The Principles of 再生医療原論 Regenerative Medicine



The Principles of 再生医療原論 **Regenerative Medicine**

PREFACE

2 Masanori Fukushima TRI Director

THEORY OF DISEASE CONTROL

3 An overview of regenerative medicine: its principles and the scope of the current revolution

STEM-CELL THERAPY

- 5 Potential treatment of cerebral infarcts and spinal cord injury with mesenchymal stem cell transplantation Osamu Honmou
- 13 Tissue regeneration by Muse cells after acute myocardial infarction Shinya Minatoguchi, Yoshihisa Yamada, Shingo Minatoguchi, Toshiki Tanaka, Atsushi Mikami, Shohei Wakao, Yoshihiro Kushida and Mari Dezawa
- 20 Stem-cell therapy: Cell-based neovascularization therapy for peripheral arterial disease Yasuyuki Fujita and Atsuhiko Kawamoto

TISSUE ENGINEERING

- 26 Autologous transplantation of peripheral blood CD34⁺ cells in patients with femoral and tibial fracture non-union Ryosuke Kuroda, Tomoyuki Matsumoto and Takahiro Niikura
- 30 Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets in order to restore sight

Chie Sotozono, Tsutomu Inatomi, Takahiro Nakamura, Noriko Koizumi, Kojiro Imai, Shigeru Kinoshita, Yasuko Kimura, Masahiro J. Go and Masanori Fukushima

38 A tissue-engineering approach to tympanic membrane regeneration Shinichi Kanemaru

序

47 福島 雅典

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター(TRI)センター長

疾病制圧の理論

49 再生医療概論: その原理と進行中の医療革命の見通し

幹細胞療法

- 53 間葉系幹細胞移植による脳梗塞および 脊髄損傷の治療の可能性 本望修
- 64 Muse 細胞による急性心筋梗塞後の組織修復再生 湊口信也、山田好久、湊口信吾、田中俊樹、 三上敦、若尾昌平、串田良祐、出澤真理
- 73 幹細胞を用いた末梢動脈疾患に対する 血管再生療法 藤田靖之、川本 篤彦

組織工学的治療

- 80 下肢難治性骨折に対する自家末梢血 CD34 陽性細胞の移植 黒田 良祐、松本 知之、新倉 隆宏
- 86 培養自家口腔粘膜上皮シート移植で光を取り戻す 外園 千恵、稲富 勉、中村 隆宏、小泉 範子、 今井 浩二郎、木下 茂、木村 泰子、郷 正博、 福島 雅典
- **95 組織工学的手法による鼓膜再生療法** 金丸眞一

ADVANCES.TRI-KOBE.ORG/EN

The Principles of Regenerative Medicine is a publication of the Translational Research Center for Medical Innovation — the first academic data and statistical analysis center in Japan.

「再生医療原論」は TRI* による出版物です。 *日本のアカデミアにおける初めてのデータセンター・解析センター

EDITORIAL

Translational Research Center for Medical Innovation 1-5-4 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Japan 650-0047 Phone: 078-303-9095 Fax: 078-303-9095





COVER STORY

An image of a human retina. Oral mucosal epithelial sheets can be used to treat severe ocular surface disorders (p30).

ヒト網膜の画像。 重症眼表面疾患に対し、 口腔粘膜上皮シートを使用した 治療が可能である。(86ページ)

© Peter Maloca. CC BY

ISSN 2010-0531

"This collection describes the paradigm shift occurring in medicine."



Preface

Masanori Fukushima, TRI Director

Translational Research Center for Medical Innovation (TRI), Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe

Throughout its history, humanity has battled to overcome diseases and disorders. This struggle has yielded revolutionary discoveries that have transformed medical care. For example, in the early 20th century, French surgeon Alexis Carrel developed a technique for sewing blood vessels together, which is used in many surgical procedures including organ transplants. During the same decade, Canadian physician Frederick Banting discovered insulin. A few years later, Scottish bacteriologist Alexander Fleming discovered penicillin; this discovery and subsequent developments made many infectious diseases treatable and triggered an explosion in drug discovery.

In this way, humanity has gained considerable control over many diseases. However, drugs have actually had a limited effect on extending life expectancy since the most important factors for extending human life, namely improving health and nutrition, depend on escaping from poverty. Consequently, most diseases still remain a long way from being overcome.

Nevertheless, you are probably aware of a recent series of breakthroughs in addressing diseases for which there are currently limited treatment options: the practical application of regenerative medicine by using stem cells derived from the human body. For instance, a patient with severe spinal cord injury, who had been unable to move and initially received a hopeless prognosis, was able to recover by receiving stem cell treatment. His recovery is movingly portrayed in a video showing him sufficiently recovered to be able to walk home. I believe that necessary evidence from clinical trials will soon help make this kind of dramatic improvement a clinical reality for many.

This collection of articles describes six emerging treatments approaches involving the regeneration of nerves, blood vessels, myocardium, cornea, eardrum and bone. The techniques involving the regeneration of nerves and eardrum have been approved for manufacture and sale by the Japanese medical regulatory authority, the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)¹, while the other four therapies have been favourably received in Japanese registration trials. Regenerative therapies are characterized by the use of stem cells, or depending on the type of injury, stem cells in combination with tissue engineering.

Some of the investigational approaches described in this collection were showcased in a *Nature Outlook on Regenerative Medicine*² and five *Nature*

*Outlines*³⁻⁷, sponsored by TRI and others, which all received positive feedback. Based on this response, we have produced this collection, titled *The Principles of Regenerative Medicine*, to provide further information on the treatments. It outlines the theory behind their common principles and explains the specifics of each treatment method. In the future, we intend to report on treatments for other difficult diseases based on new therapeutic principles. But the present collection describes the paradigm shift occurring in medicine. We live in a time of unprecedented scientific and technological revolution. Ten years from now, humankind will surely have devised a specific road map for overcoming the major diseases of our time, and we will enter an age in which, by concerting our efforts, the journey's end will be near^{8,9}.

The Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe, Translational Research Center for Medical Innovation (TRI), is a Japanese public institution that supports clinical trials led by academia. As TRI's director, I am very proud to endorse this publication.

REFERENCES

- 1. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency website http://www.pmda.go.jp/ regenerative_medicines/2019/R20190125001/530100000_23000FZX00001_A100_1. pdf [pdf; in Japanese]
- Nature Outlook: Regenerative Medicine, Nature 540, S49 (7 December 2016), https://www.nature.com/articles/540S49a
- Nature Outline: Corneal Repair, Nature 544, 7650_supp_out (20 April 2017), https://www.nature.com/collections/pdryjrsvnz/videos
- Nature Outline: Eardrum Regeneration: Membrane Repair, Nature 546, 7659_supp (22 June 2017), https://www.nature.com/collections/rzfrydkflp/videos
- Nature Outline: Critical Limb Ischaemia, Nature 548, 7668_supp (24 August 2017), https://www.nature.com/collections/vmxkcnxvwg/videos
- Nature Outline: Non-union bone fracture: a quicker fix, Nature 550, S193 (26 October 2017), https://www.nature.com/collections/qmpthxknbn/videos
- 7. Nature Outline: Spinal-cord Injury: Spurring Regrowth, Nature 552, 7684_supp (14 December 2017), www.nature.com/collections/ctdkppqqnx/videos
- Fukushima, M., Austin, C., Sato, N., Maruyama, T., Navarro, E. et al. The global academic research organization network: Data sharing to cure diseases and enable learning health systems. *Learning Health Systems* e10073 (2018), https://doi.org/10.1002/lrh2.10073
- From Lab to Clinic, TRI Advances website https://advances.tri-kobe.org/en/feature/11/ from-lab-to-clinic

An overview of regenerative medicine: its principles and the scope of the current revolution

Masanori Fukushima, TRI Director

Translational Research Center for Medical Innovation (TRI), Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe

1. INTRODUCTION

Regenerative medicine represents a coming revolution in the treatment of many illnesses. Emerging therapies that use stem cells harvested from the patients themselves are demonstrating extremely promising results in clinical trials and other studies. Referred to as stem-cell therapies, or just cell therapies, they involve taking stem cells from the body, culturing them, and then putting them back into the body to induce tissue to regrow. Japanese researchers are world leaders in this field and their many years of hard work are bearing fruit as clinical trials progress according to schedule. We can be optimistic that novel therapies will soon make currently untreatable diseases and disorders treatable.

The chapters of this collection describe six regenerative therapies. Before considering specifics, however, in this essay I provide an overview, explaining the principles common to all regenerative therapies: the use of bioactive stem cells in a patient and the provision of framework materials as scaffolds for tissue regeneration using tissue engineering.

2. WHAT IS STEM-CELL THERAPY?

Stem cells are found in various tissues in the body, including the blood, bone marrow, fat, connective tissue, nerves, skin, etc. When stimulated, stem cells have the capacity to produce specific, mature cell types. Stem cells are believed to replenish damaged or dead cells in the body.

The stem cell therapies described here use adult stem cells. Since cell manipulation is not applied, there is no risk of developing tumours. The ethical issues associated with embryonic cells are also avoided. There is no risk of rejection by the immune system, as the patient's own cells or immunotolerant stem cells are used. This means that, unlike organ transplantation, stem-cell therapy does not need adjuvant therapies such as the continuous administration of immunosuppressants. Furthermore, both cell extraction from the body and cell replacement (either as-is or after culturing) can be partially automated. Many procedures can be performed using relatively simple techniques, such as intravenous infusion and other techniques that do not require general anaesthetic.

Adult stem cells fall into two broad categories. One is haematopoietic stem cells. As their name indicates, these stem cells can produce blood cells,

but they can also generate vascular cells. The other type is currently referred to as mesenchymal stem cells. They are so named because these stem cells were originally thought to produce cells that originate in the mesoderm (mesenchyme), including the bone and fat. However, recent studies have revealed that some mesenchymal stem cells can create nerve cells, which are not of mesodermal origin. Further research is needed to uncover more about these cells.

How do we identify adult stem cells when they exist only in minute quantities in the body? The answer lies in using markers for the glycoproteins that are expressed on their membranes. For example, since haematopoietic stem cells have a glycoprotein called CD34, they can be identified as CD34⁺ cells. These CD34⁺ haematopoietic stem cells show potential for treating blood vessels in the legs that have been obstructed in critical limb ischemia (Stem Cell Therapy 3) and for treating intractable bone fractures (Tissue Engineering 1) in combination with a scaffold. An example of an emerging stem-cell therapy that uses mesenchymal stem cells is one for spinal cord injuries (Stem Cell Therapy 1), in which nerve cells are regenerated using CD105⁺ cells.

Some adult stem cells defy categorization due to their diverse characteristics. For example, multilineage differentiating stress enduring (Muse) cells, which were discovered by Mari Dezawa of Tohoku University in 2010¹, are thought to create cells of various tissue types and to play a specialized role in the repair of body tissues. Muse cells are the basis for a translational approach to treating myocardial infarction (Stem Cell Therapy 2) and have been used to regenerate cardiac muscles, which had previously been considered difficult to do. Remarkably, studies have indicated that intravenous infusion of Muse cells is effective for treating myocardial infarction patients and, despite being an allogeneic transplant, immunosuppression is not needed for the initial infusion.

The above-mentioned stem-cell approaches all employ extremely simple medical procedures. They harness the body's innate healing mechanism, by extracting stem cells, boosting them outside the body and then returning them to the patient, as is the case in intravenous infusion of stem cells from the patient. The therapies are based on biological principles known as stem-cell physiology, which have been described in the publications listed



Figure 1. Multicellular symbiotic system for maintaining homeostasis that inherits self-preserving ability

in Ref. 2. The basic steps of this mechanism are tissue damage \rightarrow signalling \rightarrow signal perception by stem cells \rightarrow migration \rightarrow homing \rightarrow conditioning \rightarrow repair. Stem cells are found throughout the body, and they maintain the processes of life. But, when the need arises, stem cells are mobilized from the bone marrow and home in on the site requiring repair, where they enter the lesion to condition and conduct the repair process. This is the essence of the morphological functional homeostatic mechanism of living organisms, which stem-cell therapies harness. In conjunction with this, regenerative medicine also uses cells that are not stem cells per se but can be activated either to migrate to the lesion (for example, cells at the periphery of the eardrum, which are induced by basic fibroblast growth factor; Tissue Engineering 2). Tissue engineering is the key to the success of therapies that use these cells (Fig. 1).

3. PROVIDING SCAFFOLDS THROUGH TISSUE ENGINEERING

When a damaged area of a tissue has a gap or hole, scaffolds are needed for cells to grow on. This is the purview of tissue engineering, and some of its elemental techniques have already been commercialized. It is vital to appropriately combine cellular regenerative medicine with tissue engineering techniques.

A diverse range of tissue engineering techniques are available. For example, a gelatin sponge called Spongel[®] is used in the regeneration of the eardrum (Tissue Engineering 3). Eardrum cells can be grown by stimulating the basic fibroblast growth factor. To activate the cells, Spongel[®] is used to plug a hole in the eardrum. Since the eardrum is not flat, a three-dimensional approach is needed, which is why Spongel[®] is used to fill a perforation in the tympanic membrane. A coating of fibrin adhesive is then applied to cause the regenerative cells to migrate from the periphery of the eardrum to the Spongel[®] scaffold — this is what makes the therapy effective. Remarkably, a natural three-layered membrane forms inside the Spongel[®] scaffold.

Investigational approaches to regenerating the cornea in the eye (Tissue Engineering 2) involves culturing a sheet of oral mucosa cells on amnion membrane. The damaged area of the cornea is cut away, and the cultured cell sheet is placed on the area. In proposed treatments for intractable fractures (Tissue Engineering 1), CD34⁺ cells and collagen are injected together into the non-union area of fractured bone. A fibrous protein known as at-elocollagen is used to fill in the fractured part of the bone and form a scaffold for bone cell regrowth.

4. TREATMENT DESIGN BASED ON CELL PRINCIPLES

Research conducted globally on regenerative therapies for various diseases has not always been successful. How have Japanese researchers achieved a series of good outcomes? One reason is that they design therapeutic approaches based on a deep understanding of biological processes that occur in the human body.

Living organisms maintain homeostasis through mutual interactions between different cells. If some abnormality occurs in the body, it is detected and stem cells are mobilized to the site, where they start to address the abnormality. This cell activity includes discriminating between cells that should be allowed to live and those that should die. It then involves sending in the necessary factors to cells designated for preservation, and eliminating inflammation or promoting blood-vessel development. New cells are regenerated when the tissue has been repaired.

Cells function in a similar way to human society, performing operations in an ordered sequence. Stem cells may be regarded as leaders in this process, giving instructions to other cells. For major traumas, there are insufficient stem cells naturally present in the human body, and hence stem cells need to be cultured *in vitro* to multiply their number and make up for what the body cannot provide. When designing therapies, it is thus important to clearly identify what is happening in a specific disease or disorder as well as what is missing.

For example, stem cells can be administered intravenously to the body or by local administration to the lesion. Intravenous administration gives good outcomes when treating spinal injuries and myocardial infarction; this is thought to be because the stem cells used are those normally involved in repairing and regenerating the peripheral microcirculatory system.

Designing a therapy requires understanding the biological principles and cell processes involved in maintaining the homeostatic health of multicellular organisms. It is vital to consider how such organisms preserve integrity, maintain homeostasis, form tissues and scaffolds. It also important to know about other aspects such as self-organizational principles, cell symbiosis, rhythm, synchronism and symmetry. These principles all orchestrate processes in living organisms and are overall encompassing activities. Keeping these principles in mind, we then need a full understanding of the similarity between animal models and human disorders; in other words, how animal models mirror the type, pathology, state and stage of a human disorder.

Therapies should be developed and evaluated by conducting registration trials that comply with the law with a view to filing for licensing. When conducting a registration trial, exact data satisfying the strict criteria of good manufacturing practice (GMP), good laboratory practice (GLP) and good clinical practice (GCP) standards can be obtained through the guidance and advice offered by the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA; the Japanese equivalent of the FDA in the United States). In Japan, the Ministry of Health, Labour and Welfare instituted the Sakigake Designation System in 2015³, which allows therapies developed in Japan that show strong promise but that have not been approved in other countries to be fast tracked in the authorization process and to be prioritized in screening and evaluation. Therefore, applying for licensing under this system is highly recommended.

5. TRANSFORMATION OF MEDICAL CARE

This collection of articles focuses on disorders resulting from damage to six types of tissue: nerve, vascular, myocardial, bone, eardrum and corneal. New therapies for more-complex diseases will be reported in the future. Promising targets for future therapies include conditions where the autoimmune system attacks tissues, such as ulcerative colitis and hepatic cirrhosis, and diseases where prionoids attack nerve cells, such as Alzheimer's disease. To deal with such diseases, our existing knowledge of cell mechanisms needs to be supplemented by forthcoming therapeutic principles gained from the stem-cell therapies and tissue-engineering technologies presented in this collection. However, practical treatments for these diseases are not far off. We also envisage developing ways to overcome arteriosclerosis and major cancers, such as prostate and bowel cancers. We have already reported on new treatments for ulcerative colitis in a white paper associated with a recent Nature Outline. In the future, we hope to be able to report on the next stages of regenerative medicine, such as one-step methods for adjusting the quantity of stem cells required for therapy, the use of new biologically active materials produced by stem cells (but that does not require using stem cells), and the development of drugs that mobilize or activate stem cells in vivo.

Regenerative medicine based on stem-cell therapy and tissue engineering promises to provide definitive therapeutic outcomes for various diseases and disorders by applying relatively simple procedures. As such, regenerative medicine has rendered obsolete the accepted norms of existing drug-development strategies, and it demands huge innovations in the concepts of drug therapy and drug discovery. Regenerative medicine will be fundamental for future medical care around the globe. As the development of regenerative medicine enters its second exciting stage, we are certain this is where the future of medicine lies.

REFERENCES

- Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y. *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 8639–8643 (2010).
- For Nature supplements that highlight research conducted by researchers associated with TRI, see TRI Advances website https://advances.tri-kobe.org/en/collaborations. See also Nature Outlook articles: www.nature.com/articles/540S49a
- Sakigake Designation System (Japanese only), Ministry of Health, Labour and Welfare website (https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/iyakuhin/topics/ tp150514-01.html)

Potential treatment of cerebral infarcts and spinal cord injury with mesenchymal stem cell transplantation



Osamu Honmou

Department of Neural Regenerative Medicine, Research Institute for Frontier Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

Current treatments for cerebral infarctions and spinal cord injuries are unsatisfactory. Researchers at Sapporo Medical University supported by the Translational Research Center for Medical Innovation (TRI) in Japan have been conducting transplantation experiments using mesenchymal stem cells (MSCs) as donors in animal models of cerebral infarction and spinal cord injury. The results indicate the remarkable therapeutic benefits of intravenous administration of these cells. A clinical study with subacute cerebral infarction patients suggested the safety and potential therapeutic effects of autologous MSCs that had been cultured using autologous human serum and administered by a single intravenous infusion. A clinical trial on the application to cerebral infarction is ongoing, while a clinical trial on the application of MSCs to spinal cord injuries has also been completed. MSCs have the potential to cause a paradigm shift in treatment strategies for refractory neurological diseases.

1. CEREBRAL INFARCTION

1.1 Introduction

Cerebral infarction is a disease that still lacks a cure, and recovery from the residual neurological dysfunction it causes is extremely difficult. Its annual incidence in Japan is just under 300,000. Most patients die or are left with a serious residual disability. An estimated 5.2 million people in Japan will need nursing care by 2025. The number of people with risk factors for cerebral infarction (such as diabetes, hypertension and hyperlipidemia) currently exceeds 10 million, and it is expected to continue rise as Japan's population ages. The social burden of cerebral infarction is enormous — annual healthcare costs are estimated to be about 2 trillion yen and social costs about 8 trillion yen.

Treatment to date is based on the concept that the therapeutic window after the onset of cerebral infarction is very short. The harsh reality is that no effective treatment currently exists for infarct lesions once they are complete. The gold standard has thus been to detect the ischemia site before an infarct is complete and to provide intensive treatment focused on thrombolytic therapy within a very limited period after onset. Current standard treatment is both medical (including antiplatelet and anticoagulant therapies) and surgical (including cerebral revascularization), but the results are unsatisfactory. Intravenous tissue plasminogen activator therapy, a promising hyperacute treatment, has also been used, but only a limited number of patients are eligible for it, since it must be given within 4.5 hours of onset.

It is thus difficult to treat cerebral infarction. Brain tissue is quickly damaged, and it is difficult to start effective treatment during this time. Furthermore, there is no established treatment for regenerating central nervous tissue that has been damaged by ischemia. Rehabilitation is the only treatment for disability after cerebral infarction.

A new method of treatment is thus needed. With the recent advances in neuroscience and stem-cell research, it is becoming increasingly possible to treat central nervous system disorders using regenerative medicine. However, although many studies have been conducted worldwide, covering many areas of basic research, most have not yet been translated into clinical practice.

Since the early 1990s, we have been actively conducting transplantation experiments using different types of stem cells as donors in animal models of central neurological disease, including cerebral infarction models¹⁻⁴. From the mid-1990s, we have focused on nerve regeneration research using bone marrow cells, which were expected to be closest to clinical application, as donor cells⁵⁻⁸. In particular, we have focused on mesenchymal stem cells (MSCs) that have a strong regenerative effect on the nervous system and have proven to be a useful source of donor cells. We have reported many basic research results that show the remarkable therapeutic effects of intravenous administration of these cells in animals with various neurological disease models, including cerebral infarction^{9–27}, spinal cord injury^{28,29} and Parkinson's disease^{28,29}.

SUMMARY

Current treatment for cerebral infarction is effective only in the acute phase; once the infarct is complete, rehabilitation is the only treatment. Treatment of the spinal cord injuries using current medical techniques is similarly unsatisfactory. We have been conducting transplantation experiments using mesenchymal stem cells (MSCs) as donors in animal models of cerebral infarction and spinal cord injury since the early 1990s. We have conducted many basic research studies that indicate remarkable therapeutic effects following intravenous administration of these cells. Following this basic research, we started a clinical study in patients with subacute cerebral infarction in January 2007. We evaluated the safety and therapeutic effects of autologous MSCs that had been cultured and expanded using autologous human serum. MSCs were administered by a single intravenous infusion rather than by surgery. The potential therapeutic effects produced by this treatment come from the multilevel mechanisms of action of MSCs minimizing the neural damage caused by cerebral infarction and facilitating the neural regeneration. A clinical trial on the application of MSCs to spinal cord injury has been completed. MSCs have the potential to cause a paradigm shift in treatment strategies for refractory neurological diseases.

CORRESPONDING AUTHOR

Osamu Honmou E-mail: honmou@sapmed.ac.jp



Figure 1. Schematic plot of symptom severity against time following administration of mesenchymal stem cells.

Based on the preclinical proof-of-concept studies to date, the mechanisms of action of MSCs may include:

- accumulation of transplanted cells in the lesions (homing effect)^{10,13,20,30}
- neurotrophic, neuroprotective and anti-inflammatory effects of transplanted cells via neurotrophic factors^{11,14,16,20}
- remyelination of demyelinated axons^{5,7,28,31}
- neural regeneration (differentiation into neural cells), regeneration of damaged axons and axonal sprouting^{28,31}
- stabilization of the blood-brain barrier (BBB)^{17,28,32}

Since transplanted cells exert therapeutic effects over time on different processes and at different sites, we can expect good therapeutic effects from a single treatment.

Following on from this basic research, we started a clinical study in January 2007^{33,34} (Fig. 1). We evaluated the safety and therapeutic effects of autologous MSCs that had been cultured and expanded using autologous human serum in patients with subacute cerebral infarction. MSCs were administered by a single intravenous infusion rather than by surgery. We obtained data showing a certain improvement in recovery compared with the course of symptoms seen with conventional treatment. These results were evaluated based on imaging findings and clinical symptoms^{33,34}.

The potential therapeutic effects produced by this treatment come from minimizing the neural damage caused by cerebral infarction and facilitating recovery (regeneration) of the nervous system. It is difficult to repair the damaged brain using conventional treatment. In contrast, this new treatment is expected to actively repair the ischemic brain via the multifaceted mechanisms described above. The proposed indication for this investigational treatment is improvements in neurological symptoms and signs, in impaired daily activities and in functional disability associated with cerebral infarction.

1.2. Clinical research

1.2.1 Overview

Autologous MSCs were cultured with autologous human serum and intravenously infused into 12 patients with supratentorial cerebral infarction³³. Patients were enrolled in the study during the subacute phase after receiving standard treatment for acute cerebral infarction. Causes of cerebral infarction could be any within the NINDS-III classification, but infratentorial infarcts, such as cerebellar infarction and brain stem infarc-



Figure 2. Magnetic resonance imaging images of patients' brains before and after the administration of mesenchymal stem cells.

tion, were excluded. Mild cases or extremely severe cases were excluded (patients with a modified Rankin scale score of 3-5 and Japan Coma Scale score of 0-100 were included). When all patients had been examined and approved by the Evaluation Committee, bone marrow aspirates (up to 60 ml) were collected from the iliac crest under local anesthesia by a haematologist. MSCs were then cultured in a specialized culture facility (the Cell Processing Center) for 2 to 3 weeks until the target cell number of 1×10^8 cells was reached. The cells were then frozen and their safety and quality tested; only those that passed the tests were administered. Administration was by intravenous infusion into a peripheral vein over 30-60 minutes. The study included nine men and three women, with ages ranging from 41 to 73 years (59.2 ± 8.2 years); 12 patients had motor paralysis and 5 patients had aphasia. The patients received cell transplantation between 36 and 133 days after the onset of cerebral infarction. Assessments included general blood lab tests such as CBC, magnetic resonance imaging (MRI), and clinical symptom evaluation according to the NIH stroke scale (NIHSS) and the modified Rankin scale (mRS).

According to NIHSS and mRS evaluation, the speed of recovery was significantly accelerated by transplantation (Fig. 2)³³. Although spontaneous recovery, which occurs as part of the natural course of cerebral infarction, usually slows down during the subacute phase, further acceleration of symptom recovery occurred.

After cerebral infarction, changes in MRI (FLAIR) over time generally converge after approximately 1 month, the high-intensity area being very similar in size, density and shape to the final infarct lesion. However, although transplantation was performed more than 30 days after onset, high-intensity areas on MRI (FLAIR) still showed a statistically significant reduction in size and density after transplantation (Fig. 3)³³.

1.2.2 What can we learn from these results?

We need to recognize the importance of having multiple points of action when developing new treatments for cerebral infarction. Over the past few decades, many drug candidates have been investigated, but their therapeutic effects are limited. The mechanism of action of a drug may be very clear when it only has limited mechanisms of action. However, the conditions after cerebral infarction vary considerably and are highly complex, as if a storm is raging in the ischemic brain. Why is cell therapy successful in such conditions? We believe the answer lies in the diversity of mechanisms of action of cell therapy. As described above, cell therapy acts in var-



ious ways over time on different processes and at different locations, and this sets it apart from current pharmaceutical treatments.

We must reconsider the pathophysiology of cerebral infarction, in particular the conventional wisdom that brain tissue damage progresses irreversibly in a very short period after cerebral infarction, so that is impossible to treat the brain once it has been damaged. The therapeutic time window is thus thought to be limited to the hyperacute phase, and treatment is focused on revascularization and neuroprotection. As described above, cerebral infarction regions treated 6 weeks or more after the onset of cerebral infarction recovered very quickly after cell therapy. This indicates that there are treatable brain tissues remaining in regions where we previously believed that irreversible damage had occurred. This does not refer to the long-term existence of the penumbra; rather, neurons and axons can be dysfunctional but remain anatomically alive for a long time.

We also must treat the entire central nervous system, not just the damaged brain. Many people tend to think of regenerative medicine only as regeneration of damaged brain tissues. However, they are failing to see the forest for the trees. The brain has a larger backup system than we think. In evolutionary history, the nervous system, which is crucial to our survival, encountered many challenges and acquired various backup systems. When trying to reduce disability after cerebral infarction, regenerating the damaged brain is certainly important but so is increasing the plasticity of the healthy areas of the brain. Indeed, increased plasticity is particularly noticeable after cell therapy. In regenerative medicine for cerebral infarction, we must make a paradigm shift towards treating the entire central nervous system.

And we need to recognize the importance of self-healing. Among the

various types of stem cells currently available, why does intravenous infusion of high-dose MSCs produce such a potential therapeutic effect? The answer lies in the role that MSCs play under normal circumstances. Even when we are healthy, MSCs seem to be released from the bone marrow into the peripheral circulation and are likely to be involved in maintaining the function of organs and in healing wounds throughout our body. MSCs are thought to be stem cells that make a considerable contribution to self-healing. This sets them apart from other stem cells. Any healthcare intervention, whether drug treatment or surgery, relies on the self-healing that follows. The more we learn about medicine, the less we know, and hence we must focus on maximizing self-healing abilities.

1.3. Treatment mechanism

1.3.1 The blood-brain barrier and the homing effect

It is well known that when central nervous system (CNS) tissues are damaged by ischemia, the BBB is destroyed, and this BBB dysfunction often lasts for about 1 month, depending on the extent of ischemia. To evaluate the extent to which BBB destruction is involved in the accumulation mechanism (homing effect) of intravenous MSCs in cerebral infarction lesions, we used a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. In this cerebral infarction model, BBB breakdown lasted for approximately 2 weeks and was mostly repaired after 4 weeks¹³. However, intravenously administered MSCs continued to accumulate in the lesions in the same manner more than 4 weeks after ischemic injury¹³. This suggests that breakdown of the BBB is not needed for MSCs to migrate from the blood vessels to the brain parenchyma. An experiment with a mouse model of prion disease, in which there is minimal BBB destruction, showed a similar homing effect³⁵. We conclude that sufficient numbers of intravenously administered MSCs can reach lesions even in subacute or chronic cerebral infarction where repair of the BBB is almost complete¹⁹, and can reach lesions not only in supratentorial but also in infratentorial regions¹⁸.

1.3.2 Multilevel mechanisms of action

We have published many basic research findings on the several possible mechanisms involved in using MSCs to treat cerebral infarction. These mechanisms fall into three main groups: neurotrophic and neuroprotective effects by neurotrophic factors^{11,14,16,20}, angiogenic effects (recovery of cerebral blood flow)^{22,26,27} and neural regeneration^{10,11,14,15,20,25,28,29,36,37}. We presume that these therapeutic effects are produced at different times. Neurotrophic and neuroprotective effects by neurotrophic factors occur very quickly, in a matter of hours, because humoral factors produced by MSCs act directly on the cerebral infarct lesion. Angiogenic effects start to appear approximately 3 days after the onset of cerebral infarction, and the recovery of cerebral blood flow becomes obvious after 1 week. The effects of neural regeneration first become apparent after 1 week and they increase over at least several months. Although these mechanisms are based on inherences drawn from animal studies, the results of our clinical study^{33,34} suggest similar multilevel effects also occur in humans.

1.3.3 Mechanisms of action of neurotrophic factors

We confirmed a statistically significant change in clinical symptoms and MRI measurements within 1–2 weeks after cell transplantation. Most patients showed reduced motor paralysis and improved resolution of spasticity within 1–3 days after transplantation, and reduction in the high-intensity area in MRI (FLAIR) within 1–2 weeks. These changes, observed soon after transplantation, are thought to be mainly due to the activity of neurotrophic factors secreted by the transplanted cells. After intravenous administration, transplanted cells accumulate in the cerebral infarct lesion and increase local levels of neurotrophic factors (e.g., brain-derived neurotrophic factor [BDNF]²⁰ and glial-derived neurotrophic factor [GDNF]¹¹) within several days¹⁴.

The effects of BDNF and GDNF on brain edema are well known, but these two factors are effective only in reducing edema in the acute phase of cerebral infarction. The patients in our clinical study were subacute cases, so this mechanism may differ slightly from the effects on regular brain edema. It may be more accurate to say that the high-intensity area on MRI (FLAIR) during this phase indicates a condition where intra- and extracellular fluid volumes are high. In current clinical practice, this high-intensity region has been considered dead or close to dying, and hence unable to be reduced using existing drugs (such as osmotic diuretics and steroids). If the recovery of neural function in our patients did indeed result from a reduction in brain edema due to the increased concentration of neurotrophic factors at the local lesion site, we may have to fundamentally reconsider the currently accepted pathophysiological concepts of cerebral infarct lesions. The region we have considered to be untreatable in subacute cerebral infarctions is not in fact damaged beyond repair, but consists of brain tissues that can still be treated.

Not only do neurotrophic factors have anti-edematous and apoptosisreducing effects¹⁴, they also affect neuronal excitability by acting directly on ion channels on the surface membrane of both neural cells and axons³³. For example, BDNF causes changes in neuronal excitability by altering the potassium channel kinetics and the properties of the resting membrane potential, polarization of the action potential, and after-hyperpolarization, all of which occur extremely quickly. The excitability of the neural cell changes within milliseconds of BDNF reaching a cell. BDNF also directly affects the efficiency of neurotransmission in the synapses. Therapeutic effects seen during the early stages after transplantation may due to the effects of these neurotrophic factors, which may restore the functions of the surviving dysfunctional neural cells and axons.

We also know that BDNF restores the activity of K–Cl transporters in the spinal cord and increases the effects of GABA, thereby reducing spasticity. Indeed, spasticity reduction was seen within several days after transplantation. These results suggest that cell therapy's site of action is not limited to the local cerebral infarct; we may have to consider that cell therapy improves the overall function of the brain, spinal cord and nerves. From this perspective, systemic administration by intravenous injection is reasonable.

1.3.4 Angiogenesis and stabilization of the BBB

One of the effects of MSCs during treatment is recovery of cerebral blood flow by angiogenesis^{22,26,27}. There are two possible mechanisms for this: MSCs accumulating in the local cerebral infarct induce angiogenesis by secreting angiogenic factors (e.g., vascular endothelial growth factor [VEGF] and angiopoietin); and transplanted MSCs differentiate into vascular endothelial cells and form new blood vessels. Approximate-ly 90% of the endothelial cells of the new vessels are derived from the host, while the other 10% are derived from donor cells. According to the results of our basic research based on animal studies, recovery of cerebral blood flow due to angiogenesis becomes significant approximate-ly 1 week following transplantation²⁷. A clinical study showed improved cerebral blood flow 1 week after transplantation³³.

As part of their effect on blood vessels, MSCs have also been found to repair the disrupted BBB. The BBB is impaired regardless of the cause of injury (i.e., ischemia or trauma). BBB injury recovers to some extent after approximately 1 month; however, recent studies have revealed that the BBB is not completely repaired even in the chronic phase, and injury continues to negatively affect the surrounding brain tissues. Intravenously administered MSCs have been demonstrated to repair this longer-term breakdown of the BBB, leading to therapeutic effects^{17,28,32}.

1.3.5 Neural regeneration

It has been suggested that neural regeneration is involved in the therapeutic action of MSCs. There are two possible mechanisms for this: MSCs accumulating in the local cerebral infarct promote endogenous neurogenesis; and transplanted MSCs differentiate into neuronal and glial cells^{10,11,14,15}.^{20,25,28,29,36,37}. Remyelination due to differentiation of MSCs into myelinforming cells, and stimulation of axonal sprouting and regeneration have also been reported^{5,7,28,31}. Thus, neural regeneration is believed to involve various multilevel regenerative processes.

1.3.6 Regeneration of the entire central nervous system

MSCs are known to induce regeneration at the local site of injury, but they have also been shown to increase the plasticity of the area surrounding the injured site and of the normal brain on the opposite side^{15,25,37}. These effects are enhanced when combined with rehabilitation²⁴. Thus, for brain/spinal cord regeneration, it is important to treat not only the local site of injury but the entire CNS. For this reason, intravenous administration of the cells, which enables them to be delivered to the entire CNS, is preferred over local transplantation.

1.4 Cell culture: Autologous human serum versus fetal bovine serum

Like any other stem cells, MSCs change during culture depending on their collection site and culture method. For example, even if we use the same basic medium, culturing cells using fetal bovine serum (FBS) will produce cells with different biological characteristics from those produce by culturing cells using autologous human serum. Using autologous human serum reduces the potential risk of infection, for example by prions³³. The cells are also maintained in a less differentiated state and have more stable gene expression and more rapid proliferation than cells cultured with FBS³³.

Gene expression analysis reveals that angiopoietin-like 4, which inhibits apoptosis, is upregulated in MSCs cultured in autologous human serum, resulting in reduced cell death; in contrast, growth arrest-specific protein 1 and anti-proliferative protein 1 are highly expressed in MSCs cultured in FBS, slowing the proliferation rate.

FBS also induces differentiation into mesenchymal lineages. For example, cells cultured in FBS have high expression levels of genes associated with differentiation into osteoblasts (cytokine-receptor-like factor 1, transmembrane glycoprotein NMB), adipocytes (leptin receptor, inhibitor of DNA binding 4, members of the complement system), and chondrocytes (extracellular matrix genes, cytokine receptor–like factor 1, leptin receptor, ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2, transforming growth factor- β , SMAD6, OLF1/EBF-associated zinc finger gene)³³.

A further problem with the use of FBS is the development of acute and delayed immune reactions caused by xenogeneic protein contamination. When human MSCs cultured in xenogeneic serum (10^8 cells) are transplanted, approximately 7–30 mg of xenogeneic serum protein is known to enter the host; side effects caused by xenogeneic protein have been reported³³.

1.5 Autologous versus allogeneic transplantation

Since it takes about 1 to 2 weeks to culture autologous MSCs, we need to develop ways to treat acute diseases, for example, cell banking. Cultured autologous MSCs can be stored frozen for more than 10 years long periods. Patients with a history of transient ischemic attack or high-risk factors may have their MSCs cultured, expanded and cryopreserved in advance, so that they can be administered immediately after cerebral infarction.

In patients whose MSCs need to be cultured after the onset of infarction, cell therapy may be combined with traditional treatment methods; for example, MSCs can be cultured while the patient is being treated with hypothermia during the acute phase to delay the damage to the brain tissues.

Although allogeneic transplantation would solve the problem of culture time, significant challenges are associated with it, such as immune rejection. In T cell activation — the starting point of immune rejection — cell-surface MHC molecules bind to the T cell receptor/CD3 complex on the T cell surface and adhesion molecules mediate co-stimulatory signals. Since MSCs are positive for both HLA classes I and II and adhesion molecules (e.g., CD40 and CD59), intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, ICAM-2, ICAM-3 and vascular adhesion molecule (VCAM)-1, MSCs are highly likely to become antigen-presenting cells. After transplantation, MSCs differentiate in the host's body, resulting in higher expression of antigen-presenting molecules. Therefore, co-administration of immunosuppressants is mandatory when transplanting allogeneic MSCs. However, given the short- and long-term side effects of immunosuppressants, their use would be very limited. Even when immunosuppressants are used, allogeneic transplantation is less effective than autologous transplantation. Obtaining large numbers of allogeneic MSCs that are safe and high quality also presents methodological problems. Thus, the use of allogeneic MSCs would be limited to diseases for which autologous MSC transplantation cannot be performed. For the time being, regenerative medicine using autologous MSCs will take precedence.

1.6 Mode of administration

In cell therapy, we must account for the particular challenges of administering suspensions of living cells. First, these cells are not always 100% separated to the single-cell level. Second, not all cells are alive, so that clumps of cells, particularly dead cells, could become sources of emboli. There is very little difference in therapeutic effect between intra-arterial and intravenous administration. If MSCs are to be administered intravascularly, we can ensure both safety and effectiveness with intravenous administration. Intrathecal administration has the advantage that it needs relatively few cells, but it leads to a lower rate of cell accumulation at the lesion site, and it is difficult to deliver the cells deep into the brain. This administration mode cannot be used when cerebrospinal fluid (CSF) flow is blocked.

If MSCs are to be transplanted directly into the brain by stereotactic surgery, as has been done in small-animal studies, they would need to be injected at multiple points because of the larger size of the human brain. This would increase the risk of bleeding, infection and additional injury. Furthermore, there are no criteria for determining appropriate transplantation sites. Although it requires administering a relatively high number of cells, intravenous administration is considered best in terms of safety, cell delivery, targeting, effectiveness, versatility and equipment needed.

1.7 Topics for future investigation

The results of our clinical study raise new questions. Functional recovery in cerebral infarct patients treated with MSC transplantation did not always follow the same course as that observed in patients not treated with MSCs. For example, shortly after MSC transplantation, some patients showed further improvement in volitional control of their peripheral extremities, and some showed improvement in complete flaccid paralysis of their upper extremities. The effects of MSC transplantation are thought to be due to both donor and host cells, and are characterized by various mechanisms operating at different times and different sites. This may explain why the recovery course seen in this study differed from the conventional course. Points to reconsider include the development of new measures of effectiveness, and different approaches to rehabilitation and goal setting.

Most methods of assessing stroke are based on data obtained by observing the course of spontaneous functional recovery. The various recovery processes induced by MSC transplantation, which differ from traditional processes, cannot be fully assessed by traditional methods; we need to develop new measures that account for treatment mechanisms. MSC transplantation is also likely to lead to recovery in smaller motor units, which we need to be able to assess in detail. One possible way is to use objective data obtained from 3D motion analysis. However, we also need a simpler assessment method that does not require special equipment.

Rehabilitation strategies also need to be reconsidered in order to increase the therapeutic effects of MSC transplantation. Neural cells start to regenerate soon after treatment and the process continues for several months; differentiation of donor cells into neural cells and activation of host cells continue, resulting in reconstruction of neural circuits. The key role of rehabilitation is to facilitate this reconstruction effectively and efficiently. We need to investigate what methods are most appropriate for reconstructing neural circuits, making use of existing and new methods. It is important to accurately activate the target neural circuit and increase its use; the key factors are the form, number of sessions and frequency of exercise.

We can expect a change in the overall goal of rehabilitation. Traditionally, the goal has been to help patients return to home and work, based on the prevailing idea that it is difficult to regenerate the impaired brain. In addition to preventing joint contractures and disuse syndrome, rehabilitation aims at maximizing the use of remaining function, using assistive devices to compensate for lost function, and enabling patients to perform daily living activities. Achievement of higher goals such as walking depends on how much function remains. Regenerative medicine using MSC transplantation will overturn current ideas on rehabilitation and will fundamentally change rehabilitation strategies. MSC transplantation promises further improvement in the functions of the extremities and trunk, and so we can set higher goals and see higher success rates.

2. SPINAL CORD INJURY

2.1 The need for a new treatment

Spinal cord injuries occur when the spinal column is subjected to a powerful external force, usually trauma. The most common causes are traffic accidents, followed by sport- or work-related accidents and falls from stairs. There are 100,000 affected patients in Japan, and an estimated 5,000 people are injured each year. The cost of healthcare in the first year after an injury is over 10 million yen per patient; the total annual healthcare cost for those who are newly injured is 50 billion yen. According to a closed commercial report by Thomson Reuters, social security for spinal-cordinjury patients costs more than 10 billion yen globally each year. In addition, there are large financial losses, including lost employment opportunities for patients with spinal cord injury and for family members who provide care. When the spinal cord is injured, the patient loses movement and sensation in the arms and legs below the level of injury. The higher the injury, the more extensive the paralysis and the more severe the disability. Damage at the thoracic or lumbar level can cause paralysis of the lower body, whereas damage at the cervical level can produce quadriplegia. Unfortunately, it is impossible to regenerate the injured spinal cord using current medical techniques, so development of a new treatment has been eagerly anticipated for years. In Japan, many of these patients are young, and most of them must live with serious disabilities for the rest of their lives.

Currently, there are three standard treatment methods, none of which provide satisfactory outcomes.

1. Decompression and stabilization surgery during the acute phase

It is impossible to repair the injured spinal cord itself by surgery. The main purpose of surgery is to reduce and stabilize fractures and dislocations of the spinal column. A direct therapeutic effect on residual disability cannot be expected from surgery.

2. High-dose methylprednisolone therapy during the acute phase

Within 8 hours of injury, methylprednisolone 30 mg/kg is given over 15 minutes, followed after a further 45 minutes by continuous infusion of 5.4 mg/kg/h for 23 hours. However, this treatment has many side effects, and its therapeutic effect is being re-examined.

3. Rehabilitation

Rehabilitation centres mainly on physical and occupational therapy, in which patients practice activities of daily living with the aim of returning to their social activities. However, rehabilitation has very limited therapeutic effect. Rehabilitation for spinal cord injuries does not aim to recover lost functions; rather its main aim is to make the most effective use of remaining functions and to enable patients to perform activities of daily living.

2.2 Research overview

The basic research we have conducted over many years leads us to expect that autologous MSCs (STR01) (the study drug used in investigatorsponsored trials for cerebral infarction) will also be effective for spinal cord injury^{28,29,38}. We are therefore attempting to expand the indication of this investigational drug to spinal cord injury. We submitted a clinical trial notification in October 2013 and started an investigator-sponsored trial (phase II: open label, exploratory trial). The proposed indication is "improvement of neurological symptoms and signs and functional disability associated with spinal cord injury (therapeutic classification code: other biological products 639)." This trial is registered in the Clinical Trials Registry of the Japan Medical Association Center for Clinical Trials (https://dbcentre3.jmacct.med.or.jp/jmactr/App/JMACTRE02_04/JMACTRE02_04.

Neuroradiological, histological and behavioural improvement has been seen in rat models of spinal cord injury after intravenous transplantation of MSCs^{28,29,38}. Treatment mechanisms may include neuroprotective, neuroregenerative, angiogenic and anti-inflammatory effects^{28,29,38}. Treatment was found to be effective not only in the hyperacute phase^{29,38} but also in the chronic phase²⁸, demonstrating a relatively broad therapeutic time window.

Most studies on regenerative medicine for spinal cord injury adopt the method of directly transplanting cells into the injury site. However, this necessitates inserting a needle into the injured spinal cord to infuse cells, which risks causing additional damage. Direct transplantation also has limited potential treatment mechanisms. Furthermore, even if efficacy can be demonstrated in animal models, the potential risk is considered too high for humans. In this trial, however, autologous MSCs are delivered through intravenous infusion; this procedure is simpler, less invasive and allows the administered cells to reach the entire damaged area due to their natural capacity to accumulate at the injury site. Treatment is expected to produce excellent results. Intravenously administered MSCs are known to induce regeneration of the motor areas of the cerebral cortex in rats with spinal cord injury³⁸. To maximize the possible therapeutic effect, it is important to induce regeneration of the entire CNS and not just at the spinal cord injury site. Consequently, intravenous injection, which can deliver cells to the entire CNS, is considered a better administration route.

At present, techniques exists to alleviate the damage of spinal cord injury (surgery and drug therapy during the acute phase, followed by rehabilitation), but no techniques can repair the damaged spinal cord itself. MSC administration could become a breakthrough therapy.

2.2.1 An investigator-sponsored trial of STR01 in spinal cord injury

We aim to establish a completely new treatment for spinal cord injury in this investigator-sponsored trial. The indication for this investigational treatment is "improvement of neurological symptoms and signs, impaired activities of daily living, and functional disability associated with spinal cord injury."

Basic research and preclinical proof of concept studies conducted to date suggest that the action mechanisms of this treatment may include accumulation of transplanted cells in the lesions (homing effect); neurotrophic, neuroprotective and anti-inflammatory effects of transplanted cells via neurotrophic factors; remyelination of demyelinated axons; neural regeneration (differentiation into neural cells), regeneration of damaged axons and axonal sprouting; stabilization of the blood–spinal cord barrier. Since transplanted cells exert multiple therapeutic effects at different times and sites, we can expect very good therapeutic effects after a single treatment.

This treatment is expected to produce greater therapeutic effects than existing treatments since it will minimize neural damage caused by spinal cord injury, inhibit progression of delayed secondary neural injury and facilitate recovery and regeneration of neural cells and axons. Standard treatment cannot repair the damaged spinal cord. In contrast, this new treatment is expected to actively repair the injured spinal cord by the multifaceted mechanisms described above.

The three measures used to assess improvement of neurological symptoms and signs, impaired activities of daily living and functional disability associated with spinal cord injury are:

- ASIA Impairment Scale, developed by the American Spinal Injury Association (ASIA), which is used as the primary outcome measure for assessing improvement in impaired movement and perception
- International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury (ISCSCI-92) designed by ASIA
- Spinal Cord Independence Measure (SCIM-III), an activity of daily living measure designed specifically for spinal cord injury.

Patients included in the trial are those with cervical cord injury (severe cases categorized as grade A, B or C in the ASIA Classification). First registration occurs within a few weeks of spinal cord injury. This is immediately followed by collection of bone marrow and culture of mesenchymal stem cells. The cells are administered intravenously on day 40, and efficacy and safety are evaluated on day 220 (about 6 months after treatment). This clinical trial has already been completed, and the Japan Ministry of Health, Labor and Welfare officially approved "Condition-al/Time-limited Authorization" (28 December 2018).

3. FUTURE PROSPECTS

Intravenous MSC therapy is known to be effective not only for localized brain ischemias such as cerebral infarctions, but also for global cerebral ischemias such as post-resuscitation encephalopathy³⁹. It has thus been suggested that intravenous administration of autologous MSCs will be effective for any type of ischemia and will have a wide range of applications. In short, this treatment can act as a potential neuroprotective agent during ischemia of the brain, spinal cord and nerves, and has various potential uses.

The treatment mechanisms of MSCs are wide ranging and include neurotrophic and neuroprotective effects via neurotrophic factors; angiogenic effects (recovery of blood flow); stabilization of the BBB; neural regeneration; and an increase in plasticity, which is believed to contribute greatly to therapeutic effects during the chronic phase. These effects are seen in both adult^{24,25} and developing brains³⁷. Intravenous administration of MSCs to a neonatal rat model of cerebral infarction has demonstrated increased plasticity of the normal side of the brain, increased brain volume and number of neural cells, and behavioural improvements³⁷.

MSCs have an inhibitory effect on abnormal neural circuits⁴⁰. Intravenous administration of MSCs in a rat epilepsy model has reduced epileptic seizures by inhibiting abnormal neural circuits and increasing the number of inhibitory GABA neurons⁴⁰. Thus, MSCs have complementary effects on the CNS when there is a deficit in neuronal activity, and inhibitory effects when there excessive neuronal activity.

We can therefore safely say that MSCs greatly contribute to self-healing. In animal studies, their effectiveness has already been demonstrated in various neurological diseases including:

- chronic cerebral infarction^{13,19}
- cerebral hemorrhage¹⁷
- chronic spinal cord injury²⁸
- post-resuscitation encephalopathy³⁹
- Parkinson's disease⁴¹
- prion disease³⁵
- hypoxic ischemic encephalopathy in the developing brain³⁷
- epilepsy⁴⁰
- brain tumours⁴²
- peripheral nerve injury^{43,44}

Regenerative medicine using somatic stem cells, including bone marrow transplantation, is expected to be put to practical use very soon because it has a high safety profile, allows for autotransplantation, and some of its techniques are already being used. In particular, since MSCs can be cultured and expanded from very small amounts of bone marrow, they are increasingly being recognized as convenient cells for clinical application.

MSCs have the potential to cause a paradigm shift in treatment strategies for refractory neurological diseases including stroke and spinal cord injury, and we anticipate that the indications for "autologous mesenchymal stem cells (STR01)" to be expanded to many refractory neurological diseases.

REFERENCES

- Akiyama, Y., Honmou, O., Kato, T., Uede, T., Hashi, K. & Kocsis, J. D. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 167, 27–39 (2001).
- Honmou, O., Felts, P. A., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Restoration of normal conduction properties in demyelinated spinal cord axons in the adult rat by transplantation of exogenous Schwann cells. *J. Neurosci.* 16, 3199–3208 (1996).
- Kato, T., Honmou, O., Uede, T., Hashi, K. & Kocsis, J. D. Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia* 30, 209–218 (2000).
- Oka S., Honmou O., Akiyama Y., Sasaki M., Houkin K. *et al.* Autologous transplantation of expanded neural precursor cells into the demyelinated monkey spinal cord. *Brain Res.* 1030, 94–102 (2004).
- Akiyama, Y., Radtke, C., Honmou, O. & Kocsis, J. D. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 39, 229–236 (2002).
- Iihoshi, S., Honmou, O., Houkin, K., Hashi, K. & Kocsis, J. D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* 1007, 1–9 (2004).
- Inoue, M., Honmou, O., Oka, S., Houkin, K., Hashi, K. *et al.* Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia* 44, 111–118 (2003).
- Sasaki, M., Honmou, O., Akiyama, Y., Uede, T., Hashi, K. *et al.* Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 35, 26–34 (2001).
- Harada, K., Honmou, O., Liu, H., Bando, M., Houkin, K. *et al.* Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res.* 1134, 206–213 (2007).
- Honma, T., Honmou, O., Iihoshi, S., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp. Neurol.* **199**, 56–66 (2006).

