

4. 心臓再生の展望

小室 一成^{*}, 永井 敏雄^{**}

近年,再生医療が大変注目されている。わが国では心不全患者は増加傾向にあり,従来の治療方法の適応とならない重症心不全の新しい治療法として,再生医療が果たす役割は大きい。心臓の再生療法の方法論には,細胞移植療法と,心筋細胞分化誘導療法が考えられている。自家骨格筋芽細胞移植は,冠動脈バイパス術と自家骨格筋細胞移植を併用した第1相試験が行われ,不整脈の合併が報告されたが,移植後のNYHA機能分類と駆出率の双方に改善が認められた。体性幹細胞は,成体のさまざまな臓器に存在することが知られている。われわれは新生仔ラット心筋細胞と骨格筋細胞を共培養すると,骨格筋細胞の一部が心筋細胞に分化すること,さらに骨格筋SP細胞に心筋細胞に分化する細胞が多いことを明らかにした。このことは,骨格筋には心筋に分化可能な幹細胞が存在することを示唆する。

胚性幹細胞は,中胚葉・内胚葉・外胚葉の3系統の細胞に分化する能力を持つ。1998年にヒトES細胞が樹立され,心筋に分化することも明らかになった。われわれは,サルES細胞を心筋細胞に分化させることに成功しており,このような高等霊長類のES細胞を用いた研究は,ヒトへの臨床応用への前段階として有用である。骨髄細胞は遊走能と多分化能を持つ。マウス心筋梗塞モデルにおいて,Stem cell factorとGranulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)を急性期に投与することにより,心機能,予後の改善,梗塞範囲の縮小が報告されている。G-CSFによる骨髄由来幹細胞の動員による心筋梗塞治療は,現在ヒトで試験が進行中で,今後の動向が注目されている。心臓再生医療において細胞移植療法と心筋細胞分化誘導療法はともに有望な方法である。本稿に,それぞれの有利な点と問題点をまとめたが,今後,それぞれの問題点を克服していくことがわれわれの課題である。

Cardiac Regeneration

ISSEI KOMURO Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine



^{*}こむろ・いっせい:千葉大学大学院医学研究院循環病態医学科学教授,昭和57年東京大学医学部卒業,平成元年ハーバード大学留学,平成10年東京大学大学院医学系研究科循環器内科講師,平成13年現職,主研究領域/循環器病学,心臓の発生・分化・再生,心不全発症の分子機序,血管の老化。
^{**}ながい・としお:千葉大学医学部第三内科講師。

Key words

細胞移植
細胞分化誘導療法
体性幹細胞
ES細胞

はじめに

近年、再生医療は医学専門誌のみならず、一般向けメディアにも頻繁に取り上げられるようになり、広く注目されている。これは、胚性幹細胞(ES細胞)の樹立、多機能体性幹細胞の発見に負うところが大きく、再生医療は、肝臓、骨、歯、膵臓、神経、血管、心臓など、体のほとんどの臓器組織に応用されようとしている。わが国では特に、高齢化社会の進行、食生活、ライフスタイルの欧米化に伴い、動脈硬化性疾患、虚血性心疾患は増加傾向にあり、心不全患者も増加すると考えられる。したがって、従来の治療方法の適応とならない重症心不全、虚血性心疾患の新しい治療法として、再生医療が果たす役割は大きい。心臓の再生療法の方法論として、外部から心筋細胞あるいは心筋細胞への分化が約束づけられている前駆細胞を補充する細胞移植療法と、内在する心筋あるいは心筋前駆細胞の動員、増殖、分化を誘導する心筋細胞分化

誘導療法が考えられている(図1)。本稿では、心筋再生に向けたこの2種類の治療法の現況と今後について概説する。

1. 自家骨格筋芽細胞移植

心臓に対する細胞移植の研究は、1990年代初頭から心房腫瘍由来細胞株、胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞株、ES細胞などが試みられてきたが、拒絶反応、腫瘍化、倫理的問題などのため、臨床応用には至らなかった。自家骨格筋芽細胞移植はMurryら¹⁾、Taylorら²⁾により動物実験が行われ、移植細胞の生着とレシピエントの心臓の機能改善が報告された。2001年、Menascheら³⁾は、ヒト自家骨格筋移植を完全血行再建不可能かつnon viableな梗塞部位に世界で初めて移植した。2003年の米国心臓会議で同グループは駆出率35%以下の陈旧性心筋梗塞患者10例に冠動脈バイパス術と自家骨格筋細胞移植を併用した第1相試験の結果、持続性心室頻拍が4例にみら

