不全まで、幅広い疾患に対して臨床研究が行われている。
- 左室補助人工心臓装着患者への再生医療を併施する治療は、大きなポテンシャルを有しており、われわれは心筋幹細胞移植との統合治療を計画している。

はじめに○

細胞移植で心臓病を治療する研究が行われはじめて久しい。その間に、幹細胞生物学の著しい進歩があり、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。再生医療という用語は、2000年に使われはじ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。中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。現在では、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おり、本稿では、これらの心臓再生療法の現況を概観する。

現在までに行われた心臓再生医療のメタアナリシス○

さまざまな臓器における幹細胞の研究から成人の臓器に存在する体性幹細胞に関する多くの知見が蓄積され、とくに、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、体性幹細胞を用いた細胞移植が多くの臓器で研究されている。急性心筋梗塞に対する報告が群を抜いて多く、骨髄や末梢血に由来する単核球もしくは CD34、CD133 細胞、骨髄由来の間葉系幹

* S. Gojo(特任准教授), S. Kyo(特任教授): 東京大学大学院医学系研究科重症心不全治療開発講座。

細胞などが、無作為比較対象試験(RCT)として実施されてきた。これらの細胞移植の臨床研究の症例数は1,000例を超え、2006年ころよりそれらの試験を統合した形で解釈したsystematic reviewが報告されている¹⁻³⁾。さまざまな指標が加重平均の差を使って統合・評価されており、収縮末期容量・拡張末期容量・心筋障害面積は細胞移植群で有意に有効であることが示された。一方、左室駆出率はばらつきが大きいものの、細胞群においてわずかではあるが3%程度の有意な改善があったことが、いずれのメタアナリシスでも示された。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、細胞数が多いほど駆出率の改善が大きい、もしくは、投与用量と有意な相関があると報告されている。安全性に関しては、どのレビューでも急性心筋梗塞における細胞移植は6カ月の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。

また、冠動脈バイパス術(CABG)に併施される形で、心外膜側より細胞移植が行われる形での臨床研究も多く報告されており、最近、メタアナリシスの結果が報告された⁴⁾。このプロトコルを採用した171の臨床研究の報告から、4つのRCTと2つのコホート試験を対象にメタアナリシスが行われた。その結果EFは5.4%有意に上昇し、左室拡張終末期容積(LVEDV)は9.56 ml有意に減少した。一方、有害事象の発生は有意な上昇はなく、骨髄幹細胞の直接心筋内移植は安全な治療法と考えられると報告されている。

心臓再生医療の方法論◎

1. 細胞シート

組織工学は細胞・増殖因子・scaffoldの3点セットで多くの研究がなされてきたが、scaffoldにはさまざまな問題点が指摘されてきた。細胞はscaffoldの表面に分布する傾向にあり充実性の組織の作出が困難であること、複数の細胞種を用い

ると三次元配列・構成をコントロールすることができないこと、増殖因子の濃度勾配等をコントロールできないこと、栄養血管を誘導することにハードルが存在することなどの障壁が存在する。

近年、デフォルトとして考えられてきたscaffoldを用いずに、細胞と最小限の生体材料で三次元の組織を構築しようとするアプローチが数多く報告されるようになってきている。中でも、細胞シートの創出は大きなブレイクスルーであった。37℃で疎水性の性質を有し、32℃で親水性となるpoly(N-isopropylacrylamide): PIPAAmについての研究がなされる中で、この物質を細胞培養皿表面に塗布することで、細胞培養の継代時に細胞回収のために行う細胞表面蛋白の酵素処理が不要となることが示された。この特徴を利用して、培養細胞を単層の密な状態にすることでシート状の構造体(細胞シート)として回収可能で、細胞の集合体がそれぞれの細胞の支持体となり、scaffoldを不要なものとした。この技術は細胞シート工学という領域を創出し、角膜を含めてきわめて広い領域で応用されている。これまで循環器系において、骨格筋芽細胞・間葉系幹細胞・血管内皮細胞・平滑筋細胞・心筋細胞をドナー細胞として細胞シートが作成され、さまざまな実験が行われ、その有効性が示されている⁵⁾。短所としてあげられていた単層であることは、細胞シートの重層化という技術が開発過程で、実用化の段階に達していることである。現在、大阪大学では重症心不全に対して骨格筋芽細胞シートを使った心機能改善を目標にした臨床研究が行われており、4層の重層化が臨床の場で使用されている。さらに、テルモ株式会社が骨格筋芽細胞シートの治験を計画している。細胞培養というステップを踏んだ再生医療の商品化という意味では、日本ではJ-TECのジェイスに次ぐ2例目である。規制を含めて、まだまだ多くのハードルがあると思われるが、再生医療が日本で根を下ろすことができるかどうかの試金石とも捉えられており、非常に大きな期待がかかっている。

