

総 説

心臓血管疾患に対する再生医療

濱野公一

山口大学医学部応用医工学系・外科学第一講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 再生医学, 心筋再生, 血管新生

はじめに

社会的環境の変化に伴った食習慣の変化, ストレスの増加, 運動不足, 高齢化などによって心臓血管疾患の発生頻度は増加し続けている。一方, 心臓血管領域における疾患の診断, 薬物治療, インタベンション治療及び外科的手術などの技術は著しく進歩し, より多くの患者が疾患の苦痛から解放されたが, 一部の症例では従来治療が応用できない現実も無視できない。近年, そのような症例に対しては遺伝子治療, 再生治療など新たな治療法が研究開発され, 臨床試験が行われるまでに至っている。特にこの数年間の幹細胞の研究の急速な進展により再生治療法に対する期待が非常に大きくなり, 再生医療が大変注目されている。

現在, 再生医療は肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓及び血管, 骨及び軟骨, 神経及び脳, 筋肉, 血液, 皮膚などを中心に様々な領域において研究されており, 中でも心臓血管再生が最も注目されている領域の一つである。心臓血管領域の再生治療は血管再生と心筋再生の二つのテーマに大別することができる(図1)。本稿は我々の研究を含めて, 心臓血管領域における再生医療の現況を紹介し, その問題点とこれからの展望を簡単に論じる。

1, 血管再生

図1に示したように, 血管再生は微小血管の再生と中小血管の再生に分けられている。前者は血管新生治療(Therapeutic Angiogenesisあるいは

心臓血管疾患に対する再生治療のストラテジー

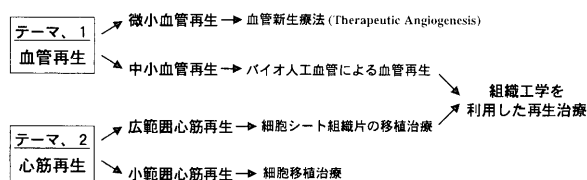


図1 心臓血管再生治療のStrategy.

Neovascularization)を指し, 太さ数十マイクロメートルの微小血管しか再生できないと考えられている。後者は組織工学的(Tissue Engineering)手法を利用した吸収性人工材料で作ったバイオ人工血管による血管再生である。

1) 血管新生療法の歴史

血管新生療法に関する研究の歴史は約20年である。血管新生療法の歴史は用いられた手段の違いによって以下の3段階に分けられる。第1段階は80年代始めからの単純な物理的手段を用いた血管新生療法である。代表的な例としてはレーザーを用いた経心筋血行再建術(Transmyocardial Laser Revascularization TMLR)である。90年代始めごろから心筋内血管新生療法として臨床応用されている^{1,2)}。第2段階は90年代始めごろから血管新生因子を利用した血管新生療法(Cytokine-based Therapeutic Angiogenesis)である。誕生した背景としては80年代からの, 血管新生に関わるメカニズムの解明と血管内皮成長因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF), 線維芽細胞成長因子(Fibroblast Growth Factor; FGF), 肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor; HGF)など

平成15年3月7日受理

の血管新生促進因子のCloningの成功がある。現在、VEGF, FGF, HGFなどを中心にいろいろな血管新生因子が血管新生治療に用いられ、臨床試験においての有効性も報告されている³⁻⁵⁾。第3段階は90年代中ごろから研究が始まった細胞を利用した血管新生療法 (Cell-based Therapeutic Angiogenesis) である。誕生した背景としては幹細胞に関する研究の進歩がある。現在、前2段階の血管新生治療は狭義的に再生医療と言えるか否かについて議論する必要はないが、本稿ではこれらの血管新生治療法の紹介を省略し、第3段階の細胞を利用した血管新生療法のみ述べる。

