

先天性心疾患領域における再生医療

小澤 司¹⁾, 吉原 克則¹⁾, 高梨 吉則²⁾東邦大学付属大森病院循環器センター心臓血管外科¹⁾,
横浜市立大学第一外科²⁾

Key words :

再生医療, 細胞移植, ティッシュエンジニアリング, 生体材料, ポリマー

Regenerative Medicine in the Field of Congenital Heart Disease

Tsukasa Ozawa,¹⁾ Katsunori Yoshihara,¹⁾ and Yoshinori Takanashi²⁾¹⁾Department of Cardiovascular Surgery, Cardiovascular Center, Toho University Omori Hospital, Tokyo,²⁾First Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine, Kanagawa, Japan

The development of worldwide research in regenerative medicine has been dramatic, opening the door for enhanced clinical practice in the cardiovascular field. Viable, autologous, functioning or less thrombogenic grafts made through tissue-engineering methods are ideal for surgical reconstruction in children with congenital cardiac defects. Implanted as a substitute for the wall of a cardiac chamber or a conduit, the graft is highly advantageous for the growing child in that it has the potential to grow and remodel. In this review, we describe basic and practical outcomes, including our studies on tissue engineering and cell therapy, and address the future applications of regenerative medicine in the field of congenital heart disease.

要 旨

ルネッサンスとも言うべき再生医学研究の急激な進歩に伴い、医療分野において臨床応用の扉が開かれつつある。わが国の循環器領域における再生医学研究とその臨床導入も、欧米先進諸国と肩を並べていると言っても過言ではない。例えば先天性心疾患であれば、人工的ポリマーマトリックスに自家細胞を播種したのち、細胞播種ポリマーグラフトを心大血管の再建部に移植し、形態的あるいは機能的な修復を行い、また虚血性心疾患であれば、患者の骨髄系細胞を心筋に移植し血管新生あるいは心筋再生を図るなどで、それらの良好な臨床成績も少しずつ報告されるようになった。本稿では、われわれの研究成果を報告し、循環器領域における再生医療の現況と将来性について展望する。

先天性心疾患治療と再生心血管グラフト

先天性心奇形は、全出生児の約1%に認められるが^{1,2)}、体外循環および心筋保護法、生体材料の開発とともにその外科治療成績も著しく向上している。先天性心疾患、特に複雑心奇形の外科治療は、弁付きパッチ³⁾や導管 (conduit) 使用による再建手術を要することが多い。これまでは自己心膜片、Dacron®, Gore-Tex® (polytetrafluoroethylene: PTFE) などの生体非吸収性ポリマー、グルタルアルデヒド処理異種心膜、あるいはホモグラフトなどが主として使用されてきた。しかし、それらの生体材料を使用した場合の術後遠隔成績は耐久性や機能性において、いまだ完全ではなく、非吸収性材料

は異物として患者内に残存する。しかも材料自体の不完全な耐久性に加えて、しばしば血栓、狭窄、石灰化、易感染性などの問題点は消えることがない^{4,5)}。

特に移植されたグラフト自体に成長性がないことは、低年齢時の再建手術の遠隔期に、患児の身体的成長に伴いグラフトサイズのミスマッチングを招来する。患児は、ミスマッチングが生じた時点でグラフト置換のための再手術を受けることになり、患児の肉体的・精神的ストレスや経済的負担、さらに医療経済的にも非効率性を生じており、従来使用されていた代用材料に基づく問題点は大きい⁶⁾。

近年、世界的な再生医学の研究成果を導入した画期的、斬新的な治療方法が登場してきた。その一つが自

平成16年3月25日受付

別刷請求先: 〒143-8541 東京都大田区大森西 6-11-1

平成16年7月13日受理

東邦大学医学部付属大森病院循環器センター心臓血管外科 小澤 司

己細胞由来の心血管組織の再生で、臨床では再生心血管組織の移植が現実化しつつある⁷⁾。この自己細胞由来の心血管組織の再生が確立されれば、先天性心疾患の外科治療において、これまで用いられてきた非吸収性ポリマーや異種心膜、あるいはホモグラフトに取って代わる可能性は高いとされる。

自己再生心血管グラフトの利点は、それ自体が「生きた自己細胞」で構築されているので、グラフトの成長が期待でき、用いる細胞の種類や遺伝子操作によってはグラフト自体に機能(例えば拍動する)を持たせることも可能となり、生体としての抗血栓性、抗感染性にも優れている点である。補材料を頻繁に使用せざるを得ない先天性心疾患外科治療の特殊性から、自己細胞による再生グラフトの価値は非常に高いと考えられる。単純な中隔欠損閉鎖術では、従来通りの非吸収性材料を使用しても遜色はないかもしれない。しかし、右室流出路-肺動脈狭窄/閉鎖に対する右室流出路再建術(RVOTR)、あるいはRoss手術における右室流出路-肺動脈側の再建、Rastelli手術、末梢肺動脈形成術や、Fontan型手術に対して、再生心血管グラフトは有効性を発揮するだろう。Fontan型手術の中でもextra-cardiac型のtotal cavo-pulmonary connection(TCPC)に対して、新岡ら⁸⁾はすでに臨床導入を開始している。すなわち骨髄単核細胞が播種された生体吸収性人工血管を下大静脈-肺動脈間の吻合に使用している。それらの術後1年以上経過例で、全くの抗凝固療法なしに再生血管は開存し、むしろ患児とともに再生血管自体が成長している可能性も示唆している。

