

2. 冠動脈 心筋梗塞への再生医療 現状と展望

木股 正樹¹ 勝目あさ子¹ 辰巳 哲也¹ 松原 弘明^{1,2}

要 旨：心筋梗塞への再生医療として末梢血単核球あるいは骨髄単核球を利用した血管新生治療が臨床応用されている。急性心筋梗塞(AMI)の経皮的冠動脈インターベンション(PCI)治療後に骨髄単核球を冠動脈から注入する血管新生治療が欧米で2001年頃からスタートした。初期のオープンラベル臨床試験では半年後の心機能が10%前後改善し世界中の注目を浴びたが、最近の二重盲検試験では有意な改善がみられないとの報告もあり、適応症例の選択が必要になった。造血性サイトカインである顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)をAMI後に投与して、心機能を改善させる臨床試験も実施されている。一方、陳旧性心筋梗塞(OMI)への骨髄単核球の直接心筋移植は、有効例が多く報告され、開胸・カテーテルを利用した再生医療が期待されている。ヒト心筋からの多能性幹細胞も分離され低心機能の重症心筋梗塞への移植も間もなくである。心筋梗塞への再生医療の最新の臨床試験の成績を中心に述べ、将来展望についても触れてみたい。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 227-234)

Key words: regenerative medicine, angiogenesis, myocardial infarction

骨髄細胞による血管新生と心筋再生

骨髄細胞中には造血系や間葉系幹細胞が含まれる。血管内皮細胞は造血系・間葉系幹細胞の両細胞群から分化可能とされる。造血系・間葉系幹細胞を含む骨髄単核球移植は虚血下肢や心筋において血管新生を誘導するが、新生血管のすべてが移植骨髄細胞から発生した(vasculogenesis)ものではなく、移植細胞から分泌されるvascular endothelial growth factor(VEGF), basic fibroblast growth factor(bFGF)などの血管内皮増殖因子が血管新生(angiogenesis)に大きな役割を演じている。虚血下肢への骨髄単核球移植による血管新生細胞治療の有効性は国際的に承認され、本邦だけでなく世界中において実施されている¹⁾。

骨髄造血系幹細胞からの心筋細胞分化は現在では否定されている、稀に観察されたとしても既存心筋細胞との融合現象であろう。骨髄間葉系幹細胞にはmultipotent

adult progenitor cell(MAPC)と呼ばれる多能性幹細胞群が存在し心筋細胞に分化可能とされる。骨髄中に存在するとされるMAPCの存在数の低さを考えると、陳旧性心筋梗塞(OMI)や急性心筋梗塞(AMI)への骨髄単核球移植による心臓ポンプ機能の改善効果は心筋再生によるものとは考えにくく、移植細胞からの血管新生誘導因子や心筋保護因子の分泌などの関与と考えるのが正しいであろう。

急性心筋梗塞に対する 骨髄単核球を利用した血管新生治療

AMIの際には急性期4~7日目をピークとして骨髄から末梢血に血管内皮前駆細胞が動員されることや、幹細胞のhoming factorであるstromal cell-derived factor 1(SDF-1)が心筋に発現し、SDF-1を導入した線維芽細胞を移植しておくことと梗塞心に骨髄幹細胞のhomingが促進され、血管新生効果と心機能改善効果が増強されることが示されている^{2,3)}。