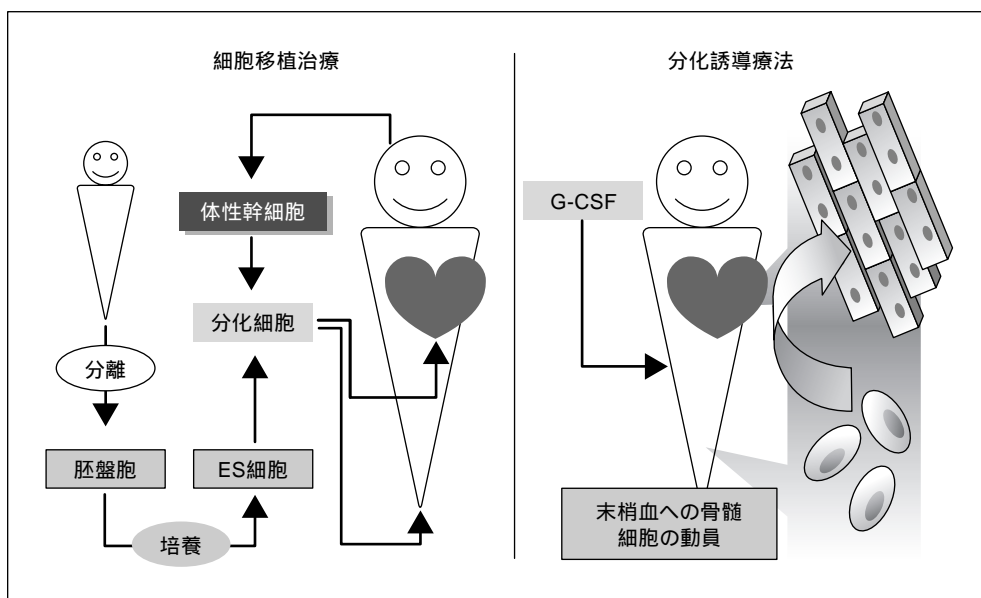


図1 近年注目されている心臓再生医療の方法 細胞移植療法と分化誘導療法

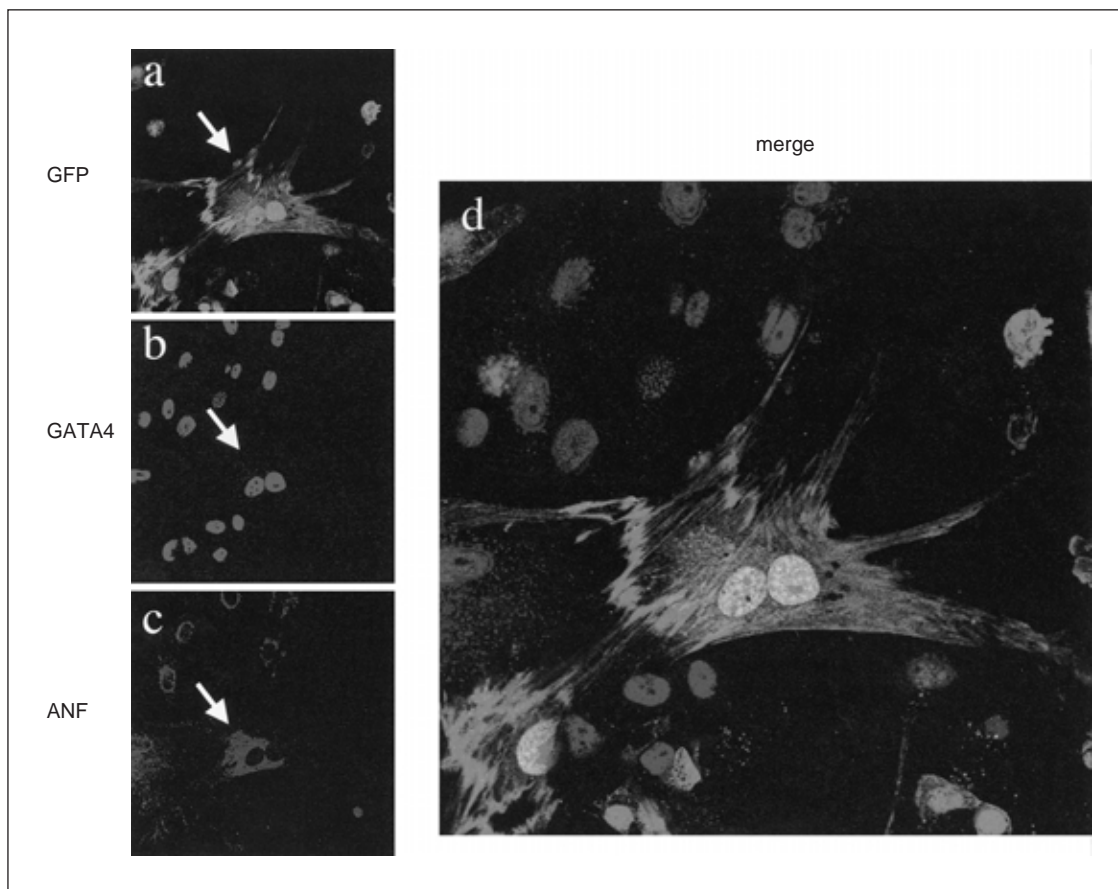


図2 骨格筋由来細胞は心筋細胞との共培養により，心筋特異的蛋白を発現する
 GFP 発現骨格筋由来細胞を新生仔ラット心筋細胞と共培養後，免疫染色法により心筋特異的 cTnT, ANF の発現を評価した．GFP 陽性骨格筋由来細胞 (a) に cTnT (b) , ANF (c) が発現している．

れたが，植え込み型除細動器とアミオダロンで対処可能であり，移植後 12 週後の NYHA 機能分類と駆出率の双方に改善が認められたと報告した．われわれのラット心筋凍結障害モデルによる実験でも，自家骨格筋芽細胞移植後 4 週間に左室リモデリングが抑制されていた．

2．体性幹細胞

多能性幹細胞は自己複製能を持ち，一つあるいはそれ以上の種類の異なる細胞に分化で

きる細胞であるが，その一部は成体の中樞神経，造血器官，肝臓，皮膚，間葉系などに存在することが知られている．われわれは，新生仔ラット心筋細胞と GFP 発現マウス由来骨格筋細胞を共培養すると，GFP 陽性骨格筋由来細胞が心筋特異的トロポニン T (cTnT) や心房ナトリウム利尿性ペプチド (ANF) を発現することを報告した(図 2) ．さらに，心筋細胞に分化したこれらの骨格筋由来細胞は，心筋細胞との接合部にカドヘリンやコネキシン 43 を発現して電氣的機械的接合部を形成するとともに，骨格筋の twitch

