

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-ky@umin.ac.jp

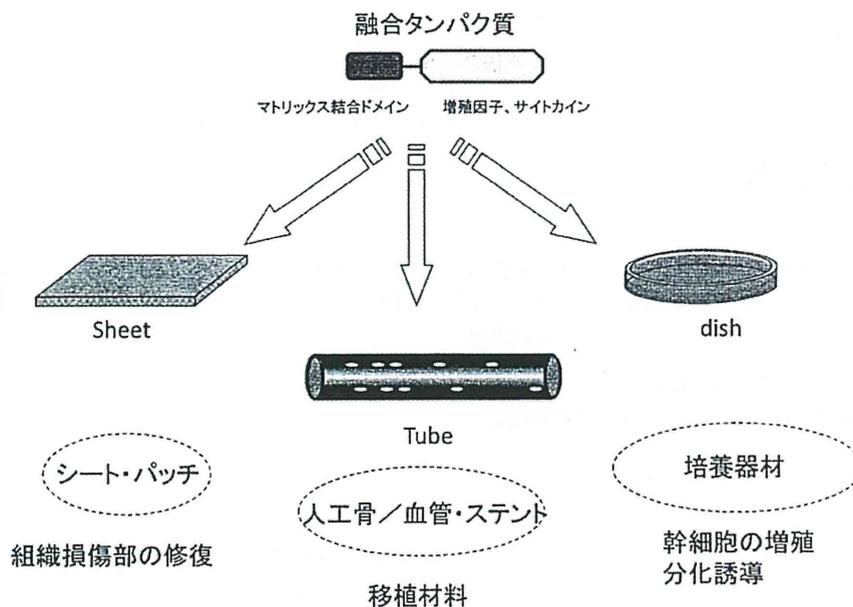


図1 組織工学を利用した再生医療への応用

傷部位へそれを貼り付けることによって、細胞の増殖や血管誘導などを引き起こすことが期待されるなど、今後、医療へ幅広く応用できることが見込まれる。

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には次のような様々な問題点が指摘されている。すなわち、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など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である。近年、デフォルトとして考えられてきたscaffoldを横に置いて、細胞と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。この方法は総じて、「バイオファブリケーション」とも「コンピュータ支援組織工学」とも呼ばれていて、バイオプリンティングやオーガニプリンティングといった手法もその範疇に入る。また、細胞シートの重層化という技術は、その中でも実用化が最も進んだ戦略であり、日本発の再生医療関連プロダクトとして世界に発信されている³⁾。私信ではあるが、数層が限界であった重層化は現在、数十層・血管新生を伴う形にまで進化しているとのことである。また、インクジェットプリンタの技術を用いた三次元構造物はラビットプロトタイプングとして既に世に出ているが、インクジェットノズルから打ち出される液滴はちょうど細胞の容積と同等で

～数百plであり、清浄な無菌環境下で稼働できる三次元プリンタが開発され⁴⁾、三次元組織の構築が可能となっている⁵⁾。別の方法として、幹細胞の単離に利用されるsphere formationであるが、このsphereを数多く作り、任意の構造に積み上げることで三次元構築を行う“bio rapid prototyping”という方法も報告されている。細胞の溶媒の問題とといったまだまだ改善を行わなければならない点、解決されていない問題点など、課題を多くを抱えているが、非常に有望な方法論として期待されている。

近年報告されたscaffoldを用いたユニークな組織作出法として、「臓器灌流脱細胞化」というテクノロジーがある。心臓をランゲンドルフ冠灌流装置にてSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)という界面活性剤を用いて12時間以上灌流をすることで、完全に細胞内構造物の除去を可能にした。一方で、細胞外マトリックスであるcollagen type I / IIIやラミニン・ファイブロネクチンといった構成物質は配列も乱されることなく保存されており、血管や心外膜のbasal membrane・弁構造などには影響がなかったと報告された⁶⁾。このscaffoldを用いて細胞を灌流させ、再び細胞化させることで弱いながらも心拍動を得ることに成功している。動物は小動物であるラットのみでなく、大動物であるブタでも同様の結果が出たとしている。しかし、細胞化がまだ不十分で*in vivo*の実験に供されるデータではないようであるが、独創的な取り組みであり、今後の展開に期待が持たれている。

