

AMCoR

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

心臓 (2010.12) 42巻12号:1575～1581.

【循環器疾患に対する再生医療】
心疾患に対する再生医療

竹原有史, 松原弘明

心疾患に対する再生医療

竹原有史¹⁾ 松原弘明²⁾

1) 旭川医科大学心血管再生・先端医療開発講座, 2) 京都府立医科大学大学院医学研究科循環器内科

● はじめに

心筋再生医療は、さまざまな先進的循環器治療を駆使してもなお、予後不良な重症心疾患患者に対する治療法として期待されている。近年では、心筋幹細胞やリプログラミング細胞の発見で、心筋分化能の極めて高い自己細胞を用いた心筋再生治療も可能になりつつある。本項では、現在までに行われたさまざまな心筋再生治療の大規模臨床試験の結果から、それぞれの病態に応じた治療法を検証し、新しい時代の心筋再生医療の展望を考えてみたい。

1. 薬物・遺伝子導入による心筋再生医療

現在までに心疾患に対して行われた、薬物および遺伝子導入による心筋再生医療を示す(表1)。薬物では、急性心筋梗塞(acute myocardial infarction; AMI)患者において骨髄から動員される血管内皮前駆細胞や骨髄幹細胞による血管新生と心機能改善効果を期待して、造血性サイトカイン(G-CSF)をAMI発症後に投与する臨床試験が実施されている。ステント内再狭窄率の懸念も残されているが、低用量、発症後早期の使用で、左室駆出分画率(left ventricular ejection fraction; LVEF)の改善が認められ、①発症後37時間以内の投与開始、②LVEFが50%以下の心機能障害を有する症例、にその使用が推奨されている¹⁾²⁾。慢性虚血性心疾患に対する有効性は確立していない。

細胞増殖因子を用いた再生医療は、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)と塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)が臨床試験に応用されている。VEGFは遺伝子導入の手法で冠動脈投与もしくは心筋投与

(NOGAシステムを用いた心内膜筋注)され、bFGFはリコンビナント蛋白の冠動脈投与が実施されているが、いずれも血管新生療法であり心筋自体を再生するものではない。VEGFはno optionの重症狭心症患者でアデノウイルス投与群にのみ狭心症状の改善を認めたが、プラスミド群では改善は認めていない³⁾。一方、bFGFは慢性虚血性心疾患に対し冠動脈投与で行われたが、LVEFの改善は認めず狭心症状の改善も一時的であった。bFGFは生体内代謝が極めて早く、冠動脈単回投与では効果は得られなかったと思われる。

2. 自家細胞を用いた心筋再生医療

自家細胞を用いた心筋再生医療は1990年代の後半から始まっている。現在までに実際に使用された、もしくは今後使用が期待されている自家細胞を示す(図1)。

① 急性心筋梗塞

急性心筋梗塞に対しては、骨髄細胞を発症後3~5日目に採取、単核球成分を発症後抽出した後に、再還流療法が成功した症例に対し3~5億個の細胞を冠動脈投与して行われるのが一般的である。単核球中の血管内皮前駆細胞などによる血管新生効果が期待されたが、代表的な臨床試験であるASTAMI試験とREPAIR-AMI試験では、いずれもLVEFの改善が3%以下と、現在のところAMIへの骨髄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である⁴⁾。その理由として細胞自体の有効性もさることながら、冠動脈投与による細胞生着率の低さがあげられている。ただ、すでに複数の企業が骨髄細胞を細胞製剤として開発しており、臨床治験を実施中である(表2)。

