

—特集「再生医療の現状と将来展望」—

第18回公開「シンポジウム」

再生医療の現状と将来展望

The Present State and Future Prospects of Regenerative Medicine

重症心不全の治療戦略

自己筋芽細胞シートによる心筋再生治療

澤 芳樹

大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科

Regeneration Therapy for Severe Heart Failure

Yoshiki Sawa

Department of Cardiovascular Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine

はじめに

重症心不全に対する治療としては、薬物療法、外科治療に加えて、最終段階の治療としては心臓移植や補助人工心臓の置換型治療である。これらの治療は、世界的にその有用性が証明されているが、医療費の問題やドナー不足や免疫抑制、合併症など解決すべき問題が多く、普遍的な治療法とは言い難い。

一方、最近、重症心不全治療の解決策として新しい再生型治療法の展開が不可欠と考えられる。最近分子生物学の進歩とともに、新たな知見が得られ、ほかの臓器のように心筋幹細胞の存在も報告され、心筋再生治療は循環器領域のトピックスとなっている。一方、その応用として再生治療とくに心筋への細胞移植は心機能を改善する事が実験的に報告され、自己骨髄細胞や筋芽細胞による細胞移植の臨床応用も開始されている。

そこで、本稿では循環器領域において、自己細胞を用いた心不全に対する心筋再生治療（図1）について自験例を中心に概説する。

1. Resident cardiac stem cell ; RCSC 心臓幹細胞

近年、分子生物学・幹細胞研究の目覚ましい進歩に伴

い、心臓源性の心筋前駆細胞（resident cardiac stem cell）の存在が報告されている。これらの細胞はヒトを含めた多様な動物において報告されており、その細胞に対するマーカーも多様である。現在までに、その細胞を判別するためのマーカーとしてはc-kit, Sca-1, isl-1などが用いられている。これらによって抽出される細胞は、各々が完全に独立した細胞で、別のマーカーで同定された細胞間に互換性がないようである。2003年Beltramiらはc-kit（stem cell factor）を有する細胞をラット心から抽出し、無限の自己再生能、多様な細胞に分化できるmultipotencyおよび複製能を有すると報告した¹。SchneiderらはSca-1+細胞の存在を報告し、これがRCSCであり、心筋虚血、再灌流障害において障害部位に認められるが、拍動する心筋細胞への分化のためにはオキシトシンを要したと報告している²。これらのRCSCは、万能細胞としての能力を有し、心筋細胞への分化が確認されている。したがって、現在のところ従来再生しないと考えられていた心臓には心筋分化可能な前駆細胞が存在していることになる。これらの報告と、心筋梗塞や心不全病態との関与については、今後のさらなる研究報告が待たれるところである。

2. 骨髄細胞（bone marrow stem cell ; BMSC）

骨髄細胞は、今日の細胞移植治療において最も注目

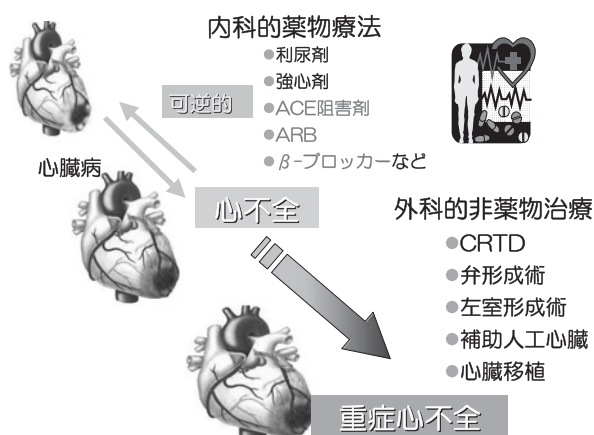


図1 重症心不全に対する現行の治療法

され、心筋細胞ほか多彩な細胞に分化することが期待されている。しかしながら、幹細胞である定義付けが確固されておらず、その名称に関しても“mesenchymal stem cell”, “marrow stromal cell”, “marrow mononuclear cell”など多彩である。ES細胞と同様な特徴を持つこの細胞は、患者から採取（自家細胞移植治療）が可能であることから理想的な細胞と考えられている。BMSCの移植後筋形成への効果に関しては、いまだ明確にされていないが、急性・慢性心筋梗塞モデルにおけるほとんどの動物実験結果は、移植後の心機能向上を認め、血管新生については明らかであろう。

