

Review

【特集：日本小児循環器学会第 14 回教育セミナー】

ここまで知っておきたい心筋症： 小児心筋症における再生医療の展望

小垣 滋豊

大阪大学大学院医学系研究科小児科

Contemporary Perspective on Myocardial Regeneration Therapy in Children with Cardiomyopathy

Shigetoyo Kogaki

Visiting Faculty Member, Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Pediatric cardiomyopathies are rare diseases associated with poor outcomes. In such cases, left ventricular assist device implants and heart transplantation are therapeutic options, but they have limited applicability owing to several complications and donor shortage, respectively. Cardiac regeneration therapies are increasingly expected to solve this unmet medical need, and recent translational researches have already been implemented to improve cardiac function and to attenuate left ventricular remodeling in adult patients with myocardial damage. Various cells, including bone marrow, myoblast, and iPS cells, have been used in preclinical studies. This review presents recent advances in myocardial regeneration therapies and discusses cell transplantation therapy, myoblast cell-sheet therapy, human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheet therapy, and direct myocardial reprogramming therapy. Additionally, the importance of understanding fundamental developmental biology of cardiomyocytes becomes apparent.

Keywords: cardiomyopathy, regeneration therapy, cell transplantation, cell-sheet therapy, iPS cells

小児心筋症は稀少疾患でありその予後は必ずしも良好ではない。重症例では補助人工心臓や移植が治療の選択肢となるが、合併症やドナー不足のためにその適応は限られたものとなる。心臓再生医療は、難治性心筋疾患に対するアンメットメディカルニーズとして期待が高まっており、最近のトランスレーショナルリサーチにより、成人患者の心筋障害に対する心機能改善や左室リモデリング抑制が実現化し、骨髄由来細胞、筋芽細胞、iPS細胞など様々な細胞を用いた前臨床試験が行われている。本稿では、心筋再生治療における最近の進歩として、細胞移植治療、筋芽細胞シート治療、iPS細胞由来心筋シート治療、ダイレクトリプログラミング手法を用いた治療を紹介する。同時に、本質的な心筋細胞の発生生物学的理解が重要であることを合わせて述べたい。

1. なぜ再生医療が求められる？

小児循環器および小児心臓血管外科の管理と技術の進歩により、ほとんどの先天性心疾患の治療法が確立された現在、毎年約 10,000 人の先天性心疾患患者が成人する時代である。先天性心疾患に対する治療の基

本は修復術であり、血行動態の異常を外科的内科的に修復することにより、循環不全を立て直すことになる。しかし、心室筋そのものが機能不全に陥ると、内科的薬物療法を駆使しても、その機能を回復させることが難しいことを経験することは少なくない。一方、心血管構造異常は伴わない心筋そのものの異常である

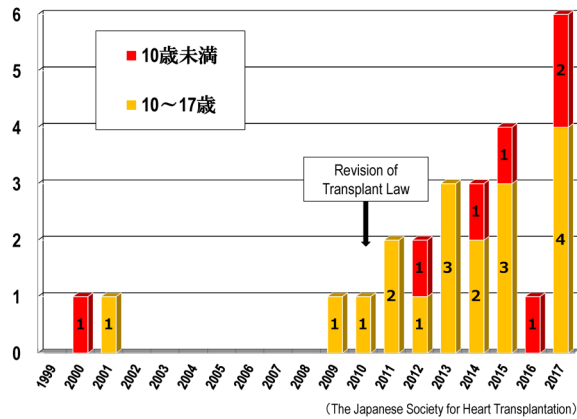
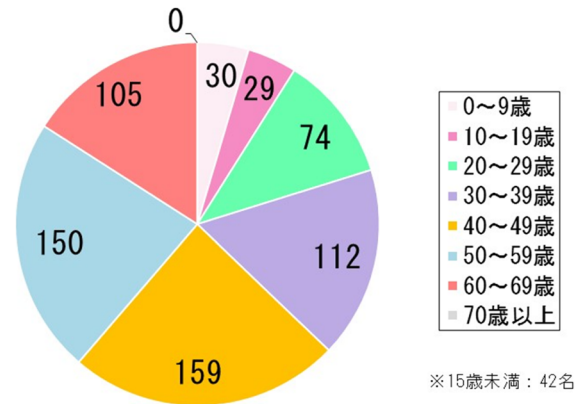