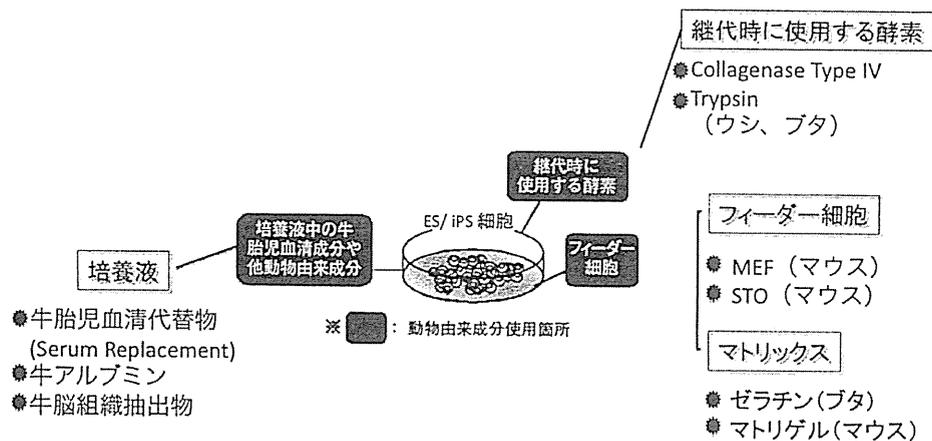


図2 ヒトES/iPS細胞培養系には様々な培養過程で異種由来成分を含む

3. 再生医療

2000年に「再生医療」という言葉が使われ始めて10年が経過しようとしている。この10年は、ヒトES(胚性幹)細胞の研究の是非に始まり、体性幹細胞の可塑性が確認され、循環器領域や整形外科領域を中心に活発に臨床応用が展開された。そのような状況の中で、核移植によるリプログラミングが哺乳動物で認められた現象は、緻密に計画された実験によって4つの遺伝子を導入することによっても達成された。このiPS(人工多能性幹)細胞と名付けられた細胞が、ここ数年の再生医学の話題の中心であることに間違いはないと思われる。iPS細胞に関しては、臨床応用の基礎研究として、マウスiPS細胞を用いてParkinson病⁷⁾, sickle cell anemia⁸⁾, 血友病⁹⁾などのモデルマウスの治療の成功が報告されている。しかし、iPS細胞には、未分化細胞からの奇形腫の発生や遺伝子導入による癌腫の発生、また細胞培養に使用する xenogenic materials による感染の危険性などの問題点が指摘されている。臨床応用に当たっては、*ex vivo* gene therapy という範疇に入ることから、クリアしなければならない規制のハードルは決して低くはない。これらの問題は、極めて多くの研究者の関心を引き寄せ、解決策として多くの報告がなされている。

テラトーマ形成に関しては、SSEA-1陽性細胞の除去⁷⁾や心筋細胞への分化においてミトコンドリアを指標に純度を極めて高い状態にすることで¹⁰⁾, マウスにおいては阻止することが可能であると報告されている。初期化遺伝子と言われる山中4因子の中で発癌遺伝子であるc-Mycの存在は当初より癌化の危険が危惧されていたが、c-Mycの再活性化による発癌は*in vivo*において確認された。また、遺伝子導入に使われたベクターがレトロウイルスであることか

ら、ゲノムへの挿入に伴う癌化という問題点も挙げられてきた。その後、c-Mycを除いた3因子でも低頻度ながらiPS細胞は誘導されることが報告されたが、最近になり、効率向上とレトロウイルスの問題点を迂回する方法として、低分子化合物もしくはリプログラミング遺伝子産物であるタンパク質導入によるiPS細胞の誘導が報告され始めている。4因子のうち Sox2 と c-Myc は TGF- β (トランスフォーミング増殖因子- β) 受容体阻害剤によって代替でき¹¹⁾, 核受容体である Esrrb は Klf4 を代替する可能性が示され¹²⁾, 最後の Oct4 も核受容体 Nr5a2 で代替できると報告された¹³⁾。さらには、4因子すべてを低分子化合物で行うことの可能性が示唆されている¹⁴⁾。遺伝子導入法と同様に、様々な細胞へのタンパク質導入法が開発されてきたが、ヒト免疫不全ウイルスI型が発現する trans-activator of transcription protein を改変した導入効率の高いペプチドを用いて、4因子すべてのタンパク質を48時間ごとに4回加えることでES細胞様の細胞が作製できたとして、piPS (protein-induced PS) 細胞と名づけて報告された¹⁵⁾。

現在一般的なES/iPS細胞の培養では、様々な過程で異種動物由来成分を使っている(図2)。ES/iPS細胞共に未分化性を維持するためにフィーダー細胞が用いられ、これには一般的にマイトマイシンCで処理され増殖停止にしたマウス胎児線維芽細胞が用いられている。治療を目的とした細胞である場合、異種動物の細胞と共培養していることによる、異種細胞そのもの、もしくは断片の混入が危惧されてきたが、その証左として、培養されたヒトES細胞の細胞表面にヒト由来しない Neu5Gc が確認された。多くの人はこの抗原に対する抗体を有しており、免疫反応が惹起されることが報告されている¹⁶⁾。また、ヒトES細胞はマウス肉腫由来の細胞外マトリックス・増殖因子を含む

マトリゲル上で培養されることがあるが、近年、Lactate Dehydrogenase-elevating Virusに汚染されているロットの存在が明らかとなった。このような危険を回避するために、完全合成化合物による細胞培養皿のコートニングと培養液の開発がされている。ヒトES/iPS細胞の未分化維持にはフィーダー細胞にbFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)の添加が重要である¹⁷⁾に加えて、TGF- β シグナル¹⁸⁾や、IGF(インスリン様成長因子)も関与していること¹⁹⁾が報告されている。これは、細胞数を増やしていくためには接着基質や増殖因子を持続的に添加していくことが必要であることを示している。ここでも、これまで述べてきた細胞外マトリックスであるコラーゲンやファイブロネクチンとの結合ドメインに固定化した増殖因子が、有効な技術となる。これらをシャーレ上に固定しておけば、活性の持続的効果を期待できる。またこの方法は、同一容器内で固定化した区画によって受ける異なる環境を作り出すことも可能であり、細胞間相互作用による分化誘導を生体環境に近い形で構築できるとともに、生体外での移植組織の作製へとつながるであろう。

