

幹細胞治療在急性心肌梗塞之角色

(台北榮民總醫院心臟內科) 黃柏勳 醫師

摘要

幹細胞再生醫學是治療缺血性心臟病相當具有潛力的治療方式之一，目前已有許多基礎與臨床研究陸續投入探討幹細胞治療在臨床應用的可行性。而許多研究顯示在組織缺氧如發生梗塞後的心臟肌肉給予骨髓幹細胞 (bone marrow-derived stem cells) 或前驅細胞 (progenitor cells) 可以適度地改善心臟肌肉的收縮功能，減少心肌梗塞的範圍，其作用機轉除了極少部份幹細胞可以轉化成心臟細胞外，幹細胞治療亦可以增加缺氧組織中的新生血管，或者刺激缺氧組織中細胞大量分泌生長因子的方式來減少細胞的凋亡，因此減少組織因缺氧所可能造成的傷害。而其中利用骨髓來源的幹細胞來治療病患因急性心肌梗塞所造成心肌缺氧面積來改善病患心臟收縮功能的方式是目前最為被使用的方法。然而利用幹細胞治療急性心肌梗塞患者仍屬於早期階段，許多不了解的問題依然存在，例如：如何確認什麼樣的患者給予幹細胞治療能得到好處、什麼種類的幹細胞最有臨床治療效果、什麼時候是幹細胞治療最好的時間點、以及什麼途徑是給予幹細胞治療最好的方式等，這些關鍵且重要的問題皆還需要許多臨床與基礎研究進一步來回答。雖然目

前臨床上利用幹細胞治療並沒有出現重大的副作用，但幾個潛在的安全問題（例如：是否會刺激癌症血管新生）仍需要長期的追蹤。

關鍵詞：幹細胞再生醫學、新生血管、急性心肌梗塞

前言

儘管目前醫療技術突飛猛進，有許多新的治療發展出來被用來治療缺血性心臟血管疾病，包括臨床藥物的進步與介入性心導管技術的突破，已大幅改善病患因缺血性心臟病所造成的傷害，雖然如此缺血性心臟病仍是工業化國家中一個主要的死亡原因，特別是許多患者若未能及時接受心肌灌流治療並恢復缺氧組織的血液循環，病患日後可能出現嚴重的心臟衰竭問題。而幹細胞治療藉由修復壞死心肌細胞與增加缺氧組織的新生血管方式，來改善心臟收縮功能，是未來相當具有潛力的治療方式。在過去的十年來，已有部份研究指出心肌細胞具有再生的能力，另一方面可以利用幹細胞治療來改善發生心肌梗塞後心肌壞死的範圍，並增加缺氧組織中新生血管的形成。2001年開始有臨床研究利用抽取骨髓組織內的幹細胞來治療周邊血

管疾病或缺血性心臟病，而幹細胞因具有自我更新與再生能力，可以經誘導分化成不同組織與細胞，而前驅細胞則在分化上比骨髓幹細胞更進一步，但仍較已分化完成的細胞具有再生與更新能力。此外，亦有臨床研究利用胚胎幹細胞來治療發生梗塞之心肌細胞，但到目前為止，骨髓組織仍是幹細胞治療最常使用的來源。

運用於幹細胞治療的細胞種類

許多研究發現多種不同類型的幹細胞皆具有促進血管新生和修復心臟的能力。一般來說，有兩種不同類型的幹細胞應該分開討論：胚胎幹細胞（embryonic stem cells）和成人幹細胞（adult stem cells）。胚胎幹細胞具有分化成多種細胞類型和組織的能力，而成人幹細胞分化成多種細胞類型和組織的能力較為有限。本次文獻回顧將著重於討論不同類型的成人幹細胞其治療缺血性心臟病的臨床效果。

