

厚生科学研究補助金

( 高度先端医療研究事業 治療機器等開発研究分野 )

平成10年度総括研究報告書

# 難治性心不全治療のための骨髄細胞を用いた 形質転換心筋細胞の開発

平成11年4月

主任研究者 福田 恵 一  
慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師

## 目 次

目次	1
総括研究報告書	2
研究発表	6
(1) 原著論文 (英文、和文)	6
(2) 学会発表 (国外、国内)	7
参考文献	10

厚生科学研究補助金（高度先端医療研究事業 治療機器等開発研究分野）  
総括研究報告書

難治性心不全治療のための骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発

主任研究者 福田恵一 慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師

### 研究要旨

分子生物学の発達により遺伝子操作動物や人工臓器の研究が進歩し、細胞の運命を人工的に転換させることが可能となったが、心筋細胞においては他の細胞を心筋に転換しうる強力な遺伝子は発見されておらず、人工的に心筋細胞を作ることは不可能とされてきた。我々はこの常識を覆し、心筋以外の細胞を心筋細胞に転換させる技術を研究開発してきた。骨髄間質細胞に DNA 脱メチル化剤 5-Azacytidine を負荷することにより、一部の細胞が自動拍動能を有する心筋細胞に分化誘導し得た。この細胞は心筋特異的蛋白質として、ANP、BNP、ミオシン、アクチニン、デスミン等を発現していた。また、心筋特異的転写因子として少なくとも Nkx2.5、TEF-1、GATA4、MEF2A、MEF2C、MEF2D を発現し、電気生理学的にも心筋特有の活動電位を示した。心筋細胞の発生学的研究、心筋細胞移植に向けた基礎研究を行う上で有力なツールになると考えられた。

### A. 研究目的

心筋細胞は胎生期には細胞分裂を行なうが、生後間もなく終末分化し、以後は細胞分裂を行わない。このため心筋梗塞等により心筋細胞が壊死した場合には、残存心筋細胞の肥大により代償される。一方、分子生物学の発達により遺伝子操作動物や人工臓器の研究が進歩し、遺伝子操作により細胞の運命を人工的に転換させることも可能となった。骨格筋細胞では MyoD 遺伝子群がクローニングされ、この一つの遺伝子を強制発現させることにより、線維芽細胞や神経細胞等の細胞を骨格筋細胞に転換するこ

とが可能となった。多くの研究者が心筋細胞の発生学的研究の手段として、あるいは心不全に対する根本治療の確立を目指して心筋細胞株の樹立や心筋細胞特異的転写因子の研究を行ってきた。心筋細胞は中胚葉のうち anterolateral plate mesoderm から発生し、心筋芽細胞に分化することが決定された後、胎生期には細胞分裂を行い、生後間もなく終末分化する。骨格筋細胞においては MyoD 遺伝子をはじめ発生分化に関する研究が進み、転写因子のカスケードが明らかとなってきた。心筋細胞において

も幾つかの心筋細胞特異的転写因子の存在が明らかにされてきたが、単独の転写因子のみで心筋細胞の形質が獲得できるような強力なあるいは上流の転写因子は見つかっていない。我々はこの常識を覆し、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に転換させる技術を研究開発してきた。本研究を開始するにあたり、未分化で心筋細胞と発生学的に同一あるいは近い細胞を材料にしなければならないと考え、骨髄間質細胞を用いた。骨髄間質細胞は、発生学的には将来血球、血管に分化する Blood Island (血島細胞) と呼ばれる細胞群に由来する中胚葉系の未分化な細胞である。血球系の幹細胞の増殖と分化を維持するため多彩なサイトカインや細胞増殖因子を分泌する性質があり、また、骨髄間質細胞自身が多分化能を持つ中胚葉系の幹細胞で、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞等に分化することが知られている。本研究の目的は多分化能を有する骨髄間質細胞に分化誘導を加えることにより、自己拍動能を有する心筋細胞を作成し、その表現形の解析、心筋細胞移植への方法を確立することである。

## B. 研究方法

### 1. CMG細胞の作成

C3H/He マウス大腿骨より骨髄を摘出し、Dexter 法により初代培養を行った。骨髄間質細胞は付着系の細胞であり浮遊系の骨髄芽細胞、血球系の細胞を除去致した後、3ヶ月以上の長期間培養を行った。長期培養後、不死化した細胞による多クローンの細胞株を作成し、この

