

心不全に対する biological therapy の現状

佐藤 志樹¹, 黒澤 博身², 石井 光¹, Sian E Harding¹

Sato M, Kurosawa H, Ishii H, Harding SE: **Biological therapy in heart failure.** J Jpn Coron Assoc 2007; 13: 188-194

I. はじめに

今日の薬物治療, 補助循環を含めた外科治療の飛躍的な進歩にもかかわらず, 虚血性心疾患および心不全は多くの臨床医にとって今なお頻繁に遭遇する疾患の一つである。ヒトの心臓は極めて限られた再生機能しかもたないため, 心筋梗塞による多量の心筋細胞喪失は非梗塞域の心筋細胞にも影響を与え, 心室のリモデリング, 心不全を発症する。このような心不全は, 患者の高齢化, 冠疾患を含めた心疾患患者の予後延長に伴い, 今後その発生頻度は増加することが予想されており, 医療経済に与える影響も大きい。イギリス心臓財団の統計によれば心不全診断後1年以内に40%の患者は死亡するとされ¹⁾, 心不全が診断された後の実質的な予後の改善は, 極めて困難である。その予後は, 多くの悪性疾患と比較しても良好とはいえない。この点で, 心不全の代表的原因疾患である虚血性心疾患に対する治療戦略, その後の心不全治療は未だ現代医学における大きな問題点として残っているのが現状である。

しかしながら, 近年, 心不全の発生機序に関する分子生物学的研究の成果は, この悪性疾患に対して, biological therapy という新たな治療戦略を生み出しつつある。本総説では, その代表である遺伝子治療および細胞移植治療に関する現状に関して報告する。

II. 心不全に対する遺伝子治療

遺伝子治療は, 遺伝子を細胞, 組織, 臓器に導入することで患者の遺伝的欠損を修正するほか, 疾患を治療または予防する治療方法である。したがって, 遺伝子操作された穀物等とは異なり, あくまで特定の細胞における遺伝子を修正するのが目的であり, 患者のゲノムを恒久的に改修することを目的とする治療ではない。心疾患に対する遺伝子

治療は, 1995年のIsnerら²⁾による報告から虚血性心疾患に対する血行再建(血管新生 angiogenesis), ついで冠動脈血管形成術後の再狭窄予防を中心として研究された。しかしながら drug-eluting stent (DES) の普及とその再狭窄率の減少により, 遺伝子治療における再狭窄予防治療の試みは衰退した。その結果, 心臓遺伝子治療は難治性狭心症に対する angiogenesis, いわゆる biological bypass が大勢を閉めることになった。今までのところ日本においては, 狭心症に対する遺伝子治療の治験は行われていないが, 現在までに6例の第二相の結果報告が各国よりなされている。これらは, vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF-2), fibroblast growth factor (FGF-4) 等のサイトカイン遺伝子を使用し血管新生を促進させる遺伝子治療であり, 結果は1例(AGENT-2)を除きコントロール群と比較し狭心症発作の軽減, 虚血領域の改善を認めている³⁻⁸⁾。しかしながら, これらの経過観察期間はいずれも6カ月以内と短く, 長期の遠隔成績, 心事故率への影響に関しては報告が待たれるところである。このように, 新たな血行再建の手段として始まった遺伝子治療は, 今日の心不全の遺伝子, 細胞レベルでの発生機序に関する理解が深まるにつれ, 心機能自体を遺伝子治療によって修正し, 心不全を治療する試みへと発展することとなった。心筋細胞レベルにおいて, その機能を回復するための方法としては, ①心筋細胞内のカルシウム恒常性の修復, ②β受容体シグナル伝達機構の修正, ③虚血, アポトーシスに対する心筋細胞の抵抗力の増大が考えられる⁹⁾。ここでは, 後者2つの解説は他の総説に譲り, 主に心筋細胞内のカルシウム恒常性の修復を目的とした遺伝子治療について解説する。