2) 細胞を利用した血管新生療法

近年では成人幹細胞⁶⁾ 及び胚性幹細胞⁷⁾ の研究が急速に進展したことにより、細胞を利用した血管新生療法も驚異的な速さで発展し、すでに臨床応用まで成長してきた。細胞を利用した血管新生療法は注入した細胞から血管新生に必要な種々の成長因子を産生する他、移植した細胞が血管内皮及び平滑筋細胞に分化し、血管形成に寄与することができるため、最も理想的な血管新生誘導手段と思われる。また、血管新生療法に用いられる細胞は、主に胚性幹細胞から分化した内皮細胞及び平滑筋細胞、成人骨髄細胞及び末梢血内皮前駆細胞などである。

骨髄細胞中にはVEGFとbFGFを分泌する細胞が存在し⁸⁾、一部の骨髄幹細胞が内皮細胞へ分化することも認められる⁶⁾。これらのことより、我々は1996年から自己骨髄細胞の局所注入による血管新生療法の研究開発に取り組んできた。虚血心筋及び虚

血下肢動物モデルにおいて、本治療の血管新生誘導が得られ、さらに組織血流と生理機能の改善効果が得られた⁹⁻¹²⁾。安全性と有効性を大動物を用いた実験で確認した後に¹³⁾、1999年からCABGを施行する虚血性心疾患患者のバイパス不可能な狭窄冠動脈の灌流領域へ自己骨髄細胞注入による血管新生治療を開始した¹⁴⁾。現在まで、8例の重症虚血性心疾患患者が本治療を受けた。バイパス術との併用であるため、治療効果の判定と評価が困難な面もあるが、心筋シンチ検査にて治療後8例中5例に明らかに血流の改善が認められた。さらに、様々な面から本治療の安全性について評価したが、明らかな副作用は認められなかった。また、難治性重症虚血肢疾患の患者に対して、自己骨髄細胞局所注入による血管新生治療も当科で行われており、治療後の患者の症状改善効果が認められている。

現在、表1に示したように様々な細胞を利用した血管新生療法の有効性が実験的に報告されている¹⁵⁻²¹⁾。また、自己骨髄細胞あるいは自己末梢血内皮前駆細胞を用いた血管新生治療の臨床応用については当教室を含めて世界の数十施設において、難治性虚血性心疾患及び重症虚血肢疾患などを対象とした臨床試験が始められている。他の施設においても、治療後の虚血症状の改善効果が認められると報告されている²²⁻²⁷⁾。今後は本治療の更なる安全性と有効性を確認していく必要がある。

しかし、表1にまとめたように、血管新生誘導療法に用いられている細胞は様々である。各々の細胞には利点と欠点があるため、どの細胞を用いることが最も理想的なのかはまだ結論を出すには至ってい

細胞の由来	代表的な研究報告と治療効果
1、骨髄細胞	1、ラット冠動脈結紮モデルで梗塞心筋内に骨髄細胞を直接注入し、血管新生を誘導 ⁹⁾ 。 2、ラット冠動脈結紮モデルで静脈内に骨髄CD34+細胞を注入し、remodelingの抑制と心機能改善 ¹⁵⁾ 。 3、ブタ心筋虚血モデルでCatheterにより骨髄細胞を冠動脈内へ注入し、血流の増加と心機能改善 ¹⁶⁾ 。
2、末梢血内皮前駆細胞	1、ラット冠動脈結紮モデルで末梢血CD34+細胞を静脈内に注射し、血管新生を誘導 ¹⁸⁾ 。 2、ラット下肢虚血モデルで末梢血CD34+細胞を直接注入し、血管新生を誘導 ¹⁹⁾ 。
3、末梢血単核球と血小板	1、ラット下肢虚血モデルで末梢血単核球と血小板を直接注入し、血管新生を誘導 ²⁰⁾ 。 2、ブタ心筋虚血モデルでCatheterにより末梢血単核球を冠動脈内へ注入し、血流の増加と心機能改善 ²¹⁾ 。
4、臍帯血血管内皮前駆細胞	1、ラット下肢虚血モデルで臍帯血CD34+細胞を直接注入し、血管新生を誘導 ¹⁷⁾ 。
5、胚性幹細胞由来内皮、平滑筋細胞	1、chick embryos ¹⁵⁾ と腫瘍モデル ¹⁶⁾ で胚性幹細胞由来内皮細胞が血管新生に関与。