表 1 薬剤による心筋再生医療

Group	薬剤	治療方法	デザイン	結果
急性虚血性心疾患				
MAGIC cell trial	G-CSF G-CSF + PBSC	10 μ g/kg \times 4 日, 皮下注	randomized trial G-CSF + PBSC (n = 10) G-CSF (n = 10)	LVEF(SPECT) G-CSF + PBSC群で +6.4% 改善 G-CSF単独群 -1.4% 改善なし G-CSF投与70%に再狭窄
FIRSTLINE-AMI	G-CSF vs placebo	10 μ g/kg \times 6 日, 皮下注	randomized trial (n = 50)	LVEF(UCG) G-CSF群で 6%改善
GLEAM	G-CSF vs placebo	2.5 μ g/kg \times 5 日, 皮下注	randomized trial (n = 40)	LVEF(SPECT) G-CSF群で4.6%改善 2群で再狭窄率に有意差なし
KATrial	VEGF-Adenovirus (Adv) vs VEGF-plasmid (plas)	冠動脈注 Adenovirus (2×10^{10} PFU) plasmid (2,000 μ g DNA)	Randomized, double-blind Adv (n = 37), plas (n = 28) placebo (n = 38)	左心機能評価なし VEGF-Adv群でCCS classと血流の改善有り
Euroinject One trial	VEGF (A165) plasmid vs placebo	心筋注(NOGA) VEGF (A165) plasmid (500 μ g DNA)	Randomized, double-blind (n = 80)	左心機能評価なし 両群で血流改善なし
慢性虚血性心疾患				
Kastrup et al	G-CSF vs placebo	5 μ g/kg \times 6 日, 皮下注	Phase I pilot	LVEF placebo + 4%, G-CSF + 1% 有意差なし
Simons et al	recombinant bFGF vs placebo	冠動脈注 0, 0.3, 3, 30 μ g/kg bFGF	Randomized, double-blind placebo-controlled (n = 337)	LVEF no change CCS score 3 μ g群でのみ3Mo後に改善 6Moで有意差なし
Ripa RS et al	VEGF (A165) plasmid + G-CSF VEGF (A165) plasmid vs placebo	intracoronary injection (NOGA) VEGF (A165) plasmid (500 μ g DNA) G-CSF 10 μ g/kg \times 6 日, 皮下注	open label, pilot trial placebo (n = 16) VEGF (n = 16) VEGF + G-CSF (n = 16)	LVEF(MRI) 6Mo後, 3群で有意差なし CCS score, 血流とも治療群に改善なし

② 低心機能慢性虚血性心疾患

LVEF 35～40%以下の低心機能慢性虚血性心疾患に対する臨床試験が骨髄幹細胞と骨格筋芽細胞を用いて行われている。TOPCARE-CHD試験は、陳旧性心筋梗塞患者に対し骨髄単核球と末梢血単核球を梗塞責任冠動脈に直接注入して行われ、cross-over試験が実施された⁵⁾。結果、6カ月後のLVEFは骨髄単核球群で2.9%の改善を認め、プラセボ・末梢血単核球に対し有意な改善であったと結論づけている。ただ、3%弱のLVEFの改善が心不全を有する重症患者に対して、どの程度有効であるかは議論の分かれるところである。

冠動脈注による低い細胞生着率を克服するためには、直視下による心筋注を移植方法として選択することも必要である⁶⁾。この場合、外科的アプローチとして、冠動脈バイパス術(coronary artery bypass grafting; CABG)と直視下細胞移植を併用する治療法が一般的である。STICH試験においてLVEF <35%の虚血性心疾患患者に対するCABG単独のLVEF改善効果は約4%と報告されており⁷⁾、細胞移植治療併用ではこれを上回る治療効果が必要である。骨髄細胞を用いた試験では、CD133陽性の骨髄幹細胞をCABG術時に直視下心筋注にて投与しており⁸⁾、CABG単独群でLVEF 3.4%の改善に対し、細胞移植併用群では9.7%の改善を示しその有効性が示唆されているが心機能保持例、僧帽弁形成術併用症例も含まれており評価は難しい。これに対し、自己骨格筋から体外増幅培養した骨格筋芽細胞を用いたMAGIC試験では2つの用量設定(4億, 8億個)で行われたが、6カ月後のLVEFの改善は各群で有意差なく、細胞移植併用の有用性は認められなかった⁹⁾。組織採取も容易であり、サイトカイン療法としての効果が期待されたが、結果として移植後の生着性および心筋分化能を欠如した細胞であるという問題点が指摘されている。