1. 心筋細胞内のカルシウム恒常性の修復

今日, 心筋細胞の収縮拡張機能においては, カルシウムイオン(Ca²⁺)がその中心的役割を果たしていることが良く知られている。また, 心不全における機能障害は, 心筋細胞内の球状筋小胞体(SR)におけるCa²⁺貯蔵量の減少が大きく影響していることが明らかとなった。その原因としては, ①SRにCa²⁺を回収するために働くSR Ca²⁺ ATPase (SERCA2a)の機能障害, ②Ca²⁺を心筋細胞拡張のために

¹ Department of Cardiac Medicine, National Heart and Lung Institute, Faculty of Medicine, Imperial College London, 2nd Floor, Guy Scadding Building, Dovehouse Street, London SW3 6LY, ² 東京女子医科大学心臓病センター心臓血管外科(〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1) (2006.11.22 受付, 2007.3.23 受理)

細胞外に排出するために働くナトリウム・カルシウム交換機構(NCX)の機能亢進, および, ③SRからのCa²⁺の流出等が考えられている. したがって, 理論的にはこれらを修復することで, 心筋細胞, 心機能の改善が可能となるはずである. SERCA2a 機能の回復は, SERCA2a の遺伝子を直接導入することでの過剰発現で成し遂げることができるほか, SERCA2a の抑制因子であるホスフォランバン (PLB) をアブレーションすることでも可能である.

a. SERCA2a の過剰発現による機能回復

心不全心筋細胞内の SERCA2a 機能低下に関しては, 未だに意見の分かれるところではあるが, SERCA2a は心筋細胞内での Ca²⁺ 調節機構において中心的な役割を果たし, 心筋細胞の収縮機能において重要な役割を担っていることがわかっている. それ故, これを心不全治療における治療目標にした試みが多くなされている. Hajjar ら¹⁰⁾, Giordano ら¹¹⁾ は, アデノウイルスを使用して SERCA2a を心筋細胞に過剰発現させることで心筋細胞の収縮機能が増大し, 細胞内の Ca²⁺ トランジェントの減衰が加速することを報告した. 同様のアデノウイルスによる SERCA2a の遺伝子導入による効果は, 終末期心不全患者の心室心筋細胞を使用した *in vitro* 実験においても同様に確認されている¹²⁾. これらの報告は, 心不全に対する遺伝子治療の可能性を示すうえで, 注目に値する出来事であったが, 同時にこのような変力性に干渉する治療方法 (inotropic intervention) での重篤な合併症といえる不整脈に関する懸念を生じることになった. このことは, ミルリノンの臨床試験¹³⁾ で認められたような不整脈死亡率の上昇といった合併症を, β 受容体の刺激やホスホディエステラーゼの抑制などによって cAMP を増大させることになる inotropic intervention が有する根本的な欠点である. しかしながら, 最近の伊藤ら¹⁴⁾ による SERCA2a を過剰発現させたトランスジェニックマウスでの圧負荷に対する予防効果, 延命効果の確認, del Monte ら¹⁵⁾ におけるラットの心不全モデルに対するアデノウイルスでの SERCA2a 過剰発現によって 4 週間後の生存率がコントロールの 9% に対して 63% と有意な延命効果を認めたことが報告されたことで間接的に否定されている. また, SERCA2a の遺伝子導入によって, 心筋細胞内のクレアチニンホスフェイトと ATP は正常化していることに加え, 通常の薬剤性の inotropic intervention と異なり, 心筋細胞内の拡張期における Ca²⁺ 濃度は減少していることが明らかとなり, その抗不整脈効果, 抗アポトーシス効果が確認された.

したがって, アデノウイルス (Ad) による SERCA2a 過剰発現は, 心不全に対する inotropic intervention において, 不整脈の合併症を心配することなく治療効果が期待できる点が, その特徴といえる. SERCA2a 遺伝子治療は, 現在 2 例の第 1 相試験がアメリカ合衆国で開始されているほか, 英国においても左心補助 LVAD における心移植待機患者に対しての臨床試験開始が目前に迫っており, これ

らの結果報告が待たれるところである. また, これら 3 例の臨床試験はいずれも Ad と比較して長期にわたる治療効果を期待できるアデノアソシエイトウイルス (rAAV) が使用されている点でも, 注目される.