成人幹細胞包括三種不同組織來源：包括骨髓幹細胞，血液循環中的前驅細胞，及存在於組織中的幹細胞（tissue-resident stem cells）。

來自骨髓組織的幹細胞其特點為容易界定所使用的幹細胞種類，而骨髓幹細胞是目前最常被使用於臨床試驗的幹細胞來源。骨髓組織中包含了各種不同的幹細胞，包括：造血幹細胞（Hematopoietic stem cells）、及“side-population cells”、骨髓間質幹細胞

（Mesenchymal stem cells）、基質細胞（stromal cells），和多分化潛能的成體前驅細胞（Multipotential adult progenitor cells）。研究顯示這些來自骨髓的幹細胞在進入缺血組織後，具有修復受損組織或促進血管新生的能力。而抽取出骨髓細胞在經過梯度離心後，可分離出一層單核球細胞（bone marrow-derived mononuclear cells），這層細胞含有約 2-4% 的造血幹細胞及內皮前驅細胞、間葉幹細胞（<0.1%），及極少量的 side population cells。從動物實驗發現若利用 G-CSF 或使用特殊方法分離出富含 CD34+ 的單核球細胞，比單純從周邊血分離出的單核球細胞更具有治療心肌梗塞的效果，但是 CD34+ 的單核球細胞是否比骨髓的單核球細胞更具有治療效果則還需要進一步的研究證實。

另一個也被證實具有治療潛力的幹細胞來源存在於血液循環內，即所謂的“內皮前驅細胞（endothelial progenitor cells）”，此類細胞特色為具有促進血管新生的作用，¹ 藉此減少缺氧組織的傷害。這些細胞可能來自成人血管細胞（hemangioblasts），這些細胞的特點是細胞帶有至少兩種造血幹細胞標記物（CD133+ 或 CD34+）和內皮細胞標記 - 血管內皮生長因子受體 2（VEGFR-2、KDR 或 flk-1）。血液中內皮前驅幹細胞是近年來血管生物學上一項重大的發現，是血液中一群具有分化成血管內皮細胞潛力的前驅細胞（progenitor cell），平常可以血液單核球細胞（mononuclear cell）之模樣存在於血液循環中，

但其量極少（僅約占 $< 0.05\%$ 之白血球）。內皮前驅幹細胞的主要作用是在血管壁受損時和血管壁成熟的內皮細胞一起修復受損的內皮細胞層，及當血管阻塞發生組織缺氧時參與並促進血管新生作用。目前已知在動脈發生急性阻塞造成的組織缺氧時，因缺血而受損的組織會釋放出大量的細胞素及細胞激素（cytokines），會吸引存在於血液循環中數量極少的內皮前驅幹細胞朝受傷部位移動趨近，缺血組織同時會表現出 stromal cell derived factor-1（SDF-1）等受體，以吸引附近的內皮前驅幹細胞前來，促使其即時參與動脈血管的增生及梗塞週遭的血管新生，這便是所謂“Homing”即“回家”之意。另一方面，缺血組織持續釋放出細胞激素及大量生長激素（growth factor），會刺激骨髓製造及釋放出大量的內皮前驅幹細胞，到達這

些受傷組織，繼續進行血管的修補及缺氧組織的血管新生（圖1）。臨床研究也發現許多心血管疾病的危險因子，都被證實會使血液中的內皮前驅幹細胞的數量與功能下降，此外血液中內皮前驅幹細胞和血管內皮細胞功能也有明顯的正相關，血液中內皮前驅幹細胞越少，代表血管內皮細胞功能越差，反應了內皮前驅幹細胞可能是代表血管修復的一個指標。而血液中內皮前驅幹細胞的數目，通常在心肌梗塞後第3~5天才會上昇到高峰，之後就慢慢減少，也就意味這段時間可能是修補受損血管及血管新生的主要關鍵。我們最近研究亦發現，基質金屬蛋白酶（MMP-9）對於內皮前驅幹細胞從骨髓組織釋放出來扮演相當重要的角色。³

