

## 2. 調査事項

### 2-1. 再生医療における不整脈モデル

慶應義塾大学医学部 心臓病先進治療学講座 三好俊一郎

### 2-2. ヒト化マウスを用いた再生医療実現のためのトランスレーショナルリサーチ

理化学研究所 横浜研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター  
ヒト疾患モデル研究ユニット 石川文彦

### 2-3. アロ移植の現状および組織適合性評価試験について

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 菰田 弘

### 2-4. 細胞ソースとしての間葉系幹細胞

#### 2-4-1. 間葉系幹細胞の同定 (1)

広島大学大学院医歯薬学総合研究科(口腔生化学) 加藤幸夫

#### 2-4-2. 間葉系幹細胞の同定 (2)

国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 梅澤明弘

#### 2-4-3. 間葉系幹細胞の同定 (3)

国立循環器病センター研究所 再生医療部 永谷憲歳

### 2-5. 骨格筋芽細胞移植による心臓再生の現状と機序

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管・呼吸器外科 澤 芳樹

### 2-6. 再生医療とサイトカイン

#### 2-6-1. FGF (Fibroblast growth factor)

京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科 米田正始

#### 2-6-2. インスリン様増殖因子 (IGF-1) と骨髄間葉系幹細胞併用による心血管再生療法の可能性

国立循環器病センター研究所 再生医療部 永谷憲歳

#### 2-6-3. HGF を基盤とした再生医療の現状と展望

大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学 森下竜一

#### 2-6-4. VEGF による血管新生促進療法

東海大学医学部再生医療科学 先端医療センター研究所 浅原孝之

#### 2-6-5. アンジオポエチンと血管新生

名古屋大学大学院医学系研究科 室原豊明

### 2-7. 再生医療製品における血清の安全使用

東京大学医科学研究所細胞プロセッシング  
CERES 寄付研究部門 高橋恒夫

### 2-8. 細胞シート調製のための多孔性温度応答性培養皿の調製

東京理科大学基礎工学部 材料工学科 菊池明彦

### Ⅲ-2-1. 再生医療における不整脈モデル

慶應義塾大学医学部・心臓病先進治療学講座講師

三好俊一郎

#### 序

重症心不全患者に対する、究極的な治療方法は心臓移植である。しかし世界各国で生体心移植のドナー不足は深刻である。脳死患者からの生体心移植に変わる方法として、自己細胞を用いた幹細胞治療が注目を集めている。すでにくつかの細胞種では臨床応用が行われ始めている。その中でも骨格筋芽細胞移植は、致命的な心室性不整脈のために自動植え込み型除細動器の挿入が必要となる事態となり、再生医療による副作用への不安が明るみに出た<sup>1</sup>。

#### まず不整脈を知る

再生医療の安全性を語る際に、まず不整脈への不安を払拭する必要がある。そのためには、不整脈がどのようにして生じるかを知る必要がある。不整脈には大きく分けると2つの機序が存在する。

撃発活動 (Triggered activity) : 少数の細胞の再分極異常によって生じる不整脈である。このような不整脈は、少数の細胞集団からの異常な自動発火によって不整脈が生じ、心臓全体に広がる。不整脈の維持のための大きな基質や回路を必要としないため、小さな心臓であっても生じる。つまり小動物であってもその不整脈の安全性を十分に評価出来るし、またこういった不整脈は細胞レベルでも観察することが出来る。

リエントリ性不整脈 : この不整脈には一方向性ブロックと緩徐伝導が必須である。リエントリ性不整脈が持続するには、興奮がもとの場所に再到達するのが遅れ、興奮到達時に不応期を脱している必要がある。経験的に頻拍維持に大きな基質や回路を必要とする場合が多い。そのためこのような不整脈の検討には小動物による不整脈の検討では不十分で、ヒト心臓と同等の大きさを持った動物を研究に用いる事が理想的である。

#### 細胞レベルでの不整脈 (撃発活動)

再生医療への警告として、Zhang 等<sup>2</sup>が mouse の Embryonic stem cell (ES) から誘導した細胞の活動電位の再分極が弱く、EAD や DAD がある特殊な条件下で出現

するとの報告を行った。In vitro で行われた実験であること、薬剤投与などを行った必ずしも生理的な条件設定では無かったが、そういった可能性を念頭において治療するべきであることを示した報告であった。また我々の in vitro のマウスでの骨髄間葉系幹細胞(MSC)の研究<sup>3,4</sup>でも、ヒト MSC の検討においても<sup>5</sup>、同様に心筋への誘導中に不整脈様の活動を呈したが、こういった不整脈様の活動は、誘導後の時間経過に伴って消滅してゆく。常識的に考えて、幹細胞から心臓が誘導される際に、細胞は固体発生の過程を一個の細胞の中で再現するはずで、そのため心筋誘導途中に未熟な活動が生じた可能性が考えられる。ではこういった不整脈様の活動が移植先で生じるであろうか？ 従来から言われている心臓電気生理学的な常識から考えると、細胞移植の方法および、移植する細胞種及び、心臓への誘導率の違いによって異なる事が考えられる。またこういった実験モデルの妥当性や、in vivo 実験を行う際の問題点はどのような点があるだろうか？

### ギャップ結合による安定化

限られた細胞の撃発活動が周囲の細胞に広がるためには、良好なギャップ結合を必要とする。一方ギャップ結合は、異常な撃発活動を持つ細胞がもしも少数であれば、周囲に正常な再分極を持つ心筋細胞の再分極の電気緊張的電位によって、空間一帯の電気活動によって均一化され安定化する可能性がある。そのためもしもこういった細胞が宿主心筋内にまばらに存在してしかも強固なギャップ結合を有する場合<sup>6,7</sup>、in vitro で観察された様な撃発活動は周辺の正常な心筋によって安定化するはずである。これはすなわち in vivo で心臓への分化誘導効率の低い細胞を用いていた場合がそれにあたる。しかし将来的に心臓への分化誘導効率の高い細胞が出現した場合や<sup>8</sup>、こういった細胞が密集して移植された場合<sup>9</sup>こういった不整脈が顕在化する可能性が否定できない。

### 骨格筋芽細胞の特殊性

骨格筋芽細胞は、成熟過程で Connexin 43 を発現している。しかし収縮蛋白を発現し始めると、Connexin は消滅する。骨格筋芽細胞の Connexin の発現は、電氣的結合を生じるため出はなく、むしろシンチノイドを形成し、多核化するためではないかと想像される<sup>10</sup>。そのため成熟した骨格筋芽細胞は心筋との電氣的結合を呈することが無い<sup>10-12</sup>、一方、骨格筋細胞はしばしば自動能を持って収縮する（自己拍動する細胞であることが、心筋のアイデンティティでは無い）

<sup>10</sup>。自動能を持って発火する培養骨格筋細胞を細胞内 Ca イメージングで観察すると、近接した Myotube 間でも乖離しており、電氣的同期は確認できない<sup>10</sup>。これらの細胞を心筋と共培養すると、電氣的同期を生じないために、骨格筋と心筋の拍動は乖離し、しばしば心筋の受攻期に骨格筋が収縮し細動様な収縮を観察することが出来る<sup>10</sup>。こういった不整脈はストレッチチャネル受容体阻害薬の投与によって阻害できることから機械的な刺激によって生じることがわかる<sup>10</sup>。またこの自動能の原因が不明であるが、少なくとも心筋の自動能とは全く異なる機序で生じて居るようで<sup>10</sup>、この自動能を停止させる方法は現在の所判然としない。

重要な事は副交感神経のトランスミッターであるアセチルコリンに対する反応が心筋と骨格筋で全く逆である点である。骨格筋にはニコチン型受容体、心筋にはムスカリン型が存在するために、アセチルコリンが作用すると、骨格筋では脱分極と強縮現象を生じ<sup>10</sup>、心筋では過分極のため活動性が低下する。そのため骨格筋による不整脈を抑制するためには、ストレッチチャネル抑制薬、ニコチン受容体ブロッカーの投与かあるいは移植した細胞が直接心筋細胞と接触しないように心がける必要があるかも知れない。

### 誘導効率の違いと電氣的不安定性

我々がマウスの骨髄間葉系細胞から心筋を誘導した際に 5-アザシチジンを使用することによって、3週間目から電気活動を生じ始め、初期は不安定な活動電位が観察されたが5週目には成熟した電気活動となり電気活動も安定してきた<sup>4</sup>。つまり電氣的活動に5週間を要した。一方ヒト骨髄間葉系幹細胞の分化の際には、マウスの心筋細胞と共培養を行う事によって、心筋誘導期間は1週間程度と短縮されたが、誘導効率は0.1%と低く、活動電位が安定するまでに3週間を要した<sup>5</sup>。さらにヒト子宮内膜間葉系幹細胞での誘導では誘導効率は90%と高く、心筋誘導も数日から観察され、活動電位は誘導1週間目にすでに成熟した活動電位を持ち、時間経過によって特に大きな変化が見られない<sup>8</sup>。誘導効率が高ければ、心筋の発生分化の課程も短いことが予想される。つまり誘導効率の高い細胞を移植に用いれば、この様な不整脈を生じる期間も短くする事が出来るかも知れない。術後の一定期間をCCU等のケアユニットで不整脈を集中的に監視して対応することによって、その後は電氣的に安定化し不整脈発生のリスクが減弱する可能性を示唆している。

## In vitro 実験モデルの限界

撃発活動などの少数の細胞から出現する不整脈を検討する際に、in vitro での実験系は有効である。ただしそれは生体から単離直後の組織あるいは細胞で、生体内での電気活動を保った状態の細胞への研究についてはそれが当てはまる。しかし In vitro での長期の培養は必ずしも細胞にとって生理的な条件とは言えない。特に心筋細胞のように常に圧力にさらされ、自動的な収縮という活動を行っている細胞であり、肝臓や神経細胞等とはエネルギー代謝の上でも全く異なっていると考えられる。我々の心筋細胞シートでの経験でも、in vitro での長期間培養を行うと細胞質は薄くなり同時期に皮下などに移植したシートに比して明らかに希薄な印象がある。また活動電位に関しても、我々は一般的に用いられるメディウムを改良することによって活動電位の成熟度と心筋細胞の誘導効率の改善が観察される。こういった現象から、発生分化してゆく細胞の電気生理学的特性、つまり長期間培養された細胞の表現系は、決して in situ で誘導された心筋細胞のものとは一致しないだろう。たとえ In vitro で異常な電気活動を呈していたとしても、心筋分化能力のある細胞であればホスト心筋内で時間に差があったとしても、いずれは成熟し、電気的な不安定性が消滅するのでは無いかと推測される。また不整脈とは心臓全体で生じる現象である。そのため移植した細胞が分泌する液成因子等によって周辺の病的心筋の代謝が改善<sup>13,14</sup>、あるいは血管新生による虚血改善によって<sup>15</sup>、ホスト側の不整脈基質を改善する可能性も考えられる。

## 撃発活動による不整脈の動物モデルの留意点

撃発活動を呈すると予想される治療法の場合、前述の如く心臓の大きさはこの場合関係が無いとため、比較的小型の動物における研究で研究を行う事で十分であるはずである。しかし撃発活動は臨床不整脈治療の現場でも、プログラム刺激などによる誘発が困難である。そのため、可能であれば長期間にわたる連続心電図記録が重要である。臨床においても、心室細動などの不整脈による突然死予測が、臨床で一般的に行われているプログラム刺激で生じる不整脈では困難で、ホルター心電図による長時間モニターによって自然発生する不整脈の方が、患者のリスク評価をするのに適していると考えられている<sup>16,17</sup>。またペーシングプロトコールも非常にアグレッシブなもので誘発したのであれば、例えそれで統計学的に有意な差が生じたとしても、臨床的な意味が無いかもしれない。

