

心肌再生治療

(成大醫院 心臟內科) 劉嚴文 醫師

目前心臟衰竭的治療主要是通過阻斷「神經-內分泌 (neurohumoral)」系統活化，進而減少心臟衰竭的發病率和降低死亡率。然而，這些療法都不能治癒心臟衰竭，而且也無法促使心肌細胞再生。傳統的觀念認為成年哺乳動物已不具有心肌細胞再生的功能。然而，近來研究指出成年哺乳類動物的心臟仍具有心肌細胞再生能力。據估計人類心臟每年大約再生 0.5~1% 的心肌細胞¹。

過去的研究指出發生一次心肌梗塞會導致十億個心肌細胞的損失²，雖然目前認為成年哺乳動物的心臟具有心肌再生能力，但是，要修復因為心肌梗塞而損失的心肌細胞仍是一件艱鉅的挑戰。目前的心肌再生研究大致上可以分為四大類：(i) 誘導已存在的心肌細胞重新進入細胞週期，以產生新的心肌細胞；(ii) 經由直接的細胞基因重組使得心臟內「非心肌細胞 (noncardiomyocytes)」分化成為「心肌細胞」；(iii) 增加內生性的心臟幹細胞 (cardiac progenitor cells, CPCs) 活性；及 (iv) 對於心肌梗塞或是心臟受損部位，注射幹細胞或是經由幹細胞分化而產生的心肌細胞。

研究策略 1：誘導已存在的心肌細胞重新進入細胞分裂週期

在齧齒動物中，心肌細胞於出生後第 7 天

退出細胞週期，而喪失心臟再生能力³。在成熟齧齒動物的心肌細胞，細胞週期的基因，如 cyclin A, cyclin B, 和 CDC2 會被抑制表現，而細胞週期蛋白酶抑制劑 (cyclin-dependent kinase inhibitor) 會被活化。這些細胞週期監管機構正在轉錄和表觀遺傳調控中的心肌細胞。例如，Rb/p130 異染色質 (heterochromatin) 形成會調控 E2F 調控細胞週期的基因使得心肌細胞自細胞分裂週期離開，而喪失細胞分裂能力，所以抑制 Rb 和 p130 的活性會減少 heterochromatin 形成，抑制細胞週期基因的表現，促使成熟的心肌細胞再次進入細胞分裂週期⁴。此外，共同活化 promitogenic 基因可能會比調控單一細胞週期基因具有更大的效果。

MicroRNA (miRNA) 能影響多個基因表現，因此，或許能夠活化成人心肌細胞的分裂程序。利用 adeno-associated virus 可以將 miRNA 成功地運送進入心臟，然後產生作用。研究發現 miR-590 和 miR-199A 可以刺激成熟的心肌細胞再次進行細胞分裂，進而修補心肌梗塞⁵。

旁泌素 (paracrine) 也可能調控心肌細胞增殖。Neuregulin (NRG1) 可以經由 ErbB2 / ErbB4 的訊息傳導路徑來促進胎兒心肌細胞增殖和分化，同時也可以驅使成年小鼠心肌細胞增殖。由於在動物實驗中已證實 NRG1

改善受損的心臟功能，recombinant human NRG1 (rhNRG1) 已開始心臟衰竭治療的臨床試驗。第一期臨床試驗發現連續 11 天輸注 rhNRG1，心衰竭患者並沒有產生副作用，並且能改善心臟功能，效果至少持續 3 個月⁶。目前正在進行隨機、多中心的臨床研究（例如，NCT01541202）。

刺激心肌細胞重新進入細胞分裂週期似乎可以有效地用於心臟再生。可能這是因為它利用了內生的心臟生長發育機制。雖然前景看好，但是仍有許多問題仍待解決。例如，我們必須確認哪些基因的調控可以施刺激成熟的心肌細胞重新進入細胞分裂週期，如何去測量新生成的心肌細胞數量等等。由於這類治療可能會引起細胞癌變，因此必須證實，這些治療是安全的，不會損害心臟或其他器官。

研究策略 2：NONCARDIOMYOCYTES 基因重組

藉由表現某一基因可以刺激原本已分化的細胞轉化為另一種型態的細胞，此一轉化過程稱之為細胞重新編程 (cellular reprogramming)。當 cellular reprogramming 不須經由多能幹細胞，而能夠直接轉換成另一個分化的細胞類型，這稱為「直接重新編程」。反轉錄病毒可以將重要的心臟轉錄因子，包含 Tbx5, MEF2C, 和 GATA4, 送入纖維母細胞內，成功地將小鼠纖維母細胞 (fibroblast) 變成“誘導類心肌細胞” (induced cardiomyocyte-like cells, iCMs)⁷，並且能夠在心肌梗塞的情況下，減少梗塞範圍、產生新生心肌細胞以及