③ 重症心不全

心臓移植のドナー不足により、移植適応患者には長期にわたる移植待機期間が必要で、その間にも人工心臓装着などの補助循環による生命維持が必要と

なることは少なくない。特に、年間心臓移植数が10例前後と極めて限られた現状の本邦では、移植までの治療すなわちbridge to transplantationとしての心臓再生医療にも高い期待が寄せられている。

海外での心臓移植状況を反映してか、人工心臓離脱を目的とした心筋再生医療の臨床試験は世界でも数少ない。Nasseriらは10例の人工心臓を装着された末期心不全患者に対して骨髄単核球細胞移植を行い、離脱できたのは1例のみで、2例が死亡、4例が離脱不能であったと報告しており、ほかの細胞種の使用などを検討すべきであるとしている¹⁰⁾。

これに対し、本邦では、細胞シートによる心筋再生のアプローチが試みられている。温度感応性マトリックスのシート上で細胞を培養、細胞間の相互接着作用でシート状となった細胞のみを障害組織に移植する方法で、すでにヒトへの臨床応用が試みられている。単層から重層へ、シート内細胞の生存に必要な血管誘導の技術、シート作成に必要な大量の高機能細胞の確保が課題であろう。重症心不全による人工心臓装着の移植待機患者にとり、新たな細胞移植による心筋再生治療の開発は急務である。

3. 心筋前駆・幹細胞を用いた心筋再生医療

成熟心筋細胞は分裂・増殖しないため、長い間、心臓は再生しない臓器と定義されてきた。しかし、最近の報告では、心筋細胞は生後から個体死を迎えるまで、年に1%の割合で古い細胞が新しい心筋細胞に置換されている可能性が示唆されている¹¹⁾。この新規心筋細胞の供給源として、自己心筋内ニッチに存在する心筋前駆・幹細胞が注目されている(図1)。

ヒト心筋内心筋前駆・幹細胞の心筋再生医療における臨床応用は2009年から始まり、米国で現在2件が進行中である。1つはヒトc-kit陽性心筋前駆細胞を用いた移植治療¹²⁾、もう1つはcardiosphereを形成し、c-kit陽性細胞を含む心筋前駆細胞群を用いた移植治療¹³⁾である(表2)。前者は、LVEF 40%以下の低心機能慢性虚血性心疾患患者のCABG術時に右心耳から心組織を採取、c-kit陽性心筋前駆細胞を単離し、