また重要な事であるが、一般的に動物実験で用いられるペントバルビタールなどの麻酔薬は、強力な心筋イオンチャネルブロッカーであるために、不整脈発生を予防することが知られており、不整脈発生リスクを過小評価する可能性がある。吸入麻酔薬などによる麻酔下での不整脈検討が重要であるかも知れない。

### リエントリ性不整脈

移植した細胞が、宿主心臓内である特定の回路を作り、不整脈が生じてしまう可能性がある。幹細胞を単離して移植するタイプの治療法では、移植された細胞は宿主内にまばらに存在するためこういった巨大な不整脈回路を形成する事が無いと予想出来る。ただし将来的に心筋誘導効率の高い細胞をソースとした場合や、宿主心筋のボリュームに比してあまりにも大量に細胞を移植してしまった場合などには、それらが大きな不整脈の回路を成立させてしまう可能性はあるかも知れない。

### 細胞シート移植の不整脈源性について

細胞シート型の移植方法は容易にマクロリエントリ性不整脈の温床となりうる事が予想される。しかし我々は心筋培養シートを宿主心臓に移植すると、ほぼ一週間で強固な電気的な結合が生じ、宿主と完全に同期してしまうため、不整脈等は誘発出来なかった<sup>18</sup>。しかしこの論文では、電気的な結合に焦点がおかれたため、動物モデルが小さく、心筋梗塞領域が貫壁性でないこと、移植する細胞シートの厚みなどの検討がなされておらず、不整脈について安全であるとは断言できない。前述した如く、マクロリエントリ性の不整脈はある程度の大きさを有した動物で同様の検討を行うべきではあるが、ある程度以上大きな動物で拒絶反応の無い動物の入手は困難で、基礎的研究にもおのずと限界がある。

基礎電気生理学的知識から、リエントリ性不整脈には、一方向性ブロックと緩徐伝導の存在が必須である。一方向性ブロックはある程度活動電位の不応期の不均一性によって生じるとされ、前述のごとく電気的な結合が強固に生じていれば不均一性は減弱する。一方緩徐伝導に関しては、心筋シートが薄いあるいはギャップ結合が弱い、特に宿主との接着面積が狭くそれによってギャップ結合が弱い場合に生じやすいと予想される。我々の検討では、心筋シートの初期接着が悪く、移植直後にゆがんでしまった場合などに、宿主との電気的な同期が見られなかったり、プログラム刺激にて、非持続型心室頻拍様の不整脈

が観察されたが、初期接着を改善することによってこのような現象は見られなくなった。

細胞シートを扱う場合しばしば経験するが、細胞種によって、シートの粘性、弾性に違いがあり、初期接着能力にも差があるように思える。シートに特殊な染色を行うと、初期接着性が減弱したり、あるいは初代心筋培養シートに比して、間葉系幹細胞シートなどは、粘性が高く弾性が弱く、機械的刺激によって容易に破れ、また初期接着に関しても、圧倒的に初代培養心筋シートより悪い印象がある。間葉系幹細胞等を細胞ソースとする際にこういったシートの材質自体への研究も重要であるように考える。

### 臨床現場での細胞シートの問題点

一般的に小動物など年齢の若い動物の心臓表面には脂肪組織は存在しない。しかし、冠動脈疾患などを有する心臓外科の手術中にこういった脂肪組織が見られない患者はむしろ少ない。細胞シートを心筋に移植する際に、このような脂肪細胞を剥離した方が良いのかあるいはしなくても良いのか、私個人的には非常に興味がある問題である。前述のように、宿主心筋との接着面積が小さければ、伝導遅延を生じやすく、不整脈のもととなる可能性が否定できない。

しかし基礎実験では興味ある現象を観察出来る。心筋細胞シートを心外膜面に移植すると、心外膜の漿膜を破壊して、心筋細胞同士が結合してゆく様な組織像を呈することが多い。これらは移植直前に初期接着を良好にするために心臓表面の水滴を取り除く操作が、漿膜に微細な傷を作り、同部位を中心としてシート上の細胞が心筋内に迷入するためかも知れない。シート内の細胞が思ったより深層に存在していることに驚かされることもあるが、科学的に証明が難しく、論文化することが出来ない。これはあくまでも我々の推測であるが、心筋細胞シートとは異なり間葉系細胞シートが、移植した後に細胞がシート内にとどまっている分けでは無いかもしれない。こういった細胞はしばしば宿主心筋内を迷走し、丁度湿布薬から薬剤がしみ出すように心臓内に細胞を配置するのもかも知れないと考えている。こればかりは臨床の現場で実行してみるまでは結論が出ないだろう。

### シート移植にて不整脈が生じた際の対応

細胞シートは通常心外膜に移植を行う。万が一同部位から不整脈が生じた場合、心臓内からのカテーテルアブレーションでは治療が困難である。なぜならば心

外膜表面までアブレーションによる熱が届かないためである。近年我々は、心嚢穿刺技術を用いて心外膜表面にアブレーションカテーテルを挿入し、心外膜表面での不整脈回路を同定して、カテーテル治療により不整脈を根治する治療法がある<sup>19,20</sup>。しかし自験例では、日本で認可されているカテーテルの材質に限界があり（8mmチップを持った CARTO system や、Irrigation システムが日本では導入されておらず、血流のない心外膜でのアブレーションでは十分な通電が行えない）、海外で行われている症例と比較して、治療効果が低い印象がある。これらについては是非厚生労働省にこのような最新の治療器具の導入を積極的に行って頂きたい。こういったデバイスが導入されれば、一旦シート移植によって不整脈が生じたとしても、これらを治療する方法が残される事になる。

### 動物実験と人体の違い

一般に動物実験に用いる動物は若く基礎心疾患が無い。そういった動物に心筋梗塞を作製する場合、通常冠動脈一枝のみを閉塞する。さもないと虚血による不整脈によって死亡したり急性心不全で死亡するケースが多い。一般的にみて一枝病変の患者で急性期の不整脈が頻発する時期を過ぎた患者で<sup>21,22</sup>、数ヶ月から一年の間に心室頻拍などの致命的な不整脈が生じることは少ない。しかし5年あるいは10年後に急に心室頻拍などを発症し治療に難渋するケースがある。こういった現象は、心筋梗塞後の長期的なリモデリングという現象によって生じると考えられている。つまり動物実験を行い、細胞を移植したとしてその効果を正確に判定するには5年から10年は経過を見る必要があることになる。また通常我々が細胞治療を必要とする重症心不全患者は、3枝病変で、微小な血管の病変も有しており、不整脈の基質も複雑である。こういった実験動物は残念ながら存在しえないため、究極的には人体で行う治療が動物実験で代用できない（特にリエントリー性不整脈について）。5年10年と言え、イヌであれば個体の寿命に近い時期でもあり、たとえ実行したとして、このような研究に意味があるかもわからない。そのため小動物であっても明らかに催不整脈作用が強い、あるいは電気生理学的に明らかに不整脈を悪化させることが予想される場合をのぞいては、臨床患者において治療を実践し、注意深く不整脈発生の有無を観察する以外無いだろう。

### 臨床試験で学ぶ催不整脈

骨格筋芽細胞の心筋内への注入によって、致命的な心室性不整脈が生じること



は有名である<sup>1</sup>。しかしこれは前述する如く、ある程度基礎電気生理学的な検討を行う事によって予想出来たはずである。しかしその他の骨髓単球細胞<sup>23</sup>や、骨髓間葉系幹細胞の臨床試験<sup>24</sup>では、明らかな催不整脈作用の報告は無い。その原因の一つは、こういった細胞が放出するサイトカインや液性因子<sup>13,14</sup>がホストの不整脈基質自体を改善させてしまっている可能性や、心臓に分化誘導する効率が圧倒的に低いために<sup>5,15</sup>、移植した細胞から出るであろうと予想された不整脈が表面化しなかつただけである可能性がある。細胞種や移植方法が変われば、それぞれについて十分な基礎電気生理学的な知識の上で実験を行い、それから得られた知見を臨床電気生理学的な経験と知識を持って安全性の判断を行った上で臨床の患者へ応用し、さらに十分な経過観察が必要であるのは言うまでもない。

1. Menasche, P. et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* † **41**, † 1078-83 † (2003).
2. Zhang, Y. M., Hartzell, C., Narlow, M. & Dudley, S. C., Jr. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* † **106**, † 1294-9. † (2002).
3. 三好俊一郎 他 心筋再生と電気現象、再生医療における不整脈. *心電図* † **24**, † 15-28 † (2004).
4. Makino, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* † **103**, † 697-705. † (1999).
5. Takeda, Y. et al. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J Gene Med* † **6**, † 833-45 † (2004).
6. Hattan, N. et al. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* † **65**, † 334-44 † (2005).
7. Yamada, Y., Wang, X. D., Yokoyama, S., Fukuda, N. & Takakura, N. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* † **342**, † 662-70 † (2006).
8. Miyoshi, S. et al. Human menstrual blood is a potential cell source for cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* † **45**, † 156

- (abstract) † (2005).
9. Shimizu, T. et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* † **90**, † e40. † (2002).
  10. Itabashi, Y. et al. Analysis of the electrophysiological properties and arrhythmias in directly contacted skeletal and cardiac muscle cell sheets. *Cardiovasc Res* † **67**, † 561-70 † (2005).
  11. Rubart, M., Soonpaa, M. H., Nakajima, H. & Field, L. J. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* † **114**, † 775-83 † (2004).
  12. Leobon, B. et al. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* † **100**, † 7808-11. † (2003).
  13. Gneocchi, M. et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* † **11**, † 367-8 † (2005).
  14. Gneocchi, M. et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J* † **20**, † 661-9 † (2006).
  15. Gojo, S. et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* † **288**, † 51-9 † (2003).
  16. Determinants of predicted efficacy of antiarrhythmic drugs in the electrophysiologic study versus electrocardiographic monitoring trial. The ESVEM Investigators. *Circulation* † **87**, † 323-9 † (1993).
  17. The ESVEM trial. Electrophysiologic Study Versus Electrocardiographic Monitoring for selection of antiarrhythmic therapy of ventricular tachyarrhythmias. The ESVEM Investigators. *Circulation* † **79**, † 1354-60 † (1989).
  18. Furuta, A. et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally

- integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res* † **98**, † 705-12 † (2006).
19. Soejima, K. et al. Endocardial and epicardial radiofrequency ablation of ventricular tachycardia associated with dilated cardiomyopathy: the importance of low-voltage scars. *J Am Coll Cardiol* † **43**, † 1834-42 † (2004).
  20. Soejima, K. et al. Subxiphoid surgical approach for epicardial catheter-based mapping and ablation in patients with prior cardiac surgery or difficult pericardial access. *Circulation* † **110**, † 1197-201 † (2004).
  21. Kaplinsky, E., Ogawa, S., Balke, C. W. & Dreifus, L. S. Two periods of early ventricular arrhythmia in the canine acute myocardial infarction model. *Circulation* † **60**, † 397-403 † (1979).
  22. Harris, A. S., Bocage, A. J. & Otero, H. Role of sympathetic excitation in generating arrhythmias in early and late phases of ectopic responses after coronary arterial occlusion in dog heart. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* † **5**, † 315-21 † (1975).
  23. Kamihata, H. et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* † **104**, † 1046-52 † (2001).
  24. Chen, S. L. 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* † **94**, † 92-5 † (2004).