其它對於缺氧組織具有修復能力的幹細胞來源包括存在於組織內的幹細胞及

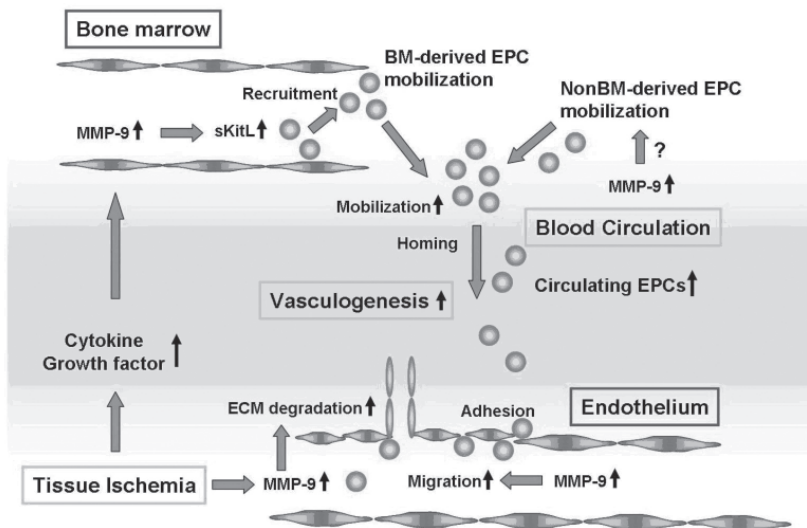


圖 1. 內皮前驅幹細胞促進血管新生之機轉圖³

mesoangioblasts。Mesoangioblasts 是屬於血管有關的幹細胞，具有細胞標記物 VEGFR-2，但不同於內皮前驅細胞，mesoangioblasts 可以分化成不同胚層的細胞，如：平滑肌細胞、心肌細胞、或骨骼肌細胞等，在動物實驗上已被證實可改善肌肉萎縮症或增加心肌收縮功能。此外，脂肪組織中亦含有許多豐富的幹細胞或前驅細胞，這些從脂肪組織中所培養出來的幹細胞亦具有修復缺氧組織或促進血管新生的能力。其中將脂肪組織利用分離酶消化後，進一步培養出間質幹細胞和血管內皮前驅細胞，已可以應用於實驗室研究。而存在於心肌細胞中的“心臟幹”細胞 (cardiac stem cells)，因具有分化為成熟心肌細胞的能力，因此具有修復心肌細胞的潛力，但臨床應用仍需進一步研究確認。另外其它不同種類的幹細胞根據其細胞標記物，包括：C-kit+ 細胞、Sca-1+ 細胞、side population cells (SP 細胞) 等，和具有標示蛋白質 Islet-1 的幹細胞，目前對這一些幹細胞特性所知有限，此部份仍有待進一步的研究。

幹細胞治療心肌梗塞之臨床試驗結果

目前已有許多研究利用各種自體成體幹細胞來進行前臨床試驗，其中骨髓幹細胞是目前最常被使用於心臟修復的臨床研究的幹細胞來源。整體而言，臨床試驗結果顯示利用骨髓幹細胞治療心肌梗塞患者是安全且合適的治療方式，可以改善左心室收縮功能約 6-9%，在治療後 4-6 個月可改善梗塞區域的

血液循環。其中最大的 Phase I/II 隨機分組臨床研究 (REPAIR-AMI trial)，⁵ 這個臨床試驗使用骨髓幹細胞 (Bone marrow-derived mononuclear cells) 隨機治療發生急性心肌梗塞的患者，經過四個月的追蹤，結果發現實驗組病人在心肌梗塞後四天後給予骨髓幹細胞，其心臟收縮功能增加 5.5%，而對照組 (placebo medium) 心臟收縮功能增加 3%，左心室收縮後體積 (end-systolic left ventricular volumes) 在對照組病人明顯增加，但接受骨髓幹細胞的實驗組病人則沒有增加，表示骨髓幹細胞治療減少了心肌梗塞的範圍及部分改善了心臟收縮的功能，有趣的是，這些接受骨髓幹細胞的病患在經過一年的追蹤，發現其發生死亡、再次發生心肌梗塞及出現心臟衰竭住院的機會明顯比對照組病人來得少。

