

## IV-2-1. 細胞培養の問題点 一心臓領域での再生細胞療法にむけて

大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管・呼吸器外科

澤芳樹

### 1. はじめに

ヒトゲノムプロジェクトがほぼ終了、世界はポストゲノム・バイオテクノロジーの実用化時代に突入している。それら領域のなかでも再生医学・医療へ向けられているまなざしは熱く、難治性疾患への期待として話題に上らない日はない。また、経済的側面に注目するとその市場規模は世界では約 48 兆円、日本国内でさえ約 5 兆円に至ると推定されている。従って、再生医療の実現・産業化は、国民の期待に応えるという面からも、本邦国際競争力の維持向上という観点からも必要不可欠な課題であるといえよう。

再生細胞医療が従来の医療と比べ大きく異なる点は、「生体由来細胞」が「培養」という過程をへて「薬剤」として患者さんに投与される、ということにある。「培養」という過程が入ることで予測できないリスクが存在するであろうことは想像に難くない。しかし、「培養」という工程がなければ患者さんの治療に求められる機能細胞の質の確保も量の確保もできないとしたら、治療に用いるべきではないのであろうか。

ほぼすべての薬剤や治療手段には、副作用や合併症のリスクが存在する。輸血製剤においさえ、アレルギーやウィンドウピリオドによるウイルスの伝播、未知ウイルスが検出できていないことなどの否定は困難である。安全性を究極まで追求すると「不作為」が最善の選択肢となってしまう。しかし、患者の切実な要求に応えられないことこそが非倫理的なのでないだろうか。反面、有効性を追求しすぎると安全性を損なう懸念が増す。そこで安全性と有効性を併せ考えリスクとベネフィットを天秤にかけた上で議論すべきであろう。本稿においては、このような視点から、自験例を参考として「培養」過程における課題に関して述べることにする。

### 2. 細胞培養における問題点

培養することにより得られるメリットは、増殖・分化・選択の 3 点である。組織工学の 3 大要素は足場・細胞・培養液（成長因子や培養技術を含む）であり、これら 3 大要素を駆使して出発点の細胞を望むべき細胞に増殖・分化・選択してゆくのである。選択の手段は増殖率の違いにより継代培養により増殖速度の遅い細胞集団を限界希釈してゆくという方法、また成長因子などへの反応性を利用し positive selection をかける方法と negative selection をかける方法とがある。すなわち、特定の培養液により望ましい細胞の増殖率が向上する、あるいは望まれない細胞の増殖率が低下するなら、継代により選択培養することが可能となる。自験例を挙げて述べれば、骨格筋由来細胞は、骨格筋組織を細切しコラ

ゲナーゼにて分離、骨格筋芽細胞を採取しており、そこには骨格筋芽細胞と線維芽細胞、脂肪前駆細胞などが含まれるが、特定の培地では線維芽細胞と脂肪前駆細胞の増殖率は低い一方で骨格筋芽細胞の増殖率は高いため、継代培養により骨格筋芽細胞を選択して純化することが可能となる。また、継代数が5代を超えると骨格筋芽細胞の増殖率は低下する一方で線維芽細胞の増殖率は増加、継代を進めると線維芽細胞が優位となるという性質があるため、細胞の量と質のバランスから5代の継代にて臨床使用している。

歴史的にみて細胞培養技術の発展は、細胞の増殖と分化機能を支持する培養液の開発にあったとって過言ではない。初期では動物体液や臓器抽出物などが用いられていたが、現在では動物血清添加を前提として、合成培地が多数開発されてきている。現在では、培養液に動物由来血清やヒト血清を添加することが一般的な技術となっている。以前は経済性の問題から無血清培地の作成が試みられてきた。現在では、血清は動物由来タンパク質などの未同定なものを含む多様な成分からなることに起因する安全性での問題、また原因不明のロット差という問題から無血清培地の確立が試みられている。今後無血清培地確立の試みが続くであろうが、すべての細胞種に有効な培地の作成はまず不可能であり、個々の細胞種に最適な無血清培地をデザインして行くという方向性となろう。

血清はなぜ必要とされるのであろうか。血清非存在下で培養すると scencence ALP の増加速度が増加すること、p16INK も増加するつまり老化進行が亢進すること、また継代するごとに無血清培地だと増殖率が低下することから、血清には老化抑制作用があると想定されている。無血清培地として販売されている培養液も、継代数が5あるいは10を超えると増殖率が低下し、継代数30を超えると増殖が停止してしまうことを経験する。従来、これら作用には血清に存在する成長因子による効果に加え、アルブミンによるホルモンなどの供給作用が主要な役割を担っていると考えられていた。これらに加え、血清には抗アポトーシス作用があり、この作用にはHDLあるいはアポリポプロテインA-Iによるホスファチジルセリンの引き抜きが関与することが知られている。現在市販されている無血清培地にはこれら作用が認められず、新たな無血清培地の開発が望まれる。将来的に無血清培地による再生細胞治療を行うことは理想である。しかし、実現するまでの間でも、患者さんは目の前に居られる。悲痛な叫びに耳をふさぐわけにはいかない。現実には、リスクベネフィットを考えつつ血清を使用する必要が生じるのである。

血清含有培地により培養した再生細胞を治療に用いるとして、その論点は自己血清を用いるのか非自己由来ヒト血清を用いるのか、あるいは牛胎児血清も可能とするのかである。ヒト血清を用いる利点は、同種であるために異種動物由来ウイルス、蛋白あるいは糖

鎖抗原などを考慮する必要がない、ということである。輸血製剤として一定の安全性が確認されているということも大きな利点であり、安全性の評価に関しても血液型を適合させるか AB 型ヒト血清のみを利用することを前提に輸血製剤に準じればよいと考えられる。しかし、新鮮凍結血漿の輸血においてもアレルギーあるいはショックは経験されることであり、これら副作用がないという論調は誤解を招くのみであろう。ヒト血清のロット間のばらつきも大きく、これを避けるためにプール血清を用いるなら、むしろウインドウピリオドや未知ウイルスなどに起因する感染症伝播のリスクは増大し、現行の輸血行政と逆行する方向性となってしまう。

自己血清を用いることが現状ではもっとも安全であると思われる。抗体による交差反応がなく、また非自己由来のウイルスなどの危険性は無いことがその根拠である。しかし、採血による負担に耐えうるような身体状況であれば問題はないが、自験例のような重症心不全の患者さんでは対外循環式の血清採血法をとるにしても血行動態に変化をきたすリスクが大きい。また、ヒト血清は牛胎児血清と完全に一致するものではない。われわれは、間葉系間質細胞を牛胎児血清とヒト血清とで培養したところ、骨格筋間質に含まれる前駆細胞のうちですでに脂肪細胞へと commitment しているものが脂肪を内包しだすことを確認している（図 1）。これは望むべき分化ではなく、またヒト血清と牛胎児血清とが完全には置き換えることができない可能性を示唆するものである。これらの知見より、現在自験例では牛胎児血清を用いて骨格筋芽細胞を培養し患者さんの治療に用いている。現在までの経験ではアレルギー反応などは認められていない。リスクベネフィットを考慮しつつ、今後何らかの基準・評価指標を設けるべきであろう。

### 3. 再生細胞治療にむけた細胞培養における問題点

実験室で細胞を培養するのと治療に用いる細胞を培養するとの間では、その品質維持管理という点でいわゆる“死の谷”が存在する。薬剤として用いる場合、院内製剤を除き薬事法に規制される。すなわち Good Manufacturing Practice (GMP) 水準での細胞培養が求められるのである。GMP 水準を満たすには施設面（ハード）と文書面（ソフト）での要求事項がある。

GMP に準拠するための施設：細胞のための細胞培養には、薬事法の希求する GMP に準拠したクリーン度の高い無菌的細胞培養施設・Cell Processing Center (CPC) が必要不可欠である。大阪大学医学部附属病院では未来医療センター内に薬事法の希求する GMP に準拠した細胞調整施設である CPC を設置、その稼働を開始している（図 2）。加えて、センター内に中央手術部と同等のクリーン度を保持した手術室を設置・運用開始し、看護師が常駐している（図 3）。未来医療センター CPC は 4 つの細胞調整ユニットをもち GMP 基準に準拠した組

織・細胞の調整を行うことができる。各細胞調整ユニット内の清浄度はクラス 10,000 であり、各ユニット内に置かれたバイオハザードキャビネットの中はクラス 100 を保持する。このような極めてクリーンな環境の中で組織・細胞の調整から保存・出荷まで行うことができる。ガウニング室で1次更衣・2次更衣を行う。1次ガウニングユニットで無塵衣を着用した後はデガウニングユニットまですべて1方通行インターロックシステムとなりクロスコンタミネーションを許さないように設計されている。

GMP に準拠するための文書管理：CPC は全てドキュメントにより動いているとって過言ではない。ドキュメントにより指示された内容にあった運営が行われており、その運営の記録も全て残されていく。例えば入室方法に始まり、施設の清掃・室内機器のメンテナンス・環境モニタリングなど列挙すればきりがなほどの事項について指示文書があり、それに伴う記録が残されている。細胞の調整についても同様であり、まず再生医療の内容が記載された実施計画書があり、その指示に基づき製品標準書・各種手順書で使用する機器・試薬・消耗品を指定し、その手順を詳細に記載する。そこから製造指図記録書で調製の指示が出され、これに従って作業するたびに確認記録を残していく。このドキュメントの特に記録の重要性を置くということは、GMP の精神に基づいており、ドキュメント作成時に考え方のベースとなるのも GMP をはじめとする関連する指針である。しかし、自験例を通し、細胞などの生きているものを扱うには適さないと思われる内容も多くあることが認識され、今後は現実的な運用を考慮した新しい GMP を提唱していくべきかもしれない。

#### 4. おわりに

再生細胞医療を普遍化するには超えるべき問題点が多い。とくに細胞を生体外で培養して生体内にもどす、という過程があることで、様々な課題が生じる。培養液における血清の問題も課題のひとつであるし、細胞培養するためのハード・ソフト、そして人材育成の問題も避けられない課題である。“死の谷”があったとしても、万難を排しても乗り越えねばならない。ただ、患者さんやその家族の笑顔を見たい、そう想いつつ。

