

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

臨牀と研究 (2011.09) 88巻9号:1138～1143.

【心筋梗塞診療の最新情報】  
先進的医療  
細胞治療

竹原有史, 松原弘明

## 特集/心筋梗塞診療の最新情報

## 先進的医療

## 細胞治療

竹原有史\* 松原弘明\*\*

## はじめに

冠動脈疾患に対する細胞治療は、その対象が急性心筋梗塞(AMI)から予後不良な重症虚血性心筋症患者へと変遷している。心臓移植対象患者の原因疾患の中で最も多くを占めている虚血性心筋症は従来欧米諸国に多いとされ、事実、本邦における心臓移植患者はその8割以上が特発性心筋症患者である。しかし、本邦においても食習慣の欧米化に伴い虚血性心疾患患者が増加、これに伴い多枝疾患を基盤とする重症虚血性心筋症患者も増加しつつある。本項では現在世界で実施されている、虚血性心筋症患者に対する心筋再生医療について、細胞治療による現状を概説する。

## I. 急性心筋梗塞に対する細胞治療

急性心筋梗塞においては、急性期4~7日をピークに骨髄から末梢血に血管内皮前駆細胞が動員され、骨髄幹細胞もまた障害心筋梗塞部に遊走することが知られており、血管新生効果と心機能改善効果が期待されている。現在までに世界で実施された急性心筋梗塞患者に対する心筋再生医療は、急性心筋梗塞時に自家動員される骨髄細胞を体外で分離精製し梗塞巣に投与する手法である(表1)。骨髄細胞の体外分離はST上昇型急性心筋梗塞の発症後3~5日目に骨髄液を採取し、比重遠心分離もしくはアフエレーシスで単核球成分を抽出する。多くの試験

表1 急性心筋梗塞に対する細胞治療

Group	細胞種	治療方法	デザイン	結果
BOOST	骨髄単核球 2.5×10 <sup>9</sup> 個	冠動脈注	Randomized trial	LVEF 骨髄単核球6Mo後+6%改善
	プラセボ対照	PCI後 5日	骨髄単核球 vs プラセボ (n=60)	18Mo後では両群で有意差なし
REPAIR-AMI	骨髄単核球 2.4×10 <sup>8</sup> 個	冠動脈注	Randomized, double-blind trial	LVEF 4Mo 骨髄単核球群+5.5% placebo群+3.0% 両群で有意差なし
	プラセボ対照	PCI後 4~8日	骨髄単核球 vs プラセボ (n=204)	
TOPCARE-AMI	骨髄単核球 3.0×10 <sup>8</sup> 個	冠動脈注	Randomized, double-blind trial	LVEF 6Mo placebo+4.3% 骨髄単核球群+1.2%で効果認めず
	プラセボ対照	PCI後 4~8日	骨髄単核球 vs プラセボ (n=100)	
Tatsumi et al.	末梢血単核球 4.9×10 <sup>9</sup> 個	冠動脈注	open label, pilot trial	LVEF 6Mo placebo+7.3% 末梢血単核球群+13.4% 有意改善有り
	プラセボ対照	PCI後 5日	末梢血単核球 vs プラセボ (n=100)	

ではステント留置に成功した症例に対し3～5億個の単核球細胞を直接冠動脈投与し、6ヵ月後にLVEFの改善を検討しているが、早期の6ヵ月に単核球移植によるLVEF改善が示唆されたBOOST試験においてfollow upの18ヵ月後ではプラセボである冠動脈形成術群との間に有意差が見いだせなくなっており、その有効性は確かではない。その後実施された代表的な大規模臨床試験であるREPAIR-AMI試験、TOPCARE-AMI試験でも左心機能保持効果は細胞治療群で3%以下と明らかな有用性を認めなかった。従って、現在ではAMIへの骨髓単核球を使った血管新生治療の標準治療としての有効性は否定的とされている。