最近、ST上昇型AMIの経皮的冠動脈インターベンション
2007年4月18日受理

¹京都府立医科大学大学院医学研究科循環器内科学

²京都大学医学部探索医療センター「重症心不全への細胞移植プロジェクト」

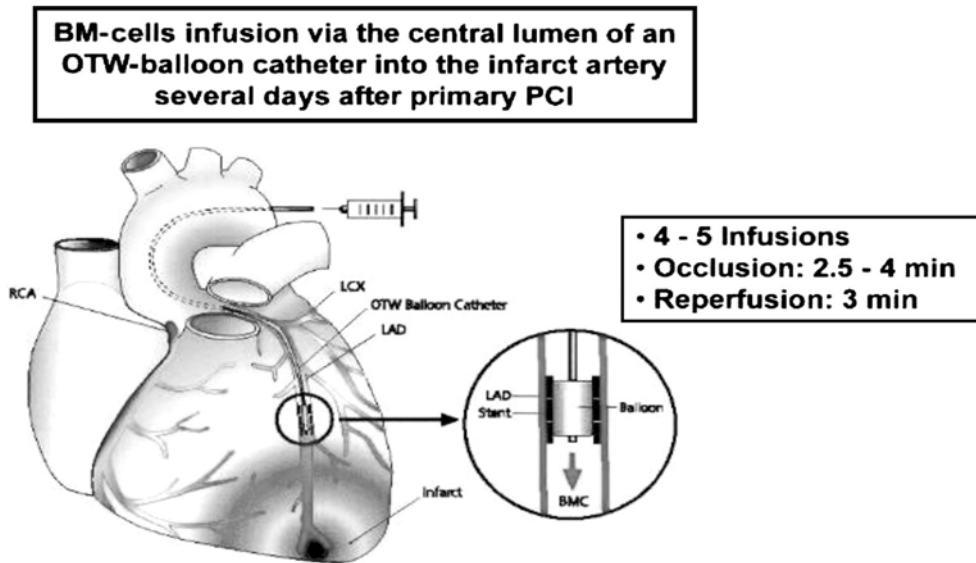


Figure 1 Intracoronary bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs, 500 million cells via inflated balloon catheter) infusion after successful PCI for ST elevation acute myocardial infarction.

Table 1 Clinical trials for acute MI by BM-MNCs transplantation

Study	Improved	Not improved	Design
Dusseldorf (Strauer et al)	Regional LV-function Infarct size	LVEDV	
Frankfurt (TOPCARE)	Regional LV-function Global EF Infarct size	LVEDV	
Hannover (BOOST-1)	Regional LV-function Global EF Infarct size	LVEDV	Randomized
Spain	Regional LV-function Global EF	LVEDV	
Belgium Janssens et al	Infarct size	Regional LV-function Global EF LVEDV	Randomized Double-blind
Frankfurt (REPAIR-AMI)	Global EF +2.5% (better Tx > 5 days, EF < 49%)	LVEDV	Randomized Double-blind
Norway (ASTAMI)		Global EF Infarct size LVEDV	Randomized

positive

negative

ション(PCI)再還流成功後に骨髄単核球細胞または末梢血単核球細胞を採取し、さらに梗塞責任冠動脈より低圧バルーン拡張カテーテル先端より注入移植することで心筋血流分布、冠予備能や左室駆出率(LVEF)が10%前後改善されるという興味ある結果が報告された(Fig. 1)⁴⁻⁶⁾。最初の報告では6カ月後の心臓収縮機能の有意な改善(10%前後, $p < 0.001$)が発表され⁴⁻⁶⁾、世界中の注目が集まり、症例数を増やして、randomized

研究が実施された(Table 1)。このうち、double-blind(骨髄採取を全例に実施し細胞・生食投与の二重盲検2アーム)はFrankfurt大学(ドイツ, REPAIR-AMI研究)⁷⁾、Leuven大学(ベルギー)⁸⁾の2つの臨床研究だけであるが、前者は対照群と比較して2.5%のLVEF増加(左室造影で評価)、後者は有意差なし(MRI評価)と報告している。ただし、REPAIR-AMIではPCI 5日以降の移植やLVEF < 49%の症例では7.5%とその効果は倍増してい



Figure 2 PB-MNCs (500 million cells) are infused via inflated balloon catheter, and cardiac function at 6 months is evaluated by LVG and echo cardiography.
 A, B: Collection of PB-MNCs by use of COBE spectra apheresis
 C, D: Intracoronary infusion of non-expanded PB-MNCs

ることが報告され、心機能低下例や心筋リモデリング開始時への移植が有効であることは興味深い。二重盲検ではないが、randomized trialデザインでなされたASTAMI研究では、有意差なし(MRI評価)と報告されている⁹⁾。骨髄単核球の調整方法がREPAIR-AMIとは異なり、回収細胞数や細胞の遊走能の違いが、臨床結果の違いを説明するとも言われている。

AMIに対するこれら3つの臨床試験の結果を受けて発表されたeditorialコメントには、再生医療におけるプラセボを用いた二重盲検試験の重要性がクローズアップされたとともに、AMIへの骨髄単核球を使った血管新生治療の有効性には否定的な意見が述べられている¹⁰⁾。しかしながら、筆者はPCI後の心機能低下症例への適用については、有用性が再検討されるべきではないかと考えている。広範囲梗塞などのショック症例はこれらの臨床試験では除かれている。まさに、これらの重症AMI症例が、再生医療の対象になるのではないかと考えている。これら3つの試験の結果を参考にして、患者病態を

