

## 細胞移植を用いた虚血性心疾患への再生医療

松原 弘明

**要 旨：**骨髄細胞には血管内皮細胞，心筋細胞，平滑筋細胞などの心血管系構成細胞の幹細胞が含まれる。さらに，骨髄細胞自身が強力な血管新生因子であるVEGFやbFGFを分泌する。骨髄細胞から幹細胞を含む単核球分画を単離し，虚血組織（虚血下肢・心筋）に移植すると，毛細血管が増生し血行再建・機能改善が動物実験で見られた。ヒト虚血肢（ASO・バージャー病）に対して，自己骨髄単核球細胞を利用した血管新生療法を開始した。2000年6月より2002年2月1日までに，外科的・内科的治療によっても血行再建の認めない患者45人の虚血下肢に対して，自己骨髄細胞移植をrandomised, double-blindedにて実施した。31人で下肢の血圧が1カ月後には10mmHg以上上昇し，トレッドミル歩行距離は約2.9倍以上増加し，下肢の疼痛は45人中39人で消失した。下肢潰瘍は31人中27人で完全に治癒した（Lancet 360：427-435，2002）。骨髄単核球細胞には骨髄間葉系・造血系幹細胞から分化する心筋幹細胞も含まれる。家畜ブタを用いて慢性虚血心筋を作製し，NOGA三次元解析により冬眠虚血部位を同定しカテーテルを用いて細胞移植を行った。全例で心機能改善・虚血域の縮小が見られた。昨年12月19日に実施された難治性狭心症患者への開胸下移植では，狭心痛の著明改善（CCSクラスIVからI），心筋虚血部の壁運動改善（シンチ，エコー，NOGA解析），心機能改善（LVG：EF 43%から52%）が見られた。血管造影では側副血行の増生は認めなかった。不整脈の発現は1年間見られていない。（J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 173-178）

Key words: Stem cell, Angiogenesis, Regenerative medicine, Cardiomyogenesis

## はじめに

本邦における心血管系の再生医学の一つの起爆剤は，1999年の2月に脳死患者から行われた心臓・肝臓・腎臓の臓器移植に始まる。もう一つの大切な要因は，1998年の11月に米国ウイスコンシン大学がヒトES（胚幹）細胞を発表したことである。同時期に，末梢血には骨髄から動員された血管内皮前駆細胞（EPC）が存在すること<sup>1)</sup>，血管内皮増殖因子のvascular endothelial growth factor（VEGF），fibroblast growth factor（FGF），hepatic growth factor（HGF）のタンパク・遺伝子血管新生治療<sup>2)</sup>，心筋細胞が骨髄間葉系幹細胞<sup>3)</sup>だけでなく造血系幹細胞<sup>4-6)</sup>からも分化可能であることが最近報告された。私たちは，閉塞性動脈硬化やバージャー病など，虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が二重盲検試験で確認してきた<sup>7)</sup>。このように，心血管系での再生医学研究は，新世紀を迎え従来

の研究室レベルでの基礎研究が臨床応用へと融合した。

## 1. 血管新生とは

発生学や組織学の視点から，広義の血管新生は以下の2種類に大別される。一つは発生初期における内皮細胞の前駆細胞である血管芽細胞（angioblastまたはendothelial progenitor cell）からのまったく新しい脈管系の発生で，脈管形成（Vasculogenesis）と呼ばれるものであり，もう一つのタイプは，すでに組織に存在する血管系からの，内皮細胞増殖および遊走を基本とした新しい娘血管枝の形成で，狭義の血管新生（Angiogenesis）と呼ばれるものである。動脈形成（arteriogenesis）は，狭窄に陥り血流量が低下した血管が，shear stressや単球浸潤などにより内径が拡張し，血管構造が正常化して血流が回復することと定義されている。最近まで生後の血管新生は，すべてangiogenesisによるものであると考えられて

きたが、循環血液中を流れるEPCがこのvasculogenesisに関与し、虚血下肢や虚血心筋での側副血行路はvasculogenesisが初期反応であり、angiogenesisが遅れて参加すると認識されてきた。さらにこの血管新生には、VEGF、HGF、bFGF、Angiopoetin-1などの増殖因子・血管成熟促進因子が複雑に関与し、虚血組織において血管新生を誘導することが明らかになった。