一方で症例数は限られるが辰巳らが行った末梢血単核球移植は、最も患者負担が少ない方法で自己単核球細胞を得る方法である。アフレーシス分離した50億個の単核球分画をST上昇型AMIの再還流療法成功5日目に直接冠動脈投与した結果、プラセボ投与群に比し約6%の心機能改善効果を認め、またAMI後の心機能低下例により高い効果を認めていることから、低心機能AMI患者に対する低侵襲の細胞治療として期待されている。

## II. 虚血性心筋症に対する細胞移植治療

現時点での心筋再生医療は基本的には細胞移植治療 (cell therapy) であり、失われた臓器機能を置換可能なまでに再生した臓器の作成には未だ至っていない。従って移植細胞が標的臓器に生着・分化して初めて組織再生効果を発揮する。当初、虚血臓器に移植細胞が集積する機序 (Homing) を利用して経静脈投与による細胞移植治療が試みられたが、ほとんどの細胞が肺・脾臓に取り込まれ標的臓器への集積は極僅かに留まることが実験的に証明されており、現在ではほとんどこの方法は採用されていない。

循環器治療では経皮的カテーテル治療が治療の主体をなすことから、他臓器と異なり心筋への細胞移植には主に3つの方法が採用されている。バルーンインフュージョンカテーテルを用いた冠動脈細胞移植法 (intracoronary injection: IC) と心筋局注針を用いた経皮経心内膜移植法 (endocardium intramyocardial injection: e-IM),

そしてCABG時の直視下心筋移植法 (direct intramyocardial injection: d-IM) である (表2)。細胞移植の侵襲性の観点ではIC法が最も低侵襲で手技的にも容易であるが、問題点も指摘されている。一つは細胞投与による冠動脈末梢塞栓 (no reflow 現象) の発生で、間葉系幹細胞など細胞径の比較的大きな細胞では特に問題となる。二つ目は組織生着性で移植細胞の90%以上は組織生着が困難である。Ang<sup>1)</sup>らはLVEF 35%以下の虚血性心筋症患者のCABG時に骨髓細胞 (単核球) の心機能改善効果をIC法とd-IM法において比較検討し、d-IM群ではプラセボ (CABG単独治療群) に比しLVEF 4.3%の改善を認めたが、IC群では細胞移植の効果が全く認められなかったとしている。

カテーテルを使用する細胞移植法としてはe-IM法も実施されている。初期のNOGAマッピングカテーテルは心筋電位と心筋 viability を同時に評価、移植適応部位心内腔側よりカテ先局注針によって細胞を移植する方法であった。しかし、装置及びカテーテルが高額であること、単針のため心室壁貫通による心タンポナーデ等の合併症発生も認められたため普及には至っていない。現在はスクリー型局注針等の新たなデバイスの開発が行われており、臨床試験が実施されている状況である。

d-IM法では虚血性心筋症の場合、CABGと併用する方法が一般的であるが、細胞治療に対するコントロールの設定が重要である。STICH試験においてLVEF<35%の虚血性心疾患患者に対するCABG術単独のLVEF改善効果は約4%と報告されており<sup>2)</sup>、これをコントロールとしてCABG術併用の細胞移植治療の有効性を評価する他ないのが現状である。しかしながら、筆者らの検討においても移植部位の虚血環境ではd-IM法であっても細胞生着率は15%以下で細胞単独移植では80%以上の移植細胞が失われるため、細胞生着率を向上させることが最も重要である。

その解決法として本邦では世界に先んじて組織工学を応用したハイブリット治療の開発が進められている。その一つは筆者らが採用しているゼラチンハイドロゲル等によるサイトカイン徐放システム (drug Delivery System: DDS)