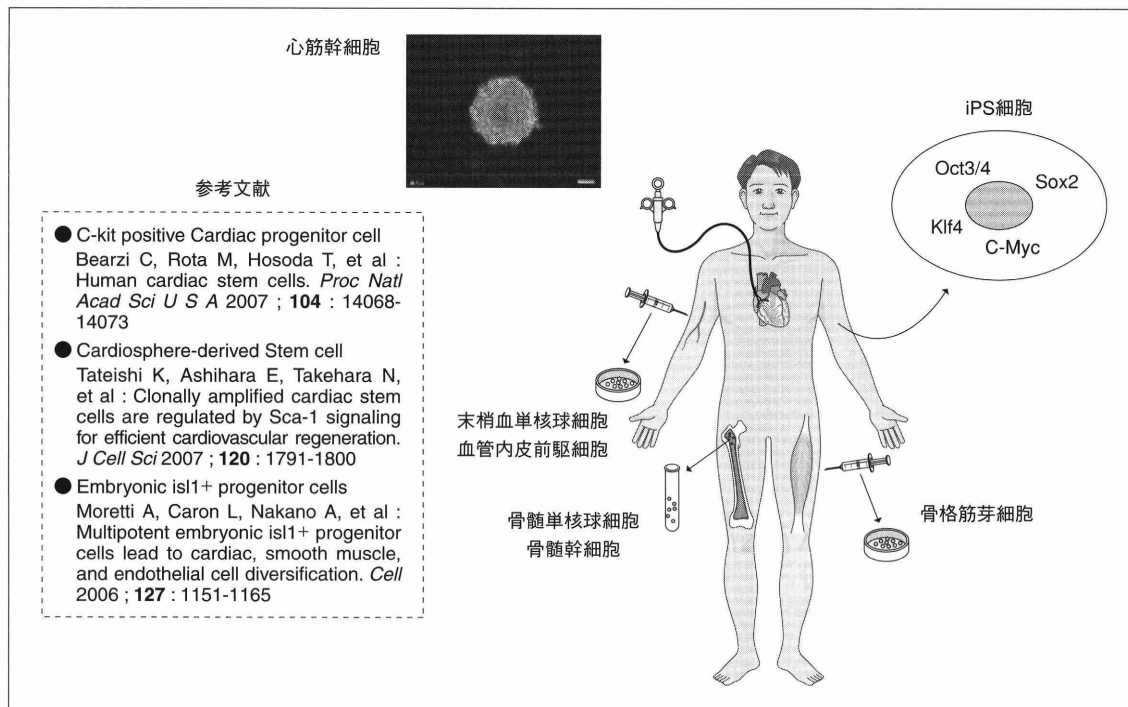


図 1
心筋再生医療に
用いられる自家
細胞

移植必要数まで体外増殖させた後にカテーテルによって経冠動脈的に移植するものである。これに対し後者は、陳旧性心筋梗塞患者を対象に心筋生検を行い、採取した約30mgの組織から explant 法で細胞群を培養し、2次的に cardiosphere を形成した細胞群を分離、増殖させる手法である。本試験では組織採取、細胞投与ともに経カテーテル的に行われ、開胸術を伴わない点で、最も患者侵襲が少ない。しかし、経冠動脈投与に関しては前者と同様、細胞の障害心筋への生着率の問題、no-reflow 現象などの懸念も残される。また、対象患者の心機能は左室駆出率が25～45%と幅広く、生命予後の異なる対照群が混在している点を考慮すると、その結果の解釈は一樣にならない可能性もあり、その結果が待たれるところである。

心臓由来心筋幹細胞を用いた臨床試験は本邦でも開始されている。著者らは、2006年にヒト心臓より cardiosphere 由来の c-kit 陰性単一細胞から拍動性心筋細胞に分化し得る心筋幹細胞のクローン化に成功した¹⁴⁾。さらに、心筋幹細胞移植の際に、細胞特異的増殖因子である bFGF を生体吸収ゼラチンハイド

ロゲルシートに含有させて併用移植した場合、細胞単独群では移植細胞が80%以上も失われているのに対し、bFGFシート併用移植群では生着率が2倍以上に改善、ホスト心筋への40%もの移植細胞の生着を可能とした¹⁵⁾。現在、この手法を用いて、2009年9月から重症虚血性心不全患者に対する自家ヒト心筋幹細胞移植臨床研究に着手している。対象は、心筋虚血によりLVEFが15～35%に低下した低心機能CABG適応患者で、治療効果に影響を与える僧帽弁形成術、心室切除術適応患者は除外されている。術前に心筋生検によって微小心筋組織(約15～18mg)を採取し、無菌化された治験薬GMP対応の細胞調整施設(cell processing center ; CPC)において心筋幹細胞を単離、約4～6週間かけて、自家血清およびbFGFを用いて体外増幅培養を行う。培養後、品質管理基準に適合した自家心筋幹細胞を、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 5×10^5 個を約20カ所に分けて梗塞心筋に移植するプロトコルである(図2)。