2. 細胞移植

1) 骨格筋芽細胞：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。臨床応用にいたるまでに、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の臨床研究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⁶⁾。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。一方、米国では現在も虚血性心疾患への骨格筋細胞移植のRCTが進行中であり、phase IIが終了し良好な結果が出ているとして、phase II/IIIへ進捗していると報告されている。

2) 骨髄間葉系幹細胞：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(線維芽細胞)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細胞が倫理的な問題で臨床応用への距離がありすぎることを背景に、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、それに関わる報告が著しく増加した。現在のところ、慢性心不全に対する間葉系幹細胞移植のRCTが数多く進行中である⁷⁾。この領域は、ベンチャーカンパニーが細胞培養の領域で関与してい

ることが多いが、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ところが多い。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入が相半ばしていて、付着系細胞という性質より冠動脈注のプロトコールは報告されていない。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) 脂肪由来幹細胞：日常の臨床において、骨髄は血液疾患などでアプローチすることが一般的な組織であるが、脂肪組織は、形成外科において広く普及しているliposuction(脂肪吸引)という方法でアプローチされ、かつ、骨髄以上に採取しやすく、量的にも非常に豊富な組織である。脂肪100 mlから 5×10^7 個の有核細胞を抽出することが可能で、 $1 \times 10^3 \sim 4$ 個に1個の割合で幹細胞・前駆細胞が含まれていると報告されている。プタを用いた前臨床試験でも骨髄幹細胞と同様な結果が報告され、急性心筋梗塞および虚血性心筋症・慢性心不全に対して脂肪由来幹細胞移植のRCTが行われている。最近、急性心筋梗塞に対するAPOLLO試験⁸⁾からの結果が報告され、頻脈性不整脈の有意な低下等、その有効性が示された。現在、ヨーロッパでは急性心筋梗塞・心不全に対する脂肪由来幹細胞移植の保険償還に向けた臨床試験がはじめられている。

4) 心筋幹細胞：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。

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, プ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⁹⁾。この前臨床大動物研究の結果を基に, ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会での審議を経て承認を得, ALCADIA という試験名で ClinicalTrial.gov に登録され, 臨床試験が開始されている。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, 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 つのプロトコルを有している。現在, 第一アームの第 1 相 : 6 症例を昨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。臨床試験の進め方として, 安全性にとくに重きを置き, 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う形が取られている。2011 年 3 月の時点で 3 症例目に入っており, 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される予定であるが, 良好な結果が出はじめている。

人工心臓と再生療法の統合治療◎

2005 年から 2007 年にかけて, われわれ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。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 装着手術のときに併施された CABG のバイパスグラフトより経冠動脈に投与された。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。細胞移植を実施した 4 例の中で 1 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¹⁰⁾。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いる。また, 前出の大阪大学でも骨格筋芽シートを用いた臨床研究では, LVAD 装着患者に適応して, 4 例中 1 例にて LVAD からの離脱が成功したと報告している。しかし, ドイツからは 10 例の LVAD 装着患者において, LVAD 装着時に骨髄由来単核球の心筋内注入を行うも 1 例の離脱を認めるのみで, 細胞移植の有効性は明らかではないと報告された。これらの臨床研究からは, 有効性に関しては何ら結論的なものを語れるようなものではなく, 現在, 心筋幹細胞をドナー細胞として心筋内直接注入と bFGF gelatin sheet を併用する方法で, LVAD 装着患者へのプロトコル作成中である。