表1 細胞移植による血管新生治療

ない。自己の細胞を用いるのは理想的であるものの、十分な細胞数を獲得するのは容易ではない。培養で増殖させた後に移植するのは一つの有効な手段であると思われる。しかし、細胞を安定して増殖させる手法の確立や、増殖した細胞移植の安全性と有効性の確認などが必要になってくる。胚性幹細胞由来の内皮細胞などを用いる方法では生体内に移植した実験の報告が少なく、治療効果と安全性の確認が必要であり、倫理的な問題も存在する。さらに、血管新生は非常に複雑なプロセスであり、様々な因子（VEGF, bFGFなど）や細胞（Endothelial cells, smooth muscle cells, pericytesなど）が関与しており、単一の細胞を注入するのが適切かどうかについてもさらなる検討が必要である。また、投与する細胞数と投与経路の選択、治療効果を高める方法、治療の安全性の確認などの問題点も多く存在する。将来、細胞を利用した血管新生療法は虚血性心臓病患者への新しい治療法として期待される。

3) 組織工学的手段を利用したバイオ人工血管による血管再生

前述したような血管新生治療では直径数十マイクロメートルの血管しか再生できない。より太い血管を再生させる最も有望な方法は、組織工学（Tissue Engineering）的手法を利用した吸収性人工材料で作ったバイオ人工血管による血管再生である。いわゆる、吸収性人工血管に生体細胞をCoatingした後、生体内に移植する方法である。

生体内で吸収できるバイオ人工血管（Scaffold）

を作成する担体材料は、まず体内である一定期間形状と強度を保持し、さらにその後に細胞による細胞外マトリックスの形成が十分にできた時点で生体内で分解・吸収され、マトリックスと置換されなければならない。現在、ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PGA）、あるいはこれらの共重合体であるPLGAなどの合成ポリマー、またコラーゲン、キチンなどの天然ポリマーが利用されている。一方、バイオ人工血管のCoatingに用いられているのは、内皮細胞や平滑筋細胞、又は骨髄細胞などである。組織工学的手段を利用したバイオ人工血管はすでに臨床試験に応用されている²⁸⁾。

しかし、現在の担体材料は理想的なものではなく、作成したバイオ人工血管の強度も十分ではないため、改善する必要がある。また、どのような細胞を用いてどのようにCoatingするのが最善の方法であるのかなどについても検討しなければならない。

2, 心筋再生

成体心筋細胞も増殖すると報告されたが²⁹⁾、一般的には成体心筋細胞の自己増殖能は殆どないと認識されている。従って、障害された心筋の再生には外来の細胞による移植をしなければならないと考えられる。現在、胎児心筋細胞移植³⁰⁾、骨髄幹細胞³¹⁾あるいは胚性幹細胞由来の心筋細胞移植³²⁾など様々な細胞が心筋再生に用いられている（表2）。そして、その有効性も報告され、細胞移植による心筋再生には大きな期待がもたれている。