### Ⅲ-2-2.

#### ヒト化マウスを用いた再生医療実現のためのトランスレーショナルリサーチ

理化学研究所 横浜研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター

ヒト疾患モデル研究ユニット

石川文彦

##### 「再生医療を実現するにあたって」

我が国において、幹細胞、スキャフォールド、液性因子、さまざまな側面から再生医療への取り組みは進んでいる。試験管内(in vitro)で行なう実験は、これらすべての側面を評価するうえで有用であり、実験動物であるマウスを用いた実験は、血液・免疫など、さまざまな組織再生の評価に利用されてきた。しかし、21世紀の新しい医療として期待される再生医療の実現のためには、試験管内やマウス体内で得られた事象が、ヒト生体内でどの程度近似しているかを検証するとともに安全性を確認することが不可欠である。そのためには、再生医療で用いられるヒト幹細胞、前駆細胞が体内でどのような能力を有するかというシミュレーションが必要であり、高分子化合物など生体材料や液性因子の投与がヒトの免疫系にどのような影響を及ぼすかという安全性に関する検討が必要である。われわれは、ヒト免疫系・血液系をマウス免疫組織を利用して再現し、生体内におけるヒトの免疫、血液の動態を時系列も含めて評価するシステムの確立に取り組んできた。この「ヒト化マウス」の再生医療実現のための研究ツールとしての有用性について、その作製法と再生/免疫の両面における研究結果について報告する。

##### 「免疫系ヒト化マウスの作製-免疫不全マウスの開発」

からだの中の様々な組織、臓器における再生が期待されているが、われわれは、まず、ヒトの免疫系・血液系をマウスに再構築することを最初の目標とした。これは、再生医療の実現において二つの意味を持つと考えられる。一つは、免疫系・血液系をマウスに再構築するには、マウス骨髄に自己複製能を有するヒト造血幹細胞が存在し続けるということを示しており、ヒト幹細胞のマウス体内での再生能を評価できる点である。もう一点は、再生医療に用いられる生体材料がヒト免疫系に及ぼす影響（抗原性、血栓性など）を評価することができることである。このようにヒト造血・免疫系を再構築したマウスを、ヒト化マウス

の中でも、「免疫系ヒト化マウス」と呼称している。免疫系ヒト化マウスは、ヒト造血幹細胞を、異種であるヒト細胞を拒絶することができない免疫不全マウスに移植することで作製される。免疫不全マウスの歴史は、数十年前にさかのぼって Nude マウスに始まったといえる。Nude マウスは、胸腺が欠如しているため、細胞性免疫の主体を担う成熟 T 細胞が存在しないものの(1、2)、ヒト腫瘍細胞株をのぞいては、正常造血細胞や患者検体から得られる腫瘍細胞などは、残存するマウスの液性免疫によって排除される。そのため、獲得免疫系の構成細胞である T 細胞および B 細胞系列の両者の成熟リンパ球が共に欠損している複合型免疫不全を呈する Scid マウスが作製された(3)。その後、様々な近交系のストレインに Scid 変異をバッククロスする試みがなされた。NOD-scid、NOD-Rag1<sup>tm1.1</sup> マウス、Rag2<sup>-/-</sup>gc<sup>-/-</sup>マウス NOD-scid/b2m<sup>tm1.1</sup> マウス、NOG マウスなど自然免疫系を不全状態に近づけたマウスの開発を背景に、われわれは、年齢とともに、不全状態となった獲得免疫系が出現する”leakiness”といわれる現象の克服と NK 細胞、樹状細胞などの残存する自然免疫系の不全化を目的として、米国ジャクソン研究所との共同で NOD-scid/IL2rgK0 マウスを開発した。このマウスは、サイトカイン共通 g 鎖 (・c) の完全欠損を有する新規免疫不全マウスであり、次項に述べるとおり新生仔期にヒト幹細胞を移植することによって、高率なヒト造血・免疫系を有する免疫系ヒト化マウスの作製が実現された(4)。

#### 「免疫系ヒト化マウスの作製-ヒト幹細胞純化と移植法」

免疫不全マウス (NOD-scid/IL2rgK0 マウス) にヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫化マウスは作製される。ヒト造血幹細胞源として、主に臍帯血、骨髓、末梢血 (G-CSF 動員後) が使われているが、単核球を分離してすべての造血細胞を移植すると、成熟した T 細胞がマウスの組織を異種として認識する、“異種 graft-versus-host 反応”をひきおこす。そのため、CD34, CD38, CD133, CXCR-4, Lin などの幹細胞抗原と成熟化抗原を組み合わせる必要となる。

生直後の新生児をレシピエントとして用いることで、幼若な環境におけるヒト造血、免疫系の再構築が高率におこることを Manz らのグループとわれわれが報告してきた(4、5、6)。新生仔マウスをレシピエントとして用いる場合の細胞移植ルートは3つある。もっとも手技的に簡便なのは、腹腔内への移植である。しかし、この方法では、造血幹細胞のホーミングは顕著でなく、ヒト造血、免疫細胞の分化が高率には認めない。Manz らのグループは、新生仔 Rag2<sup>-/-</sup>gc<sup>-/-</sup>マウスの胎児期中期 (E13-16) の造血の場である肝臓内に移植するシ

ステムを確立した(6)。一方、われわれは、造血幹細胞のニッチが存在し様々な造血細胞の分化を支持する骨髄に、効率良くヒト幹細胞をホーミングさせる目的で NOD-scid/b2mK0 マウスや NOD-scid/IL2rgK0 マウスの新生仔期に経静脈的に細胞輸注する方法を確立した(4、5)。新生仔期の造血微小環境にヒト造血幹細胞を移植することで、その後の免疫、造血構築を効率良く実現し、飼育・繁殖のうえでも、生後の免疫不全状態を最小限にすることができた。ヒト T 細胞の分化、B 細胞の成熟および抗体産生、顆粒球、樹状細胞の分化など、多くの点で有用な免疫系ヒト化マウスが作製されたといえる。

#### 「免疫系ヒト化マウスの再生医療への応用」

以上の方法にて作製された免疫系ヒト化マウスを用いて、再生医療の実現化における検討を以下の通り行なった。

##### 1 ヒト幹細胞の造血、免疫細胞への分化能

造血系、免疫系については、すでに記述したとおり、全てのヒト免疫細胞がマウス体内にて分化することが確認された。炎症早期に誘導される顆粒球、単球などもヒト造血幹細胞から骨髄を主たる場として分化する。機能的側面としては、T 細胞依存性の抗原に対して、抗原特異的抗体産生が誘導できることが確認された。全ての免疫細胞の分化と抗体産生という機能的側面から、「免疫系ヒト化マウス」の確立といえる。一方、抗体産生においては、抗原特異性という意味では、IgG 型抗体の産生量が少ない事、ヒト T 細胞のマウス胸腺内での成熟化の機序が不明であることが、現時点での問題点と指摘される。造血系においては、ヒト血小板の著名な産生が見られたことから、血管領域の再生医療の実現においては、生体材料の血栓形成とヒト血小板への影響を直接解析することが可能となった点が特筆すべき事項である。

##### 2 非造血組織における幹細胞の多能性、可塑性の検討

幹細胞の可塑性と再生医学研究を世界的にひろげた 1999 年の Petersen らの報告(7)は、ラット骨髄細胞を移植した結果のドナー由来肝細胞の存在をあきらかにしたものであるため、骨髄に存在する造血幹細胞と間葉系幹細胞のいずれが再生に関与したかが明らかでなかった。マウス幹細胞研究においては、純化した c-Kit<sup>+</sup>Scal<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>造血幹細胞を移植することで、様々な組織の再生の事象が報告されている。われわれは、自己複製可能なヒト造血幹細胞が免疫系ヒ

ト化マウス骨髄に長期生着している事実に基づいて、ヒト造血組織由来幹細胞のマウス非造血組織における多能性や可塑性、そして非造血組織由来細胞との細胞融合について検討を加えた。

免疫系ヒト化マウス消化管の解析においては、1000個に1-5個という非常に少ない頻度ではあるものの、ヒト染色体陽性サイトケラチン（CK）陽性のヒト上皮系細胞の再生が確認された（8）。これは、性不一致骨髄移植（男性ドナー／女性レシピエント）の臨床検体の解析においても、ほぼ同様の頻度で男性ドナー骨髄由来の再生消化管上皮が女性のレシピエントに認められた。この解析結果に基づく再生効率からは、広範囲に欠損した消化管上皮を修復することは現時点で困難と予測されるが、免疫学的機序が病因と考えられる自己免疫性の炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎など）については、造血幹細胞を移植することによって、免疫系をリセットし、正常な免疫系を構築するとともに、上皮系を少しずつ再生するという治療戦略は実現可能であると思われる。実際、クローン病を持つ造血管腫瘍の患者さんに対する幹細胞移植施行後、消化管の炎症、症状が改善したという症例は欧米にて報告されている。

免疫系ヒト化マウスの膵臓組織については、インスリン産生を担う膵島 b 細胞の再生を中心に解析を行ってきた（9）。ヒト臍帯血移植後の免疫系ヒト化マウスの膵臓組織において、消化管上皮細胞の再生で認められたと同様に、1000個に1-5個という非常に少ない頻度でインスリン陽性／c ペプチド陽性／ヒト染色体陽性の細胞が存在した。再生のメカニズムは、インスリン／CD45 の免疫染色とヒト染色体／マウス染色体のプロープを用いた Dual FISH 法を同時施行した後、共焦点顕微鏡を用いてマルチカラーイメージング解析を行なった。その結果、インスリン陽性／CD45 陰性の膵島 b 細胞において、ヒト染色体陽性／マウス染色体陰性の細胞とヒト染色体陽性／マウス染色体陽性の細胞とがほぼ同一の頻度で存在することが確認された。この結果から、ヒト幹細胞・マウスインスリン産生細胞の細胞融合と幹細胞からの分化という両者の再生機序が混在することが示唆された。

循環器系については、われわれのグループでは心筋の解析のみを行った。ヒト造血幹細胞を移植して作製した免疫系ヒト化マウスの心臓組織にヒト心筋細胞は確かに存在したが、ヒト染色体陽性の心筋細胞はすべてマウスの染色体を有することから、これらはヒト造血幹細胞とマウスの心筋細胞が融合していることが分かった（10）。これらのドナー幹細胞とレシピエント心筋細胞の細胞融合により再生されたハイブリット心筋細胞は、単細胞レベルで収縮能を有する

ことが高感度 CCD カメラの観察により明らかとなり、周囲のレシピエント由来の心筋細胞との間の gap junction を維持していることも電子顕微鏡レベルで確認された。虚血性心疾患や心筋症の病態解析を進めながら、このような融合心筋が組織の機能改善に貢献するかどうかを判断することが次の研究課題となると想定される。