- Horita, Y., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Intravenous administration of GDNF gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *J. Neurosci. Res.* 84, 1495–1504 (2006).
- Kocsis, J. D. & Honmou, O. Bone marrow stem cells in experimental stroke. Prog. Brain Res. 201, 79–98 (2012).
- Komatsu, K., Honmou, O., Suzuki, J., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Res.* 1334, 84–92 (2010).
- Liu, H., Honmou, O., Harada, K., Nakamura, K., Houkin, K. *et al.* Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Brain* 129, 2734–2745 (2006).
- Nagahama, H., Nakazaki, M., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Namioka, T. *et al.* Preservation of interhemispheric cortical connections through corpus callosum following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral infarction. *Brain Res.* 1695, 37– (2018).
- Nakamura, H., Sasaki, Y., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. *et al.* Elevated brain derived neurotrophic factor levels in plasma reflect in vivo functional viability of infused mesenchymal stem cells for stroke in rats. *J. Neurosurg. Sci.* 63, 42–49 (2019).
- Nakazaki, M., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S., Namioka, T. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Neurosurg.* **127**, 917–926 (2017).
- Namioka, A., Namioka, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for protection against brainstem infarction in a persistent basilar artery occlusion model in the adult rat. *J. Neurosurg.* https://doi. org/10.3171/2018.4.JNS173121 (2018).
- Namioka, T., Namioka, A., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction. *J. Neurosurg.* https://doi.org/10.3171/2018.5.JNS18140 (2018).
- Nomura, T., Honmou, O., Harada, H., Houkin, K., Hamada, H. et al. Intravenous infusion of BDNF gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neurosci.* 136, 161–169 (2005).
- Omori, Y., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin K. *et al.* Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* **1236**, 30–38 (2008).
- Onda, T., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 28, 329–340 (2007).
- Sasaki, M., Honmou, O., Radtke, C. & Kocsis, J. D. Development of a middle cerebral artery occlusion model in the nonhuman primate and a safety study of I.V. infusion of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 6, e26577 (2011).
- Sasaki, Y., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Nakazaki, M., Nagahama, H. et al. Synergic effects of rehabilitation and intravenous infusion of mesenchymal stem cells after stroke in rats. *Phys. Ther.* 96, 1791–1798 (2016).
- Suzuki, J., Sasaki, M., Harada, K., Bando, M., Kataoka, Y. *et al.* Bilateral cortical hyperactivity detected by fMRI associates with improved motor function following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat stroke model. *Brain Res.* 1497, 15–22 (2013).
- Toyama, K., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., H. *et al.* Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp. Neuro.* 216, 47–55 (2009).
- Ukai, R., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J. Neurotrauma* 24, 508–520 (2007).
- Morita, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Nakazaki, M., Nagahama, H. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a model of chronic spinal cord injury. *Neurosci.* 335, 221–231 (2016).
- Osaka, M., Honmou, O., Murakami, T., Nonaka, T., Houkin, K. *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.* 1343, 226–235 (2010).
- Matsushita, T., Kibayashi, T., Katayama, T., Yamashita, Y., Suzuki, S. et al. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci. Lett.* 8, 41–45 (2011).
 Sasaki, M., Radtke, C., Tan, A. M., Zhao, P., Hamada, H. et al. BDNF-hypersecreting
- Sasaki, M., Radtke, C., Tan, A. M., Zhao, P., Hamada, H. *et al.* BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 29, 14932–14941 (2009).
- Matsushita, T., Lankford, K. L., Arroyo, E. J., Sasaki, M., Neyazi, M. *et al.* Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp. Neurol.* 267, 152–164 (2015).
- Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., Niitsu, Y., Ishiai, S. *et al.* Intravenous administration of auto-serum expanded autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow into stroke patients. *Brain* 134, 1790–1807 (2011).
- Honmou, O., Onodera, R., Sasaki, M., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends Mol. Med.* 18, 292–297 (2012).
- Song, C. H., Honmou, O., Ohsawa, N., Nakamura, K., Hamada, H. *et al.* The effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prion. *J. Viral.* 83, 5918–5927 (2009).

- Kim, S., Honmou, O., Kato, K., Nonaka, T., Houkin, K. *et al.* Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone marrow-derived precursor cells. *Brain Res.* 1123, 27–33 (2006).
- Sakai, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S., Nakazaki, M. *et al.* Functional recovery after the systemic administration of mesenchymal stem cells in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *J. Neurosurg. Pediatr.* 22, 467–599 (2018).
- Oshigiri, T., Sasaki, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Nakazaki, M. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells alters motor cortex gene expression in a rat model of acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma* https://doi.org/10.1089/ neu.2018.5793 (2018).
- Zheng, W., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Liu, H. et al. Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia. Brain Res. 1310, 8–16 (2009).
- Fukumura, S., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. & Nakazaki, M. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells reduces epileptogenesis in a rat model of status epilepticus. *Epilepsy Res.* 141, 56–63 (2018).
- Inden, M., Takata, K., Nishimura, K., Kitamura, Y., Ashihara, E. *et al.* Therapeutic effects of human mesenchymal and hematopoietic stem cells on rotenone-treated Parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* **91**, 62–72 (2013).
- Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M. *et al.* Anti-tumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11, 1155–1164 (2004).
- Matsuda, Y., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Takayanagi, A. & Kobayashi, K. *et al.* Intravenous infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces erectile dysfunction following cavernous nerve injury in rats. *Sex. Med.* 6, 49–57 (2018).
- Takayanagi, A., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Kobayashi, K., Matsuda, Y. et al. Intravenous preload of mesenchymal stem cells rescues erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. J. Sex. Med. 12, 1713–1721 (2015).

Tissue regeneration by Muse cells after acute myocardial infarction



Shinya Minatoguchi^{1,2}, Yoshihisa Yamada³, Shingo Minatoguchi³, Toshiki Tanaka³, Atsushi Mikami¹, Shohei Wakao⁴, Yoshihiro Kushida⁴ and Mari Dezawa⁴

¹Department of Circulatory and Respiratory Advanced Medicine, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan.

²Heart Failure Center, Gifu Municipal Hospital, Gifu, Japan.

³Department of Cardiology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan.

⁴Department of Stem Cell Biology and Histology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan.

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are promising for treating acute myocardial infarction. Specifically, animal studies conducted by researchers associated with the Translational Research Center for Medical Innovation (TRI) in Japan have shown that they improve cardiac function and attenuate left ventricular remodelling after acute myocardial infarction.

1. ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION: CURRENT TREATMENT AND THERAPEUTIC CHALLENGES

Acute myocardial infarction (AMI) is caused by a sudden occlusion of the coronary artery. The occlusion blocks blood flow, which delivers oxygen and nutrients to the myocardial tissue, and hence causes necrosis of the tissue. AMI leads to heart failure because of reduced cardiac function and left ventricular (LV) remodelling and is associated with high mortality¹.

After complete occlusion of the coronary artery, necrosis commences in the ventricular wall in the region that has lost the blood supply by the occluded coronary artery. Necrosis then gradually extends from the endocardium towards the epicardium. Because of this progression of necrosis, which is termed a wavefront phenomenon², early reperfusion after myocardial ischemia can confine myocardial necrosis to the subendocardial region, resulting in a smaller infarct size and less impairment of cardiac function. However, failure to perform early reperfusion results in a transmural infarct that extends from the endocardium to the epicardium. If the coronary artery involved is a large proximal blood vessel, massive myocardial infarction occurs and seriously impairs cardiac function. In the subacute and chronic phases, the infarcted LV wall undergoes remodelling, which thins the wall and increases the LV chamber diameter. This remodelling can lead to heart failure. Consequently, one of the major problems in treating AMI is that patients saved in the acute phase (about 1 week after onset) still have a risk of heart failure in the chronic phase and may have a poor prognosis.

The current first-line and most effective therapy for AMI is reperfusion of the occluded coronary artery, implemented as early as possible after AMI onset to save residual viable cardiomyocytes and minimize damage to the myocardium. The therapy involves diagnosing as soon as possible after AMI and transporting the patient to a catheterization laboratory, where the occluded coronary artery is revascularized by percutaneous coronary intervention (PCI) to restore blood flow to myocardial tissue. Patients who received reperfusion within 60 minutes from AMI onset had a good prognosis, whereas prognosis was significantly poorer if reperfusion was delayed for longer than 120 minutes³. Reperfusion by PCI within 90 minutes of onset is considered the gold standard, but AMI patients commonly fail to receive therapy within 90 minutes, if they receive it at all⁴. Reperfusion may also fail. Therefore, AMI treatment with reperfusion by PCI alone is not enough to improve prognosis.

The process of LV remodelling during the transition from the subacute to the chronic phase is complex and closely related to the healing process, including hypertrophy of residual cardiomyocytes and reconstruction of the LV by non-cardiomyocytes such as stromal cells^{5.6}. The extent to which cardiac function recovers after AMI depends on the effect of remodelling on the healing process of the AMI lesion. If pluripotent stem cells that can differentiate into cardiomyocytes could be efficiently engrafted into the infarcted area and replace dead cardiomyocytes during the healing process, cardiac function impairment

SUMMARY

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are non-tumorigenic pluripotent stem cells that exist naturally in the human body. A clinical study in 79 acute myocardial infarction (AMI) patients showed that Muse cells increased during the acute phase of AMI. Also, patients with high Muse cell numbers in the acute phase showed improved cardiac function and attenuation of left ventricular remodelling 6 months after AMI, suggesting that an increased number of Muse cells in the peripheral blood is associated with improved cardiac function and attenuated left ventricular remodelling. After intravenously injecting Muse cells derived from the bone marrow into the rabbit AMI model upon the onset of infarction, Muse cells homed in on the infarct region and then differentiated into cardiomyocytes and blood vessels. Muse cells were shown to have a paracrine effect, which is associated with reduced infarct size, improved cardiac function, and attenuated ventricular remodelling. These results confirmed the safety and efficacy of Muse cells. Clinical trials of AMI treatment using Muse cells are ongoing.

CORRESPONDING AUTHOR

Shinya Minatoguchi E-mail: minatos@gifu-u.ac.jp



From Ref. 16 © 2019 Japanese Circulation Society



and LV remodelling, as well as heart failure in the chronic phase, could be prevented and the patient's prognosis improved. Autologous stem cells derived from the bone marrow (BM) have been used, and various regenerative effects have been reported^{7,8}. Clinical application of autologous cells should be straightforward since there are no ethical concerns with their use. Many clinical studies of tissue repair and regeneration therapy after AMI have been conducted worldwide using BM nucleated cells and BMderived mesenchymal stem cells (MSCs)^{7,8}. In placebo-controlled studies, the therapy showed no or minimal improvement in cardiac function in the chronic phase^{7,8}. These limitations of postinfarct regenerative therapy using BM nucleated cells or BM-derived MSCs as a cell source have prompted a search for an alternative cell source that readily differentiates into cardiomyocytes and has a potent repair and regenerative ability.

In 2010, Dezawa *et al.* discovered multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells⁹. Muse cells are selected as cells positive for stagespecific embryonic antigen-3 (SSEA-3), a cell surface marker for pluripotent stem cells⁹⁻¹². Muse cells also express pluripotency markers such as Sox2, Oct3/4 and Nanog, and they can differentiate into cells of all three germ layers (ectodermal, mesodermal and endodermal lineage cells) from a single cell⁹. Moreover, Muse cells reside naturally in the human body and are located in the BM⁹, skin¹⁰, adipose tissue^{12,13}, connective tissue of various organs¹⁴ and peripheral blood^{15,16}. Because Muse cells are pluripotent stem cells and the therapy does not require gene transfer, they should be safe and clinical application should be straightforward. Reports have shown that about 1 million Muse cells can be collected from approximately 30 mL of fresh human BM aspirates cultured for 3 days^{14,17}. This ease of culture suggests that therapy using Muse cells are considered feasible for clinical application.

2. MUSE CELL NUMBERS IN THE BLOOD OF ACUTE-PHASE AMI PATIENTS AFFECT CARDIAC FUNCTION AND LV REMODELLING IN THE CHRONIC PHASE

The existence of Muse cells in the peripheral blood has previously been documented for ischemic stroke patients¹⁵, but the kinetics of Muse cells in the peripheral blood of AMI patients during the acute phase had not been characterized. We thus investigated changes in the number of Muse cells in the blood during the acute phase in 79 AMI patients admitted to Gifu University Hospital (AMI group). We also investigated the effect of the change in Muse cell numbers on cardiac function and LV remodelling 6 months after the onset of AMI. The results were compared with two further groups: a coronary artery disease (CAD) group (n = 44) consisting of patients with \geq 75% coronary artery stenosis on coronary angiography and a control group (n = 64) consisting of patients with <75% coronary artery stenosis on coronary angiography and a control group (n = 64) consisting of patients with <75% coronary artery stenosis. Muse cell numbers (cells/100 µL) in the peripheral blood were determined as SSEA3⁺/CD105⁺ double-positive cells by fluorescence-activated cell sorting¹⁶. Muse cell numbers in the blood were measured on the day of admission (day 0) and at 1, 7, 14 and 21 days after AMI.

We obtained the following results¹⁶. No significant difference was detected in Muse cell numbers between the AMI group and the control group on the day of admission. Muse cell numbers in the AMI group



Figure 2. A, Effects of autograft Muse cells, non-Muse cells and MSCs on infarct size (2 weeks after AMI). B, Effects of autograft Muse cells, non-Muse cells, and MSCs on infarct size (2 months after AMI). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; AMI, acute myocardial infarction; MSC, mesenchymal stem cell

p < 0.03; p < 0.01; p < 0.01; AMI, acute myocardial infarction; MSC, mesenchymal stem c Reproduced from Ref. 19.

peaked 24 hours after AMI onset and were significantly higher than on the day of admission. This significant increase was maintained at 7 days. After 14 days, the Muse cell numbers had decreased significantly, and by 21 days they had returned to baseline (Fig. 1A). Muse cell numbers in the blood in the CAD and control groups were not significantly different (Fig. 1B).

These results demonstrate that Muse cell numbers in the peripheral blood do not increase in CAD patients with significant coronary artery stenosis, but are mobilized into blood only when AMI occurs, causing necrosis of myocardial tissue. MAX Muse was defined as the maximum number of Muse cells measured within 21 days of admission due to AMI (up to 21 days), and Δ Muse was defined as the difference in Muse cell numbers between MAX Muse and the minimum number. Both the peak creatine kinase (PCK) level after AMI onset and Σ CK, the sum of creatine kinase levels, are considered measures of myocardial infarct size¹⁸. A high Δ Muse in patients with a high PCK or Σ CK was associated with a large infarct size; that is, the more damaged the myocardium was, the more Muse cells were mobilized. We also measured plasma sphingosine-1-phosphate (S1P) levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Plasma S1P levels in the AMI group were significantly higher than in the control group, whereas plasma S1P levels in the CAD and control groups were not significantly different. Plasma S1P levels and MAX Muse showed a significant positive correlation $(r = 0.330)^{16}$. These results suggest that S1P might be involved in mobilizing Muse cells in the blood¹⁶.

We then investigated the effect of the number of Muse cells mobilized in the acute phase on cardiac function and LV remodelling in the chronic phase (at 6 months). The results were as follows. Δ Muse (maximum – minimum Muse cell number) was significantly higher in patients with improved cardiac function, as measured by ejection fraction (EF), in the chronic phase (at 6 months) than in patients without an improvement in EF (Fig. 1C); Δ Muse was also significantly higher in patients with decreased LV end-diastolic dimension (LVDd) (that is, attenuated LV remodelling) than in patients with increased LVDd (that is, accelerated LV remodelling) in the chronic phase (Fig. 1D). These results demonstrate that cardiac function is improved and LV remodelling is attenuated in the chronic phase if large numbers of Muse cells are mobilized into the peripheral blood during the acute phase of AMI¹⁶. Administering exogenous Muse cells in the acute phase is thus expected to improve cardiac function and attenuate LV remodelling in the chronic phase.

3. TISSUE REPAIR/REGENERATION THERAPY FOR INFARCTED MYOCARDIUM USING MUSE CELLS 3.1 Effect on infarct size, cardiac function, and LV remodelling

We conducted an *in vitro* study to investigate the differentiation of Muse cells into cardiomyocytes by culturing rabbit BM-derived Muse cells and human BM-derived Muse cells. Muse cells differentiated into cardiomyocyte-like cells that expressed cardiac troponin I and sarcomeric α-actinn¹⁹. To develop a tissue repair and regeneration therapy for human MI using Muse cells and to demonstrate the efficacy and safety of the therapy *in vivo*, we developed a rabbit AMI model by occluding the coronary artery of Japanese white rabbits for 30 minutes and reperfusing it (ischemia reperfusion model)¹⁹.

The current first-line therapy for AMI is revascularization of the occluded coronary artery by PCI using a cardiac catheter. Therapy using au-



Figure 3. A, Nano-lantern-labelled Muse cells accumulated in the infarct area, but non-Muse cells did not (2 weeks after AMI). B, Nano-lantern-labelled Muse cells detected in the infarct area did not accumulate when co-injected with JTE-013, an antagonist selective for S1PR2 (2 weeks after AMI). C, Numbers of Muse cells engrafted in the infarct area with and without JTE-013 estimated from immunohistochemical analysis 3 days after AMI. D, S1P levels in the infarct area and the border area of infarcted and normal myocardial tissue. S1P, sphingosine-1-phosphate; S1PR2, sphingosine-1-phosphate receptor 2 * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; Reproduced from Ref. 19.

tograft Muse cells would be worth developing if it were found to be more effective in improving cardiac function and attenuating LV remodelling than stem-cell therapies primarily involving autograft MSCs, which have been used in clinical studies to date.

The effects of 3×10^5 autograft Muse cells intravenously infused into rabbit 24 hours after AMI onset (the Muse group) were compared with an equal number of autograft MSCs (the MSC group). As MSCs include several percent of Muse cells, the effects of MSCs that do not include Muse cells (the non-Muse group) were also studied. The parameters studied were the myocardial infarct size and those that indicate LV function: LV ejection fraction (EF%), LV fractional shortening (FS%), LV systolic function (+dP/dt) and LV diastolic function (-dP/dt); and those that indicate LV remodelling: LVDs and LVDd. These parameters were compared 2 weeks and 2 months after AMI in the Muse, non-Muse and MSC groups, as well as in a control group, which was injected with vehicle only. The results showed that the MSCs moderately reduced infarct size at both 2 weeks and 2 months compared with the control group, but that there was a marked reduction in infarct size in the Muse group, approximately two times greater than in the MSC group (Fig. 2A and 2B). The attenuating effect on LV remodelling and the effect on cardiac function improvement were also significantly greater in the Muse group than in the MSC group at 2 weeks and 2 months. The greater improvement achieved using Muse cells compared with conventional stem cells (MSCs) indicates that development of tissue repair/regeneration therapy using Muse cells for AMI would be clinically very significant.

As we anticipated, AMI treatment using Muse cells could potentially be more effective than conventional therapies. However, some problems arise when autograft Muse cells are used in clinical practice. Collecting BM aspirates from patients immediately after AMI onset in the acute phase is an invasive procedure. At least 7 days is required to isolate Muse cells from BM aspirates and culture a sufficient number of Muse cells for tissue repair and regeneration. It is thus more realistic in clinical practice to use allograft Muse cells, which can be administered within the optimal time window, instead of autograft Muse cells. When 3×10^5 allograft Muse cells derived from rabbit BM cells were intravenously infused into rabbits 24 hours after AMI onset, the reduction in infarct size at 2 weeks was comparable to that seen with autograft Muse cells¹⁹. The effect of allograft Muse cells persisted for a long time — the effects of allograft Muse cells in reducing infarct size, improving LV function and attenuating LV remodelling were sustained for 6 months after AMI¹⁹.

3.2 Mechanism of engraftment of Muse cells into the infarct region

One remarkable characteristic of Muse cells intravenously injected after AMI was preferential engraftment into the infarct area. Engraftment in the MI site was investigated using Muse and non-Muse cells labelled with the luminescent Nano-lantern protein. Muse cells were engrafted into the infarct region but non-Muse cells were not (Fig. 3A). Co-injection of Muse cells with JTE-013, an antagonist selective for sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2), significantly blocked the engraftment of Muse cells onto the infarct region (Fig. 3B). Histological analyses of Muse cell engraftment 3 days after AMI also showed that Muse cells were engrafted into the infarct area, and that this engraftment was substantially inhibited by co-injection with JTE-013 (Fig. 3C). The engraftment rate of Muse cells was 14.5% at 3 days¹⁹. Given that the engraftment rates usually reported for MSCs are 0-3%^{20,21}, the rate for Muse cells is high. The S1P levels were significantly higher in the infarct area and the infarct border area than in the corresponding areas in normal myocardial tissue (Fig. 3D). This result is due to the preferential engraftment of intravenously injected Muse cells into the border area and the infarct area. An in vitro assay using a Boyden chamber to quantify Muse cell migration showed that the number of migrated



Figure 4. A–D, GFP-labelled autograft Muse cells engrafted into the infarcted myocardial region expressed cardiac markers ANP, troponin I and α-actinin (2 weeks after AMI). GFP-labelled Muse cells also expressed connexin-43 between themselves and host cardiomyocytes (2 weeks after AMI). **E–H**, GFP-labelled autograft Muse cells engrafted into the infarct myocardial region expressed cardiac markers ANP, troponin I and α-actinin (2 months after AMI). AMI, acute myocardial infarction; ANP, atrial natriuretic peptide; GFP, green fluorescent protein Reproduced from Ref. 19.

Muse cells increased significantly and in a dose-dependent manner in response to the S1PR2 agonist SID46371153. A marked level of migration of Muse cells towards affected cardiac tissue was observed, but this migration was blocked in a dose-dependent manner by JTE-013. S1PR2 is expressed on the surface of Muse cells. Silencing S1PR2 on Muse cells using siRNA significantly inhibited migration of Muse cells towards the S1PR2 agonist SID46371153 or AMI cardiac tissue¹⁹. These *in vivo* and *in vitro* data indicate that the S1P–S1PR2 axis is involved in the mechanisms of migration and engraftment of Muse cells into AMI cardiac tissue.

3.3 Differentiation of Muse cells into cardiomyocytes

Thin sections of affected cardiac tissue were stained 2 weeks after AMI to investigate the expression of cardiac markers atrial natriuretic peptide (ANP), troponin I, sarcomeric *a*-actinin and gap-junction marker connexin-43 in engrafted Muse cells. Confocal microscopy showed that green fluorescent protein (GFP) used to label Muse cells merged with ANP, troponin I and sarcomeric a actinin around the border area. Expression of cardiac markers on Muse cells confirmed differentiation of these cells into cardiomyocytes (Fig. 4A, 4B and 4C). Moreover, the expression of connexin 43 between the Muse cells that had differentiated into cardiomyocytes and the host cardiomyocytes suggested potential intercellular propagation of excitation and signalling between these cells via gap junctions (Fig. 4D). Two months after AMI, GFP-labelled Muse cells expressed lower levels of ANP and higher levels of troponin I and sarcomeric α -actinin (Fig. 4E, 4F, 4G and 4H). Sarcomeric α -actinin-positive cells showed clear striations characteristic of mature cardiomyocytes (Fig. 4H). GFPlabelled allograft Muse cells also expressed ANP, troponin I and actinin at 2 weeks and still expressed troponin I and actinin at 6 months¹⁹. These results indicate that cardiomyocytes that had differentiated from allograft Muse cells remained in the heart for at least 6 months¹⁹.

We then investigated whether cardiomyocytes that had differentiated from Muse cells were playing a functional role as working myocardium in the beating heart. GCaMP3-labelled human Muse cells were transplanted into AMI cardiac tissue in the rabbit AMI model. GCaMP is a calcium sensor protein obtained by genetically engineered fusion of enhanced GFP (EGFP), calmodulin (CaM) and myosin light chain fragment (M13). When a calcium ion binds to calmodulin, an interaction between the Ca²⁺/CaM complex and M13 induces a conformational change in EGFP (fluorophore), which changes the fluorescence intensity. This change in GCaMP fluorescence intensity can be used to detect changes in the calcium concentration. Two weeks after infarction, thoracotomy was performed to observe the postinfarct heart with an epifluorescence stereomicroscope (Nikon, SMZ745T) equipped with an EXFO X-Cite[®] illumination source. A time-intensity curve showed that a green signal synchronous with ECG recordings was intensified during systole and became less intense during diastole¹⁹. This signal represented the changes in intracellular Ca2+ concentration in cardiomyocytes that had differentiated from Muse cells, demonstrating that differentiated cardiomyocytes were functioning as working myocardium.

3.4 Differentiation of Muse cells into blood vessels and paracrine effect Two weeks after AMI, GFP-labelled Muse cells expressed vascular endothelial marker CD31 and vascular smooth muscle cell marker α -smooth muscle actin, and they formed blood vessels. The Muse group had significantly more capillaries in the border area than the control, non-Muse and MSC groups (Fig. 5A and 5B). Muse cells have a paracrine effect that is also observed in MSCs. Vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were detected in the culture supernatant of Muse cells¹⁹. After intravenous injection of Muse cells, VEGF, HGF,



Figure 5. A, Numbers of CD31-positive blood vessels in the infarct border area 2 weeks after AMI (comparison of vehicle control, Muse, non-Muse and MSC groups). **B**, GFP-labelled Muse cells expressed vascular endothelial marker CD31 and vascular smooth muscle marker α-smooth muscle actin (2 weeks after AMI). **C**, Western blot showing the expression of HGF, VEGF, MMP-2 and MMP-9 in the infarct border area 3 days after AMI (vehicle control, Muse, non-Muse and MSC groups). **D**, Comparison of TUNEL-positive cardiomyocytes in the infarct border area (vehicle and Muse groups). **E**, Comparison of areas of the Sirius Red-positive region in the infarct regions (vehicle and Muse groups). **e**, constrained with a constrained area (vehicle and Muse groups). **e**, comparison of areas of the Sirius Red-positive region in the infarct regions (vehicle and Muse groups). **e**, constrained with a constrained area (vehicle and Muse groups). **e**, comparison of areas of the Sirius Red-positive region in the infarct regions (vehicle and Muse groups). **e**, constrained with a constrained area (vehicle and Muse groups). **e**, comparison of areas of the Sirius Red-positive region in the infarct regions (vehicle and Muse groups). **e**, constrained area (vehicle and Muse groups). **e**, constrained area (vehicle and Muse groups). **e**, constrained area (vehicle and Muse groups). **e**, constrained areas (vehicle and Muse groups). **e**, constrained area (vehicle and muse g

MMP-2 and MMP-9 were expressed in the infarct border area, as was observed with MSCs. The level of VEGF expression was particularly high compared with MSCs and non-Muse (Fig. 5C). VEGF and HGF are angiogenic factors^{22,23}, and HGF exhibits an anti-apoptotic effect²³. MMP-2 and MMP-9 have antifibrotic or fibrolytic effects²⁴. Administration of Muse cells reduced the number of terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL)-positive cells in the infarct border area, indicating that Muse cells have an anti-apoptotic effect (Fig. 5D). The area of the Sirius Red-positive region in the infarct area was also reduced (Fig. 5E). These results indicate that Muse cells are very likely associated with the increased number of capillaries in the border area, the reduced area of the fibrotic scar region in the infarct area, and the reduced infarct size.

3.5 Immunomodulatory effect of Muse cells

Because Muse cells do not express human leukocyte antigen (HLA)-DR (HLA class II) on the cell surface, they are not attacked by T cells¹⁹. Furthermore, because Muse cells express HLA-G, a protein that is present in the placenta to prevent the fetus from being attacked¹⁹, they exert immunomodulatory effects and are not attacked by the host receiving Muse cells. These characteristics may partially explain why Muse cells are not eliminated and persist in the infarct area for a long time after engraftment.

3.6 Significance of the persistence of Muse cells in the infarct area

When the rabbit AMI model was co-injected with the selective S1PR2 antagonist JTE-013 and allograft Muse cells, the therapeutic effects of these cells in terms of reducing infarct size and improving cardiac function at 2 weeks were reduced (Fig. 6). When the suicide gene herpes simplex virus thymidine kinase (*HSV-tk*) was introduced into human Muse cells and these cells were then injected intravenously into AMI rabbits, the human Muse cells were destroyed after engraftment and their effects in terms of reducing infarct size and improving cardiac function (EF) were largely abolished¹⁹.

Human Muse cells were transplanted after silencing the gene coding for GATA4, a transcription factor expressed during the generation of cardiomyocytes, using siRNA. Reduction in infarct size and EF improvement were significantly attenuated 2 weeks after AMI. Histological analysis showed no differentiation of GFP-labelled Muse cells into cardiomyocytes. The observed attenuation of the effects of the human Muse cells can thus be attributed to blockage of differentiation of the Muse cells into cardiomyocytes by *GATA4* silencing¹⁹.

These findings indicate that Muse cells are involved in reducing infarct size and improving cardiac function by persisting in the infarct area, differentiating into cardiomyocytes, regenerating blood vessels, and exhibiting paracrine effects such as anti-apoptotic and antifibrotic effects.

REFERENCES

- Sutton, M. J., Pfeffer, M. A., Moye, L., Plappert, T., Rouleau, J. L. *et al.* Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction. *Circ.* 96, 3294–3299 (1997).
- Reimer, K. A. & Jennings, R. B. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab. Invest.* 40, 633–644 (1979).



Figure 6. Effect of sphingosine-1-phosphate receptor 2 [S1PR2] antagonist JTE-013 on the reduction in infarct size and improvement in cardiac function following administration of allograft Muse cells. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; Reproduced from Ref. 19.

- Cannon, C. P., Gibson, C. M., Lambrew, C. T., Shoultz, D. A., Levy, D. et al. Relationship of symptom-onset-to balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. JAMA 283, 2941–2947 (2000).
- Moscucci, M. & Eagle, K. A. Door-to-balloon time in primary percutaneous coronary intervention: Is the 90-minute gold standard an unreachable chimera? *Circ.* 113, 1048–1050 (2006).
- Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M. *et al.* Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ. Res.* 82, 1130–1138 (1998).
- Minatoguchi, S., Takemura, G., Chen, X.-H., Wang, N., Uno, Y. *et al.* Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colonystimulating factor treatment. *Circ.* 109, 2572–2580 (2004).
- George, J. C. Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials. *Trans. Res.* 155, 10–19 (2010).
- Fisher, S. A., Zhang, H., Doree, C., Mathur, A. & Martin-Rendon, E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst. Rev.* 9, CD006536 (2015).
- Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y. et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 107, 8639–8643 (2010).
- Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D. *et al.* Multilineagedifferentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 9875–9880 (2011).
- Kuroda, Y., Wakao, S., Kitada, M., Murakami, T., Nojima, M. *et al.* Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nature Protoc.* 8, 1391–1415 (2013).
- Heneidi, S., Simerman, A. A., Keller, E., Singh, P., Li, X. *et al.* Awakened by cellular stress: Isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PLoS One* 8, e64752 (2013).
- Kinoshita, K., Kuno, S., Ishimine, H., Aoi, N., Mineda, K. *et al.* Therapeutic potential of adipose-derived SSEA-3-positive Muse cells for treating diabetic skin ulcers. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 146–155 (2015).
- Wakao, S., Akashi, H., Kushida, Y. & Dezawa, M. Muse cells, newly found nontumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathol. Int.* 64, 1–9 (2014).
- Hori, E., Hayakawa, Y., Hayashi, T., Hori, S., Okamoto, S. *et al.* Mobilization of pluripotent multilineage-differentiating stress-enduring cells in ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 25, 1473–1481 (2016).
- Tanaka, T., Nishigaki, K., Minatoguchi, S., Nawa, T., Yamada, Y. *et al.* Mobilized Muse cells after acute myocardial infarction predict cardiac function and remodeling in the chronic phase. *Circ. J.* 82, 561–571 (2018).
- Dezawa, M. Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: direct contribution of Muse cells to tissue regeneration. *Cell Transplant.* 25, 849–861 (2016).
- Turer, A. T., Mahaffey, K. W., Gallup, D., Weaver, W. D., Christenson, R. H. *et al.* Enzyme estimates of infarct size correlate with functional and clinical outcomes in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 6, 12 (2005).

- Yamada, Y., Wakao, S., Kushida, Y., Minatoguchi, S., Mikami, A. *et al.* S1P–S1PR2 axis mediates homing of Muse cells into damaged heart for long-lasting tissue repair and functional recovery after acute myocardial infarction. *Circ. Res.* 122, 1069–1083 (2018).
- Nagaya, N., Fujii, T., Iwase, T., Ohgushi, H., Itoh, T. *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2670–H2676 (2004).
- Freyman, T., Polin, G., Osman, H., Crary, J., Lu, M. et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 27, 1114–1122 (2006).
- Isner, J. M. & Asahara, T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J. Clin. Invest. 103, 1231–1236 (1999).
- Chen, X. H., Minatoguchi, S., Kosai, K., Yuge, K., Takahashi, T. *et al.* In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. *J. Card. Fail.* **13**, 874–883 (2007).
- Mias, C., Lairez, O., Trouche, E., Roncalli, J., Calise, D. et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. Stem Cells 27, 2734–2743 (2009).

Stem-cell therapy: Cell-based neovascularization therapy for peripheral arterial disease



Yasuyuki Fujita and Atsuhiko Kawamoto

Institute of Medical Research and Development, Translational Research Center for Medical Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe, Japan

A neovascularization therapy developed by Translational Research Center for Medical Innovation (TRI) researchers in Japan and based on stem cells is showing great promise for treating chronic critical limb ischemia, offering hope to patients who are out of options.

1. INTRODUCTION

1.1 Pathology, epidemiology and treatment of chronic critical limb ischemia

A circulation disorder caused by the narrowing or occlusion of arteries in the limbs, peripheral arterial disease (PAD) is estimated to affect more than 200 million people globally¹, ranging from asymptomatic to severe. The most common underlying disease is arteriosclerosis obliterans (ASO) caused mainly by atherosclerosis; other underlying diseases include thromboangiitis obliterans (also known as Buerger's disease), vasculitis and autoimmune diseases.

Chronic critical limb ischemia (CLI) is defined as advanced PAD for which sufferers experience pain at rest and have ulcers or gangrene on their lower limbs (Fontaine classification stage III or more severe, or Rutherford classification category 4 or more severe) that persist for two weeks or longer. The end stage of PAD, CLI (also called chronic limb-threatening ischemia recently) generally has a very poor prognosis, being comparable with those of some advanced malignancies. It has a mortality rate of 25%, a survival rate of 30% after major amputation, and a CLI persistence rate of 20% at 1 year. Furthermore, CLI patients have a 5-year survival rate of 40–50%². The annual incidence of CLI is 500–1,000 per million in Europe and the United States. An estimated 250,000 amputations of lower limbs are performed annually because of CLI¹. The global number of patients with PAD has increased by 23.5% between 2000 and 2010², and there is concern that the number of patients may increase rapidly in the future. Amputation of lower limbs not only seriously deteriorates the patient's quality of life but also causes major social and economic loss.

The currently recommended therapeutic interventions for CLI include pain control, risk factor management, treatment of ulcers or gangrene, and, for suitable patients, revascularization by bypass surgery

1997~	2003~	2007~	2008~	2017~
Discovery of EPC (CD34* cell) in 1997	Phase I/IIa Clinical study (Japan)	Phase I/IIa Clinical study (US)	Phase II Investigator- initiated clinical study for medical device (Japan)	Phase II Sponsor-initiated clinical study for regenerative medicine product (Japan)
Non-clinical studies	Dose-escalation, single arm No-option CLI $N = 6: 1 \times 10^5$ cells/kg $N = 8: 5 \times 10^5$ cells/kg $N = 3: 1 \times 10^6$ cells/kg	Multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled No-option CLI $N = 7: 1 \times 10^5$ cells/kg $N = 9: 1 \times 10^6$ cells/kg N = 12: placebo	Single centre, single arm No-option CLI <i>N</i> = 11	Multicenter, randomized, controlled, open label No-option CLI <i>N</i> = 35

Figure 1. Lower limb neovascularization therapy using G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in CLI patients: path from nonclinical studies to clinical development. CLI, critical limb ischemia; EPC, endothelial progenitor cell; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor

SUMMARY

Chronic critical limb ischemia is a painful condition that often requires amputation of a lower limb and can prove fatal. A new treatment based on CD34⁺ stem cells has given good results in animal, nonclinical and clinical trials. A neovascularization therapy of the lower limbs using G-CSF-mobilized autologous CD34⁺ cells as the novel standard of care is currently being developed under the Japanese government's Sakigake Strategy. The approval of CD34⁺ cells as a regenerative-medicine product is expected to pave the way for extending application to diseases other than chronic critical limb ischemia.

CORRESPONDING AUTHORS

Yasuyuki Fujita E-mail: yasufujita-ths@umin.ac.jp

Atsuhiko Kawamoto E-mail: kawamoto@fbri.org or endovascular repair³. However, revascularization is unsuitable for approximately 25% to 40% of CLI patients because they lack the vein grafts needed for bypass surgery or have multiple extensive artery lesions or comorbidities^{1,4,5}. The primary goal of CLI treatment is to save the patient's life and limbs. Given that patients who are not suitable for revascularization or have refractory conditions have a very poor prognosis, it is socially and medically imperative to develop a treatment strategy for such 'nooption' CLI patients.

1.2 Neovascularization therapy using CD34⁺ cells for CLI patients

Basic and clinical research into endothelial progenitor cells (EPCs) took off after 1997, when Asahara and co-workers demonstrated that they are a subset (the CD34⁺ fraction) of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)⁶. Neovascularization therapy involving the transplantation of EPCs has attracted attention as a novel therapy for ischemic diseases. Clinical studies of neovascularization therapy using autologous bone marrow–derived CD34⁺ cells are being performed globally for diseases such as angina pectoris, acute myocardial infarction, dilated cardiomyopathy, cerebral infarction and CLI.

In 2003, we initiated a world-first phase I/IIa clinical study of lowerlimb neovascularization therapy using granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized autologous CD34⁺ cells in CLI patients and demonstrated safety and clinical efficacy⁷. Beginning in 2008, we conducted an investigator-initiated study of a CD34⁺ cell sorter in compliance with good clinical practice and again demonstrated efficacy and safety⁸. A multicentre, randomized comparative study (sponsor initiated) was started in December 2017 with the aim of obtaining regulatory approval for CD34⁺ cells as a regenerative medicine product (Fig. 1). This chapter overviews the background to these studies as well as the prospects for CD34⁺ cells as a regenerative medicine product.

2. NONCLINICAL STUDIES

2.1 Characteristics and kinetics of EPCs

Angiogenesis, which involves the proliferation and migration of pre-existing mature vascular endothelial cells, was originally proposed as the vascularization mechanism in adults. However, the identification of EPCs in adults as a subset (CD34⁺ cells) of PBMCs by Asahara and co-workers in 1997⁶ led to the new concept of vasculogenesis, which differs from angiogenesis in that it involves progenitor cells rather than mature endothelial cells. Neovascularization in adults is now thought to occur through interactions between angiogenesis and vasculogenesis.

EPCs exist within the peripheral blood as mononuclear cells expressing the hematopoietic stem cell surface antigen (CD34) and the early hematopoietic stem cell surface antigen (CD133)⁹. When isolated and cultured in an endothelial cell growth medium at an appropriate density, these cells differentiate into spindle-shaped adherent cells that express CD34, CD31, vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (also known as kinase insert domain receptor), Tie-2 and E-selectin. Also, their uptake of acetylated low-density lipoprotein has been confirmed^{6,10}.

Basic research using mouse or other animal models of bone-marrow transplantation has shown that EPCs are abundant in the bone marrow in adults. EPCs are forcefully mobilized from the bone marrow to the peripheral blood in conditions such as ischemia, inflammation, wounds, and tumorigenesis, or following the administration of cytokines such as G-CSF and granulocyte and macrophage colony stimulating factor, and hormones such as estrogen. They reach the neovascularization site by circulating blood, where they contribute to the formation of new blood vessels^{11,12}. These findings have been useful for establishing a method for collecting and isolating EPCs for neovascularization therapy (Fig. 2).

2.2 Nonclinical studies on EPC transplantation

Kalka and co-workers obtained EPCs by culturing PBMCs from healthy subjects, and they transplanted them into the nude mouse model of hindlimb ischemia. When EPCs were intravenously injected after two days of hind-limb ischemia, accumulation of transplanted cells at the isch-



Figure 2. Kinetics of EPCs. EC, endothelial cell; EPC, endothelial progenitor cell; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; PIGF, placental growth factor; SDF, stromal cell-derived factor; sKit L, soluble kit ligand; VEGF, vascular endothelial growth factor

emia site was histologically confirmed, indicating that they contributed to neovascularization in collaboration with mouse-derived vascular endothelial cells. Transplantation significantly improved the capillary density (observed histologically) and blood perfusion in the ischemic limbs (as measured by laser Doppler flowmetry). As a result, the limb salvage rate from necrosis due to severe ischemia was 59% in the EPC transplantation group, compared with only 7–8% in the control group¹³. Murohara and co-workers reported similar positive results after they collected EPCs from human umbilical cord blood and cultured and transplanted them into nude rats with hind-limb ischemia¹⁴. Losordo and co-workers also obtained favourable results after they collected and isolated CD34⁺ cells from the peripheral blood of healthy subjects who had received a subcutaneous injection of G-CSF and transplanted them into nude rats with hind-limb ischemia (unpublished data).

Nonclinical studies have also shown that EPC transplantation therapy is effective for treating other diseases such as myocardial infarction^{15,16}, cerebral infarction¹⁷ and refractory fracture¹⁸. These results theoretically support not only EPC transplantation but also transplantation of bone-marrow mononuclear cells (BMMCs, a cell group that includes hematopoietic and mesenchymal cells as well as EPCs). EPCs transplanted into the animal model of ischemia were directly integrated into new blood vessels in the ischemic tissue by vasculogenesis to form the vascular endothelium. The transplanted EPCs were found to produce various cytokines and vascular growth factors involved in angiogenesis, such as VEGF, hepatic growth factor, angiopoietin-1, stromal-cell-derived factor-1 alpha, insulin-like growth factor-1 and endothelial nitric



Figure 3. Fundamental principles of magnetic separation of CD34⁺ cells

Day 1-5	Day 5	C	Day 6
G-CSF subcutaneous injection	Leukapher- esis	Magnetic sorting of CD34 ⁺ cells	Intramuscular injection of CD34* cells
EPC mobilization	Total PBMCs harvest	EPC purification	EPC transplantation

Figure 4. Mobilization, harvesting, isolation and transplantation of CD34⁺ cells in CLI patients EPC, endothelial progenitor cell; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; PBMC, human peripheral blood mononuclear cell

oxide synthase^{19–21}, promoting the proliferation of the existing vascular endothelium and cellular migration (the paracrine effect). Moreover, EPCs have been shown to release not only angiogenesis-related proteins but also RNAs and exosomes containing microRNA, which contribute to the paracrine effect via gene-control mechanisms (Fig. 2)^{22,23}.

While transplantation can be performed using EPCs (CD34⁺ cells) isolated from BMMCs or PBMCs and purified, many methods for transplanting mononuclear cells (BMMC or PBMC transplantation) without isolating and purifying EPCs have been attempted in nonclinical studies. However, several studies have highlighted the risks associated with transplanting mixed cell groups, including ossification by osteoblasts, chondrification by chondroblasts and fibrosis by fibroblasts. The nonclinical study by Yoon and co-workers also showed that myocardial calcification occurred with high frequency when whole bone marrow cells were transplanted intramyocardially into the rat model of acute myocardial ischemia²⁴. We have also demonstrated that intramyocardial transplant of high-dose PBMCs into the rat model of acute myocardial ischemia led to intramyocardial hemorrhage with infiltration of many inflammatory cells and a reduced improvement in neovascularization and cardiac function. In contrast, transplantation of purified CD34⁺ cells alone was associated with an absence of adverse reactions, high levels of neovascularization and sustained recovery of cardiac function¹⁶. The in vitro EPC colony-forming assay developed by Masuda and coworkers showed that EPC colonies are formed from CD34⁺ cells at a







Figure 5. Changes with time in Rutherford's category and the proportion of CLI patients free of CLI in the four years after transplantation of CD34⁺ cells: results from the Japanese phase I/IIa clinical study

*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01 (compared with pre-transplant); CLI, critical limb ischemia.

high frequency, whereas colonies could not be obtained from CD34⁻ mononuclear cells even when using 100 times more cells, demonstrating a marked difference in vascularization potential between the EPC and non-EPC fractions²⁵. These fundamental research and nonclinical studies suggest that transplantation of purified EPCs is superior to BMMC or PBMC transplantation in terms of low invasiveness, therapeutic effect and safety.

3. CLINICAL STUDIES

3.1 Physiological significance of EPCs

Reports have shown that patients with diabetes mellitus and patients with many risk factors for arteriosclerosis have fewer EPCs circulating in their peripheral blood than healthy individuals and that EPCs in these patients have lower proliferative and migratory capacities^{26,27}. Arteriosclerosis patients with fewer EPCs in circulation have many risk factors for poor cardiovascular prognosis and reduced vascular endothelial function²⁸. Thus, EPCs have been shown to be one of the important intrinsic factors that determine the prognosis of patients with arteriosclerosis.

3.2 Phase I/IIa clinical study of neovascularization therapy for CLI patients

Based on the results from the nonclinical studies, we conducted a multicentre, single-blinded, dose-escalation phase I/IIa clinical trial of intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in CLI pa-



Figure 6. Changes with time in measures of signs and symptoms up to 52 weeks after transplantation of CD34⁺ cells into CLI patients: results from the exploratory investigatorinitiated study.

SPP, skin perfusion pressure; TBI, toe brachial pressure index; T_PO2, transcutaneous oxygen partial pressure

tients, which started in 20037. The study enrolled 17 CLI patients (five with ASO, including one on hemodialysis, and 12 with Buerger's disease). Mononuclear cells mobilized from the bone marrow to the peripheral blood by five days of G-CSF treatment were collected by leukapheresis with high efficiency, and CD34⁺ cells were further isolated using a magnetic-activated cell sorter (CliniMACS®) (Figs. 3 and 4). The isolated CD34⁺ cells, which had a mean purity of 92% and a mean cell viability of 87%, were transplanted to the ischemic lower limbs intramuscularly under lumbar spinal anesthesia (Fig. 4). No death or major amputation of lower limbs was reported for any patient in the year following treatment, and all patients maintained independent walking function. Healing of ulcers or necrosis, relief of ischemic pain and improvement over time in physiological measures (for example, toe brachial pressure index (TBI), transcutaneous oxygen partial pressure (TcPO₂) were observed, and 88% of patients were free of CLI one year after treatment²⁹. Long-term follow up over the four years following treatment revealed no deaths in the first two years. Four patients died of cardiac diseases after the first two years, but a relationship with the cell therapy was ruled out. No major amputation of lower limbs was reported. The proportion of patients free of CLI remained at over 80% (Fig. 5). Significant improvements were noted in TBI at four years and in TcPO2 at three years compared with pre-treatment data²⁹.

In the United States, Losordo and co-workers initiated a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study (study ACT34-CLI) in 2007, using transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in 28 patients with CLI caused by ASO³⁰. The incidence of minor and major amputations of lower limbs tended to be lower in the CD34⁺ cell transplantation group than in the placebo group at 6 months (P = 0.125) and 12 months (P = 0.054) after treatment. No adverse events related to the cell therapy were reported during the one-year follow-up period.

3.3 Investigator-initiated study of CD34 $^{\scriptscriptstyle +}$ cell sorter

Following the early clinical studies described above, we sought regulatory approval of the CD34⁺ cell sorter Isolex^{*}. We began an investigator-initiated study in 2008 in 11 CLI patients (seven with Buerger's disease and four with ASO who were not on dialysis), in compliance with good clinical practice for medical devices, and completed it in March 2012. This exploratory phase II study was the first investigator-initiated regenerative medicine study in Japan and is still the only Japanese clinical study of lower-limb neovascularization therapy by cell transplantation in which data reliability was assured in accordance with good clinical practice. This investigator-initiated study showed favourable safety and efficacy, as had been previously demonstrated in the phase I/IIa study described above. Measures of signs and symptoms, as well as quality-of-life indices, clinical severity, pain at rest, blood flow improvement indices, and walk test results, were evaluated frequently. Pain at rest improved soon after transplantation of CD34⁺ cells. Physiological improvement was confirmed, and improvement in Rutherford classification, the clinical severity index, was demonstrated at approximately 6 months (Fig. 6)⁸.

3.4 Sponsor-initiated study aiming for regulatory approval of CD34⁺ cells as a regenerative-medicine product

Based on the positive results from the phase I/IIa clinical study and the exploratory investigator-initiated study of the medical device, we currently aim to establish a neovascularization therapy of lower limbs using G-CSF-mobilized autologous CD34⁺ cells as the novel standard of care. When we initiated the exploratory investigator-initiated study in 2008, the company that was intending to file an approval application was trying to develop a CD34⁺ cell sorter and to file an application for a medical device, but following the completion of our study, the company decided to develop CD34⁺ cells instead and file an application for a therapeutic cell product.

If a CD34⁺ cell sorter were developed, it would be installed at each medical institution, and each step — G-CSF administration, apheresis, isolation of CD34⁺ cells, and cell transplantation — would be completed within the medical institution as a self-contained manufacturing process (Fig. 7). On the other hand, if a therapeutic cell product were developed, G-CSF administration and apheresis would be implemented at each medical institution, and the apheresis product would then be transported to an external cell-processing centre. The CD34⁺ would be isolated at the cell-processing centre and transported to each medical institution, where transplantation (treatment) would be performed (Fig. 7). Developing a therapeutic cell product has the advantages of easy and wide dissemination (because it is not necessary for every medical institution to install the cell sorter or employ technicians experienced in cell sorting) and a stable supply of high-quality products (because cell products are manufactured by experienced technicians under a more-controlled environment at a cell-processing centre than at general medical institutions). Disadvantages include a high manufacturing cost.

After the company developing the product had changed its plans, the cell-manufacturing process was commissioned to the Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe. Preparation for a clinical study was initiated in compliance with the structure and facility regulations, cell-manufacturing control, and quality standards based on the Ordinance on Standards of Manufacturing Control and

Stem Cell Therapy 3

IN-HOUSE PRODUCTION (NON-GCTP)



EXTERNAL PRODUCTION (GCTP)



Figure 7. Development of medical device (magnetic cell sorter) and cell product (CD34⁺ cells) for CD34⁺ cell therapy during clinical trials. GCTP: Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice

Quality Control for Cellular and Tissue-based Products (Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice). In 2013, the Pharmaceutical Affairs Law was amended, and the Law on Securing Ouality, Efficacy and Safety of Products including Pharmaceuticals and Medical Devices (Pharmaceutical and Medical Devices Act) was enacted. In addition to pharmaceuticals and medical devices, a new category of regenerative-medicine products was introduced for regulatory review. Following consultation with the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) regarding the amendment, we changed our product from the pharmaceutical category to the regenerative-medicine product category. After repeated consultations with the PMDA, the next-phase sponsor-initiated study was designed to be conducted as a multicentre, randomized, comparative study, aiming for regulatory approval of CD34⁺ cells under the category of regenerative-medicine products. The study was initiated in December 2017, and the first patient was enrolled in the same month. It is currently ongoing. In March 2018, this regenerative-medicine product was designated by the Ministry of Health, Labour and Welfare as an appropriate product for the Sakigake Strategy, which consists of the Sakigake Designation System and the Scheme for Rapid Authorization of Unapproved Drugs. This strategy identifies breakthrough medical devices, pharmaceuticals and regenerative-medicine products that are designed to treat serious diseases and are likely to be developed first in Japan. Such products are then given priority in consultations and reviews to reduce the review time for approval.

4. FUTURE PROSPECTS

The efficacy and safety of this cell therapy have been demonstrated not only for CLI and other ischemic diseases such as refractory angina pectoris³¹⁻³⁴, acute myocardial infarction^{35,36}, dilated cardiomyopathy³⁷⁻⁴², and cerebral infarction⁴³, but also in refractory fracture⁴⁴ and liver cirrhosis patients⁴⁵. The approval of CD34⁺ cells as a regenerative-medicine product is expected to pave the way for extending application to diseases other than CLI.

REFERENCES

- Fowkes, F. G., Rudan, D., Rudan, I., Aboyans, V., Denenberg, J. O. *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 382, 1329–1340 (2013).
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A. et al. Intersociety consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). J. Vasc. Surg. 45, S5–S67 (2007).
- Aboyans, V., Ricco, J.-B., Bartelink, M.-L. E. L., Björck, M., Brodmann, M. et al. 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 55, 305–368 (2018).
- Sprengers, R. W., Moll, F. L. & Verhaar, M. C. Stem cell therapy in PAD. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 39, S38–S43 (2010).
- Fadini, G. P., Agostini, C. & Avogaro, A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 209, 10–17 (2010).
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–966 (1997).
- Kawamoto, A., Katayama, M., Handa, N., Kinoshita, M., Takano, H. *et al.* Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in patients with critical limb ischemia: A phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 27, 2857–2864 (2009).
- Fujita, Y., Kinoshita, M., Furukawa, Y., Nagano, T., Hashimoto, H. *et al.* Phase II clinical trial of CD34+ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ. J.* 78, 490–501 (2014).
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M. *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002–5012 (1997).
- Gehling, U. M., Ergün, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K. *et al.* In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106–3112 (2000).
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M. *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434–438 (1999).
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C. *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221–228 (1999).
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3422–3427 (2000).
- Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K. *et al.* Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* **105**, 1527–1536 (2000).
- Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S. *et al.* Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circ.* **103**, 634–637 (2001).
- Kawamoto, A., Iwasaki, H., Kusano, K., Murayama, T., Oyamada, A. *et al.* CD34positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circ.* 114, 2163–2169 (2006).
- Taguchi, A., Soma, T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H. *et al.* Administration of CD34^{*} cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* **114**, 330–338 (2004).
- Fukui, T., Mifune, Y., Matsumoto, T., Shoji, T., Kawakami, Y. *et al.* Superior potential of CD34-positive cells compared to total mononuclear cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Trans.* 24, 1379–1393 (2015).
- Li, M., Nishimura, H., Iwakura, A., Wecker, A., Eaton, E. *et al.* Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circ.* 111, 1114–1120 (2005).
- Jujo, K., li, M. & Losordo, D. W. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. J. Mol. Cell Cardiol. 45, 530–544 (2008).
- Miyamoto, Y., Suyama, T., Yashita, T., Akimaru, H. & Kurata, H. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. J. Mol. Cell Cardiol. 43, 627–635 (2007).
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat. Cell Biol. 9, 654–659 (2007).
- Sahoo, S., Klychko, E., Thorne, T., Misener, S., Schultz, K. M. *et al.* Exosomes from human CD34⁺ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ. Res.* 109, 724–728 (2011).
- Yoon, Y.-S., Park, J.-S., Tkebuchava, T., Luedeman, C. & Losordo, D. W. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circ.* 109, 3154–3157 (2004).
- Masuda, H., Alev, C., Akimaru, H., Ito, R., Shizuno, T. *et al.* Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circ. Res.* **109**, 20–37 (2011).
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C. *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* 89, E1–E7 (2001).

- Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Kalka, C., Gagne, P. J. *et al.* Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circ.* **106**, 2781–2786 (2002).
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Wacławiw, M. A. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New Engl. J. Med.* 348, 593–600 (2003).
- Kinoshita, M., Fujita, Y., Katayama, M., Baba, R., Shibakawa, M. *et al.* Longterm clinical outcome after intramuscular transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34 positive cells in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis* 224, 440–445 (2012).
- Losordo, D. W., Kibbe, M. R., Mendelsohn, F., Marston, W., Driver, V. R. et al. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. Circ. Cardiovasc. Interv. 5, 821–830 (2012).
- Povsic, T. J., Henry, T. D., Traverse, J. H., Fortuin, F. D., Schaer, G. L. *et al.* The RENEW Trial: Efficacy and safety of intramyocardial autologous CD34+ cell administration in patients with refractory angina. *JACC Cardiovasc. Interv.* 9, 1576–1585 (2016).
- Losordo, D. W., Schatz, R. A., White, C. J., Udelson, J. E., Veereshwarayya, V. *et al.* Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circ.* **115**, 3165–3172 (2007).
- Losordo, D. W., Henry, T. D., Davidson, C., Sup Lee, J., Costa, M. A. et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ. Res.* 109, 428–436 (2011).
- 34. Henry, T. D., Losordo, D. W., Traverse, J. H., Schatz, R. A., Jolicoeur, E. M. *et al.* Autologous CD34+ cell therapy improves exercise capacity, angina frequency and reduces mortality in no-option refractory angina: a patient-level pooled analysis of randomized double-blinded trials. *Eur. Heart J.* **39**, 2208–2216 (2018).
- Quyyumi, A. A., Waller, E. K., Murrow, J., Esteves, F., Galt, J. *et al.* CD34⁺ cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *Am. Heart J.* 161, 98–105 (2011).
- 36. Quyyumi, A. A., Vasquez, A., Kereiakes, D. J., Klapholz, M., Schaer, G. L. *et al.* PreSERVE-AMI: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of intracoronary administration of autologous CD34+ cells in patients with left ventricular dysfunction post STEMI. *Circ. Res.* **120**, 324–331 (2017).
- Vrtovec, B., Poglajen, G., Sever, M., Lezaic, L., Domanovic, D. et al. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. J. Card. Fail. 17, 272–281 (2011).
- Vrtovec, B., Poglajen, G., Lezaic, L., Sever, M., Socan, A. *et al.* Comparison of transendocardial and intracoronary CD34⁺ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ.* 128, S42–S49 (2013).
- Vrtovec, B., Poglajen, G., Lezaic, L., Sever, M., Domanovic, D. et al. Effects of intracoronary CD34^{*} stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. Circ. Res. **112**, 165–173 (2013).
- Lezaic, L., Socan, A., Poglajen, G., Peitl, P. K., Sever, M. et al. Intracoronary transplantation of CD34' cells is associated with improved myocardial perfusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. J. Card. Fail. 21, 145–152 (2015).
- Frljak, S., Jaklic, M., Zemljic, G., Cerar, A., Poglajen, G. *et al.* CD34^{*} cell transplantation improves right ventricular function in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Stem Cells Transl. Med.* **7**, 168–172 (2018).
- Bervar, M., Kozelj, M., Poglajen, G., Sever, M., Zemljic, G. *et al.* Effects of transendocardial CD34^{*} cell transplantation on diastolic parameters in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1515–1521 (2017).
- Banerjee, S., Bentley, P., Hanady, M., Marley, S., Davis, J. et al. Intra-arterial immunoselected CD34+ stem cells for acute ischemic stroke. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 1322–1330 (2014).
- 44. Kuroda, R., Matsumoto, T., Niikura, T., Kawakami, Y., Fukui, T. *et al.* Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: pilot clinical trial. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 128–134 (2014).
- Nakamura, T., Torimura, T., Iwamoto, H., Kurogi, J., Inoue, H. *et al.* CD34⁺ cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 1830–1838 (2014).

Autologous transplantation of peripheral blood CD34⁺ cells in patients with femoral and tibial fracture non-union



Ryosuke Kuroda, Tomoyuki Matsumoto and Takahiro Niikura Department of Orthopaedic Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

About 5–10% of bone fractures fail to heal after conventional treatment. Stem cell therapy is promising for treating these cases, but initial results using mesenchymal stem cells have been disappointing. In a phase I/II clinical study, researchers associated with the Translational Research Center for Medical Innovation (TRI) in Japan have shown that transplantation of autologous CD34⁺ cells from peripheral blood in patients with non-union fractures is safe and effective way to heal such non-union fractures.

1. INTRODUCTION

Recent years have seen remarkable developments in the field of regenerative medicine as a result of research into embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. However, unresolved issues with the use of these so-called pluripotent cells, including ethical concerns and the potential for neoplastic cell transformation, make their clinical application problematic. Research into organogenesis and tissue regeneration has hence mainly focused on somatic stem cells. Regeneration of bone and cartilage using mesenchymal stem cells derived from the bone marrow or the synovial membrane is now attracting attention in orthopaedics and has already been used clinically. However, serious disadvantages remain, including the invasiveness of bone marrow collection, the difficulty and slowness of cell culture techniques, and the limited effectiveness of therapy. Thus, less invasive and more effective therapies are needed.

Vascular research has been conducted to establish the pathogenesis and improve the treatment of vascular diseases. Developments up until now in this field have not always been comparable with the most advanced research in fields such as oncology, hematology and neurology. However, the recent detailed characterization of the differentiation mechanisms involved in vascularization has opened up a new field of vascular research, incorporating trends in fields such as hematology and embryology. In the field of regenerative medicine, which is now part of mainstream medicine, research into organogenesis and tissue regeneration using various stem cells is underway, but many aspects of the mechanisms by which the vascular system can be reconstructed to nourish regenerated organs and tissues remain unclear. Vasculogenesis thus has the potential to play a key role in the development of regenerative medicine. After Asahara *et al.* discovered human peripheral blood vascular endothelial progenitor cells (EPCs) in 1997¹, several studies have elucidated the mechanism of vasculogenesis involving EPCs, in addition to that of conventional angiogenesis involving pre-existing vascular endothelial cells^{2,3}. Revascularization is currently performed as therapy for lower-limb ischemia and ischemic cardiac diseases. The significance of vascularization, particularly for bone regeneration, has long been recognized in orthopaedics.

This article presents an overview of basic research, non-clinical studies and a phase I/II clinical study to investigate the *in vivo* kinetics of EPCs/peripheral blood CD34⁺ cells and bone revascularization therapy using EPCs/peripheral blood CD34⁺ cells, which have great potential for fracture treatment.

2. ANGIOGENESIS AND VASCULOGENESIS

Moses Judah Folkman first established the concept of angiogenic growth factor and its application to therapy, and he showed that angiogenic growth factors were expressed as a result of cancer growth and infiltration. He defined angiogenesis as the process of forming new blood vessels from pre-existing adjacent blood vessels by the proliferation and migration of vascular endothelial cells induced by growth factors⁴. The recent discovery of various growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF), has led to the clinical application of therapy that promotes angiogenesis. However, some patients derived no clear benefit from this therapy. In these patients, the response of pre-existing vascular endothelial cells to vascular growth factors was probably lower at the ischemic lesion site. Therefore, the next challenge was to deliver highly responsive vascular endothelial cells to ischemic lesions.

SUMMARY

In recent years, regenerative medicine for treating refractory diseases, including the therapeutic use of bone marrow mesenchymal stem cells, has been exciting increasing interest in orthopaedics. At the same time, detailed characterization of the differentiation mechanisms in vascularization has led to a new area of vascular research, which is expected to find clinical application in orthopaedics. The close relationship between the fracture healing process and vascularization has been well documented. Our many *in vitro* and *in* vivo studies on vascular endothelial progenitor cells and fracture healing in animals have indicated the therapeutic usefulness of these cells. Based on these results, we conducted a phase I/II clinical study of transplantation of autologous CD34⁺ cells from peripheral blood in patients with nonunion fractures to evaluate safety and efficacy. We anticipate these studies will demonstrate the efficacy of the therapy and provide hope for patients suffering from non-union fractures.

CORRESPONDING AUTHOR Ryosuke Kuroda

E-mail: kurodar@med.kobe-u.ac.jp

Α

R

Time (weeks)	CD34 ⁺ cells No. (%) No. (%)		PBS No. (%)
2	0/15 (0)	0/15 (0)	0/15 (0)
4	8/12 (66)	0/12 (0)	0/12 (0)
8	9/9 (100)	0/9 (0)	0/9 (0)
-	G-CSF mob	DDC	

	Time		PBS		
(weeks	(WEEKS)	105	104	10 ³	NU. (70)
	2	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
	4	3/9 (33)	1/9 (11)	0/9 (0)	0/9 (0)
	8	6/6 (100)	2/6 (33)	0/6 (0)	0/6 (0)

Table 1. Fracture healing following transplantation of human peripheral blood CD34⁺ cells into a nude rat model (basic nonclinical studies)

In 1997, Asahara et al. reported that EPCs were present in adult blood circulation and involved in vascularization in severe ischemic lesions¹. This mechanism was found to be consistent with vasculogenesis, a process previously thought to occur only during fetal life, in which undifferentiated vascular EPCs migrate to a local site, where they reside, proliferate and differentiate to form a new blood vessel. This discovery led to the development of a concept distinct from angiogenesis, which is the conventional concept of vascularization in adults, where vascular endothelial cells proliferate and migrate to adjacent pre-existing blood vessels. When ischemia, cancer, wound healing or neovascularization in the uterus and the ovary were induced in a transgenic mouse model of bone-marrow transplantation that expressed β-galactosidase following expression of vascular endothelial cell-specific genes (Flk-1, Tie-2), new blood vessels formed by cells expressing donor bone marrow-derived Flk-1 or Tie-2^{5,6}. These studies showed that vascularization is achieved by both vasculogenesis and angiogenesis in adults as well as in fetal life. Neovascularization in adults is now thought to be mediated by an interaction between angiogenesis and vasculogenesis.

3. FRACTURE HEALING BY PERIPHERAL BLOOD EPCS/CD34⁺ CELLS

Bone fractures usually heal through anatomical reduction and rigid immobilization. However, bone union fails to occur (non-union fractures) in 5–10% of patients with fractures, partly because appropriate circulation is not achieved at the fracture site. Autologous free cancellous bone grafting is performed and may be followed by vascularized bone grafting with a focus on revascularization, but healing of a non-union fracture is often difficult. We therefore focused on neovascularization through cell therapy using EPCs and conducted basic experiments to examine the usefulness of this therapy for non-union fractures in preclinical animal studies.

In a preliminary study, we analysed the *in vivo* kinetics of EPCs in the fracture healing process by developing a mouse model of closed fracture and using fluorescence-activated cell sorting. EPCs were found to increase in the bone marrow and the peripheral blood after fracture. Subsequently, to demonstrate local differentiation of bone marrow–derived EPCs into vascular endothelial cells, double immunostaining of Sca1 and CD31 in a Tie2/LacZ transgenic mouse model of bone marrow transplantation was performed. It showed that bone marrow–derived EPCs differentiated into vascular endothelial cells at the fracture site. These results demonstrated that fracture-induced mobilization of EPCs from the bone marrow to the peripheral blood occurs and that EPCs contributed to healing at the fracture site⁷. Other research groups have also reported that EPCs were mobilized to the fracture site in humans⁸ and to the distraction osteogenesis site in a rat distraction osteogenesis model⁹. These reports support our findings.

Given that revascularization using peripheral blood cells was possible, it was logical to assume that differentiation of human peripheral blood CD34⁺



Figure 1. Kinetics of peripheral blood CD34⁺ cells in fracture healing. Intravenously transplanted human peripheral blood CD34⁺ cells were found to accumulate at the non-union site, induce an environment suitable for fracture healing at the non-union site through both vasculogenesis and osteogenesis, and contribute to fracture healing.

cells into vascular endothelial cells would promote bone regeneration. In our next study, we therefore intravenously transplanted 10⁵ CD34⁺ cells collected from the peripheral blood of healthy humans into a nude rat model of non-union fracture and demonstrated that these cells accumulated at the non-union site and contributed to fracture healing by inducing an environment suitable for healing through both vasculogenesis and osteogenesis (Fig. 1)¹⁰. Radiological and histological assessments showed that non-union was still present in all animals in the control groups (one control group injected with phosphate-buffered saline [PBS] and one transplanted with human mononuclear cells) 8 weeks postoperatively, whereas bone union was achieved in 66% of animals at 4 weeks and in all animals at 8 weeks in the CD34⁺ cell transplant group (Table 1A). Mechanical assessment by a threepoint bending test demonstrated significantly stronger fracture healing in the CD34⁺ cell transplant group than in the control groups.

Fluorescently labeled CD34⁺ cells were found to accumulate preferentially at the non-union site and contribute to revascularization and bone regeneration in collaboration with rat-derived endothelial cells and osteoblasts. Two weeks after transplantation, histological and molecular biological analyses showed the presence of human-derived mature vascular endothelial cells and osteoblasts at the non-union site, demonstrating that CD34⁺ cells had differentiated into mature endothelial cells and osteoblasts. Single-cell reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed that approximately 20% of CD34⁺ cells co-expressed osteocalcin, an osteoblast-specific marker, immediately after isolation, and that human CD34+ cells appeared to directly differentiate into osteoblasts without fusing with rat cells. Determination of the microvessel density and the osteoblast density in rats by immunostaining at the non-union site 2 weeks after transplantation showed that angiogenesis and osteogenesis were significantly increased in the CD34⁺ cell transplant group compared with both control groups. Because RT-PCR analysis identified angiogenic factors such as human-derived VEGF at the non-union site, the CD34⁺ cells were considered to play a paracrine role locally. Administration of soluble Flt1, a VEGF antagonist, inhibited not only angiogenesis but also osteogenesis, showing that angiogenesis by CD34⁺ cells plays a key role in the fracture healing process.

With eventual clinical application in mind, we also conducted an experiment to confirm that locally transplanted human peripheral blood CD34⁺ cells induced an environment suitable for fracture healing at the non-union site through both vasculogenesis and osteogenesis and contributed to fracture healing in a dose-dependent manner¹¹. First, peripheral blood granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized CD34⁺ cells were transplanted locally to the non-union site of the same animal model (using atelocollagen as a carrier). The numbers of cells transplanted were based on the results of the above-described intravenous transplantation. Radiological and histological assessments showed that bone union was achieved in 33% of animals at 4 weeks and all animals at 8 weeks af-

						Time to union	
Case	Sex	Age	Fracture type	Anatomical site	Sequence of operative interventions	Clinical (weeks)	Radiological (weeks)
1	Male	41	Closed, oligotrophic	Tibia, shaft	1. ORIF 2. Cell and ABG	12	12
2	Female	38	Grade IIIA, oligotrophic	Femur, shaft	1. ORIF 2. Cell and ABG	12	19
3	Male	31	Closed, oligotrophic	Femur, trochanteric	1. IMN 2. Exchange nailing, Cell and ABG	24	38
4	Male	34	Grade II, oligotrophic	Tibia, shaft	1. ORIF 2. Cell and ABG	12	12
5	Male	28	Grade II, hypertrophic	Tibia, shaft	1. IMN 2. Dynamization 3. Exchange nailing 4. Dynamization 5. Exchange nailing, Cell and ABG	12	12
6	Male	20	Grade IIIB, defect	Tibia, shaft	1. IMN 2. Cell and ABG	8	8
7	Male	45	Closed, defect	Tibia, plateau	1. ORIF 2. Revision plating, Cell and ABG	8	12

Table 2. Clinical and radiological outcomes for each patient in the phase I/II clinical study

Abbreviations: ABG, autologous bone grafting; Cell, transplantation of autologous peripheral blood CD34+ cells; IMN, intramedullary nailing; ORIF, open reduction and internal fixation.

ter transplantation of 10⁵ cells, and in 11% of animals at 4 weeks and 33% at 8 weeks after transplantation of cells, but not after transplantation of 10³ cells or in PBS controls (Table 1B). Determination of the microvessel density and the osteoblast density at the non-union site by immunostaining at 2 weeks showed dose-dependent increases in angiogenesis and osteogenesis. Greater levels of angiogenesis and osteogenesis were observed after transplantation of 10⁴ cells and 10⁵ cells than after transplantation of 10³ cells or PBS injection. These results suggest that local transplantation of peripheral blood CD34⁺ cells would be useful as a new treatment option for non-union fractures.

To confirm the superiority of human peripheral blood $CD34^+$ cells over mononuclear cells, we transplanted both cell types locally to the non-union site of the nude rat non-union fracture model and compared their effects. Transplantation of 10^7 mononuclear cells induced an environment suitable for fracture healing through both vasculogenesis and osteogenesis and contributed to fracture healing, but the efficacy was significantly inferior to that of transplantation of 10^5 CD34⁺ cells as measured by microvessel density, osteoblast density, and the density of human-derived mature vascular endothelial cells and osteoblasts, as well as by radiological, histological and mechanical assessments¹². These effects of CD34⁺ and mononuclear cell transplantation have been confirmed not only in this refractory nonunion fracture model but also in the established non-union model¹³. The results were attributed partly to infiltration of more inflammatory cells in the mononuclear cell transplant group than in the CD34⁺ cell transplant group.

Further characterization of the mechanisms involved in fracture healing associated with EPCs would lead to more improvement in therapeutic effects. We therefore investigated the healing effects of mobilization of EPCs to the non-union site by sustained released G-CSF¹⁴ and simvastatin¹⁵, the healing effect of extracellular mobilization of adaptor protein Lnk^{16,17} mediated by SCF/c-Kit signalling, and mobilization of EPCs mediated by SDF-1/CXCR4 signalling¹⁸. All studies confirmed that EPCs are closely associated with fracture healing.

4. CLINICAL STUDY: BONE REVASCULARIZATION BY TRANSPLANTATION OF PERIPHERAL BLOOD CD34⁺ CELLS

Based on the above-described non-clinical research results, a phase I/II clinical trial of bone revascularization by transplantation of autologous peripheral blood CD34⁺ cells was conducted in patients with non-infectious, nonunion fractures, following approval by the Review Committee on Clinical Research of Human Stem Cells on 4 September 2009. An advantage of bone revascularization therapy by transplantation of autologous peripher-

	CD34⁺ cells	Historical control
Number of patients	7	11
Sex (male/female)	6/1	9/2
Age	34 (20-45)	37 (21–56)
Femur/tibia	2/5	4/7
Union at week 12	5/7 (71.4%)	2/11 (18.1%)
Time to union (weeks)	16.1 (8-38)	29.1 (12-44)

Table 3. Comparison of Phase I/II study with historical control

al blood CD34⁺ cells over conventional therapies is that it regenerates both bone and new blood vessels after proliferation of cells in an undifferentiated state and subsequent differentiation at the non-union site.

Eligible patients (two with femoral non-union fractures and five with tibial non-union fractures) aged between 20 and 70 years provided written informed consent in person. After obtaining consent, screening tests, a case review meeting and an eligibility assessment were conducted and patients were then enrolled. CD34⁺ cell isolation, non-union surgery and cell transplantation were performed at the Institute of Biomedical Research and Innovation, and patients were then transferred to Kobe University Hospital for observation.

G-CSF was subcutaneously injected for 5 days to mobilize CD34⁺ cells into the peripheral blood. Mononuclear cells were collected by apheresis, and CD34⁺ cells were isolated by magnetic-activated cell sorting. Treatment involved non-union surgery (to improve internal fixation as needed in addition to autologous bone grafting) on day 6 and transplantation of 5×10^5 cells kg⁻¹ of autologous peripheral blood CD34⁺ cells using atelocollagen as a carrier (Fig. 2). The primary endpoints were safety and the presence or absence of radiological fracture healing 12 weeks after surgery.

We first reported safety and efficacy in a patient who had tibial nonunion¹⁹. The mean postoperative time to clinical bone union was 12.6 weeks, and the mean postoperative time to radiological bone union was 16.1 weeks (Table 2)²⁰. The efficacy of the therapy was demonstrated — 71.4% of patients achieved radiological bone union at 12 weeks after surgery, the primary endpoint, compared with a healing rate of 18.1% in 11 patients with femoral or tibial non-union who underwent concomitant bone grafting in the same medical institution, a patient group selected as a historical control (Table 3)²⁰. The safety evaluation 1 year after surgery showed no serious adverse events.



Figure 2. Overview of the clinical study. CD34⁺ cells were mobilized into the peripheral blood by subcutaneous injection of G-CSF, mononuclear cells were collected by apheresis, and then CD34⁺ cells were isolated by magnetic-activated cell sorting. Non-union surgery [improvement of internal fixation as necessary in addition to autologous bone grafting] was performed on day 6 and 5 ×10⁵ cells kg⁻¹ of autologous peripheral blood CD34⁺ cells were transplanted using atelocollagen as a carrier. G-CSF, granulocyte colony stimulating factor.

5. FUTURE PROSPECTS

The significance and efficacy of EPCs/CD34⁺ cells in fracture healing described so far have attracted the attention of other research groups in recent years, and the results of basic research continue to accumulate. The effect of mobilization of EPCs to the peripheral blood has been reported for the rat model of tibial distraction osteogenesis²¹ and the mouse model of femoral fracture²² as well as for tibial long bone fracture in humans^{8.9}. As well as in our immunodeficient rat non-union fracture model^{10–12}, immunodeficient rat non-union model¹³, and rat femoral defect model^{23,24}, the efficacy of EPCs/CD34⁺ cells in the fracture healing process has also been reported for the ovine tibial defect model²⁵. Thus, the importance of EPCs/CD34⁺ cells has been increasingly recognized in recent years^{26–29}.

The phase I/II clinical study demonstrated the efficacy and safety of this therapy in patients with non-union fractures. With the aim of establishing this therapy as a standard of care, we need to conduct a multicentre, investigator-initiated study in a larger number of patients. Transplantation of peripheral blood CD34* cells, a novel therapy for non-union fractures, has already demonstrated high efficacy and safety in animal experiments and early clinical studies, and excellent therapeutic effects are expected in future extensive clinical applications.

REFERENCES

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–966 (1997).
- Kawamoto, A., Katayama, M., Handa, N., Kinoshita, M., Takano, H. *et al.* Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 27, 2857–2864 (2009).
- Losordo, D. W., Schatz, R. A., White, C. J., Udelson, J. E., Veereshwarayya, V. et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circ.* 115, 3165–3172 (2007).
- Folkman, J. & Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science* 235, 442–447 (1987).
 Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C. *et al.* Bone marrow origin
- Asahara, A., Masuda, H., Takahashi, H., Kaha, C., Fastore, C. et al. Dote infinition of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221–228 (1999).
 Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D. Silver, M. *et al.* Ischemia- and
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D. Silver, M. *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Med.* 5, 434–438 (1999).
- Matsumoto, T., Mifune, Y., Kawamoto, A., Kuroda, R., Shoji, T. *et al.* Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J. Cell. Physiol.* **215**, 234–242 (2008).
 Laing, A. J., Dillon, J. P., Condon, E. T., Street, J. T., Wang, J. H. *et al.* Mobilization
- Laing, A. J., Dillon, J. P., Condon, E. T., Street, J. T., Wang, J. H. et al. Mobilization of endothelial precursor cells: Systemic vascular response to musculoskeletal trauma. J. Orthop. Res. 25, 44–50 (2007).
- Lee, D. Y., Cho, T.-J. Lee, H. R., Park, M. S., Yoo, W. J. *et al.* Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. *Bone* 46, 673–679 (2010).
- Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R., Ishikawa, M., Mifune, Y. *et al.* Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am. J. Pathol.* **169**, 1440–1457 (2006).

- Mifune, Y., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R., Shoji, T. *et al.* Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture. *Stem Cells* 26, 1395–1405 (2008).
- Fukui, T., Matsumoto, T., Mifune, Y., Shoji, T., Kuroda, T. et al. Local transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized human peripheral blood mononuclear cells for unhealing bone fractures. *Cell Transplant.* 21, 707–721 (2012).
- Fukui, T., Mifune, Y., Matsumoto, T., Shoji, T., Kawakami, Y. *et al.* Superior potential of CD34-positive cells compared to total mononuclear cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Transplant.* 24, 1379–1393 (2015).
- Ishida, K., Matsumoto, T., Sasaki, K., Mifune, Y., Tei, K. *et al.* Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis. *Tissue Eng.* 16, 3271–3284 (2010).
- Fukui, T., Ii, M., Shoji, T., Matsumoto, T., Mifune, Y. *et al.* Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J. Bone Min. Res.* 27, 1118–1131 (2012).
- Matsumoto, T., Ii, M., Nishimura, H., Shoji, T., Mifune, Y. *et al.* Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. *J. Exp. Med.* 207, 2207–2223 (2010).
- Kawakami, Y., Ii, M., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R. *et al.* A small interfering RNA targeting Lnk accelerates bone fracture healing with early neovascularization. *Lab. Invest.* 93, 1036–1053 (2013).
- Kawakami, Y., Ii, M., Matsumoto, T., Kuroda, R., Kuroda, T. *et al.* SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 95–105 (2015).
 Kuroda, R., Matsumoto, T., Miwa, M., Kawamoto, A., Mifune, Y. *et al.* Local
- Kuroda, R., Matsumoto, T., Miwa, M., Kawamoto, A., Mifune, Y. *et al.* Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34+ cells in a patient with tibial nonunion: a case report. *Cell Transplant.* 20, 1491–1496 (2011).
- Kuroda, R., Matsumoto, T., Niikura, T., Kawakami, Y., Fukui, T. *et al.* Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34⁺ cells for patients with femoral and tibial nonunion: Pilot clinical trial. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 128–134 (2014).
- Cetrulo, C. L., Knox, K. R., Brown, D. J., Ashinoff, R. L., Dobryansky, M. et al. Stem cells and distraction osteogenesis: Endothelial progenitor cells home to the ischemic generate in activation and consolidation. *Plast. Reconstr. Surg.* 116, 1053–1064 (2005).
- Laing, A. J., Dillon, J. P., Condon, E. T., Coffey, J. C., Street, J. T. et al. A systemic provascular response in bone marrow to musculoskeletal trauma in mice. J. Bone Joint Surg. 89B, 116–120 (2007).
- Atesok, K., Li, R., Stewart, D. J. & Schemitsch, E. H. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J. Orthop. Res.* 28, 1007–1014 (2010).
- Ma, X.-L., Sun, X.-L., Wan, C.-Y., Ma, J.-X. & Tian, P. Significance of circulating endothelial progenitor cells in patients with fracture healing process. J. Orthop. Res. 30, 1860–1866 (2012).
- Rozen, N., Bick, T., Bajayo, A., Shamian, B., Schrift-Tzadok, M. *et al.* Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone* 45, 918–924 (2009).
- Matsumoto, T., Kuroda, R., Mifune, Y., Kawamoto, A., Shoji, T. *et al.* Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone* 43, 434–439 (2008).
- Atesok, K., Matsumoto, T., Karlsson, J., Asahara, T., Atala, A. et al. An emerging cellbased strategy in orthopaedics: endothelial progenitor cells. *Knee Surg., Sports Traumatol., Arthrosc.* 20, 1366–1377 (2012).
- Fadini, G. P., Rattazzi, M., Matsumoto, T., Asahara, T. & Khosla, S. Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circ.* 125, 2772–2781 (2012).
- Kuroda, R., Matsumoto, T., Kawakami, Y., Fukui, T., Mifune, Y. et al. Clinical impact of circulating CD34-positive cells on bone regeneration and healing. *Tissue Eng. B Rev.* 20, 190–199 (2014).

Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets in order to restore sight



Chie Sotozono¹, Tsutomu Inatomi^{1,2}, Takahiro Nakamura¹, Noriko Koizumi³, Kojiro Imai⁴, Shigeru Kinoshita^{1,5}, Yasuko Kimura⁶, Masahiro J. Go⁶ and Masanori Fukushima⁶

¹Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan. ²Department of Ophthalmology, National Center for Geriatrics and Gerontology, Aichi, Japan. ³Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan.

⁴Department for Medical Innovation and Translational Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

⁵Department of Frontier Medical Science and Technology for Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

⁶Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe, Kobe, Japan.

Severe ocular surface disorders such as Stevens–Johnson syndrome, ocular pemphigoid and thermal or chemical injury are difficult to treat and have a poorer visual prognosis than other stem cell deficiency conditions. Using an amniotic membrane as a substrate for culturing cells, researchers associated with the Translational Research Center for Medical Innovation (TRI) in Japan have generated stratified mucosal epithelial sheets consisting of corneal epithelial stem cells or autologous oral mucosal epithelial cells, and have used these to regenerate the ocular surface. Early clinical studies have demonstrated visual improvement for cicatricial corneal opacity, epithelial repair for refractory epithelial defect and efficacy for conjunctival sac reconstruction. The technique should be applicable to other diseases of the ocular surface.

1. INTRODUCTION

There are two types of mucosal epithelia on the ocular surface: the corneal epithelium and the conjunctival epithelium. The narrow interface between the cornea and conjunctiva is called the limbus. The basal layer of the limbal epithelium is believed to contain corneal epithelial stem cells¹⁻⁴. Corneal epithelial cells can no longer be supplied when the limbus is extensively damaged, which leads to the corneal surface being covered with the neighbouring conjunctival epithelium, fibrous tissue and blood vessels, severely impairing visual function. Diseases in which the function of corneal epithelial stem cells are impaired are known as limbal stem cell deficiency conditions^{3,5,6}. Such conditions, which include Stevens–Johnson syndrome (SJS), ocular pemphigoid and thermal or chemical injury, are characterized by progressive fibrosis of subconjunctival connective tissues and inflammation. This leads to mucosal shrinkage or scarring or adhesion of the ocular surface, which produces severe dry eyes. SJS, ocular pemphigoid and thermal or chemical injury all involve cicatricial changes to the ocular surface and poor ocular surface conditions. These conditions have been classified as severe ocular surface disorders because they are especially severe, difficult to treat and have a poor visual prognosis compared to other stem cell deficiency conditions^{6,7}.

Penetrating (or lamellar) keratoplasty, a common transplantation procedure, does not transplant limbal stem cells and thus it cannot be expected to give any clinical benefit for conditions involving stem cell deficiency. Transplantation of the mucosal epithelium, which contains stem cells, is required to treat stem cell deficiency. Hence, corneal epithelial transplantation procedures such as kerato-epithelioplasty and limbal transplantation have been developed^{8,9}. However, epithelial transplantation requires a fresh donor, which is difficult to obtain. In addition, corneal epithelial transplantation has a higher rejection rate than penetrating keratoplasty. Studies have shown that persistent epithelial defects can easily occur after epithelial transplantation for severe ocular surface disorders. Even when an epithelial graft is accepted, progressive cicatricial changes can arise and persist in the long term, resulting in a poor visual prognosis^{7,10}.

In 1997, Pellegrini *et al.* developed tissue-engineered corneal epithelial sheet transplantation as a novel therapeutic method for severe ocular surface disorders. They separated cells from a small amount of corneal–limbal epithelial tissue, generated epithelial sheets *ex vivo*, and then successfully transplanted them

SUMMARY

Damage to the limbus can result in conditions arising from a deficiency in limbal stem cells, such as Stevens-Johnson syndrome, ocular pemphigoid and thermal or chemical injury. Transplantation of mucosal epithelium containing stem cells is needed to treat these severe ocular surface disorders. Our treatment concept provides a sheet of mucosal epithelium generated outside the body. We use an amniotic membrane as a substrate for culturing cells, generate stratified mucosal epithelial sheets consisting of corneal epithelial stem cells or autologous oral mucosal epithelial cells, and use these to regenerate the ocular surface. In unilateral diseases, corneal epithelial sheets can be generated using cells taken from the other (healthy) eye. Aiming for autologous transplantation in bilateral diseases, we developed epithelial sheets using cells from patients' oral mucosa. Basic research in rabbit models of corneal disease confirmed that oral mucosal epithelial sheets cultivated on amniotic membrane can survive and expand while maintaining corneal transparency on the ocular surface. Early clinical studies (72 patients) demonstrated visual improvement for cicatricial corneal opacity, epithelial repair for refractory epithelial defect and efficacy for conjunctival sac reconstruction. Similar effects were seen in a prospective clinical study. We anticipate that our technique can be applied to other diseases of the ocular surface.

CORRESPONDING AUTHOR

Chie Sotozono E-mail: csotozon@koto.kpu-m.ac.jp into two patients¹¹. Since then, basic and clinical research on corneal regeneration has gained momentum worldwide.

We have focused on amniotic membrane as a substrate for culturing cells, generating stratified mucosal epithelial sheets consisting of corneal epithelial stem cells or oral mucosal epithelial cells, and using these to regenerate the ocular surface in severe ocular surface disorders^{12–14}.

2. DEVELOPMENT OF NEW TREATMENT TECHNIQUES AND NON-CLINICAL PROOF OF CONCEPT

2.1 Clinical studies of transplantation of corneal epithelial sheets cultivated on amniotic membrane

The amniotic membrane is a thin membrane covering the fetal and placental surfaces. It consists of a basement membrane and a layer of amniotic epithelial cells. Because the amniotic membrane is unlikely to be rejected, it has long been used in surgery and dermatology. For example, it has been used to prevent adhesion after abdominal surgery and to promote epithelial repair of skin burns. The use of amniotic membrane in ophthalmology was reported in 1995 by Kim and Tseng, who used a cryopreserved amniotic membrane to reconstruct the ocular surface in rabbits¹⁵. Thereafter, amniotic membrane transplantation, with or without corneal epithelial transplantation, has been used to treat cicatricial diseases, including recurrent pterygium and SJS¹⁶.

The amniotic membrane is known to have various beneficial effects, including reducing scar formation, promoting epithelial growth mediated by growth factors¹⁷, reducing inflammation¹⁸ and reducing neovascularization. In particular, the collagen that makes up its basement membrane resembles that of the basement membrane of the ocular surface (i.e., corneal and conjunctival) epithelial cells¹⁹. Based on the assumption that selection of the substrate for culturing epithelial cells is important to obtain good prognosis, we established a method for culturing mucosal epithelial stem cells using a denuded amniotic membrane as the substrate. This was prepared by scraping off amniotic epithelial cells from cryopreserved amniotic tissue^{20–22}.

In 1999, we began the clinical application of cultivated allogeneic corneal epithelial sheet transplantation for treating bilateral severe ocular surface disorders^{23,24}. Cultivated corneal epithelial sheets were successfully grafted onto the cornea, and we were able to achieve epithelial reconstruction in patients having persistent epithelial defects with prolonged acute-phase inflammation, for which no other treatment was available. We also achieved visual improvement in patients with chronic visual impairment. Initially, we transplanted cultivated allogeneic corneal epithelial sheets in eyes with SJS, chemical injury or ocular pemphigoid (25 eyes in 23 patients). The transplanted corneal epithelium survived and maintained corneal transparency for a long time in patients with chemical injury. However, in patients with SJS and ocular pemphigoid the transplanted corneal epithelium was slowly replaced by conjunctival epithelium. Adverse events were obvious rejection (observed in four eyes) and corneal infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Staphylococcus epidermidis (three eyes).

Most severe ocular surface diseases are bilateral, but in unilateral diseases, corneal epithelial sheets can be generated using cells taken from the other (healthy) eye. A patient with a unilateral chemical injury who received an autologous epithelial sheet transplant had a favorable outcome without developing complications²⁵. Aiming for autologous transplantation in bilateral diseases, we started to develop cultivated epithelial sheets using patients' own cells.

2.2 Transplantation of autologous oral mucosal epithelial sheets cultivated on amniotic membrane: establishing non-clinical proof of concept

We created cultivated oral mucosal epithelial sheets from rabbits and performed autologous transplantation of these sheets onto the ocular surface²⁶. Rabbit oral mucosal epithelial cells cultivated on an amniotic membrane reached confluence in approximately 7 days, producing five to six layers of well-stratified epithelium, which was similar to cor-



Figure 1. Establishment of non-clinical proof of concept. A, Rabbit oral mucosal epithelial cells cultivated on amniotic membrane (asterisks) produced four to five layers of cells (circles) that resembled normal corneal epithelium. B, D, Tight junctions were seen between the cells in the superficial layer (arrow in C). D, The most superficial layer was covered with glycocalyx-like material (arrow). E, The cells were attached to each other by many desmosomal junctions (arrows). F, The basal cells adhered to the amniotic membrane via hemidesmosome attachments (arrows). G, Before transplantation, the rabbit cornea showed stem cell loss and conjunctival invasion on the cornea. H, The oral mucosal epithelial sheet cultivated on amniotic membrane survived, expanded and maintained corneal transparency on the rabbit coular surface (10 days after transplantation). I, The transplanted epithelial sheet attached to the corneal stroma without developing inflammatory cell infiltration or stromal edema.

neal epithelium, in about 14 days. The surface layer had countless microvilli, and the cells were attached to each other by numerous desmosomal junctions. Hemidesmosome attachments were seen between the basal cells and the amniotic membrane. Immunohistology for keratins expressed in the cultivated oral mucosal epithelial sheets showed the presence of mucosa-specific keratin-4 and keratin-13 and the absence of epidermal-type keratin-1 and keratin-10, which was consistent with histological findings. Among corneal epithelial-specific keratins, keratin-3 was also present, but keratin-12 was not. These results allowed us to determine the histologic characteristics of the cultivated oral mucosal epithelial sheets: unlike the epidermis, which differentiates into keratinized cells, the cultivated oral mucosal epithelial cells had the characteristics of non-keratinized mucosa, while simultaneously expressing some cornea-specific keratins (keratin-3).

We created a corneal epithelial stem cell deficiency model. Briefly, after removing all corneal and conjunctival epithelial tissue up to 5 mm outside the limbus in the albino rabbits from which we collected oral mucosa, surrounding conjunctival tissue totally covered the ocular surface. After removing any conjunctival tissue covering the corneal surface in these eyes, we transplanted oral mucosal epithelial sheets that had been cultured on an amniotic membrane. Immediately after transplanting, the ocular surface showed a similar transparency to that observed following transplantation of cultivated corneal epithelial sheets; 48 hours after transplantation, we could confirm the survival of the cultivated epithelium. Ten days after transplantation, not only had the transplanted mucosal epithelial sheet survived on the ocular surface, but also fluorescein staining revealed that the epithelial cells had expanded outward from the mucosal sheet relative to 48 hours post-transplantation. These results confirmed that oral mucosal epithelial sheets cultivated on an amniotic membrane can survive and expand while maintaining corneal transparency on the ocular surface²⁶.

Based on the data obtained from animal models, we began work on clinical application in humans. After obtaining adequate informed consent, we collected normal human oral mucosal tissue and attempted to



epithelial sheets. A mucosal specimen containing the oral mucosal epithelium was collected to create an oral mucosal epithelial sheet at the Cell Procession Center. After about 2 weeks, this stratified epithelial sheet was used for cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation.

 during surgery
 1-2 weeks later

 A: Corneal reconstruction
 Image: Construction of the present of the present

Amniotic membrane 🔜 Cultivated oral mucosa epithelial sheet

Figure 3. Extension of epithelial cells from the cultivated mucosal epithelial sheet after transplantation. A, Corneal reconstruction; B, conjunctival sac reconstruction.

determine specific conditions for creating human cultivated oral mucosal epithelial sheets. We found it was difficult to create human sheets under the same conditions used to create rabbit cultivated oral mucosal epithelial sheets, and we observed interspecies differences in cellular kinetics. However, we were able to facilitate the development of human cultivated oral mucosal epithelial sheets by modifying the culture process, including the culture medium^{27,28}.

At almost at the same time, Nishida *et al.*^{29,30} developed another regenerative procedure using the patient's own oral mucosal epithelial cells to cultivate and transplant autologous oral mucosal epithelial sheets. However, their method is very different as they transplant a sheet of epithelial cells fabricated on a temperature-responsive culture dish and do not use amniotic membrane. In our method, multilayered epithelial cells are attached to the base of the amniotic membrane, and thus are less likely to be lost by external stresses such as blinking or dryness.

With the aim of assessing the *in vivo* function of the human cultivated epithelial sheets, we performed xenogeneic transplantation of these sheets onto the ocular surface of rabbits. As with the rabbit model, the human cultivated oral mucosal epithelial sheet had similar morphologic features to corneal epithelium and survived on the ocular surface (Fig. 1)^{26,31}.

3. SURGICAL PROCEDURES AND POSTOPERATIVE MANAGEMENT

Surgical procedures involve removing scar tissue from the ocular surface to expose the normal corneal stroma or sclera and transplanting the cultivated autologous oral mucosal epithelial sheet onto the cornea or sclera. The adhesion on the ocular surface is incised so as to release symblepharon and then subconjunctival proliferative tissues are removed. Any abnormal proliferative tissues present on the cornea and limbus are removed with a spatula to expose the corneal stroma. A microsponge soaked in 0.04% mitomycin C is applied to the periphery of the subconjunctival area for 4 minutes after removing subconjunctival connective tissues. The surgical area is then washed with approximately 300 ml of saline. The cultivated autologous oral mucosal epithelial sheet is sutured onto the cornea or sclera; this is combined with amniotic membrane transplantation in patients with widely exposed sclera (Fig. 2)³¹. When an amniotic membrane is transplanted, the oral mucosal epithelial sheet to the amniotic membrane (Fig. 3).

As the transplanted tissue is autologous, there is no need to use immunosuppressants to prevent rejection when transplanting cultivated oral mucosal epithelial sheets. However, in severe ocular surface diseases, particularly SJS and ocular pemphigoid, surgery induces significant inflammation, which induces epithelial disturbances and scarring of the ocular surface (e.g., symblepharon, which is conjunctivalization with fibrous tissue). It is thus critical to fully suppress inflammation of the ocular surface immediately after surgery. Since this is difficult to do with steroids alone, systemic immunosuppressants (cyclosporine) should be co-administered for cases with severe ocular surface scarring^{13,32}. Ocular pemphigoid is a chronic, progressive, refractory autoimmune disease, and the use of cyclophosphamide can prevent disease progression.

		sıs	Ocular pemphigoid	Thermal/ chemical injury	Other	Total
Number of patients		21	10	7	9	47
Mean age		43.0	73.5	50.0	34.0	57.0
	LogMAR visual acuity (range)	2.40 (1.40-3.00)	2.70 (1.52–2.70)	2.70 (1.22–2.70)	2.40 (1.10-2.70)	2.40 (1.11–3.00)
Before surgery	Symblepharon (%)	18 (85.7)	10 (100)	6 (85.7)	3 (33.3)	37 (78.7)
	Keratinization (%)	8 (38.1)	1 (10.0)	0 (0)	1 (11.1)	10 (21.3)
Delayed surgery (%)		2 (9.5)	0 (0)	6 (85.7)	2 (22.2)	10 (21.3)

 Table 1. Characteristics of patients treated for visual improvement.

Almost all patients also have dry eyes, and so artificial tears should be used frequently. The ocular surfaces of patients with severe ocular surface diseases, especially SJS, have an increased susceptibility to infection; particular attention should be paid to MRSA colonization and infection^{13,32}. Preoperative assessment of the ocular surface and postoperative management are important factors that determine the prognosis after surgery.

4. THERAPEUTIC EFFECTS IN CLINICAL TRIALS AND INTERPRETATION

4.1 Overview

Since performing the world's first successful transplantation of cultivated oral mucosal epithelial sheets in humans at Kyoto Prefectural University of Medicine in 2002³¹, we have carefully collected cases of treatment of stem cell deficiency in refractory ocular conditions^{33,34}. As the number of patients gradually increased, our project became an external seed translational research project within the Foundation for Biomedical Research and Innovation in 2008. With the support of the Translational Research Informatics Center, we conducted a retrospective study and statistical analysis of 72 patients (81 eyes, 86 surgeries) who had undergone transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets between June 2002 and December 2008^{14,35–37}.

Conditions that led to transplantation included SJS (21 patients), ocular pemphigoid (20 patients), thermal or chemical injury (13 patients), conjunctival malignancy (4 patients) and other conditions (14 patients). The purpose of treatment was broadly classified into four categories: visual improvement for cicatricial corneal opacity (47 transplants); epithelial repair for persistent epithelial defects with accompanying subacute inflammation (10 transplants); release of conjunctival sac adhesion (22 transplants); and other (7 transplants) (Fig. 4). The most common condition treated by corneal reconstruction (visual improvement and epithelial repair) was SJS, and the most common condition treated by conjunctival sac reconstruction was ocular pemphigoid.

We examined visual acuity and ocular surface findings before transplantation, at weeks 4, 12 and 24 after transplantation, and at the final visit before the end of 2008, and assessed the success of the transplantation. We also noted all adverse events and used multivariate analysis to identify factors associated with their occurrence^{35,38}.

4.2 Effects of epithelial sheet transplantation

Improvement in best-corrected visual acuity at the 24th week after surgery occurred in 46.8% of eyes in the visual improvement group; improvement in epithelial defect score was seen in 90.0% of eyes in the epithelial repair group; and improvement of symblepharon score was seen in 68.2%

of eyes in the adhesion release group. Statistically significant efficacy was demonstrated in all groups.

4.2.1 Visual improvement

In total, 47 surgeries were performed in 46 eyes of 40 patients with the purpose of improving vision³⁵. Conditions included SJS (21 eyes in 17 patients), ocular pemphigoid (10 eyes in 9 patients), thermal or chemical injury (7 eyes in 6 patients) and other (8 eyes in 8 patients), including idiopathic stem cell deficiency, radiation keratopathy, graft versus host disease (GVHD) and aniridia (Table 1, Fig. 4). Retransplantation was performed in one eye with radiation keratopathy.

Improvement in best-corrected visual acuity at the 24th postoperative week was seen in 12 of 21 eyes with SJS (57.1%; 95% CI 34.0–78.1%), 3 of 10 eyes with ocular pemphigoid (30.0%; 95% CI 6.7–65.2%), and 3 of 7 eyes with thermal or chemical injury (42.9%; 95% CI 9.9–81.6%) (Fig. 5A and B). Patients with severe corneal stromal opacity underwent penetrating or lamellar keratoplasty after stabilizing the transplant-ed epithelium³⁴. Six patients with thermal or chemical injury underwent this two-stage procedure and saw an improvement in their visual acuity after transplantation.

Cases with keratinization (abnormal differentiation of the epithelium) and symblepharon are the most serious of severe ocular surface diseases; they are also known as end-stage ocular surface diseases, and patients are usually ineligible for transplantation⁷. In the visual improvement group, preoperative symblepharon was observed in 37 eyes (78.7%) and keratinization in 10 eyes (21.3%), and the mean LogMAR visual acuity before surgery was 2.40 (i.e., counting fingers vision). If surgery can improve visual acuity below counting fingers to 0.01 or better, patients will be able to read or walk independently. We calculated the critical visual improvement rate as the proportion of patients whose preoperative vision was below counting fingers (best-corrected visual acuity of less than 0.01) and which had improved to 0.01 or better by the 24th postoperative week; the results were 50.0% (7 of 14 eyes), 42.9% (3 of 7 eyes) and 20.0% (1 of 5 eyes) for SJS, ocular pemphigoid and thermal or chemical injury, respectively. Eyes with thermal or chemical injury achieved visual improvement after delayed penetrating or lamellar keratoplasty. Improvement was seen in about half of the eyes with a severe disease that are usually considered unsuitable for surgery.

4.2.2 Epithelial repair

Epithelial repair was achieved in all patients with persistent epithelial defects and accompanying sub-acute inflammation (10 eyes in 9 patients [both eyes in 1 patient]), and the epithelial defect resolved with-

A: Categorized by purpose of transplantation

Transplantation performed between: First: 24 June 2002, Last: 26 December 2008

	Breakdown		
	1 transplant	2 transplants	
Retrospective study sub- jects 72 patients (81 eyes)	58 patients	14 patients (1 transplant in each of both eyes: 9 patients, 2 transplants in 1 eye: 5 patients)	
Number of transplants 86 eyes (transplant/eye)	76 eyes	5 eyes	

Target therapeutic effect

	Breakdown		Diamaria		
	1 transplant	2 transplants	Diagnosis		
Visual improvement for cicatricial corneal opacity 40 patients# (46 eyes)	33 patients	7 patients	 SJS: 21 eyes (including 2 eyes with 2-stage surgery) Ocular pemphigoid: 10 eyes Thermal/chemical injury: 7 eyes (including 6 eyes with 2-stage surgery) 		
Number of transplants 47 eyes (transplant/eye)	46 eyes	1 eye	 Aniridia: 1 eye Stem cell deficiency due to drug toxicity: 1 eye Unknown cause: 3 eyes (including 2 eyes with 2-stage surgery) GVHD: 1 eye* Salzmann's corneal degeneration: 1 eye Radiation keratopathy: 2 eyes 		
Epithelial repair for subacute persistent epithelial defect 9 patients (10 eyes)	9 patients	1 patient (1 transplant in each of both eyes 1 patient)	 SJS: 3 eyes Ocular pamphigaid: 2 oves 		
Number of transplants 10 eyes (transplant/eye)	10 eyes	-	 Octat pempingold: 2 eyes Thermal/chemical injury: 5 eyes** 		
Release of conjunctival sac adhesion 21 patients (22 eyes)	21 patients	1 patient (1 transplant in each of both eyes 1 patient)	 SJS: 1 eye Ocular pemphigoid:10 eyes Thermal/chemical injury: 4 eyes** 		
Number of transplants 22 eyes (transplant/eye)	22 eyes	-	 Severe recurrent pterygium with symblepharon: 2 eyes GVHD: 1 eye* Trachoma: 1 eye Ocular pseudopemphigoid: 1 eye Idiopathic cicatricial keratoconjunctival epitheliopathy: 1 eye Measles: 1 eye 		
Malignant tumour excision 4 patients (4 eyes)	2 patients	2 patients (2 transplants in 1 eye 2 patients)	CIN: 1 eye Conjunctivel squameus cell consistence 1 eye		
Number of transplants 6 eyes (transplant/eye)	2 eyes	2 eyes	 Conjunctival squamous cert carcinoma: T eye Conjunctival melanoma: 2 eyes \$ 		
Other (cosmetic) 1 patient (1 eye)	1 patient	-			
Number of transplants 1 eye (transplant/eye)	1 eye	-			

Figure 4. Patient details in early clinical studies. a, Categorized according to reason for transplantation; b, Categorized according to disease. CIN, conjunctival intraepithelial neoplasia ; GVHD, graft versus host disease; SJS, Stevens–Johnson syndrome #: Includes 1 patient in whom a transplant was also given to the other eye for a different purpose. *, **: Each includes 1 transplant performed on the same eye of the same patient for a different purpose. \$: 2 transplants were given to the same eye of the same patient for the same purpose.

Tissue Engineering 2



Figure 5. Representative cases. **A**, **B**, Epithelial sheet transplantation was performed for visual improvement; **C**, **D**, for epithelial repair; **E**, **F**, for fornix reconstruction. photographs were taken before surgery (**A**, **C**, **E**) and at the 24th postoperative week (**B**, **D**, **F**).

in 4 weeks of transplantation in 7 eyes (Figs. 5C and D)³⁸. Conditions treated included SJS (3 eyes), ocular pemphigoid (2 eyes) and thermal or chemical injury (5 eyes).

Persistent epithelial defect with accompanying sub-acute inflammation is a condition in which a non-healing epithelial defect is accompanied by persistent inflammation resulting from the development of a total corneal epithelial defect extending beyond the limbus during the acute phase of SJS or a thermal or chemical injury. This condition is resistant to all treatments, including eye drops and ointments, oral anti-inflammatory drugs and epithelial protection by eye patching or medical-use soft contact lenses. It carries a high risk of corneal infection, corneal stromal melting and corneal perforation, and may lead to blindness. Even if these complications are avoided, conjunctival and connective tissues eventually cover the corneal surface, leading to blindness. When cultivated mucosal epithelial sheet transplantation is used to treat this disease, epithelialization of the corneal surface is achieved at the time of surgery, which can help to prevent serious complications, such as infection and perforation. In addition, it can help inhibit postoperative inflammation of the ocular surface and reduce cicatricial changes^{6,38}.

Transplantation of cultivated allogeneic corneal epithelial sheets produced a favorable outcome in treating this condition^{6,23}. We obtained similar results with transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets.

4.2.3 Release of adhesion

Fornix reconstruction was performed in 22 eyes in 21 patients (both eyes for 1 patient) using cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets for the purpose of adhesion release. The most common underlying condition was ocular pemphigoid (10 eyes), followed by thermal or chemical injury (4 eyes), SJS (1 eye) and other (7 eyes).

For the adhesion release group in ocular pemphigoid patients, the symblepharon score improved for 6 of 10 eyes, and the total upper and

lower conjunctival sac adhesion score improved for 7 of 10 eyes (Figs. 5E and F). Cataract surgery involving transplanting epithelial sheets was performed in 5 eyes (50%) with ocular pemphigoid.

Ocular pemphigoid rarely presents with the acute symptoms seen in SJS or thermal or chemical injury. It develops without symptoms; shrinkage of the conjunctival sac progresses slowly over several years, and eventually leads to corneal epithelial stem cell deficiency and corneal opacity. Using transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets to reconstruct the conjunctival sac in ocular pemphigoid patients is significant because of its role as a rescue therapy, namely stem cell protection before the development of epithelial stem cell deficiency.

All patients with thermal or chemical injury saw an improvement in their adhesion score within 4 weeks of transplantation with no tendency towards recurrence thereafter. However, in the ocular pemphigoid group, improvement was maintained in 5 eyes (50%), but adhesion recurred in 4 eyes (40%). It is unclear whether the two different postoperative courses were due to host factors or environmental factors. Further investigation is needed to clarify the role of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheet transplantation in ocular pemphigoid.

4.3 Adverse events

Adverse events included 24 cases of persistent epithelial defects in 22 patients (30.6%), 3 cases of infection in 3 patients (4.2%) and 7 cases of increased intraocular pressure due to steroids in 7 patients (9.7%). All cases of persistent epithelial defect ultimately healed, and none resulted in blindness.

Multivariate analysis to determine the factors associated with the occurrence of persistent epithelial defect in all cases of transplantation identified three factors: underlying disease (p = 0.0119), meniscus (p = 0.0323) and preoperative corneal neovascularization (p = 0.0806). These results indicate that an underlying condition of SJS, poor tear production with a very low meniscus and preoperative corneal neovascularization severe enough to cover the pupil are risk factors for developing persistent epithelial defect. In fact, persistent epithelial defect developed in 7 of 10 eyes having all three of these risk factors.

4.4 Long-term course

A long-term clinical follow-up of 19 eyes in 17 patients for over 3 years without additional intervention (including delayed surgery) revealed that the transplanted oral mucosal epithelium stabilized at 6 months after surgery and that a good epithelium was maintained on the ocular surface over a long period³⁶.

4.5 Prospective clinical study

Based on the above results, we limited patients for a prospective clinical study to those with the three most severe refractory conditions (SJS, ocular pemphigoid and severe thermal or chemical injury) and performed transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets in 22 patients between September 2014 and March 2017 as part of a prospective clinical study under the Advanced Medical Care System³⁷. The results are currently being analyzed.

4.6 Visual rehabilitation using limbal contact lenses

With the aim of reducing irregular astigmatism and dry eyes in severe ocular surface diseases, we developed our own rigid contact lens (limbal rigid contact lens) design with a diameter of 13 to 14 mm. A clinical study demonstrated significant improvement in visual acuity and quality of life, particularly in SJS patients³⁹. Therefore, we conducted an investigator-initiated study in SJS patients and obtained regulatory approval in February 2016⁴⁰.

Irregular astigmatism is present on the ocular surface after transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets. The use of limbal rigid contact lenses following epithelial stabilization after transplantation can reduce irregular astigmatism and improve visual function (Fig. 6)⁴¹. Limbal




Figure 6. Improvement in visual function using limbal rigid contact lenses. A patient with Stevens–Johnson syndrome with severe adhesion on the ocular surface and a preoperative vision of counting fingers (0.004). The patient's own oral mucosal epithelium transplanted onto the cornea was nearly stabilized 6 months after surgery, improving visual acuity to 0.05; the use of limbal rigid contact lenses further improved visual acuity to 0.9–1.0. This improvement has been maintained for over 7 years since surgery. [Modified from Ref. 41.]