多クローンの細胞株に対し、limiting dilution による単一或いは数クローンによる細胞株を作成し、各々のクローンに対し DNA 脱メチル化剤 5-azacytidine により分化誘導を行った。分化誘導後およそ4週間培養し、数百以上のクローンの中から自己拍動を行う細胞を含むクローンをスクリーニングした。自己拍動を開始した細胞の周辺をクローニングシリンジより採取し、さらにサブクローニングを反復した。得られたサブクローンの中から自己拍動する割合の高いクローンを最終的に CMG 細胞 (Cardiomyogenesis より命名) 株として樹立した。CMG 細胞は凍結融解を繰り返しても表現形は変わらず、分化誘導後自己拍動を開始する比率はおよそ 30%であった。この CMG 細胞に対し、免疫染色、Northern Blot、RT-PCR による心筋特異的遺伝子発現、電顕による微小構造解析、活動電位の記録等を行った。

## C. 研究成果

### (1) CMG細胞の特徴

CMG 細胞は 5-azacytidine による最終的な分化誘導前を行う以前には単核の線維芽細胞様の形状を呈したが、分化とともに形態は著しく変化した。図 1 に CMG 細胞の位相差顕微鏡写真を示した。分化誘導 1 週目頃より一部の細胞の細胞質が大きくなり円形を呈してくる。一部は棒状を呈し、細長くなった。これらの細胞が後に自動拍動を開始する細胞となるが、この時点では自動拍動を行うことはごく稀であった。分化誘導後 2 週

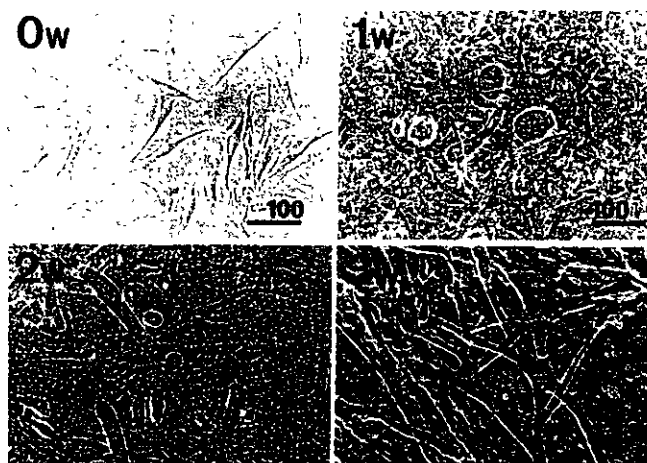


図1：CMG細胞の位相差顕微鏡写真  
分化誘前、1週、2週、3週の時点の細胞を示す。矢印の細胞が自己拍動を開始する。

になると既にこうした細胞の多くは自己拍動を開始した。ここで興味深いのはこの自己拍動を開始した細胞が互いに連結し合い、縦に連結し筋管細胞状を呈したことである。3週では多くの細胞が縦に一直線に並び、同期して収縮した。

免疫染色では分化誘導後1週では既にミオシンを発現し、細胞体が円形をしていた。2週では近接するミオシン陽性の細胞が互いに引き合うように連結し、筋管を形成してゆく様子が観察された。3週ではこれが完全に連結した細胞が同期して収縮した。CMG筋管細胞は分枝により他の筋管細胞と接合し、全体としては網の目状の外観を示した。筋管の長さは最長のもので約3 mmに達し、拍動数120-250/分で収縮した。CMG筋管細胞は基本的には単核の細胞が90%程度でありこれが縦列していたが、10%程度の細胞は3 - 10核の多核細胞を示した。アクチニンとデスミンに対する抗