このように、現在、様々な組織において、ヒト骨髄やヒト臍帯血由来の幹細胞から非造血組織に存在する細胞が、分化や細胞融合によって再生することがあきらかとなった。従って、マウス骨髄幹細胞を用いて進められてきた再生医学研究の成果が、ある程度、ヒト細胞を用いても検証されたといえる。また、ヒト染色体とマウス染色体を同一組織切片で検出する Dual FISH 法によって、再生医学が医療として実現するために不可欠な課題であった、細胞融合か分化かという再生機序についても明確となってきた。一方で、解決できていない課題として、ヒト幹細胞による非造血系細胞の再生の効率がきわめて低いことが、より疾患病態に近似したモデルを作製した場合に、治療可能な頻度に上昇し、機能的な改善に繋がるかどうかの検証があげられる。再生医療の実現のためにはこのような質問に答えていく必要があるものの、異種であるヒトとマウスの間で明確な MHC（主要組織適合抗原）の不適合にもかかわらず、以上に述べた再生の現象が確認できたことは再生医療の実現に期待が寄せられるとともに、ヒト化マウスの研究ツールとしての有効性を示唆するものと考えられる。

### 3 移植片対宿主 (Graft-versus-host: GVH) 反応

われわれは、ドナー細胞＝ヒト、レシピエント＝マウスという異種間の移植システムでヒト化マウスを作製する実験過程を利用して、純化したヒト造血幹細胞でなく臍帯血や骨髄単核球を移植片として用いることで、異種の GVH 反応を解析した。T 細胞除去を行わずにヒト臍帯血、骨髄、末梢血由来単核球を移植した場合、幹細胞が移植片に存在するものの、レシピエントマウス体内にて GVH 反応が生じる。これは、ヒト T リンパ球がマウスの主要組織適合抗原を認識する結果であるが、現象としては、臨床上見られる GVH 反応にきわめて類似していることがレシピエントマウスの組織学的解析によって判明した。消化管粘膜下、肝内胆管、皮膚毛包周囲など GVH 反応に特異的な部位でのヒト T リンパ球浸潤ばかりでなく、消化管絨毛の萎縮、胆管の胆汁鬱滞なども認められる。また、これら組織に浸潤するヒト T リンパ球は、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の両者とも存在する。このような組織局所での炎症所見は、レシピエントの全



身にも影響を及ぼしており、著明な体重減少と血清中のサイトカイン上昇を呈した。この単核球移植ヒト化マウスの GVH 反応に伴って生じたサイトカインストームで、どのサイトカインがドナーT細胞由来であり、どのサイトカインがレシピエント由来であるかを区別することが可能である。これは、マウスの同種移植、臨床での幹細胞移植から得られなかった知見である。これまでの解析から、ドナー/ヒト由来の IFN-g が著明に上昇し、レシピエント/マウス由来の MCP-1 が上昇することが判明した。ドナーの Th1 型リンパ球と、レシピエントの単球、マクロファージの GVH 反応における役割を改めて明確にしたといえる(未発表)。

#### 「免疫系ヒト化マウスを用いた今後の再生医学研究」

以上の通り、マウスという異種 MHC 不一致の存在する環境で、ヒト免疫系がきわめて高率に再構築できたこと、成熟ヒト血小板が十分に産生されたこと低い頻度ながら非造血細胞の再生と融合が認められたことは、今後、細胞を含む再生医療用具の評価ツールとしてヒト化マウスの応用が期待される。非造血組織の再生においては、安全かつ高率な医療の実現のために、間葉系幹細胞(MSC)や血管内皮前駆細胞(EPC)など様々な幹細胞源を用いた結果、最終的に、再生医療用具に付加する細胞としてどの細胞が最適であるかを検討する必要がある。また、ドナーとレシピエントの免疫反応の相互作用という点で、現在はヒト幹細胞がいかにかマウスの免疫拒絶を逃れるかを検討し、移植片に含まれるヒト T細胞がマウス主要組織適合抗原を認識する機構について解析してきたが、今後、ヒト造血幹細胞を移植して作製したヒト化マウスを用いて、異なる HLA を有するヒト細胞を輸注することで見られるヒト対ヒトの同種免疫反応を解析することで、臨床上のドナーとレシピエントにおける拒絶と GVH 反応の両者を同時に解析する系としても応用されると考えられる。

#### 参考文献

- 1 Reed ND and Manning DD. Long-term maintenance of normal human skin on congenitally athymic (nude) mice. Proc Soc Exp Biol Med 143:350-353, 1973
- 2 Manning DD, Reed ND and Shaffer CF. Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin of congenitally athymic (nude) mice. J Exp Med 138:488-494, 1973
- 3 Bosma GC, Custer RP and Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency

mutation in the mouse. *Nature* 301:527-530, 1983

4 Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD and Harada M. Development of functional human blood immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor gamma chain null mice. *Blood* 106:1565-1573, 2005

5 Ishikawa F, Livingston AG, Wingard JR, Nishikawa S and Ogawa M. An assay for long-term engrafting human hematopoietic cells based on newborn NOD/SCID/beta2-microglobulin(null) mice. *Exp Hematol* 30:488-494, 2002

6 Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A and Manz MG. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304:104-107, 2004

7 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS and Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170, 1999

8 Ishikawa F, Yasukawa M, Yoshida S, et al. *FASEB J* 18: 1958-1960, 2004

9 Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, et al. *Stem Cells* 23: 1409-1416, 2005

10 Ishikawa F, Shimazu H, Shultz LD, Fukata M, Nakamura R, Lyons B, Shimoda K, Shimoda S, Kanemaru T, Nakamura K, Ito H, Kaji Y, Perry AC and Harada M. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J* 20:950-952, 2006

### Ⅲ-2-3. アロ移植の現状および組織適合性評価試験について

大阪大学医学部附属病院未来医療センター

菫田 弘

はじめに

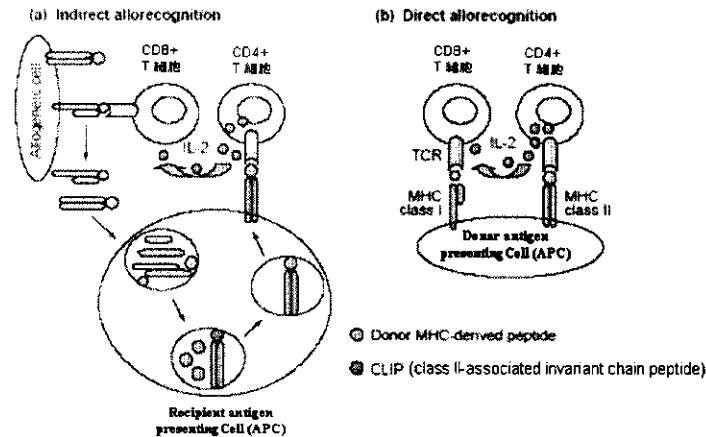
従来の内科的、外科的治療では困難であった拡張型心筋症や心筋梗塞後の虚血性心筋症による末期重症心不全に対し、骨髄由来間葉系幹細胞や骨格筋芽細胞等の細胞移植が行われるようになり、一定の成果を上げてきている。さらに本ワーキングでの主題となっている心筋シート等の組織移植も開始されようとしている。これらの clinical trial は原則として拒絶反応の起こらない自家移植の系で行われている。しかし、自己細胞・組織は採取できる量・部位が限られている上に、培養増殖が必要な場合には、移植する期日より数週間前に採取しておく必要がある。実際の臨床応用を考えた場合に、臓器不全に陥っている患者から前もって細胞や組織を採取することは困難であり、生体または心停止ドナーより採取する方が、より多く、より計画的に入手できると考えられる。さらに、ドナーからの幹細胞や組織を保存することにより、細胞バンク、組織バンクを形成することが可能となり、これらの治療がより広く普及していくと思われる。この結果、経済的側面においても市場規模は自家移植に比べ同種移植ははるかに大きいと思われる。

しかし、同種移植においては急性拒絶反応を含めた拒絶反応がもっとも大きな問題となる。現在、細胞・組織移植においても同種臓器移植と同様の拒絶反応が起きるかについては、いまだコンセンサスを得られていないのが現状である。本稿では、同種幹細胞移植において引き起こされうる免疫反応における基礎研究および動物実験について概説するとともに、現在同種臓器移植において行われている組織適合性評価試験を解析するとともに、その制御法を開発し、また拒絶反応のモニタリング法を開発するものである。

#### アロ移植の現状

最近になり、骨髄由来間葉系幹細胞の同種移植に関する基礎研究の知見が蓄積されつつある。通常同種臓器移植においては、抗原認識は2通りの経路により起こるとされている(図1)。1つはDirect pathwayで、recipientのCD4+細胞がgraft臓器中に含まれる抗原提示細胞(Antigen presenting cell: APC)上のallogenic MHC class IIを直接認識し、IL-2を産生、これがdonar由来のAPC上のMHC class Iに結合したCD8+細胞を刺激し、細胞障害性を引き起こす。もう1つはindirect pathwayでrecipientのAPCが同種抗原を処理しMHC分子との複合体を形成し、これにrecipientのCD4+細胞が結合しIL-2を産生、これ

が graft の細胞上の MHC class I に結合した CD8+細胞を刺激し、細胞障害を引



き起こす反応である。

これらのうち、同種臓器移植の拒絶反応においては、direct pathwayによる抗原認識が特に強いと言われている。Indirect pathwayは通常のウイルスや細菌蛋白に対するT細胞応答と同様である。何れの移植抗原認識機構においてもT細胞の活性化は、T細胞レセプターの刺激のみではおこらず、接着分子(T細胞上のLFA-1, 2, APC上のICAM-1, LFA-3)の他、costimulatory signal (CD28-CD80, 86, CD154-CD40)が不可欠である。

骨髓由来間葉系幹細胞は、MHC class I、Thy-1 (CD90)、vascular cell adhesion molecule (CD106, VCAM)、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、ICAM-2、activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166)、lymphocyte functional antigen-3 (LFA-3)、integrins  $\alpha$  1, 2, 3, 5, 6,  $\beta$  1, 3, 4等のT細胞と結合する分子を発現している。さらに、無刺激の状態ではMHC class IIは発現されていないが、interferon- $\gamma$ にて刺激するとMHC class IIの発現がup regulationされると報告されている。しかし、人間の骨髓由来間葉系幹細胞はCD80, CD86, CD40等のcostimulatory signalを発現しておらず、またinterferon- $\gamma$ にて刺激してもこれらの発現は変わらないとされている。これらの実験結果は、骨髓由来間葉系幹細胞の中には、抗原提示細胞(Antigen presenting cell: APC)として機能する細胞は少なく、そのためdirect pathwayによる同種抗原認識は非常に弱いと思われる。そのため、拒絶反応の程度は同種臓器移植よりも少ないと思われる。

また、骨髓由来間葉系細胞がT細胞応答を抑制するとの報告がある。リンパ球混合培養試験にて骨髓由来間葉系細胞はT細胞の増殖を刺激しないと報告されている。また、骨髓由来間葉系幹細胞を共培養することにより、T細胞を樹状細胞等の他のAPCと共培養しても増殖しないと報告されている。さらにT細胞をCD28とCD3の刺激抗体により刺激した後にMSCを加えるとT細胞の増殖は抑制されると報告されている。この骨髓由来間葉系幹細胞のT細胞の増殖抑制効果は、骨髓由来間葉系細胞を除去すれば消失すること等より、反応するT細胞

の apoptosis によるものではないとされ、ある種の液性因子によるものとされている。以上の報告から見ると骨髄由来間葉系幹細胞の免疫原性は弱くこれを同種移植した場合、起こる拒絶反応は弱いと考えられる。

