

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 福田恵一

平成13（2001）年4月

## 目 次

I.総括研究報告書	
骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究	1
福田恵一	
II.分担研究報告書	
1. 心筋細胞移植法の検討	8
中谷武嗣	
2. 骨髄間葉系幹細胞樹立に関する研究	11
梅澤明弘	
III.研究成果に関する一覧表	15
IV.研究成果の刊行物・別冊	20

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究

主任研究者	福田 恵一	慶應義塾大学心臓病先進治療学 講師
研究協力者	渋谷功、川口治子 伯野大彦、富田雄一、小西総子 藤田淳、久下康代	慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

研究要旨

本研究は骨髄間質細胞中に含まれる間葉系幹細胞を用いることにより再生心筋細胞を作製し、心筋細胞移植のドナー細胞を開発することを目的としている。本年度は心筋細胞に分化した CMG 細胞がカテコラミン受容体を発現し、シグナル伝達機能を有していることを明らかにした。また、間葉系幹細胞から心筋細胞に分化した CMG 細胞を単離する技術を開発し、再生心筋細胞の移植実験を行った。

A. 目的

特発性拡張型心筋症や重症心筋梗塞等を原因とする難治性心不全に対してこれまで様々な治療法が考案されてきたが、心臓移植以外には有効な治療は見出されていない。臓器移植法の施行に伴い本邦においても心臓移植の道が開かれたが、脳死判定の問題や国民性から見て臓器提供者が多数出現し、現実的な治療法として普及するには多くの問題が山積している。これに対し、近年動物実験レベルではあるが心筋細胞移植により心不全を治療する方法が報告され注目をあびている。心筋細胞移植はこれまで胎仔あるいは新生仔の心筋細胞を用いて行われてきたが、ヒトへの応用を考えた場合ドナーとなる細胞の問題で行き詰まっていた。一方、分子生物学の発達により再生医学の研究が発達し、様々な臓器で組織再生が試みられている。心筋細胞の再生は神経と並んで最も難しいとされてきた。本研究では骨髄間質細胞を分化誘導することにより心筋細胞を作製し、心不全治療に応用しうるレベルに至るまでの基礎研究を目的としている。心筋細胞にはカテコラミン受容体、アセチルコリン受容体が多数存在し、心拍数・心収縮力の調節、心肥大の促進等の重要な心機能の調節に関与している。本研究では骨髄由来の心筋細胞（CMG 細胞）の性質を明らかとするため、CMG 細胞のカテコラミン受容体の発現と機能解析を行った。さらに、さまざまに分化した細胞中より心筋細胞のみ

を単離する方法を開発した。

B. 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-また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。

## ②CMG細胞のカテコラミン受容体の発現：

(1)最終分化誘導前および 5-Azacytidine による分化誘導後 1-6 週の CMG 細胞より RNA を抽出した。マウス心臓を陽性対照にカテコラミン $\alpha 1$  受容体( $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1D$ )および $\beta$ 受容体( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ )の RT-PCR を行った。(2)分化誘導前および誘導後 2 週の CMG 細胞をフェニレフリン( $\alpha 1$  agonist)にて刺激し、ERK1/2 の活性化を測定した。さらに $\alpha 1$ 拮抗薬プラゾシン前処置による抑制効果を観察した。(3)同様に IBMX 存在下に isoproterenol (ISP)により細胞を刺激し、cAMP 生成量を測定した。さらに propranolol(PP)前処置による cAMP 生成量への影響を検討した。

## ③ミオシン軽鎖-2v 遺伝子プロモーターと EGFP の組み換え遺伝子を用いた心筋細胞の単離：

心筋細胞特異的に発現するミオシン軽鎖-2v 遺伝子のプロモーターに Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP-cDNA 遺伝子)を組み替えたプラスミドを作製した。この遺伝子組換えプラスミドと Neomycin 耐性遺伝子プラスミドを CMG 細胞に共遺伝子導入し、G418 存在下に細胞を選別した。