Fig. 1 The number of pediatric heart transplantation in Japan (2000.1~2017.8, N=25)

心筋症は、現在根本的な治療法はなく、あらゆる内科的治療に抵抗する重症心不全に対しては心臓移植しか救命の道がない。しかしながら誰でもが心臓移植を受けることができるわけではない。日本国内における小児心臓移植は、Fig. 1 に示すように改正臓器移植法施行後少しずつ増加傾向にあるものの、10歳未満の体格の小さな小児が移植にたどり着く数は年間1~2例であり、ごく限定された症例に対して可能な治療と言わざるをえない現状がある¹⁾。

日本小児循環器学会の希少疾患サーベイランス報告の2005~2013年の報告をもとに概算すると、18歳以下の小児期心筋症の年間発生頻度は10万人あたり0.6程度と推測されている。このうち重症心不全をきたし心臓移植の適応を考慮しなければならない例は年間約40例であり、全例が移植適応判定から移植待機となるわけではないが、国内における心臓移植待機患者数は小児においても着実に増加し続けており²⁾ (Fig. 2)、移植にたどり着く症例数と待機患者数との間の差は拡大している。近年、小児においても心臓移植までのブリッジとして補助人工心臓の使用経験も増えている。2015年に国内で承認された小児用補助人工心臓 EXCOR pediatric (Berlin Heart 社製) は、2018年3月現在38例(治験9例を含む)の小児(体重2.7kg~)に装着され、そのうち17例は移植(国内5, 海外12)に到達しているが、15例は国内で移植待機中となっている。長期にわたる待機期間中に様々な合併症は避けられず、なかには移植適応から外れることもある。

このような小児循環器医療の現場において、心筋そのものの再生に対する期待が高まっている。小児循環器医が望む再生組織・臓器には、血管、弁、心筋、気管支など複数のものがあるが、本稿では心筋の再生治



※15歳未満：42名

(Japan Organ Transplant Network 2018.1.31)

Fig. 2 The number of patients on heart-transplant waiting list in Japan (2018.1.31)

療の現状と展望について述べる。

II. 細胞移植を用いた再生医療

21世紀に入り、これまで種々の細胞種を用いた心筋再生の研究および臨床試験が行われてきた (Fig. 3)。当初より末梢血幹細胞、骨髄由来幹細胞、筋芽細胞、脂肪細胞由来間葉系幹細胞などの非心筋前駆細胞が用いられ、複数の症例報告がなされてきたが、これらの細胞は、直接注入であれ経冠動脈投与であれ、移植後の生着や心筋への分化は疑問視され、治療に必要な領域への十分な到達の限界、移植後に生じる新たな不整脈、細胞移植後の効果の持続などの問題が指摘され、いまだ確立された治療法には至っていない³⁾。例えば、骨格筋由来筋芽細胞を用いた100例以上の大規模臨床試験 MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) がヨーロッパで行われたが、一次エンドポイントである心臓の局所壁運動と心機能において、プラセボ群に対して細胞移植群の有効性が認められず、不整脈発現もあり試験は早期に終了した⁴⁾。骨髄由来幹細胞を用いた臨床試験も大小合わせて広く行われたが、29のランダム化対照試験のメタアナリシスでは、左室機能のわずかな改善(駆出率で3%程度)にとどまっている⁵⁾。一方で、2015年に発表された REGENERATION-DCM clinical trial は、非虚血性の拡張型心筋症60例を対象とした、G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) と骨髄由来幹細胞経冠動脈投与を組み合わせたランダム化二重盲検臨床試験であるが、対照群に比較し治療群では介入後3か月、1年目の心機能(収縮能)の改