考慮したAMIに対する骨髄単核球を使った新たな臨床試験が欧州を中心に進んでいる(BOOST-2 Trial)。

急性心筋梗塞に対する 末梢血単核球を利用した血管新生治療

AMIの際には急性期4~7日目をピークとして骨髄から末梢血に血管内皮前駆細胞が動員されることが室原博士のグループから報告された²⁾。私達はブタの慢性狭心症モデルに末梢血由来単核球をカテーテルで心内膜側から心筋内移植すると局所血流が改善するとともに、低下した心筋壁運動が改善することを報告した¹¹⁾。

これらの報告をもとに、私達は左前下行枝(LAD)に局限したST上昇型AMIのPCI再還流成功後に、末梢血由来単核球を責任冠動脈から注入する血管新生の臨床研究を奈良県立医科大学との共同研究にて2004年2月より開始した(Fig. 2)。細胞移植時期はAMI後3日以内であるが、非細胞治療群(4.5%LVEF改善)に比較して、末梢血単核球の注入群では12%ものLVEFの有意な改善が

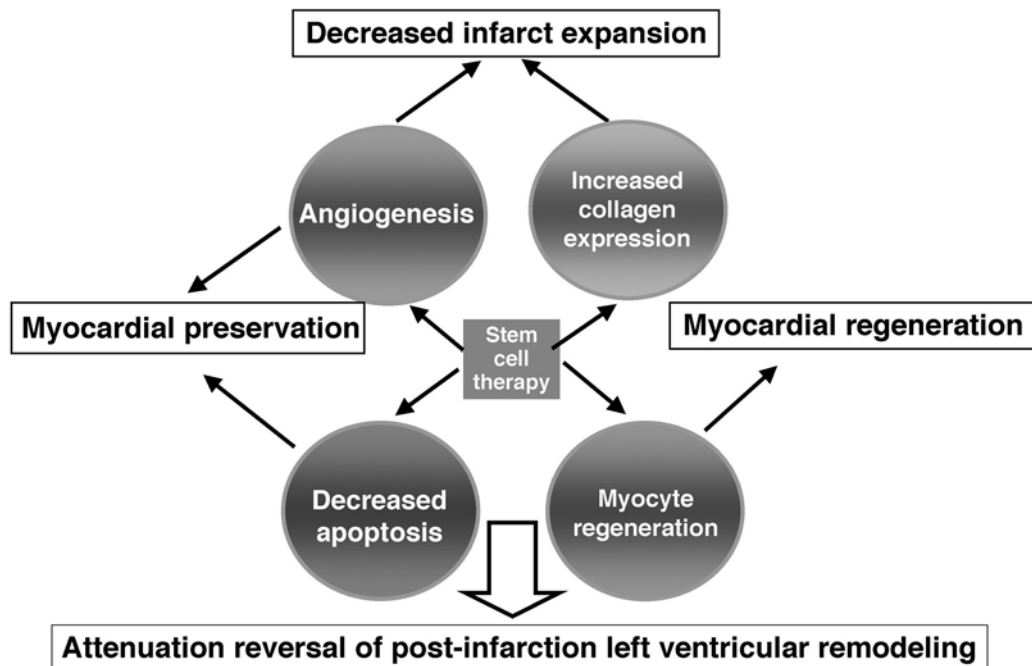


Figure 3 Suggested mechanisms responsible for improvement of cardiac function after BM-MNCs infusion.

みられている。REPAIR-AMI試験と同様に、移植前の心機能の悪い症例の方が改善度が高く、適用症例の選択が必要と考えられる。

PCIにて閉塞部再疎通後のAMIに対して骨髄や末梢血単核球の移植を行うことで心機能が良くなるメカニズムとしては、移植細胞から放出されるVEGF, FGF, insulin-like growth factor(IGF), platelet-derived growth factor(PDGF)などの因子(それ以外の未知因子?)により、虚血心筋部位での血管新生促進や虚血心筋細胞への抗アポトーシス効果が生じる結果、心筋の保護が促されたり、血管新生や線維芽細胞からのコラーゲン産生が梗塞巣のexpansionを抑制することで、梗塞心のリモデリングが抑制され心機能が改善する可能性が考えられている¹²(Fig. 3)。移植骨髄細胞からの心筋再生の可能性についてはいまだ明らかではないが、骨髄間葉系幹細胞からのtrans-differentiationやfusionの問題とともに今後解明されなければならない課題が残っているといえる。