## 2. 血管新生療法

前述の血管新生の機序を治療に用いようとした血管新生療法の概念は、古くから存在した。これまでに動物実験において、さまざまな成長因子が血管新生療法に試みられてきた。1992年Yanagisawa-Miwaら<sup>8)</sup>は、犬心筋梗塞モデルを作成し、冠動脈内にbFGF(basic fibroblast growth factor)を投与し、心筋梗塞の治療過程を改善し、心機能をも改善することを報告した。1994年Takeshitaらは、家兎片側下肢虚血モデルを作成し、腸骨動脈内にVEGF(vascular endothelial growth factor)を投与し、側副血行の発達を促進させることを報告した<sup>9)</sup>。近年、国内でも大阪大学の森下らは、上記と同様の兎片側下肢虚血モデルを作成し、腸骨動脈内にヒト型HGFを投与し、側副血行の有意な改善を報告した<sup>10)</sup>。また、欧米ではすでに臨床の場に移行しており、1994年ボストン、タフツ大学のIsnerらの研究グループは、VEGF165の遺伝子を含む発現プラスミドベクターを閉塞性動脈硬化症(ASO)患者の血管内にカテーテルを用いて投与し、有意な側副血行の改善が認められたことを報告した<sup>2)</sup>。この報告は、循環器領域における世界初のヒト遺伝子治療の症例報告となった。

### 3. 骨髄細胞移植によるASO・Burger病患者の虚血下肢への血管新生医療 (-TACT-1 Trial-Randomized, Double-Blind Control Study)

骨髄単核球には血管内皮系幹細胞が約0.01%存在し、内皮系幹細胞以外の造血系幹細胞はVEGF、Angiopoetin-1などの血管内皮増殖因子・血管成熟促進因子を合成・放出する(Fig. 1)。骨髄単核球の虚血下肢への筋肉内投与が有効な血流増加・血管新生増加を誘導することが、私たちや久留米大学の室原博士らによって動物実験で確認された(概念図, Fig. 2)<sup>1,12)</sup>。これらの基礎データをもとに倫理委員会の承認を受け、

ヒト虚血肢に対してVasculogenesisを利用した血管新生療法を、久留米大学・自治医科大学と共同で2000年1月より開始した(Japan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation (J-TACT))。これを受けて2000年6月より、現在まで外科的・内科的治療によっても下肢虚血改善の認めない患者45人の虚血下肢(Fontaine 3-4度)に対して、自己骨髄細胞移植を実施した。コントロール不良の糖尿病・網膜症、悪性腫瘍の合併症例は除外した。全身麻酔下で自家骨髄液約500ccを採取したのち、速やかに骨髄単核球を分離し、約10億個の細胞を虚血肢の筋肉内40カ所に分割注入した。第1相試験の結果(生食を対照利用, n=25)を受けて、第2相試験に必要な患者数を算定し、randomized, double-blind control(n=20)を開始した。第1相試験の対照として、対側の虚血肢に同時投与した末梢血単核球細胞(PB-MNC)や、生食では血流増加は見られなかった。第2相試験の対照としては、末梢血単核球を用いた。この第2相試験では、骨髄移植群ではABI(上肢・下肢血圧比)が0.97増加し、対照末梢血単核球群のABIが0.024より統計学的有意な差を認めた。下肢疼痛完全緩和が20人中18人で見られた。トレッドミル歩行距離は約2.6倍以上増加した。この治療成績は、Lancetに世界初の循環器病での細胞移植による血管新生治療として掲載され、注目されている<sup>9)</sup>。本邦でも20大学病院、3国立病院で同じプロトコルでno option虚血下肢を対象に実施されている。

### 4. 狭心症に対する血管新生タンパク・遺伝子や造血性サイトカイン(GM-CSF, G-CSF)を用いた血管新生療法

これまでに冠動脈結紮による虚血心筋動物モデルなどでは、VEGF、bFGFタンパクの冠動脈内投与は、側副血管形成、心収縮機能を改善させるとの多くの論文が発表された。その成績を基礎に、大規模数の冠動脈疾患患者での二重盲検試験が行われたが、VEGFタンパク<sup>13)</sup>、bFGFタンパク<sup>14)</sup>の、いずれも冠動脈内投与による血管再生治療は偽薬投与と比較して効果なしと結論づけられた。タフツ大学研究グループは、VEGF165の遺伝子を含む発現プラスミドベクターを、19人の冠動脈疾患患者にカテーテルを用いて二重盲検試験で経皮的に投与した。19人と少人数であったが、狭心痛の発現、運動機能などで有意な改善が見られた<sup>15)</sup>。このよ