移植医療の臨床応用に向けて、細胞そのものと同時に「ニッチ」と呼ばれる周辺環境を整えて培養する方法として、細胞外マトリックスの組換え合成タンパク質の使用や、インテグリンリガンドである細胞外マトリックスの認識配列の合成ペプチド²⁰⁾、合成高分子を固定化した方法など、新たな技術が次々に報告されてきている。しかしながら、未だにどの研究者が使っても従来のXenogenic Materialsを使用した培養法に匹敵するクオリティーを出すことのできるXeno-Freeの培養法はなく、未分化性維持のメカニズムの解明とともに商品開発の競争が続いている。

iPS細胞で一気にブームとなったリプログラミングに関しては、まだほとんどのことが未解決のままである。体細胞核が全能性を再び獲得し得ることを示した核移植と4因子導入によるリプログラミングが果たして同等なのかということですら回答は得られていない。iPS細胞のクローン間での幹細胞関連遺伝子の発現の違いや親細胞の記憶が残っていたりすること、また卵には4因子のうちOct3/4の発現しか認められていないことから考えると、リプログラミングは複数の経路が存在することが示唆されている。

一方、リプログラミングの正体が解らないままではあるが、その現象を促進する因子として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンAが報告されている²¹⁾。時間的にも量的にも厳格に制御された条件での使用が必須であり、そのメカニズムの精緻さを窺わせる。

もう一つ最近のトピックスとして、「ダイレクトリプロ

グラミング」と名づけられた現象がいくつかの臓器において報告されている。骨格筋細胞はMyoDというマスター遺伝子によって線維芽細胞から誘導されることが報告されて以来、多くの研究者がこのマスター遺伝子をいろいろな細胞で探索したが、骨格筋細胞以外で発見されてはいない。しかし、iPS細胞で遺伝子を4つ使ったことにより、細胞を変化させることが可能となったことより、一群の遺伝子導入によるトランスフォームの検討がなされ、これがダイレクトリプログラミングと呼ばれるようになった。1報目は、膵臓の外分泌細胞にNgn3/Pdx1/MafAの3つの因子を遺伝子導入することでインスリンを分泌する β 細胞様に分化させることに成功したとのものである²²⁾。また、マウス中胚葉細胞にGata4/Tbx5/Baf60cを導入することで心筋細胞の構成タンパク質を発現する細胞へと誘導することに成功したとの報告もある²³⁾。本年になり、Ascl1/Brn2/Myt1lを線維芽細胞に導入することで機能を有する神経細胞へと誘導できること²⁴⁾や、Gata4/Tbx5/Mef2cを同様に線維芽細胞に導入することで心筋様細胞に誘導できる²⁵⁾など、報告が活発に行われている。これらの細胞が果たして、導入遺伝子の下流に存在する特定の遺伝子発現をもたらしただけの可能性も否定することはできないが、こうして得られた細胞は増えることはなく、腫瘍化の懸念がないとされている。細胞数の確保、その細胞集団の形態を維持しながら生体内への移植、生体内での持続的機能について組織工学との融合により移植医療として用いるための有効な細胞ソースとなり得ることが期待できる。

体性幹細胞は、骨髄や骨格筋由来の細胞移植の結果が“mixed results from mixed cells”と言われたように、プロトコールに大きな隔りがあるため一定の評価ができない期間がしばらくあったが、ようやく複数のプロトコールを統合して結果を出せるような状況となり、一定の有効性はあるとのmeta-analysisの報告が複数行われた^{26),27)}。

心臓は終末分化を行い修復機能や恒常性維持機能を持たない臓器として長らく考えられてきたことが、このように心臓外に幹細胞を求めるといった流れを作ったと思われる。この流れの中で医療廃棄物として破棄される胎児関連組織(羊膜・臍帯・胎盤など)由来の細胞が、幹細胞の特徴の一つである可塑性を強く示していることから、Tsujiらは当該ヒト組織のバンキングを開始しており、さらにラットを用いた心筋虚血モデルにおいてヒト羊膜由来細胞移植による心筋再生が起こることを報告している²⁸⁾。一方、数年前より、「心臓は再生機構を持っている」との仮定からの研究が大きな潮流を形成している。以前より、その仮定を主張し続けていた研究者はいたが、このような広がりきつ