陳旧性心筋梗塞に対する骨髄細胞移植治療

ブタ動物を用いた基礎的研究に基づき¹³⁾、私達はこ

れまでに、本邦において4例の重症狭心症の患者に外科バイパスと併用しない虚血冬眠心筋への骨髄細胞移植のみの治療を行った。提示する症例は64歳の男性で、心筋梗塞発症後8年を経過し、バイパス手術を2回、冠動脈形成術を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箇所に移植した。骨髄単核球を移植した部位は壁運動が著しく改善し、14日以内に狭心痛は完全に消失した。4カ月間、週1回24時間Holter心電図をフォローしたが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。LVEF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)。その他の症例も胸痛の消失、心機能の改善がみられている。特異的な副作用は出現していない。

これまでに報告された虚血性心臓病に対する細胞移植再生医療をTable 2に示す。Stammらは心筋梗塞発症

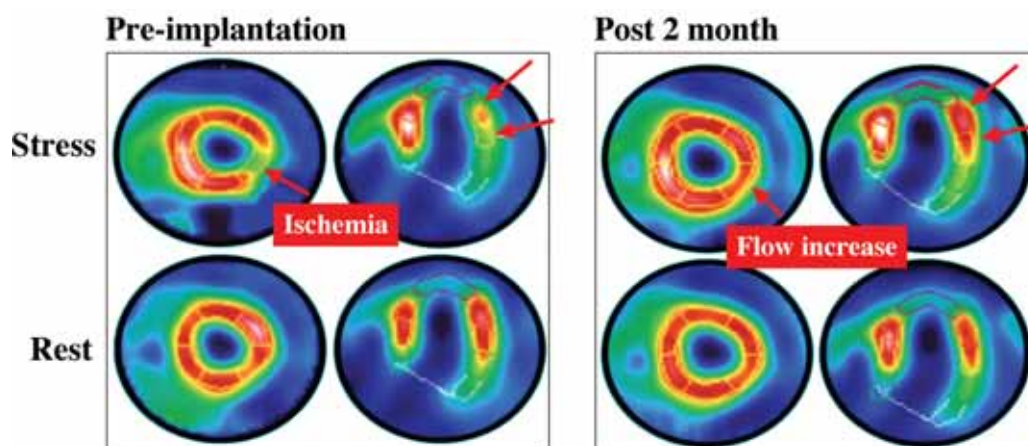


Figure 4 Evaluation of cardiac regional flow by SPECT-sestamibi.

Table 2 Clinical trials for old MI by BM-MNCs transplantation

Authors	Method	Implanted cell	Diseases	Implanted date after PCI	Result	References
Strauer BE et al	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	5–9 days	Improvement of coronary flow and cardiac function	Circulation 2002; 106: 1913
Assmus B et al	Intracoronary transplantation	BMCs CPCs	AMI	4.3 days	Improvement of coronary flow and cardiac function	Circulation 2002; 106: 3009
Perin EC et al	Catheter (NOGA)-based transplantation	BMCs	ICM	-	Improvement of coronary flow and cardiac function	Circulation 2003; 107: 2294
Stamm C et al	Transplantation with CABG	BMCs	MI	10 days–3 months	Improvement of coronary flow and cardiac function	Lancet 2003; 361: 45
Tse HF et al	Catheter (NOGA)-based transplantation	BMCs	AP OMI	-	Improvement of coronary flow and cardiac function	Lancet 2003; 361: 47
Kang HJ et al	Intracoronary transplantation	Peripheral blood stem cells mobilized with G-CSF	AMI OMI	Post 6 days	Improvement of coronary flow and cardiac function	Lancet 2004; 363: 751
Wollert KC et al	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	4.8 days	Improvement of cardiac function	Lancet 2004; 364: 141

後 3 カ月以内の 6 人の患者に他の領域へのバイパス手術と併用して 1.5×10^6 個の AC133⁺ 自家骨髄単核球細胞を梗塞境界領域に移植し、心筋血流分布とともに LVEF による心機能の改善がみられたことを報告した¹⁴⁾。また、

Tse らは 8 人の狭心症患者に NOGA mapping システムを用いて経カテーテル的に自家骨髄単核球細胞を移植し、私達と同様に狭心痛の軽減、MRI で評価した心筋血流分布や局所壁運動の改善を報告している¹⁵⁾。米国