b. PLB の抑制による心機能回復

心機能は, SERCA2a の抑制因子である PLB をアブレーションすることで, 相対的に SERCA2a の機能を向上させ, 機能改善を図ることができる. Koss ら¹⁶⁾ は, PLB のノックアウトマウスでの左室機能が正常マウスに比べ良好であるのに対し, PLB 過剰発現マウスでは SERCA2a が正常であるにもかかわらず心機能が傷害されていたことを報告した. このことは, SERCA2a と PLB のバランスが心筋細胞における機能に大きく影響していることを示唆しており, 心不全治療における治療目標としても PLB が重要であることを意味した. われわれは, PLB のアンチセンスを生体内遺伝子導入することで, 正常心筋においても心筋細胞の収縮拡張機能の向上を認め得ることを報告した¹⁷⁾. また, 星嶋ら¹⁸⁾ はヒト PLB の偽リン酸化変種 (S16EPLN) を発現する rAAV を使用することで, 心筋症マウスモデルにおける心機能低下に対する予防的効果が長期にわたって認められることを報告した. これらの実験結果は, PLB のアンチセンスを使用した遺伝子治療が心不全治療における治療戦略の一つとなりえることを示唆している. しかしながら, 現在のところ S16EPLN に関してはヒトの心不全心筋細胞を利用した実験報告はなく PLB アンチセンスの遺伝子導入と同様の治療効果が得られるかは不明であり, 実験報告が待たれるところである.

c. ナトリウム・カルシウム交換機構 (NCX) の正常化による心機能改善

NCX に関する動物実験の結果は, SERCA2a 過剰発現や PLB アンチセンスと異なり, 未だ一定の見解を得ていないのが現状である. NCX トランスジェニックマウスにおいては, NCX 過剰発現されたマウス心筋において SR Ca²⁺ 負荷の増大, 細胞内の Ca²⁺ トランジェントの減衰が加速等の機能亢進が認められるとの報告¹⁹⁾ に対し, ヒト心不全心筋や多くのその他の動物モデルにおいては NCX の増大とともに収縮機能の低下を認めている. このように相反する結果は, NCX が Ca²⁺ を心筋細胞拡張のために細胞外に排出するために働く機能とともに細胞内のナトリウムイオン (Na⁺) 濃度に伴って Na⁺ を細胞外に排出し, Ca²⁺ を心筋細胞内に取り込む機能 (reverse-mode NCX) を併せもつその機能の複雑さが原因であると考えられている. したがって, 正常な心筋細胞に対して細胞内の Na⁺ 濃度が高いことが知られている心不全心筋では reverse-mode NCX がより有意に働いていると考えられる. このことは, ラット等の小動物における NCX 遮断薬 (KB-R7943, SEA0400) が虚血予防効果を示すとの報告²⁰⁾ に対し, われわれが行った重症心不全患者の左室心筋細胞に対しては, NCX 遮断薬が残存する心筋収縮機能を喪失させる結果からも明らかであ

る(non-published data). また, われわれはラット心筋細胞を使用した *in vitro* 実験において, 心不全患者に認められる β 作動薬に対する反応性の低下にも β_2 受容体- G_i 蛋白シグナル伝達系と結合することで NCX が関与していることを証明した²¹⁾. このような NCX の複雑性のため, 今日まで NCX を対象とした心不全遺伝子治療に関する報告は認められていない.

d. 球状筋小胞体 SR からの Ca^{2+} の流出を予防することによる心機能回復

収縮期においては, 心筋細胞膜に存在する L-型カルシウムチャンネルからの Ca^{2+} 流入が刺激となり, より多くの Ca^{2+} が SR の Ryanodine 受容体 (RyR) を通して細胞内に放出される (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release; CICR) ことで心筋細胞の収縮が生じる. 近年この RyR の障害によって, 拡張期における SR からの Ca^{2+} の流出が増大し, SR 内の Ca^{2+} 貯蔵量減少を招いた結果, 心筋収縮力の減少を招いているとの報告がされるようになってきた²²⁾. したがって, この原因となっている FKBP12.6 (calstabin 2)²³⁾ を遺伝子導入し修復することで, SR からの Ca^{2+} の流出を予防し, 機能を回復させることができる. 今日, ラビット心筋細胞を使用した *in vitro* 実験では 20% の FKBP12.6 の上昇によって SR からの Ca^{2+} の流出を約 50% 減少させることが確認されている²⁴⁾. 今後, ヒトの心筋細胞を使用した *in vitro* 実験, *in vivo* 動物実験の結果が待たれるところである.