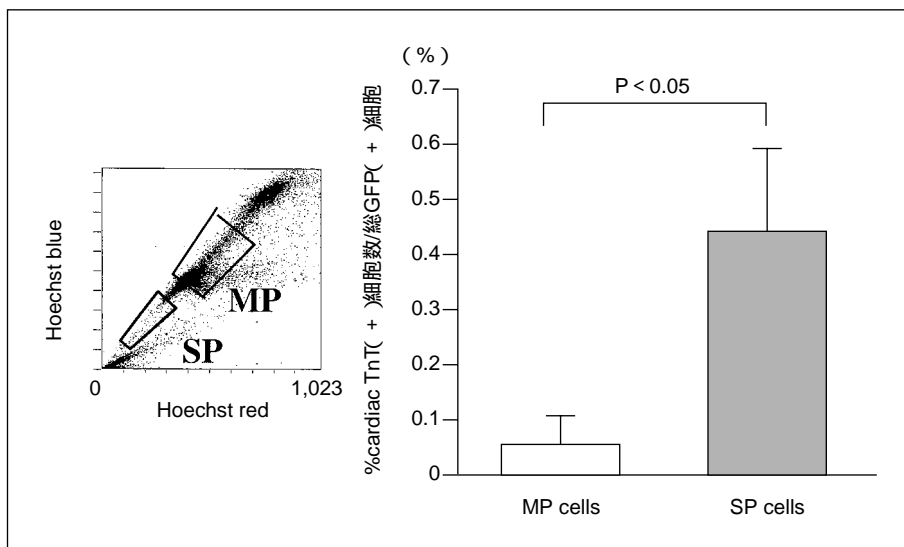


図3 骨格筋 SP 細胞は MP 細胞に比較して心筋細胞との共培養により、心筋に分化する細胞群を多く含む

とは異なる持続時間が長い、規則正しい洞結節様の活動電位を示した。

SP (side population) 細胞は多機能幹細胞のような未分化な細胞を多く含み、骨髄のような造血組織のみではなく、骨格筋にも存在すると報告されている⁴⁾。GFP 陽性骨格筋細胞から FACS で分離した SP 細胞と MP (main population) 細胞をそれぞれ心筋細胞と共培養すると、骨格筋 SP 細胞の中に心筋に分化した GFP 陽性 cTnT 陽性細胞が有意に多く認められた(図3)。以上の結果は、骨格筋には心筋細胞との共培養下で心筋に分化可能な幹細胞が存在することを示唆する。興味深いことに、肝臓および皮膚由来の細胞を心筋細胞と共培養しても、骨格筋細胞と同様に心筋細胞に分化する細胞が存在し、心筋に分化可能な体性幹細胞はさまざまな臓器に散在する可能性がある。

cell) は、中胚葉・内胚葉・外胚葉の3系統の細胞に分化する能力を持つが、浮遊状態で培養すると球体の細胞塊(エンブリオボディ)を形成し、高率に心筋細胞へと分化し、自立拍動を開始する。心筋細胞へ分化を誘導したマウス ES 細胞は、マウスの心筋に移植すると宿主の心筋細胞の間に生着することが報告されている⁵⁾。1998年ヒト ES 細胞が樹立され⁶⁾、2001年には心筋に分化することも明らかになった⁷⁾。このことは、ES 細胞によるヒトの心臓再生治療の可能性を示唆している。われわれは、すでにサルの ES 細胞を心筋細胞に分化させることに成功しており、ヒトと同じ高等霊長類の ES 細胞を使用することにより、臨床応用の前段階の研究、すなわち拒絶反応や異所性組織への分化の制御、腫瘍あるいは不整脈源性の有無などの検討が可能であると考えている。

3. 胚性幹細胞 (ES 細胞)

マウス胚性幹細胞 (ES: embryonic stem

4. 骨髄細胞

骨髄細胞は線維芽細胞、骨、軟骨、脂肪細胞

胞，骨格筋，心筋細胞など胚葉を超えてさまざまな細胞に分化する．末梢血中に移植された骨髄細胞（造血幹細胞と骨髄間葉細胞を含む）は放射線などで傷害された骨髄やリンパ組織に向かって，血管内皮細胞を超えて類洞の中を移動する．さらに，骨髄細胞は骨格筋，中枢神経系細胞，心筋に到達し，それぞれの細胞に分化すると報告されている．われわれも，放射線照射したマウスに GFP マウスの骨髄細胞を移植し，さらに心筋梗塞を起こさせると，心筋梗塞部位に GFP 陽性の骨髄由来細胞が存在し，心筋収縮蛋白を発現していることを確認した．ここで注目すべきは，臓器傷害部位に幹細胞由来の分化した細胞が多く存在する点であり，傷害された臓器から発せられる何らかのシグナル（サイトカイン，成長因子等）を幹細胞が感知して標的臓器に遊走していることを示唆する．したがって，生体内に広く存在する幹細胞の動員，遊走を促進させる因子を解明できれば，細胞移植することなく再生治療を行うことが可能である．Stem cell factor (SCF) と granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) は，造血幹細胞を末梢血中に動員させることはよく知られている．Orlic, Anversa らは，脾摘したマウスに 5 日間の SCF と G-CSF による前処置後に心筋梗塞を作成し，さらに 3 日間 SCF と G-CSF を投与して心機能，梗塞範囲，予後，梗塞部位の組織像を対照と比較した⁸⁾．その結果，SCF と G-CSF を投与したマウスでは，心機能，予後の改善，梗塞範囲の縮小を認めた．さらに，梗塞部位には血管内皮細胞，平滑筋細胞に加えて Ki67 および Brd U 陽性の心筋細胞が認められた⁹⁾．この報告では，梗塞部位の細胞周期マーカー陽性の心筋細胞が，遊走した造血幹細胞の transdifferentiation したもののか，先に述べた，未知の心筋細胞の分化したものは明らかでない．最近 2 つの異なるグループから，女性のドナーから心臓移植