④再生心筋細胞の移植：再生心筋細胞をアデノウイルス lacZ 遺伝子で標識した。麻酔下のマウス心臓に注射した。経時的にマウスを屠殺し心筋を染色した。

## C.結果

### ①骨髄間質細胞より心筋細胞への分化誘導法の確立：

骨髄間質細胞は分化誘導前には線維芽細胞様の形態を呈した。分化誘導後には多くのクローンは骨芽細胞や脂肪細胞に分化したが、ごく少数の細胞が自己拍動を開始した。このクローンを単離し、CMG細胞とした。分化誘導後 2 週間より自己拍動を開始した。その後 CMG 細胞は形態的に他の細胞より肥大し、方向性を有し近接する細胞と縦列して接着し、筋管細胞を形成した。CMG筋管細胞は骨格筋の筋管細胞と異なり、分枝により他の筋管細胞と接合し、蜘蛛の巣状の外観を呈した。

### ②CMG細胞のカテコラミン受容体の発現：

心筋細胞にはカテコラミン受容体、アセチルコリン受容体が多数存在し、心拍数・心収縮力の調節、心肥大の促進等の重要な心機能の調節に関与している。CMG 細胞におけるカテコラミン受容体の発現を RT-PCR 法により解析すると $\alpha 1$  受容体の 3 種のサブタイプの内、 $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1D$  すべてが最終分化誘導前より発現していた。さらに、CMG 細胞を $\alpha 1$  刺激薬で

あるフェニレフリンで刺激すると MAPK の 1 種である ERK1/2 の活性化が容量、時間依存性に観察され、この活性化は $\alpha 1$  遮断薬であるプラゾシンにより抑制された。 $\beta$  受容体に関しては $\beta 1$  受容体、 $\beta 2$  受容体の両者が心筋細胞に分化誘導された後に発現された。CMG 細胞を $\beta$  刺激薬であるイソプロテレンールで刺激すると細胞内 cAMP の濃度が容量依存性に増加していた。以上より CMG 細胞はカテコラミン $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$  受容体を mRNA レベルだけでなく蛋白レベルでも発現しかつ生理機能を有していることが観察された。

### ③ミオシン軽鎖-2v 遺伝子プロモーターと EGFP の組み換え遺伝子を用いた心筋細胞の単離：

CMG 細胞は 5-azacytidine により最終分化誘導を行うことにより、約 30%の細胞が自己拍動する心筋細胞に分化する。移植を前提とした際には心筋細胞に分化しなかった細胞と心筋細胞に分化した細胞を選別しなければならない。このため、心筋細胞特異的に発現するミオシン軽鎖-2v 遺伝子のプロモーターに Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) -cDNA 遺伝子を組み替えたプラスミドを作製した。この遺伝子組換えプラスミドと Neomycin 耐性遺伝子プラスミドを CMG 細胞に共遺伝子導入し、G418 存在下に細胞を選別した。この細胞に 5-azacytidine により最終分化誘導を行い、心筋細胞に分化した細胞のみを FACS により sorting を行った。この手法により CMG 細胞は完全な心筋細胞の分画にすることが可能となった。

④再生心筋細胞の移植：移植された再生心筋細胞はレシピエントの心臓で生着し、同期して収縮していた。移植心筋細胞は少なくとも 2 カ月以上、レシピエント心で生着することが確認された。

## D.考察

心筋梗塞症などにより局所的に心筋が壊死に陥った場合、壊死領域では線維芽細胞の増生により癒痕領域が形成され、心全体としていわゆるリモデリングがなされる。癒痕領域は収縮に寄与しないばかりか時に心室瘤を形成し心臓の収縮拡張機能を著しく損なう。これに対し壊死領域に細胞移植を行うことにより左室のリモデリングや収縮能の改善を行うのが心筋細胞移植の考え方である。