III. 心不全に対する細胞治療

今日の心不全に対する細胞治療 (cell therapy, cellular cardiomyoplasty) は, 非虚血性心筋症へと治療対象を拡げつつあるが, その元来の概念は心筋梗塞にて失われた心筋細胞を新たな収縮機能をもった細胞によって置き換え, 心機能を回復するものであった. この概念の方法論⁹⁾ としては, ①残存する心筋細胞を有糸分裂周期に再導入することで心筋細胞を補充する, ②瘢痕組織内の繊維芽細胞を筋細胞に形質転換させる, ③収縮能をもつ, またはもつ可能性のある外来細胞を瘢痕内に移植する方法, が考えられており, 今日まで様々な報告が認められている. しかしながら, 現在臨床学的にも一般的にも現実的な細胞治療として受け入れられているのは, 元来の概念に沿った③細胞移植治療であるといえる.

今日まで, その移植細胞に関しては種々の細胞が報告されているが, 細胞の収縮機能から線維芽細胞や平滑筋細胞に代表される『収縮機能を有しない細胞 non-contracting cells』と『収縮機能を有する細胞 contracting cells』に大別することができる. また, 後者の contracting cell は既に収縮機能を有する新生児・胎児心筋細胞, 骨格筋芽細胞に代表される "naturally contractile cells; NCC" と筋細胞への分化が期待される "potentially contractile cells; PCC" とに分けることができる⁹⁾. 現在とくに注目される胎児性幹細胞 (embryonic stem cell; ES cell) や骨髄細胞 (bone marrow

stem cell; BMSC), 心臓幹細胞 (resident cardiac stem cell; RCSC) は, この後者に分類される細胞移植治療である.

ここでは, 既に臨床応用されている骨格筋芽細胞移植, BMSC によるいわゆる cardiac stem cell therapy および最近注目されている RCSC を中心にして解説する.

1. 骨格筋芽細胞移植 skeletal myoblast transplantation; SMT

心疾患に対する細胞移植治療は, 当初胎児・新生児心筋を使用した動物実験から開始された²⁵⁾. これらの結果は, 成熟心筋細胞への分化, レシピエントの心筋細胞との細胞間結合形成に伴った心機能回復と申し分ないものであった²⁶⁾が, 臨床応用に際しては倫理的側面, 必要な細胞数の確保, 免疫源性等の問題のため困難と判断された. これに対し, 骨格筋芽細胞は患者本人からの採取が可能であり, 比較的容易に少量の筋生検から細胞数を増幅させることができることから, 急速にその研究, 臨床応用が進んだ. しかしながら, 当然のごとく移植後の心筋細胞への転換は認められず, レシピエントの心筋細胞との細胞間結合形成もできないことが明らかとなった. Murry ら²⁷⁾ は, これら骨格筋芽細胞に N-cadherin Connexin-43 等の細胞間結合に必要な蛋白質の遺伝子を導入することで移植後の細胞間結合を構築する試みを行ったが, これらは *in vivo* SMT 後に急速に減衰することが確認された. 2001 年に臨床応用第 1 例を報告した Menesche ら²⁸⁾ は, SMT 後も移植された骨格筋芽細胞は機能的・電気生理学的にレシピエントの心筋細胞からは独立しておりグラフト-宿主間結合は臨床的にも否定された. このような結果にもかかわらず, 大多数の動物実験, 臨床治験 (第 I 相) の結果は, 心機能および臨床症状の改善を示しており, そのメカニズムに関しても考察が進んでいる. 今日までに報告されているその機序としては, ① SMC 移植実験での心機能改善効果と同様な, 移植細胞による左室壁の補強効果 (リモデリングに対する予防効果), ② 骨格筋芽細胞からの (hepatocyte growth factor/scatter factor; HGF) 成長因子・血管新生因子の分泌が有力なメカニズムと考えられている. しかしながら, 治験 11 カ月のエコー検査での経過観察において, 移植部位での収縮拡張の発現が 63% の症例にて報告されていることや, 大動物での経過観察結果から, 移植骨格筋の直接作用も可能性としては残されている.

