

骨格筋筋芽細胞による心筋再生治療

関谷 直純, 澤 芳樹

Sekiya N, Sawa Y: **Myocardial regeneration therapy for heart failure.** J Jpn Coron Assoc 2008; 14: 87-89

I. はじめに

心不全に対する治療法として、βブロッカーや ACE-inhibitor 等による薬物療法が行われるが、それにも奏効しないほど重症化した場合には、補助人工心臓や心臓移植などの置換型治療が有効であり、これまでわれわれも本邦における臨床的有用性を報告してきた。しかし、これら重症心不全に対する置換型治療はドナー不足や免疫抑制、合併症など解決すべき問題点が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とはいえない。

一方、重症臓器不全に対する新しい治療法として、再生型治療法が注目されつつある。このうち、心不全に対しても、近年、心筋再生治療が取り込まれ、その展開が今後不可欠と考えられる。元来、心筋細胞は、ほとんど分裂しないため、不全心筋において傷害を受けた心筋細胞は最終的に apoptosis 等によりその数は減少する。しかし、最近、心筋への細胞移植は心機能を改善させることが報告され、骨格筋筋芽細胞による細胞移植の臨床応用が開始されている。

II. 骨格筋筋芽細胞移植

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、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(図1)。

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傷害を受けたときに、分裂・分化を開始し、傷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、Marelli¹⁾らは筋芽細胞をイヌの心筋梗塞巣に移植し、その生着を確認した。また、Murry²⁾らは自己骨格筋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、凍結傷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、このような状況のなかで、Menasché³⁾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、埋込み型除細動器(ICD)の埋込みを余儀なくされた。一方、Diacrine社の治療としてアリゾナハートセンターのDibら⁴⁾が行った臨床試験では冠動脈バイパス術(CABG)単独群に比べて心機能の回復が示唆され、なにより致死的不整脈はわずかであったことが示されている。実際、適応患者は重篤な虚血性心筋症(ICM)の患者であり、はたして筋芽細胞が心室細動(VF)などの発生原因かどうか、あるいは針による傷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。

現在、ヨーロッパでは Genzyme 社やメドトロニック社が100例以上の大規模試験を行っているが、前述のように致死的不整脈の有無がポイントであり、ICD埋込みを前提として行っている。一方、DibらはFDA承認のもと phase II 臨床試験を開始しつつあり、その結果が期待されている。

III. 骨髄細胞移植

近年の stem cell biology の発展により、成人の組織においても未分化幹細胞が存在していることが明らかとなり、様々な細胞に分化しうることが明らかとなった。特に、骨髄間質細胞中には間葉系の未分化幹細胞が含まれており、中胚葉系の様々な細胞に分化することが報告された。Makino⁵⁾らはこのことに注目し、5-アザシチジンを用いて胎児型心筋細胞、いわゆる cardiomyogenic (CMG) cell を誘導することに成功した。また、Orlic⁶⁾らは、骨髄 Lin-c-kitPOS 細胞を梗塞心に移植したところ、骨髄由来の新生心筋細胞により梗塞巣は修復され、梗塞心の機能改善が得られたことを報告した。生体内に存在する骨髄から分化誘導された心筋細胞は、自己細胞よりの心筋再生という点で、きわめて有用な細胞源となるものと思われる。

また最近では、骨髄細胞中に血管内皮前駆細胞が多数認められ、血管新生が助長されていたことが報告されてい

大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管外科(〒565-0871吹田市山田丘2-2)(本論文の要旨は第20回日本冠疾患学会学術集会, 2006年12月・東京にて発表した)
(2007.6.1受付, 2008.1.8受理)

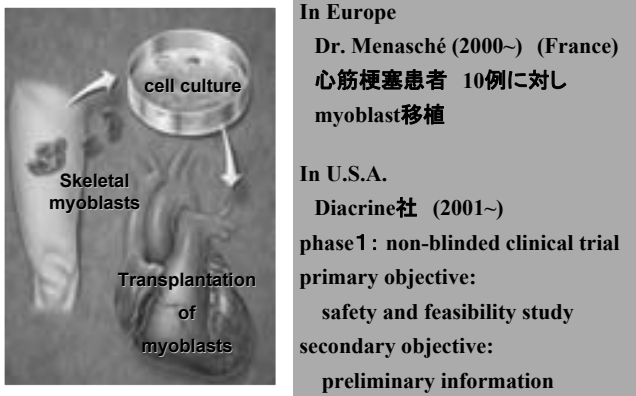


図1 虚血性心筋症に対する自己骨格筋筋芽細胞移植

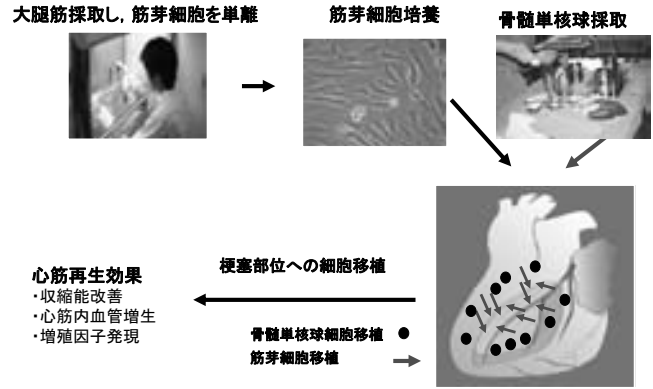


図2 虚血性心筋症に対する筋芽細胞+骨髄単核球細胞を用いた心筋再生治療

る⁷⁾。このデータをもとに最近、わが国をはじめ世界の国々で虚血心筋に対する骨髄単核球細胞移植や末梢血単核球細胞移植が行われている。現状では、これらの細胞移植は、血管構築をターゲットにした細胞療法と考えられるが、現在世界中で盛んに行われている幹細胞からの心筋細胞の分化誘導が明らかになってきた時点で、心筋再生が可能になるものと思われる。