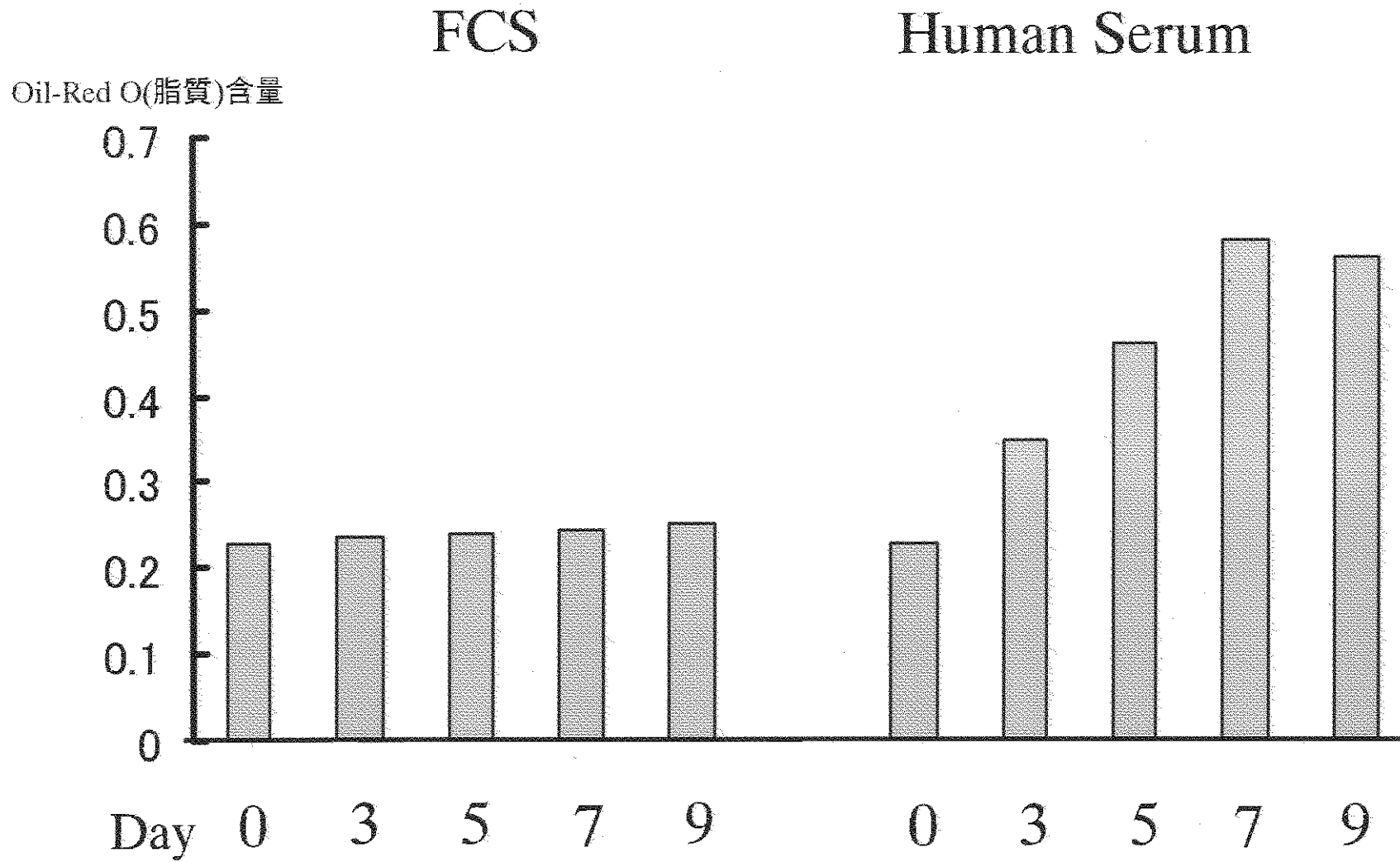
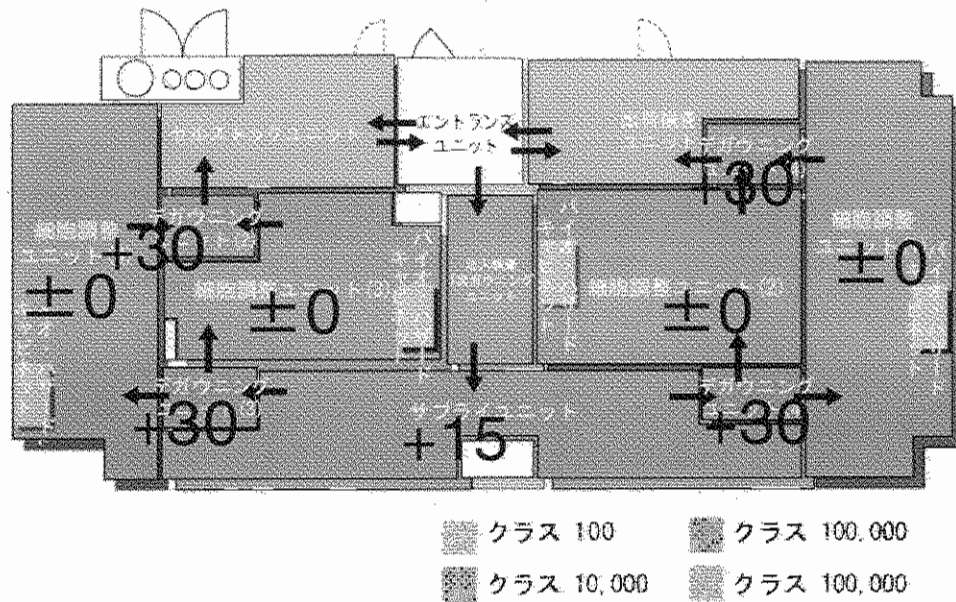
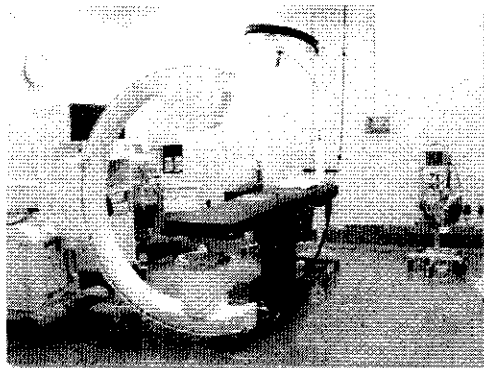


図1. ヒト血清による脂肪細胞の分化



- 4つの細胞調節室
- バイオハザードキャビネット内はクラス100を保証
- これを支援する細胞調整室はクラス10000
- 一方通行のインターロックシステム
- 清浄度の確保と封じ込めを考慮した室圧設定

図2 細胞培養調整準備施設: cell processing center



3D-CT撮影装置



全身麻酔管理システム

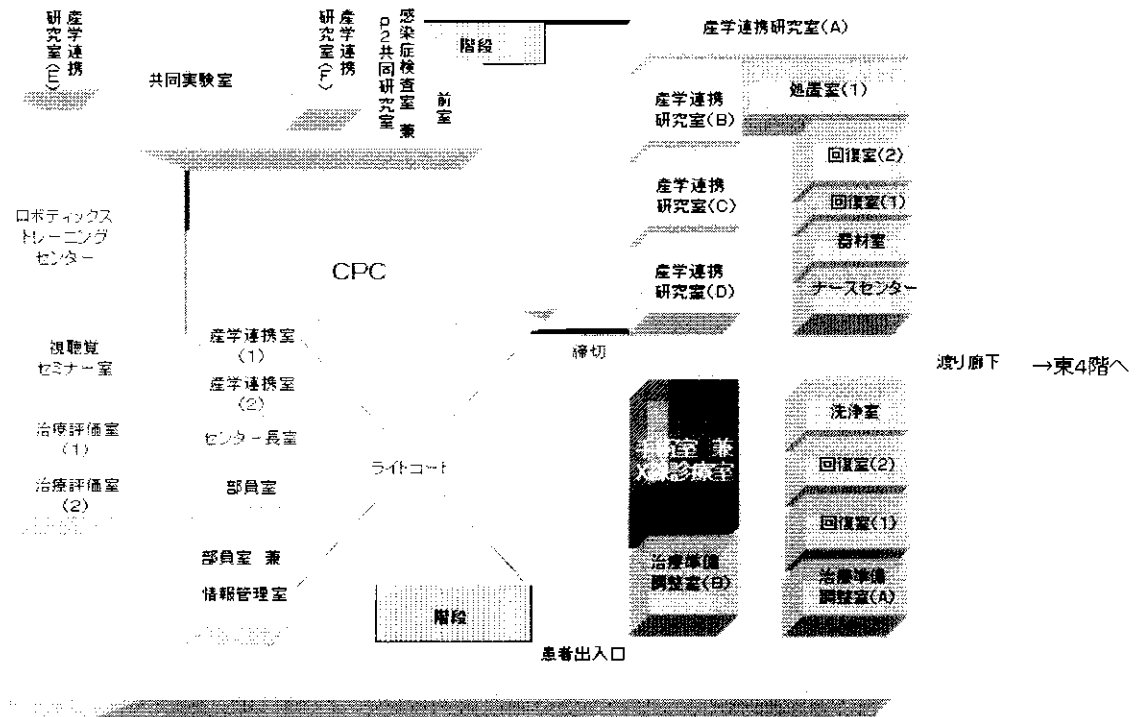


図3 未来医療センター手術室

## IV-2-2. 心臓領域での細胞移植(とくに Myoblast):

骨格筋芽細胞の性質(ドナー年齢による培養成績の違いなど)

京都大学心臓血管外科  
丹原圭一、米田正始

### はじめに

心筋梗塞を伴う虚血性心疾患に対する筋芽細胞移植 (myoblast transplantation) に関しては、2006年3月の時点で、欧米を中心に10近い臨床試験がすでに行われている。いままでのところある程度の有効性は認められてはいるようであるが、それぞれの検討において適応基準が統一されていないこともあって、虚血性心疾患に対するさまざまな治療法の中での位置づけはまったく確立されていない。すなわち、単独療法として有効なのか、また、従来から確立された血行再建法であるカテーテルインターベンションや冠動脈バイパス術、あるいは比較的新しい外科的治療法である左室形成術などどう組み合わせて用いればよいのか、さらには、細胞移植と同様に最近出現したタンパクや遺伝子を用いた血管新生療法と比較するとどういう点で優れているのかなど、その臨床応用を考えるうえで極めて重要でありながら明らかにされていない問題点がいくつも未解決のままである。

残念ながら、これまで実施された虚血心に対する臨床試験においては「ドナー年齢による培養成績の違い」について検討したものはない。そこで、筋芽細胞と加齢の関係について調べた文献から得られる知見のうち、筋芽細胞移植の虚血心に対する臨床応用を考えるうえで役立つと思われるものをここでは紹介する。なお、ここでは筋芽細胞といえば衛星細胞 (satellite cell) のことを指すものとする。