SMT は, すでに臨床治験 (第 I 相) を終了し, その安全性と可能性に関しては一定の成果を生んでいるといえる²⁹⁾. 骨格筋は患者の大腿部より局所麻酔下にて採取され, 平均 871×10^6 cell (50% 以上の骨格筋芽細胞 70% 以上の正常細胞) まで 2~3 週間で増幅され, 細胞移植に関連する手術死亡なしに治療が行われた. 11 カ月の経過観察において, 左室駆出率 (EF) は術前 24% から 32% に, 臨床症状は術前 NYHA 2.7 より 1.6 に改善している. しかしながら, この治験において 9 例に心室性頻脈 (VT) の発生を認め, 4 例の sustained VT には AICD の植込みが必要であっ

たことは、多くの臨床医が憂慮していた SMT における不整脈の発生を実証することにもなった。また、その後の長期経過観察(18~58 カ月)によって心機能は EF 28%と比較的維持できているものの、37 例中 3 例に心不全による入院加療(内 2 例は resynchronisation therapy)、5 例に新たな AICD 植込みが必要となった³⁰⁾。SMT の臨床治験はその後第 II 相に移行したが、患者募集の困難とプラシーボを使用したコントロール群との間に治療効果の差が認められないことから現在、停止されている。

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

近年、幹細胞研究が目覚しく進歩するのに伴って、心臓源性の心筋前駆細胞(resident cardiac stem cell)に関する報告が散見されている。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 が用いられている。これらによって抽出される細胞は、驚くべきことに各々がほぼ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。2003 年 Beltrami らは c-kit を有する細胞を成体ラット心から抽出することに成功し、これらの細胞が無限の自己再生能、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³¹⁾。この c-kit+ 細胞はラットの心筋梗塞モデルへの細胞移植によって、心臓源性の細胞(心筋細胞、血管上皮細胞、平滑筋細胞)に分化することが確認されている。

Sca-1+ 細胞は Schneider らによって報告された 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の報告がなされている³²⁾。その他、Martin ら³³⁾、Pfister ら³⁴⁾によって Sca-1+ および low c-kit+ の細胞“side population cells”がマウスの成体心、心臓発生過程を通して存在することが報告された。最も新しい RCSC の報告は、the homeobox gene isl-1+ 細胞である³⁵⁾。この isl-1+ 細胞は、心臓の発生を通して流出路、心房、右心室の形成に寄与しているものであり、マウスの新生児心における isl-1+ 細胞は Nkx2.5, GATA4 といった心臓の転写因子を認めるが、Sca-1, CD31, c-kit 等は認めない³⁶⁾。ここに述べた RCSC のすべては、c-kit+ 細胞と同様に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、少なくとも 4 種類の心筋分化可能な前駆細胞が存在していることになる。これらの報告は、従来の心筋梗塞からの回復は不良である臨床像と矛盾するとも考えられる。しかしながら、前駆細胞の心筋細胞への再生が極めて遅いために、多量の細胞喪失を引き起こす心筋梗塞には対応できないだけで、すでに前駆細胞の存在が確認されている脳や腸においても梗塞後の修復が不良であることからすれば、矛盾しないとも考えられ、今後のさらなる研究報告が待たれるところである。

3. 骨髄細胞(bone marrow stem cell; BMSC)

骨髄細胞とは骨髄由来の万能細胞を意味し、今日の細胞移植治療において最も注目されている細胞といえる。ES 細胞と同様の万能性をもつため、adult stem cell と呼ばれ、心筋細胞他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、今なおこの万能細胞、前駆細胞に対する定義付けが確固されておらず、その名称に関しても“marrow progenitor cell”, “marrow stromal cell”, “marrow mononuclear cell”, “mesenchymal stem cell”等多彩である。ES 細胞と同様な特徴をもつこの細胞は、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 の移植後の血管形成、筋形成への効果に関する情報は、今なお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ている³⁷⁻³⁹⁾。