表 2 虚血性心疾患に対する細胞移植治療

カテーテル治療		方 法	侵襲性	簡便性	細胞生着	予想される合併症
冠動脈投与 (IC)		梗塞責任冠動脈からの細胞注入	低	易	低	冠動脈塞栓
心筋投与 (e-IM)		心筋注入針による心内膜投与	中等度	中等度	低~中等度	心タンポナーデ
<b>開胸術による治療</b>						
単独治療						
心筋投与 (d-IM)		梗塞心筋へ直接筋注投与	高	中等度	低~中等度	一般的な開胸術と同様
組織工学との併用						
心筋投与 (d-IM) + DDS		梗塞心筋へ直接投与及びゼラチン等の徐放用材によるサイトカイン等の投与 (DDS)	高	中等度	高	一般的な開胸術と同様
細胞シート		温度感受性細胞シートの心表面への移植	高	難	中等度	一般的な開胸術と同様

IC=冠動脈細胞移植法 (intracoronary injection), e-IM=経皮経心内膜移植法 (endocardium intramyocardial Injection)  
d-IM=直視下心筋移植法 (direct intramyocardial injection), DDS=Drug Delivery System  
J Clin Invest, 115 (3) : 572-583, 2005 Mar. より一部改変

であり、もう一つは細胞シートによる心筋再生へのアプローチである。澤らは温度感応性マトリックスシートによる筋芽細胞シートを作製、人工心臓装着患者および虚血性心筋症を含む心筋症患者の障害組織に移植する方法で臨床応用を試みている。

### Ⅲ. 虚血性心筋症に対する心筋再生医療の現状

低左心機能の虚血性心筋症はCABG術後においても5年生存率が70%と予後不良であることはよく知られている。欧米諸国では心臓移植対象患者における原疾患の最も多くを占めており、心筋再生医療が真に必要とされる病態である。現在までに行われた、もしくは現在進行中の虚血性心筋症患者に対する心筋再生医療を示す(表3)。

最初に行われたのが急性心筋梗塞患者に対

する骨髄単核球・末梢血単核球(血管内皮前駆細胞)の細胞治療と同様の手法を用いたTOPCARE-CHD試験である<sup>3)</sup>。本試験は2種の細胞とプラセボにおける二重盲検クロスオーバー試験であるが、骨髄単核球移植群のみが6ヵ月後の左室駆出率(LVEF)で約3%の細胞移植効果を認め、クロスオーバーでも末梢血単核球に対して優位性を証明した。しかし本試験には患者選択基準に心機能に対する制限がなく、3%弱の細胞移植効果が重症心不全患者の予後、QOLに有効であるかは検証されていない。

IC法による不十分な移植効果を改善するため、骨髄由来細胞でもより幹細胞に近いCD133陽性骨髄細胞を用いてd-IM法での細胞移植試験がStammらによって行われている<sup>4)</sup>。対象は発症2週間以降のCABG適応心筋梗塞患者であるがTOPCARE-CHD試験と同様、この試験においても左心機能の制限がない。結果はCABG単

表 3 虚血性心筋症に対する心筋再生医療

	既に終了した臨床試験 (~2010)				現在進行中の臨床試験			
	試験名	左心機能	移植法	結果	試験名	左心機能	移植法	開始
骨髄細胞 単核球 CD133	TOPCARE- CHD	規定無し	IC	BMC+2.9%	PERFECT	<35%	d-IM+CABG	2009.7
	Stamm et al.	規定無し	d-IM+CABG	CD133+6.3%				
骨格筋芽細胞	MAGIC	<35%	d-IM+CABG	有意差無し	MARVEL	<35%	e-IM	2007.6
骨髄間葉系幹細胞			なし		PROMETHEUS	15~50%	d-IM+CABG	2007.11
					TAC-HFT	20~50%	e-IM	2008.8
心筋前駆・幹細胞			なし		CADUCEUS	25~45%	IC	2009.5
					SCIPIO	<40%	IC	2009.6
					ALCADIA	15~35%	d-IM+CABG +DDS	2009.9