またその再生心血管グラフトは、小児心疾患治療のみならず、左室瘤や心筋症などの成人心疾患の心室機能の補助に使用することで、これらの疾患の予後を大きく改善させる潜在性を秘めている。

細胞移植治療と再生グラフト移植治療

近年、虚血性心不全の治療に、各種細胞の注入移植療法が考えられ、その成果に期待が寄せられている。これまでLiらは、小動物あるいは大動物の心筋傷害モデルを用いて、心筋細胞⁹⁻¹²⁾、平滑筋細胞^{13, 14)}、骨髄細胞¹⁵⁾を心筋梗塞あるいは癒痕巣に移植した。移植された細胞は生存し、心室壁の菲薄化防止と心室拡大抑制に寄与し、ひいては心機能が改善したことを報告した。また心筋虚血、遺伝的心筋症、あるいは心不全に対して、骨格筋の筋芽細胞を移植した場合も、心機能の改善、あるいは心筋リモデリングの抑制効果が認められた^{14, 16-18)}。さらにMiyagawa, Sawaらは虚血心筋に

対して、心筋細胞を移植した群、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)の遺伝子を導入した群、細胞移植およびHGF遺伝子の併用群の3群を比較したところ、細胞移植とHGF遺伝子を併用した群で最も良好な心機能、血管新生効果、および免疫組織所見が認められたと報告している¹⁹⁾。細胞移植の具体的な方法としては、心筋傷害部に直接局所注入する方法と、冠動脈カテーテルから虚血心筋全体に灌流移植する方法とがある^{20, 21)}。

これら動物実験の結果から、最近、世界初の臨床試験が試みられた。フランスのMenascheらは、心筋梗塞後の重症心不全患者に対して、梗塞後癒痕巣と離れた心筋虚血部位に冠動脈バイパス術を施しつつ、主たる病巣である癒痕巣には患者自身の骨格筋から得た筋芽細胞を自家移植した²²⁾。細胞移植術後の心臓超音波検査などから、細胞移植された癒痕巣は有意に心筋収縮力の改善を示したと報告されている。また、わが国において虚血心筋への細胞移植治療の臨床導入に成功したHamanoらは、自家骨髄細胞移植の大きなメリットは血管新生効果であると述べている²³⁾。

一方で、Yokomuroらが、分離培養されたラット胎児心筋細胞^{24, 25)}を凍結保存し、解凍した後も細胞の機能と増殖性は温存できることを報告して以来、Fujiiらの結果は、血管平滑筋細胞、骨格筋芽細胞も凍結保存し、解凍後に虚血心筋に移植した場合もエラスチンの増加とともに心機能の改善が得られたことを示した¹⁴⁾。さらにOhnoらは、遺伝的な欠損を有する心筋症ハムスターモデルを用いて、凍結保存された骨格筋芽細胞を心筋症の病的心筋に移植し、心機能の有意な改善を得たことを報告している¹⁶⁾。このように、自己細胞の凍結保存と解凍後再培養という新たな戦略は、複雑心奇形外科治療の特殊性、すなわち姑息術、根治術、さらには再手術という段階的アプローチが必須な現状では、将来的に自己細胞を用いた再生医学的外科治療の重要な選択肢の一つとなるだろう。

以上より小児、成人を問わず、虚血心筋や心筋症への細胞移植治療も、至適な自己細胞の種類のととも、安全性と具体的な細胞移植法(例えば、どれだけの数の細胞を虚血心筋部に注射すればよいかなど)が確立されれば、虚血性心不全ひいては心筋症の有力な治療戦略として普及していくものと考えられる。

細胞移植治療の基本的コンセプトは、幹細胞、あるいは筋肉系細胞を虚血心筋あるいは癒痕組織に注入移植することで、心筋の新生・再生を促し、心機能の改善を図るというものである。しかし、この細胞移植治療という選択肢も、細胞の足場(scaffold)は宿主組織の