### 筋芽細胞の分裂能

成人において、筋芽細胞はふだん筋線維の基底膜と細胞膜 (sarcolemma) の間に不活性な状態 (細胞分裂しない) で存在しているが、外傷や疾病に反応して活性化される。活性化された筋芽細胞は増殖・分化し、その一部は筋肉組織の再生に寄与する。

培養中の筋芽細胞の分裂能は限られており、初期の成長期間の後は分裂時間が増大し、細胞はやがて分裂を止める。一般には20回以上の分裂が可能であると考えられているが、不死化はしない。この増殖能の減少は個々の細胞固有のものであり、冷凍保存された細胞であっても冷凍前に自身が分裂した回数を記憶している。このとき重要なのは細胞の分裂



回数であって培養に要した時間ではない。ヒトの線維芽細胞においては、テロメア長が細胞分裂のたびに規則的に減少し、テロメア長と複製能力の間には強い相関があることが知られているが、筋芽細胞の場合にはそれほどはっきりとした相関はないようで、テロメア長は筋芽細胞の分裂能の目安としてはあまり適していないようである。それよりも、筋芽細胞のうちで筋肉の修復に利用される（移植の場合は筋肉組織を形成する）細胞の数、あるいはこれらの細胞が起こすことのできる分裂回数が重要であり、これには細胞の生育環境が重要な役割を果たす。この観点からも、移植された筋芽細胞はその周囲の環境の激変（悪化）のために大量の細胞死をきたすであろうことが想像されるが、それは実際動物実験や臨床研究にて証明されており（90%以上、ある研究によれば99%が、移植24時間以内に死ぬ。）、筋芽細胞移植の問題点のひとつとして認識されている。

なお、筋芽細胞の移植後の増殖能を移植前に *in vitro* で推定する試みとして Schafer らは ‘Desmin Factor’ なる数値を提唱しているが、（1）これは desmin 陽性細胞の割合が各継代培養の世代ごとに高値で安定している細胞群では移植後にも増殖能が高いという観察に基づいたものである。また、別の研究者はピルビン酸キナーゼなど2つのタンパクを細胞老化の前段階に出現するものとして同定しており、個体の年齢とは無関係であったと報告している。（2）

## 筋芽細胞の再生能と加齢

加齢の特徴のひとつは臓器幹細胞の組織修復力が衰えることであるが、再生能力の高い筋芽細胞も高齢者においてはその機能を失ってくる。ある研究によれば、筋芽細胞の分裂能は生下時には60回、生後5ヶ月では43回、成人後はほぼ一定して15~25回であったという。筋芽細胞の再生能力の加齢に伴う低下が筋芽細胞自体の分子的变化によるものなのか、それとも筋芽細胞のおかれる環境の変化によるものなのかは興味深い問題であるが、これまでの研究によればその両者がともに関与しているようである。

たとえばマウスにおいて、Notch は筋芽細胞の活性化に必要十分な要素であることが示されている。（3）Notch の受容体は高齢マウスの筋芽細胞にも若年マウスと同様に発現しているが、損傷を受けた際に現れる Notch の Delta ligand は加齢とともに誘導されにくくなり、したがってそのあとのシグナル伝達も行われなくなる。これが高齢マウスの筋再生を衰えさせている大きな原因である。驚くべきことに、Notch を強制的に活性化することで高齢者の筋肉に再生能力が回復し、若年者の筋肉であっても Notch のシグナル伝達を妨げると再生能は著しく妨げられたという。

一方、若年ラットの筋肉を高齢ラットに移植する（またはその逆）実験において、筋肉の再生能力はドナーの年齢ではなくレシピエントの年齢によって決定されたという。（4）この実験で移植筋肉片はドナーの筋芽細胞から隔離されており、移植片周囲の組織環境が

移植された筋芽細胞の再生能力に影響を及ぼしたことがわかった。また高齢マウスを若年マウスの血液に曝露させると、Notch シグナル伝達が活性化され、高齢マウスの筋芽細胞の分化・再生能が回復した。(5) これらの実験結果は、筋肉再生に関連する分子の作用経路は全身を循環する要素によって制御されており、これらの要素が加齢とともに変化することで筋芽細胞の活性化が妨げられるようになること強く示唆している。

加齢とともに起こる細胞内部の変化としては、酸化ストレスの蓄積、ゲノム維持能力の衰え、あるいはミトコンドリア機能の低下などさまざまなものがあるが、細胞環境を整えることによってこれらの変化を起こりにくくしたり、また起こっても細胞環境の好転によってその悪影響を打ち消したりすることが可能になれば、筋芽細胞移植の臨床においても幅広い応用が期待される。

## 筋芽細胞の増殖能の向上させる試み

われわれの研究室では、筋芽細胞移植時のグラフト体積の向上を目的として、これまで塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor:bFGF)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor:HGF)、インシュリン様成長因子 (insulin-like growth factor-1:IGF-1) などをゼラチン水和ゲルにて徐放投与する試みを、ラット心筋梗塞モデルを用いて行ってきた。とくに徐放化 HGF を用いることによってグラフト体積は通常の 7 倍に著増した。(6) この結果はヒトの培養時にも応用できるかもしれない。

## まとめ

以上の知見をもとに、筋芽細胞を培養にて増殖していく際に参考になりそうな点をいくつかまとめた。

1. 培養中の筋芽細胞はたかだか 20 回程度しか分裂しない可能性もあり、移植前にあまり何度も分裂させると移植後に増殖しなくなる。
2. 移植時の細胞死を極力少なくする手段が必要である。この点ではシートによる cell delivery は有効な一手段である。
3. 若年者の筋芽細胞のほうが培養時に高い分裂能を有する。しかしながら、個々の細胞群によってばらつきが大きいので注意が必要であり、移植後の増殖能をドナーの年齢からだけでは判断できない。目安としては、Schafer の提唱する 'Desmin Factor' やピルビン酸キナーゼの筋芽細胞における産生量が適用できるかもしれない。
4. Notch シグナル伝達系は、少なくともマウスでは強力な筋芽細胞の増殖・分化能の制御経路であり、同様の伝達系がヒトにも存在するかもしれない。

5. 細胞の生育環境は、筋芽細胞の分化・増殖において個々の細胞の性質に勝るとも劣らないほどの重要性を持つ。少なくとも、筋芽細胞の増殖能を考える際にドナーの年齢よりレシピエントの年齢のほうを重視すべきかもしれない。このことは、臨床では自家移植を念頭においているものと思われるためすぐに問題となるとは思えないが、たとえば培養環境においては培養液の組成を考えるうえで検討に値するかもしれない。
6. 移植前の全身状態の改善によって細胞の生育環境を整え、ひいては筋芽細胞移植の効果を高めることができるかもしれない。
7. bFGF、HGF、IGF-1 などの細胞増殖因子を用いることによって、筋芽細胞の増殖能を *in vitro* および *in vivo* において向上させうる。

## 参考文献

1. Schafer R, Knauf U, Zweyer M, et al. Age dependence of human skeletal muscle stem cell in forming muscle tissue. *Artif Organs*. 2006;30:130-140.
2. Bortoli S, Renault V, Mariage-Samson R, et al. Modification in the myogenic program induced by in vivo and in vitro aging. *Gene*. 2005;347:65-72.
3. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, et al. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*. 2003;302:1575-1577.
4. Carlson BM, Faulkner JA. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am J Physiol*. 1989;256(6 Pt 1):C1262-C1266.
5. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005;433:760-764.
6. Tambara K, Premaratne GU, Sakaguchi G, et al. Administration of control-released hepatocyte growth factor enhances the efficacy of skeletal myoblast transplantation in rat infarcted hearts by greatly increasing both quantity and quality of the graft. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I129-I134.

## IV-2-3. 心臓領域での細胞移植——移植細胞と治療成績——

埼玉医科大学総合医療センター 心臓血管外科  
五條理志

### 緒言

骨髄移植から始まった細胞移植が、心臓病へ適応されるのではないかとの研究が行われ始めて10年以上が経過している。その間に、幹細胞生物学の著しい進歩があり、移植ドナー細胞として多くの候補が上げられるようになり、実験レベルでは細胞移植による不全心の機能改善が数多く発表されてきた。現在では、そのいくつかの細胞においては、臨床のRandomized trialが行われるまでになっている。しかしながら、細胞移植による心機能改善のメカニズムは明らかになっておらず、この方法論への懐疑的見解も完全には払拭されていない。本稿では、現在まで発表されている臨床研究をドナー細胞と治療成績という観点から総括する。

移植細胞ドナーとしては、大きく体性幹細胞と胚性幹細胞の2種類に分けられるが、ヒト胚性幹細胞は倫理上の問題が存在し、まだ臨床に使用できる状態にはない。体性幹細胞には、骨髄及び末梢血由来の単核球・有核球細胞・特殊なマーカー・性質を有する幹細胞・前駆細胞、骨髄及び脂肪組織由来の間葉系幹細胞、骨格筋芽細胞、心臓幹細胞が上げられる。これらの中で、複数の臨床研究が行われている骨髄由来単核球・有核球細胞と骨格筋芽細胞を中心に論ずることとする。

### 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。臨床応用に至るまでに、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及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ている。このことが臨床の場において生じた移植後に生じる不整脈の原因として存在しているという可能性は、現在も否定することができていない。この懸念される事象にもまして、2000年までに40以上の骨格筋芽細胞移植の研究が極めて良好な結果を報告しており、2000年6月に自己骨格筋芽細胞移植の臨床第一例が施行された(1)。その後、8つのPhase I Clinical Trialが虚血性心疾患に対して行われ、そのSafetyとFeasibilityに関して多くの情報が提供された。8つの内で5つが外科的な手法にて心外膜側から心筋内移植を行っており(2-7)、2つがカテーテルを用いてアプロ