細胞の由来	研究成果	利欠点
1、胎児心筋細胞	移植した胎児心筋細胞が成長分化、長期生存し、宿主心筋細胞との間にGap Junctionを形成する。心機能の改善をもたらす ^{30, 33-36)} 。	電気生理学的に心筋と一致するため、最も理想的な細胞である。十分な細胞数が得られない。倫理的な問題がある。異種移植の場合では拒絶反応などの問題がある。
2、筋線維芽細胞	移植した筋線維芽細胞が心筋内に長期生存できる。心機能の改善効果がある ³⁷⁻⁴⁰⁾ 。	筋線維芽細胞は十分な細胞数を比較的容易に得られる。電気生理学的に異なる。
3、平滑筋細胞	移植した平滑筋細胞が心筋内に生存し、心機能の改善効果がある ⁴¹⁾ 。	平滑筋細胞は増殖できるため、十分な細胞数が得られる。電気生理学的に異なり、細胞を移植後は平滑筋しか形成しない。
4、線維芽細胞	線維芽細胞にMyoD遺伝子を導入後は筋線維化し、移植後心筋内に長期生存できる。宿主心筋との間に不規則なGap Junctionを形成する ⁴²⁾ 。	増殖が速く、十分な細胞数を容易に得られる。電気生理学的に異なり、移植後は心筋細胞の機能はしない。
5、骨髄幹細胞	骨髄細胞が心筋細胞に分化できる ^{31, 43, 44)} 。骨髄細胞移植は心機能の改善効果がある ^{31, 43)} 。	自己細胞で安全性など優れている。電気生理学的に心筋とほぼ一致する。培養で心筋細胞へ分化は可能。移植後も心筋細胞へ分化する。十分な細胞数を獲得するのは容易でない。心筋細胞への分化効率が低い。
6、胚性幹細胞由来心筋細胞	胚性幹細胞が心筋細胞に分化できる ^{32, 45, 46)} 。移植細胞が心筋内に長期生存できる ³²⁾ 。	十分な細胞数を獲得するのは容易である。電気生理学的に心筋とほぼ一致する。倫理的な問題が大きく存在する。安全性の確認が必要である。

表2 細胞移植による心筋再生治療

1) 細胞移植による小範囲梗塞心筋の再生

表2に示したように、心筋再生に使われる細胞には胎児心筋細胞、骨髄幹細胞、あるいは胚性幹細胞由来の心筋細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞などが挙げられる。

現時点で最もよく研究されているのは胎児心筋細胞移植であり、移植された細胞が成長・分化し、宿主心筋との間にGap Junctionを形成することにより、心機能の改善をもたらすと報告されている^{30, 33-35)}。しかし、同種胎児心筋細胞の移植では十分な心筋細胞数を得られず、倫理的にも問題視されるので、臨床応用するには困難と思われる。また、異種胎児心筋細胞移植による心筋再生も考えられるが³⁶⁾、未解決な問題点も多く残っている。

骨格筋由来の筋線維芽細胞は自己の骨格筋から比較的容易に入手できるため、筋線維芽細胞移植は梗塞心筋再生の一つの手段として積極的に研究されている³⁷⁻³⁹⁾。現在では欧米において臨床応用され、心機能の改善効果が報告されている⁴⁰⁾。また、平滑筋細胞⁴¹⁾やMyoD遺伝子を導入した線維芽細胞⁴²⁾などを用いた心筋再生の有効性も報告されている。

さらに、骨髄幹細胞移植による心筋再生の有効性も報告されている^{31, 43)}。自己の骨髄細胞は比較的得やすく、移植後に拒絶反応もなく、理想的な心筋再生手段と考えられる。現在、心筋梗塞に対する自己骨髄細胞注入療法はすでに臨床応用されているが^{26, 27)}、骨髄幹細胞注入後の心筋細胞への分化効率が非常に低いので、培養骨髄幹細胞から分化した心筋細胞を利用した心筋再生の方がより効率的であると考えられる。骨髄幹細胞の培養下での心筋細胞への分化誘導には成功しているが⁴⁴⁾、今後さらなる研究を積んで、自己骨髄細胞を利用した心筋再生の安全性と有効性の確認が必要である。

最近、ヒト胚性幹細胞を用いた研究の発展に伴い、胚性幹細胞由来の心筋細胞を利用した心筋再生に対する研究が急激に進んでいる^{45, 46)}。安全性と倫理的な問題は残しているものの、大量の心筋細胞を容易に得られるため、胚性幹細胞由来の心筋細胞移植は心筋再生の有望な手段として大いに期待されている。