コラーゲンなどの細胞外マトリックスに依存しているため、傷害が広範囲に及んでいる場合や細胞外マトリックスの破壊が著しい場合には適応外となる。つまり末期的な不全心や左室瘤に対して効果は乏しく、同時に先天性心疾患にみられる器質的な心室の流出路あるいは大血管の狭窄/閉鎖病変の治療に対して無効に等しい。したがって、そのような三次元的な組織欠損あるいは狭窄・閉塞などの病変部を修復する場合には、病変部を切除すると同時に、生体外より人為的に「自己細胞あるいは自己組織が播種あるいは誘導された細胞の足場」となるマトリックスを病変切除部に移植することが必要となる。最近の趨勢では、細胞の足場として何らかの生体吸収性ポリマー材料、あるいは脱細胞化した同種/異種マトリックス材料を使用し、自家細胞をその材料に播種あるいは注入することにより、自家再生心血管グラフトを構築する方法が一般的であり、それがティッシュエンジニアリング(以下TE)の一つの概念にもなっている。

再生心血管グラフトの構築

心筋を再建あるいは置換する際、最も理想的な移植組織とは、ドナー組織中の筋性細胞が宿主心筋細胞と直接結合(gap junction)し、電気生理学的にも宿主心筋と同期して拍動・収縮できるような、いわゆる拍動性の筋性グラフトと考えられる。Liらは、ゼラチンスポンジを細胞の足場としてラット胎児心筋細胞を三次元的に生長させ、拍動性心筋パッチを作成した²⁶⁾。しかも2カ月に及ぶ体外培養中、細胞播種ゼラチンパッチは、規則的な自主拍動を呈した。

またShimizu, Okanoら²⁷⁻²⁹⁾は、生体吸収性ポリマーや異種/同種組織などの外来性の足場を必要とせず、培養心筋細胞のシートを重ね合わせて心筋の三次元構造を作成するという画期的な方法を開発した。温度応答性の高分子を結合させた培養皿を開発し、トリプシンなどの蛋白分解酵素を使用しないで心筋細胞シートを剥離するため、細胞の形態と心拍数の維持を可能とした。さらに心筋細胞シートを重合させたが、重合された心筋シートはその後も全体が同期して拍動を続けると報告している。こうした無傷の細胞シートを重合させる方法は、人工のポリマーマトリックスを必要としないので、細胞自体の機能を低下させず、感染防御といった点でも優れている可能性があり、心筋病変部や欠損部の移植・置換材料として、きわめて高い潜在性を秘めている。

再生心血管グラフトと至適細胞

心筋細胞は、生後間もなく、増殖能力を持たない成人型心筋細胞になると言われ、それ自身が分裂して細胞を増やすような幹細胞を持ち合わせていない^{18, 30)}。そのため成人の心臓病患者から心筋細胞を採取し、培養増殖することには無理があり、またそれら心筋細胞はすでに病的変化を来している可能性もある。

一方で、胎児心筋細胞に関しては、移植後に宿主心筋細胞とgap junctionを形成し³¹⁾、同期収縮すると言われている。しかし実際の臨床応用をにらむと、胎児から心筋細胞を得て他人に移植する場合、倫理的制限、および少なからず免疫拒絶の問題が生じる。

一方、胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)は初期胚から樹立された分化の全能性を有する未分化な細胞であるため、臓器に存在する幹細胞と比べて、さらに高い細胞分化の潜在性を秘めている。しかし初期胚から樹立する必要があるため、倫理的・宗教的な懸念も存在する。しかも実際の臨床に応用するには、十分な数の細胞を分化誘導できるかどうか、移植した細胞が腫瘍細胞など意図せぬ分化を起こさずに、さらに適切に機能するかどうかなど、いまだ解決されるべき多くの問題点を残している³²⁾。

そのため、Liらは敢えて培養平滑筋細胞、成人心房細胞からも、ゼラチンスポンジ内に筋性組織が構築できることを試みている³³⁾。

近年、骨髄細胞への関心が高まり、さらに骨髄間質細胞³⁴⁾、中でも間葉系幹細胞³⁵⁾が同定された。骨髄間葉系幹細胞は、ES細胞のような高位の幹細胞とは異なるものの、筋性細胞への分化誘導が期待され、さらに骨髄細胞移植後に心筋細胞とのgap junctionを形成するという報告もあり³⁶⁾、心筋再生における魅力的な細胞の一つとされる。Krupnickらは、同細胞をポリマーパッチへ播種し、TEへの応用を開始している³⁷⁾。

血管平滑筋細胞、あるいは骨格筋芽細胞を用いて筋性TEグラフトを構築した場合、成長性、抗感染性、筋肉特性などの諸効果は期待できるものの、グラフト内のドナー細胞群が、宿主心筋とgap junctionを形成できるか否かは、今後も論点となるだろう^{17, 38, 39)}。骨髄系幹細胞を含めて、今後何らかの幹細胞が、自己的かつ自主的同期拍動性を有する心筋パッチあるいは導管の作成を可能にすると予測される。