独群に対し、細胞移植併用群において6.3%の細胞移植効果を認めているが、僧帽弁形成術併用を含む対象患者のLVEFは平均39%で心機能保持例も多く含まれていることから細胞治療の有効性評価は難しい。現在本試験は、第二相試験の結果を受け2009年から142名を対象の第三相試験 (PERFECT 試験) に移行している。対象患者の心機能はMRIにて評価されたLVEF 25~40%の患者で、弁形成術の必要な弁膜症合併患者は除外されている。

d-IM法では自己骨格筋由来のCD56陽性骨格筋芽細胞移植によるMAGIC試験が約90例の虚血性心筋症患者を対象に行われている<sup>5)</sup>。第一相試験で筋芽細胞移植に伴う心室性不整脈の発生が懸念され、埋め込み型除細動器が手術時全例に移植された。本試験は単独CABG患者をプラセボコントロールとした二重盲検試験で、発症4週以降経過したLVEF 35%以下の心筋梗塞患者を対象とし、左室形成術、僧帽弁形成術適応患者は除外されている。結果は残念ながら、LVEFの改善はプラセボ、細胞移植群(4億、8億)に有意差なく筋芽細胞移植の有効性は証明されなかった。しかし筋芽細胞自体を細胞製剤(Myocell)として開発している米国のバイオベンチャー企業が現在、心不全患者を対象に第二、三相試験を2007年から実施している(MARVEL試験)。

骨髄由来の間葉系幹細胞を移植細胞とする臨床試験も現在進行している。骨髄由来の間葉系幹細胞は代表的な組織幹細胞であり、脂肪・骨

芽細胞の他、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に分化する事が知られているが、限定的ながら心筋分化能を有する幹細胞としても研究されてきた<sup>6)</sup>。現在、LVEFが50%以下の虚血性心筋症に対して移植方法の異なる2つの臨床試験が終了しているがいずれも結果は未だ公開されていない。

2002年に発見された心筋由来前駆・幹細胞は心筋細胞置換の概念が提唱されて以来、自家移植による心筋再生医療としては現時点で実臨床応用可能な最も有効な細胞ソースとして注目が集まっている。現在までに報告されている心筋由来前駆・幹細胞は、1) c-kit陽性を特徴とするcardiac progenitor cell<sup>7)</sup>、2) cardiosphereを形成するcardiac progenitor/stem cell<sup>8)9)</sup>、の2種に分類される。これら心筋由来の前駆・幹細胞を用いた臨床試験が本邦と米国で現在進行中である。組織採取の方法は冠動脈バイパス術(CABG)時に右心耳から心筋組織を採取・細胞分離する方法と(SCIPIO試験<sup>7)</sup>)、カテーテルによる微小心筋生検組織より細胞単離・培養する方法(CADUCEUS試験<sup>8)</sup>、ALCADIA試験<sup>10)</sup>)に分かれている。中でもCADUCEUS試験は組織採取から細胞移植まで全てが経カテーテル的に実施されることで侵襲度は3つの試験では最も低い。また、本邦で行われているALCADIA試験は自家心筋幹細胞移植と線維芽細胞増殖因子(bFGF)の徐放投与によるハイブリッド治療であり他の2試験とは一線を画するものとなっている<sup>10)</sup>。