改進的心臟功能⁸，但是這些新生的心肌細胞大多數都是不成熟細胞。

「細胞重新編程」可以直接利用心肌梗塞範圍內的纖維母細胞，來生成新的心肌細胞，進行心臟修補，如此一來，可以避免免疫排斥問題，不需要在體外準備大量心肌細胞，同時可以克服心肌細胞注射以注射後的存活度等問題。這樣的結果似乎提供心肌再生研究的一個美好方向，但是，依然有許多困難仍待克服。例如「細胞重新編程」的效率不佳，iCMs 的成熟度以及功能仍極需改進。iCMs 是否會引起心律不整仍然有待確認。目前，所有「直接細胞重新編程」的方法需使用病毒當作載體將轉錄因子送入細胞內，但是這樣的方式也證實可能會導致基因組破壞以及腫瘤新生等重大風險。因此，如何找到最適當、最有效率的方法來進行「細胞重新編程」將是至關重要。

研究策略 3：增強內生性心臟幹細胞 (CPCs) 的活動

在正常的情况下，成熟心臟內的 CPCs 不會分化成心肌細胞。然而，心肌受損可能會促使 CPCs 分化生成心肌細胞，進而修復心臟。早期的研究顯示 c-kit⁺ CPCs 會有 HGF 和 IGF-1 的受體。而 IGF-1 可以增加細胞的存活率和促進細胞增殖。HGF 和 IGF-1 合併使用可以動員 c-kit⁺ CPCs 以及改善心肌梗塞後的心臟功能。然而，最近的研究指出 c-kit⁺ CPCs 雖然可以在受損的心臟組織內進行分化，新生成心肌細胞，但是分化效率極差，只能產生極少數的心肌細胞，致使無法改善任何心臟功

能⁹。

另一種心臟幹細胞位於心外膜 (epicardium)，在心臟發育的過程中，心外膜心臟幹細胞形成心外膜衍生細胞 (epicardium-derived cells, EPDCs)，能分化成大多數的心臟纖維母細胞和冠狀動脈平滑肌細胞。同時 EPDCs 也分化成為少數的內皮細胞和心肌細胞。近來的研究著眼於如何利用旁泌素 (paracrine) 等方式來調控 EPDCs，以增強心肌修復和再生。

旁泌素的治療效果往往取決於劑量的多寡，注射旁泌素的方式、位置和時間。例如，使用「修改的核糖核酸 (modified RNA, modRNA)」可以有效地轉染 (transfect) 許多細胞，中包括心臟細胞，而且避免活化免疫系統和細胞毒性。modRNA 可以顯著擴大 EPDCs 的數量並使他們滲透入心肌。此外，modRNA 也可以促使 EPDCs 生成內皮細胞，從而提高梗塞周邊區域的血液灌流。雖然這樣的方法似乎是個不錯的選擇，但是依然需要進一步地確定使用 modRNA 的安全性以及最佳的治療方式與劑量。

研究策略 4：細胞治療

過去的二十年間，幹細胞移植一直是修復甚至是再生心臟的熱門議題。早期的研究曾經嘗試移植骨骼肌幹細胞，然而這些肌肉幹細胞無法分化成心肌細胞，甚至這些移植細胞的電活動不會與宿主心肌細胞同步。由於不良的電氣整合的結果，導致心律不整。

在骨髓捐贈者與受贈者性別不同的骨髓移

植患者心臟研究，發現骨髓受贈者的心臟會有骨髓捐贈者的基因表現，因此推論骨髓幹細胞可能會生成心肌細胞。哈佛大學的 Prof. Anversa 早期的研究指出注射 c-kit⁺ 骨髓幹細胞進入心肌梗塞的邊緣區域，可以在小鼠的心肌梗塞部位生成新的心肌細胞。然而，後來的研究卻是指出 c-kit⁺ 骨髓幹細胞無法分化形成心肌細胞^{10,11}。而這樣不同的結果可能是因為移植的骨髓幹細胞與宿主心肌細胞融合，組織切片染色的誤差以及選擇性的研究結果等。雖然骨髓幹細胞已被證實不會新生心肌細胞，但是仍然有許多臨床試驗在嘗試利用骨髓細胞，包含間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells)，造血幹細胞和內皮幹細胞，來治療缺血性心臟病。這些試驗證實，骨髓衍生細胞製劑可以安全地直接進行心肌內或冠狀動脈內注射，但治療效果卻莫衷一是，無法明確證實骨髓細胞治療可以改善病患的心臟功能。