IV. 自己骨格筋筋芽細胞および自己骨髄単核球細胞移植を併用した心筋再生治療

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起こさないため、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。前述のように最近、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行えず、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ものと思われる。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、筋芽細胞の生着には有用であると考えられる。

そこで、著者らは骨格筋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、イヌの心筋梗塞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べ、心機能および壁厚が有意に回復するとともに、リモデリング抑制効果も認められた⁸⁾。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筋芽細胞による細胞治療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合わせた心筋再生が期待される(図2)。

現在、自己骨格筋筋芽細胞による治療法は、細胞源として最も倫理的であり供給量としても臨床応用に適していると思われる。すでに著者らはGMPに準拠した細胞培養施設を院内に設置し、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、2例の臨床試験を実施し、心機能の回復とBNP値の低下および不整脈の発生のないことを検証した。

V. 拡張型心筋症に対する治療戦略

近年、拡張型心筋症(DCM)などの重症心不全に対する治療の一選択肢としてさまざまな細胞移植の研究が行われており、心機能の改善が報告されている。しかし、従来の移植方法は dissociated cell の needle による direct injection であり、心臓全体への移植は困難と考えられる。そこで著者らは、組織工学を用いた筋芽細胞シートによる細胞移植⁹⁻¹¹⁾をグローバルな心筋変性疾患であるDCMモデルにも応用し、DCMに対するあらたな治療法となりうるかを検討した(図3)。

27週齢 BIO TO-2 (DCM)ハムスターを対象とし、温度応答性培養皿を用いて作成した筋芽細胞シート移植群(S群, n=21), needle injection 法による筋芽細胞移植群(T群, n=15), 開胸手術のみのコントロール群(C群, n=18)を作成した。その結果、左室拡張末期径(LVDd)は、T, C群で術後に拡大傾向を示したが、S群ではLVDd

The culture surface grafted with N-isopropylacrylamide (temperature-responsive polymer)

東京女子医大 岡野光夫教授発明

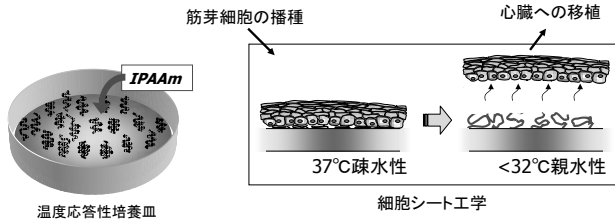


図3 温度応答性培養皿による筋芽細胞シート作成

の拡大は有意に抑制された。左室駆出率(LVEF)は、C群に比してS群では、長期にEFの改善が維持された。組織では、C群に比してS群で有意な左室壁厚の増大が認められ、S群では移植した細胞シート内に多数の新生血管が認められた。免疫組織染色では、aおよびb-sarcoglycanの発現をS群のみに認めた。また、治療効果によりS群の生存は有意に延長した¹¹⁾。

また、前臨床試験としてイヌに対し高速ペーシングモデルによる拡張型心筋症モデルを作成し、筋芽細胞シート移植による心機能改善に対する有用性について確認しており¹²⁾、本格的な臨床応用への展開を考えている。

VI. おわりに

以上のように、心機能の低下した不全心筋も骨格筋筋芽細胞や骨髄細胞などの自己細胞移植や遺伝子治療¹²⁾により、また組織工学的技術を駆使することにより、病態に応じた再生治療が可能になるとと思われる。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) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy, Kao RL, Chiu RC: Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992; **1**: 383-390
- 2) Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD: Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2512-2523
- 3) Menasché P, Hagege A, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Saratesnu S, Scorsin M, Schwartz K,

- Bruneval P, Benbunan M, Maroulleau JP, Duboc D: Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post-infarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 1078-1083
- 4) Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kreiakes DJ, Lengerrich R, Binkely P, Buchele D, Anand I, Swingen C, Di Carli MF, Thomas JD, Jaber WA, Opie SR, Campbell A, McCarthy P, Yeager M, Dilsizian V, Griffith BP, Korn T, Kreuger SK, Ghazoul M, MacLellan WR, Fonarow G, Eisen HJ, Dinsmore J, Diethrich E: Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005; **112**: 1748-1755
- 5) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; **103**: 697-705
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, Mckay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701-705
- 7) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post-natal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; **85**: 221-228
- 8) Memon IA, Sawa Y, Miyagawa S, Taketani S, Matsuda H: A combined autologous cellular cardiomyopathy with skeletal myoblasts and bone marrow cells in the canine heart for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; **130**: 646-653
- 9) Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, Taketani S, Kondoh H, Memon IA, Imanishi Y, Shimizu T, Okano T, Matsuda H: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: Transplantation 2005; **80**: 1586-1595
- 10) Kondo H, Sawa Y, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, Memon IA, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuda H: Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Resc* 2005; **69**: 466-475
- 11) Hata H, Matsumiya G, Miyagawa S, Kondoh H, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuda H, Sawa Y: Grafted skeletal myoblast sheets attenuate myocardial remodeling in pacing-induced canine heart failure model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; **132**: 918-924
- 12) 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