細胞の足場となる生体吸収材料 自験例から

TE技術によって、心血管グラフトを作成するうえで、至適な細胞の探求と同時に、「至適な細胞の足場と

して、いかなる全体材料がよいか？」も重要課題となる。Liらが報告したゼラチン材料は、細胞の生着、増殖、筋組織形成に関して、良好な足場を提供した^{26, 33)}が、その脆弱かつ柔軟な材料特性こそが、体外培養下においてもグラフトが自発的に拍動した要因となった。しかし、心臓手術に応用する場合、何らかの加工を施さない限り、その物理特性は大きな弱点である。つまり至適なポリマーマトリックスは、細胞親和性・増殖許容性に加え、吸収性ポリマー自体の心室壁における形状の安定性と強度が要求される。すなわち術後、細胞/ポリマー複合体によって置換された再建部は、その遠位側の高血圧が遷延した場合、その細胞/ポリマー複合体は絶え間ない心拍動とともに、圧負荷に曝露され、瘤形成から破裂の危険性もあり得る。

以上を踏まえて心拍動下における材料独自の特性を知るために、敢えて体外での細胞培養と播種を行わず、各種生体材料を比較検討した⁴⁰⁾。

生体吸収性パッチとして、ゼラチン(GEL)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリL乳酸とポリカプロラクトンからなるハイブリッド型ウーブン布(WV-PCLA)、同型ニット布(KN-PCLA)、コントロール群として非吸収性パッチであるGore-Tex®(PTFE)を用いて、ラット右室流出路心筋置換術を施行した。術後2カ月でラットを犠牲死、右室パッチ再建部を摘出し、評価した。

術後2カ月間でPTFE自体のサイズは変化しなかったが、線維芽細胞とコラーゲンによって被覆されたため、パッチ部全体の厚みは有意に肥厚した。宿主細胞はPTFE内部に進入しなかった。一方、吸収性のGEL、PGA、WV-PCLA、KN-PCLA内部には多数の宿主細胞が進入・増殖した。中でもKN-PCLAにおける宿主細胞数が最も多かった($p < 0.01$ (Fig. 1))。WV-PCLAのパッチ部面積と厚みは有意に変化せず、形状安定性が示された。各種パッチ部の伸展拡大と菲薄化傾向は一致し、非吸収性のPTFEは最も形状変化が少なく、PTFE < WV-PCLA < KN-PCLA < PGA < GELの順に拡大・菲薄化傾向は強かった。すなわちGELが、KN-PCLA、WV-PCLAと比較して明らかなパッチ部面積の拡大を示し、またPGAは、WV-PCLAと比べて有意に拡大していた。右室パッチ部厚みの術前・術後の変化率(術後8週のパッチ部厚み/術前のパッチ部厚み)については、GELは、PGA、KN-PCLA、WV-PCLAと比較して、極端に菲薄化していた。またPGAも、WV-PCLAと比べて、有意に菲薄化した。吸収性パッチ内部における細胞浸潤の主体は線維芽細胞であり、細胞外マトリックスの主体はコラーゲンであった。いずれの生体吸収性パッチも、部分的にポリマーが残存していたが、パッチ内部にお

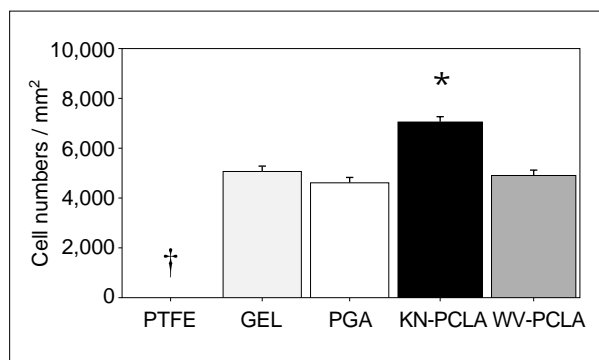


Fig. 1 Numbers of host cells in patch scaffolds at 8 weeks after implantation into defect in RVOT of adult rats. Patches studied (n=5 for each biomaterial) were PTFE, gelatin (GEL), PGA, KN-PCLA, and WV-PCLA. The KN-PCLA patch contained the largest number of cells, while the PTFE patch contained no cells. Asterisk indicates $p < 0.01$; dagger indicates $p < 0.001$ versus other groups. (This figure is quoted from our article, reference 40).