拡張型心筋症や心筋梗塞後の虚血性心筋症に対する、同種骨髄由来間葉系幹細胞移植の大動物を用いた実験としては、Amado らのブタを用いた報告がある。彼らは、ブタの心筋梗塞モデルに対し、心筋梗塞後 3 日目に梗塞部の心筋にカテーテルガイド下に骨髄由来間葉系幹細胞の同種移植を行った。その結果、免疫抑制剤の投与なしでも、移植した骨髄由来間葉系幹細胞は 8 週間後においても生着しており、心筋や血管内皮、平滑筋の蛋白を発現していたと報告している。また、梗塞部の範囲が縮小し心機能もほぼ正常にまで改善したと報告している。

以上、骨髄由来間葉系幹細胞の同種移植に関する基礎研究、動物実験の報告を述べてきたが、筋芽細胞の免疫原性や動物実験の報告はまだなく、今後の検討が待たれる。

### 組織適合性試験

前述のように、現在のところ心疾患に対する同種細胞、組織移植の大規模な clinical trial は行われておらず、従って組織適合性試験のガイドラインも存在していない。そのため、ここでは、本邦において臓器移植において行われている組織適合試験について概説する。

現在、臓器移植においては、拒絶反応の予防のため、血液型抗原 (ABO 血液型、Rh 型)、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen : HLA)、既存抗体 (preformed antibody または panel reactive antibody) が Donor-Recipient 間の組織適合性試験とされ、Recipient 選定判定の第 1 位として採用されている。

1) 血液型抗原については、骨髄由来間葉系幹細胞や筋芽細胞上に発現しているかは、厳密には調べられていない。もし、発現しているのであれば同種移植において超急性拒絶反応を起こす可能性も否定できない。

#### 2) HLA 抗原タイピング

現在用いられている HLA タイピングは血清学的検査法と DNA タイピング法が主流になっている。

① 血清学的検査法：末梢血を採血して T・B リンパ球分離、混合培養、判定の手順で行われる。class I では T リンパ球、class II では B リンパ球を用い、NIH で推奨されている微量細胞毒性試験により行われる。被検体リンパ球と HLA 抗血清を混合培養して、ウサギ補体を加えることにより細胞障害で死滅したリンパ球をカウントと生死率で判定する。

② DNA 法：HLA の多形性を示す塩基配列 18-19bp を PCR にて増幅し型を判定する。

## 2) 既存抗体検査

- ① リンパ球直接交差試験(Direct cross match) : Recipient 血液中に HLA を含めた Donar 移植抗原に反応する既存抗体があるかをスクリーニングする方法で Donar のリンパ球と Recipient 血清による混合培養の後、蛍光抗体法や FACS により判定する。
- ② PRA 検査(panel reactive antibody test) : 代表的な 100 個の HLA をコーティングし Recipient 血清を反応させ ELISA 法にて判定する。10 種以上の反応を持って PRA(+) とする。

以上が、同種臓器移植において行われている組織適合性試験であり、臓器移植においては拒絶反応を回避するため、これらの検査で Donor と最も合った Recipient が選択されているが、上述のように特に骨髄由来間葉系幹細胞の移植においては拒絶反応は弱いとの報告があり、臓器移植と同様のシステムで Recipient を選択するかまたはこれらの検査結果を参考値とするか今後の議論が待たれる。

## Reference

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 ;284 : 143-7.
2. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000 ; 251 : 3-11.
3. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003; 10 : 228-41.
4. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998 ; 176 : 57-66.
5. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 ;75 : 389-97.
6. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 ;99 : 3838-43.

7. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 ;101 : 3722-9
8. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 ; 102 : 11474-9.

### Ⅲ-2-4-1. 間葉系幹細胞の同定 (1)

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 (口腔生化学)

加藤幸夫、五十嵐晃

#### (1) 再生医療における間葉系幹細胞 (MSC) の安全性評価項目

1970年代に、骨、軟骨、脂肪などへと分化する多能性の幹細胞 (間葉系幹細胞、MSC) が骨髄に存在することが見いだされ、その後に骨髄由来 MSC の移植が、骨、軟骨、脂肪、歯周組織などの組織再生を著しく促進することが多くの動物実験や臨床研究で示された [1-6]。しかし再生医療での MSC 移植の普及/事業化には、移植細胞の安全性を客観的にかつ簡便に評価する必要がある。

安全性判定の項目を表 1 に列挙した。私たちは全ての項目を検討しているが、本稿では「間葉系幹細胞の同定」と関係する 4)、5) 項目について述べる。

#### (2) 間葉系幹細胞のマーカー分子：細胞表面抗原

「間葉系幹細胞の同定」は困難である。というのは骨髄液中の多様な細胞を培養皿に播種してから接着して増殖した細胞を所謂『MSC』としているからである。したがって『MSC』は不均質な接着細胞の総称であった。

一方で MSC であることを示すために、各種の細胞表面抗原、すなわち陽性マーカーとして SH 2, SH 3, CD44 など、陰性マーカーとして造血系細胞で発現する CD11B/Mac1, CD45, CD31, CD38, CD90/Thy1 などが、用いられてきた [7, 8]。しかし私たちのフローサイトメトリー (FACS) を用いた研究では、これらの陽性マーカーは線維芽細胞でも高レベルに発現していた [8-10]。またもともと造血系細胞は培養皿に接着しないので、上記の陰性マーカーもあまり役立たない。つまり真の MSC マーカーを探索する必要があった。

#### (3) 均質な MSC を用いた MSC マーカーの探求

MSC の分子マーカーを探索するには、MSC 細胞集団が不均質では研究が成立しない。そこでまず、均質な MSC の培養方法を確立した (超増幅法) [1-4]。FGF-2 を添加した培地で骨髄 MSC を継代すると、30-40 回の細胞分裂の後に増殖を停止した。しかし同じ培地で線維芽細胞は 110-120 世代まで増殖した。したがって骨髄 MSC に線維芽細胞がわずかでも混入しておれば、30-40 世代以後は MSC よりも混入した線維芽細胞の数が多くなっていくはずである。しかし私たちの超増



幅法では、増殖能を失った 30-40 世代の MSC 培養系でも全ての細胞が骨芽細胞へ分化した（アリザリン赤に染まった）。すなわち超増幅法で培養した MSC には線維芽細胞が含まれずしかも均質な細胞集団であることが判明した [10, 11]。

#### （４）共通 MSC マーカーの同定

私たちは 2 回の DNA microarray および定量的 PCR 解析により、線維芽細胞と比較して腸骨あるいは顎骨 MSC で発現が亢進している 29 遺伝子を同定した。このうち 24 遺伝子は、大腿骨、脛骨 MSC でも発現が亢進していた [10, 11]。つまり MSC に対する共通マーカーであった。

#### （５）線維芽細胞マーカーの同定

また、私たちは MSC で発現レベルが低く線維芽細胞で発現レベルが高い 6 遺伝子を同定した [8]。後述するように、これらは移植用 MSC に線維芽細胞が混入していないことを検査するために役立った。

#### （６）簡便な品質検査

移植用細胞が目的細胞（MSC）であることを検査するには、移植用細胞の一部から RNA を分離してマーカー遺伝子の発現レベルを測定するか ELISA により培養液に分泌したマーカー分子を定量すればよい。遺伝子発現レベルの測定には最短で 4-5 時間、ELISA では 1-2 日必要である。患者の経済的負担を考えれば検査項目は少ない方がよい。したがって上記のマーカーから、継代の影響、年齢の影響、個体差の影響がより少ないものを選択した（表 2）。また線維芽細胞に対する相対的な発現レベルが高くても絶対的発現レベルが低いものは測定誤差が大きくなる可能性があるので、定量的 RT-PCR における Ct 値が 30 以下のものを優先した（表 2）。

一次検査では、4 つの MSC マーカー、2 つの線維芽細胞マーカーを用いて、MSC の同定試験および線維芽細胞の混入否定試験を行う。具体的には、標準 MSC および標準線維芽細胞株と検体 MSC のマーカー遺伝子発現レベルを同時に測定して、検体における各種マーカー遺伝子発現レベルが標準 MSC 株あるいは標準線維芽細胞株に対して群として有意差があるかないかを検定すればよい。通常一次検査だけで評価が十分可能であると考えるが、ボーダーラインの場合、二次検査で他のマーカーを加えて再検査することを提案したい（表 2）。

#### (7) 骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、線維芽細胞との区別

上記のマーカーは線維芽細胞との区別に有用であるが、骨周囲組織に存在する細胞との区別が求められる場合がある。そこで骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、線維芽細胞および MSC での発現レベルを DNA microarray および定量的 PCR 解析して、MSC でのみ発現が亢進している遺伝子を多数同定した [11,12]。図 1 にその例を示す。なおここでは、線維芽細胞での各マーカー遺伝子の発現レベルを 1 として、MSC、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、線維芽細胞での発現レベルを折れ線グラフで示した。これらのマーカーはいずれも MSC で選択的に亢進していた。これらの MSC 未分化マーカーの一部(2-3 個)を表 2 で示したマーカーに追加すれば、より厳密な意味で MSC の同定ができる。

