

心筋再生の可能性

永井敏雄*, 松浦勝久*, 和田浩*
 小山知美*, 西淳一郎*, 小室一成*

はじめに

近年, 再生医療は医学専門誌のみならず, 一般向けメディアにも頻繁に取り上げられるようになり, 広く注目されている. これは, 胚性幹細胞 (ES 細胞) の樹立, 多機能体性幹細胞の発見に負うところが大きく, 再生医療は, 肝臓, 骨, 歯, 膵臓, 神経, 血管, 心臓など, 体のほとんどの臓器組織に応用されようとしている. わが国では特に, 高齢化社会の進行, 食生活, ライフスタイルの欧米化に伴い, 動脈硬化性疾患, 虚血性心疾患は (が) 増加傾向にあり, 心不全患者も増加すると考えられる. したがって, 従来の治療法の適応とならない重症心不全, 虚血性心疾患の新しい治療方法として再生医療が果たす役割は大きい. 心臓の再生療法の方法論として, 外部から心筋細胞あるいは心筋細胞への分化が約束付けられている前駆細胞を補充する細胞移植療法と, 内在する心筋あるいは心筋前駆細胞の動員, 増殖, 分化を誘導する心筋細胞分化誘導療法が考えられている (図1). 本稿では心筋再生に向けたこの2種類の治療法の現況と今後について概説する.

細胞移植

心臓に対する細胞移植の研究は1990年代初頭から線維芽細胞, 平滑筋細胞から心房腫瘍由来細胞株, 新生仔あるいは胎仔心筋細胞にいたるまで多くの細胞が研究されてきたが, 移植細胞の生着, 心機能改善効果, 移植用細胞の availability を考慮すると, 骨格筋芽細胞, ES 細胞, 体性幹細胞が有力である.

A. 自家骨格筋芽細胞移植

骨格筋には筋線維の基底膜下にサテライト細胞と呼ばれる骨格筋特異的幹細胞が存在し, 外傷により骨格筋が損傷すると活性化されて筋芽細胞に分化し, さらに筋芽細胞は融合して多核の骨格筋線維を形成する. 自家骨格筋芽細胞移植は Murry ら¹⁾, Taylor ら²⁾により動物実験が行われ, 移植細胞の生着とレシピエントの心臓の機能改善が報告された. 2001年, Menasche ら³⁾はヒト自家骨格筋移植を完全血行再建不可能かつ non viable な梗塞部位に世界で初めて移植した. 2003年の米国心臓会議で同グループは駆出率35%以下の陳旧性心筋梗塞患者10例に冠動脈バイパス術と自家骨格筋細胞移植を併用した第1相試験の結果, 持続性心室頻拍が4例に見られたが, 植え込み型除細動器をアミオダロンで対処可能であり, 移植後12週後のNYHA機能分類と駆出率の双方に改善が認められたと報告した. 我々のラット心筋凍結障害モデルによる実験でも, 自家骨格筋芽細胞移植後4週間後の左室リモデリングが抑制されていた.

B. 胚性幹細胞 (ES 細胞)

ES細胞は受精後3日目の blastocyst 期の内部細胞塊から得られる, 無限の増殖能力と全能性 (成体組織のすべての体性細胞に分化できる) を持つ細胞である. マウス ES細胞は, 浮遊状態で培養すると球状の細胞塊 (エンブリオボディ) を形成し, 高率に心筋細胞に分化して自立拍動を開始する. 心筋細胞へ分化誘導したマウス ES細胞は, マウスの心筋に移植すると宿主の心筋細胞の間に生着することが報告されている⁴⁾. 1998年ヒト ES細胞が樹立され⁵⁾, 2001年には心筋に分化することも明らかになった⁶⁾. このことは, ES細胞によるヒトの心臓再生治療の可能性を示唆している.