おわりに◎

昨年, 先端医療財団臨床研究情報センターより主要国における幹細胞臨床試験の現状がレポートされ, 合計 248 のプロトコルの中で日本は 11 のプロトコルが走っていて, 序列としては 7 番目ということである。国別では米国が 88, インドが 23, 中国が 20 となっており, インド・中国の急増ぶりが明らかとなった。iPS 細胞が報告されて, 再生医療実現化に向けて加速予算が計上されるなど, 一時下火となっていた再生医療への風向きも再び順風となっているが, 臨床をみると承認される臨床試験の増加のペースは緩やかである。

安全性を確保しながら, 新しいものを開発するリスクをどこまで許容するかは大きな問題である

と思われる。しかし、植込み型人工心臓が治験開始から3年で保険償還された事案をみると、リスクの大きな治療法でも、今という時代においては、迅速な医療現場への導入が可能な環境にあるように思われる。基礎研究での有望なプロトコルが1つでも多く、素早く、安全に臨床に応用されることを切に祈り、本稿の終りにしたい。

文 献●

- 1) Abdel-Latif A et al : Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair : a systematic review and meta-analysis. Arch Intern Med 167(10) : 989, 2007
- 2) Lipinski MJ 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(18) : 1761, 2007
- 3) Martin-Rendon E et al : Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction : a systematic review. Eur Heart J 29(15) : 1807, 2008
- 4) Donndorf P et al : Intramyocardial bone marrow stem cell transplantation during coronary artery bypass surgery : a meta-analysis. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, Epub ahead of print
- 5) Miyagawa S et al : Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets : a preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. Transplantation 90(4) : 364, 2010
- 6) Menasche P et al : The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial : first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. Circulation 117(9) : 1189, 2008
- 7) Hare JM : Translational development of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular diseases. Tex Heart Inst J 36(2) : 145, 2009
- 8) Meliga E et al : Adipose-derived cells. Cell Transplant 16(9) : 963, 2007
- 9) Takehara N 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(23) : 1858, 2008
- 10) Gojo S et al : Cardiac resurrection after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support. Ann Thorac Surg 83(2) : 661, 2007

INFORMATION

第 77 回 消化器心身医学研究会学術集会

日 時 2011 年 10 月 22 日 (土) 17:00~20:00 (予定)
(JDDW2011 会期: 10 月 20 日~23 日・第 3 日目)

会 場 博多港国際ターミナル 3F ターミナルホール
(〒812-0031 福岡市博多区沖浜町 14-1 Tel 092-282-4871)

会 長 田妻 進 (広島大学病院医系総合診療科)
浅川明弘 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会行動医学講座心身内科学分野)

演題応募方法 Web 登録システムにてお申し込み下さい。

URL ; <https://ds-pharma.jp/form/fm/syoukaki77>

消化器心身医学研究会ホームページからが便利です。

演題応募締切 2011 年 8 月 10 日 (水) 必着

参加証 日本心身医学会指導医・認定医研修 3 単位, 日本心療内科学会 3 単位

参加費 1,000 円

問合せ 大日本住友製薬株式会社 CNS 統括部内
「第 77 回消化器心身医学研究会学術集会」係宛
〒104-8356 東京都中央区京橋 1-13-1
Tel 03-5159-2530 Fax 03-5159-2944

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)} 許俊鏡^{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	無作為ブラセボ比較二重盲検	87	ICM	≤.40	BM-MNC	自己	Ten	II
N Noiseux	無作為ブ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	無作為ブラセボ比較二重盲検	100	IHD	<.50	BM-MNC	自己	IC	I/II
W Sherman	無作為ブ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	無作為ブ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	無作為ブ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 Bolli	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	無作為ブ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	無作為ブ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、臨床研究としての主流であった。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、プロトコールはまちまちで、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、最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ー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ー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、収縮期末容量・拡張期末容量・心筋障害面積・左室駆出率を、加重平均の差を使って統合しフォレストプロットで評価されており、収縮期末容量・拡張期末容量・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ヶ月の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細胞が倫理的な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: provenge)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しての開発も進行中で、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粋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入が相半ばしていて、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ところである。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應されており、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應基準の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機種の植込み型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つて、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