COMET, cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation

rigid contact lenses can increase the therapeutic effects of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheet transplantation.

5. FUTURE PROSPECTS AND CHALLENGES

Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets brings a ray of hope to vision-impaired patients with severe ocular surface diseases. The technique could be expanded to treat other conditions. However, both social and medical challenges need to be overcome in order to further improve outcomes.

5.1 Expansion of indications

SJS, ocular pemphigoid and thermal or chemical injury lead not only to loss of the corneal epithelium, but also to the loss of conjunctival epithelial stem cells. Diseases with similar conditions include GVHD and idiopathic stem cell deficiency, and future expansion to include these indications is expected.

Among the patients classified in the 'Other' category in our early clinical studies, 4 patients had malignant tumours. If transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets could be used to treat malignancy, it would allow us to take a sufficient safety margin during tumour excision and expect rapid epithelial repair after surgery.

5.2 Medical challenges

One study has reported the induction of differentiation of iPS cells into corneal epithelial cell-like cells, which may enable cultivated autologous corneal epithelial sheets to be transplanted for bilateral diseases in the future⁴². However, the morphology and nature of epithelial cells vary with transplantation site and environment, and the factors that control these changes are not fully understood. Transplanting cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets had different outcomes depending on the underlying disease. We must continue our exploration of cell biology, including studying the cells in epithelial sheets and the relationship between the nature of the cells and their environment.

Recently, our group has developed a novel technique for culturing oral mucosal epithelial sheets using a feeder-free and serum-free culture system. Using this new protocol, we obtained favourable results in non-clinical studies⁴³. A phase 3 clinical trial using the new culture protocol is currently being conducted.

5.3 Social challenges

Practical application of regenerative medicine requires a large investment in facilities, including cell-culture facilities; however, companies cannot expect to recoup their investments for rare diseases. Reducing visual impairment can reduce social security expenses (e.g., by removing the need for disability pensions) and increase the labour force, which greatly benefits society. However, reduced social security expenses are not reflected in corporate profits. Finding a balance between corporate profit and social benefit is critical for determining which problems should be addressed.

REFERENCES

- Schermer, A., Galvin, S. & Sun, T. T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 103, 49–62 (1986).
- Kinoshita, S., Kiritoshi, A., Ohji, M., Oohashi, S. & Manabe, R. Disappearance of palisades of Vogt in ocular surface diseases. *Jap. J. Clin. Ophthal.* 40, 363–366 (1986) [in Japanese].
- Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N. et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. Prog. Retin. Eye Res. 20, 639–673 (2001).
- Dua, H. S., Saini, J. S., Azuara-Blanco, A. & Gupta, P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J. Ophthalmol.* 48, 83–92 (2000).
- Tseng, S. C. G. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 3, 141–157 (1989).
 Kinoshita, S. Ocular surface reconstruction by tissue engineering. *Nippon Ganka*
- Gakkai Zashi 106, 837–869 (2002) [in Japanese].
- Holland, E. J. Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 94, 677–743 (1996).
- 8. Thoft, R. A. Keratoepithelioplasty. Am. J. Ophthalmol. 97, 1-6 (1984).
- Turgeon, P. W., Nauheim, R. C., Roat, M. I., Stopak, S. S. & Thoft, R. A. Indications for keratoepithelioplasty. Arch. Ophthalmol. 108, 233–236 (1990).
- Thoft, R. A. & Sugar, J. Graft failure in keratoepithelioplasty. *Cornea* 12, 362–365 (1993).
- Pellegrini, G., Traverso, C. E., Franzi, A. T., Zingirian, M., Cancedda, R. *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* **349**, 990–993 (1997).
- Kinoshita, S., Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N. *et al.* Strategic research towards developing novel therapeutic methods for severe corneal diseases based on regenerative medicine. *Saishinigaku* 62, 132–180 (2007) [in Japanese].
- 13. Kinoshita, S. Future medical treatment for corneal diseases. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* **114**, 161–199 (2010) [in Japanese].
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N. & Kinoshita, S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 187–207 (2016).
- Kim, J. C. & Tseng, S. C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14, 473–484 (1995).
- Shimazaki, J., Yang, H. Y. & Tsubota, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* **104**, 2068–2076 (1997).
- Koizumi, N. J., Inatomi, T. J., Sotozono, C. J., Fullwood, N. J., Quantock, A. J. *et al.* Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr. Eye Res.* 20, 173–177 (2000).
- Ueta, M., Kweon, M. N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J. *et al.* Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 464–470 (2002).
- Endo, K., Nakamura, T., Kawasaki, S. & Kinoshita, S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the α5 chain of type IV collagen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1771–1774 (2004).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Quantock, A. J., Fullwood, N. J., Dota, A. *et al.* Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19, 65–71 (2000).
- Koizumi, N., Fullwood, N. J., Bairaktaris, G., Inatomi, T., Kinoshita, S. *et al.* Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2506–2513 (2000).

- Koizumi, N., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Inatomi, T., Kinoshita, S. *et al.* An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2114–2121 (2002).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **119**, 298–300 (2001).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108, 1569–1574 (2001).
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N. & Kinoshita, S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol.* 82, 468–471 (2004).
- Nakamura, T., Endo, K., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Tanifuji, N. *et al.* The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 106–116 (2003).
- Nakamura, T. & Kinoshita, S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22, S75–S80 (2003).
- Kinoshita, S. & Nakamura, T. Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif. Organs.* 28, 22–27 (2004).
- Hayashida, Y., Nishida, K., Yamato, M., Watanabe, K., Maeda, N. *et al.* Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1632–1639 (2005).
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K. *et al.* Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.* 351, 1187–1196 (2004).
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Amemiya, T., Kanamura, N. *et al.* Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br. J. Ophthalmol.* 88, 1280–1284 (2004).
 Sotozono, C., Inagaki, K., Fujita, A., Koizumi, N., Sano, Y. *et al.* Methicillin-resistant
- Sotozono, C., Inagaki, K., Fujita, A., Koizumi, N., Sano, Y. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in the cornea. *Cornea* 21, S94–S101 (2002).
- Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Sotozono, C., Yokoi, N. *et al.* Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am. J. Ophthalmol.* 141, 267–275 (2006).
- Inatomi, T., Nakamura, T., Kojyo, M., Koizumi, N., Sotozono, C. et al. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. Am. J. Ophthalmol. 142, 757–764 (2006).
- Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Yokoi, N. *et al.* Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Ophthalmol.* 120, 193–200 (2013).
- Nakamura, T., Takeda, K., Inatomi, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br. J. Ophthalmol.* **95**, 942–946 (2011).
- Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Hamuro, J. *et al.* Clinical study on cultivated autologous oral mucosal epithelial sheet transplantation for treating patients with intractable keratoconjunctival disease. *Nippon Rinsho* 73, 447–451 (2015) [in Japanese].
- Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Yokoi, N. *et al.* Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity. *Acta Ophthalmol.* **92**, e447–e453 (2014).
- Sotozono, C., Yamauchi, N., Maeda, S. & Kinoshita, S. Tear exchangeable limbal rigid contact lens for ocular sequelae resulting from Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. *Am. J. Ophthalmol.* **158**, 983–993 (2014).
- Sotozono, C. Clinical trial of tear exchangeable limbal supported rigid contact lens CS-100 for ocular sequelae due to Stevens-Johnson syndrome. *Nippon Hyouka* 43, 203–205 (2015) [in Japanese].
- Sotozono, C. New treatments for practical refractory ocular surface disease and its practical application. J. Kyoto Pref. Univ. Med. 126, 145–155 (2017) [in Japanese].
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Sasamoto, Y., Katori, R., Nomura, N. *et al.* Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* 531, 376–380 (2016).
- Nakamura, T., Yokoo, S., Bentley, A. J., Nagata, M., Fullwood, N. J. *et al.* Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction. *Sci. Rep.* 6, 37173 (2016).

A tissue-engineering approach to tympanic membrane regeneration



Shinichi Kanemaru

Translational Research Center for Medical Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe, Japan

A new treatment has been developed by researchers associated with the Translational Research Center for Medical Innovation (TRI) in Japan that involves stimulating tissue stem cells or progenitor cells in order to repair perforations in the tympanic membrane. This treatment is safer and easier to administer than currently available therapies. It involves enlarging perforations and providing a gelatin sponge impregnated with basic fibroblast growth factor as a substrate for new cells to grow on. The Japanese government approved the treatment in August 2019, making it the first approved tissue-engineering treatment in Japan for repairing perforations in the tympanic membrane.

1. INTRODUCTION

Regenerative medicine seeks to harness the natural process of regeneration by inducing cells to differentiate and proliferate so that they reconstruct irreversibly damaged tissues and organs.

A fundamental property of living organisms is their ability to restore damaged components. The extent of restoration depends on the severity of the damage. In cases of fairly minor damage, tissues or organs can spontaneously heal through regeneration, being completely restored to their original state. In more severe cases, healing may fail to restore the original state, resulting in deformation or degeneration. The innate regenerative capacity also varies with the tissue or the organ. For example, even when cut in half, the liver can regenerate to almost its original size within a few months. Regenerative capacity also varies with species. For instance, newts and lizards can regrow severed tails and limbs. Generally, tissues and organs with active cell division, and lower forms of life, have a high regenerative capacity. Research into developmental processes and regeneration in various animal species has led to the development of regenerative medicine, which seeks to find ways to restore tissues and organs to their original state by promoting non-spontaneous regeneration.

Regenerative medicine has its origins in the artificial-organ research conducted in the 1950s, mainly in Europe and the United States. Materials with a high affinity for tissues were studied and developed with a view to implanting artificial organs in the body, a contrasting approach to *ex vivo* technologies such as dialysis. This led to the emergence of the new medical field of tissue engineering^{1–3} (also called regenerative medical engineering or regenerative tissue engineering). Combining medicine and engineering, tissue engineering forms the basis of regenerative medicine. To regenerate tissues and organs the following three elements need to be placed in a suitable environment: cells that provide the basis for tissue regeneration; a scaffold to support cell differentiation and proliferation; and factors that regulate these processes (Fig. 1). These three elements are known as the triad of tissue engineering. The development of regenerative medicine



SUMMARY

A tympanic membrane perforation is more than simply a hole in the eardrum - it causes or augments hearing loss, significantly reducing a patient's quality of life. Recent studies have found that hearing loss is one of the major contributors to the development of dementia. In rapidly ageing countries, such as Japan, the impact of problems resulting from communication disorders should not be underestimated. Advances in tissue engineering have delivered a major breakthrough in the treatments available: the development of a therapy involving the body's self-repair system (i.e., regenerative medicine). The tympanic membrane has a natural capacity to regenerate. Elucidating and understanding the mechanism of this regeneration has inspired the development of a safer and more convenient therapy, which is amenable to patients. This treatment involves enlarging perforations and providing a gelatin sponge impregnated with basic fibroblast growth factor as a substrate for new cells to grow on.

CORRESPONDING AUTHOR Shinichi Kanemaru

E-mail: kanemaru@ent.kuhp. kyoto-u.ac.jp

Figure 1. The tissue engineering triad.



has been undergirded by recent remarkable developments in fields such as tissue engineering, molecular biology and developmental genetics, and especially by huge advances in stem-cell research, including the generation of induced pluripotent tissue stem cells or progenitor cells. These advances have extended the range of cells that can be used and have found wide application in the development of disease models and the discovery of new drugs. However, clinical applications have been limited as there are many unresolved issues, including medical, ethical and social ones, such as the safety of cell transplantation, sources of tissue stem cells or progenitor cells, and rejection reactions. Whether regenerative medicine will become a major pillar of medical treatment in the future is still uncertain, but some progress in regenerating tissues and organs has already been reported and regenerative medicine is likely to significantly change clinical practice in the near future.

Here, we describe the background and development of the regenerative therapy for the tympanic membrane that we have developed^{4,5} and present clinical results from a preliminary single-centre study and an investigator-initiated clinical study.

1.1 Structure of the tympanic membrane

The tympanic membrane is a very thin membrane located between the outer and middle ear. It is 8 to 10 mm in diameter and shaped like a funnel, with a concave region known as the umbo in its centre (Fig. 2). The manubrium of the malleus, one of the auditory ossicles, is attached to the tympanic cavity side. A fibrocartilage-like tissue called the tympanic ring connects the outer edge of the tympanic membrane to the external auditory canal bone. The membrane has a trilaminar structure: an epithelial layer, which is continuous with the skin of the external auditory canal; the lamina propria (the middle layer), which consists of fibrous collagen tissue and which imparts strength to the tympanic membrane; and the mucous membrane layer, which is continuous with the mucous membrane of the tympanic cavity. The tympanic membrane consists of two parts: the pars tensa and the pars flaccida. The pars tensa has this trilaminar structure, but the pars flaccida lacks the middle layer, making it susceptible to the impact of pressure in the middle ear. The nutrient vessels that supply the tympanic membrane run in the lamina propria, and their numbers tend to decrease with age. Many nutrient vessels are concentrated around the tympanic ring and the manubrium of the malleus and the umbo in a normal tympanic membrane.

1.2 Problems caused by perforation of the tympanic membrane

Not only is a perforated tympanic membrane unable to capture sound sufficiently well for normal hearing, but also sound penetrates the tympanic cavity through the perforation, enters the inner ear as vibrational energy through the round window of the cochlea, and ascends the cochlear floor from the bottom (cochlear basal turn) to the top (cochlear apex). Sound entering by the normal route via the residual tympanic membrane and the oval window ascends the scala vestibuli from the bottom to the top through the oval window. When these two vibrations collide with each other near the cochlear apex, energy is rapidly attenuated because of cancellation, resulting in hearing loss. The intelligibility of speech is also reduced, making it difficult to understand spoken words⁶. Patients with both presbycusis (age-related hearing loss) and tympanic membrane perforations experience significant hearing loss and may require a hearing aid depending on perforation size. A hearing aid further increases the cancellation effect. Consequently, while it amplifies the sound entering the ear, it does not improve word recognition.

When there is a tympanic membrane perforation, the middle ear is directly exposed to the outside via the external auditory canal. The resulting susceptibility to infection can lead to otitis media. Changes in temperature and pressure can damage the inner ear and cause dizziness, which leads to sensorineural hearing loss over time. It is thus desirable to close membrane perforations as much as possible to maintain a good conduction environment in the middle ear and to prevent injury to the inner ear.

1.3 Causes of tympanic membrane perforations

According to the World Health Organization, chronic otitis media affects up to 330 million patients worldwide⁷. Tympanic membrane

perforations usually accompany chronic otitis media, but they can also be caused by trauma, incision, tube placement in the tympanic membrane, burns, radiotherapy and other causes. Thus, the number of patients with tympanic membrane perforations is likely to exceed the above number.

Perforations due to physical or mechanical injury generally heal by themselves within three months in most patients⁸. Therefore, with the exception of cases where skull fracture or other severe injuries have greatly deformed the tympanic membrane, observation for at least six months is standard first-line management for simple perforations caused by, for example, a cotton bud, a slap in the face, or barotrauma due to rapid pressure changes caused by a blast or air travel. In contrast, persistent perforations following otitis media or tube placement in the tympanic membrane as well as perforations caused by burns or radiotherapy often require some surgical treatment.

1.4 Current treatment of tympanic membrane perforations

The current methods for closing perforations in the tympanic membrane are primarily myringoplasty and tympanoplasty. For small perforations, the surface may be covered with collagen and chitin membranes after transforming the perforation edges into an open wound9. Myringoplasty targets tympanic membrane perforations alone and is performed in patients with a normal ossicular chain and who have no inflammation, infection or lesions in their middle ear. Tympanoplasty involves reconstructing the ossicular chain regardless of the presence of a tympanic membrane perforation and is classified into types I-V based on the severity of defects in the auditory ossicles. Type I tympanoplasty is performed primarily on patients with a normal ossicular chain to suppress inflammation, infection or lesions in the middle ear. In any type of tympanoplasty, autologous tissue such as temporal fascia is collected as material for reconstructing the tympanic membrane, and the epithelial layer of the residual tympanic membrane is detached to insert the autologous tissue between the epithelial layer and the fibrous middle layer. Alternatively, the mucous membrane layer (the deepest layer) around the perforation may be incised to adhere the autologous tissue to the wound site. The tympanic membrane is closed when the upper epithelial layer and the mucous membrane layer are extended with the autologous tissue as the scaffold.

Tympanoplastic methods have high success rates because of the strong affinity between tissues due to the use of autologous tissues for reconstruction. However, tympanic membranes produced by these procedures usually lack a normal middle layer because it is harder to regenerate that fibrous layer than the other two layers in the tympanic membrane. The transplanted autologous tissue may gradually degenerate, resulting in a weak tympanic membrane that lacks a middle layer. Alternatively, if it does not degenerate, a very thick tympanic membrane may result. A mixture of these two patterns may occur. New perforations at this site rarely close spontaneously.

If the ossicular chain is normal, hearing recovers to some extent after closing the perforation, but perfect hearing with no air-bone gap is hard to achieve because the conduction efficiency varies depending on both the degree of contact with the malleus and the thickness of the tympanic membrane. Incision of the postauricular skin and collection of autologous tissue for reconstructing the tympanic membrane may result in various sequelae, such as sensory loss and discomfort around the auricle.

2. THE BIOLOGY AND NON-CLINICAL PROOFS OF CONCEPT OF NEW TREATMENTS

2.1 Healing mechanism for tympanic membrane perforations

Since small perforations in healthy tympanic membranes caused by trauma often heal, many studies have focused on this mechanism for regenerating the membrane¹⁰⁻¹³. Most of these studies are animal experiments, and they have shown that the epithelial layer in the trilaminar structure of the tympanic membrane extends first and



Figure 3. Tympanic membrane that has healed spontaneously. The white arrow points to a transparent area of tympanic membrane that has formed without the middle layer. No nutrient vessels can be seen. The edge of the middle layer can be observed as a white margin surrounding the transparent tympanic membrane.

that the two other layers then extend using the epithelial layer as the scaffold¹⁰. Thus, each layer has a different rate of regeneration and a different capacity to regenerate. The fibrous middle layer gives strength and elasticity to the tympanic membrane, but it regenerates slower than the epithelial layer above it and the mucous membrane layer beneath it. Therefore, if the epithelial and mucous membrane layers, which regenerate faster, adhere to each other in regions beyond the middle layer, the fibrous layer will lack space to grow further and the perforation will persist if regeneration of the epithelial and mucous membrane layers stops at this point. If regeneration proceeds and the perforation is closed, a fragile and transparent tympanic membrane will form that lacks a fibrous layer (Fig. 3). The edge of the regenerated fibrous layer turns white. A slight pressure change can then cause reperforation.

The tympanic membrane's regenerative capacity indicates the presence of tissue stem cells or progenitor cells in the membrane and its surroundings. Indeed, animal experiments have shown that these cells probably exist in the tympanic membrane ring and the malleus (umbo and manubrium) and that injuring the membrane initiates their active proliferation^{14,15}. Normally, these cells only support cell turnover in the tympanic membrane, but an injury to the membrane appears to trigger the repair system and initiate active reactions. However, these cells are dormant in chronic tympanic membrane perforations. Thus, when the tympanic membrane is injured, the regeneration mechanism is switched on by the injury itself. However, if the regeneration environment is unfavourable (as is the case in an infection and chronic inflammation) or if the perforation is large, cell growth stops prematurely and the perforation persists. It is thus critical to maintain a favourable regeneration environment.

Observation of the natural course of tympanic membrane regeneration indicates that it is necessary to:

- promote growth of the fibrous middle layer of the membrane;
- provide a scaffold on which each membrane layer can grow;
- maintain a suitable regeneration environment that efficiently promotes membrane regeneration.

2.2 Promoting growth of the fibrous middle layer of the tympanic membrane

Various growth factors have been found for the fibrous middle layer of the tympanic membrane, but few are suitable for clinical application. Among those that are suitable, basic fibroblast growth factor (bFGF) is already marketed as a drug product in Japan, and its use for treating skin ulcers is covered by health insurance. bFGF directly affects cell proliferation and blood vessel growth^{16,17}.

During regeneration of a normal tympanic membrane, it is essential to maintain enough blood flow to support regeneration of the trilaminar structure, particularly the fibrous middle layer, which regenerates very

Tissue Engineering 3



Collagen

Gelatin sponge

1

3

5

Figure 4. Difference in density between collagen and gelatin sponge (electron micrographs).







anesthesia of the remaining tympanic membrane and the tympanic membrane perforation edge with a 4% lidocaine swab; 2. Transformation of the tympanic membrane edge into an open wound; 3, 4. Placement of b-FGF-impregnated gelatin sponge; 5. Covering the b-FGF-impregnated gelatin sponge with fibrin glue; 6. Removal of the crust three weeks after treatment.

slowly. bFGF is therefore ideal as it directly affects the growth of fibroblasts essential for regenerating the fibrous layer¹⁸ and also induces blood vessels to supply nutrients to the surrounding tissues.

2.3 Providing a scaffold on which each tympanic membrane layer can grow

In tissue regeneration, selection of a scaffold for cell growth is critical. A scaffold needs to have a high tissue affinity and be able to be eliminated by absorption or degradation after serving as a scaffold.

Our tympanic membrane regeneration therapy involves impregnating a bioabsorbable scaffold material with the growth factor, placing it within the tympanic membrane defect and fixing it with a bioadhesive glue. We selected gelatin sponge as the scaffold material for regenerating the tympanic membrane. Its primary component is the triple-helical structure of collagen molecules uncoiled by heat denaturation. When a

liquid is added, it becomes a free-shaped pliable mass and has a much looser structure than collagen (Fig. 4). Gelatin sponge is hydrolyzed and eliminated from the body within 1 month^{19,20}, although it may take a few months to eliminate it from the tympanic membrane because the tympanic cavity contains air and is not in living tissue.

Our therapy differs from many conventional ones in that it uses free-shaped gelatin sponge as a scaffold. Conventional therapies repair defects in the tympanic membrane by extending the surrounding tissues along the inner and outer surfaces of the sheet-like scaffold material glued to the portion of the tympanic membrane with the defect. If the membrane perforation is small and the entire defective portion is flat, it can be effectively repaired by conventional methods. If the defect is larger however, it is difficult to cover the entire defective portion with a flat sheet of material because of the complicated shape of the tympanic membrane and the auditory ossicle attached to it. If the defective portion cannot be



Reprinted from Ref. 4, with permission

Figure 7. Tympanic membrane regeneration in a 65-year-old woman who had chronic otitis media for 30 years. 1, Before regeneration treatment; 2, transformation of the tympanic membrane perforation edge into an open wound; 3, placement of b-FGF-impregnated gelatin sponge and covering with fibrin glue; 4, regenerated tympanic membrane and remaining gelatin sponge in the tympanic cavity 3 weeks after treatment; 5,6, the gelatin sponge in the tympanic cavity is eliminated, and numerous capillaries are observed in the regenerated tympanic membrane 4 months after treatment.

completely covered, the tympanic membrane cannot be repaired without a scaffold, or the membrane may fuse with the surrounding tissue, resulting in sequelae. In fact, if the tympanic membrane defect exceeds a certain size or if part of the auditory ossicle is affected, conventional therapies will fail to repair the perforation because the scaffold cannot cover the entire defect.

In contrast, gelatin sponge can easily cover an entire defect regardless how complex its shape is. And it is effective even for defects that span the entire tympanic membrane. This scaffold material has enabled the successful regeneration of a tympanic membrane with large perforations and virtually no residual membrane²¹. Gelatin sponge can also release bFGF in a sustained manner²², which is advantageous for tympanic membrane regeneration.

Observation of a patient whose tympanic membrane had been completely regenerated by this therapy (Fig. 5) reveals that part of the gelatin sponge remains inside the tympanic membrane (in the tympanic cavity), and the gelatin sponge on the outside (in the external auditory canal) has separated as a crust. This indicates that the regenerated tympanic membrane grows through the inside of the very loose open structure of the gelatin sponge (Fig. 4), which shows that the therapy is based on a different concept from that of conventional tympanic membrane regeneration. Tissues do not regenerate through the inside of a dense scaffold, such as the sheet-like collagen membrane used in conventional therapy, but rather grow along the surface of the scaffold. But because a loosely structured scaffold such as gelatin sponge does not interfere with the expansion of cells, regenerative cells can pass through the inside of the loose structure to repair the tympanic membrane.

2.4 Maintaining a favourable regeneration environment

For tissue regeneration to occur, the conditions must be suitable for *in vivo* cell culture. In our therapy, the scaffold is fixed in place for a certain time by dripping fibrin glue onto it and thereby covering the surface of the gelatin sponge with a fibrin membrane. The inside of the gelatin sponge is kept moist to isolate the culture environment from the outside.

3. TREATMENT PROCEDURE

Tympanic membrane regenerative therapy is based on the concept of *in situ* tissue engineering. The tissue engineering elements used are endogenous tissue stem cells or progenitor cells, gelatin sponge (Spongel[®], Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) as a scaffold and basic bFGF (Fiblast[®], Kaken Pharma Co., Ltd, Tokyo, Japan) as a regulatory factor. A fibrin glue (Bolheal[®], Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute [Kaketsuken], Kumamoto, Japan; Beriplast[®], CSL Behring K.K., Tokyo, Japan) is also used to prepare a favourable regeneration environment. Cells are not transplanted in this environment; rather the edge of the tympanic membrane perforation is made into an open wound, which activates dormant endogenous tissue stem cells or progenitor cells.

Figure 6 shows the steps involved in the therapy. To anaesthetize the external auditory canal, including the residual tympanic membrane around the perforation and its surroundings, a swab impregnated with 4% lidocaine is inserted and kept in place for 15–20 minutes. The edge of the tympanic membrane perforation is then transformed into an open wound using a myringotomy knife or a Rosen probe. At this point, the circumferential edges of all three layers of the tympanic membrane are exposed.

Gelatin sponge impregnated with bFGF is then trimmed to fit the size of the tympanic membrane perforation and placed between the tympanic cavity and the external auditory canal. It is important to place sufficient sponge pieces to sandwich the residual tympanic membrane from both the tympanic cavity side and the external auditory canal side, so that the gelatin sponge is in complete contact with the whole tympanic membrane perforation edge and there are no gaps. Finally, a few drops of a fibrin glue are dripped from a syringe to cover and stick to the entire gelatin sponge. After three weeks, the wound crust is removed from the upper surface of the tympanic membrane to check for regeneration. If the crust adheres to the surface, it may be removed by inserting a swab impregnated with 4% lidocaine from the external auditory canal for 15-20 minutes. If complete regeneration does not occur after the first treatment, the treatment may be repeated after removing the gelatin sponge retained in the tympanic cavity or the external auditory canal. Retreatment should be limited to four attempts, as clinical experience has shown that the probability of regenerating the tympanic membrane is very low beyond the fourth treatment. If otorrhea due to infection or inflammation is observed after regeneration treatment, further treatments are suspended, and oral or eardrop antibiotic therapy is initiated to suppress inflammation and otorrhea. Treatment is resumed after adequate healing (which may be several months). There may be allergic reactions to gelatin sponge, bFGF, or fibrin glue in rare cases.

Classification of TM perforation by size		Grade I (<i>N</i> = 85)	Grade II (<i>N</i> = 83)	Grade III (<i>N</i> = 64)
TM perforation closure rate		81.2% (69/85)	86.7% (72/83)	75.0% (48/64)
Hearing improvement (three-frequency average)		9.1 dB	12.4 dB	16.3 dB
Major AEs	Chole	1	3	5
	ТО	8	14	13
	DTM	4	8	7

• Grade I, perforation occupying < 1/3 of the TM; Grade II, perforation occupying 1/3–2/3 of the TM; Grade III, perforation occupying > 2/3 of the TM

• TM, tympanic membrane; AEs, adverse events; Chole, cholesteatoma; TO, transient otorrhea; DTM, depressed TM

 $\label{eq:table_table_table} \textbf{Table 1.} Results of preliminary single-centre study of tympanic membrane regeneration therapy$

4. CLINICAL RESULTS

4.1 Preliminary single-centre study

4.1.1 Selection of patients and materials

This new therapy was approved by the institutional review board of Kanai Hospital in Kyoto. And patients were limited to those who fully understood the procedure and agreed to pursue this new treatment by signing informed consent documents. To examine the efficacy and safety of tympanic membrane regenerative therapy in a clinical setting, we first conducted a single-centre preliminary study. This involved 218 patients (232 ears) with tympanic membrane perforations and no confirmed active infection or inflammation in the middle or outer ear. The causes of tympanic membrane perforations were chronic otitis media (n = 136), old traumatic tympanic membrane perforations (n42), persistent perforations after tympanic membrane incision or tympanic membrane tube placement due to exudative otitis media (n = 26), reperforations after closure of tympanic membrane perforations or tympanoplasty (n = 15), burns (n = 4), post-irradiation (n = 3) and unknown (n = 6). The male/female ratio was 101:117. Patients ranged from 8 to 91 years of age.

Patients were divided into three groups according to perforation size. Perforations occupying less than 1/3, 1/3 to 2/3 and more than 2/3 of the tympanic membrane were classified as grades I, II and III, respectively.

4.1.2 Treatment method

The treatment procedures are described above. After treatment, patients were instructed not to apply pressure to the ear by strong sniffing or nose blowing, to use caution when washing their hair or having a bath so that water would not enter the affected ear and to visit the outpatient clinic 3 weeks after surgery.

4.1.3 Assessment

The success of perforation closure was assessed according to the size of the perforation, the number of treatments required for closure and the



Figure 8. Tympanic membrane regeneration rate and number of treatments required for regeneration in preliminary study. The tympanic membrane regeneration rate after a maximum of four treatments was 81% (189/232 ears), and 82% of tympanic membrane regenerations were achieved with two or fewer treatments.

degree of hearing improvement three months after the final treatment. Occurrences of adverse events were recorded.

4.1.4 Results

Table 1 shows the results, while Fig. 7 shows an example of regeneration. Overall, the tympanic membrane perforation closure rate (189/232 ears) was 81%, and favourable hearing improvement was achieved with a small air-bone gap. Of the 189 ears with successful tympanic membrane regeneration, 80% or more had perforation closure with two or fewer treatments (Fig. 8). The most common adverse event was transient otorrhea (35/232 ears, 15.1%). Some cases of depressed tympanic membrane (19/232 ears, 8.2%) required tympanic membrane incision (5/232 ears, 2.2%). Additionally, cholesteatoma (9/232 ears, 3.9%) occurred under the epithelium of the tympanic membrane, but all lesions could be removed with a probe.

Regeneration is difficult if the tympanic membrane ring or the malleus has been lost during tympanoplasty or by other causes. Regeneration was successful in some patients with the tympanic membrane ring and the malleus conserved in tympanoplasty, and the regeneration rate (4/15 ears) was only 26.7%. No regeneration occurred in membrane perforations caused by burns or radiotherapy. These results suggest that tissue stem cells or progenitor cells may have been eliminated in these patients. Reperforation occurred in four patients (1.7%, 4/232 ears) during the three-month observation period, and all these perforations were about the size of a pin hole.

5. INDICATIONS FOR TYMPANIC MEMBRANE REGENERATION 5.1 Exclusion criteria for tympanic membrane regeneration

Only 20–30% of patients with perforations meet the eligibility criteria for tympanic membrane regeneration. Finding ways to increase the number of eligible patients in the future is thus important. The exclusion criteria for receiving tympanic membrane regenerative therapy shown below are based on the results of previous clinical studies:



Figure 9. Tympanic membrane regeneration in a 39-year-old woman with chronic otitis media. Fibrescope images [1, 2] before treatment and [3] two months after treatment. The patient had otorrhea and calcification in the remaining tympanic membrane (black arrows). The perforation edge could not be directly observed microscopically because of the extension of the anterior and lower walls of the external auditory canal (white arrows). Regeneration treatment was performed after washing the inside of the tympanic cavity and removing the calcified remaining tympanic membrane endoscopically. The regenerated tympanic membrane is virtually normal without calcification 2 months after treatment.

- 1. The patient has active infection or inflammation in the tympanic cavity or the external auditory canal as well as otorrhea.
- 2. The tympanic membrane, tympanic cavity and external auditory canal are not dry, or advanced calcification is observed in the residual tympanic membrane.
- 3. High-resolution computed tomography of the temporal bone shows a soft tissue shadow in the tympanic cavity or the mastoid cavity.
- 4. The patient has a history of middle-ear surgery such as tympanoplasty or myringoplasty.
- 5. The tympanic membrane perforation was caused by radiation or burns.
- 6. The normal structure of the middle ear is lost (including loss of the tympanic membrane ring and fusion of the residual tympanic membrane).
- 7. The edge of the perforation cannot be directly observed using microscopy because of a narrow external auditory canal.

These criteria can be divided into three categories. Criteria 1, 2 and 3 represent a poor regeneration environment; criteria 4, 5 and 6 represent a partial or total lack of tissue stem cells or progenitor cells supporting tympanic membrane regeneration; and criterion 7 represents a condition where the entire circumferential edge of the perforation cannot be transformed into an open wound because of the narrow external auditory canal.

5.2 Expansion of indications

Among the exclusion criteria, a lack of tissue stem cells or progenitor cells presents the most difficulties for regeneration, and co-transplantation of cells with the scaffold is the only conceivable regeneration method. For criteria 1, 2 and 3, tympanic membrane regeneration can be performed if the regeneration environment is improved. For criterion 7, where the perforation edge cannot be directly observed by microscopy because of a narrow external auditory canal, tympanic membrane regeneration can be performed endoscopically if an endoscope can be used to observe the entire tympanic membrane and perform treatment. If observation and treatment are still difficult, tympanic membrane regeneration may be performed after expansion of the external auditory canal. All these solutions are more straightforward than those for criteria 4, 5 and 6. Where a soft tissue shadow is present in the tympanic or mastoid cavity (criterion 3), such lesions usually need to be removed by opening and drilling the bone using a procedure such as tympanomastoidectomy. In conditions corresponding to criterion 6, a significant loss of middle-ear structure and large displacement of the residual tympanic membrane due to adhesive otitis media make regeneration very difficult.

5.3 Improving the regeneration environment before regeneration

If the inside of the ear is wet during the inactive phase of chronic otitis media or the patient has active infection or inflammation and otorrhea that is considered to be acute exacerbation of chronic otitis media, but meets other eligibility criteria, conservative treatment is first performed with oral antibiotics and eardrops, and followed up for one to two months. When inflammation has been suppressed, the tympanic cavity is washed repeatedly in the operating room, mucus in the tympanic cavity is completely removed with a swab, and the patient continues with tympanic membrane regenerative therapy. This method resulted in a tympanic membrane regeneration rate of 70–80% in our patients (Fig. 9)²¹.

For patients with advanced calcification or ectopic ossification in the residual tympanic membrane or epithelial invasion (cholesteatoma) into the back of the tympanic membrane, all the residual tympanic membrane is removed before regeneration (Fig. 9).

For patients with a lesion in the tympanic cavity, mainly cholesteatoma or tumour confined to the tympanic cavity, the cholesteatoma or tumour is removed before starting membrane regeneration. The lesion may be removed microscopically or endoscopically, but the inside of the tympanic cavity must be observed endoscopically after removal to check whether there is any remaining lesion. Among cases of cholesteatoma confined to the tympanic cavity, congenital cholesteatoma is most suitable for regeneration treatment. Among tumours, glomus tympanicum tumours are suitable. The membrane regeneration rate is very high among patients with these conditions, being 95% or higher in our patients²¹.

5.4 Expansion of the external auditory canal

Many patients have a narrow external auditory canal. The external auditory canal has a tubular structure 30–35 mm long and 10 mm in diameter. The proximal half from the entrance of the external auditory canal is the cartilaginous portion, and the distal half is the bone portion. Although there are some differences in shape between adults and children, the section connecting the cartilaginous portion and the bone portion has a slight bend (Fig. 2). In many patients with a narrow external auditory canal, the edge of the perforation cannot be directly observed microscopically because of an extension of the bone portion. The perforation edge can be transformed into an open wound by using an endoscope in most patients. However, because surgical instruments cannot be inserted together with an endoscope into an ear with a very long extension of the bone portion, the external auditory canal needs to be expanded.

To expand the external auditory canal, incisions are made on the luminal surface of the narrow lesion of the external auditory canal longitudinally and perpendicularly to it, in order to peel back part of the soft tissue on the surface and expose the surface of the extended bone. This is removed with a diamond bur, and the surface is smoothed. The external auditory canal is expanded until the edge of the perforation can be sufficiently well observed for regeneration treatment. The detached soft tissue of the external auditory canal is replaced, and bFGF-impregnated gelatin sponge pieces used for tympanic membrane regeneration are placed around the exposed bone and fixed with fibrin glue. If the bone is exposed over a wide area, gelatin sponge is used to fill the external auditory canal and fixed with fibrin glue. The entire auricle is covered and sealed with medical film. The filled gelatin sponge is removed after three weeks. The soft tissue of the external auditory canal and the tympanic membrane can both be regenerated simultaneously using this method^{22,23}.

6. FUTURE PROSPECTS

6.1 Prospects and issues for chronic otitis media

The primary goal of tympanic membrane regeneration is to restore ideal hearing with no air-bone gap by minimally invasive surgery. There are several advantages of closing the tympanic membrane, including improved hearing, relief of discomfort, prevention of otitis media and, in the longer term, protection of the middle and inner ear. However, hearing is not only affected by tympanic membrane perforations, but also by complex factors relating to other structures in the middle and inner ear and to the retrocochlear region and the central nervous system. For example, if tympanic membrane regeneration is performed in patients with a perforation and a poorly functioning eustachian tube due to poor growth of mastoid air cells, depression of the tympanic membrane and exudative otitis media may occur, because the middle ear pressure, which was regulated via the perforation, is no longer regulated, and hearing recovery may be inadequate.

As tympanic membrane perforations are mainly caused by chronic otitis media, eligibility for membrane regeneration is most critical for patients with this condition. Many patients with chronic otitis media have lesions in the mastoid cavity as well as in the tympanic cavity. A combination of tympanic membrane regeneration and conventional tympanomastoidectomy is recommended for patients with lesions in both cavities. To establish adequate communication between the tympanic and mastoid cavities, the lesions in both cavities are removed by procedures such as tympanomastoidectomy. Membrane regenerative therapy, rather than the usual autologous tissue transplantation, is performed to reconstruct the tympanic membrane. However, to allow for tympanic membrane regeneration, it is essential not to injure the tympanic membrane ring when detaching all tympanic membrane layers in order to retain tissue stem or progenitor cells and to retain the residual tympanic membrane attached to the malleus, and the umbo and manubrium^{15,16}. This therapy is suitable for only certain patients, and it requires a high level of surgical skill. In addition, otitis media with cholesteatoma will reoccur if the mechanisms are not improved that reduce pressure in the middle ear, since impaired middle ear gas exchange leads to depression of the upper tympanic cavity and the formation of cholesteatoma. Because adhesive otitis media is also caused by reduced pressure in the middle ear, a simple combination of tympanomastoidectomy and tympanic membrane regeneration cannot cure the disease completely. Poor mastoid cell growth leads to a poorly functioning eustachian tube. They facilitate middle ear gas exchange in a complementary way. Therefore, regeneration of mastoid air cells may be needed in combination with these procedures to improve middle ear gas exchange^{23,24}.

6.2 Prospects and issues for patients lacking tissue stem cells or progenitor cells

Regeneration is most difficult when tissue stem cells or progenitor cells are not present. Obtaining tissue stem cells or progenitor cells is hence a vital issue. We previously reported that these cells are present in the tympanic membrane ring and the malleus (umbo and manubrium)^{15,16}. Both the tympanic membrane ring and the malleus are essential to regenerate the tympanic membrane with a complex shape. One method uses the tympanic membrane ring and tympanic membrane, including the malleus, from

6.3 Prospects for tympanic membrane regeneration

Otologic surgeries, such as common myringoplasty, require a fully equipped operating room and a wide variety of surgical instruments and are usually performed under general anesthesia. In addition to incision of the postauricular skin and collection of autologous tissues such as temporal fascia, these surgeries require multistep surgical procedures such as detaching the external auditory canal, opening and drilling the bone, raising the epithelial layer of the tympanic membrane, transforming the perforation edge into an open wound, transplanting the temporal fascia and tamponing. At least 1 hour of surgery is required. In addition, patients need to rest in bed and limit daily activities to prevent infection and displacement of the transplanted fascia. An even bigger challenge is training surgeons well enough to perform these otologic surgeries, because training takes a long time and requires the input of senior surgeons. In contrast, tympanic membrane regenerative therapy for a simple perforation involves only transforming the perforation edge into an open wound and placing the gelatin sponge. Treatment takes only about 15 minutes. Treatment can be performed on a chair or a cot bed in an outpatient setting, and only a few types of instrument are needed, including a simple microscope or endoscope. Hospitalization or bed rest is unnecessary after surgery, and patients need to visit the clinic for a checkup only once every three or four weeks after treatment. Physicians can be quickly trained in this therapy because the treatment is very simple and non-invasive compared with conventional surgical procedures. This therapy costs only a fraction of tympanic membrane regenerative therapy combined with myringoplasty. As well as being cost effective, tympanic membrane regenerative therapy realizes closure of the tympanic membrane perforation for a similar percentage of patients as conventional surgeries, while it achieves far better hearing.

Convenience and low cost are great advantages in developing countries, where the therapy is needed most by young patients. In developed countries, the therapy will lower the psychological hurdle for middle-aged and senior patients who have given up on treatment for tympanic membrane perforations and, in addition to improving hearing, it will reduce the risks of dementia due to hearing loss.

REFERENCES

- 1. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. Science 260, 920–926 (1993).
- Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A. *et al.* Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.* 23, 3–9 (1988).
- Vacanti, C. A., Kim, W., Upton, J., Vacanti, M. P., Mooney, D. et al. Tissueengineered growth of bone and cartilage. *Transplant. Proc.* 25, 1019–1021 (1993).
- Kanemaru, S., Umeda, H., Kitani, Y., Nakamura, T., Hirano, S. *et al.* Regenerative treatment for tympanic membrane perforation. *Otol. Neurotol.* 32, 1218–1223 (2011).
- Omae, K., Kanemaru, S., Nakatani, E., Kaneda, H., Nishimura, T. *et al.* Regenerative treatment for tympanic membrane perforation using gelatin sponge with basic fibroblast growth factor. *Auris Nasus Larynx* 44, 664–671 (2017).
- Ahmad, S. W. & Ramani, G. V. Hearing loss in perforations of the tympanic membrane. J. Laryol. Otol. 93, 1091–1098 (1979).
- Acuin, J. Child and Adolescent Health and Development Prevention of Blindness and Deafness. World Health Organization (Geneva, 2004, WHO).
- Jin, Z.-H., Lou, Z.-H. & Lou, Z.-C. Assessment and spontaneous healing outcomes of traumatic eardrum perforation with bleeding. *Am. J. Otolaryngol.* 38, 479–483 (2017).
- Kim, J. H., Choi, S. J., Park, J.-S., Lim, K. T., Choung, P. H. et al. Tympanic membrane regeneration using a water-soluble chitosan patch. *Tissue Eng. A.* 16, 225–232 (2010).
- Johnson, A. P., Smallman, L. A. & Kent, S. E. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Oto-Laryngol.* 109, 406–415 (1990).

- Fina, M., Bresnick, S., Baird, A. & Ryan, A. Improved healing of tympanic membrane perforations with basic fibroblast growth factor. *Growth Factors* 5, 265–272 (1991).
- Mondain, M. & Ryan, A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope* 103, 312–318 (1993).
- Ma, Y., Zhao, H. & Zhou, X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Oto-Laryngol.* 122, 586–599 (2009).
- 14. Knutsson, J., von Unge, M, & Rask-Andersen, H. Localization of progenitor/stem cells in the human tympanic membrane. *Audiol. Neurootol.* **16**, 263–269 (2011).
- Liew, L. J., Chen, L. Q., Wang, A. Y., von Unge, M., Atlas, M. D. et al. Tympanic membrane derived stem cell-like cultures for tissue regeneration. *Stem Cells Dev.* 27, 649–657 (2018).
- Virag, J. A. I., Rolle, M. L., Reece, J., Hardouin, S., Feigl, E. O. *et al.* Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am. J. Pathol.* **171**, 1431–1440 (2007).
- Vrabec, J. T., Schwaber, M. K., Davidson, J. M. & Clymer, M. A. Evaluation of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane repair. *Laryngoscope* 104, 1059–1064 (1994).
- Kato, M. & Jackler, R. K. Repair of chronic tympanic membrane perforations with fibroblast growth factor. *Otolaryngol. Head Neck Surg*, 115, 538–547 (1996).
- 19. Rohanizadeh, R., Swain, M. V. & Mason, R. S. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1173–1182 (2008).
- Komura, M., Komura, H., Kanamori, Y., Tanaka, Y., Suzuki, K. *et al.* An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J. Pediatr. Surg.* 43, 2141–2146 (2008).
- Kanemaru, S. I., Kanai, R., Yoshida, M., Kitada, Y., Omae, K., & Hirano, S. Application of regenerative treatment for tympanic membrane perforation with cholesteatoma, tumor, or severe calcification. *Otol. Neurotol.* **39**, 438–444 (2018).
 Takemoto, S., Morimoto, N., Kimura, Y., Taira, T., Kitagawa, T., Tomihata, K. *et*
- Takemoto, S., Morimoto, N., Kimura, Y., Taira, T., Kitagawa, T., Tomihata, K. et al. Preparation of collagen/gelatin sponge scaffold for sustained release of bFGF. *Tissue Eng. A* 14, 1629–1638 (2008).
- Kanemaru, S., Umeda, H., Kanai, R., Tsuji, T., Kuboshima, F. *et al.* Regenerative treatment for soft tissue defects of the external auditory meatus. *Otol. Neurotol.* 35, 442–448 (2014).
- Kanemaru, S., Nakamura, T., Omori, K., Magrufov, A., Yamashita, M. et al. Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. *Laryngoscope* 115, 253–258 (2005).

序

" 今、医学で起きている **パラダイムシフト** "





福島 雅典

公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター(TRI) センター長

人類は、病気を克服するために、常に闘ってきた。その過程で、 ときに革命的と呼べる発見や発明が生まれ、それまでの医療を 一変させてきたことはよく知られている。例えば 20 世紀初頭、 フランスの医師アレクシス・カレルは血管の縫合術を発明し、 それは臓器の再建術をはじめとするさまざまな手術に用いられ るようになった。同じく 20 世紀前半には、カナダの医師フレ デリック・バンティングがインスリンを発見している。さらに、 その数年後には、イギリスの細菌学者アレクサンダー・フレミ ングによるペニシリンの発見があり、感染症の治療薬が開発さ れて、創薬研究が爆発的に盛んになるきっかけとなった。

このように人類は、さまざまな疾患をコントロールする方法 を、ある程度は手に入れてきたといえる。しかしながら、その 疾患のコントロールも、人間の寿命延伸という点においては、 限定的といわざるをえない。人間の寿命延伸に関しては、実際 には、貧困からの脱出、すなわち衛生と栄養の改善によるとこ ろがきわめて大きく、医薬品による寿命の延伸効果は限られた ものなのである。つまり、ほとんどの疾病は、その征圧からは ほど遠いといってよい。

しかし今、そのような治癒できなかった疾病に関して、征圧 の目途がつくような画期的な出来事が相次いでいることをご 存知だろうか。それは、生体に含まれる幹細胞を利用した再生 医療の実用化である。例えば、重篤な機能障害あるいは厳しい 予後が予想された重度の脊髄損傷の患者を、回復に導いた幹細 胞治療がある。その様子はビデオ映像に収められており、動く ことのできなかった患者が、歩いて帰れるほどまでに回復する 様子を見て感動を覚えるのは、筆者だけではないだろう。

本書では、神経、血管、心筋、角膜、鼓膜、骨の再生を利用 した疾患の治療法の開発成功事例を6例紹介する。神経と鼓膜 については、すでに医薬品の承認審査を行う医薬品医療機器総 合機構(PMDA)¹に承認されており、残りの4つについては、 いずれも日本における治験が順調に進行しており、治験終了次 第、順次承認申請に入ることになっている。これらの再生医療 は幹細胞を利用するか、または、損傷のタイプによっては、組 織工学的技術を上手に組み合わせている点を特徴とする。 これらの治療法の一部は、これまでにNature Outlook²や Nature Outline^{3~7}をも通じて紹介してきており、大きな反 響を得ている。それらの反応を踏まえ、『The Principles of Regenerative Medicine』と題して、より詳しい解説書として まとめたものが本書である。内容は、これらの治療法の原理と して共通する理論を概説する総論(Theory)と、各治療法を詳 述する各論から構成されている。将来、新しい治療原理に基づ くその他の難治性疾患に対する治療法なども、出版したいと考 える。しかしその前に、医学領域におけるパラダイムシフトが 起きていることを、まずはこの1冊で理解していただきたい。 我々は今、人類未曾有のただならぬ科学・技術の革命期に生き ている。向こう10年の間に人類は主要な疾患征圧へのロード マップを明確に描くことができるようになり、その実現に向け て一致協力して邁進する時代に入ることを確信している^{8.9}。

公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーショ ン推進センター(TRI)は、アカデミアが主導する臨床研究を 支援するための日本の公的機関である。そのセンター長とし て、本書を世に問うことを誇りに思う。

文献

- Pharmaceuticals and Medical Devices Agency website http://www.pmda.go.jp/ regenerative_medicines/2019/R20190125001/530100000_23000FZX00001_A100_1. pdf [日本語]
- 2. *Nature Outlook*: Regenerative Medicine, *Nature* **540**, S49 (7 December 2016), https://www.nature.com/articles/540S49a
- Nature Outline: Corneal Repair, Nature 544, 7650_supp_out (20 April 2017), https://www.nature.com/collections/pdryjrsvnz/videos
- Nature Outline: Eardrum Regeneration: Membrane Repair, Nature 546, 7659_supp (22 June 2017), https://www.nature.com/collections/rzfrydkflp/videos
- Nature Outline: Critical Limb Ischaemia, Nature 548, 7668_supp (24 August 2017), https://www.nature.com/collections/vmxkcnxvwg/videos
- 6. Nature Outline: Non-union bone fracture: a quicker fix, Nature **550**, S193
- (26 October 2017), https://www.nature.com/collections/qmpthxknbn/videos
 Nature Outline: Spinal-cord Injury: Spurring Regrowth, Nature 552, 7684_supp
- (14 December 2017), www.nature.com/collections/ctdkppqqnx/videos
 8. Fukushima, M., Austin, C., Sato, N., Maruyama, T., Navarro, E. *et al.* The global academic research organization network: Data sharing to cure diseases and enable learning health systems. *Learning Health Systems* e10073 (2018), https://doi.org/10.1002/lth2.10073
- From Lab to Clinic, TRI Advances website https://advances.tri-kobe.org/en/feature/11/ from-lab-to-clinic

再生医療概論:その原理と進行中の医療革命の見通し

福島 雅典

公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター(TRI)センター長

1. はじめに

再生医療は、さまざまな病気の治療に革命を引き起こそうと している。患者自身の幹細胞を利用するという新たな治療法 が、臨床試験などできわめて有望な結果を出しているのだ。幹 細胞療法あるいは細胞療法とも総称されるこの治療法は、幹 細胞を一度体外に取り出して、増やしてから体内に戻し、組織 の再生を促すというものである。日本の研究者が世界をリー ドしてきた治療法であり、日本において臨床試験が順調に進 んでいる。長年にわたるその地道な研究がようやく実を結び はじめたと言ってよいだろう。これまでは治療法がなかった 疾患や障害を治癒へと導く根治的な治療法が、今まさに登場 しようとしている。

この総説集では、6つの再生療法について詳述していくが、 その前に、この概論において、各治療法を貫く共通の原理― 一生体で生理活性をもつ幹細胞の利用、および組織工学と呼 ばれる技術を用いた組織再生の場となる足場素材の供給―― について説明する。

2. 幹細胞療法とは?