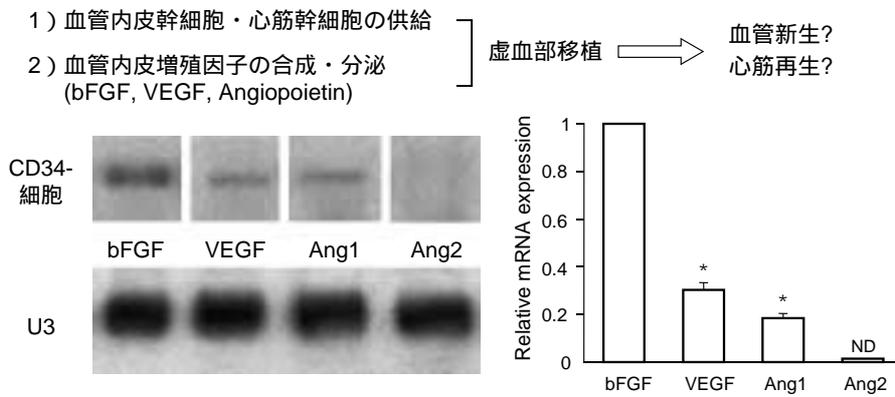


Figure 1 Conceptual scheme of therapeutic angiogenesis by bone marrow cell transplantation.

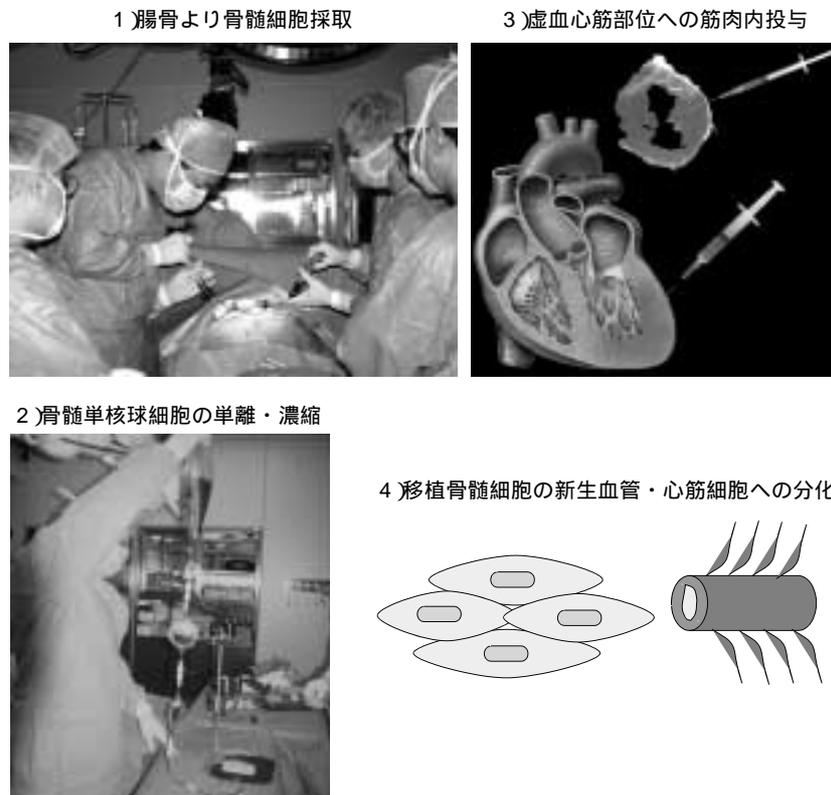


Figure 2 Aspiration and sorting of bone marrow cells.