*千葉大学大学院循環病態医科学

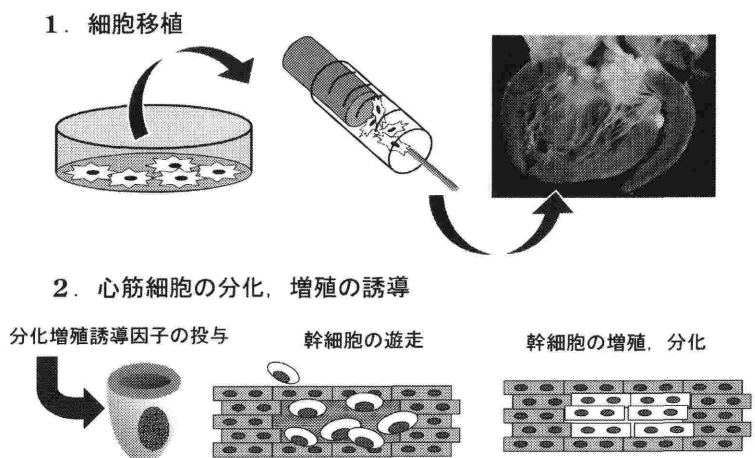


図1 近年注目されている心臓再生医療の方法—細胞移植治療と分化誘導療法—

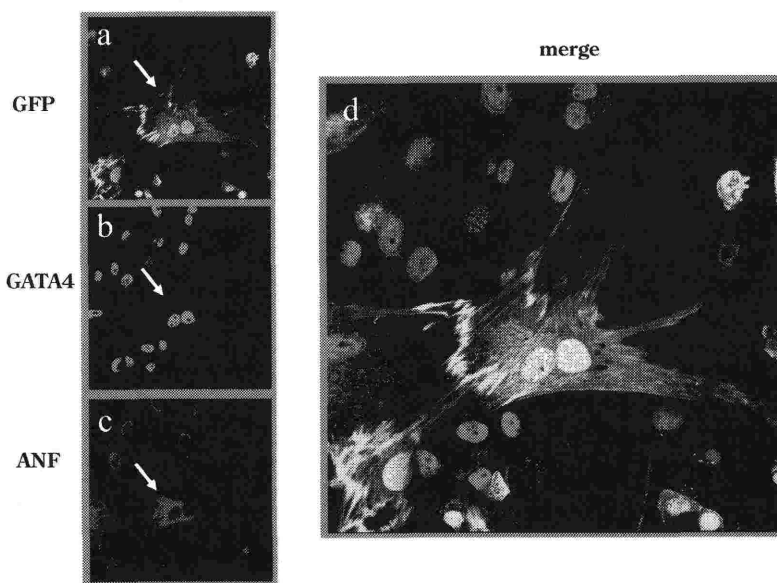


図2 骨格筋由来細胞は心筋細胞との共培養により, 心筋特異的蛋白を発現する
GFP 発現骨格筋由来細胞を新生仔ラット心筋細胞と共培養後, 免疫染色法により GATA4, ANF の発現を評価した. GFP 陽性骨格筋由来細胞(a 矢印)に GATA4(b 矢印), ANF(c 矢印)が発現している.

我々は, すでにサルの ES 細胞を心筋細胞に分化させることに成功しており, ヒトと同じ高等霊長類の ES 細胞を使用することにより, 臨床応用の前段階の研究, すなわち, 拒絶反応や異所性組織への分化の制御, 腫瘍あるいは不整脈源性の有無などの検討が可能であると考えている.

C. 体性幹細胞

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

であるが, その一部は成体の中樞神経, 造血器官, 肝臓, 皮膚, 骨格筋, 間葉系などに存在することが知られている. 我々は新生仔ラット心筋細胞と GFP 発現マウス由来骨格筋細胞を共培養すると, GFP 陽性骨格筋由来細胞が心筋転写因子 GATA4 や心房ナトリウム利尿性ペプチド(ANF)を発現することを報告した(図2). さらに, 心筋細胞に分化したこれらの骨格筋由来細胞は心筋細胞との接合部にカドヘリンやコネキシン 43 を発現して電氣的

機械的接合部を形成するとともに、骨格筋の twitch とは異なる持続時間が長い、規則正しい洞結節様の活動電位を示した。我々は、肝臓および皮膚由来の細胞を心筋細胞と共培養しても、骨格筋細胞と同様に心筋細胞に分化する細胞が存在することを確認した。これらの結果は、骨格筋、肝臓、皮膚に心筋細胞との共培養下で心筋に形質転換する幹細胞が存在することを示唆する。