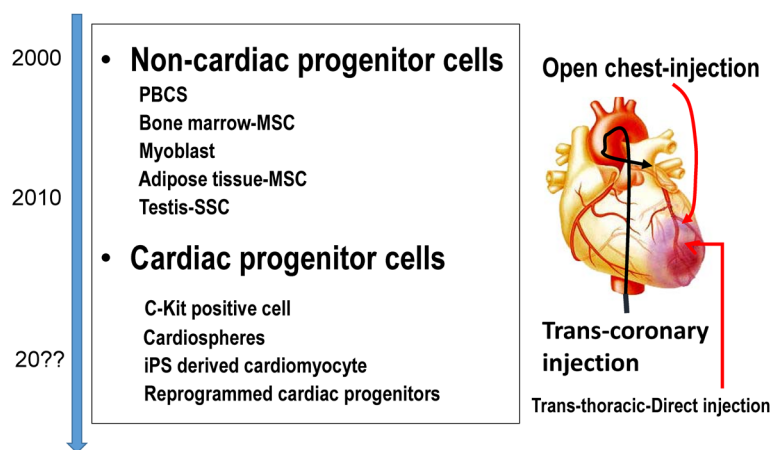


Fig. 3 Cardiac regeneration therapy with cell transplantation

善が見られ、NT-proBNP 値や運動耐容能、NYHA 機能分類の改善も見られたと報告されている⁶⁾。以上のように、非心筋前駆細胞移植を用いた再生医療については今後も検討を続ける必要がある。

一方、内在する心筋前駆細胞を用いた心筋再生の研究も進められており、心房組織から培養した c-Kit 陽性細胞を用いた臨床試験 (SCIPIO) や右心室心筋生検から培養した cardiospheres を用いた臨床試験 (CADUCEUS) が急性心筋梗塞に対して行われ報告されている。両試験において心筋梗塞巣の減少が得られたと報告されているが、試験対象数、有害事象、左室機能への効果などまだ検討を重ねる必要がある³⁾。岡山大学の王英正らは、2011～2012 年にかけて、左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法の第 1 相臨床研究を実施 (TICAP 試験: 対象 14 例)⁷⁾。小児においても冠動脈注入法による幹細胞移植法の、安全性と心不全治療における有効性を確認したと報告している。続いて 2013～2016 年にかけて PERSEUS 第 2 相ランダム化臨床研究 (機能的単心室症 34 症例) を施行し、心臓内幹細胞自家移植療法の有効性を確認している⁸⁾。現在、小児心不全疾患に対する細胞治療法の薬事法承認を目指し、2016 年から APOLLON 第 3 相臨床治験 (機能的単心室症 39 症例) を実施している。さらに 2017 年からは小児拡張型心筋症に対する細胞治療法の臨床研究 (TICAP-DCM 第 1 相臨床研究) も進行中である。

III. 細胞シート工学

1990 年代より、シート状の細胞を単層あるいは積層化して組織を作成し移植するという技術 (cell-sheet-based tissue engineering) が開発され研究が進

められてきた⁹⁾。この技術の基盤には、温度に応答して親水性・疎水性を変化させて細胞の着脱を制御できる温度応答性培養基材 (インテリジェントナノ表面) の開発がある。従来のタンパク分解酵素を用いた培養細胞回収法では、ばらばらの単細胞状態でしか回収できなかったが、温度応答性培養基材を用いた場合には温度を下降 (37→20°C) させるのみで、細胞接着タンパクなど細胞間表面-細胞間構造を損なうことなく単層の細胞シートとして回収可能となった。これまでに再生医療に応用されている例として、自己口腔粘膜細胞シートを用いた角膜上皮の再生治療、同様の細胞シートによる食道癌切除後の内視鏡治療、歯根膜シートによる歯周病の再生治療、筋芽細胞シートによる重症心不全治療などがある。さらに数種の細胞シートの積層化による層状構造を呈する組織の構築 (肝臓、腎臓など) も試みられている。

IV. 筋芽細胞シートによる重症心不全治療

拡張型心筋症や虚血性心疾患による重症心不全に対して心臓移植が治療の選択肢のひとつであるが、ドナー不足の問題は成人でも小児でも深刻であり、再生医療への期待が高い。成人において補助人工心臓を必要とする虚血性拡張型心筋症患者を対象とする自己筋芽細胞シート移植 (Fig. 4) の臨床試験 (TCD-51073) が行われ、26 週間の観察期間において、左室駆出率の改善と左室収縮末期容積の減少、6 分間歩行距離および NYHA 機能分類の改善が得られたことが報告された¹⁰⁾ (Fig. 5)。この筋芽細胞シートの治療効果はパラクライン効果と考えられており、細胞シートから分泌される VEGF, HGF, FGF などの増殖因子がもつ血管新生誘導、線維化抑制、幹細胞誘導作用が、残存心