本試験第1例目の患者は、心不全を合併した陳旧

表 2 重症心不全への細胞移植治療

実施者	試験名	試験細胞	疾患・対象患者	左室 駆出率	治療法	試験 開始	n	試験 フェーズ
Osiris, Inc. Therapeutics	Prochymal® (Human Adult Stem Cells) Intravenous Infusion Following Acute Myocardial Infarction (AMI)	Prochymal® (骨髄幹細胞)	急性心筋梗塞	30~45%	静注	2009.3	220	II
Athersys, Inc.	Safety Study of AMI Multistem® to Treat Heart Attacks	MultiStem® (骨髄幹細胞)	急性心筋梗塞	30~45%	PCI後5日 冠動脈注	2008.3	28	I
Bioheart Inc.	To Assess Safety and Efficacy of Myoblast Implantation Into Myocardium Post Myocardial Infarction (MARVEL)	MyoCell® (筋芽細胞)	慢性心不全	< 35%	心筋注 (カテーテル)	2007.6	390	II and III
Petra Hennemann	Intramyocardial Transplantation of Bone Marrow Stem Cells in Addition to Coronary Artery Bypass Graft (CABG) Surgery (PERFECT)	CD133 + 骨髄単核球細胞	陳急性心筋梗塞	< 35%	直視下心筋注 + CABG	2009.7	142	III
Joshua M. Hare	Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS)	骨髄幹細胞	慢性虚血性 心不全	15~50%	直視下心筋注 + CABG	2007.11	45	I and II
E. Marban	cardiospherederived autologous stem cells to reverse ventricular dysfunction (CADUCEUS)	cardiosphere 由来心筋前駆細胞	陳旧性心筋梗塞	25~45%	冠動脈注	2009.5	30	I
R. Bolli	Myocardial Regeneration Using Cardiac Stem Cells	c-kit陽性 心筋前駆細胞	CABG後の 陳旧性心筋梗塞	< 40%	冠動脈注	2009.6	40	I
Matsubara H	AutoLogous human CArdic-Derived stem cell to treat Ischemic cardiomyopathy (ALCADIA)	cardiosphere 由来心筋幹細胞	慢性虚血性 心不全	15~35%	直視下心筋注 + CABG + bFGF gelatin sheet	2009.6	6	I

(Clinical Trial Gov.を元に著者作成)



図 2
自家心筋幹細胞を用いた心筋再生医療臨床試験

性心筋梗塞患者で広範な前壁梗塞により治療前の左室駆出率は26%まで低下していた(図 3)。右室中隔から 8 個, 計18mgの心筋組織を採取, CPCにおいて心筋幹細胞を単離・培養し, 39日間で1個の細胞から数万倍までの増幅に成功, 組織採取から40日目にCABG+心筋再生治療が行われた(図 3)。CABG後, 約 3 千万個の自家心筋幹細胞が直接心筋に移植され, bFGF含有ゼラチンハイドロゲルシートが心臓表面に縫着された。術中, 術後において合併症・副作用などは観察されず術後 4 週間で退院となった。術後 4 週目に行われた検査ではLVEFは41%まで回復し, 明らかな心機能の改善が認められた(図 3)。

本試験は, 安全性なら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 I 相pilot試験を行っている段階である。今後, 安全性・有効性の証明が重要であり, 冠動脈バイパス単独のプラセボ対照による多施設共同第 II 相試験が予定されている。