近年、骨髄細胞や神経幹細胞を ES 細胞と共培養すると骨髄細胞や神経幹細胞が ES 細胞と細胞融合して、多能性を獲得すること、また、骨髄細胞を肝臓傷害を遺伝的に起こさせたモデルマウスに移植すると、骨髄細胞は肝細胞と細胞融合して肝細胞に分化増殖することが報告された^{7~10}。このことは、細胞が他の系譜の細胞の形質を獲得する機序として、transdifferentiation の他に細胞融合という機序が存在することを示唆する。我々も心筋細胞に生体色素染色あるいは LacZ 遺伝子を導入し、GFP 陽性骨格筋細胞と共培養することにより、一部の心筋化した骨格筋細胞は GFP と心筋細胞由来のマーカーを有することを確認した。このような心筋細胞と他の体性細胞との融合は心筋細胞を内皮細胞や線維芽細胞と共培養しても起こった。興味深いことに、融合細胞の一部では内皮細胞や線維芽細胞の形質より心筋細胞の形質が優位となり、最低7日間は心筋の形質を保った。心筋細胞は生後まもなく分裂能を失うとされる。我々は、心筋細胞が分裂能のある体性細胞との細胞融合を介して、分裂能を獲得するか検討した。その結果、少なくとも *in vitro* では心筋細胞が心筋線維芽細胞や内皮細胞と細胞融合して細胞周期の G₂, M 期のマーカーであるリン酸化ヒストンを発現することを確認した。

分化誘導療法

骨髄細胞は線維芽細胞、骨、軟骨、脂肪細胞、骨格筋、心筋細胞など胚葉を越えて様々な細胞に分化する。末梢血中に移植された骨髄細胞(造血幹細胞と骨髄間葉細胞を含む)は放射線などで傷害された骨髄やリンパ組織に向かって、血管内皮細胞を越えて類洞の中を移動する。さらに、骨髄細胞は骨格筋、中枢神経系細胞、心筋に到達し、それぞれの細胞に分化すると報告されている。我々も、

放射線照射したマウスに GFP マウスの骨髄細胞を移植し、さらに心筋梗塞を起こさせると、心筋梗塞部位に GFP 陽性の骨髄由来細胞が存在し、心筋収縮蛋白を発現していることを確認した。ここで注目すべきは、臓器傷害部位に幹細胞由来の分化した細胞が多く存在する点であり、傷害された臓器から発せられる何らかのシグナル(サイトカイン、成長因子等)を幹細胞が感知して標的臓器に遊走していることを示唆する。したがって、生体内に広く存在する幹細胞の動員、遊走を促進させる因子を解明できれば、細胞移植すること無く再生治療を行うことが可能である。Stem cell factor(SCF)と granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)は造血幹細胞を末梢血中に動員させることは良く知られている。Orlic, Anversa らは脾摘したマウスに5日間の SCF と G-CSF による前処置後に心筋梗塞を作成し、さらに3日間 SCF と G-CSF を投与して心機能、梗塞範囲、予後、梗塞部位の組織像を対照と比較した¹¹。その結果、SCF と G-CSF を投与したマウスでは、心機能、予後の改善、梗塞範囲の縮小を認めた。さらに、梗塞部位には血管内皮細胞、平滑筋細胞に加えて Ki67 および BrdUrd 陽性の心筋細胞が認められた¹¹。この報告では梗塞部位の細胞周期マーカー陽性の心筋細胞が、遊走した造血幹細胞が transdifferentiation したものか、先に述べた、未知の心筋幹細胞が分化したものかは明らかでない。最近、2つの異なるグループから女性のドナーから心臓移植を受けた男性患者の心臓の心筋、平滑筋、血管内皮細胞に Y 染色体を持つ細胞が存在することが報告された¹²⁾¹³⁾。このことは、本来 XX 染色体を持つ女性由来の移植心臓に男性レシピエント由来の幹細胞が遊走して心筋や血管に分化したことを示唆し、ヒトにおいても末梢血中を循環する幹細胞が臓器にホーミングして分化する機序が存在することを示唆している。我々はマウス心筋梗塞モデルに G-CSF あるいは G-CSF と SCF の両者を急性期に投与し、残存心筋を評価した。その結果、未投与対照群に比べて G-CSF あるいは G-CSF と SCF の両者を投与した群で残存心筋が有意に多いことを確認した(図3)。また、我々のブタ心筋梗塞モデルによる G-CSF の急性期投与と実験では、心筋梗塞後のリモデリングを抑制した。さらに、梗塞および境界領域での毛