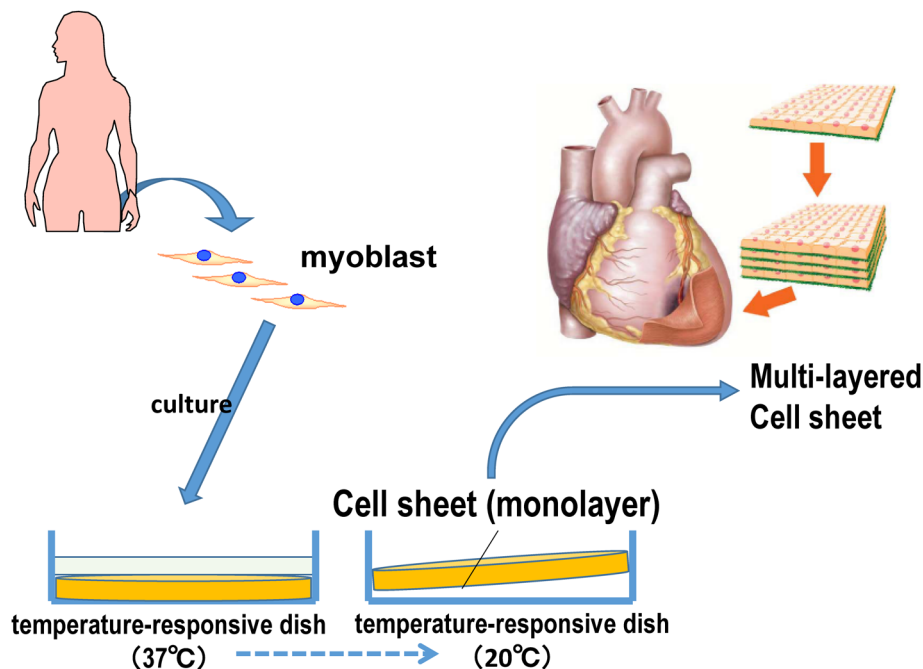
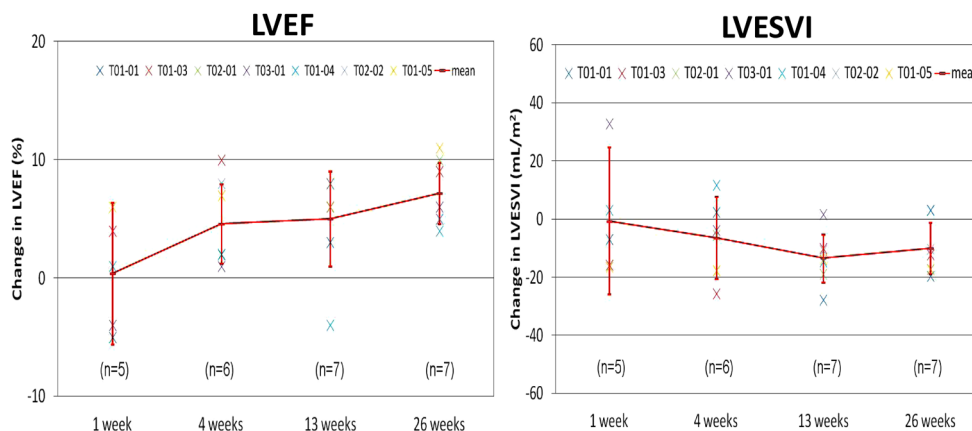


Fig. 4 Autologous skeletal myoblast sheets (TCD-51073) therapy



(Sawa Y, Miyagawa S et al. Circ J. 2015; 79: 991-999.)

Fig. 5 Serial changes in echocardiographic parameters from baseline to 26 weeks after cell sheet (TCD-51073) transplantation

筋に働く効果と考えられている¹¹⁾。この臨床試験の結果を受け、世界に先駆けて心不全治療用の再生医療製品としてヒト（自己）骨格筋由来細胞シート（ハートシート[®]）が承認されている。ハートシートは、薬物治療や侵襲の治療を含む標準治療で効果不十分な虚血性心疾患による重症心不全患者で、NYHA 機能分類が III または IV 度、かつ安静時における左室駆出率が 35% 以下の例が適応となる。ただしどの施設でも使用可能というわけではなく、以下に示す施設基準が設けられている。