図2：抗ミオシン抗体による免疫染色  
心筋に分化した細胞は1週の時点で既にミオシンを発現している。時間経過と共にCMG細胞は筋管様形態をとる。

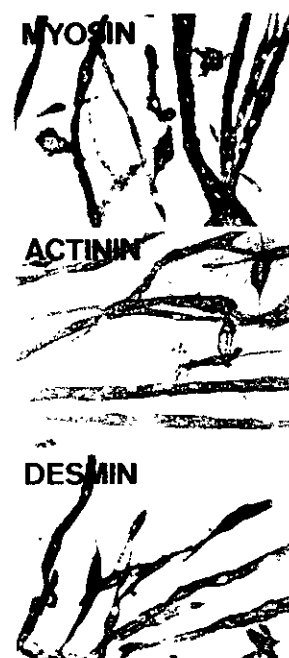


図3：抗ミオシン、アクチニン、デスミン抗体による免疫染色

体を用いた免疫染色写真を示した。筋管細胞に一致してANPとデスミンの染色が観察され、CMG細胞がANPとデス

ミンを発現していることが観察された。

透過型電顕を用いた観察では典型的な横紋構造に加えて、細胞中央部に存在する核、豊富なグリコーゲン顆粒、大型のミトコンドリアが観察された。核周囲には膜に包まれた直径 70-130 nm の high density の分泌顆粒様の構造物が多数認めら心房顆粒を考えられた。成獣マウスの心房で観察される ANP の分泌顆粒である心房顆粒は直径が 150-200 nm であり、CMG細胞で観察される分泌顆粒はそれよりもやや小さい傾向であった。その電顕的特徴より心房顆粒の可能性が高いと判断した。デスモゾーム、SR等も観察された。

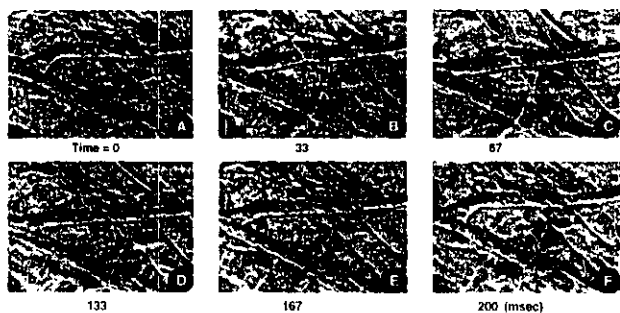


図4：CMG細胞の1収縮期の連続写真  
CMG細胞は拍動数120-250/分で収縮した

## (2) CMG細胞の活動電位

ガラス微小電極を用いて記録したCMG筋管細胞の活動電位は洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類に大別された。両者に共通した活動電位の特徴は①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅

い静止期電位を持つこと、③ペースメーカー細胞に見られるような静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また、心室筋細胞型では活動電位はPeak & Dome型を呈した。その後の研究でこれ以外の活動電位も見受けられ、分化誘導初期には洞結節型が多く、時間と共に心室筋細胞型が多くなることも明らかとなった。また、Ca遮断薬であるベラパミルを投与すると、この活動電位の幅は狭小化し、この活動電位がカルシウム電流に起因するものであることも明らかとなった。表1にこれらの活動電位の基本周期(BCL)、活動電位持続時間(APD)、拡張期膜電位(MDP)、活動電位振幅(APA)を計測したものを示した。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は、従来ウサギやラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋型はこれに比し、拡張期膜電位は深く、活動電位振幅は大きい傾向を示した。

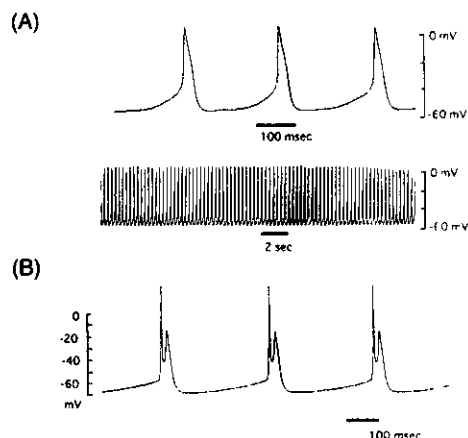


図5：CMG細胞の活動電位  
上段は洞結節細胞型、下段は心室筋細胞型の活動電位を示す。

	BCL (msec)	APD (msec)	MDP (mV)	APA (mV)	n
洞結節細胞型	143-788	46.6 ± 15.5	-54.8 ± 9.4	58.5 ± 14.6	40
心室筋細胞型	108-950	58.2 ± 14.1	-59.5 ± 7.8	71.0 ± 13.2	18