BMSCを利用した細胞移植治療は、利便性から早期の臨床応用が開始され、現在までに多くの報告がなされている。これら臨床治験では治療としての安全性とともに、可能性には一定の評価が得られ、効果としては症状の改善、心筋組織への血液灌流改善が認められている。特に、初期の報告ではコントロール群を持たず、治療患者は少数かつ作為的抽出で精度も高くない研究がほとんどであったが、近年、BOOST trial³, TOPCARE-AMIやASTAMIなどのコントロール群を持った多施設臨床治験の結果が報告された。たとえばBOOST trialによると、BMSC移植直後のEFはコントロール群（0.7%の改善）に比較し、6.7%の有意の改善を認めたが、18カ月後にはコントロール群との間に有意差を認めなかったと報告している。最近、REPAIR-AMIと呼ばれるドイツの多施設臨床試験で、急性心筋梗塞患者に対する、骨髄細胞冠動脈注入が、有意に術後心機能を改善させることを明らかにし、ようやく、骨髄細胞の有用性がEBMとして証明された。しかし、Jacksonらは、骨髄から採取した細胞中、心筋細胞に分化しうる細胞は0.02%程度であ

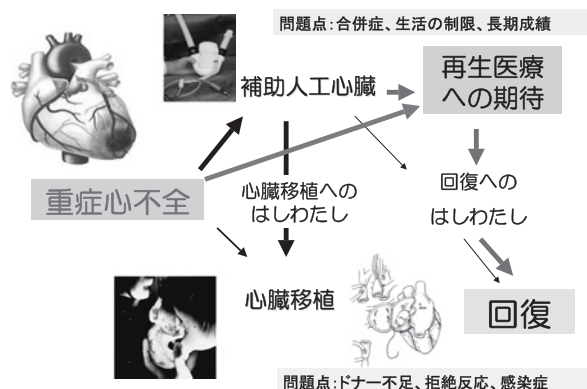


図2 重症心不全の治療：補助人工心臓と心臓移植

り、明らかに心筋梗塞で失われた機能を修復するのには不十分であると報告している。この点からみても、現段階ではBMSCの移植による治療効果は、細胞からの血管新生因子などの分泌（paracrine effect）における局所部位の血液灌流改善が本体であると考えるのが妥当と思われる。

3. 心臓に対する自己骨格筋芽細胞移植

近年、骨格筋由来細胞を細胞移植に用いる研究が盛んに行われて、細胞移植において臨床応用可能な細胞源として注目を集めている。

骨格筋に存在する筋芽細胞からなる衛星細胞は、骨格筋が障害を受けたときに、分裂、分化を開始し、障害された部分の筋肉を補填する。このような筋芽細胞の幹細胞様の性質に着目し、Marelliらは筋芽細胞を犬の心筋梗塞巣に移植し、その生着を確認した。またMurryらは自己筋芽細胞を梗塞心に移植したところ、myotubeの形成を認めたが、レシピエント心筋との結合を認めなかったと報告した。一方、Taylorらは、凍結障害を加えたウサギの心臓に自己筋芽細胞を移植したところ、心機能の改善が得られたことを報告している。

実際、このような状況の中で、Menascheらはフランスで10例の心筋梗塞患者において、自己骨格筋より分離培養した筋芽細胞移植を開心術中に施行した。しかし、このうち4例に致死的な不整脈が発生し、ICDの埋め込みを余儀なくされた。一方、Diacrine社の治験としてアリゾナハートセンターのDr. Dibが行った臨床試験では、26例のCABG単独例に比して心機能の回復が示唆され、何より致死的不整脈の発生は2/26例とMenascheの報告に比べ少なかったことが示されている。実際適応患者は重篤なICMの患者であり、果たして筋芽細胞がVFなどの発生原因かどうかもし

●自己骨髄細胞移植による血管新生 EBM?