目前大多數臨床研究皆顯示，利用骨髓幹細胞來治療心肌梗塞患者是有好處的，可以小幅增加患者心臟收縮功能及減小心肌梗塞範圍，但也有研究報告顯示幹細胞治療並沒有明顯臨床效果，如其中 ASTAMI trial 顯示給予骨髓幹細胞並無法改善心肌收縮功能，⁶ 原因可能是由於 ASTAMI trial 中幹細胞分離與儲存方式不同於其它研究，因此減少了幹細胞治療的好處。(Table 1)

什麼樣的病患適合接受骨髓幹細胞治療？

從 REPAIR-AMI trial 研究顯示接受骨髓幹細胞治療所得到的好處和病人治療前的心

臟收縮功能有明顯的相關性，若患者左心室收縮功能在治療前較差（LVEF \leq 48.9%），其接受骨髓幹細胞治療後，其心室收縮功能改善情形會較治療前左心室收縮功能較佳的患者（LVEF > 48.9%）來的較為明顯，暗示了心肌梗塞越嚴重的患者在接受骨髓幹細胞治療後，可能可以得到較多的好處，這樣的觀察在 TOPCARE-AMI trial 也獲得了進一步的證實。⁷

什麼時間點是給予幹細胞治療的適當時機？

病患發生心肌梗塞後不同時間點給予幹細胞治療也有不同的臨床效果，目前大部份的臨床研究給予幹細胞治療的時間，大約是在發生心肌梗塞後 4-14 天內給予，其中有一個臨床試驗是在病患發生心肌梗塞後 24 小時內立即給予骨髓幹細胞治療，⁸ 結果早期給予幹細胞治療並沒有辦法改善心臟收縮功能，但可以減少心肌梗塞的範圍。另一個臨床研究（REPAIR-AMI）則發現，若在發生心肌梗塞 4 天內馬上給予幹細胞是沒有好處的，但若是心肌梗塞發生後 4-8 天內給予幹細胞治療，則可以適度改善心臟收縮功能。這樣的結果有可能是由於剛發生心肌梗塞的心肌可能出現心肌再灌流傷害（reperfusion injury），而組織中的氧化壓力也大幅增加，另外剛發生梗塞區域的心肌細胞其小血管循環也明顯不佳，這些原因都不利於幹細胞的作用與分化，也可能是過早給予幹細胞治療失敗的原

因。

幹細胞治療的安全性和長期治療效果

依現有的臨床證據顯示，給予骨髓來源的單核核細胞或是 CD34+ 幹細胞並不會對病患造成嚴重的副作用，總體而言，幹細胞治療的安全性是可以被接受的。但幹細胞治療仍有一些潛在問題，包括：幹細胞可能分化為具節律細胞特性的心肌細胞而可能發生心律不整的機會，或可能增加血管支架發生再狹窄的機會（在一項臨床研究中顯示，給予 CD133+ 幹細胞可能會有此副作用），以及可能加速動脈粥樣硬化疾病的進展等，這些可能的副作用皆需要進一步研究來澄清這些問題。另外，所有目前的臨床試驗後續觀察的時間皆不夠久（最長的約五年），而且參與研究的病人數亦不夠多，因此幹細胞治療缺血性心臟病是否會增加腫瘤血管新生或增加癌症發生的機會等嚴重副作用，皆需要更大型與更長時間的臨床研究與觀察才可獲得證實。

另一個重要的問題是，幹細胞治療對於心肌梗塞患者是否具有長期的治療效果？從 BOOST trial 研究中發現，儘管在給予骨髓幹細胞治療後半年可以觀察到好處，但是這樣的治療效果在一年半左右就消失了。另外在 TOPCARE-AMI trial 則發現在經過一年的追蹤，接受幹細胞治療的實驗組病人相較於對照組，仍然可以獲得治療的好處。但是不可否認的在這個重要議題上，仍需要更大型的