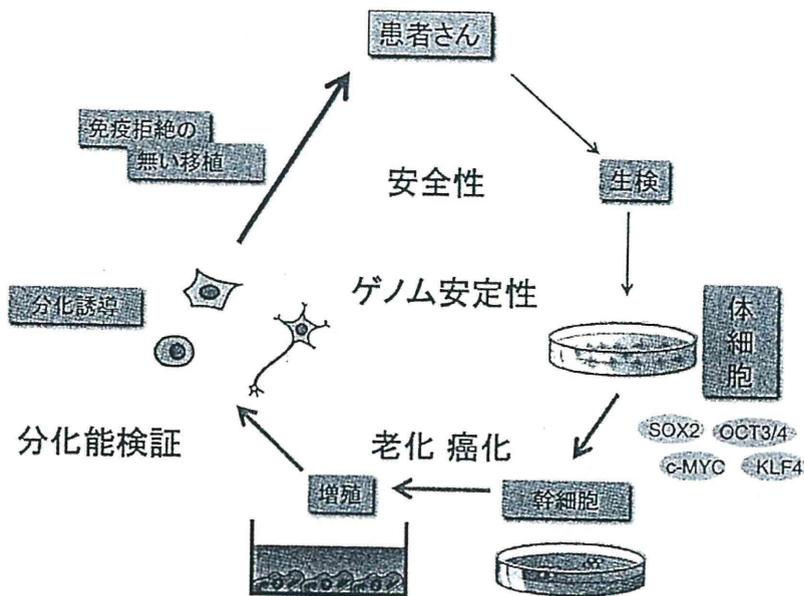


図3 幹細胞によるオーダーメイド細胞移植医療

けは, embryonic bodyに着想を得たと思われる方法であり, 心臓組織に由来する細胞を sphere 形成させることで未分化に近い細胞群を選別し得るという報告²⁹⁾である。それ以降, 複数の施設から心臓に存在する幹細胞・前駆細胞の存在が相次いで報告された。それらの細胞のプロファイルは異なっており, Sca-1陽性, c-kit陽性, islet-1陽性, side population細胞などが挙げられている。これが分化の過程の途上を見ているのか, 複数の幹細胞システムが存在するのかは, 今後解決されなければならない問題である。中でも Sca-1陽性の細胞をマウスで報告し³⁰⁾, ブタを使った preclinical study³¹⁾を丁寧に報告したTakeharaらは, ヒト幹細胞を用いた臨床研究の指針に合致した, 心臓では初めての細胞移植の臨床第1例目を本年6月に施行した。

この臨床試験は, 左室駆出率が35%以下に低下した重症慢性虚血性心不全患者を対象とし, 方法は冠状動脈バイパスを施行する時に, 予めバイオプシーにて右室中隔側より採取した~20 mgの心筋組織より単離した心筋幹細胞を心外膜側より25 μ lずつ, 5 \times 10⁵個/kgの総量になるように合計20ヶ所に筋注し, 当該部位をbFGF徐放ゼラチンシートにて覆うものである。細胞培養はxenogeneic materialsは使用せず, recombinant bFGFを使用するも, 血清は自己血から採取されたものが使用された。ランダム化はせず, 非盲検のPhase I/IIaの臨床試験として6例が予定されており, 1年の追跡調査が予定されている。その後は, 多施設臨床研究として症例を積み重ね, 高度先進医療への展開が計画されている。

生体内では常に細胞が新陳代謝を繰り返すことによって恒常性を維持している。今後の研究が進展し, 細胞そのものを一種の薬として, 理想的にはオーダーメイド医療としての細胞移植による再生医療(図3)は, 今後日本が迎える高齢社会において重要な医療となっていくと考えられる。細胞移植を実用化レベルまで持つていくためには様々な課題があり, それに応じたアプローチが必要で分野を超えた融合的研究が展開していくことが期待される。

4. おわりに

本原稿を執筆中の2010年8月23日に厚生労働相厚生科学審議会技術部会でヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する治療指針の改正案が審議され, 自己のiPS細胞に限定して臨床試験への門戸が開かれることとなった。さらに, ヒト胚の臨床応用の指針の成立後という条件付きではあるがヒトES細胞に対しても審議の扉が開かれた。今後, 様々なハードルが存在するであろうが, 大きな一歩であることは間違いない。一方, アメリカではヒトES細胞研究の差止請求が連邦地裁で認められるなど, この分野の研究者や幹細胞治療に一筋の光明を見ている患者にとっては厳しい状況も起っている。

本レビューの執筆に当たり, 改めて様々な報告を読み返し, 地道でも着実な研究が進んでいることに大きな希望を持った筆者の思いが少しでも本稿で伝えることができれば幸いである。

文 献

- 1) Kitajima T, Sakuragi M, Hasuda H, et al: A chimeric epidermal growth factor with fibrin affinity promotes repair of injured keratinocyte sheets. *Acta Biomater* 5: 2623-32, 2009
- 2) Ohkawara N, Ueda H, Shinozaki S, et al: Hepatocyte growth factor fusion protein having collagen-binding activity (CBD-HGF) accelerates re-endothelialization and intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *J Atheroscler Thromb* 14: 185-91, 2007
- 3) Shimizu T, Sekine H, Yamato M, et al: Cell sheet-based myocardial tissue engineering: new hope for damaged heart rescue. *Curr Pharm Des* 15: 2807-14, 2009
- 4) Nishiyama Y, Nakamura M, Henmi C, et al: Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology. *J Biomech Eng* 131: 035001, 2009
- 5) Norotte C, Marga FS, Niklason LE, et al: Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* 30: 5910-7, 2009
- 6) Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al: Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 14: 213-21, 2008
- 7) Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al: Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5856-61, 2008
- 8) Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al: Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318: 1920-3, 2007
- 9) Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al: Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 808-13, 2009
- 10) Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al: Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 7: 61-6, 2010
- 11) Maherali N, Hochedlinger K: Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19: 1718-23, 2009
- 12) Feng B, Jiang J, Kraus P, et al: Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 11: 197-203, 2009
- 13) Heng JC, Feng B, Han J, et al: The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 6: 167-74, 2010
- 14) Desponts C, Ding S: Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol* 636: 207-18, 2010
- 15) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al: Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-4, 2009
- 16) Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al: Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11: 228-32, 2005
- 17) Xu RH, Peck RM, Li DS, et al: Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2: 185-90, 2005
- 18) Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ: Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24: 1476-86, 2006
- 19) Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, et al: IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448: 1015-21, 2007
- 20) Melkoumian Z, Weber JL, Weber DM, et al: Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 28: 606-10, 2010
- 21) Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T, et al: Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Dev Biol* 289: 195-205, 2006
- 22) Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al: In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-32, 2008
- 23) Takeuchi JK, Bruneau BG: Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-11, 2009
- 24) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al: Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-41, 2010
- 25) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142: 375-86, 2010
- 26) 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: 989-97, 2007
- 27) 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: 1761-7, 2007
- 28) 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: 1613-23, 2010
- 29) 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: 911-21, 2004
- 30) 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: 12313-8, 2003
- 31) 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: 1858-65, 2008