幹細胞は、血液、骨髄、脂肪、結合組織、神経、皮膚など、体 のさまざまな部位に分布しており、刺激を受けると、特定の 成熟した細胞タイプを作り出す。生体において、細胞が死ん だり傷ついたりしたときに、それを修復補充する役目を担っ ているものと考えられている。

ここで述べる幹細胞療法で使用するのは、成体幹細胞と 総称される種類の幹細胞である。細胞には操作を加えないの で腫瘍化するおそれがなく、胚の細胞は使用しないので倫理 的な問題も生じない。用いるのは自分自身の細胞、あるいは 免疫学的に寛容な幹細胞なので、拒絶反応の心配も不要であ る。したがって、臓器移植のときのような、免疫抑制剤の継続 投与といった補助療法も必要ないのである。また、細胞を生 体から取り出し、そのままで、または増殖させてから戻す操 作は、一部自動化も可能であり、投与の仕方としては静脈注 射または、全身麻酔不要の比較的簡単な手技で行えるものが 多い。



図1 自己保持能を備えた恒常性維持のための多細胞共生系

成体幹細胞は大きく2つのタイプに分類される。1つは、 造血幹細胞である。その名の通り血液細胞を作り出す能力を もつが、それに加えて、血管の細胞をも作り出すことができ る。もう1つは、現在、間葉系幹細胞と総称されるタイプで、 もともとは骨や脂肪など、中胚葉(間葉)から発生する細胞 を作り出すとされた幹細胞であることが名前の由来である。 ただしその中には、最近の研究によって、中胚葉由来でない 神経などの細胞を作り出すものも見つかっており、その全容 解明には至っていないといえよう。

ところで、こうした成体幹細胞は生体組織中に微量にしか 存在しないことが多いのだが、どのようにして識別し同定す るのだろうか。その答えは、幹細胞の表面に発現する糖タンパ ク質をマーカーとして利用することだ。例えば、造血幹細胞 は CD34 という糖タンパク質をもつことから、CD34 陽性細胞 として認識されるといった具合である。重症下肢虚血(CLI) における閉塞した足の血管の治療(幹細胞療法 3)や、難治 性骨折の治療(組織工学 1)では、CD34 陽性の造血幹細胞 が、足場(スキャフォールド)とともに用いられるだろう。 また、脊髄損傷に対する新たな治療法(幹細胞療法 1)では、 CD105 陽性の間葉系幹細胞が、神経の再生に用いられる。

成体幹細胞という分類には収まりきらない多彩な性質をも つ幹細胞も存在する。2010年に東北大学の出澤真理教授に より発見されたMuse細胞¹がそうである。いろいろな組織の 細胞を作り出す能力を保持しており、体の組織の修復に特化 した働きをもつと推測されている。Muse細胞は、心筋梗塞の 治療におけるトランスレーショナル臨床試験の基礎となって おり(幹細胞療法 2)、これにより、これまで難しいと考えら れていた心筋の再生に成功している。驚くべきことに、Muse 細胞は心筋梗塞患者に静注することで効果を示すと報告され ており、他家移植にもかかわらず、少なくとも1回目の静注 においては免疫抑制剤が不要であった。

以上の幹細胞を用いた方法で用いられる医療技術は、患者 本人、また他家由来の幹細胞を静注するというようなきわめ て単純な手順からなる。つまり、幹細胞を体外に取り出し、 増殖させ、患者に戻すというものであり、これにより、生体 に備わっている治癒機構を利用するのである。この治療原理 は、すでに文献2で紹介したが、幹細胞生理という生物学的 原理にもとづいている。すなわち、組織の損傷 → シグナル 放出 → 幹細胞によるシグナル受容 → 動員 → ホーミング → コンディショニング → 修復、である。幹細胞は体中の組織に 存在し、生命の成り立ちを維持している。そして、必要とさ れる事態が起こると、骨髄から動員され、修復が必要な場に 入り込み、場を整え、修復を行うのだ。これが、生命の形態 – 機能恒常性維持機構の本態である。幹細胞療法は、この仕組 みを利用する医療技術なのである。さらに、幹細胞には属さ ないが、病変部位に動員されうる細胞(例えば、鼓膜の辺縁 部に存在する細胞で、bFGF〔basic fibroblast growth factor: 塩基性線維芽細胞増殖因子〕により誘引される;組織工学 3〕 や、自己複製活性をもつ細胞(例えば、口腔粘膜細胞;組織 工学 2)も利用可能だ。これらの治療法を成功させる上で鍵 になっているのが、組織工学である(図 1)。

3. 組織工学が足場の問題を解決する

組織の損傷した部分に空間的な隙間ができたり、欠損してし まっているときには、細胞が増殖して場を形成するための足 場(スキャフォールド)が必要となる。それを扱う分野を組 織工学と呼び、すでに商品化されている技術も多い。再生医 療の開発には、必要に応じて組織工学的技術を工夫して併用 することが重要である。

組織工学的技術にはさまざまなものが存在する。例えば、鼓 膜の再生では(組織工学3)、スポンゼル[®]という商品名のゼ ラチンスポンジが利用されている。鼓膜の細胞はbFGFの刺激 で増殖できるのだが、その細胞を活性化させるために、bFGF 含有のスポンゼル[®]で鼓膜の穴をふさぐのである。鼓膜は平 坦ではなく立体的な形状をしているが、スポンゼル[®]を丁度 綿球のように鼓膜穿孔部につめ、フィブリン糊でコーティン グして固定すれば、鼓膜辺縁部から再生にかかわる細胞がス ポンゼル足場の中に遊走してくる。これが成功の鍵で、驚く べきことに、スポンゼル[®]の中に、3 層からなる自然な鼓膜 が形成されるのである。

角膜の再生に関する研究では(組織工学2)、口腔粘膜細胞 を羊膜の上でシート状に増殖させる。角膜の損傷した部分を 切除し、そこに作製した細胞シートを貼り付けるという方法 をとる。一方、難治性骨折の治療に関する報告では(組織工 学1)、CD34 陽性細胞とともにコラーゲンを、骨折部の周囲 に注射する。アテロコラーゲンは線維状タンパク質であり、 骨の欠損部を埋めて、骨の細胞が増殖するための足場となる のである。

4. 細胞社会の原理を知って治療をデザインする

さまざまな病気に対する再生療法がこれまで世界中で研究されてきたにもかかわらず、必ずしも成功に至っていない。その中で今、日本の研究者たちが次々と成果をあげはじめたのは、どうしてなのだろうか。1つの理由は、生体内で起こっている生物学的プロセスを詳細に理解し、それにもとづいて治療方法をデザインしているからである。

生体では、さまざまな種類の細胞が相互に作用を及ぼしな がら、生体の恒常性を維持している。生体に異常が起きたと きには、まずその異常が検知され、幹細胞がその部位に動員 され、異常を是正する細胞活動が起こる。すなわち、死なせ るべき細胞と生かすべき細胞を峻別し、生かすべき細胞には 必要な因子を送り込み、炎症を止めたり、血管を呼び込んだ りなどが起こる。こうして再び、酸素・栄養が供給され、最 終的に組織の修復が整うと、新しい細胞が再生される。

細胞どうしは、まるで社会を構成するように働き、このよ うな過程を踏んだプロセスが遂行されるのである。その過程 では、幹細胞は指令を下すリーダーのような存在といえるの かもしれない。そして、損傷が大きい場合には、生体に備わ る幹細胞などの働きのみでは量が不足するため、体外で培養 して増殖させ、それを補うのである。何が起きていて、何が 足りていないのかを病気や障害ごとに見極め、治療法をデザ インしていくことが重要なのだ。

例えば、幹細胞を体内に戻すとき、静脈内投与するのか、 患部に局所投与するのかといった選択肢がある。脊髄損傷や 心筋梗塞の治療では、静脈内投与で行うことにより効果が上 がった。そのとき用いられた幹細胞は、ふだんから末梢微小 血循環のなかで修復・再生にかかわっているものだからだと 考えられる。

治療をデザインする際には、多細胞生物の健常性維持にか かわる生物学的原理および細胞プロセスを理解しなければな らないが、そのためには、個体の統合性の保持、恒常性の維 持、組織構築と足場の考慮が不可欠である。さらに、自己組 織化の能力、細胞の共生系としての作用、リズム、同期性、 対称性について理解することも重要である。これらの諸原理 を総合的に念頭に置いた上で、動物モデルとヒトの疾患との 近似性、すなわち動物モデルがヒト疾患のどのような病型、 病理、病態そして病期を反映しているのかを、十分に理解し ておくことが必要なのである。

また、治療の開発および評価は、承認申請を前提とした法 律にもとづく registration trial (治験) により行うべきであ る。registration trial を行うことで、PMDA(医薬品医療機器 総合機構)の指導および助言の下、GMP (good manufacturing practice:製造管理および品質管理の基準)、GLP (good laboratory practice:非臨床試験の実施の基準)、GCP (good clinical practice:臨床試験の実施の基準)などの厳格な基 準に沿った厳密なデータが得られるのである(PMDA は米 国のFDAに相当する)。なお、日本では、2015年に厚生 労働省が「先駆け審査指定制度」(URL: https://www.mhlw. go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/iyakuhin/topics/ tp150514-01.html) を創設した³。この制度の下では、世界 に先駆けて日本で開発された高い有効性が期待される製品に ついては、審査の迅速化がはかられるとともに、優先的な審 査・評価を受けられることになっている。この申請を目指す ことを強く推奨する。

5. これからの医療は変わる

この総説集では、神経、血管、心筋、骨、鼓膜、角膜の6つ の組織の損傷による疾患に絞って説明しているが、今後、よ り複雑な病気に関しても、新しい治療方法について報告して いく考えである。その筆頭にあげられるのが、潰瘍性大腸炎や 肝硬変などの自己免疫によって組織が攻撃を受け続けている 疾患、および、アルツハイマー病のようなプリオノイド(プリ オン様タンパク質)によって神経系細胞が攻撃を受ける疾患 である。こられに対処するためには、既知の細胞メカニズム に加えて、ここで紹介するまもなく登場しつつある幹細胞治 療と組織工学医療技術から得られるさらなる治療原理を考慮 していく必要があるが、実用化も間近である。さらに、前立 腺がん、大腸がんなど主要ながん、あるいは動脈硬化につい ても、征圧の目処が立つところまで来ている。潰瘍性大腸炎 や肝硬変の新しい治療法については、既にホワイトペーパー および Nature Outline² で紹介している。また、その後になる が、次世代の再生医療についても報告していきたいと考えて いる。例えば、治療に必要な量の幹細胞を one step で調整す る方法、(幹細胞を用いることなく) 幹細胞が作り出す新たな 生理活性物質を用いる方法、体内の幹細胞を動員ないしは活 性化させる薬物の開発などである。

幹細胞療法と組織工学を基盤にした再生医療は、さまざま

な病気や障害に対して、比較的単純な処置により根本的な 治療効果をもたらすことが期待できる。このような再生医療 は、これまでの治療法の常識をくつがえすものであり、薬物療 法や創薬の概念に大きな変革を迫るものである。再生医療が 世界の医療で中心的な位置をしめるようになることは間違い ないだろう。再生医療の開発はこれから第2ラウンドに入る が、医療の未来がそこにあることは確かである。

文献

- Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y. et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107, 8639–8643 (2010).
- 2. TRIが関連する研究者たちの研究を特集した Nature supplements, TRI Advances https://advances.tri-kobe.org/en/collaborations, Nature Outlook articles: www.nature.com/ articles/540S49a も参照
- 先駆け審査指定制度,厚生労働省ウェブサイトhttps://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/ bunya/kenkou_iryou/iyakuhin/topics/tp150514-01.html

間葉系幹細胞移植による脳梗塞および 脊髄損傷の治療の可能性



本望 修

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所神経再生医療学部門

脳梗塞および脊髄損傷に対する現在の治療法は、満足のいくものとはいえない。これに 対し、日本の医療イノベーション推進センター(TRI)の支援を受ける札幌医科大学の 研究者たちは、脳梗塞や脊髄損傷の動物モデルに対して、骨髄間葉系幹細胞(MSC)を ドナーとした移植実験を行ってきた。その結果、MSC の経静脈投与が顕著な治療効果 を示すことが判明した。脳梗塞亜急性期の患者を対象とした臨床研究により、自己血清 により培養した自己 MSC の単回点滴静注という治療法の安全性と治療効果が示さ れたのである。脳梗塞への適応拡大をめざした臨床試験は進行中であり、脊髄損傷 への適応拡大をめざした臨床治験は完了している。MSC は難治性神経疾患に対する 治療戦略に、パラダイムシフトを引き起こす可能性を秘めている。

1. 脳梗塞

1.1 はじめに

脳梗塞は、今日においても根本的な治療法はみいだされておらず、残存する神経機能障 書の回復がきわめて困難な疾患の1つである。日本全国では年間30万人弱が新規に発 症する国民病であり、その多くの場合、死亡するか重篤な後遺障害が残る。2025年まで に520万人の要介護者が生まれると推定されている。また、糖尿病、高血圧、高脂血症 などによる脳梗塞予備軍は1000万人以上にのぼるが、高齢化の進む日本では、ますま す増加していくと予測される。脳梗塞による社会的負担は甚大で、年間医療費は約2兆 円/年、社会的損失は約8兆円/年と推計されている。

これまでの脳梗塞に対する治療は、脳梗塞の発症後の therapeutic time window (治療 可能な時間帯) がきわめて短いことを基本的なコンセプトとしていた。すなわち、脳梗 塞の治療において、完成してしまった梗塞病巣に対する有効な手段はない、という厳し い現実があったのである。その結果、梗塞が完成する前に虚血部位をとらえ、発症から ごく限られた時間内に血栓溶解療法を中心とした集約的な治療を行うことができるか どうかが、治療の基準となっている。現在のおもな標準治療としては、抗血小板療法、 抗凝固療法などの内科的治療や、脳血行再建術などの外科的治療が行われているが、そ れらの治療効果は満足すべきものではない。また、最近では、超急性期治療として期待 されている組織プラスミノゲンアクチベーター静注療法も積極的に実施されるように

要旨

脳梗塞に対する現在の治療 法は、急性期にのみ有効で ある。いったん梗塞が完成 してしまうと、リハビリテー ションが唯一の治療法とな る。脊髄損傷に対する現在 の治療法も、同様に満足の いくものではない。我々は 1990年代初めより、骨髄間 葉系幹細胞(MSC)をドナー とした移植実験を、脳梗塞 や脊髄損傷の動物モデルに 対して行ってきた。我々が 行ってきた数多くの基礎研 究は、MSC の経静脈投与の 著しい治療効果を示してい る。これらの基礎研究の結 果を踏まえ、脳梗塞亜急性 期の患者を対象とした臨床 研究を 2007 年1月より開 始し、自己血清を用いて培 養・増殖させた自己 MSC の 安全性と治療効果を評価し た。MSCは、手術ではなく 単回点滴静注で投与した。こ の治療法で得られる治療効 果は、脳梗塞によって生じた 神経損傷を最小限に抑える と同時に神経再生を促進す るという、MSC の多段階的 に起こる作用メカニズムに よってもたらされるもので ある。脊髄損傷への適応拡 大をめざした MSC の臨床治 験も完了している。MSC は 難治性神経疾患に対する治 療戦略にパラダイムシフト を引き起こす可能性を持つ ものといえよう。

責任著者

本望修 E-mail: honmou@sapmed.ac.jp



なってきたが、発症から 4.5 時間以内に投与しなければなら ず、適応となる患者がきわめて限られた状況にある。

このように、脳梗塞の治療が困難な理由としては、脳神経組 織が障害されるまでの時間が短く、その間に有効な治療を開始 することが難しいこと、虚血など障害を受けた脳神経組織を再 生させる治療法が確立されていないこと、があげられる。脳梗 塞後の後遺障害に対する治療としては、リハビリテーションが 主なもので根本治療は存在しない。

それゆえ、新たな治療法の開発が望まれている。近年、 神経科学と幹細胞研究が大きく進歩し、脳神経疾患に対して再 生医療が可能な時代になりつつある。基礎研究のさまざまな分 野では、世界的に多くの研究がなされてきている。ただし、ほ とんどがまだ臨床応用にまでは到達してない。

我々は 1990 年代初めより、脳梗塞モデルなどを含む動物の 中枢神経系疾患モデルに対して、各種幹細胞をドナーとした移 植実験を精力的に行ってきた^{1~4}。さらに 1990 年代中頃より、 実用化を念頭に、臨床応用に最も近いと予想された骨髄細胞 をドナー細胞とした神経再生研究に着手してきている^{5~8}。特 に、有用なドナー細胞として神経系に対する再生効果の強い 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に注目し、これを経静脈的に投与 することで、脳梗塞^{9~27}を含む各種神経疾患(脊髄損傷^{28,29}、 パーキンソン病^{28,29} など)のモデル動物に対して著明な治療 効果が認められるという基礎研究結果を多数報告している。

- 移植細胞の病巣への集積(ホーミング効果)^{10,13,20,30}
- 移植細胞による神経栄養因子を介した神経栄養・保護 作用、抗炎症作用^{11,14,1620}
- 脱髄軸索の再有髄化^{5,7,28,31}
- 神経再生(神経系細胞への分化)、損傷軸索の再生や軸索の
 の sprouting^{28,31}
- 血液脳関門(BBB)の安定化^{17,28,32}

治療効果はさまざまな過程や箇所において時間をかけて 多段階的に発揮されるため、1回の投与で高い治療効果を期待 できる。

これらの基礎研究の結果を踏まえ、2007 年 1 月より臨床 研究を開始した^{33,34} (図 1)。自己血清を用いて培養・増殖させ た自己骨髄 MSC を脳梗塞亜急性期の患者に投与し、安全性と 治療効果について検討したのである。MSC は、手術ではなく 単回点滴静注で投与している。回復は画像診断および臨床症状 にもとづいて評価した^{33,34}。

本治療法では、脳梗塞によって生じた神経損傷を最小限に抑 え、神経系の回復(再生)を促進することで、治療効果が期待 できると考えている。従来の標準治療では損傷を受けてしまっ た脳の修復は困難であったが、それに比べ、本治療法は上記の ような多面的なメカニズムによって虚血脳を積極的に修復す ることが期待される新しい治療法であり、本治験薬に報告され ている効能・効果は、脳梗塞に伴う神経症候、日常生活動作障 害、機能障害の改善である。

1.2 臨床研究

1.2.1 概要

自己血清を用いて自己 MSC を培養し、病変が脳のテント上に あった脳梗塞患者 12 例を対象に静脈内投与を行った³³。症例 は、脳梗塞急性期の一般的な治療が終了した後の亜急性期にエ ントリした。脳梗塞の原因は NINDS- Ⅲ分類のいずれでもかま わないとしたが、小脳梗塞、脳幹梗塞のようなテント下の梗塞 は除外した。また、軽症例や極端な重症例は除外した(modified Rankin scale [mRS] が 3 ~ 5、かつ Japan Coma Scale が 0 ~ 100 の患者を対象)。すべての症例は「評価委員会」で検討・ 承認を受けた後、血液内科専門医によって局所麻酔下で腸骨よ



© 2019 Oxford Un

図2 間葉系幹細胞(MSC) 投与前後の脳 MRI 画像

り骨髄液が最大 60 mL 採取され、専用の培養施設(CPC: Cell Processing Center)で目標の細胞数である約 1 × 10⁸ 個にな るまで 2 ~ 3 週間培養した。培養終了後、細胞をいったん凍 結し、安全性と品質性の検査の後、合格したもののみが投与さ れた。投与方法は、末梢静脈内への点滴静注で、30 ~ 60 分 かけて行われた。症例の内訳は、男性 9 名・女性 3 名、年齢 は 41 ~ 73 歳(59.2 ± 8.2 歳)、運動麻痺 12 名・失語症 5 名 で、それぞれ脳梗塞発症後 36 ~ 133 日に細胞移植を行った。 評価としては CBC のような一般検査のほか、画像診断学的検 査(MRI)(図 2)³³、および臨床症状の評価(NIH Stroke Scale [NIHSS]〔図 3〕³³、mRS)を行っている。

NIHSS および mRS での評価において、回復スピードが移植 によって統計学的に有意なレベルで加速されることが判明し た。脳梗塞後のナチュラルコースとしての自然回復が緩慢に なってくる亜急性期において、症状改善がさらに加速される 結果となった。

また、一般的には、脳梗塞後の MRI (FLAIR)の経時的変化 は1カ月程度で収束し、高信号域のサイズ、密度、形が最終的 な梗塞巣ときわめて近いものとなる。しかし我々の臨床研究に おいては、発作後 30 日以降の時点での移植にもかかわらず、 移植を契機に MRI (FLAIR)の高信号域が、統計学的に有意に 減少することが判明した。

1.2.2 これらの結果は何を意味しているのか?

脳梗塞の新しい治療法の開発にあたっては、それが多数の作用 点をもつ必要があることを、あらかじめ認識しておくべきであ る。これまで過去何十年間にもわたって数々の新薬候補があっ たが、それらの効果は限定的なものだった。これらの薬の作用 メカニズムはきわめて明確なものだが、それゆえに作用点が限 定されているのである。一方、脳梗塞後の病態はきわめて多様 で複雑であり、虚血脳はまるで嵐の中に置かれたかのような状 況になっている。その中にあって、細胞治療がどうして著効し たのだろうか? その答えは、細胞治療の作用メカニズムの多 様性にあると考える。上記のように、細胞治療は多様な作用メ カニズムがさまざまな過程や箇所において時間をかけて多段 階に発揮されることが、現在の薬物治療とまったく異なる点な のである。

我々は脳梗塞の病態生理を再考する必要がある。従来から、 脳梗塞後はきわめて短時間に脳組織の損傷が不可逆的に進行 するため、いったん損傷を受けてしまった脳は治療不可能と考 えられ、そのため therapeutic time window は超急性期のみに 限られ、血流再建や神経保護が中心になると考えられてきた。 しかし、上記に示したように、脳梗塞から6週間以上経過し た脳梗塞領域が、細胞治療によりきわめて短時間で蘇るのであ る。これは、不可逆的な損傷が起こってしまっていると思われ ている脳の領域にも、まだ治療可能な組織が残存していること を示している。これはペナンブラ領域の長期存続という意味で はない。機能不全には陥っていても、解剖学的に生き残ってい る神経細胞や軸索が長期にわたって存在しているということ である。

損傷された脳だけでなく、中枢神経系全体を扱わなければな らないということも重要である。再生医療と聞くと、損傷され た脳組織の再生だけを考えがちであるが、それでは「木をみて 森を見ず」なのである。脳には我々が考えている以上のバック アップ機構がある。おそらく進化の過程で、我々の生存に必須 の神経系は、多くの試練に遭遇し、さまざまなバックアップ 機構を獲得したのである。脳梗塞後の後遺症改善においては、 損傷脳の再生も重要であるが、健常側の脳の可塑性亢進もきわ めて重要といえよう。実際、細胞治療後には、このような可塑 性の亢進が顕著に観察される。脳梗塞の再生医療においては、 中枢神経系全体を治療するというパラダイムシフトが求めら れている。

自己治癒力の重要性についても認識する必要がある。現在、 さまざまな幹細胞があるが、自己骨髄 MSC を静脈内に多量に 投与することで、なぜこのような治療効果を出しうるのだろう か? その答えは、MSC の通常時の役割にある。すなわち、健常



時でも MSC は骨髄中から末梢循環に出ていると考えられ、全 身の臓器の機能維持や創傷治癒にかかわっている。言い換えれ ば、MSC は自己治癒力に大きく貢献していると考えられる幹細 胞なのである。これが、MSC が他の幹細胞と大きく異なると思 われる点である。医学における治療(介入)は、薬物治療であ ろうと外科手術であろうと、その後の自己治癒力を前提として いる。我々は、医学における「無知の知」を再認識し、自己治 癒力の最大活用をめざす必要がある。

1.3 治療メカニズム

1.3.1 血液脳関門とホーミング効果

中枢神経系組織が虚血によって損傷すると、血液脳関門(BBB) が破壊されることはよく知られている。この BBB の機能不全 は、虚血の程度にもよるが、多くの場合約1カ月間継続する。 静脈内に投与した MSC が脳梗塞の病巣へ集積するホーミング 効果のメカニズムに、BBBの破壊がどの程度関与するかについ て、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて検討した。この 脳梗塞モデルでは、BBBの破綻は約2週間継続し、4週間後に はかなり修復されていた¹³。しかしながら、静脈内に投与した MSCは、虚血損傷後4週間にわたって同程度に病巣へ集積し 続けていた¹³。このことから、MSCが血管内から脳実質へ移 行する際、BBBの破綻は必要条件ではないことが示唆された。 また、BBBの破壊がきわめて少ないプリオン病モデルマウスを 用いた実験でも、同様なホーミング効果が認められた³⁵。BBB が修復されつつある脳梗塞の亜急性期や慢性期においても¹⁹、 また、テント上ばかりでなくテント下の領域に対しても¹⁸、静 脈内投与により十分量のMSCを病巣へ到達させることが可能 と考えられた。

1.3.2 多段階に起こる作用のメカニズム

脳梗塞に対する MSC を用いた治療メカニズムはいくつ

か推測され、我々は基礎研究結果を多数報告してきた。 そのメカニズムは、神経栄養因子による神経栄養・保護 作用^{11,14,16,20}、血管新生作用(脳血流の回復)^{22,26,27}、神経 再生作用^{10,11,14,15,20,25,28,29,36,37}の3つに大別される。そして、 これらの治療効果が発揮される時期はそれぞれ異なっている と推測される。すなわち、神経栄養因子による神経栄養・保護 作用は、MSC が産生する液性因子が脳梗塞巣に直接的に作用 するため、作用時期はきわめて早く時間単位である。血管新生 作用は、脳梗塞発症のおよそ3日後から始まり、1週間後には 脳血流の回復が明らかに認められるようになる。神経再生作 用は、1週間後から顕著になり、少なくとも数カ月間は漸増す る。これらは動物実験から示された治療メカニズムであるが、 我々の臨床研究^{33,34}においても、同様のメカニズムによる多段 階的作用がヒトで起こっていることを強く示唆する結果が示 されている。

1.3.3 神経栄養因子の作用メカニズム

細胞移植後の1~2週間以内に、臨床症状および MRI 所見が 統計学的に有意に変化することを我々の臨床研究で確認した。 ほとんどの症例で運動麻痺の改善や spasticity(痙性)の軽快 が移植後1~3日以内にみられ、MRI (FLAIR)の高信号域の 縮小も1~2週間以内にみられた。移植後短期間にみられる これらの変化は、おもに移植細胞が分泌する神経栄養因子の作 用によるものと推測される。静脈内に投与した移植細胞は脳梗 塞巣へ集積し、brain-derived neurotrophic factor(BDNF)²⁰、 glial-derived neurotrophic factor(BDNF)²¹といった神経栄養 因子の局所レベルを数日以内に上昇させた¹⁴。

BDNFやGDNFが抗脳浮腫効果を呈することはよく知られて いるが、これら2つが示す効果は、いずれも脳梗塞急性期に おけるものである。しかしながら、我々の臨床研究の患者は、 亜急性期であり、通常の脳浮腫とは捉え方が若干異なる可能性 がある。むしろ、この時期のMRI (FLAIR)の高信号域は、細 胞内外の水分量が高い状態であると表現したほうがより正確 と思われる。しかし、現在の一般臨床では、この高信号域はす でに死んでいるか、またはまもなく死ぬと予測されてきた領域 であり、少なくとも既存の薬物(浸透圧利尿薬やステロイド など)では縮小させることができなかった領域である。もし、 病巣局所の神経栄養因子濃度の上昇による抗浮腫作用のため に神経機能が回復したのだとすると、脳梗塞巣の病態生理に関 する既知の概念を根本的に考え直す必要があるかもしれない。 すなわち、我々が脳梗塞亜急性期にはすでに治療不可能と思っ ていた領域は、実際には損傷は完成しておらず、まだ治療の可 能性が残っている脳組織といえることになる。

神経栄養因子は、抗浮腫作用やアポトーシス抑制作用¹⁴の ほかにも、神経細胞や軸索の膜表面にあるイオンチャネルに直 接作用して、神経の興奮性に影響を及ぼすなど、さまざまな作 用点をもつ³³。例えば BDNF は、カリウムチャネルの kinetics を変化させて、静止膜電位・活動電位再分極・後過分極の特性 を変化させることにより、神経の興奮性を変化させるが、これ らはミリ秒レベルのきわめて短時間に起こる変化である。すな わち、BDNF が細胞に到達して何ミリ秒の間に、神経細胞の興 奮性が変化する。BDNF はまた、シナプスにおける神経伝達効 率にも直接影響を及ぼす。移植後早期にみられた治療効果は、 このような神経栄養因子の作用により、生き残ってはいたもの の機能不全に陥っていた神経細胞や軸索の機能を、ふたたび蘇 らせたと推測される。

また、BDNF は脊髄の K-Cl 輸送体の活性を回復させ、GABA の作用を増強させることにより spasticity を軽減させることが わかっている。実際、spasticity の軽減は、移植後数日以内に 認められた。このような観点からすれば、細胞治療の作用部位 は脳梗塞局所のみに限定するのではなく、脳・脊髄・神経全体 の機能を総合的に改善させる、と考えたほうがよいのかもしれ ない。その点では、静注による全身投与が理にかなっている。

1.3.4 血管新生と BBB 安定化

MSC による治療の効果の1つに、血管新生による脳血流の回 復がある^{22,26,27}。これには2通りの機序がある。1つは、脳梗 塞局所に集積した MSC が vascular endothelial growth factor (VEGF)や angiopoietin のような血管新生因子を分泌して血管 新生を誘導することであり、もう1つは、移植された MSC が 血管内皮に分化して新たな血管を形成することである。新生血 管の内皮細胞のうちの約90%はホスト由来で、ドナー細胞由 来のものは約10%である。動物を用いた我々の基礎研究の結 果によると、これらの血管新生による脳血流の回復は移植後約 1週間程度で顕著になるが²⁷、臨床研究においても、移植後1 週間で脳血流の改善が確認されている³³。

MSC の血管に対する作用としては、損傷した BBB を修復す ることも確認されている。虚血であれ外傷であれ、損傷原因 を問わず BBB は障害される。損傷した BBB は 1 カ月程度で、 ある程度は回復するが、近年の研究では、慢性期においても完 全には修復されず、損傷が周囲の脳神経組織に悪い影響を与え 続けていることが判明した。静脈内に投与した MSC が、この 壊れ続けている BBB を修復し、治療効果を発揮することが確 認されている^{17,28,32}。

1.3.5 神経再生

MSC による治療の効果には、神経再生が関与していると推測 されている。これにも 2 通りの機序が考えられる。1 つは 脳梗塞局所に集積した MSC が内因性の神経発生を促進し ていることであり、もう 1 つは移植された MSC 自身が 神経細胞ニューロン・グリア細胞へと分化していることで ある^{10,11,14,15,20,25,28,29,36,37}。また、髄鞘形成細胞への分化による 再有髄化、軸索の sprouting や再生の促進なども論文で報告さ れている^{5,7,28,31}。このように、神経再生といっても、さまざま なレベルでの再生が、多段階に起こっていると考えられるので ある。

1.3.6 中枢神経系全体の再生

MSC は損傷局所の再生を誘導するほか、損傷周囲さらには対 側の正常脳の可塑性を亢進させることも判明している^{15,25,37}。 さらに、リハビリテーションとの組み合わせで、作用が増強さ れることも判明してきている²⁴。このように脳や脊髄の神経の 再生には、損所局所の再生だけではなく、中枢神経系全体の再 生が重要である。その点では、細胞は局所に移植するのではな く、静脈内に投与して中枢神経系全体に行き届かせることが望 ましい。

1.4 細胞培養:自己血清かウシ胎児血清か

他の幹細胞と同様に、MSC は採取部位や培養方法によって変 化する。例えば、同じ基礎培地を使用した場合でも、ウシ胎児 血清(FBS)を用いた場合と自己血清を用いた場合とでは、細 胞生物学的に多くの点で性質が異なる細胞となってしまう。自 己血清であればプリオン病などの感染症の潜在リスク³³ は軽 減されるといった利点があり、その他にも、自己血清で培養し た場合は FBS で培養した場合と比べて、より未分化な状態に 保たれ、遺伝子発現も安定しており、また、増殖速度も速いな どの利点がある³³。 遺伝子の発現解析を行うと、ヒトの自己血清で培養された MSCでは、アポトーシスを阻害する angiopoietin-like 4 の発現 が上昇して、その結果細胞死が抑制されるが、それに対して、 FBS で培養された MSC では、growth arrest-specific protein 1 や anti-proliferative protein 1 の発現が増加し、増殖速度が低 下することがわかる³³。

加えて、FBSでは間葉系への分化がより進む。例えば、FBSで 培養された細胞では、骨芽細胞への分化に関係する遺伝子 (cytokine-receptor-like factor 1、transmembrane glycoprotein NMB)、脂肪細胞への分化に関係する遺伝子 (leptin receptor、 inhibitor of DNA binding 4、members of the complement system)、軟骨細胞への分化に関係する遺伝子 (extracellular matrix gene、cytokine receptor-like factor 1、leptin receptor、 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2、 transforming growth factor- β 、SMAD6、OLF1/EBF-associated zinc finger gene)の発現が高いことが確認されている³³。

また、FBS を使用した場合の問題として、異種タンパク質の 混入による急性および遅発性の免疫反応がある。異種血清で培 養したヒト MSC(10⁸ 個)を移植した場合、約7~30 mgの 異種血清タンパク質がホストに入り込むことがわかっており、 この異種タンパク質による有害な副作用が報告されている³³。

1.5 自家移植か他家移植か

自己 MSC は、培養に 1 ~ 2 週間程度を要するため、急性の疾 患に対応するための工夫が必要である。例えば細胞バンクであ る。自己培養 MSC は 10 年以上にわたる長期の凍結保存が可 能である。一過性脳虚血発作の既往や高リスク要因をもつ予 備群に対しては、その MSC を、あらかじめ培養・増殖・冷凍 保存しておくことで、脳梗塞発症後、速やかに投与することが 可能となる。

また、発症してから MSC の培養を行わなければならない場 合は、急性期に低体温療法などで脳神経組織のダメージを遅ら せておいて、その間に培養するなど、従来の治療法との組み合 せも考えられる。

一方、他家 MSC なら培養時間の問題は解消できるものの、 免疫拒絶反応という別の重大な問題が生じてくる。免疫拒絶 の開始点である T 細胞の活性化には、細胞表面上の MHC が T 細胞の T 細胞受容体 /CD3 複合体に結合し、同時に接着分子 を介した共刺激シグナルが必要である。MSC は、HLA クラス

IとⅡの両者および接着分子(CD40やCD59)、intercellular adhesion molecule (ICAM) -1, ICAM-2, ICAM-3, vascular adhesion molecule (VCAM) -1 などが陽性であるため、十分、 抗原提示細胞となりうる細胞なのである。さらに、MSC は移 植後にホストの体内で分化するが、その際、これらの抗原提示 分子の発現がさらに高まるため、他家 MSC を移植する場合は 免疫抑制薬の併用が必須であると考えられる。しかしながら、 免疫抑制薬の短期的ならびに長期的な副作用を考えると、その 使用はきわめて限定的なものにならざるをえないと思われる。 また、たとえ免疫抑制薬を使用したとしても、他家移植は自 家移植より治療効果が劣ることが判明している。さらに、他家 MSC を大量に入手する手段や、安全性や品質の担保、培養に 使用する血清の問題も解決しなければならない。このように、 他家 MSC を使用する場合は、自己 MSC 移植がどうしても使用 困難な疾患に限らざるをえず、当面は自己 MSC を用いた再生 医療が先行すると思われる。

1.6 投与方法

細胞治療の場合、生きた細胞の縣濁液を投与するという特殊性 を、十分に考慮する必要がある。第一に、個々の細胞が 100% 単一細胞レベルに分離しているとは限らず、数個程度は凝集 していることを想定すべきである。第二には、すべての細胞 が生きているわけではなく、数%の死細胞の混入は避けられ ない。したがって、塞栓源となる可能性を十分考慮する必要 がある。また、動脈内投与と静脈内投与とでは、治療効果に さほど差がないことも重要なポイントである。これらのことを 考慮すると、MSC を血管内へ投与する場合には、動注である 必要性はなく、むしろ静注のほうが安全性と治療効果の両方を 確保できると思われる。髄腔内投与の場合、比較的少ない細 胞数でよいという利点がある一方、病巣局所への集積率が低 く、また、脳深部へ到達させることも困難である。また、髄液 フローにブロックがある場合などは髄腔内投与を行うことは できない。

手術によって直接脳に定位的に移植する場合、ヒトの脳は実 験小動物と比較してかなり大きいため、多数の部位への注入が 必要となるが、それにともなって、出血、感染症、さらなる損 傷のリスクが高まる。何よりも、適切な移植部位を決定する合 理的な判断基準がない。

以上を総合すると、必要とする細胞数は比較的多いが、

本望 修

安全面、cell delivery、ターゲッティング、治療効果、汎用性、 必要設備などの点から、静脈内投与が最良の投与方法であると 考えられる。

1.7 今後の検討事項

我々の臨床研究の結果から、新たな検討事項も浮かびあがって いる。MSC 移植を受けた脳梗塞患者の機能回復は、一般的な 脳梗塞の回復過程に、必ずしも一致するとは限らないことがわ かった。例えば、MSC 移植直後に、四肢末梢の随意性が一段 と改善した症例や、上肢の完全弛緩性麻痺が改善した症例がみ られた。MSC 移植の効果は、ドナー細胞とホスト細胞による 反応の総和と理解され、多様な作用メカニズムがいろいろな 時間にいろいろな箇所で作用することが特徴である。よって、 今回の臨床研究でみられたように、従来の回復過程とは異なる 回復過程を示したと考えられる。このため、効果を評価する新 たな指標の策定、リハビリテーションの介入方法、目標設定な ど、さまざまな面で再検討が必要である。

これまでの脳卒中の評価方法は、自然回復でみられる機能回 復の過程を観察し、それで得られたデータをもとに策定された ものが多い。そのため、従来の過程とは異なる MSC 移植によ る多彩な回復の評価には、十分には対応できないと考えられ る。したがって、その治療メカニズムを考慮した指標の策定が 必要である。MSC 移植における回復は、細かい運動単位での 回復も期待できと考えられるので、その回復過程をより詳細に 評価できる方法を作成していく必要があるのである。その際、 三次元動作解析装置などを用いて得られる客観的なデータを 用いるのも1つの方法であると考えている。しかし将来的に は、特別な機器を使用するのではなく、簡便に行える評価方法 が必要となるであろう。

一方、リハビリテーションの介入方法においても、MSC 移 植の治療効果をより高めるためには、その戦略の再考が必要と 考えられる。治療直後から神経細胞の再生が起こり、数カ月以 上にわたってドナー細胞の神経細胞への分化やホスト細胞の 活性化が続き、神経回路の再構築が起こる。神経回路の再構築 をいかに有効かつ効率的に促進させるかが、MSC 移植におけ るリハビリテーションに期待される重要な役割と思われる。神 経回路の再構築にどのような方法が最適であるかを、既存の手 法や新たな手法なども取り入れて検討していく必要がある。目 標とした神経回路を正確に賦活し、使用回数を増やすことが重 要となり、運動方法と運動回数・頻度が大切なポイントになっ てくると考えられる。

さらに、リハビリテーション全体における目標設定の変更も 予想される。今までの目標設定は、障害された脳の再生は困難 という広く行きわたっている考えのもとに、自宅や職場復帰を めざすとするものであり、関節拘縮や廃用症候群を予防しなが ら、残存機能を最大限に活用し、足りない機能は補装具等で 補い、日常生活動作の獲得を図っていくというものであった。 歩行などのより高い目標の達成には、残存機能がどの程度のも のかが大きく影響した。しかし、MSC 移植による再生医療は、 このリハビリテーション考え方を根幹から覆すものである。こ の新たな治療の確立に伴い、リハビリテーションの戦略も抜本 的に変化していくと予想される。MSC 移植では、四肢・体幹 の機能障害のさらなる改善が期待でき、より高いレベルの目標 設定や目標達成率の向上が期待できるのである。

2. 脊髄損傷

2.1 新しい治療法の必要性

脊髄損傷とは多くは外傷により、脊柱に強力な外力が加わ り脊髄が傷つくことから発生する病態である。原因として 最も多いのは交通事故であるが、スポーツ事故や勤務中の 事故、さらに階段からの転落などでも発症し、わが国ではす でに累積 10万人の患者が存在し、毎年 5000人が新規に受傷 すると推計されている。受傷後 1 年間の年間医療費は 1 人 あたり 1000万円を超え、新規発生患者の医療費だけでも年間 500億円にものぼると推定されている。トムソンロイター社に よると、脊髄損傷患者に対して全世界で年間 100億円以上の 社会保障費が使われていると試算されている。また、脊髄損傷 患者および介護にあたる家族等の就労機会の逸失などによる 経済的損失も大きい。

脊髄損傷になると損傷脊髄下位の手足が動かなくなり、感覚 も喪失する。損傷の位置が高いほど麻痺の範囲は広範になり、 障害は重度になる。胸腰部の損傷であれば下半身麻痺、頸部の 損傷であれば四肢麻痺となる。しかし、現代の医学では残念な がら損傷された脊髄の再生は不可能であり、新しい治療法の開 発が長年切望されてきた。わが国では若年者の受傷が多く、重 篤な後遺症を残したまま、その後の人生を過ごすことも多い。

現在、標準的な治療法には以下の3つがあるが、治療成績は いずれも満足のいくものではない。

- 1. 急性期に行われる除圧および固定手術
 - 脊髄損傷自体を手術によって修復することは不可能で あり、手術の主目的は骨折や脱臼した脊椎の整復と固定で ある。後遺障害に対しては、手術による直接的な治療効果 は期待できない。
- 急性期に行われるメチルプレドニゾロン大量投与療法 受傷後8時間以内にメチルプレドニゾロン30 mg/kgを 15分かけて投与し、その45分後より5.4 mg/kg/時で 23時間持続点滴するものである。しかし、副作用なども 多く、治療効果については再検討がなされている。
- リハビリテーション 理学療法および作業療法を中心として、患者の社会復帰の ための日常生活訓練等を行うが、治療効果についてはきわ めて限定的である。脊髄損傷におけるリハビリテーション の位置づけは、失われた機能の回復ではなく、残存機能を いかに有効活用して日常生活動作を可能にするか、という ことに主眼がおかれている。

2.2 研究の概要

脳梗塞を対象として実施している医師主導治験の治験薬であ る「自家骨髄 MSC (STRO1)」は、これまで我々が長年にわ たり行ってきた基礎研究の結果から、脊髄損傷にも治療効果 が期待されることがわかった^{28,29,38}。そこで、同治験薬の適応 疾患を脊髄損傷に拡大することを試みた。2013 年 10 月に 治験届を提出し、医師主導治験(第 II 相:非盲検試験、探索 的試験)を開始した。予定される効能・効果は「脊髄損傷に 伴う神経症候や機能障害の改善(薬効分類コード:その他の生 物学的製剤 639)」である。またこの治験に関しては、公益社 団法人日本医師会治験促進センター臨床試験登録システムに も登録済である(https://dbcentre3.jmacct.med.or.jp/jmactr/ App/JMACTRE02_04/JMACTRE02_04.aspx?kbn = 3&seqno = 3923)。

脊髄損傷モデルラットで MSC を静脈内に移植すると、画像 診断学的、組織学的および行動学的に改善が認められた^{28,29,38}。 治療メカニズムとしては、神経保護作用や神経再生作用、血管 再生作用、抗炎症作用等が関与していると考えられ^{28,29,38}、超 急性期^{29,38}に治療した場合のみならず、慢性期²⁸に治療を行っ ても効果が認められたことから、therapeutic time window は 比較的広いとわかった。 脊髄損傷を対象とした再生医療の基礎研究の多くは、損傷局 所に細胞を直接移植する方法を採用している。しかし、損傷 を受けている脊髄にさらに針を刺し、細胞を注入することは、 その手技自体が脊髄を新たに損傷させるリスクが高い。直接移 植による治療メカニズムも限定的で、たとえ動物モデルで効果 が認められても、ヒトへの適用はリスクが大きすぎると思われ る。一方、本治験は、自己骨髄 MSC を静脈内に点滴投与する ため、簡便かつ侵襲性は低く、投与した細胞が損傷局所に集積 する特性により、投与した細胞が損傷領域全体に行き渡り、高 い効果を発揮すると期待される。

静脈内に投与した MSC は、脊髄損傷ラットの大脳皮質の運 動野の再生を誘導することが判明している³⁸。高い治療効果を 得るためには、脊髄損傷局所の再生だけではなく、中枢神経系 全体の再生を誘導することが必要であり、投与ルートは細胞が 中枢神経系全体に行き渡る方法、すなわち静脈内投与がよいと 考えられる。

現在のところ、脊髄損傷の損傷を軽減するための治療法(急 性期の手術療法や薬物療法、その後のリハビリテーション療 法)は存在するが、損傷を受けた脊髄そのものを修復する治療 法はなく、MSC を利用した本手法は画期的な治療法となりう ると考えられる。

2.2.1 脊髄損傷に対する STR01 の医師主導治験

本医師主導治験では、脊髄損傷のまったく新しい治療法の確立 をめざす。すなわち、本治験薬の効能・効果は「脊髄損傷に伴う 神経症候、日常生活動作障害、機能障害の改善」とする。

これまでの基礎研究ならびに前臨床 POC から示唆された 本治験薬の作用メカニズムは、1)移植細胞の病巣への集積 (ホーミング効果)、2)移植細胞による神経栄養因子を介した 神経栄養・保護作用、抗炎症作用、3)脱髄軸索の再有髄化、 4)神経再生(神経系細胞への分化)、損傷軸索の再生、軸索の sprouting、5)血液脊髄関門の安定化、と考えられる。治療効 果は時間的にも空間的にも多段階に発揮されるため、1回の投 与で高い治療効果を発揮することが期待される。

本治験法は、脊髄損傷によって生じた神経損傷を最小限に 抑え、遅発性の二次的な神経損傷の進行を抑制すると同時に、 神経細胞と軸索の回復ならびに再生を促進することで、既存の 治療法と比べて高い治療効果を期待できるものと考えている。 従来までの標準治療では、損傷を受けてしまった脊髄を修復す ることは可能ではなかった。しかし本治療法は、上記のような 多角的なメカニズムにより、損傷脊髄を積極的に修復すること が期待されるまったく新しい治療法である。

本医師主導治験では、脊髄損傷に伴う神経症候、日常生活動 作障害、機能障害の改善を評価するために、下記の3つの指標 を用いた。

- 運動および知覚障害の改善度に関する主要評価指標として、米国脊髄損傷協会(ASIA)が開発した ASIA Impairment Scale (ASIA 機能障害尺度)
- ASIA が定めた International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury(脊髄 損傷の神経学的ならびに機能的な分類のための国際基準、 ISCSCI-92)
- ・ 脊髄損傷に特化した日常生活動作の評価法として開発さ れた Spinal Cord Independence Measure(脊髄障害自立度 評価法、SCIM-Ⅲ)

治験の対象は頸髄損傷患者(ASIA 分類で A 群、B 群、C 群の 重症例)で、脊髄損傷発症後 2 ~ 3 週間以内に一次登録を行い、 ただちに骨髄液の採取と MSC の培養を開始した。40 日目に細 胞を静脈内より投与し、220 日目(治験薬投与の約半年後)に 有効性および安全性を評価した。本治験はすでに完了し、厚生 労働省による条件・期限付き承認を正式に受けている(2018 年 12 月 28 日)。

3. 今後の展望

MSC の静注療法は、脳梗塞のような限局した脳虚血ばかりで なく、蘇生後脳症のような全脳虚血に対しても効果があること が判明している³⁹。このように、自己 MSC の静脈内投与は、 虚血の種類を問わず有効であることが示唆されており、その応 用範囲はかなり広いと考えられる。端的にいうならば、脳・脊 髄・神経の虚血時における強力な脳保護薬との位置づけが可能 であり、その用途は多岐にわたるであろう。

また、MSC の治療メカニズムは、1)神経栄養因子による神 経栄養・保護作用、2)血管新生作用(血流の回復)、3)脳血液 関門の安定化、4)神経再生、と多岐にわたっているが、特に、 5)可塑性を亢進させる作用は、慢性期の治療効果に大きく貢 献すると思われ、さらに、成熟脳^{24,25}のみならず、発達脳³⁷ において顕著に認められる。生後すぐのラット脳梗塞モデルに おいては、MSC を静脈内投与すると正常側脳の可塑性が亢進 し、脳体積および神経細胞数がともに増加し、行動学的な改善 が観察される³⁷。

一方、異常神経回路に対しては、MSC は抑制効果を示すこと が観察されている⁴⁰。てんかんモデルラットに MSC を静脈内 投与すると、てんかん発作を抑制すると同時に、異常神経回路 を抑制し、抑制系ニューロンである GABA ニューロンを増やす 効果がある⁴⁰。このように、MSC は中枢神経系に対して、神経 細胞の働きが足りないときには補完的に作用し、過剰なときに は抑制的に作用する。

以上より、MSCは、自己治癒力に大きく貢献している幹細胞と いってよいと考えられる。すでに、動物実験レベルでは、下記の ようなさまざまな神経疾患に対する効果が確認されている。

- 慢性期脳梗塞^{13,19}
- 脳出血¹⁷
- 慢性期脊髄損傷²⁸
- 蘇生後脳症³⁹
- パーキンソン病⁴¹
- プリオン病³⁵
- 発達脳における低酸素性虚血性脳症³⁷
- てんかん⁴⁰
- 脳腫瘍⁴²
- 末梢神経障害 43,44

骨髄移植などを代表とする体性幹細胞を用いた再生医療は、 安全性が高い、自己移植が可能、すでにその技術の一部は実用 化されている、などの利点があるため、早急な実用化が期待さ れている。特に、MSC は非常に少量の骨髄液から、培養・増殖 させることが可能であり、臨床応用においては誠に使い勝手の よい細胞として認知されつつある。

MSC は、脳卒中や脊髄損傷をはじめとする難治性神経疾患 に対する治療戦略にパラダイムシフトを引き起こすと考えら れる。同時に、「自家骨髄 MSC(STR01)」が、多くの難治性 神経疾患へ適応拡大されることが期待される。

文献

- Akiyama, Y., Honmou, O., Kato, T., Uede, T., Hashi, K. & Kocsis, J. D. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 167, 27–39 (2001).
- Honmou, O., Felts, P. A., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Restoration of normal conduction properties in demyelinated spinal cord axons in the adult rat by transplantation of exogenous Schwann cells. *J. Neurosci.* 16, 3199–3208 (1996).

- Kato, T., Honmou, O., Uede, T., Hashi, K. & Kocsis, J. D. Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia* 30, 209–218 (2000).
- Oka S., Honmou O., Akiyama Y., Sasaki M., Houkin K. *et al.* Autologous transplantation of expanded neural precursor cells into the demyelinated monkey spinal cord. *Brain Res.* 1030, 94–102 (2004).
- Akiyama, Y., Radtke, C., Honmou, O. & Kocsis, J. D. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 39, 229–236 (2002).
- Iihoshi, S., Honmou, O., Houkin, K., Hashi, K. & Kocsis, J. D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* 1007, 1–9 (2004).
- Inoue, M., Honmou, O., Oka, S., Houkin, K., Hashi, K. *et al.* Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia* 44, 111–118 (2003).
- Sasaki, M., Honmou, O., Akiyama, Y., Uede, T., Hashi, K. *et al.* Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 35, 26–34 (2001).
- Harada, K., Honmou, O., Liu, H., Bando, M., Houkin, K. *et al.* Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res.* 1134, 206–213 (2007).
- Honma, T., Honmou, O., Iihoshi, S., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp. Neurol.* **199**, 56–66 (2006).
- Horita, Y., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Intravenous administration of GDNF gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *J. Neurosci. Res.* 84, 1495–1504 (2006).
- Kocsis, J. D. & Honmou, O. Bone marrow stem cells in experimental stroke. *Prog. Brain Res.* 201, 79–98 (2012).
- Komatsu, K., Honmou, O., Suzuki, J., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Res.* 1334, 84–92 (2010).
- Liu, H., Honmou, O., Harada, K., Nakamura, K., Houkin, K. *et al.* Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Brain* 129, 2734–2745 (2006).
- Nagahama, H., Nakazaki, M., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Namioka, T. *et al.* Preservation of interhemispheric cortical connections through corpus callosum following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral infarction. *Brain Res.* 1695, 37– (2018).
- Nakamura, H., Sasaki, Y., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. *et al.* Elevated brain derived neurotrophic factor levels in plasma reflect in vivo functional viability of infused mesenchymal stem cells for stroke in rats. *J. Neurosurg. Sci.* 63, 42–49 (2019).
- Nakazaki, M., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S., Namioka, T. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells inhibits intracranial hemorrhage after recombinant tissue plasminogen activator therapy for transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Neurosurg.* **127**, 917–926 (2017).
- Namioka, A., Namioka, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for protection against brainstem infarction in a persistent basilar artery occlusion model in the adult rat. *J. Neurosurg.* https://doi. org/10.3171/2018.4.JNS173121 (2018).
- Namioka, T., Namioka, A., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction. *J. Neurosurg.* https://doi.org/10.3171/2018.5.JNS18140 (2018).
- Nomura, T., Honmou, O., Harada, H., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Intravenous infusion of BDNF gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neurosci.* 136, 161–169 (2005).
- Omori, Y., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin K. *et al.* Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* **1236**, 30–38 (2008).
- Onda, T., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 28, 329–340 (2007).
- Sasaki, M., Honmou, O., Radtke, C. & Kocsis, J. D. Development of a middle cerebral artery occlusion model in the nonhuman primate and a safety study of I.V. infusion of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 6, e26577 (2011).
- Sasaki, Y., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Nakazaki, M., Nagahama, H. *et al.* Synergic effects of rehabilitation and intravenous infusion of mesenchymal stem cells after stroke in rats. *Phys. Ther.* **96**, 1791–1798 (2016).
- Suzuki, J., Sasaki, M., Harada, K., Bando, M., Kataoka, Y. *et al.* Bilateral cortical hyperactivity detected by fMRI associates with improved motor function following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat stroke model. *Brain Res.* 1497, 15–22 (2013).

- Toyama, K., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., H. *et al.* Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp. Neuro.* 216, 47–55 (2009).
- Ukai, R., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J. Neurotrauma* 24, 508–520 (2007).
- Morita, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Nakazaki, M., Nagahama, H. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a model of chronic spinal cord injury. *Neurosci.* 335, 221–231 (2016).
- Osaka, M., Honmou, O., Murakami, T., Nonaka, T., Houkin, K. *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.* 1343, 226–235 (2010).
- Matsushita, T., Kibayashi, T., Katayama, T., Yamashita, Y., Suzuki, S. *et al.* Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci. Lett.* 8, 41–45 (2011).
- Sasaki, M., Radtke, C., Tan, A. M., Zhao, P., Hamada, H. *et al.* BDNFhypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 29, 14932–14941 (2009).
- Matsushita, T., Lankford, K. L., Arroyo, E. J., Sasaki, M., Neyazi, M. et al. Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells. Exp. Neurol. 267, 152–164 (2015).
- Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., Niitsu, Y., Ishiai, S. *et al.* Intravenous administration of auto-serum expanded autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow into stroke patients. *Brain* 134, 1790–1807 (2011).
- Honmou, O., Onodera, R., Sasaki, M., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends Mol. Med.* 18, 292–297 (2012).
- Song, C. H., Honmou, O., Ohsawa, N., Nakamura, K., Hamada, H. *et al.* The effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prion. *J. Virol.* 83, 5918–5927 (2009).
- Kim, S., Honmou, O., Kato, K., Nonaka, T., Houkin, K. *et al.* Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone marrow-derived precursor cells. *Brain Res.* 1123, 27–33 (2006).
- Sakai, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S., Nakazaki, M. *et al.* Functional recovery after the systemic administration of mesenchymal stem cells in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *J. Neurosurg. Pediatr.* 22, 467–599 (2018).
- Oshigiri, T., Sasaki, T., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Nakazaki, M. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells alters motor cortex gene expression in a rat model of acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma* https://doi.org/10.1089/ neu.2018.5793 (2018).
- Zheng, W., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Liu, H. *et al.* Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia. *Brain Res.* 1310, 8–16 (2009).
- Fukumura, S., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S. & Nakazaki, M. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells reduces epileptogenesis in a rat model of status epilepticus. *Epilepsy Res.* 141, 56–63 (2018).
- Inden, M., Takata, K., Nishimura, K., Kitamura, Y., Ashihara, E. *et al.* Therapeutic effects of human mesenchymal and hematopoietic stem cells on rotenone-treated Parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* **91**, 62–72 (2013).
- Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M. *et al.* Anti-tumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11, 1155–1164 (2004).
- Matsuda, Y., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Takayanagi, A. & Kobayashi, K. *et al.* Intravenous infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces erectile dysfunction following cavernous nerve injury in rats. *Sex. Med.* 6, 49–57 (2018).
- Takayanagi, A., Sasaki, M., Kataoka-Sasaki, Y., Kobayashi, K., Matsuda, Y. *et al.* Intravenous preload of mesenchymal stem cells rescues erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *J. Sex. Med.* **12**, 1713–1721 (2015).