Table 3 Clinical trials for acute MI by G-CSF

AMI Study	Improved	Not improved	MACE	Design
Germany, Rostock (FIRSTLINE-AMI)	Global EF +6% LVEDD (n = 25) Segmental wall thickening		No	Randomized Double-blind
Germany, Munchen (REVIVAL 2)		Global EF Infarct size LVEDV (n = 56)	No	Randomized Double-blind
Denmark (STEMMI)		EF, Systolic thickening	No	Randomized Double-blind
Takano, Komuro et al	Global EF +4.6% (n = 18)	LVEDV		Randomized

OMI Study	Improved	MACE	Design
NIH, USA (Hill et al, G-CSF 10 µg, 5 days)		MI 8 h after G-CSF (n = 16) MI death at Day 17	
Bern, Switzerland (Zbinden et al, GM-CSF 10 µg, 14 days)	Collateral flow index	2 pts ACS (n = 7)	Randomized Double-blind

では同じく経カテーテル的に重症の虚血性心不全患者 21人に自家骨髄単核球を移植する治療が行われ、安全性とともに虚血部血流増大や心機能の改善が認められている¹⁶⁾。この成績をベースに米国FDAは慢性虚血性心筋症の患者への自家骨髄単核球の心筋内移植治療の臨床応用を2004年許可した。現在、NOGAナビゲーションのもとでのMYOSTARカテーテルを用いた二重盲検臨床試験が米国で実施されている。

造血性サイトカイン(G-CSF, GM-CSF)による血管新生治療

Orlicらによる造血性幹細胞(Lin⁻/c-kit⁺)の梗塞心筋内移植が豊富な心筋再生現象を誘導するとの報告の後、granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)+stem cell factor(SCF)投与による循環血中の造血性幹細胞増加も心筋再生に有効であるとの動物実験結果をもとに、慢性冠動脈疾患患者に対して臨床試験が実施された(Table 3)。NIHグループはG-CSF(10µg/kg/dayを5日間)投与を16人に対して実施した。wall motion score, regional perfusion, exercise durationに有意な改善はみられず、CRPIは上昇し、G-CSF投与8時間後にMI発症が1人、17日後にMIを発症し死亡例が1例出現したために、中止された¹⁷⁾。スイスのグループはgranulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) 10µg/kg/dayを14日間をrandomized, double-blindで7人ずつ計14人に投与

した。collateral blood flowの有意改善がみられたが、投与群7例中で2人にACS発症がみられた¹⁸⁾。このように、慢性冠動脈疾患患者に対してG-CSF, GM-CSFの投与はACSを誘発させ禁忌と考えられる¹⁹⁾。

その後、AMIにおいてPCI成功後にG-CSF(10µg/kg/dayを5日間)を投与するrandomized, double-blind臨床試験(FIRSTLINE-AMI, REVIVAL 2)が2つのグループにより実施された。いずれも再狭窄増強などの有害事象はなかった。FIRSTLINE-AMI²⁰⁾ではLVEFが6%改善し、left ventricular end-diastolic diameter(LVEDD), wall thickeningにも改善がみられたが、REVIVAL 2(2005 AHA)²¹⁾では心機能改善効果はみられなかった(Table 3)。本邦では千葉大学医学部循環器内科の小室教授のグループにより実施され、半年後の心機能改善は4.6%と有意な改善がみられている²²⁾。

心筋梗塞に対する骨髄細胞移植治療の将来展望

TOPCAREなどの初期の臨床成績からは通常のPCI後に10%前後の心機能や心筋リモデリング改善効果が得られ、インターベンション治療と再生医療の組み合わせが新しい標準治療となる可能性が示唆され、世界中の循環器内科医の注目を集めた。その後、2つのrandomized, double-blind試験が実施され、最近発表された^{7,8)}。その結果は期待とは反するものであり、有効で

あったとしても2~5%のEF改善であり、梗塞巣の縮小、リモデリング抑制効果も小さく、骨髄採取の侵襲度を考えると標準治療として拡大する見込みは少ないと思われる。一方、慢性虚血性心臓病の冬眠領域への骨髄細胞の心筋内移植は狭心症の軽減も含めて、心機能改善の点では非常に有効との報告が多い。しかしながら、重症疾患患者が多いため、randomized, double-blind試験は困難と考えられたが、2005年3月より米国で実施されており、その結果が待たれる。