心臓における再生医療

細胞移植を方法論とした再生医療は、心臓において特に盛んに臨床試験がなされている。わが国においても、ヒト幹細胞治療指針に合致したプロトコールが3つ走っている。再生医療の揺籃期であると思われる今、新しい臓器再生への方法論であるダイレクトリプログラミングがさまざまな細胞種で報告され始めており、遺伝子治療との統合にも大きなポテンシャルが示されている。さらに、臓器間葉組織の再構築という視点からの臓器修復の戦略も提示されており、ますます治療の選択肢が広がっている。再生医療が人工心臓とともに重症心不全治療における車の両輪となるのも遠くはないと予感させる現状をレビューする。

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心臓外科

五條 理志

GOJO, Satoshi

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

上 大介

KAMI, Daisuke

Key Word

心臓幹細胞 ダイレクトリプログラミング
心外膜細胞 細胞移植

1. はじめに

日本人の高齢化と食生活の欧米化は生活習慣病を招き、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(図1)。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・組織に何らかの方法で移植することで機能回復を期待する療法である。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。

この細胞移植療法に用いられる移植細胞源の候補として、胚性幹細胞(ES細胞)に匹敵する

多分化能を有する人工多能性幹細胞(iPS細胞)があげられている。しかし、iPS細胞は心筋細胞への分化誘導は確認できるものの、低い誘導効率、細胞株によっては奇形腫形成しやすいといった問題点を有するため、現状の技術では臨床応用には安全性に問題を残している。このiPS細胞に代わる移植細胞源として、骨髄や骨格筋芽細胞、side population細胞、血管内皮前駆細胞、サテライト細胞、心筋幹細胞などがあげられている。2000年前後からこれらの細胞を用いた心臓に対する細胞移植療法が本格的に始まっており、回復に寄与した例もいくつか報告されている^{1), 2)}。

ALCADIA: AutoLogous human CArdiac-Derived stem cell to treat Ischemic cArdiomyopathy
ATP: adenosine 5'-triphosphate
bFGF: basic fibroblast growth factor
CD: cluster differentiation
ES: embryonic stem
GFP: green fluorescent protein
iPS: induced pluripotent stem

POINT

心臓幹細胞：再生しないと考えられていた心臓・中枢神経においても、組織の恒常性維持に細胞のターンオーバーが少なくながらも寄与していることがさまざま

な研究から明らかとなってきた。心臓幹細胞は、いまだ純化・単離をできるだけの方法論がなく、ある程度の絞り込みが可能になったというのが現状である。

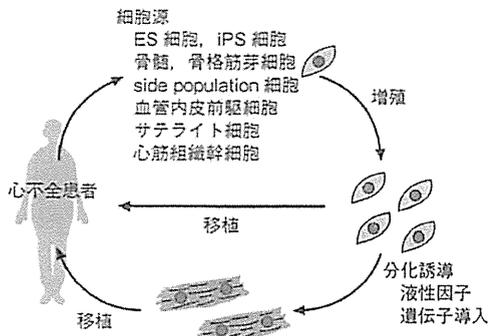


図1 細胞移植療法

本稿では心臓への再生医療の最近の代表例として、2010年に京都府立医科大学で行われた心筋幹細胞を用いた重症心不全患者への臨床試験ALCADIAと、今後の再生医療に应用される可能性の高い心筋細胞分化誘導法の研究成果、移植に適した細胞源のup-to-dateな知見について概観したい。

2. ALCADIA

近年まで心臓は再生しない臓器だと考えられてきたが、Bergmannらによって70歳までに心筋細胞の約50%が新しい細胞に置換していることが明らかにされ、心臓に幹細胞が存在していることが示唆された³⁾。また、2007年には松原らによって、マウス心臓組織から心筋幹細胞が単離され⁴⁾、この心筋幹細胞は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)依存性の増殖を示した。この心筋幹細胞は未分化の転写因子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, *Rex1*)と心筋発生初期の転写因子(*Nkx2-5*, *Gata4*)を発現し、間葉系幹細胞に類似の細胞表面抗原を示した(*CD29*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *Stro-1*は陽性、*CD31*, *CD45*は陰性)。さらに、活動電位を有する心筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞への多分化能を有していること