いて、多数の線維芽細胞が進入・増殖しており、コラーゲンの増生も良好であった。特にKN-PCLA、WV-PCLAの両群のパッチ置換部は、L型ポリ乳酸によるポリマー繊維部分を残し、その他の重合ポリマースポンジ部分は一様に吸収され、線維芽細胞を中心とした豊富な細胞成分およびコラーゲンによって置換されていた。またコンピュータ画像解析によるパッチ内部の細胞数の算定では、健全な宿主細胞が最も多く進入・増殖したポリマーパッチの種類は、KN-PCLAであった。さらに興味深いことにすべてのパッチ心内膜側は内皮化され、血栓は認められなかった。この結果は循環血液中に存在するとされる血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell)^{36, 41, 42)}が関与していると考えられた。以上からハイブリッド構造を有するPCLAパッチは、スポンジ部分が内部への細胞増殖を促し、かつ繊維構造部分が形状安定性を維持したことから、再生医学的心筋再建に適した吸収性材料であることが示唆された。

ラットRVOTRに用いられた血管平滑筋細胞播種・各種吸収パッチの比較 自験例から

次に実際に培養細胞が播種された生体吸収性材料同士を比較した⁴³⁾。前出のゼラチン(GEL)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリL乳酸とポリカプロラクトンからなるハイブリッド型ニット布(KN-PCLA)を選択した。

免疫拒絶反応のないラットから採取された血管平滑筋細胞 2×10^6 個をKN-PCLA、PGA、GELの各パッチに播種し、培養した。播種後1, 2, 3週において、細胞播種パッチよりDNAを抽出し測定した。また播種後2

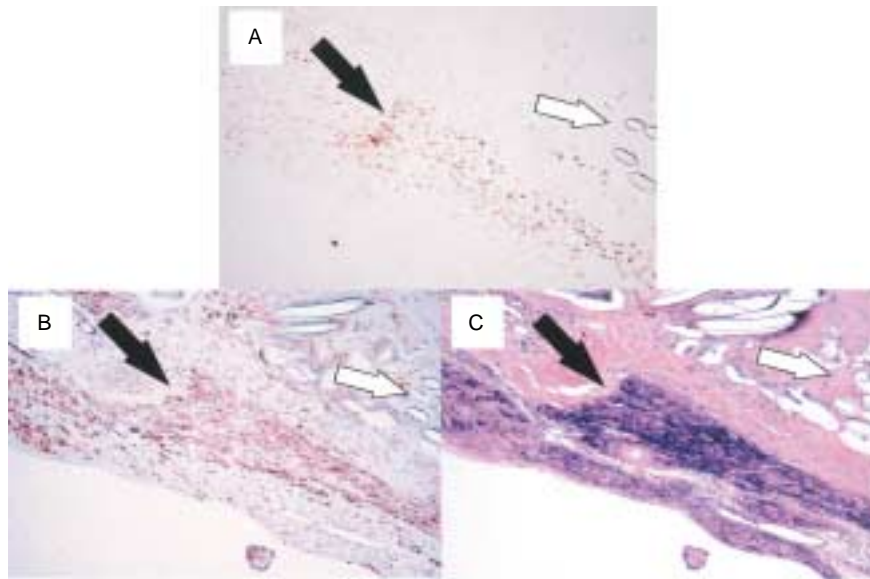


Fig. 2 Distribution and localization of BrdU-labeled cells (A, black arrow, 100×) correspond to the location of smooth muscle tissue identified by staining with anti-alpha SMA (B, black arrow, 100×) and with the location of elastin fibers (C, black arrow, 100×) in the cell-seeded patches. White arrows point to the remaining polymeric fibers. (This figure is quoted from our article, reference 43).

週において、組織学的に比較検討した。さらに細胞播種および非播種のKN-PCLA, PGA, GELの各パッチを用いて、ラット右室流出路心筋置換術を施行した。術後8週にてラットを犠牲死、右室パッチ再建部の形態・組織学的検討を行った。

1. 体外培養での結果

細胞播種パッチからのDNA量は、播種後1週から3週にかけて3群ともに上昇した($p < 0.05$)。α-smooth muscle actin(αSMA)を用いた免疫組織染色では、KN-PCLA, GELパッチにおける血管平滑筋細胞の内部増殖は、PGAよりも良好であった。

2. 細胞播種ポリマーパッチ移植後の結果

BrdUを用いた免疫染色では、いずれの細胞播種群においても、播種・標識された細胞は、パッチ移植後少なくとも8週間生存した。すべてのパッチ心内膜側には一層のfactor VIII陽性細胞を認め、内皮化を呈した。各播種群は非播種群に比べ、αSMA, elastin陽性率が著しく高かった。また細胞播種3群中、KN-PCLAパッチ再建部がGEL, PGAと比べて、生存細胞数, αSMA, elastin発現率のいずれも有意に良好であった。パッチ内部で生存した平滑筋細胞の局在が、新たに構築された筋構造および弾性線維発現部位に一致したことから、播種された細胞が平滑筋のみならず、エラスチン産生