一チしいるが、1つは心内膜側からで(8)、もう1つが冠状静脈から心筋内移植を行ってる(9)。

Safety に関しては、心室頻拍の問題が重要である。最初の Clinical trial は、低心機能の冠状動脈バイパス術においてバイパス不可能な瘢痕領域に筋芽細胞移植が行われた。10人中4人において持続性心室頻拍を術後3週間目までに認め、埋め込み式除細動器(ICD)が必要となった(3)。移植領域にもバイパスを行ない前述の Trial と同様の  $10^8$  オーダーの細胞数の移植を行った Trial でも、12例中1例の心室頻拍を術後40日目に認め(2)、細胞数を落として  $10^7$  オーダーとした Trial でも10例中2例が同様の不整脈を術後1日目に認めた(5)。虚血性心筋症にて左室補助人工心臓装着術を施行されるときに、瘢痕部に移植するという Trial においても5例中2例が術後に心室頻拍を起こした(4)。一方、経カテーテル的移植術でも同様の状況が起こっており、心内膜側よりの移植では、13例中3例に心室頻拍が起こり2例が死亡している(8)。冠状静脈よりのアプローチでは、9例中1例で心室頻拍が生じている(9)。最も長い期間フォローアップを行った Trial でも、30例中に2例の持続性心室頻拍を認めている(7)。このように不整脈の発生が報告されている中、その原因はドナー細胞がホストと電気的にも独立に存在しているためなのか、心筋内直接投与の局所へのダメージなのかは不明である。他の可能性としては、選択された患者が心室頻拍を惹起する素因を既に有している割合が高すぎた可能性に関しても、コントロールを怠っていない Trial であるために結論は出せない。もう一つの可能性として、一昨年に自己血清を使って骨格筋芽細胞を培養を行ったところ、心室頻拍が20例中1例も起こっていないことが報告された(6)。これは、前述の12例中1例の不整脈を経験したグループからの報告であり、患者バックグラウンドに関しては違いはないとしている。骨格筋芽細胞を培養する際の牛胎児血清の使用は、未知の感染源という観点からも一つの懸念材料である。血清がどのような働きによって不整脈惹起に関わるのかは推論の域を出ないが、今後の検証が待たれる。

Feasibility に関しては、これらの Trial から、骨格筋バイオプシーより骨格筋芽細胞培養にて2から3週間で、 $1 \times 10^7 \sim 8$  オーダーの細胞を確保することが可能であると確認された。培養においては、Good Manufacturing Practice のガイドラインが厳しすぎる位の状況で運用されており、交叉感染やウイルス感染は報告されていない。また、移植手技では外科的手法でも経カテーテル的手法においても、手技関連の合併症は生じていない。

Efficacy に関しては、Controlled randomized trial は存在せず結論を出せる状況ではない。しかしながら、いずれの Trial においても指標としては全体としての Ejection Fraction: EF を取っており、EFで10%前後の心機能改善を認めている。また、ドナー細胞の病理組織学的な長期間の生着と分化が報告されている(7;10)。

Phase I trial の全てで、Safety に関しては不整脈惹起の可能性が警告され、Efficacy に関しては EF を指標として有望な結果が出された。Menasche らは、Phase I で結論を出せなかった問題に関して、移植部位の収縮性を Primary end point にした大規模・多施設・ダブルブラインド・ランダム化臨床試験を始めている。この臨床試験では、ICD はルーチンに移植されるプロトコールとしている。この Trial が虚血性心臓病への骨格筋芽細胞移植の Safety/Efficacy に関して重要な情報を提供してくれると期待されている。

## 骨髄由来細胞

血液幹細胞や神経幹細胞の研究から体性幹細胞に関する多くの知見が蓄積され、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: Plasticity）することが報告されるや(11)、体性幹細胞を用いた治療（細胞移植）が多くの臓器で研究され始めた(12)。心臓病を治療する目的には、骨髄に存在する候補となる細胞群は、単核球・有核球、間葉系幹細胞、CD133(+) Cells, MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cell)、SP Cells (Side Population Cells)等があるが、それぞれに利点・欠点・制約が存在し、複数の臨床研究へと移行されているのは、単核球・有核球である(13-15)。この細胞移植に G-CSF を加えた臨床研究も行われたが、合併症のリスクが高く中止されている。CD133(+)細胞は1つの Trial が報告されているが、単核球・有核球を用いた場合との差異はないようである。間葉系幹細胞は、学会レベルでは複数の施設より発表され始めているが、Publication としては1つの Trial があるに留まっている(16)。

最も早くに急性心筋梗塞に細胞移植を行った報告では、梗塞後 5-9 日後に経冠状動脈にて  $10^7$  オーダーの単核球移植が行われた(14)。ランダム化コントロールはなく、EF に変化を認めなかったが、核医学検査にて虚血の改善を認めた。TOP-CARE の Trial 名で、急性心筋梗塞だけでなく慢性心不全にも単核球移植を行い、長期間のフォローアップやメカニズムの解析と精力的に報告を行っているグループの報告によると、29 例の急性心筋梗塞の患者に  $10^8$  オーダーの単核球移植が施行された(13)。また、11 例には末梢血前駆細胞移植を行い、マッチドコントロールを取って検討を行っている。EF は 8% 程度改善し、虚血の程度が改善した。ランダム化コントロールを取った Trial は、BOOST Trial と名付けられ、 $10^9$  オーダーの有核球細胞移植が行われた(15)。30 例の心筋梗塞に対して、経冠状動脈にて細胞移植され、EF の改善は 6% 程度で、移植領域での局所壁運動も改善したと報告された。また、いずれの Trial においても左室拡張期容量は変化していない。しかしながら、骨格筋芽細胞移植に見られた不整脈の問題は、どの Trial においても報告されていない。また、実験レベルで有害事象として懸念されていた細胞移植に伴う梗塞や異所性分化（特に骨化）もなかった。

この細胞種は、もともとはその取り扱いの簡便さから選択された経緯もあり、心臓のみならず、下肢の虚血への細胞移植として普及し始め(17)、Safety/Feasibilityに関しては、多施設において実証されている。

Efficacy に関しては、作用メカニズムが血管新生が主なものであると考えられてきたが、ドナー細胞自身が、新たな血管を構築している割合は極めて少ないことが解ってきた。サイトカインを介したパラクライン作用や心臓幹細胞・前駆細胞への作用も検討され始めている。そのような状況の中、Gross effect としての Global EF の改善はいずれも 10%に満たないもので、1つのみがランダムイズコントロールを取っているに過ぎず、骨格筋芽細胞移植と同様に結論を出すには時期早晚であると考ええる。

以上、主要な Clinical Trial を概観した。虚血性心臓疾患の場合、細胞移植の Efficacy の指標としては、局所壁運動: Regional EF を Primary に考え、Global EF は Secondary であると考ええる。Remodeling に関しては長期フォローアップが必要であり、左室拡張容積インデックス: LVEDVI を指標に、Survival を End point にした Trial が必要であろうと考ええる。一方、拡張型心筋症の場合は、Small number での臨床研究も行われておらず、そもそも細胞移植で Global な疾患を治療できるのかを少しずつ詰めて行く時期であると考ええる。

### より良い細胞移植が臨床に応用されるために

臨床の場に細胞移植が始まり 6 年が経過している。まだまだ、Efficacy を比較できるところにまでは到達していないというのが、Clinical Trial の現状であると考ええる。先月、厚生労働省が幹細胞を用いた Clinical trial のガイドラインを策定したとの発表があった。今後、より Efficacy の良い Safety/Feasibility に優れた細胞の Selection, Preparation, Delivery を最適化するに当たり新たな Trial が必要である。しかしながら、治療が標準化され極めて安定した成績を出している急性心筋梗塞のコロナリーインターベンションや冠状動脈バイパス手術に併施するという Trial では、ガイドラインよりも一段要求度の高いプロトコールの検討がなされた上で行われなければならないと考える。大きなリスクのない治療行為に、先に述べた不整脈の問題だけではなく、培養による細胞の癌化や純化による異所性分化の惹起など、薬剤・化合物にはない細胞特有の問題に起因するリスクを与えることは軽視されてはならない。一方で、臨床研究を行うには倫理委員会に申請を行うことになるが、いづれの倫理委員会でも、その審議にはあまりに形式的な書類の山が必要であり、その審議は長期間に及んでいる。更に、細胞移植の企業治験に至っては未だ日本では行われていない。作用メカニズムの不明瞭さのために、No option である疾病に対して先進的医療行為が阻害されてはならないことは、臓器移植や骨髄移植の歴史と現状を見るまでもなく明らか



である。適切な実験成果を基にした臨床研究が迅速に審議されるためにも、その Efficacy に関する指標の合意を得ることは極めて重要である。広く細胞それ自体を治療の道具とする新しい時代に入ろうとしているこの時に、脳死心臓移植の轍を踏まぬように厳格なプロトコルを遵守すること、Clinical trial 全体に関わるフレキシブルでバランスの取れたガイドラインに沿った迅速な審査が行われることが望ましい。

#### Reference List

1. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357(9252):279-80.
2. Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur.Heart J.* 2003;24(22):2012-20.
3. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;41(7):1078-83.
4. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;41(5):879-88.
5. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am.Heart J.* 2004;148(3):531-7.
6. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int.J.Cardiol.* 2004;95 Suppl 1:S29-S33.
7. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005;112(12):1748-55.
8. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a

primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;42(12):2063-9.

9. Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, Rozwadowska N, Kalmucki P et al. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur.Heart J.* 2005;26(12):1188-95.
10. Hagege AA, Carrion C, Menasche P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;361(9356):491-2.
11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
13. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-17.
14. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8.
15. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8.
16. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* 2004;94(1):92-5.
17. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9331):427-35.

#### IV-2-4. 心臓領域での細胞移植:移植細胞のカクテル化と治療成績

大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管・呼吸器外科

澤芳樹

##### 1. はじめに

従来の内科的・外科的治療では救命困難であった、拡張型筋症や心筋梗塞後の虚血性筋症による末期重症心不全に対する治療は今なお臨床上大きな問題である。現在、末期重症心不全例に対する唯一の有効な治療法は心臓移植であるが、移植までの待機中にブリッジ (bridge to transplantation) として補助人工心臓、特に左室補助人工心臓 (left ventricle assist device: LVAD) を装着するケースがほとんどである。しかし心臓移植に関しては、移植後の免疫抑制療法に伴う感染症の危険性、遠隔期の冠動脈硬化病変の出現、絶対的なドナー不足などが深刻な問題となっており、また、現在の補助人工心臓は血栓塞栓症や感染などの合併症やその耐久性に問題があり、患者の QOL (Quality of Life) も非常に制限され、長期補助は困難である。そういった問題を解決するために、更なる長期補助が可能な補助人工心臓や、完全置換型人工心臓の開発などについての研究が行われているが、十分満足のいく結果は得られていないのが現状であった。

幸いなことに、末期重症心不全での LVAD 装着術後に自己心機能が改善し、LVAD からの離脱が可能となる症例、いわゆる LVAD の “Bridge to Recovery” use が報告されつつある。しかし、病態が十分に解明されておらず、また離脱症例は LVAD 装着例のごく一部に過ぎず、長期離脱例は少なく再度 LVAD 装着や心臓移植を要する症例が認められるなど残された課題も少なくない。また、離脱例において LVAD に起因する合併症や LVAD 装着に対する肉体的、精神的負担から解放されるものの、不全心の心機能の程度により患者の QOL は大きく制限されるということからも、さらにもう一段階心機能を改善させるための新しい治療法の開発が待たれていた。