#### (8) 結論

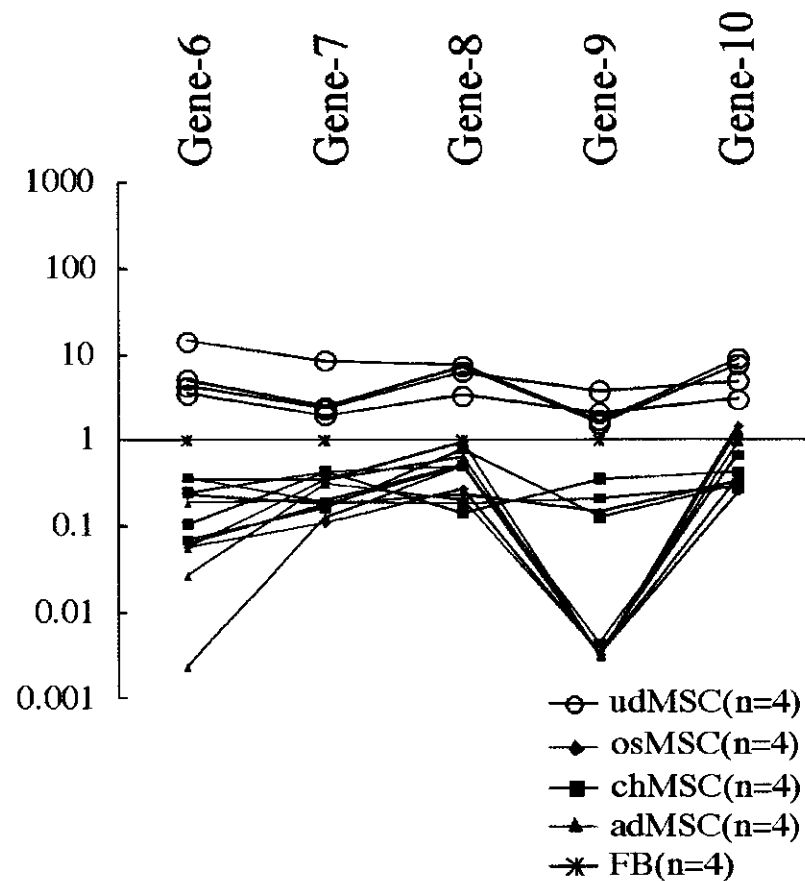
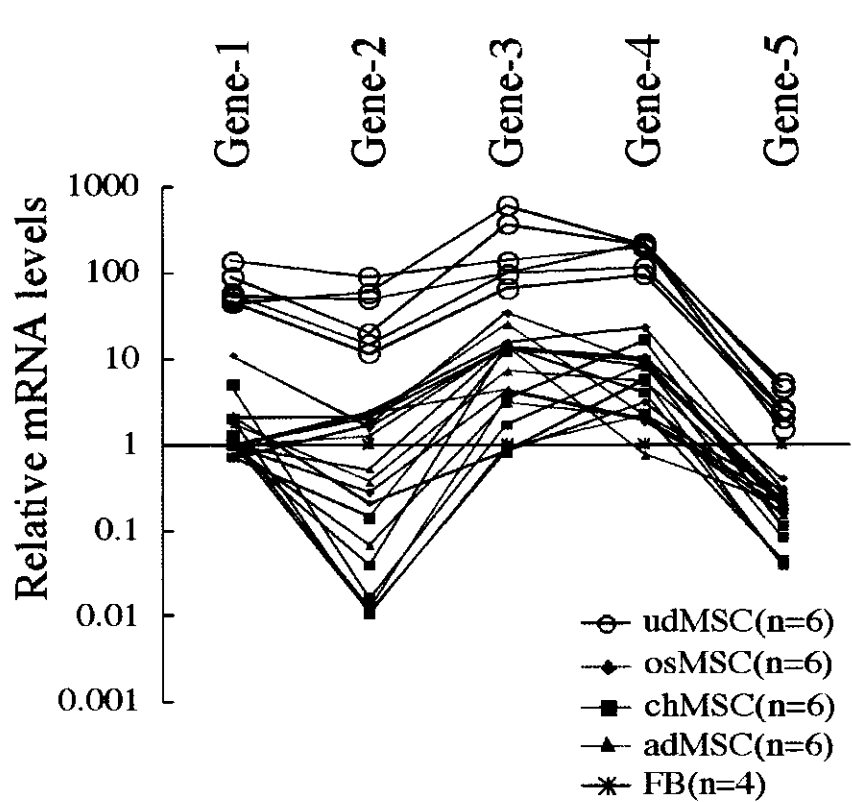
MSC の同定には、表 2 と図 1 のマーカーの一部を選択して、遺伝子発現レベルを測定すればよい。また私たちの研究では、一部のマーカーについては ELISA による評価も可能であった。これらのマーカーを使用することで、MSC であることを同定できるのみならず、性質（遺伝子発現レベル）を規定した細胞を移植できるので、従来よりも明確で、かつ効果と移植細胞の関係を追跡しやすい治療が可能となる。

#### 参考文献

- 1 加藤幸夫、堤真一、原真衣子、小池千加、松原全宏、辻紘一郎、自家間葉系幹細胞の移植による骨、軟骨、歯周組織の再生療法、*The Bone*, 17(2003) 17-20
- 2 加藤幸夫、五十嵐晃、間葉系幹細胞の増幅技術、*科学と工業*、55 (2004) 502-506,
- 3 Tsutsumi, S, Shimazu, A, Miyazaki, K, Pan, H, Koike, C, Yoshida, E, Takagishi, K, Kato, Y., Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response of FGF., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 413-419.
- 4 Matsubara, T, Tsutsumi, S, Pan, H, Hiraoka, H, Oda, R, Nishimura, M, Kawaguchi, H, Nakamura, K, Kato, Y., A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 503-508.

- 5 Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y., Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells., *J Bone Miner Res.* 20 (2005) 399-409.
- 6 Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H., Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells., *J Periodontol.* 75 (2004) 1281-1287.
- 7 Pittenger, M.F, Mackay, A.M, Beck, S.C, Jaiswal, R.K, Douglas, R, Mosca, J.D, Moorman, M.A, Simonetti, D.W, Craig, S, Marshak, D.R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells., *Science.* 284 (1999) 143-147.
- 8 Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, Kawaguchi H, Sugiyama M, Kamata N, Iwata T, Matsubara T, Nakamura K, Kurihara H, Tsuji K, Kato Y., Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts., *Biochem Biophys Res Commun.* 332 (2005) 297-303.
- 9 小池千加、五十嵐晃、Ketut Suardita, 原真衣子、松原全宏、石井正和、加藤幸夫、間葉系幹細胞に発現する遺伝子の解析、*広島大学歯学雑誌* 35(2003)151-153
- 10 加藤幸夫、加家壁正知、Pan Haiou, 五十嵐晃、松原全宏、河本健、辻紘一郎、中村耕三、高岸憲二、軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質、*関節外科* 25 (2006) 63-69
- 11 加藤幸夫、五十嵐晃、金輪真佐美、ヒト間葉系幹細胞—培養と品質管理のストラテジー、*バイオテクノロジージャーナル*(2006) 693-696
- 12 加藤幸夫、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、辻紘一郎、河本健、中島歩、間葉系幹細胞の基礎 (2) 間葉系幹細胞の性質、腎と骨代謝 19, 307-312, 2006

Figure 1



## 表1 MSCの安全性評価

移植用MSCの安全性検査項目
<ol style="list-style-type: none"><li>1 移植用細胞に病原体が感染していないこと</li><li>2 本人由来の細胞であること(同一性)(取り違え防止)</li><li>3 癌や炎症性細胞(関節症の滑膜細胞など)への病的変化がないこと</li><li>4 移植細胞が目的細胞である(MSC)であること</li><li>5 移植細胞集団への他細胞の混入がないこと (純度、均質性試験)</li><li>6 移植細胞の仕様(マーカー発現パターン)が明記されていること</li></ol>

# 表2

## MSCマーカー遺伝子

有用な遺伝子	Relative mRNA levelの平均値		MSC÷FB	Ct値の平均値		
	MSC (Pt.1 - 9)	FB (n=6)		MSC (Pt.1 - 9)	FB (n=6)	
1 次検査用	LIF	546	2	273	26	33
	IGF1	439	2	219	29	34
	PRG1	118	1	118	23	30
	MGP	281	3	94	27	34
2 次検査用	BMP4	173	4	43	30	33
	CTGF	34	2	17	19	25
	KCTD12	30	2	15	25	29
	IGFBP7	62	5	12	23	26
	TRIB2	17	2	8	25	29
	DYNC1H1	35	4	9	30	34

## FBマーカー遺伝子

有用な遺伝子	Relative mRNA levelの平均値		FB ÷ MSC	Ct値の平均値		
	MSC (Pt.1 - 9)	FB (n=6)		MSC (Pt.1 - 9)	FB (n=6)	
1 次検査用	COL15A1	2	1003	410	33	25
	CUGBP2	5	1335	264	30	25
2 次検査用	APOD	5	960	195	32	24
	MMP1	17	2581	151	27	21

### Ⅲ-2-4-2. 間葉系幹細胞の同定 (2)

国立成育医療センター研究所  
生殖医療研究部  
梅澤明弘、豊田雅士

#### 1. 間葉系幹細胞とは.

間葉系細胞(mesenchymal cell)という名称と間質細胞(stromal cell)という名称があり(文献 1)、正確に言えば間葉系細胞と間質細胞は異なる意味を有するものの現実問題として一流国際誌においても明確に区別している場合もあり、同一の細胞であると理解した方が分かりやすい. ひと言で言えば、実質細胞に対し、間充織を埋める細胞として考える。上皮細胞の間に存在する場合もあり、骨髄の場合は造血細胞の間を占める細胞として知られている。この骨髄に存在する間質細胞が脂肪細胞への分化することはよく知られていたが多分化能を有することが知られ、間葉系「幹」細胞として注目されるようになった。

その間葉系幹細胞の培養とは、細胞を体外で培養し増殖させることである。細胞を培養するためには、栄養、温度、酸素と言った一般的な条件の他に、「増殖因子」が必要となる。特定の細胞には特定の増殖因子が働く必要がある。1種類だけの増殖因子で増殖することは少なく、複数の増殖因子のによって増殖できるようになる。無血清培地を開発するという事は、この複数の増殖因子の組み合わせを発見することに他ならない。これまで、50種類を超える増殖因子が見つかっている。ヒトの正常細胞で培養の歴史が古く培養が容易であるのは間葉系細胞である。間葉系細胞は、結合組織を構成する主要な細胞であり、どの臓器にも必ず結合組織があるために、培養系に移したときに、増えてくるのは間葉系細胞である。ひとつは間葉系細胞がもともと特定の組織あるいは臓器の形をつくらない細胞であり、シャーレ表面のような環境でも困らないためであることと、細胞外基質を自分で合成して自分の環境を整える能力も強い。血清自身は増殖因子を適切に含んでおり、血漿はその増殖因子を含まない。血清が増殖因子を含むのは血液が凝固する時に血小板が壊れて、血小板が持っているplatelet-derived growth factor (PDGF)が出てくるためである。しかし、間葉系細胞の増殖にはPDGF だけでは十分ではなく、血清中の epidermal growth factor (EGF) や insulin-like growth factor (IGF) も必要となる。

平成 18 年には研究用とはなっているものの再生医療を意識した培養製品が開発され、間葉系幹細胞に特化した細胞培養皿が上市されており、産業界から培養液を多く販売されるようになった。無血清培地の開発にはこれまで2つの流れがあった。ひとつは細胞生物学的観点から細胞の増殖・分化制御を解明するという流れ、もうひとつはモノクローナル抗体産生のような工業的生産手段を開発するという流れである。再生医療における無血清培地の意義はこれらとは少し異なる。効率の良い分化制御の実現という観点もあるが、最も大きな意義は安全性の確保である。再生医療用途の培地にどれだけの質が要求されるかは未確定だが、再生医療の実用化に臨んでは想定しうる危険要素は極力排除する方向になる。とすれば、それに使用する培地も相応の安全基準を設ける必要がある。アミノ酸の原材料や製造工程の安全性にも配慮する必要がある。よって、臨床応用に際しては培地の無血清化あるいは低血清化が不可欠である。無血清培地の開発は再生医療研究に比べ地味で手間の掛かる作業である。しかし、再生医療の発展を図る基盤としての意義は大きい。ウシ血清の使用が許可されるようになってはきたものの、ロットによる差を考慮に入れると、再生医療が現実のものとならんとする今日、さらに無血清培地の重要性は増すものと期待される。

## 2. 分化形質の検証

間葉系幹細胞が示す分化形質として、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、神経細胞があげられる。間葉細胞とか間質細胞といった抽象的な名称であるので、その分化形質で細胞を呼ぶのが正しいという指摘があり、もっともな考えがある。細胞を形態学で分類するよりも、生物学的特性で分類することは正しい。問題は、骨芽細胞は一般に脂肪細胞への分化能を有しており、ニューロンへの分化能も有していることがあり、試験管内においては細胞の初期値で名称をつけることがむずかしいことである。骨芽細胞及び筋細胞になる間葉細胞は多分化能を有していることが多い。それぞれの分化形質について、その判断基準が標準化されることは臨床医療を考える上で極めて重要な意義を有する。骨へ分化した、骨格筋へ分化した、脂肪へ分化したとそれぞれの研究者が異なる基準で判断した場合は、問題となることは自明である。生物学の論文では、それぞれが一般的な方法で検証することになっているものの、その「一般的な」方法を、使用する試薬を含めて共通する方法にすることが要求される。