にも寄与した可能性が示唆された(Fig. 2)。またPCLAによる右室再建部は他群と比べ、明らかな菲薄・拡大化を示さなかった。

以上より、生体吸収性パッチに播種された培養血管平滑筋細胞は、細胞パッチの移植後8週においても生存・増殖し、さらに右室心筋での移植部位において、弾性線維発現に貢献したわけである。したがって血管平滑筋細胞を用いた自家細胞グラフトは心筋パッチにも応用できるかもしれない。また今回検討した各種生体吸収性パッチの中では、スポンジ部分と繊維部分というユニークなハイブリッド構造を持つPCLAパッチが、最も良好な結果を示した。その理由として、PCLAの多孔性のスポンジ構造部分が体外培養および移植後における細胞の接着、進入、増殖と細胞外マトリックス産生を容易ならしめ、一方でL型ポリ乳酸からなる繊維構造部分がパッチ形状の維持・安定性に寄与したと考えられる。したがってPCLAパッチは細胞増殖とマトリックス産生に貢献しつつ、右室での形状安定性を示し、再生心血管外科的再建に適した生体吸収性材料と考えられた。

細胞播種グラフトの心筋への移植

Liらによる拍動性の胎児心筋細胞播種ゼラチンパッチは、ラット鼠径部皮下移植後も、自主的拍動を続けた²⁶⁾。さらにSakaiらは同グラフトを用いて、ラット右

室流出路心筋の置換手術(Sakaiモデル)を施行した⁴⁴⁾。右室置換術後12週では、グラフト再建部において、胎児心筋細胞は新たな心筋組織を形成し、免疫組織学的にも播種細胞の生存が確認されている。

成人心疾患の中では、心筋の虚血退行変性の結末ともいべき左室瘤、心室中隔穿孔などの心筋梗塞後合併症も、近年、外科治療の対象として手術法の開発がなされてきた⁴⁵⁻⁴⁷⁾。しかしそれら疾患群に対する手術法も基本的に従来の非吸収性生体材料を必要としているため、TE技術による再生組織が臨床応用されれば、術後心機能改善など多くの利点が生じる。Leorらはアルギン酸塩のスポンジにラット胎児心筋細胞を播種・培養後、左室の梗塞巣に縫着し、左室拡大抑制と左室収縮能温存に有効であったと報告している³⁰⁾。

またMatsubayashiらはラット冠動脈を結紮し、左室に貫壁性の梗塞痕巣を作成したうえで、前述の生体吸収性PCLAパッチを用いてmodified endoventricular circular patch plasty(EVCP:いわゆるDor手術)を行った⁴⁸⁾。その結果、血管平滑筋細胞が播種されたPCLAパッチを用いた群は、細胞非播種のパッチ群と比較して、有意に左室の壁厚が厚く、心機能も良好であった。

細胞播種グラフトの心臓弁への応用

近年、TE技術によるバイオ心臓弁の構築にも関心が高まっている。脱細胞化された異種あるいは同種弁に患者の自己細胞を播種することで、自己細胞由来のバイオ心臓弁を作るというコンセプトである。つまり脱細胞化によりドナー細胞が有する抗原性を除去し拒絶・異物反応を防ぎ、ドナーのコラーゲンやエラスチンなどの天然マトリックスをレシピエントの自己細胞増殖の足場に用いるという画期的な方法と考えられる。今後の報告を待ちたい。

再生心臓弁を構築する際、細胞の足場となる生体吸収性ポリマーに自己細胞を播種するという方法はShinokaらにより導入された⁴⁹⁾。しかし一方で自己細胞が播種されていない吸収性ポリマー弁は移植後8週間で跡形もなく消失したという⁵⁰⁾。生体の循環血液中には、前述(p.502)のように血管内皮前駆細胞が存在しており、患児に移植された通常の人工血管やパッチの病理所見において、内膜側に比較的良好な内皮細胞層が自主的に構築されていることを臨床上しばしば目にする。われわれの研究結果からも、ラット心筋を置換した非細胞播種・生体吸収性ポリマーパッチの心内膜側には良好な内皮細胞層を認め、パッチ断面の深層には線維芽細胞を中心とする豊富な健常細胞が浸潤、増殖していた。この結果の相違は、吸収性ポリマー材料の

違い、動物種とその年齢の違いもさることながら、再生グラフトが移植された部位、つまり右室心筋と肺動脈弁という違いが関与しているかもしれない。つまり心臓弁は、心筋以上にダイナミックかつ精緻な可動性が要求され、常に激しく血流に曝露され、物理的な強度も必要とされる。そのため細胞/ポリマー複合体を肺動脈弁位に移植する前に、体外操作として自己細胞播種とポリマー深層への細胞増殖が不可欠かもしれない。細胞播種なしでポリマー弁をいきなり植え込むことは、体内で循環している前駆細胞の接着や浸潤だけに頼ることとなり、移植された時点で組織構築の元となる細胞成分が不足しており、しかも細胞の足場としてポリグリコール酸(PGA)が用いられたためにポリマー自体の生体吸収速度が速すぎ、細胞接着による組織構築が起こる前にポリマー弁は消失する運命を迎ったと推論される。