これまで動物実験レベルでは心臓に対する細胞移植は様々な形で行われてきた。研究の初期の段階ではラットあるいはウサギに心筋梗塞を作製し平滑筋細胞や

骨格筋細胞を移植するというものであった。平滑筋、骨格筋細胞の場合にはもちろん心筋細胞と同期して収縮することはないが、心筋梗塞後の心室リモデリングの改善に有用であった。心筋細胞移植についてはこれまでに 20 を越える報告がなされているが、心筋細胞の場合初代培養を行ってある程度の生きた細胞が得られるのは胎仔あるいは新生仔の心筋細胞に限られる。これまでに行われた心筋細胞移植では胎仔細胞が用いられてきた。胎児心筋細胞の心臓への移植の結果、移植した心筋細胞は心臓の線維化された組織中に生着できること、移植したドナー細胞とホストの心筋細胞が介在板を介して電気的に連結した結合を取りうる事が報告された。さらに胎児心筋細胞の移植により心収縮、拡張能が改善することが報告され、心筋細胞移植の将来的な臨床応用への期待が集まることとなった。

心筋細胞移植の最大の問題点はドナー細胞の確保である。ヒトを対象とした場合には胎児の細胞を用いることは倫理的に不可能である。心筋細胞の再生は現在 ES 細胞および骨髄間葉系幹細胞を材料として分化誘導する方法が試みられている。自己骨髄より骨髄間葉系幹細胞を単離し、*in vitro* で増幅した後心筋細胞に誘導出来れば移植の拒絶反応の問題も解決できる。現在我々は最終分化した骨髄細胞から心筋細胞に分化した細胞の単離法の開発や細胞移植に関する研究を行っている。今後のプラクティカルな問題として移植細胞がホストに長期間安定して生着するか否か、不整脈源とならないか、ヒト骨髄細胞より心筋細胞が作製できるか否かなどがあり、今後解決しなければならない課題と考えている。

#### E. 結論

本研究により骨髄間葉系幹細胞から胎児心室筋型の心筋細胞が分化誘導出来ること、骨髄細胞由来の心筋細胞は *in vivo* の心筋細胞と同様にカテコラミン受容体を発現し、かつ機能を有していることが明らかとなった。これは細胞移植後の CMG 細胞が生体内でもカテコラミンに充分反応し、機能を調節し得るという点で重要な意味を持つ。また、心筋細胞のみの単離法の確立は分化誘導した細胞を移植用に用いるには最も重要なステップの一つであると考えられる。

#### F. 健康危険情報

本年度はヒトの細胞を用いた実験やヒトに対する移

植実験は行っておらず、健康上問題となる点は存在しない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Keiichi Fukuda, Shinji Makino, Fusako Konishi, Daihiko Hakuno, Satoshi Ogawa. Establishment of Cardiomyogenic Cell Line from Marrow Stroma In Fourth International Symposium of Tissue Engineering for Therapeutic Use 4. Y Ikada and Y. Shimizu Edit. Elsevier 55-66, 2000
2. Keiichi Fukuda. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. Artificial Organs. 25:183-193, 2001
3. Takahiro Kato, Motoaki Sano, Shunichiro Miyoshi, Toshihiko Sato, Daihiko Hakuno, Hideyuki Ishida, Hiroe Kinoshita-Nakazawa, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. Calmodulin kinase-II, -IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. Circ. Res. 87:937-945, 2000
4. Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Jing Pan, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Takahiro Kato, Shinji Makino, Tomohiro Manabe, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa. Significance of Raf-1/MEK/ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated Cardiac Hypertrophy. AM. J. Physiol. 2000; 279:H1635-H1644
5. Keiichi Fukuda, Shinji Makino, Fusako Konishi, Daihiko Hakuno, Tomohiro Manabe, Satoshi Ogawa. A Cardiomyocyte Cell Line To Overcome Fibrotic Myocardium. Microcirculation annual, 2000:16:17-18
6. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Hiroaki Kodama, Jing Pan, Mikiyoshi Saito, Junichi Matsuzaki, Toshiyuki Takahashi, Shinji Makino, Takahiro Kato, Satoshi Ogawa. IL-6 Family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. J. Biol. Chem 2000: 275:29717-29723.
7. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Hiroaki Kodama, Toshiyuki Takahashi, Takahiro Kato, Daihiko