### 3. 表面マーカーによる検証

分化形質同様に、間葉系幹細胞という細胞は、「増殖し、多分化能を有する間葉系細胞」の総称であることより、医療を念頭におく場合は間葉系幹細胞を表面マーカーで規定する必要がある。造血系幹細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞とは科学的な意味で定義、アッセイ系を含めて同じ幹細胞とは言えない。医療に用いられる間葉系幹細胞は、培養皿に付着し、増殖するものを指すことが多いけれども、多分化能を有する間質細胞に共通する指標を明確にすることは臨床的に極めて重要な意義を持つ。さらに、これらの指標は発生生物学的に妥当であり、神経幹細胞、上皮細胞、血液細胞といった他の系統の細胞との差別化が可能であることが必要とされると同時に最前線の医療現場で検証可能な現実的なものでなくてはならない。これは造血幹細胞と間葉系幹細胞の違いだけにいえることではなく、神経幹細胞、胚性幹細胞、Trophoblastic stem cells, 腸管上皮幹細胞、肝幹細胞、毛根幹細胞、生殖幹細胞 (EG cells) といった他の幹細胞にも関わる問題である。

間葉系幹細胞の多分化能性は Fibroblast colony-forming unit というコロニーに由来する細胞を利用するために、試験管内でのアッセイとなる。または、ひとつの細胞に由来するコロニーで多分化能を検討する方法と同時に、ひとつの細胞を蛍光蛋白質でラベルして多分化能を検討する方法がある。幹細胞の定義は「自己複製と多分化能性を有する細胞」であることから培養し増殖した時点で細胞は自己複製能を有している訳であり、多分化能を獲得すれば間葉系に由来する幹細胞ということになってしまう。多分化能性は、試験管内で誘導剤を用いるので極端な場合かなりの細胞が幹細胞と判断され、分化能を有していない単なる間葉系細胞は線維芽細胞と呼ばれることになる。造血幹細胞は培養し増殖させることはむずかしいものの CD34, CD133 といった表面マーカーを利用して単離することが可能であり、幹細胞を同定するアッセイ系も多い。その一方、培養する幹細胞の代表としてあげられるものとして、胚性幹細胞と間葉系幹細胞があげられる。骨髄に由来するヒト間葉系幹細胞の分離は、「骨髄細胞に対して、CD29, 44, 73, 105, 166 を陽性抗体として、CD14, 34, 45 を陰性抗体として使用することによる間葉系幹細胞分画の認識」がある。この場合は、間葉細胞を一度も培養することなく、骨髄穿刺によって得られた骨髄細胞から直接、間葉細胞を分離する。臍帯血に由来する間葉系細胞は数が極端に少ないことから、ソートすることは意味がないと考えられる。検体全てを培養しても1個ないしそれ以下である。

#### 4. 間葉系幹細胞の供給源

間葉系細胞とは骨、軟骨、脂肪、骨格筋、真皮、靭帯、腱といった結合織細胞を総称しており、発生学的に中軸中胚葉(paraxial mesoderm)由来の細胞である。1999年、ヒト間葉系幹細胞から骨、軟骨、脂肪に分化する多分化能を有する間葉系幹細胞を同定したという報告をPittengerらが行った。また、この沿軸中胚葉の他に、心筋、平滑筋、血管内皮といった発生学的に臓側中胚葉(visceral mesoderm)由来の細胞があり、間葉系幹細胞のなかに臓側中胚葉にも分化できる幹細胞が見出された。間葉系幹細胞は、分化能に応じて階層構造を形成しているものと考えられている。このような間葉系細胞の供給源として、骨髄、臍帯血、臍帯、胎盤、月経血、子宮内膜、胎児、真皮、脂肪、末梢血等があげられる。それぞれの組織・臓器由来の間葉系幹細胞は、その性格が異なり、やはり表面マーカーで規定し、「スペック」を決める必要がある。

#### 5. 有効性の検証

標準化・均てん化と繰り返しているが、間葉系幹細胞を医療に利用する際には、細胞そのものの判断基準、分化形質の判断基準、移植後の有効性の判断基準が日本国内において決められており、それらの判断基準のもとにさまざまな医療が検証されることは必要不可欠である。移植された細胞が組織の虚血に対して効果があるという報告がなされており、「その治療メカニズムは移植した細胞が血管内皮に分化したからか、移植した細胞から産生される液性因子が血管増生に働いたのか？」という研究論点(Research Question)がある。虚血下肢に対する骨髄細胞移植および間葉系細胞移植は、当初は移植した細胞が血管系に分化して毛細血管が増え、虚血に対して治療効果を生じると考えられていたけれども、現在は移植された細胞から産生される液性因子により血管が増生するという結論となっている。虚血性心疾患や心筋症に対して骨髄細胞及び間葉系幹細胞を用いて細胞移植をする場合も、細胞から産生される液性因子による血管再生であり心筋細胞再生ではないというのが一般的な結論となっている。その一方、間葉系幹細胞を試験管内で拍動する心筋細胞へ分化させることは可能であり、実験技術の向上とともにその分化効率も高くなっている。心筋・血管に関する例だけでなく、骨、軟骨、脂肪、骨格筋、神経の形成が間葉系細胞を移植することにより生体内で再生できたかどうか、ならびに臓器の機能が回復したかについて、検証する判断基準をそれぞれの組織・臓器、また疾病に関し、標準化する必要がある。

### Ⅲ-2-4-3. 間葉系幹細胞の同定 (3)

国立循環器病センター研究所再生医療部  
大西俊介、永谷憲歳

#### はじめに

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) は細胞移植による再生医療の新しい細胞ソースとして近年注目されつつあり、すでに虚血性心疾患や変形性関節症、歯周病などの治療や乳房再建などを目的とした臨床応用も一部で開始されている。本稿では MSC の同定および安全性について概説する。

#### MSC とは

MSC は骨髄や脂肪、その他の組織から分離される多分化能をもったプラスチック培養皿への接着細胞集団を指し、これまでに骨髄、脂肪、歯周靭帯、滑膜、臍帯血、胎盤などから同定されているが、最近の報告では脳、脾臓、肝臓、腎臓、肺、骨格筋、胸腺、膵臓といった生体のほとんど全ての組織から分離することができるとされている [1]。MSC は脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、腱細胞、筋細胞、内皮細胞、神経細胞などに分化可能である [2]。しかし、この細胞集団の中で厳密に "stemness" の定義を満たすものはほんの一部と考えられているため、International Society for Cellular Therapy (ISCT) がこの細胞集団を "multipotent mesenchymal stromal cells" と命名することを提案したが [3]、すでに MSC という呼び名が 20 年以上にわたって習慣的に使用されてきたこともあり、あまり浸透していない。"stemness" とは本来、in vivo で長期自己増殖能と多分化能を持った細胞と定義されるため、混乱を招かぬよう注意が必要である。

#### MSC の役割

MSC は組織の維持 (骨髄における造血細胞の支持など) のみならず、組織修復や組織再生にも重要な役割をはたす [4]。MSC を種々の心臓疾患モデルに投与した結果、血管新生や線維化の抑制、心筋細胞のアポトーシスの抑制、心筋細胞や血管内皮細胞への分化により心機能の改善が認められてい

る。また、MSC 自身が分化することのみならず、MSC から分泌される VEGF などの増殖因子の必要性も認識されている。さらに、G-CSF により MSC が骨髄から動員され、心筋梗塞後の心筋組織へのホーミングおよび心筋細胞への分化をも促進したとの報告もある [5]。このように、MSC は分化・動員・分泌といった多彩な作用により組織修復・組織再生に寄与していると考えられている。

#### 骨髄由来 MSC とその同定

上述の通り、MSC は多くの組織から分離することが可能であるが、最も良く研究されている骨髄の場合、穿刺吸引して得られた全骨髄液或いはそれを Ficoll による比重遠心法で分離した骨髄単核球をプラスチック培養皿に低密度で培養し、増殖してくる接着細胞がコロニーを形成すること (fibroblast colony-forming unit, CFU-F) で MSC と同定される [6]。しかし、骨髄由来の接着細胞はヘテロな細胞集団であり、CFU-F の中で MSC に由来するものは一部にすぎない。表面抗原の発現は由来組織にかかわらず概ね同一で、血球マーカー (CD45) や前駆細胞マーカー (CD34)、血管内皮マーカー (CD31) が陰性であり、主な陽性マーカーとして CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 などがあるが、MSC 特異的なマーカーは今のところ存在しない [7]。これまでプラスチック接着法よりも高純度に MSC を分離するために、CD45 のネガティブセレクションが行なわれたり、STRO-1 や CD49a, C15, CD271 (LNGFR) などが MSC 特異的なマーカーの候補として挙げられてきた (Table 1) [8-11]。これらのマーカーの中では CD271 が最も CFU-F 活性が高く、これを用いた分離キットもすでに市販されている。しかし、これらはいずれも血球細胞の一部や神経細胞、線維芽細胞も陽性であるなどの問題があり、また血球細胞の中にも CFU-F 活性を維持するものがあるため、CFU-F 活性をもって MSC のクローナリティーを示すことにはならない。最近、SSEA-4 が新たな MSC のマーカーとして有用であると報告され、実際骨髄の SSEA-4 陽性細胞から得られたクローンの 80% 近くが多分化能を有していた [12]。プラスチック接着により得られた MSC からのクローンでは多分化能を有するものが 20% 以下とされているため [13]、SSEA-4 は MSC を簡便に純化する方法として、今後プラスチック接着法にかわり広く用いられる可能性がある (Table 1)。

### 脂肪由来 MSC

MSC は骨髄由来のものが最も良く研究されているが、最近新しい細胞ソースとして脂肪由来 MSC も注目されている [14]。脂肪由来 MSC はこれまでに皮下脂肪をはじめ鼠径や膝蓋下などからも分離されており、脂肪吸引 1 ml あたり約 40 万個の細胞数を得ることができる [15-17]。脂肪由来 MSC は以前から preadipocyte と言われていた細胞と本質的に同一であり、骨髄由来 MSC と同様に多くの増殖因子およびその受容体、細胞接着、マトリックス蛋白やプロテアーゼなどを発現している。脂肪由来 MSC は骨髄由来 MSC と比べ、継代数の進んでいない時期では増殖能および分化能に差はないが、継代数の進んだ細胞では脂肪由来 MSC の方が増殖能に優れ、多分化能を維持している [18]。また骨髄由来 MSC は脂肪由来 MSC よりも骨や軟骨に分化しやすく、脂肪由来 MSC は骨髄由来 MSC よりも脂肪に分化しやすいとの報告があり、その原因として“幹細胞”自身の分化能の違いではなくそれぞれの系譜への前駆細胞数の違いが推察されている [19]。脂肪由来 MSC より得られたクローンの *in vitro* での多分化能の検討では、解析した 500 クローンのうち bipotent が 6%、tripotent が 1.4% であり、骨髄由来 MSC とほぼ同様の結果であった [6, 20]。