これまでに行われた臨床試験

- BOOST
- TOPCARE-AMI
- ASTAMI
- REPAIR-AMI



●間葉系幹細胞移植

●筋芽細胞移植

MAGIC試験



図3 循環器領域での自己細胞治療

くは針による障害組織の瘢痕が不整脈を誘発しないかどうか、長期遠隔成績も含めて、検討を要するものと思われる。

最近、ヨーロッパでは Menache の臨床試験の流れを汲んで Genzyme 社とメドトロニック社が 100 例以上の大規模試験を行った。これが MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) とよばれる臨床試験で、ランダム割付け、プラセボ対照、二重盲検、多施設 (欧州の 24 施設) で 97 例を対象に行われた。心筋梗塞後の CABG を必要とする症例に対し、全例 ICD を植え込み、高用量群 (30 例): 30 回注入により 800×10^6 の筋芽細胞を移植、低用量群 (33 例): 400×10^6 を注入、プラセボ群 (34 例) に自己筋芽細胞を投与した。6 カ月後の結果は、左室拡張終末期容積、左室収縮終末期容積は 6 カ月後に高用量群でプラセボ群に比べ有意に減少、低用量群も有意ではないが減少したが、EF は 3 群間に有意差はなく、局所および全般の収縮機能の有意な改善は見られなかった (図 2)。一次エンドポイントである心臓の局所壁運動 (細胞注入場所)、心臓全般の機能において細胞移植群のプラセボ群を凌ぐ有効性が認められなかったため試験は早期に終了し、見直しの段階のようである。一方、Dr. Dib らは FDA の承認の元、Phase II 臨床試験を開始しつつあり、その結果も期待されている。

本邦においては、テルモ社が、日本における臨床試験を開始しようとしており、適応はやはり CABG に対する併用療法であり、申請から 3 年以上を経てようやく厚生労働省の長期にわたる厳しい審査が終了し、いよいよ多施設試験が行われる予定である。一方、大阪大学では、世界的にも初めてとなる自己筋芽細胞と骨髄細胞を併用する再生治療法を 4 例の虚血性心筋症の患者さんに補助人工心臓下に施行したが、この内容

- ヨーロッパ多施設臨床試験 100 例以上の大規模試験。心筋梗塞後の CABG 症例に対し、全例 ICD を植え込み
- ランダム割付け、プラセボ対照、二重盲検、多施設 (欧州の 24 施設) で 97 例を対象に実施
- 方法: 30 箇所注入 高用量群 (30 例): 800×10^6 , 低用量群 (33 例): 400×10^6 , プラセボ群 (34 例)



に自己筋芽細胞を投与

- 心筋の肥大化を食い止める効果あり。心機能は改善せず。
- ICD の作動に有意差はなし。

→ Myoblast は細胞源として有効? 安全? 適さない?

図4 MAGIC: Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy

については次項で詳細に述べる。

4. 大阪大学における自己細胞を用いた心筋再生治療

重症心筋梗塞などにおいては、心筋細胞が機能不全に陥り、さらに線維芽細胞の増殖、間質の線維化が進行し、心不全を呈するようになる。心不全の進行に伴い心筋細胞は傷害され apoptosis に陥るが、心筋細胞はほとんど細胞分裂をおこなわないため、心筋細胞数はどんどん減少し、心機能もさらに低下していく。前述のごとく最近、このような重症心不全患者に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており、すでに自己骨格筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されている。しかし、実際に細胞移植法により臨床的に心機能を十分に向上させるためには、直接心筋内注入による細胞移植方法では、移植細胞の 70~80% の細胞が失われ、その効果が十分に発揮できない点や、不整脈などの副作用、大量かつ安全な細胞源の確保、細胞外環境整備による移植細胞の定着など細胞移植による種々の問題の解決が不可欠である。細胞治療において現状での心筋内への直接注入法を用いれば、注入局所に炎症を惹起するとともに、局所的な細胞移植しかおこなえず、拡張型心筋症のように心臓全体の心機能が低下した場合には限界がある。

このような心筋細胞移植の臨床応用のために、移植細胞への血液供給および移植後の細胞の機能維持、すなわち細胞外環境の整備がきわめて重要であり、心筋における血管構築が不可欠であると思われる⁴。一方、骨髄単核球細胞には、血管新生効果による心筋再生機能が備わっており、骨格筋芽移植細胞の生着にきわめて重要と思われる。そこで、われわれは骨格筋芽細胞および骨髄単核球細胞移植による心筋再生に関する研究に取り組み、心筋梗塞ラット心に両細胞を移植したところ、両細胞移植群では、それぞれの単独群に比し、心機能および壁厚が有意に回復するとともに