＊骨格筋由来細胞シート心表面移植術に関する施設基準

1. 植込型補助人工心臓（非拍動流型）の実施施設として届出のある施設であること。
2. 医薬品医療機器法に基づく薬局等構造設備規則又は再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）に基づく細胞培養加工施設の構造設備に関する基準に則った細胞培養センターを有すること。
3. 循環器内科の経験を 5 年以上有する常勤医師及び心臓血管外科の経験を 5 年以上有する常勤医

師がそれぞれ1名以上配置され、これらの医師は所定の研修を修了していること。

4. 定期的に循環器内科の医師と心臓血管外科の医師が参加する、心臓移植を含む重症心不全患者の治療方針を決定するカンファレンスが開催されていること。
5. 関連学会の定める「ヒト（自己）骨格筋由来細胞シートの使用要件等の基準について」において定められた実施施設基準に準じていること。

V. 細胞シート治療の近未来

細胞シートを用いた小児患者への応用については、「小児重症心筋症に対する自己由来細胞シート移植による新たな治療法の開発」としてヒト幹細胞臨床研究が現在進行中である。さらに、シート化する細胞源として、iPS由来心筋細胞シートへの期待が高まっている。動物実験^{12,13)}に基づいて、文部科学省iPS細胞拠点事業「重症心不全に対するアロ iPS細胞由来心筋細胞シート移植法の確立」が進められている。iPS細胞研究中核拠点である京都大学CiRAで樹立されたiPS細胞株の提供を受け、iPS細胞から心筋細胞に分化誘導し、誘導されたiPS由来心筋細胞を純化してシート化し心不全患者に移植する治療法である。実際の臨床応用に向け、iPS細胞から心筋細胞に高効率に分化・誘導するシンプルな技術の開発、テラトーマの発生を抑制する技術、至適培養法・至適移植法の確立など様々な課題に挑戦がなされている。

iPS細胞を細胞源とした再生医療では、遺伝子修飾技術を用いたアプローチも考えられる。患者由来iPS細胞内に潜在する疾患特異的遺伝子異常を、遺伝子修飾技術を用いて修復し、遺伝子異常が修復されたiPS細胞を培養増殖して心筋細胞まで分化誘導して用いる方法である。この方法の利点は自己の細胞由来であるため拒絶反応を考えずに移植が可能である点である。

VI. 細胞シート治療のメカニズムを応用した創薬

前述したように筋芽細胞シートが心機能を改善するメカニズムは、細胞シートから産生分泌される増殖因子のパラクライン効果である。このメカニズムを応用して自己修復再生治療を可能にする薬剤の開発も試みられている。線維芽細胞や平滑筋細胞に対してHGF, VEGF, EGF, SDF-1などの産生促進作用をもつ新規プロスタサイクリンアゴニストを、マイクロスフェアの表面に結合させることにより心臓局所で徐放的に作用

させ、血管新生や局所組織再生促進、幹細胞誘導生着促進、抗線維化・抗炎症をもたらすことにより細胞シートと同様あるいはそれ以上の効果を期待するものである¹⁴⁾。

VII. ダイレクトリプログラミングによる心筋再生

慶応義塾大学の家田らは、細胞移植を必要としない新しい心筋再生法として、心臓に存在する心臓線維芽細胞に直接心筋誘導遺伝子を導入して、その場で心筋を再生させる研究を行っている。マウスの心臓線維芽細胞に、3つの心筋誘導遺伝子（Gata4, Mef2c, Tbx5）をレトロウイルスベクターを用いて導入し、マウス生体内で直接的に心筋細胞を作製した^{15,16)}。しかし、この方法ではレトロウイルスによって遺伝子が組み込まれるために細胞のゲノムを損傷する可能性があることや、心筋誘導効率が低く心筋作製に長期間かかるという課題があった。その後、この3つの心筋誘導遺伝子を同時に発現するセンダイウイルスベクターを開発し、効率よく短期間でマウスおよびヒト線維芽細胞から心筋細胞をゲノムの損傷なく作製することに成功し、さらに心筋誘導センダイウイルスベクターをマウス心筋梗塞モデルの心臓に導入すると、1週間で心筋再生が始まり、1か月後には心機能が改善することを報告している¹⁷⁾。