うな遺伝子心筋内注入のように、緩やかに長期間にわたってのVEGFタンパク放出は有効かもしれない。しかしながら、同様のアデノbFGFの遺伝子心筋内注入は二重盲検試験で有効性がないと結論づけられている。

造血性サイトカインであるGM-CSFが、骨髓から血管内皮前駆細胞を動員させるとの基礎データが報告

されていた<sup>16)</sup>。このGM-CSFを二重盲検試験で21人の冠動脈疾患症例に投与し、collateral flowの有意な増加が観察され、その血管新生への効果が臨床でも実証された<sup>17)</sup>。G-CSFを用いた冠動脈疾患症例への臨床試験が、岐阜大学医学部のグループによって実施されている。その臨床成績が非常に期待される。

## 5. 狭心症に対する骨格筋芽細胞移植

骨格筋には多能性幹細胞が存在し、心筋内に移植されたときには心筋細胞への分化が可能である。摘出自己骨格筋を細切し、培養して増殖させた骨格筋芽細胞を、実際に心筋梗塞患者においてバイパス開胸手術時に運動機能のない梗塞心筋に移植された<sup>18)</sup>。10人の患者に移植した時点で重症不整脈が2人に出現し、このphase-I臨床研究は中止となった。心筋細胞への分化と同時に骨格筋細胞への分化が誘導され、骨格筋タイプのイオンチャンネルが発現して、リエントリー回路が形成され不整脈が誘発されたのではないかと筆者は考えている。しかし、その後米国では細胞調整法を変え、冠動脈バイパス形成術と併用する骨格筋芽細胞移植治療が行われている。20人を越す患者に投与されたが、不整脈の誘発は1人であったと報告され、今後の展開が期待される。

## 6. 大動物狭心症モデルに対する骨髄単核球細胞移植

骨髄単核球には血管内皮系幹細胞が約0.01%存在し、内皮系幹細胞以外の造血系幹細胞はVEGF, Angiopoetin-1などの血管内皮増殖因子・血管成熟促進因子を合成・放出する(Fig. 1)。最近、非常に未分化な造血系幹細胞(lin-, c-kit+, sca1+)が心筋幹細胞に分化するとの報告がなされた。血管内皮系幹細胞、心筋幹細胞に加えて血管内皮増殖因子を含む骨髄単核球移植が、血管再生に有効である可能性を大動物実験で私たちは検討した(概念図, Fig. 2)。冠動脈結紮によるブタ急性心筋梗塞モデルでは、自家骨髄単核球を梗塞周囲部位に開胸にて心外膜側より心筋内に移植した。4週間後には移植部血管数が3倍以上増加し、血管造影で明らかな側副血管が観察された。移植骨髄細胞は、新生血管の20~30%に内皮細胞として分化していた。骨や骨芽細胞の形成、6カ月週1回24時間Holter心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった<sup>19)</sup>。また、われわれの系では移植骨髄細胞の心筋細胞への分化は観察できず、一部はマクロファージへの分化が認められた。ヒトの狭心症は慢性虚血心であるため、大動物実験モデルとしては、アメリロイドコンストラクターでの冠動脈狭窄が必要である。また、カテーテルを介した経皮的注入が将来は好ましい。NOGA mappingシス

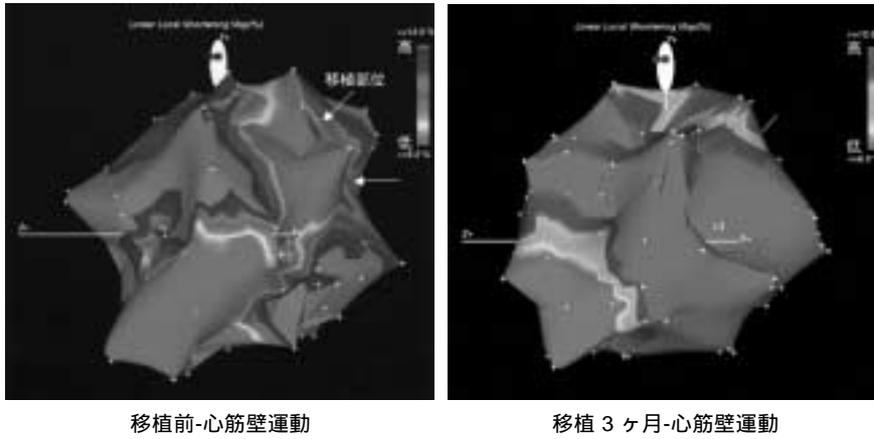
テムは虚血冬眠心筋を同定し、経カテーテル的に細胞移植が可能な画期的な装置である。電気的活動を示す部位と機械的運動を示す部位がリアルタイムに同定可能であり、不一致領域は冬眠心筋である。紫>青>黄が良好に活動・運動を示す部位であり、赤が活動・運動低下部位である。経カテーテル的に冬眠心筋に骨髄単核球を移植した部位は著しく運動低下部位が改善した(赤から紫)(Fig. 3)。生食を注入した冬眠心筋は改善ではなくさらなる悪化を示した(赤色部位の拡大)<sup>20)</sup>。