臨床応用の問題点と将来的展望

将来的に、再生グラフトが心血管生体材料の主流になることが予想される。成人心疾患では、心筋梗塞後の左室瘤、心室中隔穿孔などが、再生グラフトの対象疾患になり得るかもしれない。小児先天性心疾患においては、Fallot四徴症、肺動脈狭窄・閉鎖症をはじめとする右室から肺動脈にかけての器質的病変を有する疾患群、あるいは右室低形成や単心室を有する疾患群が、再生グラフト使用の対象となる。RVOTRに拍動性再生心筋グラフトが導入された場合、右室機能と肺循環の改善が期待でき、右室心筋の過剰な切開、切除後に生じる右室不全を補うことができるかもしれない。また、Ross手術時のRVOTRにおける弁付き導管として、ホモグラフトやGore-Tex®(PTFE)などが用いられているが、将来的に自己細胞由来の再生・弁付き導管(tissue-engineered valved conduit)のよい適応になるかもしれない。実際Stockら⁵¹⁾はヒツジの肺動脈を自己血管細胞が播種された三弁付き導管によって置換し、良好な結果を得ている。

左室心筋に心筋再生グラフトが応用されれば、心拍出量増加につながり、そのメリットは計り知れない。TE由来の大動脈弁や大動脈移植術が実現するならば、心筋グラフトによる左心低形成症候群の解剖学的根治手術も夢ではなくなる³⁷⁾。

しかし、拍動性グラフトの作成にいかなる細胞が至適なのか、まだ不明な部分が多い。しかし骨髄幹細胞、循環血中筋前駆細胞、臍帯血中筋前駆細胞などのいわゆるstem cell(幹細胞)が、細胞自体の分化・増殖能などの潜在能力から、心血管再生における至適細胞の

有力候補と考えられる^{36, 41, 42}。Shin'okaらは、自己細胞から構築されたTE血管グラフトを用いて、良好な臨床結果を得ているが、足場に播種する細胞を当初使用していた自己血管細胞⁷から自己骨髄細胞⁸へと切り換えている。血管細胞(線維芽細胞, 平滑筋細胞, 内皮細胞等)を播種細胞として使用する場合, 体外培養によって細胞の増殖を待たなくてはならず, 培養中の汚染・感染や, もし異種胎仔血清を培養液中に混合した際のBSE (bovine spongiform encephalopathy: 牛海綿状脳症, 狂牛病)も問題となる。そのため分化・増殖能力の高い骨髄細胞を開胸直後に骨髄より採取し, 骨髄細胞中の単核細胞を分離したうえで, すぐに手術台の上で吸収性ポリマーに細胞を塗布し, そのまま術中に細胞播種ポリマーグラフトを移植するというShin'okaらの方法⁸は, 体外培養という煩雑な操作を省略でき, 細胞培養液の汚染・感染のリスクを下げ, 臨床的な安全基準をクリアする意味でも画期的である。しかも体外培養と異なり, より早期から生体内の無限に近いgrowth factorを播種細胞の増殖と分化, 再生組織形成のために有効活用できる。しかしながら体外培養されず, ただ塗布されただけの骨髄細胞がどの程度グラフト内に残存し, 生体内で増殖していくかは, 注目すべき点であり, 今後の結果に期待が寄せられる。

以上のように, 多くの研究者の努力によって臨床応用への道が開かれつつあるが, 自己再生グラフトを使って, 再生医療を進展させていくには, cell biology (細胞生物学), engineering (工学), medicine (医学) という3つの領域がまさに三位一体(さんみいったい)となって進むことが肝要である⁵²。臨床医療を支える者として, 他領域を学び知ることは高いハードルを越えることでもあるが, そここそ研究, 発展の醍醐味が存在するのかもしれない。