Muse 細胞による急性心筋梗塞後の組織 修復再生



湊口 信也^{1,2}、山田 好久³、湊口 信吾³、田中 俊樹³、三上 敦¹、
 若尾 昌平⁴、串田 良祐⁴、出澤 真理⁴

- 1. 岐阜大学大学院医学系研究科循環呼吸先端医学講座
- 2. 岐阜市民病院心不全センター
- 3. 岐阜大学大学院医学系研究科循環病態学分野
- 4. 東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞は急性心筋梗塞の治療に有 望である。公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター (TRI) に関連した研究者らが行った動物実験は、Muse 細胞が急性心筋梗塞後の心機 能を改善し、左室リモデリングを抑制することを示している。

1. 急性心筋梗塞:現状の治療法と課題

急性心筋梗塞(AMI)は、冠動脈の突然の閉塞により発症する。閉塞により血流の途絶 が起こると、血流により酸素化あるいは栄養されていた心筋組織が壊死に陥る。その結 果、心機能低下、左室リモデリングが起こり、心不全が発症するため、AMIの死亡率は 高い¹。

冠動脈が完全閉塞すると、その支配領域の心室壁は血流が途絶されるため壊死に陥っ ていくが、壊死は心内膜側からはじまり、時間経過とともに心外膜側まで拡大していく。 この現象は wavefront 現象と呼ばれる²。したがって、心筋虚血後、早期に再灌流を得 ることができれば心筋組織の壊死は心内膜側にとどまり、梗塞領域を小さくおさえるこ とができ、心機能には大きな影響を及ぼさない。しかし、早期に再灌流を得ることがで きなければ、梗塞は心内膜側から心外膜側に及び、貫壁性梗塞が成立する。この場合、 閉塞冠動脈が近位部の太い血管であれば、大型心筋梗塞となり、深刻な心機能低下をも たらす。また、亜急性期から慢性期にかけて梗塞に陥った左室壁は薄くなり、左室内腔 が拡大して左室リモデリングが起こり、その結果、心不全が発症する。AMI で大きな問 題となっているのは、たとえ急性期(発症後約1週間)に救命できたとしても、慢性期 に心不全に陥り、生命予後が悪くなることである。

AMI の第一選択の治療法であり、かつ現在最も有効な方法は、AMI 発症後、できるだ け早期に閉塞冠動脈の再灌流を行い、いまだ死に至っていない心筋細胞を救済し、心筋

要旨

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細 胞は、ヒトの体内に元から 存在する非腫瘍性多能性幹 細胞である。79例の急性心 筋梗塞 (AMI) 患者を対象と した臨床研究により、Muse 細胞数が AMI の急性期に増 加することが示された。ま た、AMI の急性期に Muse 細胞が数多く動員された症 例では、6か月後の心機能 が改善し、左室リモデリン グが抑制されており、末梢 血中の Muse 細胞数の増加 が、心機能改善と左室リモ デリング抑制に関与してい ることが示唆された。ウサ ギAMIモデルに骨髄由来 Muse 細胞を梗塞発症後に 静脈注射したところ、Muse 細胞は梗塞部位にホーミン グし、心筋細胞・血管に分 化した。Muse 細胞はパラク ライン効果も有し、これら が梗塞サイズの縮小、心機 能改善、心室リモデリング 抑制に関与していることが 示された。これらの結果に より、Muse 細胞の安全性 と有効性が確認され、現在、 Muse 細胞による AMI 治療 の治験が行われている。

責任著者

湊口 信也 E-mail: minatos@gifu-u.ac.jp



図1 A: AMI 患者の末梢血中の Muse 細胞数の変化。**B**: AMI 患者(AMI)、冠動脈疾患患者(CAD)、冠動脈正常者(対照)の末梢血中の Muse 細胞数。**C**: 急性期 の Muse 細胞数の増加(Δ Muse)と、駆出率の変化(Δ EF)で評価した慢性期の心機能改善との関係。**D**: 急性期のΔ Muse と慢性期のΔ LVDd との関係。 LVDd、左室拡張末期径 *: P < 0.05、**: P < 0.01

文献 16 より改変(© 2019 Japanese Circulation Society)。

のダメージを最小限にとどめることである。具体的には、AMI が発症した後、可及的速やかに診断し、カテーテル室に搬送し て、経皮的冠動脈インターベンション(PCI)によって閉塞し た責任冠動脈を再開通させ、心筋組織に血流を回復させること である。臨床的には AMI 発症後 60 分以内に再灌流ができれ ば予後は良好であるが、120 分を超えると予後は有意に悪く なることが報告されている³。一般的には、PCI による再灌流 は、発症後 90 分以内に行うのが gold standard といわれてい る。しかし実際には、その時間内に処置を開始したとしても、 再灌流できるとは限らない⁴。しかも多くの場合は、その時間 内に処置が開始できず、再灌流に失敗するケースもある。した がって、予後のことを考えた場合、PCI による再灌流療法だけ では、AMI の治療は不十分である。

亜急性期から慢性期にかけての左室リモデリングのプロセ

スは複雑であり、残存心筋細胞の肥大化、間質細胞などの非心筋細胞の構造的な再構築など、亜急性期から慢性期への治癒過程が深くかかわってくる^{5.6}。すなわち、心筋梗塞部の治癒過程 がどのような影響を受けるかによって、梗塞後の心機能回復の 程度が違ってくるのである。治癒過程において、死んでしまっ た心筋細胞の代わりに、多能性幹細胞を効率よく梗塞部分に生 着させ、心筋細胞に分化させることができれば、心機能低下お よび左室リモデリングを防ぐことができ、慢性期の心不全を防 止でき、患者の予後は明らかに改善する。この問題を解決する 1つの方法として、現在までに自己骨髄由来幹細胞を用いた研 究が行われてきた。自己骨髄由来幹細胞を用いた研 究が行われてきた。自己骨髄由来幹細胞を用いた研 にが報告されており^{7.8}、自己の細胞を用いるため倫理的なハー ドルも低く、臨床応用が容易である。そのため、現在までに、 骨髄単核細胞、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)などを用いて、



文献 19 より改変(© 2019 American Heart Association, Inc.)。

急性心筋梗発症後の組織修復再生療法に対する臨床研究が世 界中で数多く行われてきたのである^{7.8}。しかし、これらを用 いたプラセボ対照研究の結果は、効果がほとんどないか、ある いは、効果があってもわずかな改善でしかないものだった^{7.8}。 心筋梗塞後の再生医療に用いる細胞ソースとしては、骨髄単核 細胞、骨髄由来 MSC には限界があるといわざるをえない。心 筋細胞への分化効率が高く、強力な修復再生能力を有する新た な細胞ソースを開発することが必要とされているのである。

2010 年、出澤らによって multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞が発見された⁹。Muse 細胞は、多能 性幹細胞表面マーカーの stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) が陽性である細胞として分別できる^{9~12}。Muse 細 胞は多能性マーカーである Sox2、Oct3/4、Nanog を発現し、 1 つの細胞から 3 胚葉系(外胚葉、中胚葉、内胚葉)すべての 細胞に分化できる能力を有する⁹。しかも、この細胞はヒトが 本来、体の中に有している細胞であり、骨髄⁹、皮膚¹⁰、脂肪 組織^{12,13}、種々の臓器の結合組織¹⁴、末梢血^{15,16}に存在してい る。つまり、Muse 細胞は多能性幹細胞であり、応用に際して 遺伝子導入を必要としないという点で安全性が担保できるた め、臨床応用へのハードルは低いと考えられる。約 30 mL の 新鮮なヒト骨髄液から、3 日間の培養で約 100 万個の Muse 細 胞が得られることも^{14,17}、臨床応用に有利である。

2. AMI患者の急性期における血中Muse細胞数が心機能と左室 リモデリングに与える影響

末梢血中に Muse 細胞が存在していることは、以前から脳卒中 患者で報告されていたが¹⁵、AMI 患者の急性期に末梢血中の Muse 細胞がどのような動態を示すかについては明らかでな かった。そこで我々は、岐阜大学病院に入院した 79 例の AMI 患者について (AMI 群)、急性期に血中 Muse 細胞数がどのよ うな変化を示すかについて調査し、さらにこの Muse 細胞数の 変化が、AMI 発症後 6 か月の時点の心機能、左室リモデリング



図3 A: Nano-lantern で標識した Muse 細胞は心筋梗塞部位に集積したが、non-Muse 細胞は集積しなかった(梗塞 2 週後)。B:心筋梗塞部位に集積していた Nano-lantern で標識した Muse 細胞は、S1PR2 の選択的阻害薬である JTE-013 の共投与により集積しなくなった。C:免疫組織学的に評価した梗塞領域に生着した Muse 細胞数(梗塞 3 日後;JTE-013 の共投与のなし、あり)。D:梗塞心筋組織の梗塞領域と境界領域、正常心筋組織における S1P 濃度。 *:P < 0.05、**:P < 0.01、***:P < 0.001; S1P、sphingosine-1-phosphate; S1PR2、sphingosine-1-phosphate receptor 2 文献 19 より改変(© 2019 American Heart Association, Inc.)。

にどのような影響を及ぼすかについて検討した。冠動脈造影で 75%以上の冠動脈狭窄を有する患者を冠動脈疾患(CAD)群 (*n* = 44)、75%以上の狭窄を有さない患者を対照群(*n* = 64) として比較検討した。末梢血中の Muse 細胞数 (cells/100μL) を、蛍光活性化セルソーティング (FACS)を用いて、SSEA-3⁺ かつ CD105⁺ 細胞として測定し、AMI による入院当日(0日)、 1 日後、7 日後、14 日後、21 日後に行った¹⁶。

その結果、以下のような結果を得た¹⁶。入院当日は、AMI 群と対照群の間で、Muse 細胞数に有意な差を認めなかった。 AMI 発症 24 時間後に、入院当日に比べて、Muse 細胞数が有 意に増加してピーク値を示し、その後、7 日後も有意な増加を 持続した。14 日後には、Muse 細胞数は有意に低下し、21 日 後には、入院時の値に戻った(図 1A)。CAD 群の血中 Muse 細 胞数は、対照群と同等の値であり、有意差は認められなかった (図 1B)。

これらのことから、冠動脈の有意な狭窄を有する CAD 患者 では、末梢血中の Muse 細胞数は増加しないが、心筋組織が壊 死に陥る AMI が起こると、血中への Muse 細胞の動員が起こ

ることが明らかになった。AMIによる入院21日目までに示し た最大の Muse 細胞数を MAX Muse、MAX Muse から最小の Muse 細胞数を差し引いたものを∆ Muse と定義した。AMI 発 症後、経時的に測定したクレアチンキナーゼ(CK)の最大値 peak CK (PCK)、そして CK の値を合計した Σ CK は、いずれ も心筋梗塞サイズの指標であると考えられている¹⁸。PCK ある いはΣCK が高値を示す患者は、Δ Muse の高値を示すことか ら、梗塞サイズが大きい、すなわち、心筋へのダメージが大き ければ大きいほど、Muse 細胞はより多く動員されることを示 している¹⁶。次に、血漿 sphingosine-1-phosphate (S1P) 濃度 を液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析装置(LC-MS/ MS) で測定したところ、AMI 群の血漿 S1P 濃度は、対照群に 比べて有意に増加していた¹⁶。一方、CAD 群の血漿 S1P 濃度 は対照群と同等であり、有意差は認められなかった。さらに、 血漿 S1P 濃度と MAX Muse は、有意な正の相関(r = 0.330) を示すことがわかった¹⁶。これらのことから、血中への Muse 細胞の動員には、S1Pが関与している可能性が示唆された¹⁶。

次に、AMI 急性期に動員される Muse 細胞数が、慢性期



図4 A~D: 梗塞心筋領域に生着した GFP で標識した自家 Muse 細胞は、心筋マーカーである ANP、troponin I、α-actinin を発現した(梗塞2週後)。さらに、 GFP で標識した Muse 細胞は、host 心筋細胞との間に connexin-43 を発現した(梗塞2週後)。**E~H**: 梗塞心筋領域に生着した GFP で標識した自家 Muse 細胞は、 心筋マーカーである ANP、troponin I、α-actinin を発現した(梗塞2か月後)。 ANP、心房性ナトリウム利尿ペプチド; GFP、緑色蛍光タンパク質 文献 19 より改変(© 2019 American Heart Association, Inc.)。

(6か月後)の心機能および左室リモデリングに与える影響に ついて検討した。駆出率 (EF)で評価した心機能が急性期と比 較して慢性期 (6か月後)に改善した患者では、改善しなかっ た患者と比べてΔ Muse (最大-最小の Muse 細胞数)が有意 な高値を示した (図 1C)。さらに、慢性期に左室拡張末期径 (LVDd)が減少した (左室リモデリング抑制)患者では、LVDd が増加した (左室リモデリング促進)患者に比べて、Δ Muse が有意な高値を示した (図 1D)。これらの結果から、AMIの 急性期に末梢血に動員される Muse 細胞数が多い症例は、慢性 期の心機能が改善し、左室リモデリングが抑制されることが明 らかとなった¹⁶。この結果から、AMI の急性期に Muse 細胞を 外因性に投与すれば、慢性期の心機能改善と左室リモデリング 抑制が期待できることが示唆された。

3. Muse細胞を用いた梗塞心筋組織修復再生療法

3.1 梗塞サイズ、心機能、左室リモデリングへの効果

*in vitro*の実験で、ウサギ骨髄由来 Muse 細胞とヒト骨髄由 来 Muse 細胞を培養して心筋細胞への分化を試みた結果、 Muse 細胞は cardiac troponin I(心筋トロポニンI)および sarcomeric α-actinin(サルコメアαアクチニン)を発現する 心筋細胞様の細胞に分化することを確認した¹⁹。Muse 細胞を 用いたヒト心筋梗塞に対する組織修復再生療法を開発するた めには、まずは *in vivo* ウサギ AMI モデルでの有効性と安全性 を証明する必要がある。そこで我々は、日本白色種ウサギの冠 動脈を 30 分間閉塞し、その後再灌流する AMI モデル(虚血・ 再灌流モデル)を用いて解析することにした¹⁹。

前述したように、現在、AMIの第一選択の治療法は、心臓 カテーテルを用いた PCI によって、閉塞冠動脈を再開通させる ことである。従来、臨床研究でも使用されてきた自家 MSC を 中心にした幹細胞療法と比較して、自家 Muse 細胞による治療 が、心機能改善や左室リモデリング抑制に対してより大きい効 果を示すことがわかれば、治療法として開発する意味がある。

そのため、我々は 3 × 10⁵ 個の自家 Muse 細胞(Muse 群) と、同じく 3 × 10⁵ 個の自家 MSC (MSC 群)の効果を比較した。 また、MSC の中には数%の Muse 細胞が含まれるので、Muse 細胞を除去した MSC (non-Muse 群)の効果についても比較を



図5 A: 梗塞 2 週後の梗塞境界領域における CD31 陽性血管数(対照群、Muse 群、non-Muse 群、MSC 群の比較)。B:GFP で標識した Muse 細胞は、血管内皮の マーカーである CD31、血管平滑筋のマーカーであるα-smooth muscle actin を発現した(梗塞 2 週後)。C: 梗塞 3 日目の梗塞境界領域におけるウェスタンブロッ トによる HGF、VEGF、MMP-2、MMP-9 の発現(sham 群、vehicle 群、MSC 群、Muse 群、non-Muse 群の比較)。D: 梗塞境界領域における TUNEL 陽性心筋細胞 の比較(対照群、Muse 群)。E: 梗塞領域における Sirius Red 陽性領域面積の比較(対照群、Muse 群)。 *: P < 0.05、**: P < 0.01、***: P < 0.001; aSMA、a-smooth muscle actin; GFP、緑色 蛍光タンパク質; HGF、hepatocyte growth factor; MMP、matrix metalloproteinase; MSC、間葉系幹細胞; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling、VEGF: vascular endothelial growth factor 文献 19 より改変(© 2019 American Heart Association, Inc.)。

行った。心筋梗塞サイズを測定し、左室機能の指標としては、 左室駆出率(EF%)、左室短縮率(FS%)、左室圧増加速度(+ dP/dt)、左室圧減少速度(-dP/dt)を用い、左室リモデリン グの指標としては、左室収縮末期径(LVDs)と左室拡張末期径 (LVDd) を用いた。Muse 群、MSC 群、non-Muse 群、対照群 について、AMI 発症の2週後と2か月後に比較を行った。対 照群については、溶媒のみ投与した。その結果、梗塞サイズに ついては、2週後、2か月後ともに、対照群に比較して MSC 群 で中等度な縮小が認められたのに対し、Muse 群での縮小はき わめて大きく、MSC 群の約2倍の縮小効果が認められた(図 2A、2B)。さらに、左室リモデリング抑制効果、心機能改善効 果についても、2週後、2か月後ともに、Muse 群では MSC 群 に比較して有意に大きかった。従来の幹細胞 (MSC) を用いた 場合に比較して、Muse 細胞を用いた場合に大きな改善が得ら れることから、Muse 細胞を用いて AMI 後の組織修復再生療法 を開発することは、臨床において非常に重要と考えられる。

Muse 細胞を用いた AMI の治療が、従来の治療法に比べてよ り有効である可能性が期待できる。しかし、自家 Muse 細胞を 使用する場合、急性期の AMI 患者から骨髄液を採取するのは 侵襲的である。また、骨髄液から Muse 細胞を分離して培養す る場合、組織の修復再生に十分な量の Muse 細胞を得るために は、少なくとも 1 週間を要する。そのため実際の臨床現場で は、自家 Muse 細胞ではなく、他家 Muse 細胞を使用するのが 現実的であると思われる。そこで、ウサギ骨髄細胞由来の他家 Muse 細胞 3 × 10⁵ 個をウサギ心筋梗塞発症 24 時間後に静脈 注射したところ、2 週後の梗塞サイズ縮小効果は自家 Muse 細胞 の梗塞サイズ縮小効果、左室機能改善効果、左室リモデリング 抑制効果は、梗塞 6 か月後にも持続していた¹⁹。

3.2 Muse細胞の梗塞部位への生着メカニズム

Muse 細胞の特筆すべき性質は、AMI後に静脈注射された Muse



図 6 他家 Muse 細胞の梗塞サイズ縮小効果、心機能改善効果に対する S1PR2 阻害薬 JTE-013 の影響。 *:*P* < 0.05、**:*P* < 0.01、***:*P* < 0.001; 文献 19 より改変(© 2019 American Heart Association, Inc.)。

細胞が梗塞領域に選択的に生着することである。Muse 細胞と non-Muse 細胞を蛍光タンパク質 Nano-lantern で標識して、心 筋梗塞部位への生着を調べた。その結果、Muse 細胞は梗塞領 域に生着したが、non-Muse 細胞は生着しなかった(図 3A)。 JTE-013 は、sphingosine-1-phosphate receptor 2(S1PR2)の 選択的阻害薬であるが、Muse細胞とJTE-013を共投与すると、 Muse細胞の梗塞領域への生着は顕著に阻害された(図3B)。梗 塞領域への生着を組織学的手法により調べた場合においても 同様の結果が得られた。すなわち、AMI 発症3日後に Muse 細 胞は梗塞領域に生着したが、JTE-013との共投与では生着がほ ぼ消失した(図 3C)。Muse 細胞の生着率は梗塞3日後で14.5% であった¹⁹。通常報告されている MSC の生着率は 0~3%で あることを考えれば^{20,21}、Muse 細胞の生着率はきわめて高い ことがわかる。梗塞心筋組織の梗塞領域と境界領域の S1P 濃 度は、正常心筋組織の相当する領域に比べて有意に高値であっ た(図 3D)。このことから、静脈注射された Muse 細胞が、梗 塞領域と境界領域に選択的に生着していることがわかった。さ らに、Boyden chamber を用いた in vitro 遊走アッセイを行い、 Muse 細胞の遊走を定量したところ、S1PR2 アゴニストである SID46371153 に対して、Muse 細胞の遊走は有意に用量依存 性を示した。Muse 細胞は、梗塞心筋組織に対しても顕著な遊 走を示し、この遊走は、JTE-013で用量依存性に阻害された。 Muse 細胞の表面には S1PR2 が発現しているが、siRNA によっ て S1PR2 をサイレンシングすると、SID46371153 あるいは梗

塞心筋組織に対する Muse 細胞の遊走は有意に抑制された¹⁹。 これらの *in vivo* ならびに *in vitro* のデータは、Muse 細胞の梗 塞心筋組織への遊走生着のメカニズムには、S1P-S1PR2 シス テムが関与していることを示している。

3.3 Muse細胞の心筋細胞への分化

梗塞2週後の心筋細胞組織の薄切切片を染色して、心筋 マーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、 troponin I, sarcomeric α -actinin, およびギャップジャンク ションのマーカーである connexin-43 (コネキシン 43) の発現 を調べた。共焦点顕微鏡で観察したところ、梗塞境界領域を中 心にして、Muse 細胞を標識した緑色蛍光タンパク質(GFP)と、 ANP、troponin I、sarcomeric *a*-actinin の発現細胞が一致し ていた。Muse細胞での心筋マーカーの発現から、これらの細胞 が心筋に分化したことが示された(図4A、4B、4C)。さらに、 Muse 細胞から分化した心筋細胞と、もともとあった host 心筋 細胞との間には connexin-43 が発現していることから、分化し た心筋細胞はギャップジャンクションを介して host 心筋細胞 と細胞間の興奮伝播や情報伝達を行っている可能性が示され た(図 4D)。

梗塞 2 か月後になると、

GFP 標識 Muse 細胞の ANP発現レベルは低下したが、troponin I あるいは sarcomeric *α*-actinin の発現レベルは増加していた(図 4E、4F、4G、4H)。 特に、sarcomeric α-actinin 陽性細胞は、成熟した心筋細胞に 特徴的である明瞭な横紋を示していた(図4H)。GFP で標識 した他家 Muse 細胞でも同様に、2 週後に心筋マーカーである ANP、troponin I、 α -actinin を発現し、6 か月後においても troponin I、 α -actinin の発現があった¹⁹。このことは、他家 Muse 細胞から分化した心筋細胞が、少なくとも 6 か月間は心 臓内にとどまっていたことを示している¹⁹。

次に、Muse 細胞から分化した心筋細胞が、拍動している心 臓において実際に作業心筋としての役割を果たしているかど うかを確認した。GCaMP3で標識したヒトMuse細胞をウサギ AMI モデルの梗塞心筋組織に移植した。GCaMP は、enhanced GFP (EGFP)、カルモジュリン (CaM)、ミオシン軽鎖フラグメ ント(M13)を遺伝子工学的に連結したカルシウムセンサータ ンパク質である。Ca²⁺が CaM に結合すると、Ca²⁺/CaM 複合 体が M13 と相互作用して蛍光団である EGFP の立体構造を変 化させ、それにより蛍光強度が変化する。これを利用すること で、Ca²⁺濃度の変化を GCaMP 蛍光強度の変化として検出する ことができる。梗塞2週後に開胸術を行って心臓を露出させ、 落射蛍光実体顕微鏡(Nikon、SMZ745T)とEXFO X-Cite®蛍 光照明装置を用いて観察したところ、心電図に同期して、収縮 期には緑色の信号が濃く(強く)なり、拡張期には薄く(弱く) なるという時間強度曲線が描かれた¹⁹。このことは、Muse 細 胞から分化した心筋細胞において、収縮期には細胞内 Ca²⁺濃 度が上昇した結果として緑色の強い信号が発生し、拡張期には 細胞内 Ca²⁺濃度が低下した結果として緑色の信号が弱くなっ たことを意味しており、分化した心筋細胞が作業心筋として機 能していることを示している。

3.4 Muse細胞の血管への分化とパラクライン効果

梗塞 2 週後の時点で、GFP で標識した Muse 細胞は血管内皮 細胞のマーカーである CD31、および血管平滑筋細胞のマー カーである α -smooth muscle actin を発現し、血管の形状を形 成していた。さらに、梗塞境界領域の毛細血管数は、対照群、 non-Muse 群、MSC 群に比較して、Muse 群で有意に多かった (図 5A、5B)。Muse 細胞は MSC と同様のパラクライン効果を 有する。Muse 細胞の培養液の上清中には、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF)、matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、MMP-9 が発現していた。Muse 細胞を投与した 梗塞心筋組織の境界領域には、MSC と同様に、VEGF、HGF、 MMP-2、MMP-9 が発現していた¹⁹。VEGF の発現レベルは、 MSC や non-Muse 細胞に比べて、Muse 細胞で特に高かった (図 5C)。VEGF と HGF は血管新生因子であり^{22,23}、HGF は抗 アポトーシス効果を示す²³。MMP-2、MMP-9 は抗線維化ある いは線維分解作用を有する²⁴。Muse 細胞の投与により、梗塞 心筋境界領域の terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) 陽性細胞数が減少した(図 5D)。 これは Muse 細胞が抗アポトーシス効果を有することを意味 している。さらに、梗塞領域の Sirius Red 陽性領域面積の減少 も認められた(図 5E)。これらの結果から、Muse 細胞は梗塞 境界領域の毛細血管数の増加、梗塞領域の線維化領域面積の減 少、梗塞サイズの縮小などに関与している可能性が高いと考え られる。

3.5 Muse細胞の免疫調節効果

Muse 細胞は human leukocyte antigen (HLA) –DR (HLA ク ラス II) を細胞表面に発現しないため、T 細胞の攻撃を受け ない¹⁹。さらに Muse 細胞は、HLA-G (胎盤に存在して胎児が 母胎の免疫から免れるように働くタンパク質)を発現するた め¹⁹、Muse 細胞が投与された host からの攻撃を受けないよう に免疫が調節される。これらの性質が、Muse 細胞が梗塞領域 に生着した後も長期間にわたって排除されずに存在し続ける 理由の 1 つかもしれない。

3.6 梗塞領域でのMuse細胞存在の意義

他家 Muse 細胞と S1PR2 の選択的阻害薬である JTE-013 を、 ウサギ AMI モデルに共投与すると、他家 Muse 細胞による 2 週後の梗塞サイズ縮小効果ならびに心機能改善効果は減少 した(図 6)。さらに、自殺遺伝子である herpes simplex virus thymidine kinase (*HSV-tk*)をヒト Muse 細胞に導入し、その 細胞をウサギ AMI モデルに投与すると、ヒト Muse 細胞は生 着後に破壊され、その後は、ヒト Muse 細胞による梗塞サイズ 縮小効果、心機能(EF)改善効果は、大幅に減少した¹⁹。

次に、GATA4(心筋細胞発生の際に発現する転写因子の1 つ)をコードする遺伝子を siRNA でサイレンシングしたヒト Muse 細胞を、ウサギ AMI モデルに移植した。梗塞2週後の 時点で、Muse 細胞による梗塞サイズ縮小効果ならびに心機能 (EF)改善効果は有意に減少していた。心臓の組織学的検討を 行ったところ、GFP で標識した Muse 細胞からの心筋細胞の 分化が認められなかった。これは、ヒト Muse 細胞における
GATA4 のサイレンシングにより心筋細胞への分化が阻害されたため、梗塞サイズ縮小効果、心機能改善効果が減少したことを意味している¹⁹。

これらのことは、Muse 細胞が梗塞領域に存在し続け、心筋 細胞への分化あるいは血管再生、抗アポトーシス効果や抗線維 化効果などのパラクライン効果を発揮することが、梗塞サイズ 縮小、心機能改善に関与していることを意味している。

文献

- Sutton, M. J., Pfeffer, M. A., Moye, L., Plappert, T., Rouleau, J. L. *et al.* Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction. *Circulation* 96, 3294–3299 (1997).
- Reimer, K. A. & Jennings, R. B. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab. Invest.* 40, 633–644 (1979).
- Cannon, C. P., Gibson, C. M., Lambrew, C. T., Shoultz, D. A., Levy, D. et al. Relationship of symptom-onset-to balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. JAMA 283, 2941–2947 (2000).
- Moscucci, M. & Eagle, K. A. Door-to-balloon time in primary percutaneous coronary intervention: Is the 90-minute gold standard an unreachable chimera? *Circulation* 113, 1048–1050 (2006).
- Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M. *et al.* Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ. Res.* 82, 1130–1138 (1998).
- Minatoguchi, S., Takemura, G., Chen, X.-H., Wang, N., Uno, Y. et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colonystimulating factor treatment. *Circulation* 109, 2572–2580 (2004).
- George, J. C. Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials. *Trans. Res.* 155, 10–19 (2010).
- Fisher, S. A., Zhang, H., Doree, C., Mathur, A. & Martin-Rendon, E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst. Rev.* 9, CD006536 (2015).
- Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y. *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 107, 8639–8643 (2010).
- Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D. et al. Multilineagedifferentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 9875–9880 (2011).
- Kuroda, Y., Wakao, S., Kitada, M., Murakami, T., Nojima, M. et al. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. *Nature Protoc.* 8, 1391–1415 (2013).
- Heneidi, S., Simerman, A. A., Keller, E., Singh, P., Li, X. *et al.* Awakened by cellular stress: Isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PLoS One* 8, e64752 (2013).
- Kinoshita, K., Kuno, S., Ishimine, H., Aoi, N., Mineda, K. *et al.* Therapeutic potential of adipose-derived SSEA-3-positive Muse cells for treating diabetic skin ulcers. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 146–155 (2015).
- Wakao, S., Akashi, H., Kushida, Y. & Dezawa, M. Muse cells, newly found nontumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathol. Int.* 64, 1–9 (2014).
- Hori, E., Hayakawa, Y., Hayashi, T., Hori, S., Okamoto, S. *et al.* Mobilization of pluripotent multilineage-differentiating stress-enduring cells in ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 25, 1473–1481 (2016).
- Tanaka, T., Nishigaki, K., Minatoguchi, S., Nawa, T., Yamada, Y. *et al.* Mobilized Muse cells after acute myocardial infarction predict cardiac function and remodeling in the chronic phase. *Circ. J.* 82, 561–571 (2018).
- Dezawa, M. Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: direct contribution of Muse cells to tissue regeneration. *Cell Transplant.* 25, 849–861 (2016).
- Turer, A. T., Mahaffey, K. W., Gallup, D., Weaver, W. D., Christenson, R. H. *et al.* Enzyme estimates of infarct size correlate with functional and clinical outcomes in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 6, 12 (2005).
- Yamada, Y., Wakao, S., Kushida, Y., Minatoguchi, S., Mikami, A. et al. S1P–S1PR2 axis mediates homing of Muse cells into damaged heart for long-lasting tissue repair and functional recovery after acute myocardial infarction. Circ. Res. 122, 1069–1083 (2018).

- Nagaya, N., Fujii, T., Iwase, T., Ohgushi, H., Itoh, T. *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2670–H2676 (2004).
- Freyman, T., Polin, G., Osman, H., Crary, J., Lu, M. et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. Eur. Heart J. 27, 1114–1122 (2006).
- Isner, J. M. & Asahara, T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J. Clin. Invest. 103, 1231–1236 (1999).
- Chen, X. H., Minatoguchi, S., Kosai, K., Yuge, K., Takahashi, T. *et al. In vivo* hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. *J. Card. Fail.* **13**, 874–883 (2007).
- Mias, C., Lairez, O., Trouche, E., Roncalli, J., Calise, D. et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. Stem Cells 27, 2734–2743 (2009).

幹細胞を用いた末梢動脈疾患に対する 血管再生療法



藤田 靖之、川本 篤彦

公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション 推進センター メディカルイノベーションディビジョン

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター(TRI)の 研究者らによって開発された幹細胞を用いた血管再生療法は、慢性重症下肢虚血の治 療として大いに期待され、既存の治療法に対し抵抗性を示す、または適応外となる状 態の患者に希望を与えるものである。

1. はじめに

1.1 慢性重症下肢虚血の病態・疫学・治療

末梢動脈疾患(PAD)とは、四肢の動脈に生じた狭窄または閉塞により循環障害をもた らす疾患群である。無症候性のものから重症のものまで合わせると、全世界で2億人以 上が罹患していると見積もられている¹。原因疾患として最も多いのは動脈硬化に起因 する閉塞性動脈硬化症(ASO)で、その他の原因疾患としては、閉塞性血栓血管炎(バー ジャー病とも呼ばれる)、血管炎、自己免疫疾患があげられる。

PAD が高度に進行し、下肢の安静時疼痛または潰瘍・壊疽を示すに至った病態

1997~	2003~	2007~	2008~	2017~
EPC (CD34 陽性 細胞)の発見 (1997)	第 l/lla 相臨床試験 (日本)	第 I/IIa 相臨床試験 (米国)	第 Ⅱ 相医師主導 治験(医療機器) (日本)	第 II 相企業治験 (再生医療等製品) (日本)
前臨床試験	単群用量漸増試験 治療手段のない CLI N=6;1×10 ⁵ 個/kg N=8;5×10 ⁵ 個/kg N=3;1×10 ⁶ 個/kg	 多施設共同二重盲検 ランダム化プラセボ 対照試験 治療手段のない CLI N = 7;1 × 10⁵ 個 /kg N = 9;1 × 10⁶ 個 /kg N = 12;プラセボ 	単施設単群試験 治療手段のない CLI <i>N</i> = 11	多施設共同非盲検 ランダム化比較試験 治療手段のない CLI <i>N</i> = 35

図1 CLI 患者に対する G-CSF 動員 CD34 陽性細胞を用いた下肢血管再生療法:これまでの前臨床~臨床開発の 歩み。CLI:重症下肢虚血、EPC:血管内皮前駆細胞、G-CSF:顆粒球コロニー刺激因子

要旨

慢性重症下肢虚血は疼痛や **潰瘍・壊疽を伴い、しばしば** 下肢切断を余儀なくされ、 致命的な結果となりうる病 態である。CD34 陽性細胞を 用いた新しい治療法は、動 物実験、前臨床および臨床 試験により良好な成績が示 されてきた。現在、日本に おいて、先駆け審査指定制 度の指定のもと、G-CSF 動員 自家 CD34 陽性細胞を用い た下肢血管再生療法は新た な標準治療となることを目 指して開発を進められてい る。CD34陽性細胞が再生医 療等製品として承認されれ ば、慢性重症下肢虚血のみ ならず、それ以外の疾患へ の適応拡大への道も切り開 くことになるものと期待さ れている。

責任著者

藤田 靖之 E-mail: yasufujita-ths@umin.ac.jp

川本 篤彦 E-mail: kawamoto@fbri.org (Fontaine 分類 III 度以上、または Rutherford 分類 4 群以上) が 2 週間以上持続するものを、慢性重症下肢虚血(chronic critical limb ischemia:CLI、近年では chronic limb-threating ischemia:CLTI とも呼ぶ)と定義している。PAD の終末像と もいえる CLI 患者の予後はきわめて不良であり、いくつかの進 行性悪性腫瘍の予後に匹敵する。CLI発症から1年後の転帰は、 死亡率 25%、大切断後生存率 30%、CLI 持続率 20%、また、 5年生存率は 40~50%と報告されている²。欧米においては、 百万人あたり年間 500~1,000 人の新たな CLI 患者が発生し、 CLI による下肢切断は年間 25 万件行われていると推定されて いる¹。2000 年から 2010 年までの間に全世界の PAD 患者の 数は 23.5% 増加しており²、今後も患者数の急速な増加が懸念 されている。下肢切断は患者自身の QOL を大きく損なうだけ でなく、同時に大きな社会経済的損失につながっている。

CLI に対して現在推奨されている治療的介入方法は、まず、 疼痛コントロール、リスクファクターの管理、潰瘍・壊疽に対 する創傷治療、そして適応がある場合には、外科的バイパス手 術や血管内治療による血行再建である³。しかし、CLI 患者の 約 25 ~ 40%は、バイパス手術に用いる静脈グラフトの欠如、 多発性・広範囲に及ぶ動脈病変および併存する合併症を理由と して血行再建の適応外となる^{1,4,5}。CLI 患者に対する治療の最大 の目的は救肢・救命であるが、血行再建の適応がない、あるい は治療抵抗性の患者はきわめて予後不良である。したがって、 このような CLI 患者に対する新しい治療戦略の確立が社会的・ 医学的急務となっている。

1.2 CD34 陽性細胞を用いた CLI 患者の血管再生療法

1997年にAsaharaら⁶により、血管内皮前駆細胞(EPC)が ヒトの末梢血単核球(PBMC)の一成分(CD34陽性分画)と して存在することが証明されて以来、EPCに関連する基礎・臨 床研究が幅広く行われてきた。その中で、虚血性疾患に対する 新しい治療法として、EPC移植による血管再生療法が注目を集 めている。現在、自家骨髄由来 CD34 陽性細胞を用いた血管再 生療法の臨床試験が、狭心症、急性心筋梗塞、拡張型心筋症、 脳梗塞、CLIなどを対象に国際的に展開されている。

筆者らは、CLI 患者を対象とした、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)動員自家 CD34 陽性細胞を用いた下肢血管再生療法 について、2003 年から第 I/IIa 相臨床試験を世界に先駆けて開 始し、安全性および臨床効果を報告した⁷。また、2008 年か



図2 EPC の体内動態。EC:血管内皮細胞、EPC:血管内皮前駆細胞、G-CSF:顆粒 球コロニー刺激因子、GM-CSF:顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、MMP-9:matrix metalloproteinase-9、PIGF:placental growth factor、SDF:stromal cell-derived factor、sKit L:soluble kit ligand、VEGF:vascular endothelial growth factor

らは CD34 陽性細胞分離装置に関する医師主導治験を実施し、 この GCP 準拠試験においても本治療の有効性および安全性を 確認した⁸。さらに、2017 年 12 月から CD34 陽性細胞の再生 医療等製品としての薬事承認を目指した多施設共同ランダム 化比較試験(企業治験)を開始した(図 1)。本稿では、CD34 陽性細胞の再生医療等製品としての開発を進めるに至った経 緯とその展望について概説する。

2. 前臨床研究

2.1 EPC の特性・体内動態

成体の血管形成のメカニズムとして、既存の成熟血管内皮細胞の増殖・遊走による血管新生(angiogenesis)という仕組みが従来より提唱されてきた。しかし、1997年にAsaharaら⁶は、成体における PBMC の一成分(CD34陽性細胞)として EPC の存在を証明し、これにより、血管新生とは異なる血管

2

3 4

Λ



図3 CD34 陽性細胞の磁気分離方法の基本原理

第1~5日	第5日	第	6日
G-CSF 皮下注	アフェレシス	CD34 陽性細胞 の磁気分離	CD34 陽性細胞の 筋注
EPC の動員	全 PBMC の採取	EPC の精製	EPC の移植

図4 CLI患者に対する CD34 陽性細胞の動員、採取、分離および移植方法。EPC: 血管内皮前駆細胞、G-CSF:顆粒球コロニー刺激因子、PBMC:末梢血単核球

図5 CLI 患者に対する CD34 陽性細胞移植後 4 年までの Rutherford 分類の推 移と CLI からの離脱率(CLI-free ratio):国内第 I / II a 相臨床試験の成績。 *:P<0.05、**:P<0.01(治療前との比較)

24

调

12

発生(vasculogenesis)により成体血管が形成されるという新 たな概念が生まれた。血管発生では、成熟血管内皮細胞ではな く、血管内皮前駆細胞が関与する。それ以降、成体の新たな血 管形成は、血管新生と血管発生の相互作用により起こると考え られるようになった。

EPC は PBMC 中に、CD34 (造血幹細胞表面抗原) 陽性細胞や CD133 (早期造血幹細胞表面抗原)⁹陽性細胞として存在する。 これらの細胞を単離し、内皮用培地を用いて一定の密度以上で 培養すると、CD34、CD31、vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR:kinase insert domain receptor とも 呼ぶ)、Tie-2、E-selectinの発現を認める紡錘形の接着細胞に 分化する。また、これらの細胞によるアセチル化低密度リポタ ンパク質(Ac-LDL)の取り込みも確認できるようになる^{6,10}。

骨髄移植マウスなどを用いた基礎研究によると、EPC は成体 内では骨髄に多く分布しているが、虚血・炎症・創傷・腫瘍形 成などの病態下、あるいは G-CSF、顆粒球マクロファージコロ ニー刺激因子 (GM-CSF) などのサイトカインやエストロゲン などのホルモン投与により、骨髄から末梢血へ強制動員され、 循環血を介して血管形成部位へたどりつき、血管形成に貢献す る^{11,12}。これらの知見は、血管再生療法のための EPC の採取・ 分離法の確立にも役立っている(図2)。

2.2 EPC 移植の前臨床試験

Rutherford 分類

100

80

60 (%) 割心 40

20

Ω

100

80

60 (%) 割 40

20

Λ

治療前

/.

治療前

Q

8

1

12

24

週

52

52

104

156

104

156

208

Kalka らは、健常人の PBMC を培養して得られた EPC を、ヌー ドマウスの下肢虚血モデルに移植した。それによると、下肢虚 血2日後に EPC を静脈内投与すると、移植された細胞が虚血







部位に集積し、マウス由来の血管内皮細胞と共同して血管再生 に貢献していることが組織学的に確認された。組織学的に確認 された毛細血管密度や、レーザードプラ法により測定された虚 血肢の血液灌流も、細胞移植後に有意に改善した。この結果、 重症虚血後壊死に対する下肢温存率が、対照群で7~8%に すぎなかったのに対し、EPC移植群では59%と著明に改善し た¹³。Murohara らは、ヒト臍帯血から採取・培養した EPC を 下肢虚血ヌードラットに移植し、同様に良好な成績を報告して いる¹⁴。また、Losordo らは、健常人へのG-CSF 皮下注後に末 梢血から採取・分離した CD34 陽性細胞を下肢虚血ヌードラッ トに移植し、同様に良好な結果を確認した(未発表データ)。

また、CD34 陽性細胞治療は、この他に心筋梗塞^{15,16}、脳梗 塞¹⁷、難治性骨折¹⁸ などの治療にも有効であることが前臨床 研究で証明されている。これらの成果は、EPC 移植のみなら ず、骨髄単核球 (BMMC:EPC に加えて造血系細胞、間葉系細 胞なども含む細胞群)移植による治療の理論的支柱にもなって いる。また、虚血疾患モデル動物に移植された EPC は、血管 発生の機序により虚血組織における新規血管に直接統合され て血管内皮を形成するのみならず、EPC 自身が VEGF、hepatic growth factor、angiopoietin-1、stromal-cell-derived factor-1 alpha、insulin-like growth factor-1、endothelial nitric oxide synthase といったさまざまな血管新生サイトカインおよび血 管成長因子を産生し^{19~21}、その結果、既存の血管内皮の増生 と遊走を促進すること (パラクライン効果) も証明された。さ らには、EPC からは血管新生関連タンパク質のみならず、リ ボ核酸 (RNA) そして microRNA を含むエキソソームが分泌さ れ、遺伝子機序によってもパラクライン効果に寄与することが 明らかになってきた (図 2)^{22,23}。

EPC (CD34 陽性細胞) は、BMMC または PBMC から純化・ 分離し、移植に用いることができる。一方、EPC の純化・分 離を行わずに単核球をそのまま移植する方法(BMMC または PBMC 移植)も、前臨床試験において数多く試されてきた。し かし、BMMC・PBMC 移植では EPC だけでなく雑多な細胞群 を移植することとなり、その危険性が指摘されてきた。すな わち、骨芽細胞・軟骨芽細胞成分による骨化・軟骨化、線維 芽細胞成分による線維化などである。Yoon らの前臨床研究で は、ラット急性心筋虚血モデルに対して全骨髄細胞を心筋内移 植したところ、高頻度に心筋石灰化の出現が認められた²⁴。ま た、筆者らも、ラット急性心筋虚血モデルに対する PBMC の心 筋内移植で、細胞用量を高くすると移植後に多数の炎症細胞侵 潤を伴う心筋内出血が出現し、血管再生および心機能改善効果 の低下が認められたのに対し、純化された CD34 陽性細胞のみ を移植した場合には、これらの副反応は認められず、高い血管 再生効果と心機能保持効果が得られることを確認した¹⁶。さら に、Masuda らが確立した in vitro における EPC colony-forming assay 法では、CD34 陽性細胞からは高頻度に EPC コロニーが 形成される一方、単核球中の CD34 陰性細胞からは、細胞数を 100 倍に増加させてもコロニーが得られず、EPC 分画と非 EPC 分画の間で血管発生能力に顕著な差があることを確認してい る²⁵。これらの基礎・前臨床研究の結果から、BMMC・PBMC



図7 治験に用いる CD34 陽性細胞の製造: 医療機器(磁気細胞分離装置)治験 と再生医療等製品(CD34 陽性細胞)治験。 GCTP: Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice

移植と比べて純化 EPC 移植は、低侵襲性で治療効果・安全性の面で優れるものと考えられる。

3 臨床研究

3.1 EPC の生理学的重要性

糖尿病の症例や動脈硬化危険因子を多数保有する症例では、健 常者と比べて循環血中の EPC 数が少なく、かつその増殖能・ 遊走能なども低いことが報告されている^{26,27}。また、循環血中 の EPC 数の少ない動脈硬化患者は心血管系の予後不良因子を 多数保有しており、血管内皮機能も低下していることが報告さ れている²⁸。つまり、EPC は動脈硬化患者の予後を規定しうる 重要な内因性因子の1つであることが判明してきた。

3.2 CLI に対する血管再生療法の第 I/IIa 相臨床試験

前臨床試験の結果を踏まえ、筆者らは 2003 年から「慢性重症 下肢虚血患者に対する自家末梢血血管内皮前駆細胞 (CD34 陽 性細胞)移植による血管再生治療に関する第 I/IIa 相試験」を 実施した⁷。17 例の CLI 患者 (ASO 5 例 [うち 1 例は血液透析 導入患者]、バージャー病 12 例)を対象に、G-CSF 製剤を 5 日 間投与して骨髄から末梢血に動員された単核球をアフェレシ スで高効率に採取し、さらに磁気細胞分離装置(CliniMACS[®]) を用いて高純度の CD34 陽性細胞を分離した(図3、4)。分 離された CD34 陽性細胞は、純度が平均 92%、生存率が平均 87%という高品質を示し、腰椎麻酔下で虚血下肢筋肉内へ移 植された(図4)。全症例で治療後1年以内の死亡・下肢大切 断は発生せず、自立歩行機能を温存することができた。また、 潰瘍・壊死の治癒、虚血性疼痛の改善、生理検査指標(足趾・ 上腕血圧比(TBI))、経皮的酸素分圧[TcPO₂]などの経時的 な改善も認められ、CLIからの離脱率は治療後1年で 88%で あった²⁹。また、治療後4年に及ぶ長期成績についても検討し た。死亡は移植後2年までは発生せず、移植後2年以降に4 例が心疾患により死亡したが、本細胞治療との関連は否定され た。下肢大切断は発生しなかった。CLIからの離脱率は 80% 以上の高率を維持した(図5)。TBI は治療後4年、TcPO2は 治療後3年まで、治療前と比較して有意な改善を示した²⁹。

また、米国においては 2007 年から Losordo らにより、ASO による CLI 患者 28 例を対象として、G-CSF 動員 CD34 陽性細 胞移植に関する多施設共同ランダム化二重盲検プラセボ対照 試験 (ACT34-CLI 試験) が行われた ³⁰。CD34 陽性細胞移植群 ではプラセボ対照群に比較して、治療後 6 か月、1 年における 下肢大切断・小切断率が低い傾向を認め(それぞれ P = 0.125、 P = 0.054)、また、治療後 1 年までの観察期間で細胞治療に 関連する有害事象は発生しなかった。

3.3 CD34 陽性細胞分離装置に関する医師主導治験

上記の初期臨床試験に引き続き、筆者らは CD34 陽性細胞分 離装置「Isolex[®]」の薬事承認をめざし、2008 年より医療機器 GCP に準拠した医師主導治験を 11 例の CLI 患者 (バージャー 病 7 例、ASO 4 例、ただし透析患者は除外した) に対して開 始し、2012 年 3 月に終了した。この探索的な第 II 相試験は、 再生医療領域における国内初の医師主導治験であり、今日に至 るまで日本で実施された細胞移植による下肢血管再生療法に 関する臨床試験のうち、GCP にもとづきデータの信頼性が担 保された唯一の試験である。この医師主導治験においても、前 述の第 I/IIa 相試験での良好な安全性・有効性がほぼ再現され ていた。また、臨床的重症度、安静時疼痛、血流改善指標およ び歩行検査に加え、QOL 指標を含めた数多くの自他覚的所見 について、頻回の観察時点を設定して探索的に評価した結果、 CD34 陽性細胞の移植後早期に安静時疼痛が改善し、その後、 生理学的検査所見の改善が確認され、約半年後に臨床的重症 度の指標である Rutherford 分類の改善に至ることが明らかと なった(図 6)⁸。

3.4 CD34 陽性細胞の再生医療等製品としての薬事承認をめざ した企業治験

第 I/IIa 相臨床試験および探索的医療機器医師主導治験の良好 な結果を踏まえ、筆者らは G-CSF 動員自家 CD34 陽性細胞を 用いた下肢血管再生療法の標準治療化をめざしている。筆者ら が探索的医師主導治験を開始した 2008 年当時、薬事承認申請 の主体となる企業は、CD34 陽性細胞分離装置を医療機器とし て開発することをめざしていたが、治験終了後に、CD34 陽性 細胞を細胞医薬品として開発する方針に変更した。

医療機器として開発する場合、各医療機関に CD34 陽性細胞 分離装置を設置し、医療機関内で G-CSF 投与からアフェレシ ス、CD34 陽性細胞分離および細胞移植までの全過程を完結で きる。すなわち、院内製造的なプロセスとなる(図7)。一方、 細胞医薬品として開発する場合、各医療機関で G-CSF 投与お よびアフェレシスを実施した後、アフェレシス産物が外部の細 胞製造施設(CPC)へ輸送される。CPC で CD34 陽性細胞の分 離が行われた後、分離された CD34 陽性細胞が各医療機関へ輸 送され、移植(治療)が行われる(図7)。細胞医薬品として 開発する際の利点としては、まず、本医療技術の普及に有利と いう点があげられる(各医療機関に細胞分離装置を設置する必 要がなく、細胞分離操作に熟練した技術者を雇用する必要もな いため)。もう1つの利点は、より高品質な製品を安定供給で きることである(一般の医療機関に比べて CPC では、高度に 管理された環境下で、熟練した技術者が細胞製造を行うため)。 一方、難点としては、1回の製造コストが高額となることがあ げられる。

開発企業の計画変更により、細胞製造業務は神戸医療産業 都市推進機構が受託した。「再生医療等製品の製造管理及び品 質管理の基準に関する省令」(Good Gene, Cellular, and Tissuebased Products Manufacturing Practice:GCTP)にもとづき、 構造施設規則ならびに細胞製造管理および品質基準を遵守し て、治験準備を開始した。その後、2013年に薬事法が改正さ れ、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等 に関する法律(医薬品医療機器等法)」が制定されて、医薬品 や医療機器とは別に、「再生医療等製品」という新しい審査対 象カテゴリーが導入された。法改正に伴う対応については、医 薬品医療機器総合機構(PMDA)と相談の結果、本開発のカテ ゴリーを医薬品から再生医療等製品に変更することにした。そ の後、PMDAとの治験相談を繰り返した結果、次期企業治験 は、CD34 陽性細胞の再生医療等製品としての薬事承認をめざ した、多施設共同ランダム化比較試験として施行する運びと なった。本治験は、再生医療等製品のカテゴリーの下、2017 年 12 月より開始し、同月 1 例目の患者が組み入れられ、現在 進行中である。2018 年 3 月には、厚生労働省より、本再生医 療等製品が先駆け審査指定制度の対象品目に指定された。先駆 け審査指定制度とは、対象疾患の重篤性、世界に先駆けた国内 での開発など、一定の要件を満たす画期的な医療機器・医薬 品・再生医療等製品を指定し、承認に係る相談・審査において 優先的な取り扱いをすることで、承認審査期間を短縮すること を目的とするものである。

4. 今後の展望

CD34 陽性細胞治療については、CLI以外にも、治療抵抗性狭 心症^{31~34}、急性心筋梗塞^{35,36}、拡張型心筋症^{37~42}、脳梗塞⁴³ などの虚血性疾患、さらには難治性骨折⁴⁴や肝硬変⁴⁵を対象 にした臨床試験が行われ、その有効性および安全性が報告され つつある。CD34 陽性細胞が再生医療等製品として薬事承認さ れれば、CLI 以外の疾患に対する将来の適応拡大への布石とな ることが大いに期待される。

文献

- Fowkes, F. G., Rudan, D., Rudan, I., Aboyans, V., Denenberg, J. O. *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 382, 1329–1340 (2013).
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A. *et al.* Intersociety consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J. Vasc. Surg.* 45, S5–S67 (2007).
- Aboyans, V., Ricco, J.-B., Bartelink, M.-L. E. L., Björck, M., Brodmann, M. *et al.* 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 55, 305–368 (2018).
- Sprengers, R. W., Moll, F. L. & Verhaar, M. C. Stem cell therapy in PAD. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 39, S38–S43 (2010).
- Fadini, G. P., Agostini, C. & Avogaro, A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 209, 10–17 (2010).
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–966 (1997).
- Kawamoto, A., Katayama, M., Handa, N., Kinoshita, M., Takano, H. *et al.* Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in patients with critical limb ischemia: A phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 27, 2857–2864 (2009).
- Fujita, Y., Kinoshita, M., Furukawa, Y., Nagano, T., Hashimoto, H. *et al.* Phase II clinical trial of CD34+ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ. J.* 78, 490–501 (2014).
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M. *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002–5012 (1997).