4. 今後の展望と課題

iPS細胞は, 4つの未分化維持転写因子を線維芽細胞に組み込むことで, 胚葉系譜を超えた多分化能を獲得した細胞である(図 1)¹⁶⁾。目的細胞への特異的分化

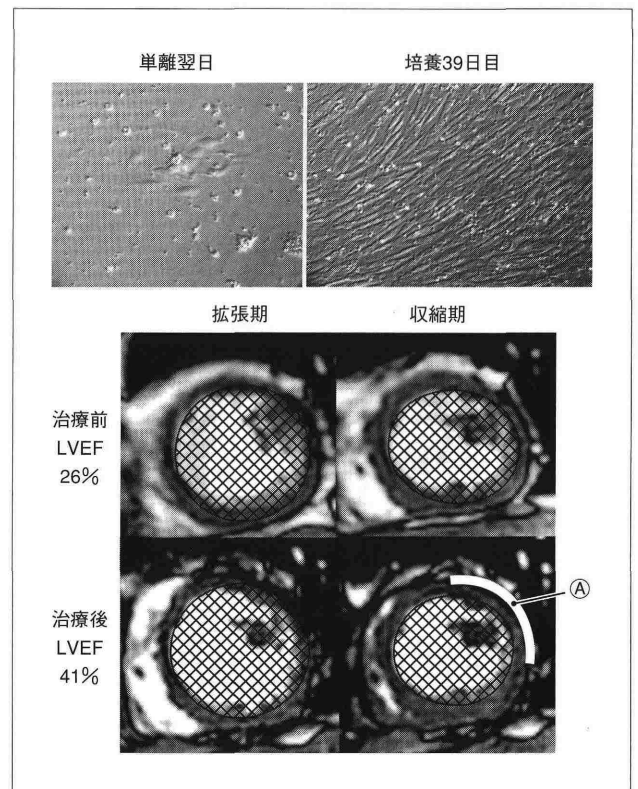


図 3 自己心臓由来心筋幹細胞移植による心機能改善
治療前に比べ, 治療後では心機能が改善, 収縮期の心内腔(⊗部分)が小さくなっているのがわかる。①は細胞移植を行った領域を示す。

誘導において、さまざまな組織細胞に分化するポテンシャルをもち、拍動する初期心筋細胞塊の作成にも成功している。最近では皮膚線維芽細胞由来iPS細胞からの心筋前駆細胞への分化¹⁷⁾、また、マウス心臓線維芽細胞にGATA4, Mef2C, Tbx5を組み込むことで、iPS細胞を介さずとも直接心筋細胞を作成可能との報告もあり¹⁸⁾、細胞のリプログラミング技術の発達により、その可能性はさらに広がりつつある。リプログラミング細胞は自己組織から作成されるため自家移植が可能で、ES細胞の抱える課題を克服したといえるが、長期にわたる作成期間、決して高くはない増殖能力、また分化抵抗性細胞による奇形腫形成など、心筋再生医療の臨床応用には、いまだ解決すべき課題も多い。

● まとめ

心筋再生医療においては、創成期のさまざまな細胞を用いた治療法から、現在では新たな細胞の開発だけでなく、患者の病態に応じた適切な再生治療の選択も求められている。また、心臓移植の普及が困難なわが国においては、人工臓器との併用なども視野に入れた心臓移植へのブリッジ、もしくは代替治療としての心筋再生治療の開発も必要である。近い将来、真に有効な心筋再生療法が確立されることに期待したい。

文 献

- 1) Suzuki K, Nagashima K, Arai M, et al : Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment at a low dose but for a long duration in patients with coronary heart disease. *Circ J* 2006 ; **70** : 430-437
- 2) Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK, et al : Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction : a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2008 ; **156** : 216-226
- 3) Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, et al : Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia : phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003 ; **107** : 2677-2683
- 4) Rosenzweig A : Cardiac cell therapy-mixed results from mixed cells. *N Engl J Med* 2006 ; **355** : 1274-1277
- 5) Assmus B, Honold J, Schächinger V, et al : Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006 ; **355** : 1222-1232
- 6) Ang KL, Chin D, Leyva F, et al : Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008 ; **5** : 663-670
- 7) Jones RH, Velazquez EJ, Michler RE, et al : Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction. *N Engl J Med* 2009 ; **360** : 1705-1717
- 8) Stamm C, Kleine HD, Choi YH, et al : Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease : safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007 ; **133** : 717-725
- 9) Menasché 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* 2008 ; **117** : 1189-1200
- 10) Nasser BA, Kukucka M, Dandel M, et al : Intramyocardial delivery of bone marrow mononuclear cells and mechanical assist device implantation in patients with end-stage cardiomyopathy. *Cell Transplant* 2007 ; **16** : 941-949
- 11) Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al : Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009 ; **324** : 98-102
- 12) Tang XL, Rokosh G, Sanganalath SK, et al : Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 2010 ; **121** : 293-305
- 13) Smith RR, Barile L, Cho HC, et al : Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007 ; **115** : 896-908
- 14) Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, et al : Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; **352** : 635-641
- 15) Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, 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* 2008 ; **52** : 1858-1865
- 16) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; **131** : 861-872
- 17) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009 ; **104** : e30-e41
- 18) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al : Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010 ; **142** : 375-386