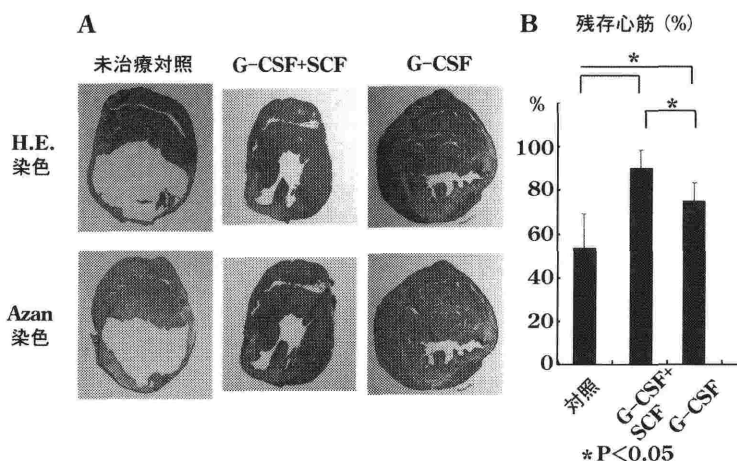


図3 G-CSFまたはSCFによる心筋梗塞急性期治療

マウスに心筋梗塞を作成直後より G-CSF 単独あるいは G-CSF と SCF の両者を 5 日間皮下注射し、14 日後に HE 染色および Azan 染色 (A) により、残存心筋を定量的に比較した (B)。G-CSF と SCF 併用群、G-CSF 単独は対照群と比較して有意に残存心筋量が多かった。また、G-CSF 単独と比較して G-CSF と SCF 併用群において残存心筋量が多く、相乗効果が認められた。

表1

1. 細胞移植

細胞	利点	問題点
骨格筋芽細胞	自己細胞増殖	非心筋細胞
胚性幹細胞	容易に増殖, 分化	拒絶, 腫瘍
体性幹細胞	自己細胞	増殖

2. 誘導, 分化促進

心臓幹細胞	性格?	
骨髄	分化, 遊走の機序	

細血管数は G-CSF 投与群において対照群より多く、境界領域での apoptosis 細胞数は G-CSF 投与群において対照群より少なかった。G-CSF による骨髄由来幹細胞の動員による心筋梗塞治療は、我々の施設において臨床治験が進行中で、今後の動向が注目されている。

おわりに

心筋再生医療において細胞移植療法と心筋細胞分化誘導療法はともに有望な方法である。胚性幹細胞は旺盛な増殖分化能を有するが、拒絶反応や倫理的な問題が存在する。一方、体性幹細胞は自家移植が可能であるが、in vitro で増殖させることが困難である。細胞分化誘導療法は比較的簡便な手法であるが、どれほどの骨髄細胞が動員され、心筋に分化するのか、血管新生に働くのか、さらに別の心筋保護機序が存在するのか、など分化遊

走の機序について解明されるべき点は多い。近年、Anversa らは心筋幹細胞の細胞株化に成功したと報告した¹⁴⁾。このような内因性の幹細胞に対する分化誘導法の確立のために、心筋幹細胞の心筋への分化の分子機序、特異的な細胞マーカーなどが明らかにされるべきであろう (表1)。

文 献

- 1) Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, et al: Skeletal myoblasts transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-23.
- 2) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al: Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-33.
- 3) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-80.
- 4) Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al: The in

- in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 27-45.
- 5) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
 - 6) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Segev H, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-14.
 - 7) Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-8.
 - 8) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-5.
 - 9) Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al: Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
 - 10) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW: Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-4.
 - 11) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-9.
 - 12) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al: Chimerism of the transplanted heart. *N Eng J Med* 2002; 346: 5-15.
 - 13) Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al: Evidence for cardiomyocytes repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human heart. *Circ Res* 2002; 90: 634-40.
 - 14) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-76.