元来心筋細胞は分裂能が低いとされるが、骨格筋に含まれる「筋芽細胞」は筋肉が損傷を受けたときに分裂して修復する。心筋と骨格筋とは構造、機能、顕微鏡的外観に類似する部分が多く、そのため骨格筋由来の「筋芽細胞」によるは傷害心筋の治療が試みられている。また、骨髄由来細胞には血管内皮前駆細胞が存在することが示され、その血管新生作用に期待がもたれている。これらの治療法、すなわち「骨格筋芽細胞による傷害心筋の修復治療」と骨髄由来細胞による血管新生治療」を組み合わせることで良好な治療効果を得られると考えるのはまさに合理的である。

LVAD 装着と上記のような心筋再生医療を併用することで、十分な心機能の改善が期待されよう。またその結果、一旦装着した LVAD からの離脱が可能となれば、これまで心臓移植、LVAD 装着のみでしか救命できなかった患者を救命でき、LVAD の合併症のリスク軽減、移植待機中の患者の QOL 向上につながると思われる。そこで我々は、従来の内科的治

療法では救命困難であった左室補助人工心臓（LVAS）装着の必要な末期的虚血性心筋症の症例に対し、左室補助人工心臓を装着すると同時に、骨格筋より単離した自己筋芽細胞および自己骨髄単核球細胞を不全心に移植することにより左室機能の改善を目指し、その治療法の安全性を検討するとともに被験者の術前・術後の心機能を比較評価することを目的として臨床試験を開始したのである。

## 2. 症例

### 54 歳男性 虚血性心筋症

現病歴：1996 年（45 歳時）急性心筋梗塞発症。冠動脈形成術（POBA）施行されるも peak CK 7059 であり、心筋梗塞は完成していた。以後、内科的に治療継続されるも 2001 年（50 歳時）再度心筋梗塞発症。PCI 施行により peak CK は 2123 にとどまったが、広範囲陳旧性心筋梗塞巣が残存していた。2004 年（53 歳）4 月 22 日、自宅にて突然ショック状態となり、りんくう総合医療センターへ救急搬送。心筋梗塞による pump failure と診断され PCPS、IABP 挿入。その後もカテコラミンからの離脱は不可能であり、また shock kidney により腎不全に陥っており持続腹膜透析導入となった。虚血性心筋症が完成しており従来の治療法では治療困難と判断され、家人の強い希望もあり 6 月 22 日、自己筋芽細胞移植を含めた外科的治療目的で阪大病院転院となった。

入院後経過：7 月 1 日心不全悪化、IABP 挿入となった。患者本人ならびに家人の書面に手の了解のうえ、細胞再生医療による治療を開始することを決定、7 月 6 日骨格筋芽細胞の採取目的にて局麻下にて大腿四頭筋より約 10g の骨格筋を採取、細胞治療プロトコールにのっとり、無菌的細胞調整施設（CPC）にて培養を開始した。7 月下旬となり、消化管出血が出現、同 29 日 左心不全進行し、挿管となった。緊急招集された未来医療審査評価委員会により、消化管出血に重篤な菌血症を合併しているため、現時点での細胞治療は不適格であると判断され、LVAS 装着+左室縫縮術+MAP を緊急に施行するとともに、培養された骨格筋芽細胞は凍結し無菌的細胞調整施設（CPC）にて保存することとなった。術後、呼吸循環状態は安定し、感染症も軽快して経過した。10 月 19 日 LVAS off test 施行するも PCWP の上昇を認めたため LVAS よりの離脱は困難と判断、未来医療審査評価委員会にて細胞治療の再開の承認を得、患者本人と家人による意思・承諾を確認した。11 月 19 日、自己骨格筋芽細胞および自己骨髄細胞による細胞移植術を施行した（図 1）。

細胞移植後臨床経過：細胞移植後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月において LVEF に加え心係数、SvO<sub>2</sub> を測定した（図 2）。心係数は一過性に低下したものの LVEF は改善しており、自己細胞移植前において 22.3%であったものが、移植後 6 ヶ月では 35.3%にまで改善していた。また、

これら LVEF 改善に関して詳細に検討するため、細胞移植前、移植後 1 ヶ月、3 ヶ月における左室壁運動を color kinesis にて検索すると (図 3)、細胞移植 1 ヶ月にすでに壁運動の改善をみとめるとともに 3 ヶ月にても効果は維持されていた。さらに驚くべきことに、細胞移植領域である前壁側壁に加え、細胞を移植していない下壁後壁ならびに中隔においても壁運動の改善を認めることが明らかとなった。心不全とくに拡張障害の指標として検討したのが BNP 値である (図 4)。細胞移植後に BNP 値が低下しており、細胞移植により心不全とくに拡張障害も改善していることが明らかとなった。

### 3. 細胞移植療法の戦略概論

#### 骨格筋芽細胞による治療戦略

元来心筋細胞は分裂能がないために一旦傷害を受けると心筋の修復はできないか、修復できたとしてもごく限られた回復でしかない。一方で骨格筋に含まれる「筋芽細胞」は筋肉が損傷を受けたときに分裂して修復する。心筋と骨格筋とは構造、機能、顕微鏡的外観に類似する部分が多く、そのため骨格筋由来の「筋芽細胞」は傷害心筋も修復しようと考えられている。実際に海外では自己骨格筋芽細胞の心筋への移植が臨床的に応用されつつある。急性心筋梗塞発症直後には有効と考えるのに難くない。なんとなれば、心筋梗塞発症直後であれば機能性心筋が喪失していても血管網は維持されていると予想されるため、壊死に陥った心筋細胞あるいは機能細胞のみの供給でそれらが生着すると推定されるからである。現在の虚血性心疾患にたいする細胞再生医療のモデル動物の多くは、冠動脈を閉塞させる直前、あるいは直後からの治療であり、陳旧性心筋梗塞のように血管網も破壊され線維化が進行している症例で有効であるかは確定的なことは言えないのが実情である。しかし、心筋梗塞モデル動物への骨格筋芽細胞あるいは心筋芽細胞を移植すると配向性をもって生着する。それら細胞をシート化したのちに mechanical stretch を加えると細胞の配列に配向性が生じる。従って、筋芽細胞を拍動している心筋に移植することは、mechanical stretch の加わっている場で、ふさわしい分化をしているのであろう。

#### 骨髄由来単核細胞による治療戦略

近年、骨髄由来単核細胞には血管内皮前駆細胞が存在することが示され、その血管新生作用に期待がもたれている。実際、骨髄より血管内皮前駆細胞を末梢血へと動員して心筋梗塞により破壊された血管網を再構築するという治療、また急性心筋梗塞後に骨髄由来単核細胞を経皮血管的に冠動脈へと注入して血管新生を惹起させしめるという治療も臨床応用されつつある。これらに加えて間葉系幹細胞には成長因子の供給源としての作用があると知られている。これは、移植された細胞のほとんどが消失してしまうにもかかわらず

血管新生が生じており、新生血管の管腔形成が宿主の細胞によりなされている割合が多い、という動物実験によるデータがあるからである。

#### 骨格筋芽細胞と骨髄由来単核細胞の併用移植による治療戦略

上記2つに治療法、すなわち「骨格筋芽細胞による傷害心筋の修復治療」と「骨髄由来単核細胞による血管新生治療」を組み合わせることで心筋梗塞後に問題となる機能性細胞：心筋細胞の喪失と血管網の喪失の双方を改善し、良好な治療効果を得られると考えるのはまさに合理的であろう。骨髄由来単核細胞のもつ成長因子の供給作用が、血管新生のみならず筋芽細胞の生着をももたらすと想定される。また、心筋細胞や骨格筋芽細胞が生着するために線維化が解除され、望むべき形での remodeling が期待される。ここに、骨髄由来単核細胞が分泌する MMP が重要な役割を果たしていると予想される。これは拡張障害の解除というデータが示唆するものであるかもしれない。

#### 4. おわりに

骨格筋芽細胞と骨髄由来単核細胞によるカクテル化は、機能細胞とそれを支持・維持する血管網の構築という点で望ましい細胞治療である。カクテル化が有効であることは、次世代の再生医療として期待されている筋芽細胞による細胞シートに希求される機能に示唆を与える。すなわち、細胞シートは機能細胞のみにより構成されるのではなく、その機能を維持・亢進するための血管網の同時構築も求められているのである。細胞移植医療の黎明からカクテル化へ、そして筋芽細胞シート。いつかは細胞を用いずとも治癒できる日が来ることに思いをはせる。