BMSC を利用した細胞移植治療は、その簡便性から基礎的な実験データの集積を待たずに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⁴⁰⁻⁴³⁾。これら臨床治験第 I 相の目的は、その安全性と治療手技の可能性に関する評価であり、治療としての安全性、可能性には一定の評価が得られている。その多くで症状の改善、心筋組織への血液灌流改善が認められているのに加え、SMT と異なり sustained VT を含めた心室性不整脈の発生報告がない点は、注目に値する。しかしながら、これらの多くはプラシーボ効果を除外するためのコントロール群をもたず、治療患者は少数かつ作為的抽出であった。これに対し、近年患者の無作為抽出で、プラシーボ効果を除外するためのコントロール群をもった多施設臨床治験(BOOST trial)の結果が報告された⁴⁴⁾。これによると、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。したがって、その長期にわたる治療効果に関しては十分といえない結果となった。Jackson ら⁴⁵⁾は、骨髄から採取した細胞中、心筋細胞に分化し得る細胞は 0.02%程度であり、明らかに心筋梗塞で失われた機能を修復するには不十分であると報告している。この点で、BMSC 由来の心筋細胞での機能回復を期待するためには、その細胞特性を損なうことなく細胞数を増幅し、細胞移植する技術の開発が必要といえる。そのため、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等の分泌(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である。しかしながら、この効果は移植細胞、RCSC の心筋細胞への分化促進、レシピエントの心筋細胞の細胞周期への再導入、骨髄内、循環血液内の前駆細胞の心臓内導入等を促す可能性は十分あり、その検討が必要なのはいうまでもない。以上のことから、今後の BMSC 臨床応用では無作為患者抽出、コントロール群(プラシーボ効果)を含んだ多施設による治験が絶対的条件であり、単発的に各施設で行う

BMSC 細胞移植治療とその報告は、細胞移植治療に関しての誤った情報を人々に与える恐れもあり、厳に慎むべきであることを併せて強調しておきたい。

IV. 将来における biological therapy の展望

近年の分子生物学的な心疾患に対する知識の集積は、biological therapy という全く新しい治療方法を生み出しつつある。遺伝子・細胞治療の概念は1990年代に始まった動物実験の報告以来、医療関係者のみならず、一般の人々にも急速に浸透し、臨床応用へ邁進している。今日までの前臨床、臨床治験の結果は、ここで解説したように心不全治療戦略において biological therapy が標準的治療になり得る可能性を十分示唆するものといえる。この点で、われわれは心不全治療における新時代の夜明けに立っていることは間違いない。しかしながら、今後この治療に関連した詳細な作用機序を探求することが今後の臨床治験の正当性を公共に示すためにも、またこれを標準的治療として確立するためにも必要である。現在、多くの医学雑誌において臨床治験の報告は、開始前におけるそのガイドラインの報告が義務づけられ、臨床治験を行うチーム、妥当性を科学的に立証できる基礎研究チーム、臨床治験結果を評価する独立したチーム等が必要になっている。この点で、biological therapy における各関係学会の連携とリーダーシップが重要なものはいまでもないのである。