も明らかになっている。

重症心不全患者(68~82歳、虚血性心疾患4例、心臓弁膜症1例、心不全症状分類クラスIIおよびIIIまで)の心筋生検から採取した細胞にbFGFを加えて培養したところ、6~8週で 10^9 個まで増殖し幹細胞関連因子の発現を認めた。また、この細胞の細胞移植における効能を評価するために、ブタ慢性虚血性心不全心モデルを用いて前臨床試験が行われた。この際、移植した細胞の生着を促進するbFGF徐放ゼラチンハイドロゲルシートの効果も検討された。その結果、心筋幹細胞とbFGF徐放ゼラチンハイドロゲルシートを用いた群で、移植細胞が有意に生着し心筋細胞に分化誘導され、心機能が有意に回復することが明らかになった⁵⁾。

これらの成果を元に、2009年9月に松原らはヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会の承認を受け、重症心不全患者への臨床試験を開始した。今回の試験では、冠状動脈バイパス術予定の重症虚血性心筋症患者が対象とされた。2010年6月に、対象患者の心筋生検から細胞が回収され、bFGF存在下にて約1カ月間培養された。培養によって増殖した細胞は、手術中に心筋内に移植され、その上にbFGF徐放ゼラチンハイドロゲルシートが貼り付けられた。この移植の結果、手術前は26%の収縮能が41%まで改善し、患者は翌月の7月に退院し、現在も健康に過ごされている。

このように、ALCADIAによる世界初の心臓幹細胞の移植は、収縮機能の改善に寄与した。今後は、さらなる症例の積み重ねと他施設において同様の手技による手術が行われ、本臨床試験の有用性が実証されることを期待したい。

3. ダイレクトリプログラミング

2007年、山中らによって発表されたヒト

POINT

ダイレクトリプログラミング: この現象がマウスで報告されて2年余り経つが、いまだにヒトにおける報告はない(2010年11月現在)。ヒトでの作出はiPS細胞

は1年で実現したが、ES細胞は17年を要した。この現象がヒトで再現可能か、可能ならどれくらいの時間を要するのか、ホットな領域となっている。

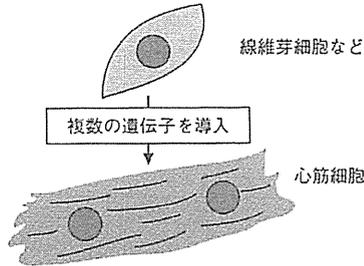


図2 ダイレクトリプログラミングによる心筋分化誘導

iPS細胞は世界中に大きな衝撃を与えた。iPS細胞は線維芽細胞に4遺伝子(*Oct3/4*, *Sox2*, *cMyc*, *Klf4*)を強制的に発現させることでES細胞と同等の能力を有した細胞である。この研究成果は、細胞に特定の遺伝子を複数組み合わせ導入するだけで、あらゆる目的の細胞への分化誘導ができる可能性を示している。つまり、線維芽細胞に特定転写因子を遺伝子導入することで、心筋細胞や肝細胞、肺胞細胞といった終分化した細胞に直接分化誘導できる可能性がある。この現象はダイレクトリプログラミングと名付けられ(図2)、すでに神経細胞や膵β細胞への分化誘導の成功例が報告されており、非常にホットな研究分野でもある。また、心筋細胞へのダイレクトリプログラミングについても、2つの異なった対象に対して報告されている。

1つ目は2009年4月に、竹内らによって報告されたマウス胚(中胚葉分化予定領域)から心筋細胞へのダイレクトリプログラミングである⁶⁾。マウス胚(発生6.5~7日目)の中胚葉分化予定領域に2つの転写因子(*Tbx5*, *Gata4*)とクロマチンリモデリング因子*Baf60c*を導入して培養したところ、培養1日後(7.5日胚)に拍動(16胚中8胚が拍動)し、心筋特異的な遺伝子(*Nppa*, *Myl2*, *Myl7*, *Tnnt2*, *Myh6*, *Actc1*, *Nkx2-5*)と構造タンパク質(*cTnT*,

Actc1)を発現したと報告された。*Baf60c*は心臓で高発現しているSwi/Snf型ATP依存性クロマチンリモデリング複合体の構成因子の1つである。*Baf60c*はこの複合体の中で中心的な役割を担っており、クロマチンを解きほぐし、心筋分化に関連する転写因子と相互作用して特定のプロモータ領域を活性化させつつ、心筋に特異的な転写因子を複数発現させることで、通常なら拍動しない組織の心筋分化誘導を可能にした。この論文の中で、内胚葉分化予定領域に遺伝子導入しても拍動しなかったという非常に興味深い知見が報告されている。筆者らのチームもマウス細胞に*Tbx5*, *Gata4*, *Baf60c*を遺伝子導入しても心筋分化誘導能に変化がないことを実証している。つまり、*Tbx5*, *Gata4*, *Baf60c*の遺伝子セットは、特定の細胞状態、中胚葉性細胞のみを心筋細胞に分化誘導できることを示唆している。