細胞移植による梗塞心筋再生の共通の問題点としては細胞Sourceの選択、移植経路と移植細胞の量の決定などが残されている。現状では、使われてい

る細胞は研究者によって様々であり、投与する細胞数がずいぶん異なる。治療に必要な細胞数についても十分な検討が行われていない上に、治療効果と細胞数との相関関係についても明らかにされていないので、今後の大きな課題として残されている。また、一度に移植できる細胞数が限られており、細胞移植後の自己増殖にも限界があるので、広範囲な心筋梗塞に対する治療効果は十分ではないと予想される。

2) 組織工学的手段を利用した広範囲な梗塞心筋の再建

細胞移植による心筋再生は一度に移植できる細胞数が少ないので、広範囲な心筋梗塞に対しては十分な治療効果が得られないと一般的に認識されている。より多くの細胞を一度に移植するには組織工学を利用した心筋細胞シートの移植などが考案され、研究が進められている^{47, 48)}。

心筋細胞シートの作成には吸収性バイオ材料(Scaffold)に心筋細胞などをseedingする方法と東京女子医科大学の岡野らが開発した温度応答性材料を利用した細胞シートの作成の2通りがある。前者は心筋細胞を吸収性バイオ人工材料にSeedingした後に心筋梗塞領域へ移植する方法である。現在、吸収性バイオ人工材料の材質は、バイオ人工血管と同様であり、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、コラーゲン、キチンなどが利用されている。一方、後者は培養皿の上に細胞外マトリックスをCoatingし、培養心筋細胞の接着後はCoatingした細胞外マトリックスの温度応答性原理を利用し、細胞を一層のシート状に培養皿から剥がし、細胞シートを重層した後に梗塞心筋領域へ移植する方法である。岡野らは心筋細胞シートを用いることにより、移植後の心筋組織内のCollagenなどの細胞外基質が少ないので、より正常心筋組織と類似した心筋再生ができると主張している。現在までの研究では用いられている細胞は殆ど心筋細胞である。

組織工学的手段を利用した心筋再生はまだ臨床試験に応用されていないようである。しかし、この方法は広範囲の心筋梗塞の再生治療法として期待されている。

3, おわりに

再生医療は心血管領域における虚血性疾患や心筋梗塞の新しい治療法であり, 研究が始まってまだ10年にも満たず, 不明な点も多い. 一般的に臨床応用されるまでにはたくさん問題点を解決しなければならない. 今後は十分な基礎研究を重ねて, 臨床試験において再生医療の有効性, 安全性を証明していく必要があると思われる. 21世紀には, 再生医療が心血管領域における新たな有望な治療法として大きく貢献できると考えられる.

文 献

- 1) Diethrich EB, Hanafy HM, Santiago OJ, Bahadir I, Kiessling JJ, Stern LA. Intraoperative coronary excimer laser angioplasty: preliminary clinical experience. *Angiology* 1990 ; **41** : 777-784.
- 2) Horvath KA, Cohn LH, Cooley DA, Crew JR, Frazier OH, Griffith BP, Kadipasaoglu K, Lansing A, Mannting F, March R, Mirhoseini MR, Smith C. Transmyocardial laser revascularization: results of a multicenter trial with transmyocardial laser revascularization used as sole therapy for end-stage coronary artery disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997 ; **113** : 645-653.
- 3) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998 ; **98** : 2800-2804.
- 4) Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002 ; **105** : 788-793.
- 5) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. 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.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 ; **275** : 964-967.
- 7) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 ; **408** : 92-96.
- 8) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Transplant* 2000 ; **9** : 439-443.
- 9) Kobayashi T, Hamano K, Li TS, Katoh T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res* 2000 ; **89** : 189-195.
- 10) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Tanaka N, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery* 2001 ; **130** : 44-54.
- 11) Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, Kobayashi T, Li TS, Kobayashi S, Matsuzaki M, Zempo N, Esato K. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 2001 ; **96** : 277-283.
- 12) Nishida M, Li TS, Hirata K, Yano M,