BCL: beating cycle length, APD: action potential duration,

MDP: most diastolic membrane potential,

APA: action potential amplitude

表 1 : CMG 細胞の活動電位

### (3) CMG 細胞の遺伝子発現

CMG 細胞の心筋細胞としての表現形を解析するため、心筋細胞特異的蛋白質の発現を観察した。心筋特異的蛋白である ANP および BNP、心筋特異的な転写因子である *Csx/Nkx2.5*、*GATA-4*、筋肉細胞特異的な転写因子である *TEF-1* の mRNA の発現を心筋、骨格筋を陽性、陰性対照として RT-PCR-Southern 法により解析した。CMG 細胞では ANP、BNP の発現が観察された。転写因子に関しては心筋細胞、CMG 細胞では *Csx/Nkx2.5*、*GATA-4*、*TEF-1* 遺伝子の発現が認められたが、骨格筋では *TEF-1* のみの発現が観察された。筋細胞特異的な転写因子である *MEF2 family* の発現を RT-PCR 法で観察すると、CMG 細胞では *MEF2 family* のうち *MEF2A*、*MEF2C*、*MEF2D* の発現が観察された。しかし、その発現時期は 3 者で異なり、*MEF2 C* は分化誘導前で発現が認められたが、*MEF2A*、*MEF2D* は分化誘導後に発現されることが観察された。

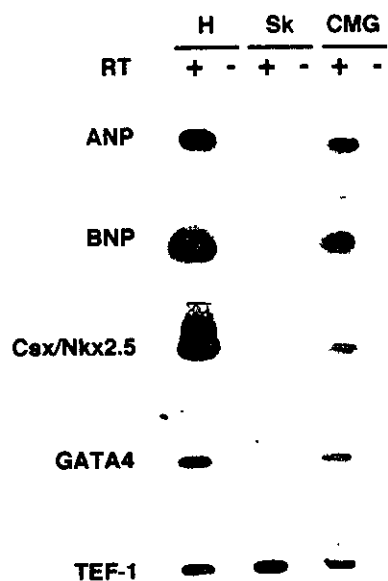


図 6 : 心筋特異的蛋白および転写因子の RT-PCR-Southern 解析

H は陽性対照の心室筋、Sk は陰性対照の骨格筋を示した。

### D. 考察

本年度の研究成果より、骨髄間質細胞を用いることにより、ほぼ心筋細胞と考えられる細胞が分化誘導できることが明らかとなった。この細胞は自己拍動能、活動電位、心筋特異的蛋白、心筋特異的転写因子の発現等より心筋細胞と考えられた。その表現形の詳細な解析は今後の課題である。骨髄間質細胞は間葉系の幹細胞と考えられ、この細胞を分化させ効率的に増殖させることにより心筋細胞が得られたものと推測される。今後はこのような心筋細胞を移植した際に生体に生着するか否か、心機能を改善するか

否か、不整脈原となるか否か等の研究を行わなければならない。

#### E. 結論

骨髓間質細胞に DNA 脱メチル化剤 5-Azacytidine を負荷することにより、一部の細胞が自動拍動能を有する心筋細胞に分化誘導された。この細胞は心筋特異的蛋白質として、ANP、BNP、ミオシン、アクチニン、デスミン等を発現していた。また、心筋特異的転写因子として少なくとも Nkx2.5、TEF-1、GATA4、MEF2A、MEF2C、MEF2D を発現し、電気生理学的にも心筋特有の活動電位を示した。心筋細胞の発生学的研究、心筋細胞移植に向けた基礎研究を行う上で有力なツールになると考えられた。

#### F. 論文発表

##### 1. 論文発表

(1) Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Shunichirou Miyoshi, Fusako Konishi, Hiroaki Kodama, Jing Pan, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Shingo Hori, Hitoshi Abe, Jun-ichi Hata, Akihiro Umezawa, Satoshi Ogawa. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. **J. Clin. Invest.** 1999;103:697-705.

(2) Jing Pan, Keiichi Fukuda, Mikiyoshi Saito, Junichi Matsuzaki, Hiroaki Kodama, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Takahiro Kato, Satoshi Ogawa. Mechanical Stretch Activates the JAK/STAT Pathway in Rat Cardiomyocytes. **Circ. Res.** 1999;(in press)

(3) Mitsushige Murata, Keiichi Fukuda, Hideyuki Ishida, Shunichirou Miyoshi, Takahiro Koura, Hiroaki Kodama, Hiroe K. Nakazawa, Satoshi Ogawa. Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, enhances L-type Ca<sup>2+</sup> current and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 1999;31: 237-245.

(4) Keiichi Fukuda, Seigo Izumo. Angiotensin II potentiates DNA synthesis in AT-1 transformed cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 1998; 30: 2069-2080.