臨床研究與更長時間的觀察來回答這個問題。

幹細胞治療作用機轉與臨床治療限制

幹細胞治療雖然已顯現出臨床治療效果，但是其中仍有許多不清楚的地方，因此需要基礎科學研究來了解幹細胞治療其中複雜的作用與機轉。有研究指出多種前驅細胞及骨髓組織的幹細胞具有促進缺氧組織中血管新生的作用，這樣的作用在 REPAIR-AMI trial 亦被證實，其利用超音波發現給予骨髓幹細胞可以改善缺氧心肌內的小血管功能與循環情形。此外，血液循環中的內皮前驅細胞在血管新生的過程扮演非常重要的角色，而幹細胞亦可以促進細胞分泌成長因子或生長激素（paracrine effect），這些生長激素可以幫

助細胞對抗氧化壓力以減少細胞的死亡，並可促進存在於心肌內的心肌幹細胞分裂、分化並進一步來修復受損的心肌細胞。

然而，幹細胞治療對於改善心肌梗塞患者之心臟功能其效果仍十分有限，在目前臨床試驗結果發現約可改善 3-3.66% 的心臟收縮功能。當然若針對某些心肌梗塞較為嚴重的患者，幹細胞治療可能會有比較好的治療效果，但這樣的治療效果顯然不是很令人滿意，也因此目前在幹細胞治療方法上仍需要做些適當的調整，如：找尋出更具有治療效果的幹細胞，如何增加幹細胞的存活率，改善幹細胞到達缺氧組織的效率及分化能力等，這些都需要未來新的科學技術來突破目前幹細胞治療所面臨的瓶頸。

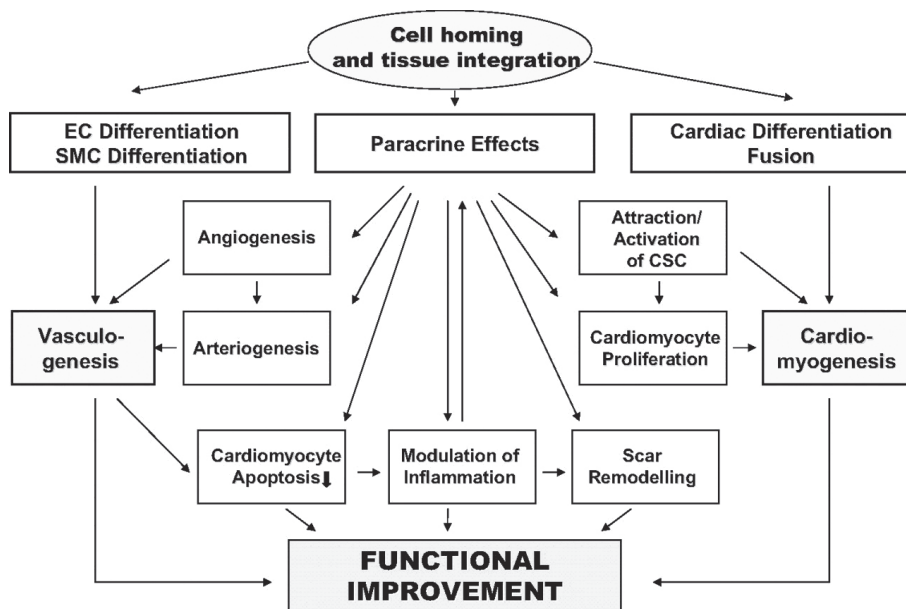


圖 2. 幹細胞治療作用機轉圖 4

結論：未來幹細胞治療所面臨的問題

急性心肌梗塞的治療目前已有臨床治療的標準，如何盡早給予梗塞心肌再灌注治療是治療成敗的關鍵，可惜不幸的是仍有許多病患因無法及時得到治療而發生心臟衰竭等問題，針對這類患者而言，幹細胞治療可說是未來極具有潛力的治療方法之一。但是幹細胞治療仍有許多重要問題有待回答：包括：