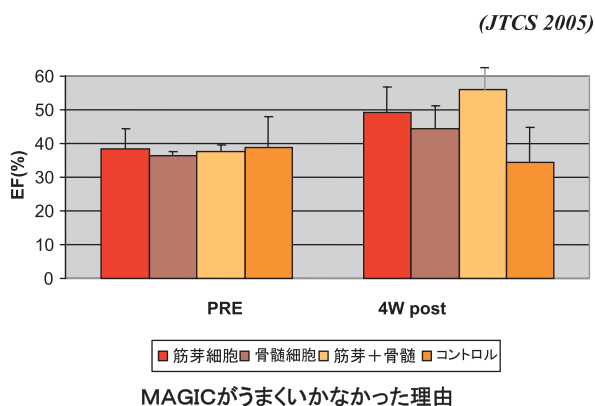


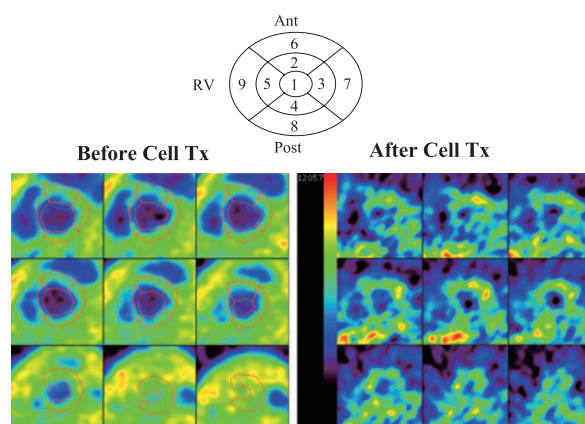
図5 筋芽細胞+骨髄単核球細胞移植による心筋再生

に、リモデリング抑制効果も認められた (図3)。このように、単独でも血管新生作用を有する骨髄単核球細胞による治療を、減少した細胞を補填するための骨格筋芽細胞による細胞治療法と組み合わせることにより、血管新生や移植細胞の生着向上効果を併せた心筋再生が期待される。現在、自己骨格筋芽細胞による治療法は細胞源としても最も倫理的にも供給量としても臨床応用に適していると思われる。

そこで、大阪大学では、すでにGMPに準拠した細胞培養施設を附属病院内に設置し、自己筋芽細胞の培養法を確立し、学内のトランスレーショナルリサーチのプロジェクトとして、倫理委員会の承認を得て臨床試験を実施し、心機能の回復とBNP値の低下を確認した。一方、経過中、致死的な不整脈の発生は認めていない。今後さらに症例を重ね、慎重にその安全性と有効性を確認していく予定である。

5. 細胞シート工学を用いた心筋再生治療

一方、より広範囲な心筋への有効な心筋再生治療の開発をめざし、東京女子医科大学岡野光夫教授の開発された、組織工学応用による温度感応性培養皿を用いて筋芽細胞シートを作成し、ラット心筋梗塞モデルに移植し、その心機能の改善を検討し (図4) その結果、心筋壁厚の有意の改善と心機能の改善が見られた⁵。さらに、当科では、東京女子医科大学岡野教授と共同研究で筋芽細胞シートによる細胞移植をグローバルな心筋変性疾患であるDCMモデルに応用し、DCMに対する新たな治療法となりうるかを検討した⁶。27週令BIOTO-2 DCM hamsterを対象とし、温度応答性培養皿を用いて作成した筋芽細胞シートを移植した。その結果LVDdの拡大は有意に抑制され、EFも有意に長期にわたって改善し生存率の延長が見られた (図5)。組織所見でも有意な左室壁厚の増大が認められ、

図6 Case 2: H₂O PET

多数の新生血管が認められた (図6)。免疫組織染色では、 α -DGと α -, β -SGの発現が回復した。以上よりDCM hamsterに対し、筋芽細胞シート移植により心筋組織および心機能が改善し、生存が延長されたことより、筋芽細胞シート移植によりDCMの組織再生の可能性が示唆された。