骨髓単核球細胞： $3 \times 10^7$  cells

筋芽細胞： $3 \times 10^8$  cells

それぞれ3mlに調製

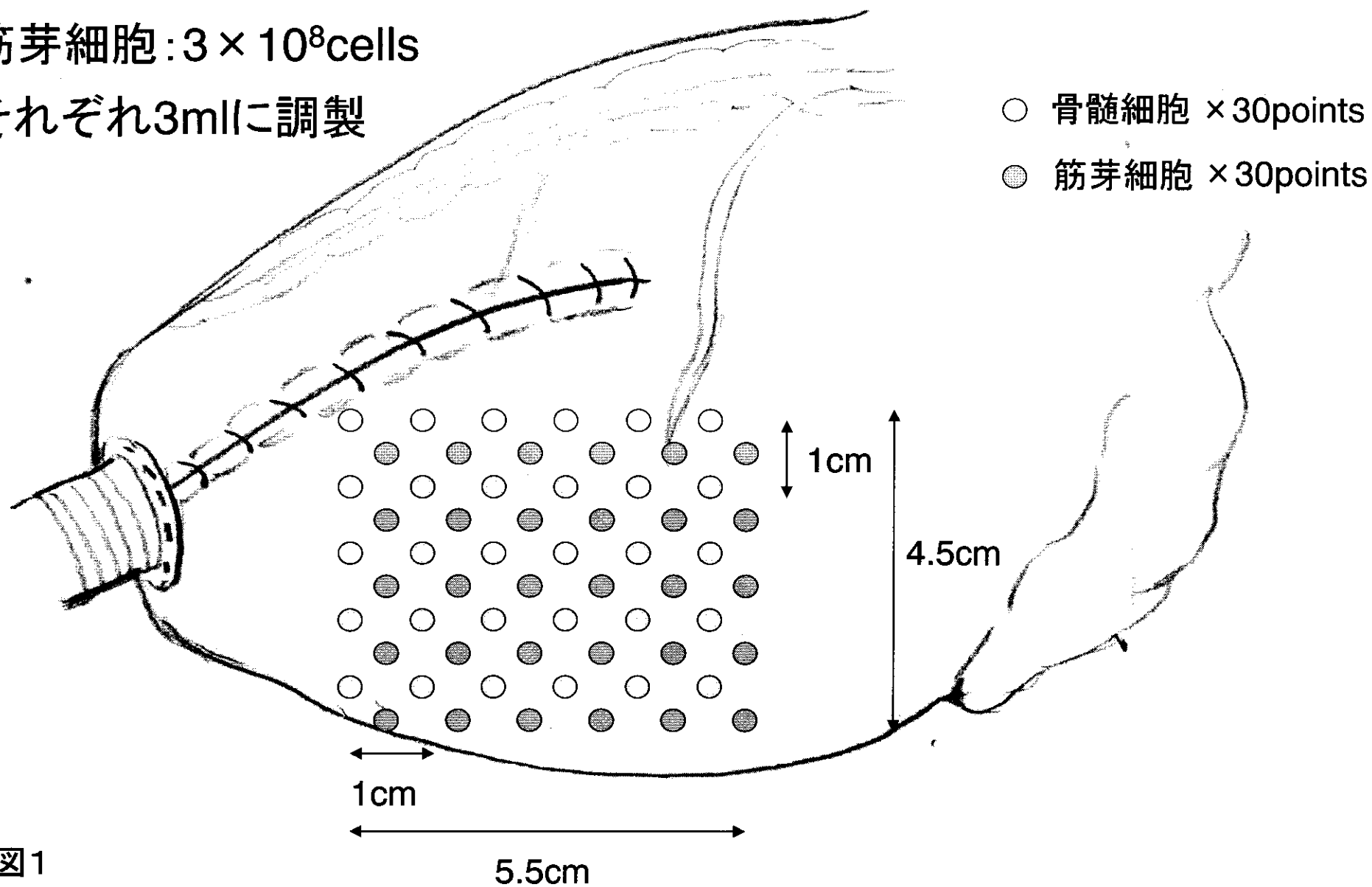


図1

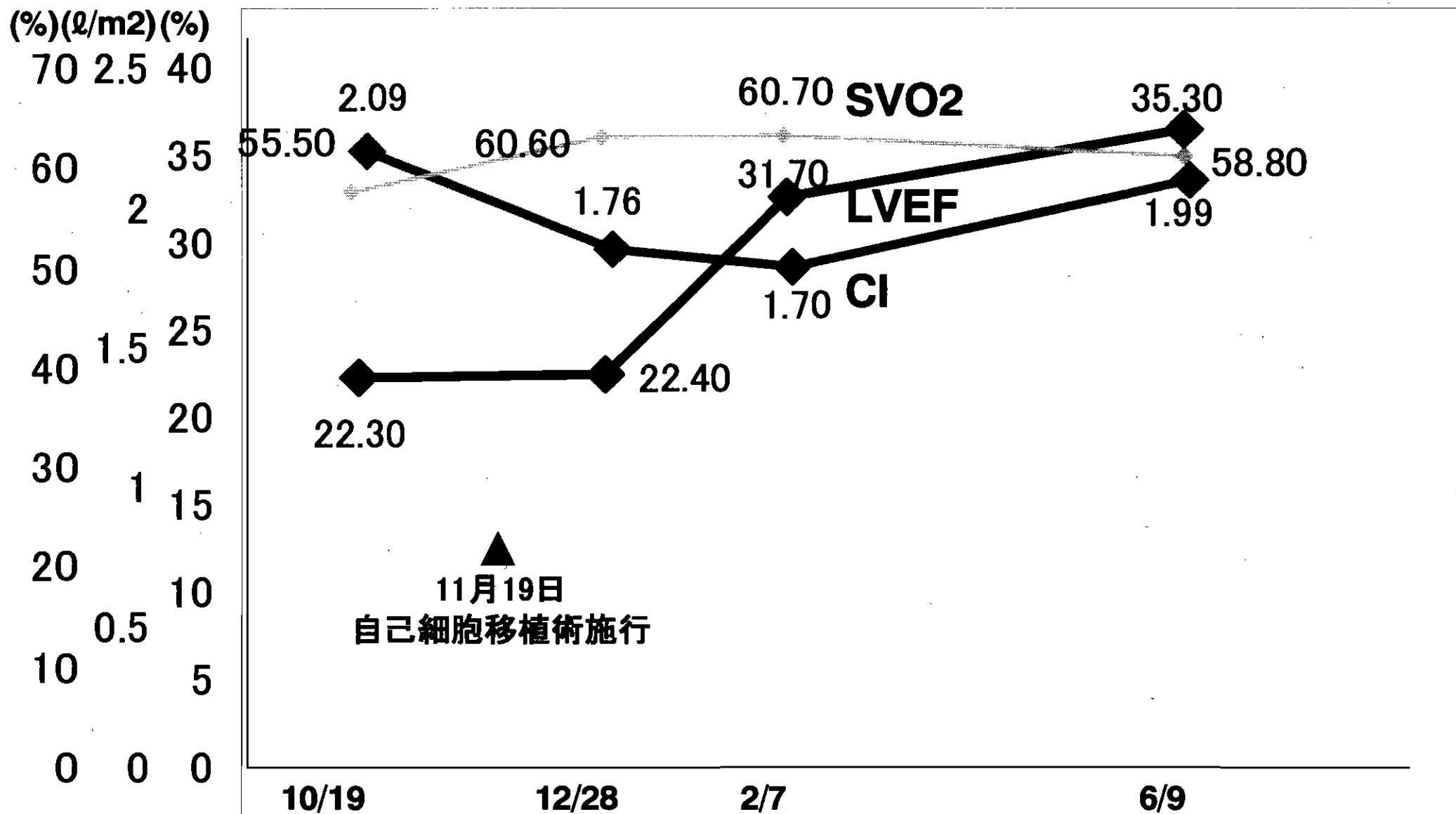


図2 細胞移植前後におけるLVAS停止下の左室駆出率、混合静脈血酸素飽和度および心係数の推移



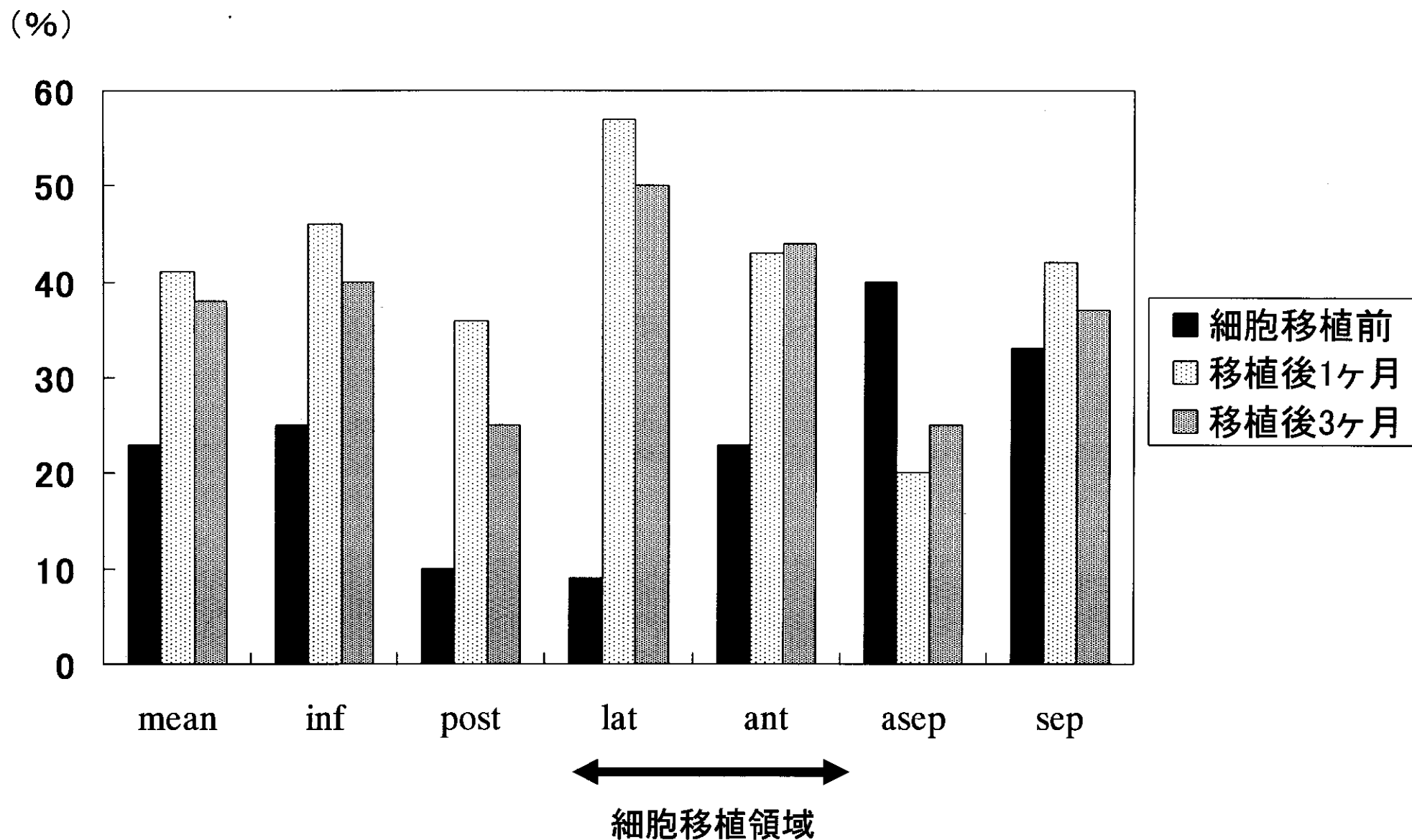


図3 心臓超音波Color kinesis法による領域別の左室diastolic index (inf; inferior, post; posterior, lat; lateral, ant; anterior, asep; antero-septal, sep; septal)