(1) 什麼時候是幹細胞治療的最佳時機？(2) 幹細胞治療的好處是否和所輸予的幹細胞量成正比？(3) 不同幹細胞種類的治療效果又是如何？

這些問題還是需要更多的研究來回答，但是利用幹細胞來治療心血管疾病是一個全新的起步，但可惜其治療效果仍十分有限，因此目前尚不建議當作臨床治療的常規療法，如何找尋出更適合的幹細胞來進行臨床治療是未來必須繼續努力的方向。

參考資料：

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
3. Huang PH, Chen YH, Wang CH, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating the function and behaviors of bone marrow-derived, circulating endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1179-84.
4. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:208-16.
5. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al. REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
6. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:150-8.
7. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1690-9.
8. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21.

Table 1. Clinical trials in patients with acute myocardial infarction⁴

Study	Patient No.	Days after AMI	Cell Type	Cell Preparation	Cell No. (x106)	Safety	Myocardial Function
Pilot trials (Phase I/II)							
Strauer et al. <i>Circulation</i> . 2002	n=10 (Nov 03: n=40) vs ctrl.	8	BMC	40 mL Ficoll-overnight teflon	28	+	Regional contractility ↑ (LVA)
TOPCARE — AML. <i>Circulation</i> . 2002/2003	n=59	4.9	CPC	250 mL/3 day culture	16	+	Endsystolic volume ↑ (LVA) Perfusion (Szinti) Global contractility ↑ (LVA/MRI)
JACC. 2004			BMC	50 mL/Ficoll - same day	213		Endsystolic volume ↓ (LVA/MRI) Viability ↑ (MRI) Flow reserve ↑ (Doppler)
Fernandez-Aviles. <i>Circ Res</i> . 2004	20	13.5	BMC	50 mL Ficoll - overnightteflon	78	+	Global contractility ↑ (MRI) End systolic volume ↓ (MRI)
Ruan et al. <i>Chin Med J</i> . 2005	10 vs 10 (rand.)	0	BMC vs saline			+	Global contractility ↑ (LVA)
Bartunek et al. <i>Circ</i> . 2005	12	14	CD133+BMC	Mouse antibody		Stenosis?	Global contractility ↑ (LVA)
Chen et al. <i>Am J Cardiol</i> . 2004	34 vs 35	18	B-MSC vs control	10 day culture		+	Global contractility ↑ (LVA)

Randomized trials Single/2 Center(s) BOOST	60 1:1 rand.	4.8	BMC vs rand. control	Gelatine polysuccinate - same day infusion	2460	+	6 months: global contractility ↑ (MRI) Lancet 2004/Circ 2006 18 months: no significant difference (MRI) Eur Heart J 2006 18 months: diastolic dysfunction ↓ (Echo) Global contractility: no change
Janssens et al. Lancet. 2006	67	<24h	BMC vs i.c. placebo	Ficol density gradient centrifugation - few hours after acute PCI	304	+	Infarct size ↓ (MRI) Global contractility: no change
ASTAMI <i>New Engl J Med.</i> 2006	1:1 rand. 100	6	BMC vs rand. control	Lymphoprep TM - next day infusion	87	+	Global contractility: no change
Multicenter-Placebo controlled, double-blind REPAIR - AMI	1:1 rand. 204	4	BMC vs i.c. placebo	Ficol density gradient centrifugation -same or next day infusion	234	+	Global contractility ↑ (QLVA) Adverse remodeling ↓ Clinical outcome ↑ Flow reserve ↑
<i>New Engl J Med.</i> 2006 <i>EHJ.</i> 2006 <i>Circulation.</i> 2007	1:1 rand.						