Prof. Anversa 的研究團隊後來指出由心臟分離出的 c-kit⁺ CPCs 可以自我更新 (self-renewal) 以及能分化成心肌細胞，平滑肌細胞和內皮細胞。將 c-kit⁺ CPCs 注射到啮齒類動物心臟內，這些細胞可以形成具有功能的心臟血管和相當數量的再生心肌，並且修復心臟功能。隨後第 1 期臨床試驗 (Cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy, SCIPIO) 報告將病患自體的 c-kit⁺ CPCs 經由冠狀動脈內注射可以有效地縮小心肌梗塞範圍以及改善心臟收縮功能¹²。然而，最近 Harvard University 卻主動調查 Prof. Anversa 的一系列 c-kit⁺ cardiac stem cells 的研究，並且主動將其

中一篇發表在 *Circulation* 的論文撤回，c-kit⁺ cardiac stem cells 未來的發展仍有待觀察以及更進一步地研究。

到現在為止，只有多能幹細胞 (pluripotent stem cells) 被證實有幾乎無限的自我更新能力和多種細胞分化能力。多能幹細胞包含了胚胎幹細胞以及人造萬能幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)。目前已知將未分化多能幹細胞注射入心臟內將會形成的畸胎瘤，因此現今的幹細胞治療研究已不再將未分化的多能幹細胞直接移植心臟，取而代之的是先在體外進行心肌分化的工作，之後再把已分化的心肌細胞做細胞治療之用。過去許多的研究顯示這樣的細胞治療不論是在小動物 (例如大鼠、天竺鼠) 或是大動物實驗中都證實可以改善心肌梗塞動物的心臟功能¹³⁻¹⁵。甚至在天竺鼠的研究中發現由人類胚胎幹細胞分化所得的心肌細胞甚至可以抑制心室頻脈的發生¹⁴。可能的作用機制包含了移植的細胞可以在心肌梗塞區域存活，修補了部分心肌梗塞部位。另外，移植的幹細胞也會分泌旁泌素促進心臟修復因子分泌、心肌再生以及促進心肌血管新生。但是，值得注意的是最近一項「非人靈長類」心肌梗塞模型的研究證明由人類胚胎幹細胞衍生的心肌細胞可以修補心肌梗塞，但是卻可能會引起心室頻脈¹⁶。

雖然人類胚胎幹細胞衍生的心肌細胞理論上是可以治療缺血性心臟病。然而，眼前仍有許多困難：倫理問題的考慮，人類胚胎幹細胞衍生心肌細胞的不成熟，需要非常大量心肌細胞，免疫排斥問題以及安全性 (必須證明不會

形成畸胎瘤或致命性心律不整)。

在大多數方面，iPSC 表現像胚胎幹細胞一樣，具有強大的細胞分化能力，可以迴避胚胎幹細胞的倫理與免疫排斥問題。然而，生產這種細胞將需要長達數個月的準備，並無法治療急性或是亞急性 (subacute) 疾病。此外，目前要產生 iPSC 需要使用基因調控的方式，這樣的方式卻會引起細胞癌變的疑慮。

結論

在過去十年，心臟生物學的研究已有了巨大的變化。心臟不再視為一個分化末期的器官而缺乏再生的能力，現今的觀點認為心臟具有一定程度的再生機制。目前有多個研究方向正在進行，嘗試以創新的方法增加或補充心臟的再生能力。儘管心臟再生的目標已露曙光，但是仍有許多難題橫亙在前。在開始大規模臨床試驗之前，我們仍然需要更多基礎醫學以及轉譯醫學的研究，來解決目前種種難題。

References

1. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324:98-102.
2. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*. 2005;23:845-856.
3. Porrello ER, Mahmoud AL, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331:1078-1080.
4. Sdek P, Zhao P, Wang Y, et al. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes. *J Cell Biol*. 2011;194:407-423.
5. Eulalio A, Mano M, Ferro MD, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012;492:376-381.

6. Jabbour A, Hayward CS, Keogh AM, et al. Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:83-92.
7. Ieda M, Fu JD, Delgado-P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 2010;142:375-386.
8. Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature.* 2012;485:593-598.
9. Van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature.* 2014;509:337-341.
10. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428:664-668.
11. Balsam LB, Wager AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428:668-673.
12. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2011;378:1847-1857.
13. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007;25:1015-1024.
14. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, et al. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature.* 2012;489:322-325.
15. Ye L, Chang YH, Xiong Q, et al. Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell.* 2014;15:750-761.
16. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature.* 2014;510:273-277.