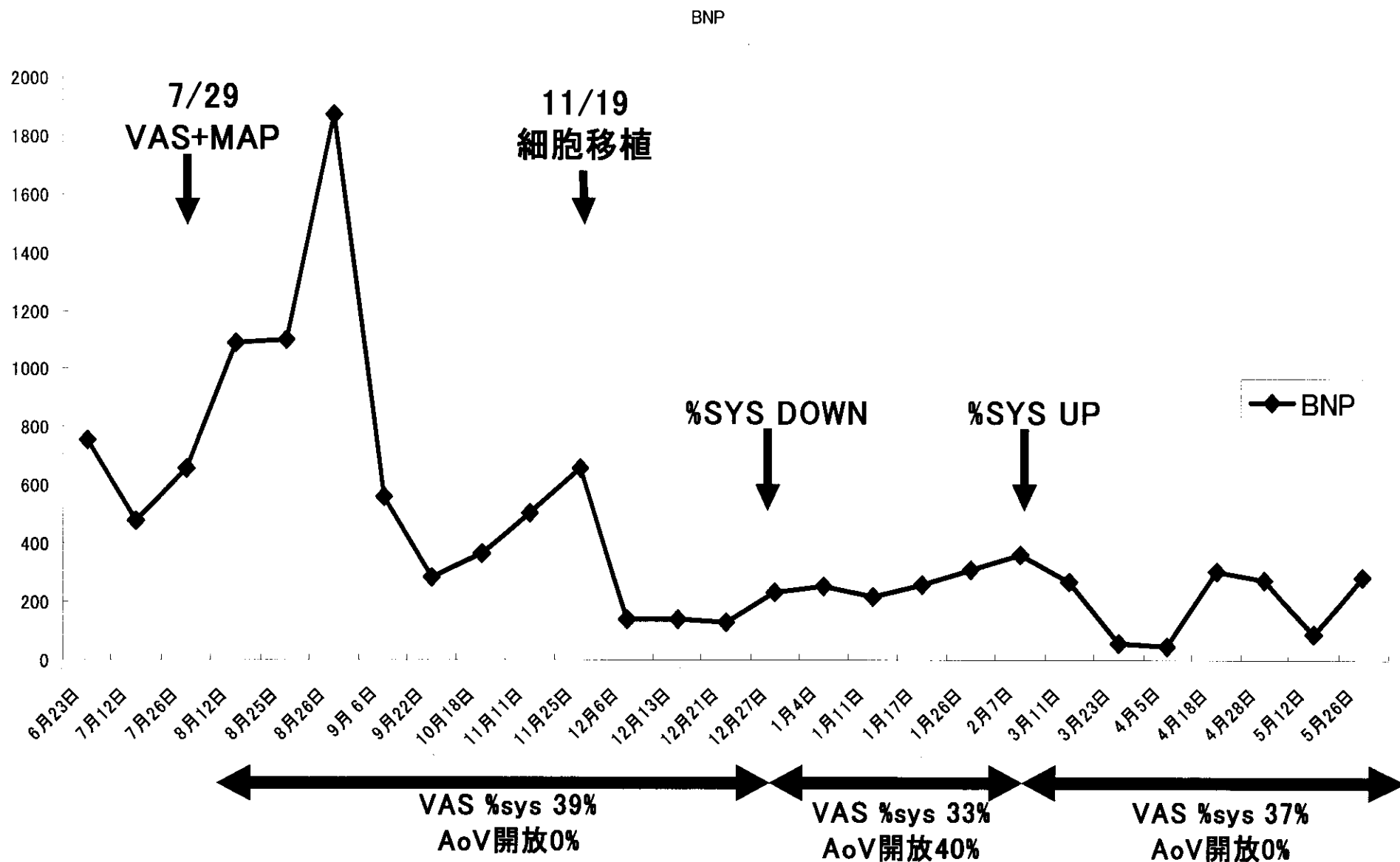


図4 BNP(心不全マーカー)推移

##### はじめに

心筋再生医療の目的は失われた心筋組織を補充することにより心不全を治療することであるが、大別すると細胞移植治療と、増殖・遊走・分化促進因子による治療に分類される。胚性幹細胞（ES細胞）の心疾患への臨床応用はまだ開始されていないが、自家移植可能な細胞、特に骨格筋芽細胞、骨髄または末梢血幹細胞移植はすでに臨床応用が開始されている。本稿ではこれら細胞移植治療の最近の知見について概説する。

##### 骨格筋芽細胞移植

骨格筋には骨格筋特異的前駆細胞であるサテライト細胞が存在する。サテライト細胞は基底膜直下に筋線維に並列して存在する単核細胞であり、骨格筋に運動や外傷など外部からの刺激により筋細胞が失われると、非対称分裂により骨格筋芽細胞に分化する。この骨格筋芽細胞はたがいに細胞融合することにより、多核の骨格筋管を形成して骨格筋を再生する。

移植された骨格筋芽細胞は多核の骨格筋管に分化して心筋細胞には分化せず、周囲の心筋細胞とも電気的機械的結合を形成しない。しかし、骨格筋はその再生能力、虚血耐性および自家移植可能なことから、心筋への移植細胞として動物実験が行われ、心機能の改善効果が報告されてきた<sup>1) 2)</sup>。2001年にMenasche等により重症虚血性心不全患者のnon viableな心筋への自家骨格筋芽細胞移植とCABGの併用療法の1例が初めて報告されて以来<sup>3)</sup>、いくつかの欧米で行われた第1相安全性試験の結果が報告されている。Menasche等は3-4年のfollow upを終了した第1相安全性試験の10症例（移植細胞数 $871 \times 10^6$ ：86%がCD56陽性の骨格筋芽細胞、CABG併用例）について、移植後10.9ヶ月後にNYHA Class III/IVからNYHA Class I/IIへ臨床症状が改善し、左室機能の指標である左室駆出率と心臓超音波検査による移植部位の心臓壁運動の改善を認めたと報告している。経過中、非心臓死（脳卒中）1例、再入院は4症例で7回を認め、不整脈に関しては、phase Iの10症例のうち移植後早期に非致死的心室頻拍を呈した4例にAICDが移植された。AICDは3年9ヶ月の経過中3症例で12回作動し、移植後32-26ヶ月においても記録された<sup>4)</sup>。Herreros等の第1相安全性試験では12症例（移植細胞数 $221 \times 10^6$ ：65.6%がCD56陽性の骨格筋芽細胞、CABG併用例）について検討され、移植後3ヶ月の時点で左室駆出率と移植部位の心臓壁運動の改善を認めた。さらに、<sup>18</sup>F-FDG PETにより、移植部位の糖代謝の改善-生細胞の生着を確認した<sup>5)</sup>。Siminiak等の10症例（移植細胞数 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$  65.4%がdesmin陽性の骨格筋芽細胞、CABG併用例）の報告では、移植後4ヶ月の時点で左室駆出率と移植部位の心臓壁運動の改善を認めたが、4例に移植後心室性頻拍を認めた<sup>6)</sup>。

これまでに明確になっている点は以下の点である。

a)患者からの骨格筋組織片から数週間で骨格筋芽細胞を $1 \times 10^8$ まで増殖させる方法は医療産業技術として確立されていて、開胸下に外科的に直接心筋に注射する手技も合併症なく可能である。

b)移植された骨格筋芽細胞は心筋痙攣組織に移植後18ヶ月においても存在するが、その生着率は移植細胞数に比較して少ない。移植された骨格筋芽細胞の多くは注入部からの漏れ、体循環への流入または移植後の細胞死により失われる。

c)フランスの第1相安全性試験で10症例のうち4例に移植後早期に心室性不整脈が認められ、安全性の問題が提起されている。

d)移植後早期に心機能の改善効果が認められているが、骨格筋芽細胞を移植した領域の心筋収縮力が改善したと即断はできない。

これまでの骨格筋芽細胞移植の臨床試験は無作為に抽出された対照群との比較試験ではなく、冠動脈バイパス術併用例であり、細胞移植による心機能改善効果を純粋に判断することが困難である。また、骨格筋芽細胞の培養方法、移植効果の評価方法（負荷心エコー、核医学検査、MRI、PETなど）、細胞移植領域の心筋のviabilityの評価が各試験で統一されておらず、各試験の結果を単純には比較できない。移植後の不整脈の問題に関しては、フランスに比較して米国の第1相安全性試験では致死的不整脈の発生が少ないこと、低心機能患者に対する冠動脈バイパス術後の心室生不整脈の合併頻度10-15%に比較して第1相安全性試験の結果は高率ではないことから検討の余地はある。しかし、電氣的結合部位（gap junction）を形成しない骨格筋と、形成する心筋細胞が混在する状況ではリエントリー型頻脈が起りやすいこと<sup>7)</sup>、頻度は少ないものの、梗塞境界領域に移植された骨格筋芽細胞と心筋細胞が細胞融合することにより、心筋細胞の形質を獲得した骨格筋細胞が存在することが報告されている<sup>8), 9)</sup>。したがって、電気生理学的な基礎的な検討の重要性は増すものと考えられる。現在、primary endpointを移植領域の収縮性の改善とした、phase II他施設二重盲検試験（MAGIC trial）が47症例で行われている。Magic trialでは42例すべてにAICDが安全性の問題から移植されたが、8ヶ月の経過中VTによる作動が4回であり、不整脈の発生頻度はPhase Iに比較して少ない。これは、術前からのアミオダロン併用による効果と考えられる。

骨格筋芽細胞移植のもう一つの問題点は生着および移植効率である。細胞移植方法として、培養骨格筋芽細胞は単離した後に心筋内へ直接注入する方法に加えて、カテーテルによる経心内膜および経冠状静脈洞移植が試みられている。しかし、移植領域は血流に乏しい低酸素領域であり、また、細胞単離のための酵素処理などは移植細胞に傷害を惹起し、移植後の生着率を低下させる原因となる。組織工学的手法は心筋梗塞巣全体に多くの機能的な細胞を移植する方法として期待されている。温度感受性ポリマーは細胞に傷害を与えることなく、培養細胞を細胞シートとして単離することが可能である。近年、骨格筋芽細胞シートを、ラット心筋梗塞および心筋症モデルに移植したところ心機能改善効果が得ら

れたとの報告がなされている 10), 11)。骨格筋芽細胞シートは 1 層の細胞層で形成されているため、ある程度の厚みを持った心筋組織を再生させるためには重層化させる必要がある。今後、ミリメートル単位の細胞シートを作成して生着させるためには、シート内の酸素、栄養の供給を維持するための血管も備えたより心筋組織に近い移植床を作成する必要がある。

移植後の骨格筋芽細胞の生着率は、IL-1受容体アンタゴニスト発現骨格筋芽細胞の移植やホストのC3補体の除去による抗炎症効果、ホストに抗CD154抗体を投与することによる移植骨格筋芽細胞に対する免疫反応の低下作用により改善する。また、移植骨格筋芽細胞にIGF-1やVEGF、FGF、HGF、heat shockなどを作用させることにより生着率が改善されることが報告されている12)。