文 献

- 1) British Heart Foundation statistics. www.heartstats.org. 2003
- 2) Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rossow S, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Schainfeld R: Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1995; **91**: 2687-2692
- 3) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE: Phase1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; **105**: 2012-2018
- 4) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL: Angiogenic gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; **105**: 1291-1297
- 5) Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, Iskandrian AE, Rade JJ, Marrott P, Pratt C, Kleiman N, for the Angiogenic GENE Therapy (AGENT-2) study group: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**: 1339-1347
- 6) Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Narvanen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M, Yla-Herttuala S: Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia Phase 2 results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003; **107**: 2677-2683
- 7) Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, Botker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyongyosi M, Sylven C, the Euroinject One Group: Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris. A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One Trial. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**: 982-988
- 8) Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JMO, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, Charbonneau F, Cohen E, Curtis M, Buller CE, Mendelson FO, Dib N, Page P, Ducas J, Plante S, Sullivan J, Macko J, Rasmussen C, Kessler PD, Rasmussen HS, on behalf of the REVASC Investigators: Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF121 (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Therapy* 2006; **13**: 1503-1511
- 9) Sato M, Fuller SJ, Hajjar R, Harding SE: Targeting genes and cells in the progression to heart failure. *Heart Failure Clin* 2005; **1**: 287-301
- 10) Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, Rosenzweig A: Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 1997; **95**: 423-429
- 11) Giordano FJ, He H, McDonough P, Meyer M, Sayen MR, Dillmann WH: Adenovirus-mediated gene transfer reconstitutes depressed sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase levels and shortens prolonged cardiac myocyte Ca²⁺ transients. *Circulation* 1997; **96**: 400-403
- 12) del Monte F, Harding SE, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Hajjar RJ: Improvement in contractile function in isolated failing human ventricular cardiac myocytes by gene transfer of antisense phospholamban. 2000
- 13) Felker GM, Benza RL, Chandler AB, Leimberger JD, Cuffe MS, Califf RM, Gheorghade M, O'Connor CM, OPTIME-CHF Investigators: Heart failure etiology and response to milrinone in decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 997-1003
- 14) Ito K, Yan X, Feng X, Manning WJ, Dillmann WH, Lorell BH: Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca (2+) atpase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure. *Circ Res* 2001; **89**: 422-429
- 15) del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ: Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 2001; **104**: 1424-1429
- 16) Koss KL, Grupp IL, Kranias EG: The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol* 1997; **92** Suppl 1: 17-24
- 17) Sato M, O'Gara P, Harding SE, Fuller SJ: Enhancement of adenoviral gene transfer to adult rat cardiomyocytes in vivo by immobilization and ultrasound treatment of the

- heart. *Gene Ther* 2005; **12**: 936–941
- 18) Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, Date MO, Gu Y, Iwatate M, Li M, Wang L, Wilson JM, Wang Y, Ross J, Jr., Chien KR: Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* 2002; **8**: 864–871
 - 19) Terracciano CMN, De Souza AI, Philipson KD, MacLeod KT: Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticular Ca regulation in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing the Na-Ca exchanger. *J Physiol (Lond)* 1998; **512** Pt3: 651-677
 - 20) Magee WP, Deshmukh G, Deninno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR: Differing cardioprotective efficacy of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**: H903-H910
 - 21) Sato M, Gong H, Terracciano CMN, Ranu HK, Harding SE: Loss of beta-adrenoceptor response in myocytes overexpressing the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. *J Mol Cell Cardiol* 2004; **36**: 43–48
 - 22) Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH: Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res* 2003; **93**: 487–490
 - 23) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Rosemblyt N, Marks AR: PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101 (2000), pp. 365-376. *Cell* 2000; **101**: 365–376
 - 24) Prestle J, Janssen PM, Janssen AP, Zeitz O, Lehnart SE, Bruce L, Smith GL, Hasenfuss G: Overexpression of FK506-binding protein FKBP12.6 in cardiomyocytes reduces ryanodine receptor-mediated Ca(2+) leak from the sarcoplasmic reticulum and increases contractility. *Circ Res* 2001; **88**: 188–194
 - 25) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; **264**: 98–101
 - 26) Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE: Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 1999; **100**: 193–202
 - 27) Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE: Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; **149**: 731–740
 - 28) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; **357**: 279–280
 - 29) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D: Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1078–1083
 - 30) Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P: Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 2006; **114**: I108-I113
 - 31) 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
 - 32) 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
 - 33) Martin CM, Messon AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ: Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; **265**: 262–275
 - 34) Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, Colucci WS, Liao R: CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 2005; **97**: 52–61
 - 35) Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S: *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003; **5**: 877–889
 - 36) Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR: Postnatal *Isl1*+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; **433**: 647–653
 - 37) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; **100**: II247-II256
 - 38) Saito T, Kuang JQ, Lin CC, Chiu RC: Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; **126**: 114–123
 - 39) Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK: Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **123**: 1132–1140
 - 40) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; **106**: 1913–1918
 - 41) Stamm M, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; **361**: 45–46
 - 42) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP: Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; **361**: 47–49
 - 43) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT: Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; **107**: 2294–2302

- 44) 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
- 45) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2002; **107**: 1395–1402