VIII. 脱細胞化生体組織の応用

脱細胞化した生体組織を利用した再生医療が心血管領域でも試みられている。ブタの小腸粘膜下組織を脱細胞化して作製したCorMatrix® porcine SIS-ECM（CorMatrix Cardiovascular社）はそのひとつである。小腸粘膜下層には生体内で自然に形成された架橋構造のない細胞外マトリックスで構築された組織があり、脱細胞化処理後も細胞外マトリックスは生体のままの構成を保ち、力学的強度だけでなく、コラーゲン、成長因子、サイトカインといった組織修復やリモデリングに重要な役割を果たす分子が維持されている。米国では実臨床で用いられ、人工材料や架橋材料の代用として心血管組織の修復（心膜修復、心臓組織修復、心臓弁修復、血管修復）に応用され、円柱状にしたCorMatrixを房室弁修復に利用するなどのユニークな使い方もされている¹⁸⁾。この天然由来の細胞外マトリックス生体材料は、のちに自己の細胞が生着して内的修復を起こす生体足場材料（bioscaffold）になりう

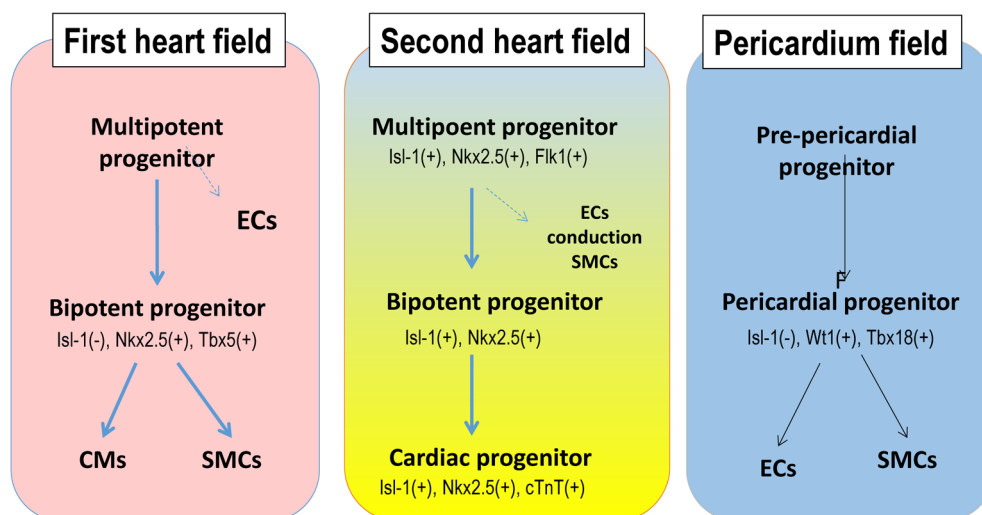


Fig. 6 Cardiomyocyte differentiation in development

と考えられ、石灰化や隔絶が起こらず、吸収とリモデリングにより成長にも対応する可能性も示唆されている。ただし、最近の使用報告で（特に高圧系、高シェアストレス系で用いられた場合）、炎症反応の惹起や石灰化、長期耐久性への疑問も出されており、今後の前方視的臨床研究が待たれるところである¹⁹⁾。

心臓弁については、SynerGraft (CryoLife 社, USA) や Matrix P (AutoTissue 社, Germany) が市販されているほか、ドイツ・ハノーファー医科大学の Haverich 教授らが主導する新鮮脱細胞化ヒト心臓弁の EU 諸国共同臨床試験が継続されており、肺動脈弁同所移植でよい成績が報告されている²⁰⁾。新鮮脱細胞化ヒト心臓弁は日本でも大阪大学で 2014 年から臨床研究が行われており、今後国内での導入も計画されている。このほか、3D プリンターで作製した心臓弁鑄型を皮下に埋入し、生体内組織形成術を用いた導管付心臓弁（バイオバルブ）の開発も行われている。心臓全体を脱細胞化し、心筋細胞や血管内皮細胞を再充填する研究も動物実験レベルで行われているが、まだ道のりは遠い。

IX. 再生医療に残された課題

心筋再生の研究をさらに推進し安全で確実な再生医療を確立するためには、心筋細胞発生の基礎的理解が不可欠である。いまだ心筋幹細胞から心筋細胞までの発生過程が完全に解明されているわけではなく、今後この領域の基礎的研究の成果を蓄積していくことが重要である (Fig. 6)。例えば、心筋前駆細胞に特異的な細胞表面マーカーの同定はそのひとつである²¹⁾。心