### 骨髄細胞移植

骨髄細胞には $\sim 0.01\%$ の造血幹細胞と間葉系幹細胞、あらゆる分化段階の前駆細胞と成熟した血球細胞が混在する。骨格筋芽細胞移植と異なり、骨髄細胞移植は主に、急性心筋梗塞に対する経冠動脈移植が臨床試験として行われている。Strauer 等は梗塞 7 日後に経冠動脈的に骨髄細胞移植を行った 10 例、と通常治療 10 例を比較検討し、梗塞 3 ヶ月後に全体の駆出率には差を認めなかったが、細胞移植群で梗塞領域の縮小、左室リモデリング抑制が認められたと報告している 13)。初回の急性心筋梗塞でステントによる再灌流療法に成功した症例 19 例に対して、梗塞後約 4 日目に末梢血あるいは骨髄から採取した自己内皮前駆細胞を梗塞責任冠動脈に注入移植した TOPCARE-AMI では、末梢血、骨髄由来前駆細胞ともに 4 ヶ月後の心機能を同程度に改善させた 14)。ハノーバー医科大学では再灌流に成功した急性心筋梗塞患者に対する経冠動脈自家骨髄細胞移植の左室機能に与える影響を前向き無作為試験により検討している (BOOST1)。登録症例を骨髄細胞移植群と対照群に無作為に振り分けた後に、再灌流後 3-4 日に MRI を撮像、再灌流後 4-5 日に細胞移植を行い、6 ヶ月後に MRI、冠動脈造影、電気生理学検査を実施した。その結果、6 ヶ月間で駆出率は対照群で 0.7%、移植群で 6.7%増加し、MRI による局所壁運動では梗塞境界領域での改善度が大きかった。移植群の駆出率の改善はさらに 18 ヶ月後においても保たれていた 15)。慢性虚血性心不全に対してもカテーテルによる経心内膜移植による骨髄細胞移植の無作為臨床試験が行われており、心筋虚血、心機能の改善効果が報告されている 16)。これまでの報告から、骨髄細胞を直接心筋内または、冠動脈内に注入する方法自体は、急性心筋梗塞、慢性虚血性心不全ともに安全に行うことが可能であり、多くの報告では梗塞後の虚血および心機能を改善させることが明らかである。しかし、最適な移植細胞数はどれくらいか、移植細胞のどの分画 (造血幹細胞、骨髄間葉系細胞、その他の血球前駆細胞など) が効果的なのか、梗塞後の最適な移植時期、cardiac event を含めた長期予後などについてさらに検討されるべきである。

## おわりに

心筋再生に理想的な移植細胞は、標準化された方法で調整でき、心筋細胞、血管を含めた広範囲な心筋組織を新たに再生する能力があり、不整脈源性、免疫源性、腫瘍源性を持たない細胞である。残念ながら骨格筋芽細胞、骨髄細胞ともにこれらの条件を十分に満たしているとは言えない。しかし、これまでの報告から骨格筋芽細胞および骨髄細胞が移植後の心機能回復に寄与している可能性は十分にある。今後、無作為抽出比較対照臨床試験による多施設による再現性の評価が必要である。さらに、最も重要なことはこれらの細胞移植による効果の分子生物学的メカニズムが、*in vitro*、*in vivo* で解明され、その成果が臨床にフィードバックされるべき点である。

- 1) Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, et al: Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997; 109:245.
- 2) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al: Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998 ;4:929.
- 3) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357:279.
- 4) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 ;41:1078-83.
- 5) Herreros J, Prosper F, Perez A, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2003; 24:2012-20.
- 6) Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J*. 2004; 148:531-7.
- 7) Fernandes S, Amirault JC, Lande G et al: Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res*. 2006; 69:348-58.
- 8) Matsuura K, Wada H, Nagai T, et al.: Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol*. 2004;167:351-63.
- 9) Reinecke H, Minami E, Poppa V, Murry CE. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ Res*. 2004; 94:e56-60.
- 10) Memon IA, Sawa Y, Fukushima N et al: Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 30:1333-41.

- 11) Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S et al: Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res.* 2006 ;69:466-75.
- 12) Ye L, Haider HKh, Sim EK. Adult stem cells for cardiac repair: a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp Biol Med.* 2006 231:8-19.
- 13) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering 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;106:1913-8.
- 14) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106:3009-17.
- 15) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-8.
- 16) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003;107:2294-302.

#### IV-2-6. 心臓領域での細胞移植（とくに Myoblast）：今後の課題など

京都大学医学部心臓血管外科

長澤淳

1990年代初頭以来10数年におよぶ心臓領域での細胞移植研究の歴史の中で、これまで殊に動物実験レベルでは実に様々な形の細胞移植の試みが行われてきた。これらを移植する細胞の種類、移植方法、作用機序の面からそれぞれ整理すると、細胞の種類としては初期の骨格筋芽細胞<sup>1)2)</sup>、胎児および新生児心筋細胞<sup>3)4)</sup>、骨髄細胞<sup>5)6)</sup>に始まり、近年では胚性幹細胞（ES細胞）<sup>7)8)</sup>、成体心臓組織由来の心筋前駆細胞<sup>9)</sup>、脂肪組織由来の間葉系前駆細胞<sup>10)</sup>などを用いた研究が行われている。移植の方法としては心外表面からの心筋内注入（needle injection）、カテーテルによる冠動脈内注入、NOGAシステムによる心内腔からの心筋内注入に加えて、近年の生体工学技術の進歩を背景に培養細胞を膜状に形成した細胞シートの技術が登場した。一方、作用機序としては大別すると移植細胞から分泌される液性因子による血管新生効果やアポトーシス抑制、線維化抑制などの効果と、移植細胞自体の生着、分化、増殖による血管および心筋組織の再生という2つの機序が考えられている。治療対象として想定される虚血性心筋症や拡張型心筋症などの末期重症不全心では心筋細胞そのものが失われ線維化した組織に置き換わった状態であることから、治療の究極の目標は血管組織、心筋組織の再生であると言える。

こうした中で、末梢血幹細胞を含めた骨髄細胞移植<sup>11)13)</sup>と骨格筋芽細胞移植<sup>14)16)</sup>に関しては既に臨床試験が行われ、一定の成果が報告されている。しかしながら、これらの移植では移植細胞の生着はごくわずかであり<sup>14)</sup>、その効果のほとんどは治療初期の液性因子分泌による血管新生効果によるものであろうと考えられる。

細胞液の注入による移植では早期に移植細胞のほとんどが失われて生着しないことは知られており<sup>17)</sup>、欠損した部分を補うほどの新生組織が移植細胞から形成されることは極めて困難であると考えられていたが、細胞シート技術の登場によってその道が大きく開かれることとなった。細胞シート、特に我が国の東京女子医大グループによって開発された温度感応性培養皿を用いた細胞シート<sup>18)</sup>は、移植の際に足場（scaffold）が存在せず、重層化が可能であるなど優れた特徴を持ち、新生組織の形成を目的とした真の心臓再生治療を可能にする有力な手段として期待される。

一方、移植する細胞としては比較的侵襲で自家組織から採取可能であり、in vitroでの培養・増殖が容易で移植後の生着率も高いという点で、骨格筋芽細胞が現時点では最も有用な材料と考えられる。しかし、骨格筋芽細胞が移植後周囲の心筋細胞と同調して収縮し心筋の一部として機能する可能性は低く<sup>19)</sup>、今後真の心筋再生という究極の目標を達成す



るためにはあらたな材料を検討していくべきであろう。

近年脂肪組織の中に様々な細胞への分化能を有する幹細胞の存在が明らかとなり、心筋細胞への分化誘導も可能であることが報告された<sup>20)</sup>。また成体の心臓組織からも心筋前駆細胞の単離、培養が可能となり成熟心筋への分化が確認された<sup>21)</sup>。胚性幹細胞が免疫拒絶という最大の壁を克服しなければならないのに対し、これらの細胞は自家組織から採取できるため、今後心臓再生療法の有力なアイテムとなっていくことが予想される。既に動物実験では新生児の心筋細胞を用いて細胞シートを作成し梗塞心へ移植することで宿主の心筋と同調して収縮する心筋組織が形成され心機能が回復するという報告<sup>22)</sup>があり、これらの細胞の安全で低侵襲な採取法と大量培養の技術さえ確立されれば臨床応用が可能となる日もさほど遠くはないと思われる。

今後血管前駆細胞の研究や種々のサイトカインの作用機序の解明がさらに進めば、近年進捗の著しいドラッグデリバリーシステム（DDS）技術を応用してこれらを組み合わせ、最も効率的に心臓組織を再生する治療法の開発が可能となるであろう。また、細胞シートを不整脈モデルに移植した動物実験の報告も出てきており、その適応はさらに広がっていく可能性がある。この分野で現在我が国は先進的な立場にあり、今後も世界に貢献していきけるものと思われる。

- 1) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant*. 1992;1(6):383-90.
- 2) Zibaitis A, Greentree D, Ma F, Marelli D, Duong M, Chiu RC. Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Transplant Proc*. 1994 Dec;26(6):3294.
- 3) 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.
- 4) Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1321-30.
- 5) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
- 6) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428:664-8.
- 7) Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. Transplantation of

embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol.* 2002 Jan;92(1):288-96.

8) Behfar A, Hodgson DM, Zingman LV, Perez-Terzic C, Yamada S, Kane GC, Alekseev AE, Puceat M, Terzic A. Administration of allogenic stem cells dosed to secure cardiogenesis and sustained infarct repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 May;1049:189-98.

9) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.

10) Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Begyui R, Maclellan WR, Hedrick MH, Fraser JK. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy.* 2005;7(3):282-91.

11) Tomita S., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A., Kim E.J., Sakai T., Jia Z.Q., Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function, *Circulation*, 100: II247-II256, 1999

12) Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P., Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature*, 410: 701-705, 2001

13) Ishida M., Tomita S., Nakatani T., Fukuhara S., Hamamoto M., Nagaya N., Ohtsu Y., Suga M., Yutani C., Yagihara T., Yamada K., Kitamura S., Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy, *J. Heart Lung Transplant.*, 23: 436-445, 2004

14) Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, Dinsmore JH, Wright S, Aretz TH, Eisen HJ, Aaronson KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Mar 5;41(5):879-88.

15) 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 Apr 2;41(7):1078-83.

16) Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sanchez PL, Canizo C, Rabago G, Marti-Climent JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gonzalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2003 Nov;24(22):2012-20.

17) Yasuda T, Weisel RD, Kiani C, Mickle DA, Maganti M, Li RK. Quantitative analysis of

survival of transplanted smooth muscle cells with real-time polymerase chain reaction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Apr;129(4):904-11.

18) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):141-51.

19) Gulbins H, Pritisanac A, Anderson I, Uhlig A, Goldemund A, Daebritz S, Meiser B, Reichart B. Myoblasts for survive 16 weeks after intracardiac transfer and start differentiation. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Dec;51(6):295-300.

20) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.

21) Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004;279:11384-91.

22) 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: their integration with recipient myocardium. *Transplantation.* 2005 Dec 15;80(11):1586-95.