謝 辞

本稿を終えるにあたり, ご支援とご協力をいただいた鈴鹿医療科学大学: 筏 義人先生, 滋賀医科大学: 松林景二先生, 京都大学: 大野暢久先生, Toronto General Hospital: Ren-Ke Li先生, Richard D. Weisel先生, Donald A.G. Mickle先生, Auckland City Hospital: 富田伸司先生, University of Pittsburgh: 酒井哲郎先生, 東京女子医科大学: 新岡俊治先生に深謝いたします。また貴重なご助言をいただいた東邦大学附属大森病院循環器センター小児科: 佐地 勉先生, 心臓血管外科: 小山信彌先生および教室員各位に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Srivastava D, Olson EN: A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 2000; 407: 221–226
- 2) Hoffman JL: Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol* 1995; 16: 155–165
- 3) Kurosawa H, Imai Y, Nakazawa M, et al: Conotruncal repair of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg* 1988; 45: 661–666
- 4) Fernandez G, Costa F, Fontan F, et al: Prevalence of reoperation for pathway obstruction after Fontan operation. *Ann Thorac Surg* 1989; 48: 654–659
- 5) Mayer JE Jr, Shin'oka T, Shum-Tim D: Tissue engineering of cardiovascular structures. *Curr Opin Cardiol* 1997; 12: 528–532
- 6) Oechslin EN, Harrison DA, Harris L, et al: Reoperation in adults with repair of tetralogy of fallot: Indications and outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118: 245–251
- 7) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001; 344: 532–533
- 8) 新岡俊治, 松村剛毅, 日比野成俊, ほか: 術後1年以上経過した再生血管移植例の検討. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 51(Abstracts): 254
- 9) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al: Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 654–660; discussion 660–651
- 10) Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al: Fetal cell transplantation: A comparison of three cell types. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118: 715–724
- 11) Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al: Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2074–2080; discussion 2080–2081
- 12) Li RK, Weisel RD, Mickle DA, et al: Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 62–68
- 13) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al: Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 513–522
- 14) Fujii T, Yau TM, Weisel RD, et al: Cell transplantation to prevent heart failure: A comparison of cell types. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 2062–2070; discussion 2070
- 15) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100: II247–256
- 16) Ohno N, Fedak PW, Weisel RD, et al: Transplantation of cryopreserved muscle cells in dilated cardiomyopathy: Effects on left ventricular geometry and function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 1537–1548
- 17) Robinson SW, Cho PW, Levitsky HI, et al: Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: Long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell Transplant* 1996; 5: 77–91
- 18) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al: Regenerating func-

- tional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929–933
- 19 Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, et al: Myocardial regeneration therapy for Heart failure: Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 2002; 105: 2556–2561
- 20 Suzuki K, Brand NJ, Smolenski RT, et al: Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. *Circulation* 2000; 102: III359–364
- 21 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
- 22 Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279–280
- 23 Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al: Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1210–1215
- 24 Yokomuro H, Li RK, Mickle DA, et al: Transplantation of cryopreserved cardiomyocytes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 98–107
- 25 Yokomuro H, Mickle DA, Weisel RD, et al: Optimal conditions for heart cell cryopreservation for transplantation. *Mol Cell Biochem* 2003; 242: 109–114
- 26 Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al: Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999; 100: II63–69
- 27 Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al: Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng* 2001; 7: 141–151
- 28 Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 110–117
- 29 Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002; 90: e40
- 30 Leor J, Aboulaflia-Etzion S, Dar A, et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; 102: III56–61
- 31 Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264: 98–101
- 32 中野 徹: ES細胞, 筏 義人監修: 再生医療工学の最先端. 東京, シーエムシー出版, 2002, pp211–216
- 33 Li RK, Yau TM, Weisel RD, et al: Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 368–375
- 34 Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71–74
- 35 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–147
- 36 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 221–229; discussion 229–230
- 37 Krupnick AS, Kreisel D, Engels FH, et al: A novel small animal model of left ventricular tissue engineering. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 233–243
- 38 Reinecke H, Murry CE: Transmural replacement of myocardium after skeletal myoblast grafting into the heart. Too much of a good thing? *Cardiovasc Pathol* 2000; 9: 337–344
- 39 Suzuki K, Brand NJ, Allen S, et al: Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 759–766
- 40 Ozawa T, Mickle DA, Weisel RD, et al: Histologic changes of nonbiodegradable and biodegradable biomaterials used to repair right ventricular heart defects in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 1157–1164
- 41 Walter DH, Dimmeler S: Endothelial progenitor cells: Regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz* 2002; 27: 579–588
- 42 Murohara T: Angiogenic cell therapy. *Nippon Rinsho* 2003; 61: 871–880
- 43 Ozawa T, Mickle DA, Weisel RD, et al: Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation* 2002; 106: 1176–1182
- 44 Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al: The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 932–942
- 45 Komeda M, Fremes SE, David TE: Surgical repair of postinfarction ventricular septal defect. *Circulation* 1990; 82: IV243–247
- 46 David TE, Dale L, Sun Z: Postinfarction ventricular septal rupture: Repair by endocardial patch with infarct exclusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 1315–1322
- 47 Dor V, Sabatier M, Di Donato M, et al: Late hemodynamic results after left ventricular patch repair associated with coronary grafting in patients with postinfarction akinetic or dyskinetic aneurysm of the left ventricle. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 1291–1299; discussion 1300–1301
- 48 Matsubayashi K, Fedak PW, Mickle DA, et al: Improved left ventricular aneurysm repair with bioengineered vascular smooth muscle grafts. *Circulation* 2003; 108 Suppl 1: II219–225
- 49 Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, et al: Tissue engineering heart valves: Valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: S513–516
- 50 Shinoka T: Tissue engineered heart valves: Autologous cell seeding on biodegradable polymer scaffold. *Artif Organs* 2002; 26: 402–406
- 51 Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, et al: Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 732–740
- 52 小澤 司, Ren-Ke Li: 心筋, 筏 義人監修: 再生医療工学の最先端. 東京, シーエムシー出版, 2002, pp139–146