### その他の組織由来の MSC

MSC は骨髄や脂肪の他に歯周靭帯 [21]、歯髄 [22]、滑膜 [23]、骨膜 [24]、関節軟骨 [25]、筋 [26]、臍帯血 [27]、胎盤 [28]、末梢血 [29] などから分離されており、生体のほとんど全ての組織から分離可能であると考えられる [1]。しかし末梢血からは MSC が分離されたという報告とそうでなかったという報告があり [1, 29]、正常の生体において MSC が循環血中に存在しているのかについては一定の見解が得られていない。いずれの組織由来の MSC も脂肪細胞や骨芽細胞などへの分化能を有し、蛋白発現パターンも類似しているが、増殖能や分化能の程度は由来組織によって異なることが指摘されている。例えばラットの滑膜由来 MSC は骨髄由来 MSC よりもコロニー形成能が 100 倍高く、骨髄、脂肪、筋、骨膜由来の MSC よりも増殖能が高かった [30]。また軟骨や脂肪への分化能が最も高かった。一方、骨芽細胞への分化能については歯周靭帯や歯髄由来の MSC は骨髄由来 MSC よりも低く、骨膜や筋由来の MSC が最も高い骨分化能を有していた [21, 22, 30]。このように、MSC は所在する組織によって増殖能や分化能が異なり、組織

修復や組織再生における役割が由来組織によっておのずと違っていることが予想される。

### MSCの安全性の評価

MSCはその旺盛な増殖能のため、少量の組織から大量の細胞数を得ることが可能であるが、安全性において最も懸念されるのは腫瘍形成の可能性である。胚性幹細胞(ES細胞)は免疫不全マウスに移植すると奇形種を形成することが知られているが、MSCはES細胞と比較して増殖が遅く、テロメラーゼ活性がないことから腫瘍形成のリスクは低いと考えられている[31]。しかし最近、ヒト脂肪由来MSCが長期間培養後に形質転換をおこし骨肉腫を形成したと報告された[32]。一方でヒト骨髄由来MSCは全く形質転換を起こさなかったという報告もあり[33]、今後詳細な検討が必要である。次に問題となるのは培養に用いる血清である。現在までに報告されているMSCの臨床応用はすべて胎児ウシ血清(FCS)を用いていた[34]。FCSによる副作用の報告はないが、プリオンなどの感染の可能性が常につきまとう。また自己血清を用いる場合、培地に血清が10%以上含まれなければならないことを考えると、大量の採血が必要である[35]。同種ヒト血清はこの問題を解決するかもしれないが、MSCの増殖が抑制され細胞死が誘導されるという報告もある[36]。理想的には無血清培地でMSCを大量に増殖させることができれば良いが、現在までのところ胎児ウシ血清を凌駕する結果は得られていない。しかし最近、市販の無血清培地で胎児ウシ血清よりも増殖が良好で多分化能も維持されたという報告があり、興味深い[37]。その他、組織採取に伴う侵襲性や、培養する際の細菌感染などによる汚染の可能性が挙げられる。

表 細胞表面抗原による MSC の高純度分離法 (文献 8-11)

	CD45			CD271	
	negative	Stro-1	CD49a	(NGFR)	SSEA-4
骨髄での率(%)	39.0	15.0	5.4	2.3	3.0
CFU-F (個/10 <sup>5</sup> cells)	2	16	34	270	
多分化能をもつ クローン (%)					76.5

CFU-F: fibroblast colony-forming unit

細胞表面マーカーを用いた、磁気ビーズや FACS による MSC の高純度分離法の報告を示す。この中では CD271 (NGFR) が最も CFU-F 活性が高く、分離キットも市販されている。しかし、いずれも特異性に問題があり、また CFU-F 活性をもって MSC のクローナリティーを示すことにはならない。最近、SSEA-4 が新たな MSC のマーカーとして有用であると報告されており、骨髄の SSEA-4 陽性細胞から得られたクローンの 80% 近くが多分化能を有していた。

## 参考文献

- [1] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-13.
- [2] Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:39-49.
- [3] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
- [4] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-84.
- [5] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104:3581-7.
- [6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- [7] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-84.
- [8] Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78:55-62.
- [9] Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45<sup>med,low</sup> phenotype. *Br J Haematol* 2003;122:506-17.
- [10] Letchford J, Cardwell AM, Stewart K, Coogans KK, Cox JP, Lee M, et al. Isolation of C15: a novel antibody generated by phage display against mesenchymal stem cell-enriched fractions of adult human marrow. *J Immunol Methods* 2006;308:124-37.



- [11] Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30:783-91.
- [12] Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2006.
- [13] Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 7):1161-6.
- [14] Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 2006;13:77-81.
- [15] Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:1033-41; discussion 42-3.
- [16] Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2003;196:212.
- [17] Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;5:362-9.
- [18] Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006;99:1285-97.
- [19] Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hoi J, Hui P, Lee EH, et al. Identification of Common Pathways Mediating Differentiation of Bone Marrow and Adipose Tissues Derived Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) into Three Mesenchymal Lineages. *Stem Cells* 2006.
- [20] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95.
- [21] Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et

- al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.
- [22] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-30.
- [23] De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
- [24] Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res* 1990;223-32.
- [25] Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004;117:889-97.
- [26] Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001;68:245-53.
- [27] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.
- [28] Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004;22:649-58.
- [29] Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-88.
- [30] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2006.
- [31] Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 2003;349:267-74.
- [32] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation.

Cancer Res 2005;65:3035-9.

[33] Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006;24:1095-103.

[34] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 2006;24:1409-10.

[35] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 2004;32:1212-25.

[36] Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005;23:1357-66.

[37] Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejefeffe M, Massy M, Libertalis M, et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol* 2006;76:309-16.

### Ⅲ-2-5. 骨格筋芽細胞移植による心臓再生の現状と機序

大阪大学大学院医学系研究科心臓血管・呼吸器外科

澤 芳樹

はじめに

近年の心臓病に対する治療の革新的進歩にかかわらず、重症心不全に対する治療体系は確立されていないのが現状である。心不全に対する治療法として、 $\beta$ ブロッカーや ACE-inhibitor による内科治療が行われるが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、外科治療が行われている。しかしながら、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。心筋細胞は殆ど分裂しないため、不全心筋において障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とされてきたが、最近心筋幹細胞の存在が、報告され、循環器領域のトピックスとなっている。一方、再生治療として、心筋細胞等による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、本稿では重症心不全に対する再生治療について骨格筋芽細胞による治療を中心に報告する。

#### 1. 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 (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、Diactirne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等の発生原因かどうかもし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Menasche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 $800 \times 10^6$ の筋芽細胞を移植、低用量群（33例）： $400 \times 10^6$ を注入、プラセボ群（34例）に自己筋芽細胞を投与した。6ヵ月後の結果は、左室拡張終末期容積、左室収縮終末期容積は6ヵ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みられなかった。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、PhaseII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Diactirne社を買収したGeneVec社と、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年以上を経ていまだに厚生労働省の長期にわたる厳しい審査中である。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に骨髄細胞を併用する再生治療法を3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、この内容については次項で詳細に述べる。

## 2. 自己骨格筋芽細胞及び自己骨髄単核球細胞移植を併用した心筋再生治療

重症心筋梗塞等においては、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。前述の如く最近、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、不整脈等の副作用、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等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及び移植後の細胞の機能維持、即ち細胞外環境の整備が極めて重要であり、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、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、我々は骨格筋芽細胞及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、心機能及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。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(図2)。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られていない。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。

### 3. 自己筋芽細胞シートによる心筋再生治療

細胞治療において、局所注入という方法が簡便ですでに臨床応用が行われている。しかし、この方法は局所的な治療法にしか過ぎず、注射の際の細胞の損失が多い、などの問題点があった。そこで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今日の開発された、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た。そうすると、心筋壁厚の有意の改善と心機能の改善が見られた。当初、この機序として、筋芽細胞が増殖した結果、壁厚が厚くなったものと考えた。しかし、種々の実験の結果、筋芽細胞の有意の増殖は認められなかった。一方、このように筋芽細胞シートを移植した心筋で、HGF, VEGF などの増殖因子が増えていることがわかった。さらに、骨髄由来幹細胞に対するケモカインである SDF-1 とそのレセプターも高値であることがわかった。その結果として、これらの幹細胞のラットマウス類の抗体である cK i t および Sca-1 が陽性の幹細胞が多数集積していることがわかった。このように、筋芽細胞シートを移植することは、シートが心臓をカバーすることで、Gurdling effect とよばれる物理的効果より、増殖因子やケモカインが関与し幹細胞も誘導することによって炎症反応とも言うべき Self-renewing が心機能改善に関与するのではないかと考えられる。

一方、拡張型心筋症 (DCM) に対しても、治療の一選択肢として様々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、特に拡張型心筋症のような心臓全体の疾患に対する細胞移植は困難と考えられる。そこで、当科では、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 モデルにも応用し、DCM に対する新たな治療法となりうるかを検討した。(図 3) 27 週令 BIOT0-2 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 LVd 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た。組織所見でも有意な左室壁厚の増大が認められ (図 4), 多数の新生血管が認められた。免疫組織染色では、 $\alpha$ -DG と  $\alpha$ -,  $\beta$ -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や心筋症ハムスターの実験結果を元に、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、いよいよその成果により学内倫理委員会の承認を経て、臨床応用へと展開する予定である。

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思われる。

図 1

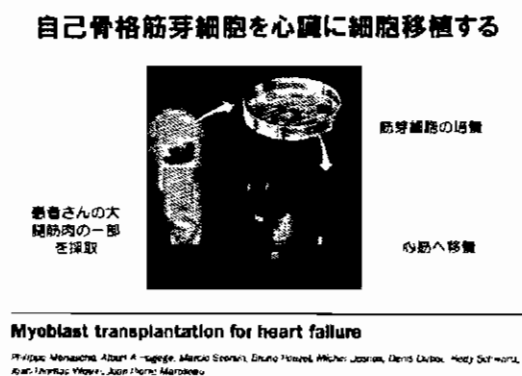


図 2

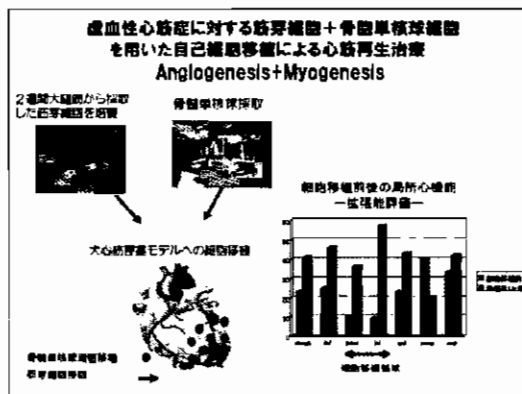


図 3

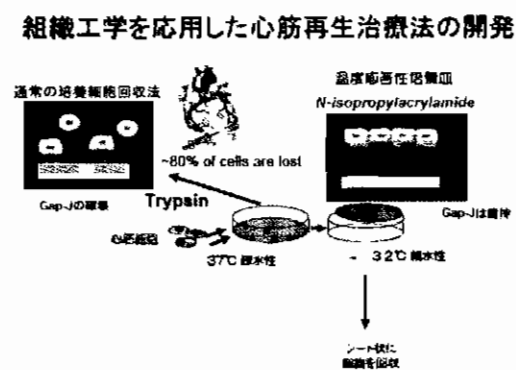


図 4





文献

1. 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(21) : 2556-2561
2. Funatsu T. Sawa Y. Ohtake S. takahashi T. Matsumiya G. Matsuura N. Nakamura T. Matsuda H. Therapeutic angiogenesis induced by myocardial injection of naked cDNA plasmid encoding hepatocyte growth factor in ischemic canine heart. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002 ; 124(6) : 1099-1105
3. Kondo H. Sawa Y. Fukushima N. Matsumiya G. Miyagawa S. Kitagawa-Sakakida S. Memon IA. Kawaguchi N. Matsuura N. Matsuda H. Re-organization 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. (in press)
4. 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)