- Matsuzaki M, Hamano K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann Thorac Surg* 2003 ; **75** : 768-773.
- 13) Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, Matsuzaki M. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002 ; **73** : 1210-1215.
- 14) Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001 ; **65** : 845-847.
- 15) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001 ; **7** : 430-436.
- 16) Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001 ; **37** : 1726-1732.
- 17) Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000 ; **105** : 1527-1536.
- 18) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001 ; **103** : 634-637.
- 19) Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000 ; **106** : 571-578.
- 20) Kobayashi T, Hamano K, Li TS, Nishida M, Ikenaga S, Hirata K, Zempo N, Esato K. Angiogenesis induced by the injection of peripheral leukocytes and platelets. *J Surg Res* 2002 ; **103** : 279-286.
- 21) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T. 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.
- 22) Esato K, Hamano K, Li TS, Furutani A, Seyama A, Takenaka H, Zempo N. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002 ; **11** : 747-752.
- 23) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002 ; **360** : 427-435.
- 24) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003 ; **361** : 47-49.
- 25) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003 ; **361** :

- 45-46.
- 26) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002 ; **106** : 1913-1918.
- 27) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI) . *Circulation* 2002 ; **106** : 3009-3017.
- 28) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001 ; **344** : 532-533.
- 29) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001 ; **344** : 1750-1757.
- 30) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994 ; **264** : 98-101.
- 31) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001 ; **410** : 701-705.
- 32) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996 ; **98** : 216-224.
- 33) Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, Laird PW, Kloner RA. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002 ; **105** : 1720-1726.
- 34) Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, Masuda S, Takahashi A, Emoto T, Shiraishi I, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 1999 ; **100** (Suppl) : II262-268.
- 35) Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 1999 ; **100** : 193-202.
- 36) Li TS, Hamano K, Kajiwara K, Nishida M, Zempo N, Esato K. Prolonged survival of xenograft fetal cardiomyocytes by adenovirus-mediated CTLA4-Ig expression. *Transplantation* 2001 ; **72** : 1983-1985.
- 37) Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 ; **119** : 1169-1175.
- 38) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcherson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998 ; **4** : 929-33.
- 39) Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, Pouzet B, Schwartz K, Menasche P, Hagege AA. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002 ; **106** (Suppl) : II131-136.
- 40) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001 ; **357** : 279-280.
- 41) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle

- DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999 ; **31** : 513-522.
- 42) Etzion S, Barbash IM, Feinberg MS, Zarin P, Miller L, Guetta E, Holbova R, Kloner RA, Kedes LH, Leor J. Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD ex vivo: an unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation* 2002 ; **106** (Suppl) : I125-130.
- 43) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001 ; **107** : 1395-1402.
- 44) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999 ; **103** : 697-705.
- 45) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; **282** : 1145-1147.
- 46) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001 ; **108** : 407-414.
- 47) Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000 ; **102** (Suppl) : III56-61.
- 48) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T. 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.

Regenerative Medicine in Cardiovascular Disease

Kimikazu HAMANO

*Division of Cardiovascular Surgery, Department of Medical Bioregulation,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan.*

SUMMARY

Regenerative medicine is considered as an effective method for repairing various injured organs or tissues in the near future. The cardiovascular diseases are one of the most focused clinical applications of regenerative medicine, targeting mainly the repair of injured vessel for the treatment of ischemic diseases and the regeneration of damaged myocardium for the treatment of heart failure. The former could be done by inducing therapeutic angiogenesis to develop microvessel, or by surgical grafting with tissue-engineered graft to reconstruct blood vessel. On the other hand, the regeneration of the damaged myocardium could be done by implanting cardiomyocytes or other cells. We presented the up-date research and clinical application, and also discussed the strategy of regenerative therapy for cardiovascular diseases.