(5) Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Jing Pan, Shinji Makino, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Shingo Hori, Satoshi Ogawa. Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. **Circ. Res.** 1998; 82: 244-250.

(6) Jing Pan, Keiichi Fukuda, Hiroaki Kodama, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Shinji Makino, Takahiro Kato, Tomohiro Manabe, Shingo Hori, Satoshi Ogawa. Involvement of gp130-mediated signaling in Pressure Overload Induced Activation of the JAK/STAT Pathway in Rodent Heart. **Heart and Vessel.** 1999;(in Press)

(7) 福田恵一、牧野伸司、梅沢明弘。骨髓細胞から心筋細胞への分化誘導とその形態学的、電気生理学的、分子生物学的解析。循環器専門医。1998年;6巻: 185-190.

(8) 福田恵一。骨髓細胞を用いた心筋細胞への分化誘導と心筋細胞移植の可能



性。 **Cardiovasc. Trends.** 1999年:2  
巻:(in Press)

(9) 福田恵一。心臓の細胞情報伝達系の役割。 **呼吸と循環**。1998年:46巻:1153-1154.

(10) 福田恵一。心肥大の分子生物学的機序:転写因子、細胞周期調節遺伝子を中心として。 **最新医学**。1998年;53巻:996-1001.

## 2. 学会発表

(1) Jing Pan, Hiroaki Kodama, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Kato, Keiichi Fukuda. Mechanical stretch activates the JAK-STAT pathway in cardiomyocytes. **American Heart Association, 71st Scientific meeting**. 1998.11. Dallas, TX, USA.

(2) Shinji Makino, Shunichiro Miyoshi, Akihiro Umezawa, Hiroaki Kodama, Jing Pan, Tomohiro Manabe, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Takahiro Kato, Keiichi Fukuda. Molecular and electrophysiological characterization of marrow stromal cell-derived cardiomyogenic cell. **American Heart Association, 71st Scientific meeting**. 1998.11. Dallas, TX USA.

(3) 潘静、福田恵一、小玉博明、牧野伸司、高橋暁行、佐野元昭、加藤隆弘、堀進悟、小川聡。ラット圧負荷肥大心における JAK-STAT シグナル伝達系の活性化と Angiotensin II の関与。第 20 回心筋代謝研究会 1998.11

(4) 福田恵一・佐野元昭・小玉博明。心肥大、リモデリングにおけるレニン・アンジオテンシン系と IL-6 族サイト

カインのクロストーク。第 6 3 回日本循環器学会総会 公募シンポジウム-1『心筋の適応・破綻における神経体液性因子の新しい展開』1999.3 東京国際フォーラム  
(5) 福田恵一、牧野伸司、梅沢明弘。演題名:骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導とその形態学的、電気生理学的、分子生物学的解析。第 6 2 回日本循環器学会総会公募シンポジウム-1『心血管系細胞の発生分化と死』1998.3 東京国際フォーラム

(6) 高橋暁行・福田恵一・小玉博明・潘静・佐野元昭・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・小川聡。IGF-1 は心筋細胞において IRS-1,-2, raf1/MAPK 系だけでなく JAK/STAT 系を活性化する。第 6 2 回日本循環器学会総会 1998.3. 東京国際フォーラム

(7) 佐野元昭・福田恵一・小玉博明・潘静・高橋暁行・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・小川聡。Angiotensin II は非心筋細胞において IL-6 ファミリーのサイトカインの産生を誘導する。第 6 2 回日本循環器学会総会 1998.3. 東京国際フォーラム

(8) 牧野伸司・福田恵一・小玉博明・潘静・高橋暁行・佐野元昭・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・梅沢明弘・小川聡。骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導法の確立。第 6 2 回日本循環器学会総会 1998.3. 東京国際フォーラム

(9) 牧野伸司・福田恵一・小玉博明・潘静・高橋暁行・佐野元昭・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・梅沢明弘・小川聡。骨髄細胞より分化誘導した心筋細胞(CMG細胞)の電気生理学的特徴と心筋特異的

遺伝子発現.第62回日本循環器学会総会.1998.3.東京国際フォーラム

(10) 小玉博明・福田恵一・潘静・高橋暁行・佐野元昭・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・小川聡. 心筋細胞におけるLIF刺激にともなうp70、p90RSK活性化経路と心肥大における意義.第62回日本循環器学会総会.1998.3.東京国際フォーラム