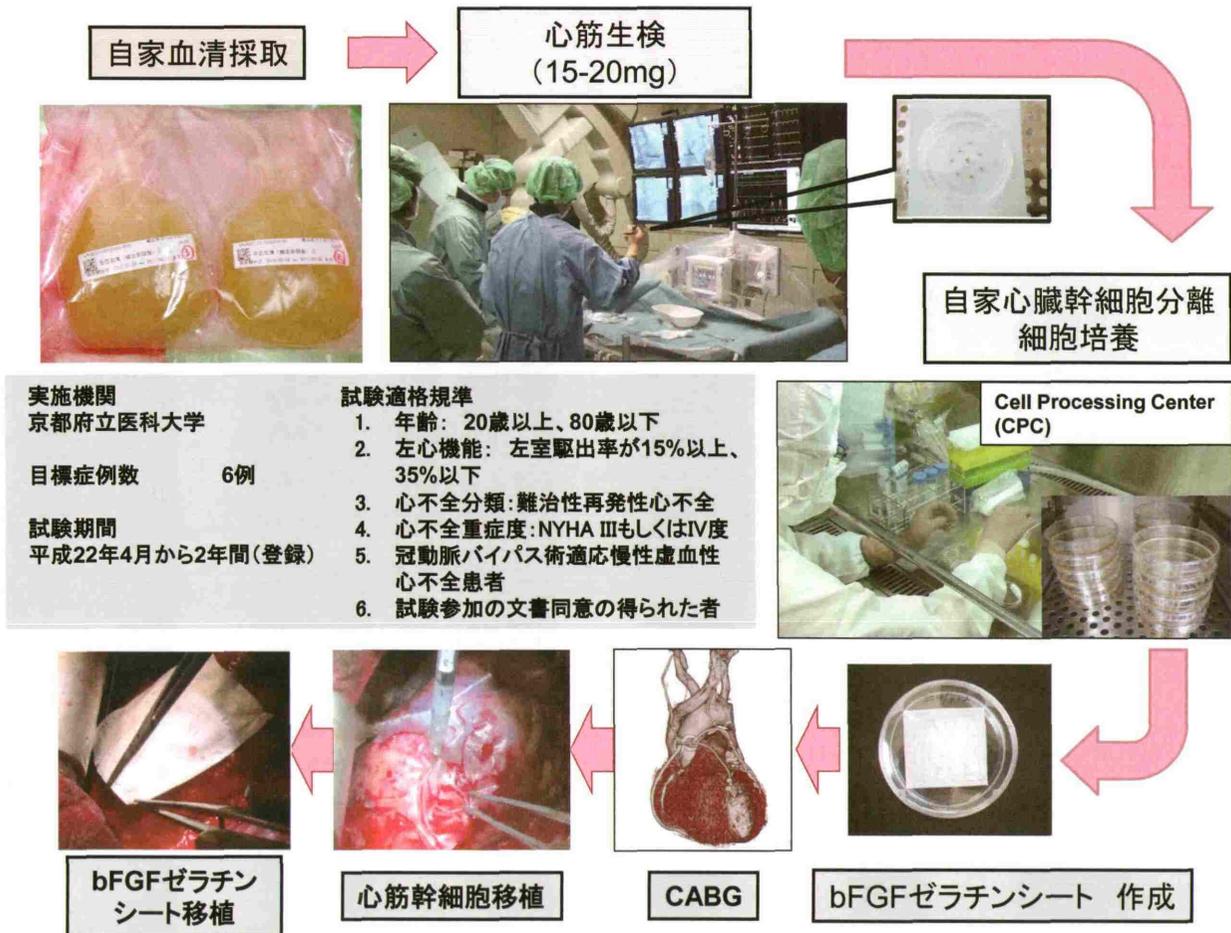


図 1 自家心臓幹細胞を用いた心臓再生医療のスキーム

#### IV. 自家心臓幹細胞と組織再生工学による心臓再生医療

筆者らは2006年にヒト心臓組織より cardio-sphere 由来 c-kit 陰性単一心臓幹細胞の樹立に成功した<sup>7)</sup>。この細胞は無血清の浮遊培養系で浮遊塊 (sphere) として単一細胞から自立増殖する性質を持ち、Oct 3/4, Nanog といった ES 細胞のマーカーとなる転写因子とともに初期心臓分化転写因子 NKX2.5, GATA4 をも高発現する体性幹細胞で、接着培養系に移行してなお、高い心臓分化能を有することが確認されている。しかし、細胞単独移植による組織生着能は従来の細胞と変わらずホスト心臓での生着率を飛躍的に向上させる技術開発が必須であった。筆者らは心臓幹細胞の特異的増殖因子でもある bFGF を、組織再生工学技術である生体吸収ゼラチンハイドロゲルシートを用いて心臓組織へ徐放投与することで40%ものホスト心臓での細