2つ目の報告は2010年8月に家田らによるトランスジェニックマウスを用いて解析したダイレクトリプログラミング法である⁷⁾。このマウスは心筋特異的な構造タンパク質であるαミオシン重鎖のプロモータ配列の下流にGFP遺伝子が存在しているため、心臓組織特異的にGFPが発現するマウスである。家田らはこのマウスから心筋線維芽細胞や尾先端線維芽細胞といった初代培養細胞(ともにGFP陰性細胞)を樹立し、前述した竹内らの3遺伝子と一部異なる3遺伝子(*Tbx5*, *Gata4*, *Mef2c*)を導入することで、GFP⁺の活動電位を示す拍動型の心筋細胞への分化誘導に成功した。この3遺伝子を心筋線維芽細胞に導入したところ、1週間後にGFP⁺細胞が全細胞の20%、さらに全細胞の4%が心筋特異的な構造タンパク質トロポニンT陽性細胞に分化し、横紋状の構造タンパク質を発現した。また、マイクロアレイ解析

POINT

心外膜細胞：左室構成細胞の起源に関する発生学的な研究は、右室に比べ種々に乏しい。心外膜細胞の上皮間葉移行を介した心筋細胞の生物学・物理的な支持が

最近明らかになってきており、収縮能を改善するには、欠落した心筋細胞を捕うという方法論に加え、サポート機構の再構築という新しい展開が始まっている。

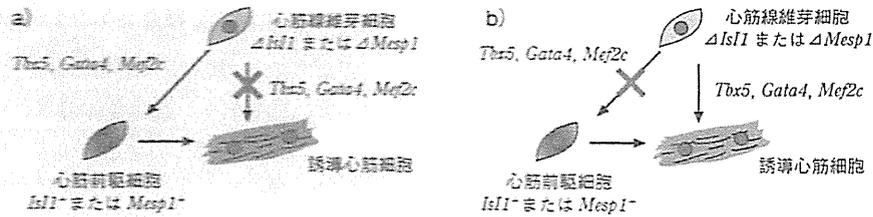


図3 ダイレクトリプログラミングの経路

結果では、誘導心筋細胞は心筋線維芽細胞より心筋細胞に近い遺伝子発現パターンを示していた。この分化様式が、直接的に誘導心筋細胞に分化するのか、それとも心筋前駆細胞を経由してから誘導心筋細胞に分化するのかを調べるために、心筋前駆細胞マーカーである *Mesp1* や *Isl1* が発現すると黄色蛍光タンパク質が発現する心筋線維芽細胞をそれぞれ作製した。もし心筋前駆細胞を経由してから誘導心筋細胞に分化するのならば、これらの遺伝子の発現は必須であるため、心筋線維芽細胞に3遺伝子を導入すると黄色蛍光タンパク質陽性の誘導心筋細胞に分化する(図3a)。しかし、この遺伝子操作を行ったどちらの心筋線維芽細胞に3遺伝子を導入しても、黄色蛍光タンパク質陰性の誘導心筋細胞に分化したことから、このダイレクトリプログラミングでは心筋前駆細胞を経由せず心筋細胞に直接分化することが明らかとなった(図3b)。

4. epicardium progenitor or stem cell

哺乳類の心臓はおもに4つの異なった領域の細胞群から構成されている。1つ目は前側側板中胚葉由来の心臓領域で、おもに心臓心房心室の心筋層、心内膜、房室弁などを形成する。2つ目は背側領域の前側臓中胚葉由来の *Isl1*⁺ の細胞群で、おもに右室を中心とした組織を形

成する。3つ目は神経管背側外胚葉性組織由来の心臓神経堤細胞と呼ばれる細胞群で、^{さいきょう} 鰓弓動脈などの心大血管形成に大きく関与する。4つ目は心臓発生初期に前心外膜組織由来細胞から遊走する細胞群で、心外膜を形成し心筋細胞の成育に役立つことが知られている。

心外膜は心臓組織の最外部に当たる二重の膜である。心臓発生の初期に心臓を被膜した細胞は増殖し、上皮間葉移行を経て、最終的には心筋層の厚みを増加させる。この厚みの増加は心臓発生においては重要な役割を果たしており、心外膜細胞の遊走因子である *Thymosin β4* をノックダウンしたマウスの心筋層は薄くなり、スポンジ状になってしまう⁸⁾。また、心外膜細胞は幹細胞としての性質ももっており、心外膜細胞内で発現する *Epicardin* は分化誘導にかかわる転写因子 (*bHLH*, *E2A*, *MyoD*) を抑制し、細胞分裂を促進するように働き、未分化状態を維持することが知られている⁹⁾。さらに、上皮間葉移行で心臓組織内に移動した細胞は、胎児期の心筋細胞の増殖と成熟を促すとともに¹⁰⁾、血管内皮細胞や線維芽細胞、平滑筋細胞に分化誘導することも報告されている⁸⁾。ただし、心筋細胞にも分化できるという報告^{11)~13)}や、その一方で分化できないという報告⁸⁾もあり、どちらが正しいのかについての説明は今後の課題である。