さらに、前述のラット心筋梗塞モデル⁵や心筋症ハムスター⁶の実験結果を元に、現在、豚心筋梗塞モデルおよび犬拡張型心筋症様モデルを用いた大動物前臨床試験を行い有効性を確認しており、その成果により学内倫理委員会の承認を経て、臨床応用を開始した。

6. 重症拡張型心筋症患者に対する自己筋芽細胞シート移植

以上のような研究成果をもとに、2006年7月に倫理委員会の承認を得て、左室補助人工心臓を必要とするような末期的拡張型心筋症患者に対する自己筋芽細胞シート移植を計画し、2007年5月に第1例目に対しての臨床試験を開始した (図6)。患者は55歳の男性。2004年より心拡大を指摘されていたが、2006年に心不全が増悪し、左室補助人工心臓 (LVAS) を装着した。しかし、自己心機能の回復がLVASを離脱するほどには及ばず、本人の同意のもと、臨床試験に登録し治療を開始するに至った。2007年3月に大腿部より筋肉を採取し約1カ月間の培養後、凍結。同年5月に再培養・シート化して、開胸下に細胞移植を行った。その後の患者の心機能はLVASを離脱できるほどに回復し、同年9月にLVASから離脱、12月には退院となった。細胞シート移植後において、致死的不整脈をふくむ合併症は発生しなかった。退院後半年が経過したが、現在のところ心不全の再発を認めていない。今後、症例を重ねてさらに安全性、有効性を

検討する予定である。

7. iPS 細胞への期待

マウス胚盤胞期の受精卵から ES 細胞が樹立されてから 25 年、ヒト ES 細胞が樹立されてから 8 年、2006 年にマウス induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞が樹立され⁷⁾、そして 2007 年のヒト iPS 細胞の樹立に成功したニュースは世界中を駆け巡り、再生医療実現化に対する期待は大いに高まっている。元来、ES 細胞の作製と利用にあたっては、2つの問題点が存在していた。1つは作製にあたって初期胚を破壊することによる倫理的な問題である。さらにもう1つは、HLA の不一致による移植後の免疫拒絶の問題である。iPS 細胞は生殖系細胞を用いず線維芽細胞、上皮細胞などの体細胞を初期化するので、自己細胞から iPS 細胞を作製すれば倫理的、免疫的問題を解決することができる。

心筋再生については、iPS から拍動する治療用ヒト心筋細胞様細胞の分化誘導に成功すれば、細胞シートによる治療も大きく変わると考えている。われわれはすでに、心筋細胞シートの移植のほうが、筋が細胞シート移植より、さらに有効性が高いことを証明している。iPS 由来細胞シートは機序的に、心筋細胞シートと同様に電気的につながって、直接は駆動を伝え、新機能改善をもたらしうる可能性がある。しかし、iPS 細胞も ES 細胞と同様、目的の細胞へ分化・誘導する技術の確立は必須であり、iPS 細胞による実用化は、まだ遠い。

まとめ

以上のように、心機能の低下した不全心筋も、骨格筋芽細胞や骨髄細胞などの自己細胞移植や遺伝子治療により、また組織工学的技術を駆使することにより、そして、病態に応じて再生治療が可能になると思われる。特に拡張型心筋症のような広範囲の心筋障害を呈する心不全においては、細胞移植や遺伝子治療による

局所的治療よりも、組織工学により心筋組織片ともいえる細胞シートを移植することにより、治療は可能になるとと思われる。

文 献

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.
2. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12313-12318.
3. Meyer GM, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H: Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction Eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113: 1287-1294.
4. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, Kawaguchi N, Nakamura T, Matsuura N, Matsuda H: Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 2002; 105: 2556-2561.
5. Memon IA, Sawa Y, Miyagawa S, Taketani S, Matsuda H: A combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in the canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 646-653.
6. Kondo H, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, Memon IA, Kawaguchi N, Matsuura N, Matsuda H: Reorganization of cytoskeletal proteins and prolonged life expectancy caused by hepatocyte growth factor in a hamster model of late-phase dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 295-302.
7. Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.