- Gehling, U. M., Ergün, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K. *et al.* In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106–3112 (2000).
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M. *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434–438 (1999).
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C. *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221–228 (1999).
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3422–3427 (2000).
- Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K. *et al.* Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* **105**, 1527–1536 (2000).
- Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S. *et al.* Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circ.* **103**, 634–637 (2001).
- Kawamoto, A., Iwasaki, H., Kusano, K., Murayama, T., Oyamada, A. *et al.* CD34positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circ.* 114, 2163–2169 (2006).
- Taguchi, A., Soma, T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H. *et al.* Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* **114**, 330–338 (2004).
- Fukui, T., Mifune, Y., Matsumoto, T., Shoji, T., Kawakami, Y. *et al.* Superior potential of CD34-positive cells compared to total mononuclear cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Trans.* 24, 1379–1393 (2015).
- Li, M., Nishimura, H., Iwakura, A., Wecker, A., Eaton, E. *et al.* Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circ.* 111, 1114–1120 (2005).
- Jujo, K., li, M. & Losordo, D. W. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. J. Mol. Cell Cardiol. 45, 530–544 (2008).
- Miyamoto, Y., Suyama, T., Yashita, T., Akimaru, H. & Kurata, H. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 43, 627–635 (2007).
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659 (2007).
- Sahoo, S., Klychko, E., Thorne, T., Misener, S., Schultz, K. M. *et al.* Exosomes from human CD34⁺ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ. Res.* 109, 724–728 (2011).
- Yoon, Y.-S., Park, J.-S., Tkebuchava, T., Luedeman, C. & Losordo, D. W. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circ.* 109, 3154–3157 (2004).
- Masuda, H., Alev, C., Akimaru, H., Ito, R., Shizuno, T. *et al.* Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circ. Res.* **109**, 20–37 (2011).
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C. *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* 89, E1–E7 (2001).
- Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Kalka, C., Gagne, P. J. *et al.* Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circ.* **106**, 2781–2786 (2002).
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Wacławiw, M. A. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New Engl. J. Med.* 348, 593–600 (2003).
- Kinoshita, M., Fujita, Y., Katayama, M., Baba, R., Shibakawa, M. *et al.* Longterm clinical outcome after intramuscular transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34 positive cells in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis* 224, 440–445 (2012).
- Losordo, D. W., Kibbe, M. R., Mendelsohn, F., Marston, W., Driver, V. R. et al. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34⁺ cell therapy for critical limb ischemia. Circ. Cardiovasc. Interv. 5, 821–830 (2012).
- Povsic, T. J., Henry, T. D., Traverse, J. H., Fortuin, F. D., Schaer, G. L. *et al.* The RENEW Trial: Efficacy and safety of intramyocardial autologous CD34⁺ cell administration in patients with refractory angina. *JACC Cardiovasc. Interv.* 9, 1576–1585 (2016).
- Losordo, D. W., Schatz, R. A., White, C. J., Udelson, J. E., Veereshwarayya, V. et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circ.* 115, 3165–3172 (2007).
- Losordo, D. W., Henry, T. D., Davidson, C., Sup Lee, J., Costa, M. A. *et al.* Intramyocardial, autologous CD34⁺ cell therapy for refractory angina. *Circ. Res.* 109, 428–436 (2011).

- 34. Henry, T. D., Losordo, D. W., Traverse, J. H., Schatz, R. A., Jolicoeur, E. M. *et al.* Autologous CD34⁺ cell therapy improves exercise capacity, angina frequency and reduces mortality in no-option refractory angina: a patient-level pooled analysis of randomized double-blinded trials. *Eur. Heart J.* **39**, 2208–2216 (2018).
- 35. Quyyumi, A. A., Waller, E. K., Murrow, J., Esteves, F., Galt, J. *et al.* CD34⁺ cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *Am. Heart J.* **161**, 98–105 (2011).
- 36. Quyyumi, A. A., Vasquez, A., Kereiakes, D. J., Klapholz, M., Schaer, G. L. *et al.* PreSERVE-AMI: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of intracoronary administration of autologous CD34⁺ cells in patients with left ventricular dysfunction post STEMI. *Circ. Res.* **120**, 324–331 (2017).
- Vrtovec, B., Poglajen, G., Sever, M., Lezaic, L., Domanovic, D. et al. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. J. Card. Fail. 17, 272–281 (2011).
- Vrtovec, B., Poglajen, G., Lezaic, L., Sever, M., Socan, A. *et al.* Comparison of transendocardial and intracoronary CD34⁺ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ.* 128, S42–S49 (2013).
- Vrtovec, B., Poglajen, G., Lezaic, L., Sever, M., Domanovic, D. *et al.* Effects of intracoronary CD34^{*} stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ. Res.* **112**, 165–173 (2013).
- Lezaic, L., Socan, A., Poglajen, G., Peitl, P. K., Sever, M. et al. Intracoronary transplantation of CD34⁺ cells is associated with improved myocardial perfusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. J. Card. Fail. 21, 145–152 (2015).
- Frljak, S., Jaklic, M., Zemljic, G., Cerar, A., Poglajen, G. *et al.* CD34^{*} cell transplantation improves right ventricular function in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Stem Cells Transl. Med.* **7**, 168–172 (2018).
- Bervar, M., Kozelj, M., Poglajen, G., Sever, M., Zemljic, G. et al. Effects of transendocardial CD34^{*} cell transplantation on diastolic parameters in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1515–1521 (2017).
- Banerjee, S., Bentley, P., Hamady, M., Marley, S., Davis, J. *et al.* Intra-arterial immunoselected CD34⁺ stem cells for acute ischemic stroke. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 1322–1330 (2014).
- 44. Kuroda, R., Matsumoto, T., Niikura, T., Kawakami, Y., Fukui, T. et al. Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34⁺ cells for patients with femoral and tibial nonunion: pilot clinical trial. Stem Cells Transl. Med. 3, 128–134 (2014).
- 45. Nakamura, T., Torimura, T., Iwamoto, H., Kurogi, J., Inoue, H. *et al.* CD34⁺ cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 1830–1838 (2014).

下肢難治性骨折に対する自家末梢血 CD34 陽性細胞の移植



黒田 良祐、松本 知之、新倉 隆宏 神戸大学大学院医学研究科整形外科学

骨折の約5~10%は従来の治療法では治癒しない。幹細胞療法が、そのような症例の治療法として期待されているが、間葉系幹細胞を用いた場合の治療成績は満足のいくものではない。公益財団法人神戸医療産業都市推進機構医療イノベーション推進センター (TRI)に関連した研究者は、難治性骨折(偽関節)患者を対象とした自家末梢血CD34 陽性細胞移植の第1/II相臨床試験を実施し、その有効性と安全性を報告している。

1. はじめに

胚性幹細胞(ES 細胞)、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の研究により、近年、再生医療 の分野は目覚ましい発展を遂げている。一方で、これらの多能性細胞は、倫理上の問題 や細胞のがん化の問題などを含んでおり、臨床応用を困難にしている。そこで、器官形 成や組織再生の研究において中心的な役割を果たしてきたのが、体性幹細胞を用いた研 究である。現在、骨髄あるいは滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨の再生が整形 外科領域で注目されており、すでに臨床応用が実現している。しかし、骨髄採取の侵襲 性、細胞培養技術の難しさや培養に時間を要するという問題があり、また、治療の効果 も限定的なものであった。そこで、より低侵襲で、より効果的な治療法の開発が必要と されている。

血管研究は、血管疾患の病態解明・治療法確立のために展開されてきた。この分野に おけるこれまでの研究の歩みは、例えば腫瘍学や血液学、あるいは神経学などと比べれ ば、必ずしも最先端の科学レベルで進んできたものとはいえなかった。しかし、最近に なって、血管研究は大きく進展し、血液学や発生学などの流れを取り入れながら、血管 形成における分化メカニズムを詳細に明らかにするという、新たな研究領域が切り開か れている。また、今や医療の主流の一部をなす再生医療の分野において、さまざまな幹 細胞を用いた器官形成や組織再生の研究が推し進められているが、再生された器官や組 織を養う血管系がいかに再構築されていくかについては不明な点が多い。したがって、 今後、血管形成は再生医療の発展において中心的な役割を果たす可能性がある。1997年 に浅原ら¹がヒト末梢血から血管内皮前駆細胞(EPC)を発見して以来、従来の既存血 管内皮細胞の再形成(angiogenesis)のほかに、EPCからの血管発生(vasculogenesis) のメカニズムが関与していることが明らかとなり、現在では下肢虚血や虚血性心疾患の

要旨

近年整形外科領域におい て、骨髄間葉系幹細胞の臨 床応用をはじめ、難治性疾患 に対する再生医療が注目さ れている。その一方で、血管 研究においては血管形成に おける詳細な分化メカニズ ムの研究が新たな潮流を作 り出し、整形外科領域への応 用が期待されている。骨折治 癒過程と血管形成に密接な 関係があることは周知の事 実であり、我々は成体の血管 内皮前駆細胞と骨折治癒過 程・骨折治癒能につき、多く の in vitro/in vivo の実験を 通じて、その臨床応用に関す る有用性を示唆する知見を 集積してきた。それらの成果 をもとに第 I/II 相臨床試験 として、難治性骨折患者に対 する自家末梢血 CD34 陽性 細胞移植を試み、有効性と 安全性の確認を行った。有効 性が証明され、難治性骨折・ 偽関節で苦しむ多くの人々 に新たな光明がもたらされ、 福音となることを期待する。

責任著者

黒田 良祐 E-mail: kurodar@med.kobe-u.ac.jp Α

в

観察期間 (週)	CD34陽性細胞 骨癒合率(%	2群 単6) 骨:	核球細胞群 癒合率(%)	PBS 群 骨癒合率 (%)
2	0/15 (0)		0/15 (0)	0/15 (0)
4	8/12 (66)		0/12 (0)	0/12 (0)
8	9/9 (100)		0/9 (0)	0/9 (0)
観察期間	G-CSF	PBS 群 骨癒合率		
()(22)	105	104	103	(%)
	10-	10	103	(,
2	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)
2	0/12 (0) 3/9 (33)	0/12 (0)	0/12 (0) 0/9 (0)	0/12 (0) 0/9 (0)

表1 ヒト末梢血 CD34 陽性細胞のヌードラットモデルへの移植による骨折治癒 (非臨床基礎研究)。



図1 骨折治癒における末梢血 CD34 陽性細胞の動態。経静脈移植されたヒト末 梢血 CD34 陽性細胞は骨折部に集積し、骨折部において血管発生のみならず骨新 生を通じて骨折治癒に適正な環境を誘導し、骨折治癒に貢献することが明らか になった。

血管再生療法として臨床に用いられるようになってきている ^{2.3}。整形外科領域においても、以前より特に骨再生における血 管形成の重要性が指摘されており、血管医学は欠かせない分野 となってきているといえる。

本稿では骨折治療において大きな可能性を秘めている EPC/ 末梢血 CD34 陽性細胞の生体内動態、EPC/ 末梢血 CD34 陽性 細胞を用いた骨・血管再生療法に関する基礎研究、前臨床試 験、第 I/II 相臨床試験につき概説する。

2. 血管新生と血管再生

血管新生増殖因子 (angiogenic growth factor) とその治療応用 の概念が初めて確立されたのは、Moses Judah Folkman によっ てである。彼はさらに、がんの発育浸潤のプロセスとして、血 管新生を招く増殖因子の発現を解明した。そして、増殖因子の 働きにより、既存の近傍血管から血管内皮細胞を増殖・遊走さ せ、新たな血管を作り出す過程を「血管新生 (angiogenesis)」 と定義した⁴。近年、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)をはじめとする数々の増殖因子が発見 され、血管新生促進療法が奏効しない症例も存在し、そのような 症例では、虚血部位における既存の血管内皮細胞の血管増殖因 子に対する反応性が低下している可能性が考えられた。そこ で、反応性に富む血管内皮細胞を虚血部に供給することが次の 課題であった。

1997年に浅原らは、EPC が成体の循環血液中に存在し、重

症虚血部位の血管形成に関与することを報告した¹。そしてこ の機序は、胎児期のみに存在すると考えられていた血管発生 (vasculogenesis) に一致することがわかった。つまり、血管 内皮前駆細胞が未分化のまま局所にたどりつき、定着、増殖、 分化することにより、新たな血管が構築されるという過程で ある。それまでは、成体における血管形成の過程は、既存隣 接血管の血管内皮細胞による増殖、遊走により成立する血管 新生(angiogenesis)によるものと考えられていたのだが、そ れとは異なる新たな概念が生み出されたのである。さらに、血 管内皮系細胞に特異的な遺伝子(Flk-1、Tie-2)が発現すると β- ガラクトシダーゼを発現するようにしたトランスジェニッ クマウスの骨髄移植モデルにおいて、虚血、がん、創傷治癒、 あるいは子宮、卵巣の血管形成を誘発すると、ドナー骨髄由来 の Flk-1 あるいは Tie-2 を発現している細胞が新たな血管を構 成していることが示された 5.6。つまり、成体においても胎生期 と同様に、血管新生と血管発生の両方の機序を介して血管形成 が成立していることがわかってきたのである。これ以後、成体 の新規血管形成は、血管新生と血管発生の相互作用によるもの と考えられるようになった。

3. 末梢血 EPC/CD34 陽性細胞による骨折治癒

通常、骨折は解剖学的整復と強固な固定により治癒に至る。し かし、骨折の5~10%は骨癒合不全の状態に陥り(難治性骨 折/偽関節)、それは、骨折部に適切な血行が得られないこと が一因と考えられている。自家遊離海綿骨移植、さらには血行

						骨癒合	骨癒合に要した期間	
症例	性別	年齢	骨折のタイプ	解剖学的部位	外科的介入	臨床的 (週)	X 線学的 (週)	
1	男性	41	皮下骨折、骨萎縮型	脛骨骨幹部	1. ORIF 2. Cell + ABG	12	12	
2	女性	38	Grade III A、骨萎縮型	大腿骨骨幹部	1. ORIF 2. Cell + ABG	12	19	
3	男性	31	皮下骨折、骨萎縮型	大腿骨転子部	1. IMN 2. 髄内釘交換、Cell + ABG	24	38	
4	男性	34	Grade II 、骨萎縮型	脛骨骨幹部	1. ORIF 2. Cell + ABG	12	12	
5	男性	28	Grade II 、肥厚性	脛骨骨幹部	1. IMN 2. Dynamization 3. 髄内釘交換 4. Dynamization 5. 髄内釘交換、Cell + ABG	12	12	
6	男性	20	Grade III B、骨欠損型	脛骨骨幹部	1. IMN 2. Cell + ABG	8	8	
7	男性	45	皮下骨折、骨欠損型	脛骨高原部	1. ORIF 2. プレート交換、Cell + ABG	8	12	

表2 第1/II相臨床試験における各症例の臨床的・X線学的転帰。

ABG:自家骨移植、Cell:自家末梢血 CD34 陽性細胞移植、IMN:髄内釘固定、ORIF:観血的整復内固定

再建を重視して血管柄付骨移植を行うこともあるが、治癒に難 渋することも少なくない。そこで我々は、EPC を用いた細胞治 療による新規血管形成に注目し、難治性骨折に対するその有効 性を、基礎実験を通じて前臨床試験的に確認することとした。

まず予備実験として、骨折治癒過程における EPC の生体内 動態を、マウス閉鎖性骨折モデルを作製して、蛍光活性化セ ルソーティング (FACS)を用いて解析した。その結果、骨折 後に骨髄中、末梢血中で EPC が増加していることが明らかに なった。次に骨髄の EPC が局所で血管内皮細胞に分化するこ とを確認するため、Tie2/LacZ トランスジェニックマウスの骨 髄移植モデルにおいて、Sca1 と CD31 の二重免疫染色を行っ たところ、骨折部において骨髄由来の EPC が血管内皮細胞に 分化することが確認された。これらの結果から、EPC は、骨 折後に骨髄から末梢血に動員され、骨折部で骨折治癒に貢献す ることが明らかとなった⁷。さらに他の研究グループからも、 ヒト骨折において EPC が動員されること⁸、ラット distraction osteogenesis モデルにおいて EPC が骨延長部へ動員されるこ と⁹が報告され、我々の報告を支持している。

末梢血細胞による血管再生が可能となった現在、血管内皮細胞に分化するヒト末梢血 CD34 陽性細胞が骨再生を促進すると考えるのが合理的である。そこで、我々は健常人から得られた末梢血 CD34 陽性細胞(10⁵個)のヌードラット難治性骨折

モデルへの経静脈移植を試み、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞が骨 折部に集積し、骨折部において血管発生のみならず骨新生を通 じて骨折治癒に適正な環境を誘導し、骨折治癒に貢献すること を明らかにした(図1)¹⁰。経時的なX線学的・組織学的評価 では、術後8週目に対照群(リン酸緩衝生理食塩水〔PBS〕群 およびヒト単核球細胞移植群〕では偽関節に移行しているのに 対し、CD34 陽性細胞群では4週目で66%、8週目には全例 で骨癒合が得られた(表1A)。3点曲げ試験による力学的評価 では、対照群と比較して CD34 陽性細胞群では有意に高い強度 をもつ機能的骨折治癒が証明された。

蛍光標識した CD34 陽性細胞は、骨折部に選択的に集積し、 ラット由来の内皮細胞や骨芽細胞と共同して骨折部での血管 再生および骨再生に寄与していた。移植 2 週後には、ヒト由 来の成熟血管内皮細胞と骨芽細胞が骨折部で組織学的・分子 生物学的に認められ、CD34 陽性細胞が標的部位で成熟血管内 皮細胞および骨芽細胞に分化することが証明された。さらに、 single cell RT-PCR 解析により、分離直後の CD34 陽性細胞の 約 20%は骨芽細胞特異的マーカーとされるオステオカルシン を共発現していることが明らかになり、ヒト CD34 陽性細胞は ラット細胞との細胞融合を経ることなく直接、骨芽細胞に分化 するものと考えられた。移植 2 週後のラットの骨折部での免 疫染色による微小血管密度、骨芽細胞様細胞密度の定量評価に

	CD34 陽性細胞	Historical control
症例数	7	11
性別(男性 / 女性)	6/1	9/2
年齢	34 (20–45)	37 (21–56)
大腿骨 / 脛骨	2/5	4/7
術後 12 週での骨癒合率	5/7 (71.4%)	2/11 (18.1%)
骨癒合に要した期間(週)	16.1 (8-38)	29.1 (12-44)

表3 第1/II 相試験と historical control の比較。

おいて、CD34 陽性細胞群の骨折部における血管新生および骨 新生は、対照群と比較して有意に亢進していた。RT-PCR 解析 により骨折部でヒト由来の VEGF などの血管新生因子が同定 できたことから、CD34 陽性細胞が局所でパラクリンの役割を 担っているものと考えられた。さらに、VEGF のアンタゴニス トである可溶型 Flt1 の投与により、血管新生だけでなく骨新 生も抑制されたことから、CD34 陽性細胞による骨折治癒過程 には血管新生が中心的な役割を果たしていることが明らかに なった。

次に我々は臨床応用を想定して、局所移植されたヒト末梢血 CD34 陽性細胞が、骨折部において血管発生のみならず骨新生 を通じて骨折治癒に適正な環境を誘導し、用量依存的に骨折治 癒に貢献することを確認した11。まず、末梢血顆粒球コロニー 刺激因子(G-CSF)動員 CD34 陽性細胞を、同じ動物モデルの 骨折部(担体としてアテロコラーゲンを使用)に移植した。移 植する細胞数は、上述の静脈内移植時の効果を参考にした。経 時的なX線学的・組織学的評価において、105群では4週目で 33%、8週目には全例で骨癒合が得られ、10⁴ 群では4週目で 11%、8週目で33%の骨癒合が得られたが、10³群、PBS群で は骨癒合はみられなかった(表 1B)。移植2週後の骨折部での 免疫染色による微小血管密度、骨芽細胞様細胞密度の定量評価 において、骨折部における血管新生および骨新生は、10⁴群、 10⁵ 群では 10³ 群、PBS 群と比較して用量依存的に亢進してい た。これらの結果から、難治性骨折治療の新たな選択肢の1つ として、末梢血 CD34 陽性細胞の局所移植が有効であることが 示された。

さらに、CD34 陽性細胞の単核球細胞に対する優位性を確認 するため、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞あるいは単核球細胞を ヌードラット難治性骨折モデルの骨折部に移植し、その効果を 比較検討した。その結果、10⁷個の単核球細胞を移植した群で も、血管発生のみならず骨新生を通じて骨折治癒に適正な環境 を誘導し、骨折治癒に貢献することが確認されたが、その有効 性は10⁵個のCD34陽性細胞を移植した群と比較して、ラット の微小血管密度、骨芽細胞様細胞密度、ヒト由来の成熟血管内 皮細胞密度、骨芽細胞密度、X線学的・組織学的・力学的評価 のいずれにおいても有意に劣っていた¹²。さらに、CD34陽性細 胞および単核球細胞の移植効果を、難治性骨折モデルのみなら ず、確立した偽関節モデルにおいても確認した¹³。単核球細胞 移植群では、CD34陽性細胞移植群と比較して炎症性細胞の浸 潤が多くみられ、結果の一因となっているものと考えられた。

EPC が関与する骨折治癒の機序をさらに解明していくこと は、さらなる治療効果の向上につながるものと考えられる。そ こで我々は、G-CSF¹⁴、シンバスタチン¹⁵の局所徐放による骨 折部への EPC 動員の治癒効果、SCF/c-Kit シグナルを介した細 胞外アダプタータンパク質 Lnk^{16.17}、SDF-1/CXCR4 シグナル¹⁸ による EPC 動員の治癒効果につき検討し、それぞれが EPC の 骨折治癒に密接に関連していることを確認した。

4. 臨床試験:末梢血 CD34 陽性細胞移植による骨・血管再生 療法

上述した基礎研究の成果を踏まえ、「ヒト幹細胞臨床研究に関 する審査委員会」の2009年9月4日付承認にもとづき、「難 治性骨折(偽関節)患者を対象とした自家末梢血CD34陽性細 胞移植による骨・血管再生療法に関する第I/II相試験」を実施 した。自家末梢血CD34陽性細胞移植による骨・血管再生療法 は、骨折部での未分化な状態での増殖とその後の分化の過程を 経て、骨を再生しうるだけでなく、まったく新たな血管を再生 しうる点で、従来の治療法と比較して利点があると考えられる。

被験者の適格基準としては、大腿骨(2例)または脛骨(5 例)の非感染性偽関節患者で、同意取得時の年齢が20歳以上 70歳未満であり、本人から文書による同意が得られている患 者とした。試験の流れとしては、まず文書による同意が得られ てからスクリーニング検査・症例検討会・適格性判定を行い、 そのうえで登録する。CD34 陽性細胞の分離、偽関節手術、細 胞移植は神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センターで 実施し、その後、神戸大学医学部附属病院に転院させて観察を 行った。

まず G-CSF を皮下注射(5 日間)して、CD34 陽性細胞を末



図2 臨床試験の概要。G-CSFを皮下注射して CD34 陽性細胞を末梢血中に動員し、アフェレシスにより単核球細胞を採取した後に CD34 陽性細胞を磁気分離する。 6 日目に偽関節手術(自家骨移植に加え、必要に応じて内固定の改善を行う)とともに、5 × 10⁵ 個 /kg の自家末梢血 CD34 陽性細胞をアテロコラーゲンを担体とし て移植する。 G-CSF: 顆粒球コロニー刺激因子

梢血中に動員。アフェレシスにより単核球細胞を採取し、その後に、CD34 陽性細胞を磁気分離する。治療は、6 日目に偽関節手術(自家骨移植に加え、必要に応じて内固定の改善を行う)とともに、5 × 10⁵ 個 /kgの自家末梢血 CD34 陽性細胞をアテロコラーゲンを担体として移植する(図 2)。主要評価項目は、安全性および術後 12 週での X 線学的骨折治癒の有無とした。

1 症例目の脛骨偽関節患者に関して、本治療の有効性と安全 性を報告した¹⁹。術後平均12.6 週には臨床的骨癒合が得られ、 術後平均16.1 週でX線学的骨癒合が得られた(表 2)²⁰。主 要評価項目である術後12 週でのX線学的骨癒合率は71.4% であった。historical control として設定した、同施設内で骨 移植を併用して治療を行った大腿骨または脛骨の偽関節患者 11 例の治癒率は18.1%であり、本治療の有効性が示された (表 3)²⁰。術後1年での安全性評価においても、重篤な有害 事象はみられなかった。

5. 今後の展望

これまでに述べてきた EPC/CD34 陽性細胞の骨折治癒におけ る意義と有効性は他の研究グループからも注目され、近年、基 礎研究成果が集積されつつある。EPC の末梢血への動員効果 は、ラット脛骨骨延長モデル²¹、マウス大腿骨骨折モデル²²、さ らにはヒトの脛骨・長管骨骨折^{8,9}においても報告されている。 また、EPC/CD34 陽性細胞の骨折治癒効果については、我々が 報告してきた免疫不全ラット難治性骨折モデル^{10~12}、免疫不 全ラット偽関節モデル¹³ やラット大腿骨骨欠損モデル²³²⁴ だ けでなく、ヒツジ脛骨骨欠損モデル²⁵ においても報告されて いる。このように、近年ますます EPC/CD34 陽性細胞の重要 性が認識されつつあるのである^{26~29}。

第 I / II 相臨床試験により、偽関節患者に対する本治療の有効 性と安全性が示された。最終目的である医療技術としての定着・ 普及をめざすためには、より多数の症例を対象に、多施設共同 医師主導治験を行うことが必要である。偽関節に対するまった く新しい治療法である末梢血 CD34 陽性細胞移植は、すでに動 物実験・初期臨床試験で高い有効性と安全性が示されており、 今後の幅広い臨床適用においても高い効果が期待されている。

文献

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–966 (1997).
- Kawamoto, A., Katayama, M., Handa, N., Kinoshita, M., Takano, H. *et al.* Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 27, 2857–2864 (2009).
- Losordo, D. W., Schatz, R. A., White, C. J., Udelson, J. E., Veereshwarayya, V. et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circ.* 115, 3165–3172 (2007).
- 4. Folkman, J. & Klagsbrun, M. Angiogenic factors. Science 235, 442-447 (1987).
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C. *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221–228 (1999).
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D. Silver, M. *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Med.* 5, 434–438 (1999).
- Matsumoto, T., Mifune, Y., Kawamoto, A., Kuroda, R., Shoji, T. *et al.* Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J. Cell. Physiol.* 215, 234–242 (2008).
- Laing, A. J., Dillon, J. P., Condon, E. T., Street, J. T., Wang, J. H. *et al.* Mobilization of endothelial precursor cells: Systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *J. Orthop. Res.* 25, 44–50 (2007).

- Lee, D. Y., Cho, T.-J. Lee, H. R., Park, M. S., Yoo, W. J. *et al.* Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. *Bone* 46, 673–679 (2010).
- Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R., Ishikawa, M., Mifune, Y. *et al.* Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34positive cells for functional bone healing. *Am. J. Pathol.* 169, 1440–1457 (2006).
- Mifune, Y., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R., Shoji, T. *et al.* Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture. *Stem Cells* 26, 1395–1405 (2008).
- Fukui, T., Matsumoto, T., Mifune, Y., Shoji, T., Kuroda, T. *et al.* Local transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized human peripheral blood mononuclear cells for unhealing bone fractures. *Cell Transplant.* **21**, 707–721 (2012).
- Fukui, T., Mifune, Y., Matsumoto, T., Shoji, T., Kawakami, Y. *et al.* Superior potential of CD34-positive cells compared to total mononuclear cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Transplant.* 24, 1379–1393 (2015).
- Ishida, K., Matsumoto, T., Sasaki, K., Mifune, Y., Tei, K. *et al.* Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis. *Tissue Eng.* 16, 3271–3284 (2010).
- Fukui, T., Ii, M., Shoji, T., Matsumoto, T., Mifune, Y. *et al.* Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J. Bone Min. Res.* 27, 1118–1131 (2012).
- Matsumoto, T., Ii, M., Nishimura, H., Shoji, T., Mifune, Y. *et al.* Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. *J. Exp. Med.* 207, 2207–2223 (2010).
- Kawakami, Y., Ii, M., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kuroda, R. *et al.* A small interfering RNA targeting Lnk accelerates bone fracture healing with early neovascularization. *Lab. Invest.* **93**, 1036–1053 (2013).
- Kawakami, Y., Ii, M., Matsumoto, T., Kuroda, R., Kuroda, T. *et al.* SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 95–105 (2015).
- Kuroda, R., Matsumoto, T., Miwa, M., Kawamoto, A., Mifune, Y. *et al.* Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34⁺ cells in a patient with tibial nonunion: a case report. *Cell Transplant.* 20, 1491–1496 (2011).
- Kuroda, R., Matsumoto, T., Niikura, T., Kawakami, Y., Fukui, T. *et al.* Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34⁺ cells for patients with femoral and tibial nonunion: Pilot clinical trial. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 128–134 (2014).
- Cetrulo, C. L., Knox, K. R., Brown, D. J., Ashinoff, R. L., Dobryansky, M. et al. Stem cells and distraction osteogenesis: Endothelial progenitor cells home to the ischemic generate in activation and consolidation. *Plast. Reconstr. Surg.* 116, 1053–1064 (2005).
- Laing, A. J., Dillon, J. P., Condon, E. T., Coffey, J. C., Street, J. T. *et al.* A systemic provascular response in bone marrow to musculoskeletal trauma in mice. *J. Bone Joint Surg.* 89B, 116–120 (2007).
- Atesok, K., Li, R., Stewart, D. J. & Schemitsch, E. H. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J. Orthop. Res.* 28, 1007–1014 (2010).
- Ma, X.-L., Sun, X.-L., Wan, C.-Y., Ma, J.-X. & Tian, P. Significance of circulating endothelial progenitor cells in patients with fracture healing process. *J. Orthop. Res.* 30, 1860–1866 (2012).
- Rozen, N., Bick, T., Bajayo, A., Shamian, B., Schrift-Tzadok, M. *et al.* Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone* 45, 918–924 (2009).
- Matsumoto, T., Kuroda, R., Mifune, Y., Kawamoto, A., Shoji, T. *et al.* Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone* 43, 434–439 (2008).
- Atesok, K., Matsumoto, T., Karlsson, J., Asahara, T., Atala, A. *et al.* An emerging cell-based strategy in orthopaedics: endothelial progenitor cells. *Knee Surg., Sports Traumatol., Arthrosc.* 20, 1366–1377 (2012).
- Fadini, G. P., Rattazzi, M., Matsumoto, T., Asahara, T. & Khosla, S. Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circ.* 125, 2772–2781 (2012).
- Kuroda, R., Matsumoto, T., Kawakami, Y., Fukui, T., Mifune, Y. *et al.* Clinical impact of circulating CD34-positive cells on bone regeneration and healing. *Tissue Eng. B Rev.* 20, 190–199 (2014).

培養自家口腔粘膜上皮シート移植で 光を取り戻す



外園 千恵¹、稲富 勉^{1,2}、中村 隆宏¹、小泉 範子³、今井 浩二郎⁴、 木下 茂^{1,5}、木村 泰子⁶、郷 正博⁶、福島 雅典⁶

- 1. 京都府立医科大学眼科
- 2. 国立研究開発法人国立長寿医療研究センター眼科
- 3. 同志社大学生命医科学
- 4. 京都府立医科大学大学院医学研究科医療フロンティア展開学
- 5. 京都府立医科大学感覚器未来医療学
- 6. 公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構

スティーヴンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘡、眼の熱・化学外傷のような難治性 眼表面疾患は、幹細胞疲弊症のうちでも特に治療が難しく、視力予後はきわめて不良 である。これに対し、公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推 進センター(TRI)と京都府立医科大学の研究者らは、羊膜を細胞培養の基質として用 いる角膜再生医療の実用化への道をともに歩んできた。この再生医療では、羊膜の上 に角膜上皮幹細胞や自家口腔粘膜上皮細胞からなる多層の粘膜上皮シートを作製し、 その移植により眼表面を再建する。早期臨床研究では、高度角膜混濁での視力改善、 遷延性上皮欠損での上皮修復、結膜嚢再建での効果が証明された。この技術は、その 他の眼表面疾患にも拡大して適応できると考えられる。

1. はじめに

眼表面には、角膜上皮および結膜上皮という性質の異なる2種類の粘膜上皮細胞が存在 する。角膜上皮と結膜上皮の境界部分は輪部と呼ばれ、輪部の上皮基底層には角膜上皮 幹細胞が存在すると考えられている^{1~4}。輪部領域が広範囲に障害されると、角膜上皮 を供給できなくなり、周辺部の結膜上皮が結合組織や血管を伴って眼表面を覆い、高度 の視機能障害をきたす。このように角膜上皮幹細胞が機能障害をきたす疾患を、角膜上 皮幹細胞疲弊症と呼ぶ^{35.6}。このような疾患であるスティーヴンス・ジョンソン症候群 (SJS)、眼類天疱瘡、あるいは眼の熱・化学外傷においては、炎症を伴って角膜上を結 膜組織が被覆して高度の視力低下をきたす。さらに、眼表面粘膜の短縮ないし癒着とと もに粘膜が瘢痕化し、高度ドライアイを伴うという特徴がある。SJS、眼類天疱瘡、熱・ 化学外傷は、眼表面の瘢痕性変化と表面環境の悪化を伴い、幹細胞疲弊症のうちでも特

要旨

スティーヴンス・ジョンソン 症候群、眼類天疱瘡、熱・化 学外傷などにより眼の輪部 が障害されると、角膜上皮幹 細胞疲弊症を引き起こすお それがある。これらの難治性 眼表面疾患を治療するには、 幹細胞を含む粘膜上皮の移 植を行う必要がある。我々の 治療コンセプトは、生体外で 作製したシート状の粘膜上 皮を移植するというもので ある。すなわち、羊膜を細胞 培養の基質として用いて、角 膜上皮幹細胞や自家口腔粘 膜上皮細胞からなる多層の 粘膜上皮シートを作製し、そ の移植により眼表面を再建 するのである。片眼性の疾患 の場合は、他眼(健眼)から 採取した細胞を用いて角膜 上皮シートを作製すること が可能であるが、両眼性疾患 での自家移植の可能性を求 めて、患者自身の口腔粘膜上 皮細胞を用いた上皮シート を開発した。角膜疾患の家兎 モデルでの基礎研究におい て、羊膜上で培養した口腔粘 膜上皮シートが眼表面に生 着・伸展し、角膜の透明性を 維持することが確認された。 早期臨床研究(72例)では、 瘢痕性角膜混濁での視力改 善、遷延性上皮欠損での上皮 修復、結膜嚢再建での効果が 証明されていた。同様の結果 は、前向き臨床試験でも確認 された。我々の技術の適応 は、その他の眼表面疾患にも 拡大できると考えている。

責任著者

外園 千恵 E-mail: csotozon@koto.kpu-m.ac.jp に重症かつ難治性で予後不良であり、難治性眼表面疾患と呼ばれてきた⁶⁷。

一般的な移植である全層(あるいは表層)角膜移植は、輪部 の幹細胞を移植しないため、幹細胞疲弊症に対しては臨床的効 果が期待できない。幹細胞疲弊症を治療するには幹細胞を含む 粘膜上皮の移植を行う必要があり、そのため、角膜上皮形成術 や輪部移植術などの角膜上皮移植術が開発されてきた^{8,9}。しか し角膜上皮移植には新鮮なドナーを要し、全層移植よりも拒絶 反応の発生率が高いという問題がある。さらに、難治性眼表面 疾患では上皮移植を行っても遷延性上皮欠損をきたしやすく、 たとえ上皮の生着を得ても長期経過の中で瘢痕性変化が進行 し、視力予後はきわめて不良であった^{7,10}。

1997 年に Pellegrini らは、難治性眼表面疾患に対する新規 治療法として、培養角膜上皮シート移植術を報告した。すなわ ち、彼らは少量の角膜輪部上皮組織から細胞を分離、培養し て、生体外で上皮シートを作製し、それらを2例に移植して成 功した¹¹。これが皮切りとなり、角膜再生医療の基礎研究なら びに臨床研究が世界的に活発に行われるようになった。

我々は、眼表面上皮再生の基質として羊膜組織に注目し、羊 膜を用いた培養粘膜(角膜または口腔粘膜)上皮シート移植術 による眼表面再生医療の開発に取り組んできた。具体的には、 羊膜を細胞培養の基質として用いて角膜上皮幹細胞や口腔粘 膜上皮細胞からなる多層の粘膜上皮シートを作製し、重症眼表 面疾患を再建することに挑戦したのである^{12~14}。

2. 新たな治療技術の開発と非臨床 POC

2.1 羊膜を用いた培養角膜上皮シート移植の開発と臨床研究 羊膜は、胎児と胎盤の表面を覆う薄い膜であり、基底膜と1層 の羊膜上皮細胞からなる。羊膜は拒絶反応が起こりにくいとさ れ、腹部手術の際の癒着防止や皮膚の熱傷後の上皮修復促進 などの目的で、外科・皮膚科領域で古くから用いられてきた。 眼科領域では、1995年に Kim と Tseng が凍結保存した羊膜 を動物モデル (ウサギ) 眼の眼表面再建に用いたのを皮切りに ¹⁵、再発翼状片や SJS などの瘢痕性疾患に対して、羊膜移植単 独、あるいは角膜上皮移植と併用した羊膜移植が行われるよう になった¹⁶。

羊膜には、瘢痕形成抑制、増殖因子を介した角結膜上皮の増 殖促進効果¹⁷、抗炎症効果¹⁸、新生血管抑制効果などさまざま な効果があることが知られている。特にその基底膜を構成する



図1 非臨床 POC。A:羊膜上で培養した家兎口腔粘膜上皮細胞は、正常角膜上 皮に類似した 5-6 層の細胞層(破線円)を形成した。B、C:表層の細胞間にはタ イトジャンクションがみられた(cの矢印)。D:最表層はグリコカリックス様物 質で覆われていた(矢印)。E:細胞間には多数のデスモソームによる細胞接着 が認められた(矢印)。F:基底細胞と羊膜の間にはヘミデスモソームによる細胞接着 着構造が認められた(矢印)。G:移植前の家兎角膜では幹細胞が消失している。 H:羊膜上で培養した口腔粘膜上皮シートは家兎の眼表面に生着・伸展し、角膜 の透明性を維持した(移植10日後)。I:移植された上皮シートは角膜実質に接 着し、炎症細胞の浸潤や実質浮腫を認めなかった。 文献14、26より改変。

コラーゲンは、角膜や結膜などの眼表面上皮細胞の基底膜と類 似するものである¹⁹。我々は、移植後の眼表面にシートが確実に 生着するためには上皮培養の基質の選択が重要であると考え、 凍結羊膜組織から羊膜上皮細胞を掻爬した「上皮なし羊膜」を 基質として用いた培養粘膜上皮幹細胞培養法を確立した^{20~22}。

我々は1999年に、両眼性の重症眼表面疾患の治療として、培 養他家角膜上皮シート移植の臨床応用を開始した^{23,24}。培養角 膜上皮シートは眼表面に良好に生着し、他に治療法のない急性 期炎症の持続を伴う遷延性上皮欠損症例では上皮再建を、慢性 期の視力障害患者では視力改善を得ることができた。初期の培 養他家角膜上皮シート移植は、SJS、化学外傷、眼類天疱瘡に対 して行われた(計23例25眼)。このとき、化学外傷では移植 された角膜上皮が維持され、透明性が長期に持続したのに対し て、SJSと眼類天疱瘡では全例で緩除に結膜上皮に置換された。 有害事象として認められたのは、明らかな拒絶反応(4眼)、メ チシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、あるいはメチシリン耐 性表皮ブドウ球菌(MRSE)による角膜感染症(3眼)であった。

難治性眼表面疾患のほとんどは両眼性であるが、片眼性の疾 患では他眼(健眼)から採取した少量の組織から自家の角膜上 皮シートを作製することが可能である。実際に自家上皮シート -rom Ref. 41 © 2019 Kyoto Prefectural University of Medicine

1~2週後

口腔粘膜上皮が

羊膜上に伸展





図3 培養口腔粘膜上皮シートからの上皮細胞の伸展。A:角膜再建。B:結膜 嚢再建。

培養自家口腔粘膜

上皮シート移植

羊膜

移植時

A:角膜再建

B:結膜囊再建

羊膜移植

培養口腔粘膜上皮シート

移植を実施した片眼性化学外傷では、合併症を生じず予後良好 であった²⁵。そこで両眼性疾患での自家移植の可能性を求めて、 患者自身の細胞を用いた培養上皮シートの作製に着手した。

2.2 羊膜を用いた培養自家口腔粘膜上皮シート移植の開発と 非臨床 POC の取得

まず家兎の培養口腔粘膜上皮シートを作製し、眼表面に自家移 植して有用性について検討した²⁶。羊膜上で培養した家兎口腔 粘膜上皮細胞は、約7日間でコンフルエントになり、約14日 間で角膜上皮に類似した5~6層に重層化した上皮層を形成 した。その最表層には無数の微絨毛が存在し、細胞間には多数 のデスモソームによる細胞接着が認められた。また、基底細胞 と羊膜の間にはヘミデスモソームによる接着構造が認められ た。培養口腔粘膜上皮シートのケラチンに対する免疫組織学的 検討では、粘膜特異的ケラチンであるケラチン4および13は 陽性、表皮角化型ケラチンであるケラチン1および10は陰性 であり、口腔粘膜の組織所見と一致した。角膜上皮特異的ケラ チンとされているケラチン3も陽性を示したが、ケラチン12 は陰性であった。以上の結果より、培養口腔粘膜上皮シートの 組織学的特徴としては、表皮のように角化の方向へ分化してい るのではなく、非角化型の粘膜上皮としての性質を保持しなが ら、角膜特異的なケラチンの一部(ケラチン3)も同時に保持 していることがわかった。

口腔粘膜を採取した同じ白色家兎に対して、輪部より5mm 外側から角膜と結膜上皮をすべて機械的に擦過除去し、角膜上 皮幹細胞疲弊症モデルを作製した。この眼に対して、角膜表面 を被覆している結膜組織を除去した後、前述の羊膜上培養口腔 粘膜上皮シートを移植した。その結果、眼表面は移植直後から 培養角膜上皮シート移植と同様な透明性を示し、移植48時間 後には培養上皮が生着していることを確認した。移植10日後 にも、移植された粘膜上皮シートは眼表面に生着しており、し かも48時間後と比較して粘膜シートより外側へ上皮細胞が伸

		SJS	眼類天疱瘡	熱・化学外傷	その他	合計
症例数		21	10	7	9	47
平均年齢		43.0	73.5	50.0	34.0	57.0
術前	LogMAR 視力(範囲)	2.40 (1.40-3.00)	2.70 (1.52–2.70)	2.70 (1.22–2.70)	2.40 (1.10-2.70)	2.40 (1.11–3.00)
	瞼球癒着(%)	18 (85.7)	10 (100)	6 (85.7)	3 (33.3)	37 (78.7)
	角化 (%)	8 (38.1)	1 (10.0)	0 (0)	1 (11.1)	10 (21.3)
二期的手術(%)		2 (9.5)	0 (0)	6 (85.7)	2 (22.2)	10 (21.3)

表1 視力改善目的の症例構成。

展していることがフルオレセイン染色により観察された。以上 の結果より、羊膜上で培養した口腔粘膜上皮シートは眼表面に 生着・伸展し、角膜の透明性を維持することが確認された²⁶。

動物モデルでの基礎的データを踏まえ、ヒトへの臨床応用を めざしてヒト培養口腔粘膜上皮シートの作製に着手した。ま ず、十分なインフォームドコンセントを得た後、ヒト正常口腔 粘膜組織を採取し、培養上皮シート作製の詳細な条件設定を試 みた。家兎培養口腔粘膜上皮シート作製と同一の条件ではシー ト作製が困難であり、動物種間の細胞動態の違いが観察された が、培養液も含めた培養操作過程の改変により、ヒト培養口腔 粘膜上皮シート作製は可能となった^{27.28}。

なお、患者自身の口腔粘膜上皮細胞を用いた再生医療として は、ほぼ同じ時期に Nishida ら^{29,30} が開発した培養自家口腔粘 膜上皮シート移植がある。Nishida らの方法は温度感受性応答 皿を用いてシート状の上皮細胞を移植する方法であり、羊膜を 使わない点が我々の方法と大きく異なる。我々が移植に用いて きた培養自家口腔粘膜上皮シートは、羊膜を基質としているた め適度な伸縮性があり、角膜・強膜に密着するように移植する ことができる。多層の上皮細胞が基底部で羊膜と接着してお り、瞬目や乾燥といった外的ストレスのもとでも細胞が脱落し にくいという特長を有する。

この培養上皮シートの *in vivo* における機能的評価を目的と して、家兎の眼表面に異種移植した。その結果、ヒト培養口腔 粘膜上皮シートは家兎モデルと同様に、角膜上皮と同様の形態 学的特徴を保持し、眼表面に生着した(図 1)^{26,31}。

3. 手術の実際と術後管理

手術では、眼表面の瘢痕組織を切除して健康な角膜実質あるい は強膜を露出した後に、角膜表面あるいは強膜に培養自家口腔 粘膜上皮シートを移植する。具体的には、まず眼表面の癒着部 を切開し、結膜下の増殖組織を除去する。角膜上に増殖組織が ある場合には、スパーテルなどを用いて輪部部分も含めて異 常な増殖組織を除去し、角膜実質と強膜を露出する。0.04% マイトマイシンCを浸潤させたマイクロスポンジを癒着解除 部の周辺結膜下に4分間留置し、ついで約300 mLの生理食 塩水で術野の洗浄を行う。広範に強膜が露出される症例では羊 膜移植を併用し、培養自家口腔粘膜上皮シートを角膜または強 膜に縫合する(図2)³¹。羊膜移植の併用例では、移植された 上皮シートから羊膜上に口腔粘膜上皮がスムーズに伸展する (図3)。

培養口腔粘膜上皮移植は自家移植であることから、拒絶反応 を制御する目的で免疫抑制薬を使用する必要はない。しかし ながら、重症の難治性眼表面疾患、特に SJS、眼類天疱瘡にお いては、手術により高度の炎症が惹起され、上皮障害、眼表 面の瘢痕化(癒着、結膜侵入など)を誘導する。したがって、 術直後より眼表面の炎症を十分に抑制することがきわめて重 要である。ステロイド単独では眼表面炎症を制御することは困 難であり、高度に眼表面が瘢痕化している症例では免疫抑制薬 (シクロスポリン)の全身投与を併用する¹³³²。また、眼類天 疱瘡は慢性、進行性の難治性自己免疫疾患であるが、シクロホ スファミドなどによって疾患の進行を抑制することができる。

A:移植の目的別、疾患別にみた症例の内訳

2002 年 6 月 24 日~ 2008 年 12 月 26 日の期間に移植を実施した症例

	内訳		
	移植1回	移植2回	
後ろ向き調査の対象:72 例 81 眼	58 例	14 例(両眼に移植:9 例、片眼に 2 回の移植:5 例)	
移植数:86 移植	76 眼	5 眼	
	\downarrow		

移植の目的

	内訳		佐忠		
	移植1回	移植2回			
瘢痕性角膜混濁での視力改善 (40 例 [#] 46 眼)	33 例	7 例	 •SJS(21 眼、うち 2 眼に二期的移植実施) ・眼類天疱瘡(10 眼) ・熱・化学外傷(7 眼、うち 6 眼に二期的移植実施) 		
移植数:47 眼	46 眼	1眼	 ・無虹彩症(1眼) ・薬物毒性による幹細胞疲弊症(1眼) ・原因不明(3眼、うち2眼に二期的移植実施) ・GVHD(1眼*) ・ザルツマン角膜変性症(1眼) ・放射線角膜症(2眼) 		
亜急性炎症を伴う 遷延性上皮欠損での上皮修復 (9 例 10 眼)	9例	1例(両眼に移植)	• SJS(3 眼) • 眼類天疱瘡(2 眼)		
移植数:10 眼	10 眼	-	•熱・化学外傷(5 眼 **)		
結膜囊再建(21 例 22 眼)	21 例	1例(両眼に移植)	 • SJS(1眼) • 眼類天疱瘡(10眼) • 熱・化学外傷(4眼**) 		
移植数:22 眼	22 眼	-	 ・		
悪性腫瘍切除後再建 (4 例 4 眼)	2 例	2 例(両例とも片眼に 2 回の移植)	• CIN(1 眼) • 結時巨平上内が6 (1 眼)		
移植数:6 眼	2 眼	2 眼	•結膜黑色腫(2 眼 ⁵)		
その他(美容目的) (1例1眼)	1例	-	_		
移植数:1 眼	1眼	-			

図4 早期臨床研究の症例構成。移植の目的別、疾患別にみた症例の内訳。

CIN:結膜上皮内新生物、GVHD:移植片対宿主病、SJS:スティーヴンス・ジョンソン症候群

#:うち1例では左右の眼にそれぞれ異なる目的で移植を実施した。 ****:同じ症例の同じ眼に異なる目的で1回の移植を実施した。

\$:同じ症例の同じ眼に同じ目的で2回の移植を実施した。

(© 2019 Nature Research)

難治性眼表面疾患では、ほぼ全例が高度ドライアイを合併し ており、人工涙液の頻回点眼を行う。これらの患者では眼表面 が易感染性となっており、なかでも SJS では MRSA の保菌と 感染に注意する必要がある^{13,32}。眼表面の術前評価および術後 管理は、手術予後を決める重要な要因である。

4. 臨床試験での治療効果と解釈

4.1 概要

京都府立医科大学において 2002 年に世界初の臨床での成功 を得たのち³¹、難治性眼表面疾患の病態を呈する幹細胞疲弊症 を対象に、慎重に症例を重ねていった^{33,34}。症例数が次第に増 えていくなかで、2008 年より先端医療振興財団における橋渡 し事業の外部シーズとなり、臨床研究情報センターの支援のも とで、初回より 2008 年 12 月までに実施した培養自家口腔粘 膜上皮シート移植全 72 例(81 眼、86 手術)を対象に、後ろ 向き調査と統計学的解析を実施した^{14,35~37}。

移植対象となった疾患の内訳は、SJS (21 例)、眼類天疱瘡 (20 例)、熱・化学外傷(13 例)、結膜悪性腫瘍(4 例)、その 他(14 例)であった。治療目的は、瘢痕性角膜混濁での視力 改善(47 移植)、亜急性炎症を伴う遷延性上皮欠損での上皮修 復(10 移植)、結膜嚢再建(22 移植)、その他(7 移植)に大 別された(図 4)。角膜再建(視力改善、上皮修復の目的)では SJS が最も多く、結膜嚢再建では眼類天疱瘡が最も多かった。

移植前、移植後4、12、24週、最終受診時(2008年12月 まで)の視力、前眼部所見を調査し、上皮シート移植の目的別 に有効性を評価した。また有害事象をすべて抽出し、発現に関 連する因子を、全例を対象に多変量解析により探索した^{35,38}。

4.2 上皮シート移植の効果

視力改善目的群の術後24週における最良矯正視力の改善率 は46.8%、上皮修復目的群での眼の上皮欠損スコア改善率 は90.0%、癒着解除目的群での瞼球癒着スコアの改善率は 68.2%であり、各群ともに統計学的に有意な有効性を認めた。

4.2.1 視力改善

視力改善を目的として 40 例 46 眼に 47 手術を実施した³⁵。移 植対象となった疾患の内訳は、SJS(17 例 21 眼)、眼類天疱 瘡(9 例 10 眼)、熱・化学外傷(6 例 7 眼)、その他(8 例 9 眼)であった。「その他」の疾患には、特発性(原因不明)幹



図5 代表的な症例。 上皮シート移植を実施した目的は、**A、B**:視力改善、**C、D**:上皮修復、**E、F**:癒 着解除である。術前(**A、C、E**)と術後 24 週(**B、D、F**)の比較。 Elsevier 社の許諾を得て文献・38 より改変(© 2018 Elsevier)。

KGaA.