## 7. No-option重症狭心症(CCS class IV)に対する骨髄単核球移植治療

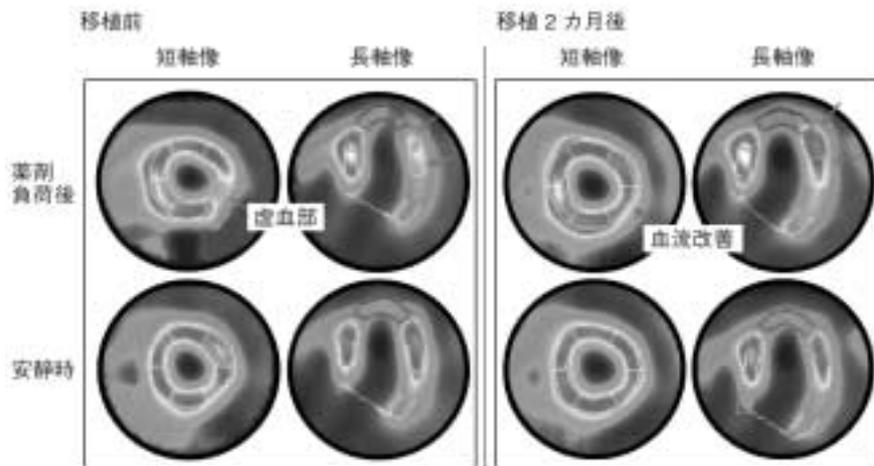
狭心症モデル大動物実験での成績に加えて、閉塞性動脈硬化やパージャーカー病など、虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が二重盲検試験で確認された<sup>7)</sup>ことより、関西医大倫理委員会において、狭心症患者への骨髄単核球細胞移植治療が許可された。64歳の男性で、心筋梗塞発症後8年を経過し、バイパス手術2回、冠動脈形成術5回受けている。CCS class IVの重症狭心症であり、安静時狭心痛が頻発し、1日15回程度のニトログリセリンスプレーを使用している。肋間小切開にてNOGA mappingシステムで同定された虚血冬眠心筋に心外膜側より、自家骨髄単核球を30カ所に移植した。14日以内に狭心痛は全く消失した。冬眠心筋部位での運動低下部位は改善した(赤から紫)。4カ月間、週1回24時間Holter心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった。CPK, Troponinで評価される心筋傷害は最小限であり、4日以内に正常域に復帰した。左心室収縮率は43%から52%へと増加した。心筋シンチでは負荷後再分布現象は消失し、運動対応能は3倍も亢進した(Fig. 4)。

## 今後の方向

-TACT Trial- Randomized, Double-Blind Control Studyは、世界で初めてその効果が確認された骨髄細胞移植による血管新生医療である。閉塞性動脈硬化やパージャーカー病など、虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が、二重盲検試験で確認されたことより、再建不可能な虚血下肢への細胞移植治療の安全性・有効性が示された。重症狭心症への骨髄単核球移植は1例ではあるが、有望な血行再建治療と期待される。虚血下肢に対する骨髄細胞移植症例で



**Figure 3** NOGA electromechanical mapping showing improvement of regional blood flow in patient with ischemic heart disease.