胞生着に成功した<sup>10)</sup>。現在、この手法を用いて2009年9月から自家ヒト心臓幹細胞移植臨床研究に着手している (ALCADIA 試験: NCT009 81006)。LVEF が15~35%の再発性心不全の既往を有する CABG 適応虚血性心臓症患者を対象に、心臓生検由来の微小心臓組織 (約18mg) から心臓幹細胞を単離、自家血清で体外培養後、CABG の際に bFGF 含有生体吸収ゼラチンハイドロゲルシートとともに、患者体重あたり  $5 \times 10^5$  個を約20箇所に分けて梗塞心臓に直視下心臓移植する治療である (図1)。本試験は安全性並びに臨床効果を評価する目的に症例数6例を目標として第一相試験を行っており、既に3例の患者に対し治療を成功させている。今後、安全性・有効性の確認にプラセボ対照による多施設共同第二相試験が予定されている。

お わ り に

急性心臓梗塞患者に対する細胞治療は細胞腫、

投与方法の問題等により期待に反してその有効性は明らかではなかった。心筋梗塞急性期の限られた状況では採取が容易な自家細胞を用いた侵襲性の低い治療に限られる。心筋分化能が高く、組織生着能の高い細胞製剤が開発されれば急性心筋梗塞患者に対する細胞治療も可能となるであろうが他家移植が前提であり拒絶その他解決すべき問題が数多い。虚血性心筋症患者に対する細胞治療では、現時点で既に心筋幹細胞や再生工学との併用等移植技術の改良により有効性の期待できる治療法が開発されつつあるが、コントロールの問題が有効性の客観的評価にあたっての最大の課題であり、比較対象臨床試験が必要である。本邦でも臓器移植法の改正以来心臓移植数が増加しているが、虚血性心筋症の増加とともに今後も移植登録患者の増加が予想されており、移植患者は長期にわたる待機期間と人工心臓装着等の補助循環装置を用いた生命維持が必要とされている。細胞移植治療と人工臓器との併用等をも視野に入れた集学的な心筋再生治療の開発も今後の課題である。

#### Reference

- 1) Ang, K. L., Galiñanes, M. et al.: Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone *Nature Clinical Prac*, 5(10): 663-670, 2008.
- 2) Jones, R. H. et al.: Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction, 360(17): 1705-1717, 2009.
- 3) Assmus, B. et al.: Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355: 1222-1232, 2006.
- 4) Stamm, C., Kleine, H. D., Steinhoff, G. et al.: Intramyocardial delivery of CD133<sup>+</sup> bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133(3): 717-725, 2007.
- 5) Menasche, P., Alfieri, O., Janssens, S. et al.: The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, 117: 1189-1200, 2008.
- 6) Silva, G. V., Perin, E. C. et al.: Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 111: 150-156, 2005.
- 7) Tang, X. L., Anversa, P., Bolli, R. et al.: Intracoronary Administration of Cardiac Progenitor Cells Alleviates Left Ventricular Dysfunction in Rats With a 30-Day-Old Infarction. *Circulation*, 121: 293-305, 2010.
- 8) Smith, R. R., Abraham, M. R., Marban, E. et al.: Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*, 115(7): 896-908, 2007.
- 9) Tateishi, K., Ashihara, E., Matsubara, H. et al.: Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. *J Cell Sci*, 120: 1791-1800, 2007.
- 10) Takehara, N., Matsubara, H., Oh, H. et al.: Controlled Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Human Cardiosphere-Derived Cell Engraftment to Enhance Cardiac Repair for Chronic Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*, 52(23): 1858-1865, 2008.