細胞疲弊症、放射線角膜症、移植片対宿主病(GVHD)、無虹 彩症などが含まれていた(表1、図4)。放射線角膜症1眼で は再移植を行った。

術後 24 週時に最良矯正視力の改善がみられたのは、SJS で 21 眼中 12 眼 (57.1%;95%信頼区間〔CI〕34.0 ~ 78.1%)、 眼類天疱瘡で 10 眼中 3 眼 (30.0%;95% CI 6.7 ~ 65.2%)、 熱・化学外傷で 7 眼中 3 眼 (42.9%;95% CI 9.9 ~ 81.6%) であった (図 5A、5B)。このうち角膜実質混濁の高度な症例 では、移植された上皮が安定化したのちに全層ないし表層角膜 移植を行った³⁴。熱・化学外傷では、そのような二期的移植を 行った症例が 6 例あり、移植後に視力が向上した。

最も重症の難治性眼表面疾患は、瞼球癒着や上皮の異常分化 である角化を呈する症例であり、end-stage とも呼ばれ、通常 は移植の適応外とされる⁷。視力改善目的群のうち、術前の瞼 球癒着を 37 眼(78.7%)、角化を 10 眼(21.3%)に認め、術 前の平均 LogMAR 視力は 2.40、すなわち指数弁であった。指 数弁以下の視力が手術で 0.01 以上になれば、文字を読んだり 自分で歩いたりすることが可能となる。そこで、術前に指数 弁以下(最良矯正視力 0.01 未満)であった症例が術後 24 週 に 0.01 以上を得た割合を critical visual improvement rate と して計算したところ、SJS、眼類天疱瘡、熱・化学外傷の順に 50.0%(14 眼中 7 眼)、42.9%(7 眼中 3 眼)、20.0%(5 眼 中 1 眼)であった。このうち、熱・化学外傷は二期的な全層な いし表層移植後に視力向上を得た。通常は手術適応外とされる 重症眼で約半数に改善がみられたことは特筆すべきであると 考える。

4.2.2 上皮修復

急性炎症を伴う遷延性上皮欠損(9例10眼〔両眼が1例〕)の 全例で上皮が修復し、7眼は移植後4週以内に上皮欠損が消失 した(図5C、5D)³⁸。原疾患の内訳はSJSが3眼、眼類天疱 瘡が2眼、熱・化学外傷が5眼であった。

急性炎症を伴う遷延性上皮欠損とは、SJS あるいは熱・化学 外傷の急性期に輪部を含む全角膜上皮欠損を生じ、眼表面の炎 症が遷延したまま上皮欠損が治癒しない病態である。点眼・軟 膏・内服による消炎、眼帯や治療用ソフトコンタクトレンズに よる上皮保護など、あらゆる治療に抵抗性であり、角膜感染症 や角膜融解、角膜穿孔を生じて失明に至るリスクが高い。これ らの合併症を回避できたとしても、結合組織を伴った結膜組織 が緩徐に角膜表面を被覆してほぼ失明に至る。この病態に対し て培養粘膜(角膜または口腔粘膜)上皮シート移植を行うと、 手術と同時に角膜表面の上皮化が得られ、感染や穿孔といった 重篤な合併症を回避できる。また手術による上皮化とともに眼 表面炎症が沈静化し、瘢痕性変化を抑制できる^{6.38}。

培養他家角膜上皮シート移植は急性炎症を伴う遷延性上皮 欠損に良好な結果をもたらしたが⁶²³、培養自家口腔粘膜上皮 シート移植でも同様の結果が得られた。

4.2.3 癒着解除

癒着解除を目的として培養自家口腔粘膜上皮シートを用いて 結膜嚢再建された症例は21例22眼(両眼が1例)である。 原疾患は眼類天疱瘡が10眼と最も多く、ついで熱・化学外傷 が4眼、SJSが1眼、その他が7眼であった。

眼類天疱瘡における癒着解除目的群の瞼球癒着スコアは10 眼中6眼で改善し、結膜嚢癒着スコア上下合計は10眼中7眼 で改善した(図5E、5F)。眼類天疱瘡の5眼(50%)では白 内障手術を上皮シート移植と同時に施行した。 眼類天疱瘡は、SJS や熱・化学外傷のような急性所見を呈す ることはまれである。自覚症状に乏しいまま発症し、数年かけ て緩徐に結膜嚢の短縮が進行し、最終的に角膜上皮幹細胞疲弊 を生じて角膜混濁に至る。培養自家口腔粘膜上皮シート移植に よる眼類天疱瘡での結膜嚢再建は、上皮幹細胞疲弊に至る前の レスキュー、すなわち stem cell protection としての意義が高 いと考えられる。

熱・化学外傷では、移植後4週で全例の癒着スコア改善が 得られ、以後再発傾向を認めなかった。一方、眼類天疱瘡で は最終観察日まで5眼(50%)で改善が維持されたが、4眼 (40%)では癒着の再発を認めた。眼類天疱瘡の術後経過が改 善と悪化の2群に分かれた理由が、ホスト要因によるものか、 環境要因によるものなのかは不明であり、眼類天疱瘡のさらな る解明が今後の課題である。

4.3 有害事象

有害事象としては、遷延性上皮欠損を24件22例(30.6%)、 感染症を3件3例(4.2%)、ステロイドによる眼圧上昇を7 件7例(9.7%)に認めた。遷延性上皮欠損は全例で最終的に 治癒し、これらの有害事象のために失明した症例はなかった。

遷延性上皮欠損の発現の有無に関連する要因を、全移植例を 対象に多変量解析で探索したところ、原疾患(P=0.0119)、 涙液メニスカス(P=0.0323)、移植前の角膜内血管侵入 (P=0.0806)の3つの要因が見いだされた。すなわち、原疾 患がSJSであること、涙液産生が乏しくメニスカスが非常に低 いこと、移植前の角膜内血管侵入が高度であり瞳孔を覆う程度 であることが、遷延性上皮欠損の発現のリスクとなることが示 唆された。実際、これら3つの要因をすべてもつ移植眼10眼 中、7眼において術後に遷延性上皮欠損が発現していた。

4.4 長期経過

二期的手術などの追加の介入なしに3年以上経過を観察した 17例19眼における長期の臨床成績では、移植された口腔粘 膜上皮は術後6カ月で安定化し、長期に眼表面で良好な上皮が 維持されていることが明らかとなった³⁶。

4.5 前向き臨床試験

以上の解析結果を踏まえ、対象を難治性疾患の中でも最重症の 3疾患(SJS、眼類天疱瘡、重症熱・化学外傷)に限定し、前 向き臨床試験として先進医療制度のもとに、2014年9月から 2017年3月までに22例で培養自家口腔粘膜上皮シート移植 を実施した³⁷。現在、その結果を解析中である。

4.6 輪部支持型コンタクトレンズを用いた視覚リハビリテーション 難治性眼表面疾患における不正乱視とドライアイの軽減を目 的として、独自にデザインした直径 13 ~ 14 mm のハードコ ンタクトレンズ (輪部支持型コンタクトレンズ)を開発した。 臨床研究では特に SJS 患者において著しい視力改善と QOL 改 善が得られた³⁹。そこで SJS を対象として医師主導治験を実施 し、2016 年 2 月に薬事承認を得た⁴⁰。

培養自家口腔粘膜上皮シート移植後の眼表面にも不正乱視 が存在する。移植後に上皮が安定化したのちに輪部支持型コン タクトレンズを装用すると、不正乱視が緩和されて視機能が向 上する(図6)⁴¹。すなわち、輪部支持型コンタクトレンズの 装用により培養自家口腔粘膜上皮シート移植の治療効果を増 強することが可能となる。

5. 今後の展望と課題

培養自家口腔粘膜上皮シート移植は、難治性眼表面疾患による 視覚障害患者に光をもたらすものであり、将来的な適応拡大 も可能と思われる。しかし社会への橋渡しにあたっては、医 学的側面と社会的側面の双方に次のような課題がある。

5.1 適応拡大

SJS、眼類天疱瘡、熱・化学外傷は、角膜上皮だけでなく結膜 上皮の幹細胞も失われる疾患である。類似の病態を呈する疾患 として、GVHDや特発性(原因不明)幹細胞疲弊症があり、将 来的な適応拡大が望まれる。

早期臨床研究で、その他に分類された症例には悪性腫瘍 4 例 が含まれる。結膜扁平上皮がんでは、腫瘍切除後の再建のため に羊膜移植と角膜上皮移植が単独あるいは併用して実施され る。培養自家口腔粘膜上皮シート移植が併用できれば、腫瘍切 除時に安全域を十分にとりやすくなり、手術後の速やかな上皮 修復が期待できる。

5.2 医学的課題

iPS細胞から角膜上皮細胞様細胞への分化誘導が報告されたことから、将来的には両眼性疾患での培養自家角膜上皮シート移



図6 輪部支持型コンタクトレンズによる視機能向上。 眼表面に高度の癒着を伴うスティーヴンス・ジョンソン症候群の症例であり、術 前視力は指数弁(0.004)であった。角膜に移植された患者自身の口腔粘膜上皮 は術後半年でほぼ安定し、視力は0.05となった。さらに輪部支持型コンタクト レンズを用いることで、視力0.9~1.0を得た。術後7年を経ても同じ状態を維 持している。 COMET:培養口腔粘膜上皮シート移植

文献 41 より改変。

植が可能になるかもしれない⁴²。一方で、上皮細胞は移植され た部位と環境によってその形態や性質が変化するが、それらを 制御する因子については十分にわかっていない。培養他家角膜 上皮シート移植、培養自家口腔粘膜上皮シート移植はともに、 原疾患によって予後が異なった。上皮シートの細胞そのものに 関する研究や、細胞の性質と環境の関係など、細胞生物学的な 探求を今後も継続していく必要がある。

最近、我々はフィーダーフリーの無血清培養系を用いて口腔 粘膜上皮シートを作製する新しい技術を開発した。この新しい プロトコルにより、非臨床研究で良好な結果を得ている⁴³。新 しい培養プロトコルを用いた第 III 相臨床試験が進行中である。

5.3 社会的課題

再生医療の実用化には、細胞培養センターなどの設備に多額の 投資が必要となるが、対象が希少疾患の場合には、企業は投資 の回収が見込めない。一方、視覚障害の軽減は社会保障費(障 害年金など)の減少、労働力の増加につながり、社会への恩恵 が多大である。ところがまた、社会保障費の減少は企業の収益 には反映されないのである。企業収益と社会貢献の間のバラン スをとることが非常に重要である。

文献

- Schermer, A., Galvin, S. & Sun, T. T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 103, 49–62 (1986).
- Kinoshita, S., Kiritoshi, A., Ohji, M., Oohashi, S. & Manabe, R. Disappearance of palisades of Vogt in ocular surface diseases. *Jap. J. Clin. Ophthal.* 40, 363–366 (1986) [in Japanese].
- Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N. et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. Prog. Retin. Eye Res. 20, 639–673 (2001).
- Dua, H. S., Saini, J. S., Azuara-Blanco, A. & Gupta, P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J. Ophthalmol.* 48, 83–92 (2000).
- 5. Tseng, S. C. G. Concept and application of limbal stem cells. Eye 3, 141-157 (1989).
- Kinoshita, S. Ocular surface reconstruction by tissue engineering. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 106, 837–869 (2002) [in Japanese].
- Holland, E. J. Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 94, 677–743 (1996).
- 8. Thoft, R. A. Keratoepithelioplasty. Am. J. Ophthalmol. 97, 1-6 (1984).
- Turgeon, P. W., Nauheim, R. C., Roat, M. I., Stopak, S. S. & Thoft, R. A. Indications for keratoepithelioplasty. Arch. Ophthalmol. 108, 233–236 (1990).
- Thoft, R. A. & Sugar, J. Graft failure in keratoepithelioplasty. *Cornea* 12, 362–365 (1993).
- Pellegrini, G., Traverso, C. E., Franzi, A. T., Zingirian, M., Cancedda, R. *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* **349**, 990–993 (1997).
- Kinoshita, S., Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N. *et al.* Strategic research towards developing novel therapeutic methods for severe corneal diseases based on regenerative medicine. *Saishinigaku* 62, 132–180 (2007) [in Japanese].
- Kinoshita, S. Future medical treatment for corneal diseases. Nippon Ganka Gakkai Zashi 114, 161–199 (2010) [in Japanese].
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N. & Kinoshita, S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 187–207 (2016).
- Kim, J. C. & Tseng, S. C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14, 473–484 (1995).
- Shimazaki, J., Yang, H. Y. & Tsubota, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* **104**, 2068–2076 (1997).
- Koizumi, N. J., Inatomi, T. J., Sotozono, C. J., Fullwood, N. J., Quantock, A. J. *et al.* Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr. Eye Res.* 20, 173–177 (2000).
- Ueta, M., Kweon, M. N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J. et al. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 464–470 (2002).
- Endo, K., Nakamura, T., Kawasaki, S. & Kinoshita, S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the α5 chain of type IV collagen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1771–1774 (2004).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Quantock, A. J., Fullwood, N. J., Dota, A. *et al.* Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19, 65–71 (2000).
- Koizumi, N., Fullwood, N. J., Bairaktaris, G., Inatomi, T., Kinoshita, S. *et al.* Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 2506–2513 (2000).
- Koizumi, N., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Inatomi, T., Kinoshita, S. *et al.* An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2114–2121 (2002).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 119, 298–300 (2001).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108, 1569–1574 (2001).
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N. & Kinoshita, S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol.* 82, 468–471 (2004).

- Nakamura, T., Endo, K., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Tanifuji, N. *et al.* The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 106–116 (2003).
- Nakamura, T. & Kinoshita, S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22, S75–S80 (2003).
- Kinoshita, S. & Nakamura, T. Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif. Organs.* 28, 22–27 (2004).
- Hayashida, Y., Nishida, K., Yamato, M., Watanabe, K., Maeda, N. *et al.* Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1632–1639 (2005).
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K. *et al.* Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.* 351, 1187–1196 (2004).
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Amemiya, T., Kanamura, N. *et al.* Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br. J. Ophthalmol.* 88, 1280–1284 (2004).
- Sotozono, C., Inagaki, K., Fujita, A., Koizumi, N., Sano, Y. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis infections in the cornea. Cornea 21, 894–S101 (2002).
- Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Sotozono, C., Yokoi, N. *et al.* Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am. J. Ophthalmol.* 141, 267–275 (2006).
- Inatomi, T., Nakamura, T., Kojyo, M., Koizumi, N., Sotozono, C. *et al.* Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol.* **142**, 757–764 (2006).
- Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Yokoi, N. *et al.* Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Ophthalmol.* 120, 193–200 (2013).
- Nakamura, T., Takeda, K., Inatomi, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br. J. Ophthalmol.* **95**, 942–946 (2011).
- Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Hamuro, J. *et al.* Clinical study on cultivated autologous oral mucosal epithelial sheet transplantation for treating patients with intractable keratoconjunctival disease. *Nippon Rinsho* 73, 447–451 (2015) [in Japanese].
- Sotozono, C., Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Yokoi, N. *et al.* Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity. *Acta Ophthalmol.* 92, e447–e453 (2014).
- Sotozono, C., Yamauchi, N., Maeda, S. & Kinoshita, S. Tear exchangeable limbal rigid contact lens for ocular sequelae resulting from Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. *Am. J. Ophthalmol.* **158**, 983–993 (2014).
- Sotozono, C. Clinical trial of tear exchangeable limbal supported rigid contact lens CS-100 for ocular sequelae due to Stevens-Johnson syndrome. *Nippon Hyouka* 43, 203–205 (2015) [in Japanese].
- Sotozono, C. New treatments for practical refractory ocular surface disease and its practical application. J. Kyoto Pref. Univ. Med. 126, 145–155 (2017) [in Japanese].
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Sasamoto, Y., Katori, R., Nomura, N. *et al.* Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* 531, 376–380 (2016).
- Nakamura, T., Yokoo, S., Bentley, A. J., Nagata, M., Fullwood, N. J. *et al.* Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction. *Sci. Rep.* 6, 37173 (2016).

組織工学的手法による鼓膜再生療法



金丸眞一

公益財団法人 田附興風会 医学研究所 北野病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科 公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション 推進センター

鼓膜穿孔に対する現行の治療法よりも安全で簡便な新しい閉鎖法が、公益財団法人神 戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター(TRI)に関連した研究者 によって開発された。この手法では、穿孔縁を新鮮創化して幹細胞の活性化を図った うえで、塩基性線維芽細胞増殖因子を含浸させたゼラチンスポンジを、新たな細胞が 成長するための足場として留置するのが特徴である。2019 年 8 月、この治療法は厚 生労働省による承認を受け、鼓膜穿孔を有する患者を対象とした国内発の組織工学的 療法となった。

1. はじめに

再生医学では、不可逆的に損傷した組織・臓器の再構築を図るため、細胞の分化・増殖 を誘導し、再生という生命現象を人為的にコントロールすることを目指すものである。

生体の一部が損傷された場合、生物には、それをもとに戻そうとする基本的な性質が そなわっている。もとの状態が回復する程度は、障害の大きさによる。ごく軽微な損傷の 場合は自然に治癒し、完全にもとの状態にまで再生する。損傷がそれより重たい場合に は、もとの状態には戻らず、変形や変質が伴う。自然にそなわった再生能力は、組織や臓 器によっても異なる。例えば肝臓などは全体の半分を切除しても数か月でほぼもとの大 きさまで再生できる。また、再生能力は動物種によっても大きく異なる。例えば、イモリ やトカゲでは、尻尾や足を切ってももとの状態に戻る。一般に、細胞分裂の盛んな組織・ 臓器ほど再生力は旺盛で、下等な動物ほどよく再生するといえる。さまざまな動物種の



図1 組織工学の3要素。

鼓膜穿孔は単に鼓膜に穴が 開くだけでなく、難聴の発 症や悪化に伴い、患者の OOLを著しく低下させる。 また、最近の研究で、難聴 は認知症の発症を助長する 大きな要因の1つであるこ とがわかってきている。急 速に高齢化が進む日本やそ の他の国々では、コミュニ ケーション障害がもたらす 種々の問題を過小評価すべ きではない。近年の組織工 学の発展は、我々が手にで きる治療法に大きな変革を 生じさせた。それは、生物 が本来持つ自己修復のシス テムを取り入れた治療法 (再生医療)の開発である。 鼓膜は本来、再生しやすい 組織である。そのメカニズ ムを解明して理解するこ とが、患者にとって受け入 れやすい、より安全でより 簡便な治療法の開発につな がった。穿孔縁を新鮮創化 したうえで、塩基性線維芽 細胞増殖因子を含浸させた ゼラチンスポンジを、新た な細胞が成長するための足 場として留置する治療法で ある。

責任著者

金丸 眞一 E-mail: kanemaru@ent.kuhp. kyoto-u.ac.jp



発生過程や再生を研究することにより、自然には起こらないヒ トの組織・臓器の再生を引き起こし、本来の状態を回復させる 方法を探るのが再生医学である。

再生医学の源流は、1950年代に欧米を中心に行われた人工 臓器開発のための研究にある。人工臓器を体内に移植すること を目指して、組織親和性の高い素材の研究開発が行われたので ある(これは、体外で使用することを念頭においた人工透析な どの研究とは異なる流れとなる)。その結果、医学と工学が融 合し、組織工学という、再生医学の基盤ともいえる新しい医学 の分野が生まれるに至った1~3(〔組織〕再生医工学とも呼ば れる)。組織・臓器を再生させるためには、組織再生のもとに なる細胞、それが分化・成長するための足場、それらを調節す る因子、という3つの要素を適切な環境におくことが必要とな る(図1)。この細胞・足場・調節因子の3つを、組織工学の 3要素と呼んでいる。再生医学は、近年の組織工学、分子生物 学、発生遺伝学などの目覚ましい進歩によって支えられ発展し てきた。特に、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の作製をはじめ として、幹細胞の研究が大きく進んだことがある。こうした研 究の進展により、選択できる細胞の幅が大きく広がり、疾患モ デル、創薬への応用などに大きな飛躍がみられた。しかし、こ

れを臨床に応用する段階となると、医学的のみならず倫理的、 社会的な問題が山積しているため、今のところは限定的であ る。例えば、細胞移植の安全性、採取する細胞の出所、拒絶反 応などの課題がある。今後、再生医療が治療の中心的な柱とな るか否かは、現時点ではまだ未知数といわざるをえないが、数 多くの研究から、組織・臓器が再生するということの糸口はす でにつかめている。おそらくさほど遠くない将来には、再生医 療が現行の医療を変える新しい医療の1つになるのはまちが いないだろう。

本稿では筆者らが鼓膜再生療法⁴⁵の開発に至った経緯と、 単一施設による予備試験の結果につき概説する。

1.1 鼓膜の構造

鼓膜は、外耳と中耳の境界にある非常に薄い膜である。直径 8~10 mmで、漏斗状をしており、中央部には鼓膜臍と呼ば れるくぼみがある(図2)。鼓室側には、耳小骨の1つである ツチ骨柄が付着している。また、鼓膜の周縁は、鼓膜輪と呼 ばれる線維軟骨様組織を介して外耳道骨と接している。鼓膜 は、外耳道の皮膚に連なる上皮層、コラーゲン線維組織から なり鼓膜に強度を与える固有層(中間層)、鼓室粘膜に連なる 粘膜層の3層構造をなしている。また、鼓膜は緊張部と弛緩 部に分けられ、前者はこの3層構造を有しているが、後者は 中間層を欠いており、中耳内圧の影響を受けやすい構造となっ ている。鼓膜の栄養血管は固有層上にあり、その数は加齢と ともに減少する傾向がみられる。栄養血管の多くは、鼓膜輪、 ツチ骨柄・鼓膜臍に集まっている。

1.2 鼓膜穿孔の問題点

鼓膜穿孔がある場合、鼓膜で音を十分にとらえられなくなるだ けではない。穿孔を通じて鼓室内に直接音が侵入し、その音が 振動エネルギーとして蝸牛の正円窓を通じて内耳に入り、蝸牛 階を下(蝸牛基底回転)から上(蝸牛頂)に向けてのぼってい く。一方、残存鼓膜を通じて正規のルートで入った音は、卵円 窓経由で前庭階を下から上へとのぼっていく。両方の振動が蝸 牛頂付近でぶつかり合うと、キャンセル効果によって急激なエ ネルギーの減衰をきたし、聞こえを妨げることになる。また、 語音明瞭度も下がるため、言葉を聞き取りにくくなる⁶。特に 鼓膜穿孔に老人性難聴が加わると、穿孔の大きさにもよるが、 聴力低下が著しくなり、補聴器が必要となる。しかし、補聴器 装用は、上記のキャンセル効果をいっそう大きくすることにな り、大きな音が入っても言葉の聞き取りは改善されない。

また、鼓膜穿孔があると中耳が外耳道を通じて直接外部に曝 されることになる。その結果、中耳炎に罹患しやすくなる。ま た温度変化や圧変化が加わると、めまいや内耳障害をきたし、 長期的には内耳障害による感音性難聴をも引き起こす。した がって、中耳の伝音環境を良好に維持し、内耳障害を予防する ためにも、できるかぎり穿孔を閉鎖することが望ましい。

1.3 鼓膜穿孔の原因

世界保健機関 (WHO) によると、慢性中耳炎の患者数は全世界 で3.3 億人にものぼる⁷。通常、慢性中耳炎は鼓膜穿孔を伴っ ており、それに加えて、鼓膜穿孔の原因には物理的・機械的損 傷、鼓膜チューブ留置後の穿孔遺残、熱傷、放射線治療なども あるため、鼓膜穿孔を有する患者の数がさらに多いことは確か である。

物理的・機械的損傷による鼓膜穿孔は、3か月以内にほとん どが自然治癒するといわれている⁷。したがって、頭部骨折な どで鼓膜に大きな変形をきたした場合などを除いて、耳かきな どによる単純な鼓膜穿孔や、平手打ちや爆風、航空機での急激 な圧変化による圧外傷などを原因とする鼓膜穿孔に対しては、 少なくとも半年程度の経過観察が第一選択となる。一方、中耳 炎後あるいは鼓膜チューブ留置後の穿孔遺残、さらに熱傷や放 射線治療後の鼓膜穿孔については、何らかの外科的治療が必要 になることが多い。

1.4 鼓膜穿孔に対する現行の治療

現行の鼓膜穿孔閉鎖治療は、鼓膜形成術と鼓室形成術が主体で ある。また、小穿孔に対しては、穿孔縁を新鮮創化するなどし てコラーゲン膜やキチン膜などで表面を覆う治療がなされる 場合もある⁸。鼓膜形成術は、鼓膜穿孔だけを対象に治療する もので、中耳内に炎症・感染や病変がなく、耳小骨連鎖が正常 な症例を対象に行われる手術である。一方、鼓室形成術は鼓膜 穿孔の有無にかかわらず、主として中耳内の炎症・感染や病変 の除去を目的に行われる手術で、耳小骨連鎖が正常な症例に対 する鼓室形成術 I 型のほか、耳小骨損傷の程度に応じて耳小骨 連鎖再建を行うⅡ型からⅤ型までの術式がある。いずれの術式 でも鼓膜穿孔に対しては、側頭筋膜などの自家組織を採取し、 残存鼓膜の上皮層を剥離して中間層である線維層との間に挿 入する方法や、穿孔周囲の粘膜層(最深層)に傷をつけて、そ の部位に自家組織を接着させる方法などが用いられている。自 家組織を足場として、上皮層と粘膜層が伸びることで鼓膜が閉 鎖される。

これらの方法の利点は、自家組織による再建であることから 組織間の親和性がよく、成功率が高いことである。しかし、鼓膜 の3層構造のうち、中間にある線維層は他の2層と比較して再 生されにくいことから、通常、これらの術式で得られた鼓膜には 正常な中間層はない。具体的には、移植した自家組織は、徐々 に縮重して中間層を欠いた弱い鼓膜が残る場合と、縮重せずに 残った自家組織のために非常に分厚い鼓膜になる場合と、さら にそれらが混在する場合など、さまざまである。当然、その部 位にふたたび穿孔が生じても自然閉鎖することは少ない。

聴力という観点からみると、耳小骨連鎖が正常である場合に は、鼓膜穿孔を閉鎖することで、ある程度の聴力回復は得られ る。だが、気骨導差のない理想的な聴力を取り戻すことは難し い。ツチ骨との接触具合や鼓膜の肥厚の有無によって伝音効率 が変化するからである。また、耳後部の皮膚切開と、鼓膜再建 材料としての自家組織の採取が必要となり、それに伴う耳介周 囲の感覚消失や違和感などさまざまな後遺症を伴う。



図3 自然治癒した鼓膜穿孔。白い矢印は線維層のない透明な鼓膜を示している。その領域には栄養血管を認めない。透明な領域の周縁に白くみえるのは、再 生した線維層の最先端部分である。

2. 新たな治療技術の生物学と非臨床 POC

2.1 鼓膜穿孔治癒のメカニズム

外傷などで健康な鼓膜に穿孔が生じても、小穿孔の場合は自然 治癒することが多い。そのため、この鼓膜再生のメカニズムに ついて、多くの研究がこれまでに行われてきた^{9~12}。大半は 動物実験によるもので、それによると、鼓膜を構成する3層構 造のうち上皮層が最初に伸び、それを足場にして他の層が伸び ることが明らかになっている⁹。つまり、再生に際して各層の 再生速度と再生のしやすさが異なっている。中間の線維層は鼓 膜に強度と弾力性を与えているが、その上と下にある上皮層や 粘膜層と比較して、再生速度が遅く再生しにくい。そのため、 再生の速い上皮層と粘膜層が中間層を超えて互いに接着して しまうと、線維層が成長する場がなくなり、それ以上成長でき なくなる。この時点で上皮層と粘膜層の再生が止まってしまう と、穿孔が残存することになる。一方、再生が進行して穿孔が 閉鎖された場合には、線維層のない脆弱で透明な鼓膜が形成さ れることになる(図3)。再生した線維層の最先端部分は白色 となり観察可能である。再生した鼓膜は軽度の圧変化によって 再穿孔をきたすことがある。

鼓膜は本来非常に再生しやすい組織である。このことから、 鼓膜およびその周辺には、鼓膜再生を推し進める組織幹細胞も しくは前駆細胞が存在することが示唆される。実際、これらの 細胞が鼓膜輪、ツチ骨柄・鼓膜臍に存在する可能性が高いこと、 また、鼓膜が損傷するとこれらの細胞が活発に増殖を開始する ことが動物実験で報告されている^{13,14}。これらの細胞は、平常 は鼓膜の細胞の入れ替わりを支える以上の活動は行っていな いが、鼓膜が損傷を受けると、それによって修復システムが活 性化され、活発な活動が開始すると考えられる。一方、慢性の 鼓膜穿孔では、これらの細胞は活発な活動を休眠している状態 にある。このように、鼓膜が損傷した場合には、損傷そのもの がトリガーとなって再生のメカニズムにスイッチが入るもの と考えられる。しかし、感染や慢性炎症などによって再生環境 が悪くなっている場合や、大穿孔の場合には、細胞の成長が途 中で止まり、穿孔が残存することになるのである。したがって、 再生環境を良好な状態に保つことがきわめて重要である。

このような鼓膜再生の自然経過の観察から、鼓膜再生を効率 よく進行させるには以下のことが必要であることがわかる。

- 中間層である線維層の成長促進
- 各層が成長するための足場の提供
- 鼓膜の再生を効率よく行うための良好な再生環境の維持

2.2 中間層である線維層の成長促進

種々の増殖因子が発見されているが、臨床に応用できるものは 少ない。この中で塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)は、日 本国内では製剤としてすでに市販化されており、皮膚潰瘍など で保険適用が認められている。その薬理作用は、細胞に対する 直接的な増殖効果と、血管に対する増殖効果である^{15,16}。

正常鼓膜の再生には、再生速度が遅く再生しにくい中間層で ある線維層の再生と、3層構造を支える十分な血流の維持が不 可欠である。この観点から bFGF は理想的な要素をそなえてい る。すなわち、その名が示すとおり、線維層の再生に不可欠な 線維芽細胞を増殖させる直接作用を有すると同時に¹⁷、血管を 誘導して周囲組織に栄養を供給する作用を兼ねそなえている のである。

2.3 各層が成長するための足場の提供

組織の再生において、細胞が成長するための足場の選択は非常 に重要である。足場として不可欠な性質は、組織親和性が高い ことと、一定期間足場を提供した後に吸収・分解され消失する ことである。

我々の鼓膜再生療法は、鼓膜再生の足場素材として生体吸収 性材料に増殖因子を含浸させて鼓膜欠損部に留置し、これを生 体接着糊で固定するというものである。足場素材として我々が 選択したのは、ゼラチンスポンジである。ゼラチンスポンジ は、コラーゲン分子の三重らせん構造が熱変性によってほどけ たものを主成分とする混合物である。液体を含ませると、自由



図4 コラーゲンとゼラチンスポンジの構造の密度の違いを示した電子顕微鏡 写真。



図5 再生した鼓膜。鼓膜再生処置から2か月後の再生した鼓膜は、すりガラスのような外見をしている。多くの血管がみられることから、中間層が再生していることがわかる。白い矢印は残存したゼラチンスポンジを示している。

な形状をとるやわらかい塊となり、コラーゲンと比較して非常 に疎な構造をしている(図 4)。ゼラチンスポンジは生体内で は1か月以内に加水分解されて消失する^{18,19}が、鼓室内は空 気を有する空間であり、通常の生体内部とは異なるため、消失 までには数か月を要すると思われる。

本治療法がこれまでの多くの治療法と異なるのは、足場素材 として形状が自由な塊としてのゼラチンスポンジを使用した 点にある。これまでの手法では、鼓膜欠損部にシート状の足場 素材を張りつけ、その底面に沿って周囲組織が伸びるという方 法をとる。鼓膜穿孔が小さく、修復する箇所が平面的な部位の みであれば、これでも修復可能な場合がある。しかし、鼓膜の 形状は複雑で、しかも耳小骨が付着するため、鼓膜欠損が大き くなればなるほど平面的なシート状の素材で全体を覆うこと は難しくなる。完全に欠損部を覆うことができなければ、足場 のない部分が生じて鼓膜の修復が不可能となるか、あるいは、 周囲組織との癒着が生じて後遺症を残すことになる。実際、こ れまでの治療法では、ある程度以上の大きさの鼓膜欠損や耳小 骨にかかる欠損がある場合には、足場で欠損部全体を覆うこと ができないため、修復が不可能である。

一方、ゼラチンスポンジは、どのような複雑な鼓膜欠損に対 しても容易に全体を覆うことができ、鼓膜の全欠損に対して も有効である。ほとんど残存鼓膜のない大穿孔であっても本 治療法により再生が可能であるのは²⁰、この足場素材の選択に よる。また、ゼラチンスポンジには bFGF を徐放する効果もあ り²¹、そのことも鼓膜再生に有利に働いている。

本治療法による鼓膜再生が完了した症例を観察すると (図 5)、鼓膜の内側(鼓室側)にゼラチンスポンジの一部が残 存し、外側(外耳道側)には痂疲となって、ゼラチンスポンジ が分断されて存在していることがわかる。このことは再生鼓膜 が、非常に疎な構造をもつゼラチンスポンジの内部(図 4)を 進んで成長していることを示しており、この点が、これまでの 鼓膜再生療法と異なっている。すなわち、シート状のコラーゲ ン膜のような密な構造の足場に対しては、組織はその足場の内 部を進んで再生することはなく、上方か下方のいずれかに沿っ て再生する。一方、ゼラチンスポンジのような疎な構造の足場 は、細胞の伸長を妨害しないため、足場の中を再生細胞が通過 して鼓膜を修復することが可能となる。

2.4 良好な再生環境の維持

組織が再生するためには、生体内培養の良好な環境を整備する ことが重要である。本治療法では、フィブリン糊を滴下してゼ ラチンスポンジの表面をフィブリンの膜で被覆することによ り、一定期間足場を固定し、ゼラチンスポンジの内部を湿った 状態に保ち、外部から隔絶された培養環境を作り出している。

3. 処置の手順

鼓膜再生療法は in situ 組織工学の概念にもとづき、細胞・足 場・調節因子という組織工学の3要素のうち、細胞として内因 性の組織幹細胞/前駆細胞、足場としてゼラチンスポンジ(ス ポンゼル[®]、アステラス製薬)、調節因子としてbFGF(フィブ ラスト[®]、科研製薬)を用い、さらに再生環境を良好なものと するためにフィブリン糊(ボルヒール[®]、化学及血清療法研究 所/ベリプラスト[®]、CSLベーリング)を使用している。細胞 に関しては、細胞移植を行うのではなく、鼓膜穿孔縁の新鮮創 化によって、活動を停止している(休眠状態にある)内因性の 組織幹細胞 / 前駆細胞が活性化されることを利用している。

具体的な処置の流れを図6に示した。残存鼓膜とその周辺 を含めた外耳道を麻酔するために4%リドカインを含浸させ た綿球を外耳道から挿入し、約15~20分間留置する。その 後、鼓膜切開刀やローゼンの探針などを用いて、鼓膜穿孔縁の 新鮮創化を図る。その際、穿孔縁の全周にわたり、鼓膜が有す る3層構造すべてが露出するようにする。

次に、ゼラチンスポンジに bFGF を含浸させ、鼓膜穿孔の大 きさに合わせてそれをトリミングし、鼓室内および外耳道に充 填する。この際、ゼラチンスポンジが鼓膜穿孔縁と完全に接 し、残存鼓膜を鼓室側と外耳道側から挟むように、複数個のス ポンジを隙間なく留置することが重要である。最後にフィブリ ン糊を数滴滴下し、ゼラチンスポンジ全体を被覆・接着する。 3週後、鼓膜上面の痂疲を除去すると、再生した鼓膜を確認で きる。痂疲が固着している場合は、4%リドカインを含浸させ た綿球を外耳道から挿入し、約15~20分間留置した後に除 去するとよい。1回の鼓膜再生処置で完全な再生が得られない 場合は、鼓室内や外耳道内に残ったゼラチンスポンジなどを除 去した後に同処置を繰り返し行うが、最大4回までにとどめ る。これは、これまでの臨床経験から、5回目以降の処置で鼓 膜再生が達成される確率が非常に低いからである。また、鼓膜 再生処置を行った後、感染・炎症による耳漏を認めた場合は、 いったん再生処置を中止し、抗生物質の内服・点耳などにより 消炎・耳漏停止を図り、十分な時間間隔(数か月かかる場合 もある)ののち再開する。まれに、ゼラチンスポンジ、bFGF、 フィブリン糊に対するアレルギー反応を示す症例もあること を念頭においておく必要がある。

4. 臨床試験の結果

4.1 単一施設による予備試験

4.1.1 症例構成

本鼓膜再生療法の臨床における有効性と安全性を評価する目的 で、金井病院(京都)の治験審査委員会の承認を受け、書面に よるインフォームドコンセントが得られた患者を対象に、単一 施設による予備試験を実施した。患者は、鼓膜穿孔を有し、中 耳・外耳に活動性の感染・炎症がないことを確認した総数 218 例(232 耳)で、男性 101 例、女性 117 例、年齢は 8 ~ 91 歳



図6 鼓膜再生療法の処置の手順。1:4%リドカインを含浸させた綿球で、残存 鼓膜とその周辺を含めた外耳道を浸潤麻酔。2:鼓膜穿孔縁を新鮮創化。3、4: b-FGF 含浸ゼラチンスポンジを留置。5:フィブリン糊でゼラチンスポンジを被 覆。6:処置から3週後に痂疲を除去。

の範囲であった。鼓膜穿孔の原因の内訳は、慢性中耳炎(N = 136)、外傷性鼓膜穿孔陳旧症例(N = 42)、滲出性中耳炎に対 する鼓膜切開ないし鼓膜チューブ留置後の穿孔遺残(N = 26)、 鼓膜穿孔閉鎖術ないし鼓室形成術施行後の再穿孔(N = 15)、熱 傷(N = 4)、放射線照射後(N = 3)、不明(N = 6)であった。

鼓膜穿孔の大きさにより、患者を Grade I (鼓膜穿孔が全体の 1/3 以下)、Grade II (全体の 1/3 以上 2/3 未満)、Grade III (全体の 2/3 以上)の3 群に分類した。

鼓膜穿孔の大	きさによる分類	Grade I (<i>N</i> = 85)	Grade II (<i>N</i> = 83)	Grade III (<i>N</i> = 64)
鼓膜穿孔閉鎖	率	81.2% (69/85)	86.7% (72/83)	75.0% (48/64)
聴力改善(3 周波数の平均値)		9.1 dB	12.4 dB	16.3 dB
	真珠腫	1	3	5
有害事象	一過性耳漏	8	14	13
	鼓膜陥凹	4	8	7

Grade II、鼓膜穿孔が全体の 1/3 以下; Grade II、全体の 1/3 以上 2/3 未満; Grade III、全体の 2/3 以上

TM、鼓膜;AEs、有害事象;Chole、真珠腫性中耳炎;TO、一過性耳漏; DTM、鼓膜陥凹

表1 鼓膜再生療法に関する単一施設による予備試験の結果。



図7 慢性中耳炎を30年前から患っている65歳女性に対する鼓膜再生療法。 1:再生処置前。2:鼓膜穿孔縁を新鮮創化。3:b-FGF 含浸ゼラチンスポンジを 留置し、フィブリン糊で被覆。4:処置から3週後の再生した鼓膜と、鼓室内に 残ったゼラチンスポンジ。5、6:鼓室内に残ったゼラチンスポンジを除去する と、処置から4か月後の再生した鼓膜には多くの血管が認められる。

4.1.2 処置の手順

処置の手順は上述のとおりである。処置後は、患者に強い鼻す すりや鼻かみなど耳に圧力がかかるようなことをしないよう、 また洗髪・入浴時に患側耳に水が入らないよう注意し、3週間 後の外来受診を指導した。

4.1.3 評価法

鼓膜穿孔閉鎖の成功を、穿孔の大きさ、閉鎖に要した処置の回 数、最終処置3か月後の聴力改善の程度で評価した。有害事象 の有無は記録された。

4.1.4 結果

結果を表1に、再生例を図7に示す。鼓膜穿孔閉鎖率は81% (189/232 耳)で、気骨導差の少ない良好な聴力改善が得られ た。鼓膜再生が成功した189 耳のうち、閉鎖に要した処置の 回数は2回以下が80%以上を占めていた(図8)。有害事象と しては一過性耳漏が最も多く(35/232 耳、15.1%)、鼓膜陥 凹した症例(19/232 耳、8.2%)の一部で鼓膜切開を要した ものがあった(5/232 耳、2.2%)。また、真珠腫(9/232 耳、 3.9%)は鼓膜上皮下にできたもので、いずれも探針で除去で きる程度のものであった。

鼓室形成術などで鼓膜輪やツチ骨が欠損した術後の症例で は、再生が難しかった。鼓膜輪やツチ骨が温存されていたとして も、術後症例での閉鎖率は26.7%(4/15 耳)であった。熱傷、 放射線治療後の鼓膜穿孔例は、まったく再生しなかった。以上 の結果から、これらの症例では組織幹細胞/前駆細胞の消失が 考えられた。3か月の観察期間中、4例に再穿孔が認められたが (4/232 耳、1.7%)、大きさはすべてピンホール程度であった。

5. 鼓膜再生療法の適用基準

5.1 鼓膜再生療法の適用除外項目

鼓膜穿孔を有する患者のうち、鼓膜再生療法の現在の適用基準 を満たすものは、わずか 20 ~ 30%程度である。今後、適用 患者数をいかにして増大させるかが大きな課題となる。次に示 す鼓膜再生療法の適用除外項目は、これまでの臨床試験などの 結果を踏まえたものである。

1. 鼓室や外耳道に活動性の感染・炎症あるいは耳漏がある患者

2. 鼓膜、鼓室、外耳道が湿った状態であるか、残存鼓膜に高度 の石灰化を認める患者

- 3. 側頭骨の高分解能CTで鼓室や乳突腔に軟部組織陰影がみら れる患者
- 4. 鼓膜形成術や鼓室形成術のような中耳手術の既往がある患者
- 5. 熱傷もしくは放射線治療による鼓膜穿孔の患者
- 6. 中耳の正常な形態が損なわれている患者(鼓膜輪の欠損や 残存鼓膜の癒着など)
- 7. 外耳道が狭いために鼓膜穿孔縁の顕微鏡による直接の観察 が不可能な患者

このうち1~3は再生環境が悪い状態、4~6は鼓膜再生 のもとになる組織幹細胞/前駆細胞が部分的にあるいは完全 に欠如した状態、7は外耳道が狭いために鼓膜穿孔縁の全周に わたる新鮮創化ができない状態、と分類できる。

5.2 適用拡大に向けて

適用除外項目の中で、4~6の組織幹細胞/前駆細胞が欠如し た状態は最も再生が難しく、細胞と足場の同時移植以外に再生 方法はないと考えられる。一方、1~3では、再生環境を改善 できれば、鼓膜再生が可能となる。また、7では、外耳道が狭い ために鼓膜穿孔縁が顕微鏡で直視できないが、内視鏡を使用す ることで鼓膜全体の観察と処置が可能になるようであれば、内 視鏡下での鼓膜再生が可能であり、それでも観察・処置が困難 な症例では、外耳道拡大後の鼓膜再生といった手段が考えられ る。4~6と比較すると、これらのいずれの処置も容易に行え るものである。3の鼓室や乳突腔に軟部組織陰影がみられる状 態では、通常、鼓室形成術・乳突削開術などで骨削開を行い、 これらの病変を除去する必要がある。また、6のうち中耳の形 態が著しく損なわれている場合や、癒着性中耳炎などで残存鼓 膜に大きな変形がある場合は、再生が非常に困難と考えられる。

5.3 再生処置前に行う再生環境の改善

慢性中耳炎の非活動期で耳内が湿った状態の症例、あるいは活動性の感染・炎症や耳漏があるが、そのほかの適用基準を満たす症例(いわゆる慢性中耳炎の急性増悪)に対しては、まず保存的治療として抗生物質の内服・点耳を行って、1、2か月経過観察する。これにより消炎が可能となった場合、手術室で鼓室内の洗浄を繰り返し行い、綿球で鼓室内の粘液などの除去を 十分に行った後に続けて鼓膜再生処置を施行する。この方法での鼓膜穿孔閉鎖率はかなり高く、自験例では70~80%となっている(図 9)²⁰。



図8 予備試験における鼓膜穿孔閉鎖率と閉鎖に要した処置の回数。最大4回の 処置による鼓膜穿孔閉鎖率は81%(189/232耳)であった。閉鎖に要した処置 の回数は2回以下が82%を占めていた。

残存鼓膜に高度の石灰化・異所性骨化を認める症例、あるい は鼓膜裏面に上皮の侵入(真珠腫)を認める症例では、これら の残存鼓膜をすべて除去したうえで鼓膜再生処置を施行する (図 9)。

鼓室内に限局した病変がある症例、主として鼓室内に限局した真珠腫や腫瘍に対しては、真珠腫や腫瘍を除去した後に鼓膜 再生処置を続けて施行する。病変の除去は顕微鏡下あるいは内 視鏡下いずれで行ってもよいが、その後必ず内視鏡による鼓室 内の観察を行い、鼓室内に残存病変がないことを確認する必要 がある。鼓室内に限局した真珠腫、なかでも先天性真珠腫は、手 術時間も短く最もよい適用となる。また、腫瘍の中では、鼓室 型グロームス腫瘍がよい適用である。これらの症例での鼓膜穿 孔閉鎖率は非常に高く、自験例では 95%以上となっている²⁰。

5.4 外耳道狭窄への対策

鼓膜穿孔の有無にかかわらず、外耳道が狭い症例は比較的よく みられる。外耳道は長さ約 30 ~ 35 mm、直径約 10 mm の管 状構造で、入口から手前 1/2 が軟骨部外耳道、奥 1/2 は骨部 外耳道となっている。成人と小児では若干の形状の差はある



図 9 慢性中耳炎を有する 39 歳女性に対する鼓膜再生療法。処置前(1、2)および処置から 2 か月後(3)のファイバースコープ所見。この症例は耳漏があり、残 存鼓膜には石灰化(黒い矢印)が認められた。外耳道の前壁と下壁が張り出しているため(白い矢印)、鼓膜穿孔縁の顕微鏡による直接の観察は不可能であった。鼓 室内の洗浄を行い、石灰化した残存鼓膜を内視鏡的に除去してから鼓膜再生処置を施行した。処置から 2 か月後の再生した鼓膜には石灰化もなく正常にみえる。

が、軟骨部と骨部の移行部で軽度屈曲している(図 2)。外耳 道狭窄例では、骨部外耳道の張り出しのために、鼓膜穿孔縁の 顕微鏡による直接の観察が不可能になっていることが多い。こ の場合、上述したように内視鏡を使用することで、ほとんどの 症例で鼓膜穿孔縁の新鮮創化が可能となる。しかし、外耳道の 張り出しが極端に強い症例では、内視鏡とともに手術器具を入 れて操作できないため、外耳道の拡大が必要となる。

外耳道狭窄部の内腔表面に、長軸に沿った方向とそれに垂直 な方向に切開線を入れ、表面の軟組織を一部剥離して張り出し た骨面を露出し、ダイヤモンドバーを用いて削除して表面を平滑 にする。鼓膜穿孔縁が十分に観察できるまで拡大し、鼓膜再生処 置を施行する。この後、剥離した外耳道軟部組織をもとに戻し、 鼓膜再生処置で使用した bFGF 含浸ゼラチンスポンジ片を骨露 出部を中心に留置し、フィブリン糊で固定する。骨露出範囲が広 い場合は、外耳道全体にゼラチンスポンジを充填し、フィブリン 糊で固定する。その後、医療用フィルムで耳介全体をカバーして 密閉する。充填したゼラチンスポンジは3週後に除去する。この 方法により、外耳道軟組織と鼓膜の同時再生が可能である²⁰²²。

6. 今後の展望

6.1 慢性中耳炎症例に対する展望と課題

鼓膜再生療法の最大の目的は、患者の負担が少ない低侵襲手術 による、気骨導差のない理想的聴力の回復である。鼓膜穿孔を 閉鎖することのメリットは、聴力改善や違和感の消失、中耳炎 の防止や長期的には中耳・内耳の保護など非常に多い。しかし、 聴力に関しては、単純に鼓膜穿孔だけの問題ではなく、中耳・ 内耳さらには後迷路、中枢神経に至る複雑な要因がかかわって いる。例えば、乳突蜂巣の発育が悪く、耳管機能の悪い鼓膜穿 孔症例に対して鼓膜再生処置を行った場合、穿孔を通じてなさ れていた中耳圧の調節ができなくなるため、鼓膜の陥凹や滲出 性中耳炎が発症し、聴力の回復が不十分になることもある。

鼓膜穿孔のおもな原因は、慢性中耳炎である。したがって、 慢性中耳炎症例の鼓膜再生は、最も大きな課題である。慢性中 耳炎症例の多くは、鼓室のみならず乳突腔にも病変が存在し、 乳突蜂巣の発育が悪く、耳管機能も悪いことが多い。このよう な症例では、従来の鼓室形成術・乳突削開術と鼓膜再生療法の 併用による治療が考えられる。すなわち、鼓室内病変と乳突腔 の病変は乳突削開術を含めた術式によって除去し、鼓室と乳突 腔の交通を十分につけたうえで、通常の自家組織移植ではなく 鼓膜再生療法により鼓膜を再建する。しかし、鼓膜再生を可能 にするためには、組織幹細胞 / 前駆細胞を温存する目的で、鼓 膜は全層剥離で鼓膜輪を損傷しないこと、ツチ骨およびツチ骨 柄・鼓膜臍に付着している残存鼓膜を温存することが必要不可 欠である^{13,14}。このため適用症例は限られ、より高度の手術手 技が要求される。また、真珠腫性中耳炎では、中耳ガス交換能 の障害により、中耳の陰圧化、上鼓室の陥凹、真珠腫の形成が 起こるが、ここに至るメカニズムを改善しなければ、再発が起 こってしまう。さらに、中耳の陰圧化は癒着性中耳炎も引き起 こすので、鼓室形成術・乳突削開術と鼓膜再生療法を単に併用 するだけでは、この疾患の完治は望めない。乳突蜂巣再生術な ど、中耳ガス交換能の改善を含めた手術 23.24 との併用が必要に なると考えられる。

6.2 組織幹細胞 / 前駆細胞が欠如した症例に対する展望と課題 組織幹細胞 / 前駆細胞が欠如した状態は、最も再生が難しいと 考えられる。したがって、組織幹細胞 / 前駆細胞をどのように 確保するかが、きわめて重要な問題となる。これらの細胞が鼓 膜輪、ツチ骨柄・鼓膜臍に存在する可能性が高いことはすでに 述べた^{14,15}。鼓膜は複雑な形状をしており、その再生には鼓膜 輪とツチ骨が両者ともに必要不可欠と考えられる。具体的な方 法として、例えば死体から、鼓膜輪とツチ骨を含めた鼓膜を得 る方法が考えられる。それらを脱細胞化し、抗原となる物質を 除去したのちに、患者由来の間葉系幹細胞を培養する処置を経 て、これを足場として移植するといった方法である。この場 合、部分的移植か全移植かは症例ごとに検討する必要がある が、鼓膜や耳小骨の大きさには個人差が少ないこともあり、鼓 室形成術との併用で実現可能な治療法である。

6.3 鼓膜再生療法の展望

通常の鼓膜形成術などの耳科手術は、本格的な手術室と多岐に わたる手術器具が必要で、通常は全身麻酔下で施行される。ま た、耳後部の皮膚切開と側頭筋膜など自家組織の採取をはじめ とし、外耳道の剥離、骨削開、鼓膜上皮層の挙上、穿孔縁の新 鮮創化、側頭筋膜の移植、タンポンワークなど多段階の手術処 置を要し、少なくとも1時間程度の手術時間が必要である。加 えて、感染や移植筋膜のずれを防止するために、一定期間の安 静や日常生活における制約を伴う。さらに大きな問題として、 これらの耳科手術を施行できる技量をもった医師の養成には かなりの年月を要し、それを指導する上級医の存在が不可欠で ある。これに対し、本鼓膜再生療法で単純穿孔を処置する場合 には、穿孔縁の新鮮創化とゼラチンスポンジの留置のみを行え ばよく、わずか15分程度の処置で終わる。外来の診療用の椅 子あるいは簡易ベッド上での処置が可能で、使用する処置器具 も3、4種類にとどまり、簡便な顕微鏡あるいは内視鏡があれば 十分治療可能である。術後の入院や安静も不要で、処置後の通 院も3、4週に1回程度で済む。また、医師の養成に関しても、 従来の手術手技と比較して非常に容易であることから、短期間 により多くの術者を育成可能である。医療経済的な視点から両 治療法を比較すると、鼓膜再生療法は鼓膜形成術の数分の1以 下の費用に収まることになる。費用効率の利点に加えて、鼓膜 穿孔閉鎖率はほぼ同程度を達成し、聴力の改善については鼓膜 再生療法の方がはるかに良好な結果をもたらすことができる。

途上国にあっては若年者層が患者のボリュームゾーンである ことから、鼓膜再生療法の手軽さとコストの面でのメリットは、 大きな利点となる。先進国ではさらに、鼓膜穿孔に対する治療 をあきらめていた中高年層の治療に対する心理的ハードルを下 げ、難聴による認知症のリスクを減らすことが可能になる。

文献

- 1. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. Science 260, 920-926 (1993).
- Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A. *et al.* Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.* 23, 3–9 (1988).
- Vacanti, C. A., Kim, W., Upton, J., Vacanti, M. P., Mooney, D. et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant. Proc.* 25, 1019–1021 (1993).
- Kanemaru, S., Umeda, H., Kitani, Y., Nakamura, T., Hirano, S. et al. Regenerative treatment for tympanic membrane perforation. Otol. Neurotol. 32, 1218–1223 (2011).
- Omae, K., Kanemaru, S., Nakatani, E., Kaneda, H., Nishimura, T. *et al.* Regenerative treatment for tympanic membrane perforation using gelatin sponge with basic fibroblast growth factor. *Auris Nasus Larynx* 44, 664–671 (2017).
- Ahmad, S. W. & Ramani, G. V. Hearing loss in perforations of the tympanic membrane. J. Laryol. Otol. 93, 1091–1098 (1979).
- Acuin, J. Child and Adolescent Health and Development Prevention of Blindness and Deafness. World Health Organization (Geneva, 2004, WHO).
- Jin, Z.-H., Lou, Z.-H. & Lou, Z.-C. Assessment and spontaneous healing outcomes of traumatic eardrum perforation with bleeding. *Am. J. Otolaryngol.* 38, 479–483 (2017).
- Kim, J. H., Choi, S. J., Park, J.-S., Lim, K. T., Choung, P. H. et al. Tympanic membrane regeneration using a water-soluble chitosan patch. *Tissue Eng. A.* 16, 225–232 (2010).
- Johnson, A. P., Smallman, L. A. & Kent, S. E. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Oto-Laryngol.* 109, 406–415 (1990).
- Fina, M., Bresnick, S., Baird, A. & Ryan, A. Improved healing of tympanic membrane perforations with basic fibroblast growth factor. *Growth Factors* 5, 265–272 (1991).
- Mondain, M. & Ryan, A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope* 103, 312–318 (1993).
- Ma, Y., Zhao, H. & Zhou, X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Oto-Laryngol.* 122, 586–599 (2009).
- Knutsson, J., von Unge, M. & Rask-Andersen, H. Localization of progenitor/stem cells in the human tympanic membrane. *Audiol. Neurootol.* 16, 263–269 (2011).
- Liew, L. J., Chen, L. Q., Wang, A. Y., von Unge, M., Atlas, M. D. *et al.* Tympanic membrane derived stem cell-like cultures for tissue regeneration. *Stem Cells Dev.* 27, 649–657 (2018).
- Virag, J. A. I., Rolle, M. L., Reece, J., Hardouin, S., Feigl, E. O. *et al.* Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am. J. Pathol.* **171**, 1431–1440 (2007).
- Vrabec, J. T., Schwaber, M. K., Davidson, J. M. & Clymer, M. A. Evaluation of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane repair. *Laryngoscope* **104**, 1059–1064 (1994).
- Kato, M. & Jackler, R. K. Repair of chronic tympanic membrane perforations with fibroblast growth factor. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 115, 538–547 (1996).
- Rohanizadeh, R., Swain, M. V. & Mason, R. S. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. J. Mater. Sci. Mater. Med. 19, 1173–1182 (2008).
- Komura, M., Komura, H., Kanamori, Y., Tanaka, Y., Suzuki, K. *et al.* An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J. Pediatr. Surg.* 43, 2141–2146 (2008).
- Kanemaru, S. I., Kanai, R., Yoshida, M., Kitada, Y., Omae, K., & Hirano, S. Application of regenerative treatment for tympanic membrane perforation with cholesteatoma, tumor, or severe calcification. *Otol. Neurotol.* **39**, 438–444 (2018).
- Takemoto, S., Morimoto, N., Kimura, Y., Taira, T., Kitagawa, T., Tomihata, K. *et al.* Preparation of collagen/gelatin sponge scaffold for sustained release of bFGF. *Tissue Eng.* A 14, 1629–1638 (2008).
- Kanemaru, S., Umeda, H., Kanai, R., Tsuji, T., Kuboshima, F. *et al.* Regenerative treatment for soft tissue defects of the external auditory meatus. *Otol. Neurotol.* 35, 442–448 (2014).
- Kanemaru, S., Nakamura, T., Omori, K., Magrufov, A., Yamashita, M. *et al.* Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. *Laryngoscope* 115, 253–258 (2005).

The Principles of Regenerative Medicine 再生医療原論



2020年1月X日 初版第一刷発行

企画・総合監修	公益財団法人神戸医療産業都市推進 医療イノベーション推進センター
	センター長 福島 雅典
執筆	福島 雅典、本望修、湊口信也、藤田靖之、黒田良祐、外園千恵、金丸眞一他
発行	公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター
	〒 650-0047 神戸市中央区港島南町 1-5-4
	TEL 078 (303) 9095

advances.tri-kobe.org www.tri-kobe.org

ISBN 978-4-9905705-2-3 © 2019 公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 医療イノベーション推進センター