心外膜は心臓組織最外部に存在するため、組

POINT

細胞移植の課題：臨床試験が1000例以上行われ、システミック・レビューが行われるまでになったが、投与する細胞種と同様に投与方法も課題となっている。

また、2010年11月に公表された幹細胞治療に関する指針では、細胞加工の中央化を見据えた改正がなされ、再生医療を推進するうえで大きな進歩である。

織は簡便に取得できる。また、ラット心臓組織から心外膜細胞を単離する手法はすでに確立されており、心臓組織片をThymosin β 4含有培地中で培養することで、組織片からEpicardin⁺の細胞が遊走し、単離できることが報告されている⁹⁾。Epicardin⁺の細胞は接着培養により増殖でき、心臓組織内への遊走と心筋細胞の増殖、複数の細胞種に分化も可能なため、心臓組織への細胞移植療法に非常に適した細胞源として期待されている。

5. おわりに

ここ数年における心臓組織への細胞移植を用いた再生医療は急速に発展しており、心不全患者への心臓移植に代わる新たな治療法として注目を集めている。今回紹介したALCADIAやダイレクトリプログラミング、心外膜細胞についての研究はすべて自己由来の細胞や組織を用

いることが可能なため、免疫抑制剤の併用や患者への心理的な負担がないという優れた特徴を有する。

今後は、最適な細胞移植の手法、投与方法の検討が重要な課題である。冠動脈からの投与と心筋への直接投与を比較したところ、冠動脈からの投与では5%程度の生着で、心機能の改善はわずかであった。一方で新たな心臓への再生医療の方法として、細胞シートを用いた手法が岡野らにより開発されており、臨床研究にも応用されている。今後、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、一人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付くことを切望する。

■著者連絡先メールアドレス
satoshigojo-ky@umin.ac.jp

■文献

- 1) Gojo S, Kyo S, Nishimura S, et al: Cardiac resurrección after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support, *Ann Thorac Surg* 83(2): 661-662, 2007
- 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(2): 133-136, 2009
- 3) Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al: Evidence for cardiomyocyte renewal in humans, *Science* 324(5923): 98-102, 2009
- 4) Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, et al: Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration, *J Cell Sci* 120(Pt 10): 1791-1800, 2007
- 5) 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(23): 1858-1865, 2008
- 6) Takeuchi JK, Bruneau BG: Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors, *Nature* 459(7247): 708-711, 2009
- 7) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors, *Cell* 142(3): 375-386, 2010
- 8) Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al: Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization, *Nature* 445(7124): 177-182, 2007
- 9) Funato N, Ohyama K, Kuroda T, et al: Basic helix-loop-helix transcription factor epicardin/capsulin/Pod-1 suppresses differentiation by negative regulation of transcription, *J Biol Chem* 278(9): 7486-7493, 2003
- 10) Weeke-Klimp A, Bax NA, Bellu AR, et al: Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes, *J Mol Cell Cardiol* 49(4): 606-616, 2010
- 11) Winter EM, Grauss RW, Hogers B, et al: Preservation of left ventricular function and attenuation of

remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart, Circulation 116(8): 917-927, 2007

- 12) Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al: Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium, Circ Res 101(12): 1255-1265, 2007
- 13) Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al: A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells, Nature 454(7200): 104-108, 2008

Clinical Engineering

臨床工学ジャーナル【クリニカルエンジニアリング】

●B5判・毎月25日発行
●定価 1,470円(本体 1,400円+税5%)

2010年6月号 (Vol.21 No.6) ・好評発売中

【特集】 植込み型補助人工心臓の在宅治療 —高いQOLを求めて—

【編集責任】 許 俊鋭 (東京大学大学院医学系研究科重症心不全治療開発講座)

- 重症心不全患者の在宅治療の展望 許 俊鋭
- 体外設置型補助人工心臓—透析患者の外出プログラム—
..... 榎 重好ほか
- 植込み型補助人工心臓
コロンビア大学病院における在宅治療 高山博夫ほか
DuraHeartを用いた治療 西村元延
日本における EVAHEART を用いた在宅治療 ... 西中知博ほか
日本における Jarvik 2000 を用いた在宅治療 ... 斎藤俊輔ほか
- 人工心臓管理技術認定士—患者が安心して一般社会で生活する
ための支援— 柏 公一
- 在宅治療の社会基盤整備—ハブ・サテライト病院システムと
在宅モニタリングシステム— 西村 隆
- 植込み型補助人工心臓在宅治療のもたらす経済的影響
..... 田倉智之

【特集関連記事】

- ・ 植込み型補助人工心臓在宅治療を経験して

【臨床工学技士のための心電図講座】

- 第 11 回 QRS 波 - II—QRS 波形の異常— 平手裕市
- 【心臓手術の実際—外科医が語る術式, 麻酔科医が語る心臓麻酔,
臨床工学技士が語る体外循環法—】
- 第 2 回 心室中隔欠損症に対する手術と体外循環法—長野県立
こども病院— 坂本真彦ほか/市野 隆ほか/佐藤直己ほか

【よくわかる医療機器の分類】

- 第 2 回 医療機器のクラス分類 古川 孝

【第 2 種 ME 技術実力検定試験全問解説】

- 第 6 回 (最終回) 午後の部 問題 41 ~ 60 ... 試験問題研究会

学研メディカル秀潤社

〒141-8510 東京都品川区西五反田2-11-8 TEL: 03-6431-1210(営業部) FAX: 03-6431-1214
E-mail: info@shujunsha.co.jp URL: http://www.shujunsha.co.jp/

《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 銳*

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9.56ml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とのことである。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。ブ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、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状動脈に投与された。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 装着患者に適應して、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

問合先 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