(11) 神吉秀明・福田恵一・小川聡・井幡巖・大串一彦・荒川義弘.心筋除神経時における神経成長因子の役割:糖尿病性除神経モデルにおける検討.第62回日本循環器学会総会.1998.3.東京国際フォーラム

(12) 福田恵一. gp130およびAngiotensin II刺激による心筋細胞のJAK/STAT系活性化と圧負荷肥大心における関与.第1回Molecular Cardiovascular conference.1997.9 北海道トマム

(13) 加藤隆弘・福田恵一・小玉博明・潘静・高橋暁行・佐野元昭・佐藤敏彦・伯野大彦・小川聡・石田英之、中沢博江.LIFによるCaMK II活性化機構の解明と心肥大形成におけるその意義.第63回日本循環器学会総会.1999.3.東京国際フォーラム

(14) 佐野元昭・福田恵一・小玉博明・潘静・高橋暁行・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・小川聡. AngiotensinII(AngII)による心肥大は心線維芽細胞から分泌されるIL-6族cytokineのparacrine作用が重要である.第63回日本循環器学会総会.1999.3.東京国際フォーラム

(15) 小玉博明・福田恵一・潘静・高橋暁

行・佐野元昭・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・小川聡.心肥大反応においてtyrosine phosphataseを介したシグナル伝達系が活性化される:gp130を介したPTP1Dの活性化.第63回日本循環器学会総会.1999.3.東京国際フォーラム

(16) 牧野伸司・福田恵一・小玉博明・潘静・高橋暁行・佐野元昭・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・梅沢明弘・小川聡.骨髄間質細胞から分化誘導した心筋細胞(CMG細胞)の分化過程における位置付け.第63回日本循環器学会総会.1999.3.東京国際フォーラム

(17) 福田恵一・佐野元昭・小玉博明・潘静・高橋暁行・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・小川聡.心肥大促進因子のautocrine, paracrineネットワーク:Angiotensin II刺激によるIL-6サイトカインファミリーの誘導とその意義.第2回Molecular Cardiovascular conference.1998.9 北海道北広島

(18) 小玉博明・福田恵一・潘静・高橋暁行・佐野元昭・牧野伸司・加藤隆博・真鍋知宏・堀進悟・小川聡.第63回日本循環器学会総会.1999.3.東京国際フォーラム

(19) 馬場彰泰、吉川勉、福田恵一、小川聡.拡張型心筋症におけるNa-K-ATPase自己抗体の存在.第62回日本循環器学会総会.1998.3.東京国際フォーラム.

(20) 柴田克志、岡部輝雄、福田恵一、村田八重子、岩永史郎、三田村秀雄、赤石誠、小川聡.心筋梗塞後リモデリングに伴うKv1チャネルファミリーの発現量の変化およびサブユニット構成に関する

19980439

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

### 研究成果の刊行に関する一覧表

**Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.**

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.

J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):697-705.

**Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, enhances L-type Ca<sup>2+</sup> current and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in cardiomyocytes.**

Murata M, Fukuda K, Ishida H, Miyoshi S, Koura T, Kodama H, Nakazawa HK, Ogawa S.

J Mol Cell Cardiol. 1999 Jan;31(1):237-45.

**Angiotensin II potentiates DNA synthesis in AT-1 transformed cardiomyocytes.**

Fukuda K, Izumo S.

J Mol Cell Cardiol. 1998 Oct;30(10):2069-80.

**Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes.**

Kodama H, Fukuda K, Pan J, Makino S, Sano M, Takahashi T, Hori S, Ogawa S.

Circ Res. 1998 Feb 9;82(2):244-50.

**骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導とその形態学的、電気生理学的、分子生物学的解析**

福田恵一、牧野伸司、梅沢明弘

循環器専門医 6(2) 1998 P.185-190

**ラット圧負荷肥大心における JAK/STAT シグナル伝達系の活性化とアンジオテンシン II の関与**

福田恵一、小玉博明、牧野伸司…

心筋の構造と代謝 20 1998 P.351-356

**心肥大の分子生物学的機序**

福田恵一

最新医学 53(5) 1998年 P.36-41

**心臓の細胞内情報伝達系の役割**

福田恵一

呼吸と循環 46(11) 1998 P.1153-1154