**Figure 4** SPECT scintigraphy showing improvement of regional blood flow in patient with ischemic heart disease.

は、可能性は非常に少ないが、移植細胞のマクロファージへの分化、血管平滑筋細胞への分化による冠動脈、頸動脈の動脈硬化病変の修飾は、移植後の血管造影で注意深くフォローがなされている。

#### 文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964-967.
- 2) Isner JM: Myocardial gene therapy. *Nature* 2002, **415**: 234-239.
- 3) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 697-705.
- 4) Tomita S, Li RK, Weisel RD et al: Autologous transplanta-

tion of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, 1999, **100**: 2471I-2561I.

- 5) Kobayashi T, Hamano K, Li TS et al: Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res*, 2000, **89**: 189-195.
- 6) Anversa P and Nadal-Ginard B: Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature*, 2002, **415**: 240-243.
- 7) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial *Lancet*, 2002, **360**: 427-435.
- 8) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F et al: Salvage of infarct myocardium by angiogenic action of basic fibroblast

- growth factor. *Science*, 1992, **257**: 1401-1403.
- 9) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E et al: Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 662-670.
- 10) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S et al: Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension*, 1999, **33**: 1379-1384.
- 11) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897-895.
- 12) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs *Circulation*, 2002, **106**: 2019-2025.
- 13) Henry TD, Mckendall GR, Azrin MA et al: VEGF in Ischemic for Vascular Angiogenesis (VIVA) Trial: one year follow up. *Circulation*, 2000, **102**: II-309.
- 14) Simon M, Annex BH, Laham RJ et al: Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2. Double-blind, Randomized, Controlled Clinical Trial *Circulation*, 2002, **105**: 788-793.
- 15) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC et al: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2002, **105**: 2012-2018.
- 16) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al: Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, **5**: 434-438.
- 17) Seiler C, Pohl T, Wustmann K et al: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, 2001, **104**: 2012-2017.
- 18) Menasch P, Hagge AA, Scorsin M et al: Myoblast transplantation for heart failure *Lancet*, 2001, **357**: 279-281.
- 19) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al: Implantation of Autologous Bone Marrow Cells into Ischemic Myocardium Enhances Collateral Perfusion and Regional Function via Side-Supply of Angioblasts, Angiogenic Ligands and Cytokines. *Circulation*, 2001, **104**: 1046-1052.
- 20) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue N et al: Improvement of Collateral Perfusion and Regional Function by Catheter-Based Implantation of Peripheral Blood Mononuclear Cells into Ischemic Hibernating Myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1804-1810.

## Cell Therapy for Ischemic Heart Disease

Hiroaki Matsubara

Department of Cardiology and Regenerative Vascular Medicine

**Key words:** Stem cell, Angiogenesis, Regenerative medicine, Cardiomyogenesis

Bone marrow cells contain progenitors for vascular endothelial cells (EC) and cardiomyocytes, and also release angiogenic factors (VEGF and bFGF). We have reported the availability of implantation of bone marrow mononuclear cells (BMC) for patients with ischemic limbs (*Lancet*, 2002; **360**: 427-435). Here, we discuss the effect of BMC on a pig model of chronic ischemic myocardium and one-year follow-up data for a no-option patient (CCS-class-IV angina) treated solely with BMC.

1) Animal study: Chronic ischemia was prepared by ameroid constrictor in domestic pigs. The NOGA electromechanical system was used to map hibernating regions and to inject BMC (30 sites, 10 cells). Increases in systolic function (EF: 33% to 52%) and regional blood flow (2.1-fold), and reductions in the ischemic area (29% to 8%) were observed. Capillary numbers were markedly increased (3.6-fold) with the incorporation of BMC, while trans-differentiation into cardiomyocytes was much less (~0.1% of viable myocytes). There was no bone formation (n=15).

2) Clinical Study: A 65-year-old man suffered from refractory angina (CCS class IV) in spite of bypass surgery (2 times) and angioplasty (5 times). 0.05 ml of BMC was injected into the hibernating foci identified by NOGA mapping (30 different sites, 3x10 cells). An increase in EF (42% to 54%), reduction in ischemic area (16.5% to 3.8%), and decrease in angina occurrence (Class IV to I) were observed 10 months after BMC. There was no substantial arrhythmia on 24-h Holter recordings performed monthly for 10 months. Blood supply to ischemic hibernating myocardium and myogenic cell grafting by cell therapy using BMC is a promising approach for the prevention of myocardial remodeling. (*J. Jpn. Coll. Angiol.*, 2003, **43**: 173-178)