心筋梗塞への心筋再生医療(ヒト心筋由来心筋幹細胞の発見と心筋再生治療)

広範囲の梗塞巣を有する心筋梗塞や心筋破壊の進んだ心筋症では心筋細胞の移植・補充が心筋収縮能の改善には必要である。心筋再生医療を実施するためにはヒト心臓から心筋前駆細胞を採取・増殖させ病態心筋へ移植する必要がある。心筋幹細胞マーカーとしてc-kit, sca-1, isl-1が報告されている。われわれは臨床応用を目的に、手術時に得られたヒト心房、肺動脈組織や心筋生検組織から単クローン幹細胞の単離に成功した。この幹細胞は無血清培地でsphereと呼ばれる間葉系幹細胞の表現系を強く呈する浮遊系の細胞塊を形成し、高い増殖能を示した。特異的成長因子の存在で神経細胞、上皮細胞、脂肪細胞に分化可能な間葉系由来の多能性幹細胞であった。電気生理学的にも成熟心筋と同じイオン電流・活動電位を持ち、心筋移植後にはconnectin-43などのgap junction蛋白も正常に発現する心筋細胞へと分化しており、心筋創生に向けた探索医療に十分適合した幹細胞ソースである。虚血心筋に移植された時には、移植後の生存度が大きな問題となるが、われわれはゲラチンシートを用いて特異的な幹細胞維持因子を徐放させ、移植後の生存率が大きく改善することを発見した。このシートとヒト心筋由来幹細胞を用いたハイブリット療法が現在では最もすぐれた心筋再生治療と考えられ、現在はOMIのブタモデルにて前臨床試験を京都大学探索医療センターで実施している。

文 献

1) 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.

- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897-903.
- 3) Murry CE, Field LJ, Menasche P: Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation*, 2005, **112**: 3174-3183.
- 4) Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al: Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, **106**: 3009-3017.
- 5) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, **106**: 1913-1918.
- 6) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B et al: Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2003, **108**: 2212-2218.
- 7) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al: Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1210-1221.
- 8) Janssens S, Dubois C, Bogaert J et al: Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2006, **367**: 113-121.
- 9) Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al: Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1199-1209.
- 10) Rosenzweig A: Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1274-1277.
- 11) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al: Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1804-1810.
- 12) Forrester JS, Price MJ, Makkar RR: Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation*, 2003, **108**: 1139-1145.
- 13) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T 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*, 2001, **104**: 1046-1052.

- 14 Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, **361**: 45–46.
- 15 Tse HF, Kwong YL, Chan JK et al: Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 2003, **361**: 47–49.
- 16 Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al: Transcatheter, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 2003, **107**: 2294–2302.
- 17 Hill JM, Syed MA, Arai AE et al: Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46**: 1643–1648.
- 18 Zbinden S, Zbinden R, Meier P et al: Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46**: 1636–1642.
- 19 Matsubara H: Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet*, 2004, **363**: 746–747.
- 20 Ince H, Petzsch M, Kleine HD et al: Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation*, 2005, **112**: 3097–3106.
- 21 Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J et al: Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2006, **295**: 1003–1010.
- 22 Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y et al: Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, in press.

Regeneration Cell Therapy for Myocardial Infarction

Masaki Kimata,¹ Asako Katsume,¹ Tetsuya Tatsumi,¹ and Hiroaki Matsubara^{1,2}

¹Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

²Translational Research Center, Therapeutic Cardiac Stem Cells Project, Kyoto University, Kyoto, Japan

Key words: regenerative medicine, revascularization, myocardial infarction

Recent advances in stem cell biology have paved the way to development of a new regenerative medicine to treat the injured heart. Recent studies have suggested that several subpopulations of stem cells resident within the adult heart can be isolated and induced to develop into cardiac muscles and vascular tissues. Beyond directly repopulating damaged-myocardial tissue, cardiac stem cells seemed to activate regenerative program through stimulating angiogenesis and improving survival of host myocardium by paracrine effectors secretion. A number of questions require answers to achieve a maximal effect on cell therapy, such as the best cell source and optimal conditions for therapeutic intervention. Integrated biotherapy involving tissue engineering technology has emerged as a promising approach to create new cardiac muscle as a result of growth factor supplementation to enhance the stem cell survival and plasticity. Intensive basic-research is underway to understand the mechanistic insights of adult stem cell biology and development. The current status and future challenges of myocardial regeneration by human heart-derived adult stem cells involving tissue engineering will be discussed.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 227–234)