筋細胞と言っても、心房筋から左右心室の固有心筋、刺激伝導系の心筋まで多様であり、各々の分化の過程を明らかにした上で、使用可能なよりよい細胞源を選定し、細胞環境に影響を及ぼす因子（パラクリン因子）を活用し、目的とする病変部位にあった心筋再生が実現される方法の開発が望まれる。また今後 iPS 細胞の活用が期待される一方、iPS 細胞を作成する過程で生じる細胞ゲノムの損傷に関する警鐘も報告され²²⁾、基礎研究の確実な理解に基づく臨床応用へと進むことが望まれる。

利益相反

本論文について、開示すべき利益相反 (COI) はない。

引用文献

- 1) 日本心臓移植研究会：心臓移植の現状 20170831 現在日本の心臓移植レジストリ。 <http://www.jsht.jp/registry/japan/>
- 2) 日本臓器移植ネットワーク：移植希望登録者数 移植に関するデータ。 <https://www.jotnw.or.jp/datafile/index.html>
- 3) Ptaszek LM, Mansour M, Ruskin JN, et al: Towards regenerative therapy for cardiac disease. *Lancet* 2012; **379**: 933-942
- 4) 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* 2008; **117**: 1189-1200
- 5) Zimmet H, Porapakkham P, Sata Y, et al: Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: A meta-analysis

- of randomized control trials. *Eur J Heart Fail* 2011; **14**: 91–105
- 6) Hamshire S, Arnous S, Choudhury T, et al: Randomized trial of combination cytokine and adult autologous bone marrow progenitor cell administration in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy: The REGENERATE-DCM clinical trial. *Eur Heart J* 2015; **36**: 3061–3069
 - 7) Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, et al: Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: The TICAP prospective phase 1 controlled trial. *Circ Res* 2015; **116**: 653–664
 - 8) Ishigami S, Ohtsuki S, Eitoku T, et al: Intracoronary cardiac progenitor cells in single ventricle physiology: The PERSEUS (Cardiac progenitor cell infusion to treat univentricular heart disease) randomized phase 2 trial. *Circ Res* 2017; **120**: 1162–1173
 - 9) 松浦勝久, 岡野光夫: 細胞シート工学からみた再生医療. *再生医療* 2011; **10**: 12–24
 - 10) Sawa Y, Yoshikawa Y, Toda K, et al: Safety and efficacy of autologous skeletal myoblast sheets (TCD-51073) for the treatment of severe chronic heart failure due to ischemic heart disease. *Circ J* 2015; **79**: 991–999
 - 11) Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, et al: Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets: A preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. *Transplantation* 2010; **90**: 364–372
 - 12) Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, et al: Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 2012; **126** Suppl 1: S29–S37
 - 13) Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, et al: Enhanced therapeutic effects of human iPS cell derived-cardiomyocyte by combined cell-sheets with omental flap technique in porcine ischemic cardiomyopathy model. *Sci Rep* 2017; **7**: 8824
 - 14) Fukushima S, Miyagawa S, Sakai Y, et al: A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: A new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart. *Heart Fail Rev* 2015; **20**: 401–413
 - 15) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; **142**: 375–386
 - 16) Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, et al: Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res* 2012; **111**: 1147–1156
 - 17) Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, et al: Direct in vivo reprogramming with Sendai virus vectors improves cardiac function after myocardial infarction. *Cell Stem Cell* 2018; **22**: 91–103.e5
 - 18) Gerdisch MW, Boyd WD, Harlan JL, et al: Early experience treating tricuspid valve endocarditis with a novel extracellular matrix cylinder reconstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; **148**: 3042–3048
 - 19) Mosala Nezhad Z, Poncelet A, de Kerchove L, et al: Small intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix®) in cardiovascular surgery: A systematic review. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2016; **22**: 839–850
 - 20) Sarikouch S, Horke A, Tudorache I, et al: Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: A decade of clinical experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016; **50**: 281–290
 - 21) Ishida H, Saba R, Kokkinopoulos I, et al: GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation in a RET-independent signaling pathway. *Cell Reports* 2016; **16**: 1026–1038
 - 22) Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, et al: Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature* 2017; **546**: 370–375