表 心臓再生治療の課題

1 細胞移植

細胞	利点	問題点
胚性幹細胞 体性幹細胞	容易に増殖，分化 自己細胞	拒絶，腫瘍 増殖

2 誘導，分化促進

細胞	利点	問題点
心臓幹細胞 骨髄	自己細胞	分化，増殖， 遊走の機序

を受けた男性患者の心臓の心筋，平滑筋，血管内皮細胞に Y 染色体を持つ細胞が存在することが報告された⁹⁾¹⁰⁾．このことは本来 XX 染色体を持つ女性由来の移植心臓に，男性レシピエント由来の幹細胞が遊走して心筋や血管に分化したことを示唆し，ヒトにおいても末梢血中を循環する幹細胞が臓器にホーミングして分化する機序が存在することを示唆している．われわれはマウス心筋梗塞モデルに G-CSF あるいは G-CSF と SCF の両者を急性期に投与し，残存心筋を評価した．その結果，未投与対照群に比べて G-CSF あるいは G-CSF と SCF の両者を投与した群で残存心筋が有意に多いことを確認した．G-CSF による骨髄由来幹細胞の動員による心筋梗塞治療は，現在ヒトで治験が進行中で，今後の動向が注目されている．

おわりに

心筋再生医療において，細胞移植療法と心筋細胞分化誘導療法はともに有望な方法である．表にそれぞれの利点と問題点を記した．今後，それぞれの問題点を克服してゆくことがわれわれの課題である．

〔文献〕

- 1) Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, *et al.* : Skeletal myoblasts transplantation for repair of myocardial

- necrosis. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 2512 - 2523.
- 2) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, *et al.* : Regenerating functional myocardium : improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998 ; 4 : 929 - 933.
 - 3) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, *et al.* : Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001 ; 357 : 279 - 280.
 - 4) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, *et al.* : Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999 ; 401 : 390 - 394.
 - 5) Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, *et al.* : The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines : formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol exp Morph* 1985 ; 87 : 27 - 45.
 - 6) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* : Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145 - 1147.
 - 7) Kehat I, Kenyagin -Karsenti D, Segev H, *et al.* : Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001 ; 108 : 407 - 414.
 - 8) Orlic D, *et al.* : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10344 - 10349.
 - 9) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, *et al.* : Chimerism of the transplanted heart. *N Eng J Med* 2002 ; 346 : 5 - 15.
 - 10) Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, *et al.* : Evidence for cardiomyocytes repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human heart. *Circ Res* 2002 ; 90 : 634 - 640.

質 疑 応 答

座長(永井) ありがとうございます。先生は先ほど皮膚の細胞も心筋になり得る、すなわち transdifferentiation が起こり得るということですが、細胞が融合したということではなくて、これは別個の細胞が独自に分化したということによろしいのでしょうか。

小室 複雑なので今日はお話ししなかったのですが、最近 fusion(融合)ということが注目されています。それは昨年 Nature に二つ論文が出たわけですが、ES 細胞と神経の stem cell 等が融合して、その結果新しい形質を獲得するというお話でした。それ以来、trans-differentiation という概念が疑われて、融合しているのではないかと、つまり細胞が骨髄から脳に行ったり、筋肉に行って、そこで融合して一見分化したように見えるのではないかと話になっています。

そこでわれわれもすぐに検討してみました。われわれの検討では、かなり多くの率で融合が認められました。これはいままでまったく考えられなかったことですが、心筋細胞と骨格筋、心筋細胞と皮膚、さらに心筋細胞と内皮細胞などが融合するのです。もっと意外だったことは、昔、心筋細胞と線維芽細胞を融合させると線維芽細胞になってしまうという研究があり、心筋細胞は比較的弱い性格しか持っていないと考えられていたからです。そのときは、ポリエチレングリコールという融合促進剤を加えてわざと融合させていました。われわれの実験では自然に融合するのですが、驚いたことに心筋は結構強くて、心筋と内皮が融合すると心筋になりますし、心筋と骨格筋でも心筋が勝つのです。ですから確かに融合の可能性は大いにあります。まだパーセントまではわかりませんが、かなりの率で起こっていると思います。

座長 むしろそのメカニズムを明らかにして、逆に利用すれば増やすこともできますね。

小室 今それについて解析中で、いくつかの factor が必要であるところまでは突き止めています。

座長 ありがとうございます。