- Hakuno, Toshihiko Sato, Tomohiro Manabe, Satoko Tahara, Satoshi Ogawa. Autocrine/Paracrine Secretion of IL-6 Family Cytokines Causes Angiotensin II-Induced Delayed STAT3 Activation. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000;269:798-802.
8. 鈴木雄介、福田恵一。骨髄間質細胞から心筋細胞への分化誘導。Bio Clinica 特集：心血管の発生。分化と再生医学への展開：2001年6月号。北隆館
  9. 福田恵一。特集 慢性心不全—実地医家に必要な診療のすべて：心筋再生療法の現状と未来。Medical Practice 2001年7月号文光堂
  10. 伯野大彦、福田恵一。特集 再生の医学：心筋細胞の再生、新生療法。細胞。2001年33巻、3月号80-83。ニューサイエンス社
  11. 福田恵一。心筋梗塞後の心不全治療の未来。循環器科。特集：心筋梗塞の治療は如何にあるべきか：2001年49巻3月号 252-258 科学評論社
  12. 福田恵一。特集：再生医学とリウマチ：骨髄細胞から心筋細胞の分化誘導。炎症と免疫。2001年5月号先端医学社
  13. 福田恵一、真鍋知宏。特集 外科学の進歩と再生医学 『骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導』 外科 63巻6号291-295。南江堂
  14. 田原聡子、福田恵一。心筋細胞の培養：麻酔科医が知っておきたい基礎知識。臨床麻酔。2001年真興交易医書出版部
  15. 福田恵一。特集『再生医学と組織工学 現状と今後の課題』心臓の組織工学。医学のあゆみ。2001年第196巻5号、321-326。
  16. 福田恵一、真鍋知宏。特集 「狭心症—治療の New Frontiers—」幹細胞移植。Heart View 2001年5巻2号116-122。メジカルレビュー社
  17. 福田恵一。心筋再生。総合臨床 特集『移植・再生医療の現状と展望』50巻1号44-46、2001年 永井書店
  18. 福田恵一。心臓疾患と Tissue Engineering。臨床外科。56巻1号35-43、2001年 医学書院
  19. 福田恵一。骨髄細胞から心筋細胞への分化。Molecular medicine 第38刊1号22-28、2001年 中山書店
  20. 福田恵一。臓器再生医学。組織培養工学 2001年27巻3月号124-129。ニューサイエンス社
  21. 福田恵一、藤田淳。心筋細胞の再生。医工学治療 2001年第12巻4号870-876。日本医工学治療学会
  22. 福田恵一、鈴木雄介。骨髄間質細胞から心筋細胞への分化誘導。血液・免疫・腫瘍。第5巻2000年5巻4号363-366。メジカルレビュー社
  23. 福田恵一、伯野大彦。骨髄細胞と心臓移植。「今日の移植」2000年13巻4号349-354。特集『発生学から見た移植・再生医療』日本医学館
  24. 福田恵一。心筋幹細胞。Bio Clinica。15:345-350。2000年 北隆館
  25. 福田恵一。骨髄細胞による心筋細胞分化療法。最新医学 別冊 再生医学—21世紀の医学を展望する。PP149-156、2001年
  26. 福田恵一。心臓を標的とする再生医療の役割。P108-113、シーエムシー。21世紀の再生医療。2000年。
  27. 福田恵一：心筋細胞・間充織幹細胞。蛋白質核酸酵素増刊号。再生医学と生命科学—生殖工学、幹細胞工学、組織工学—浅島誠、岩田博夫、上田実、中辻憲夫編。共立出版 pp2078-2084、2000年
  28. 福田恵一。心筋再生。生活習慣と遺伝子疾患。堀内正嗣、福田恵一、森下竜一編著。メジカルレビュー社。2001年
  29. 佐野元昭、福田恵一。サイトカインと心肥大、心不全。心臓における生命現象の分子生物学。(in press) 2001年。メジカルレビュー社。
  30. 福田恵一、真鍋知宏。『SOLVD』Hypertensionナビゲーター2001年178-179。メジカルレビュー社。萩原俊男、猿田享男、永井良三、日和田邦夫編。
  31. 福田恵一、真鍋知宏。心血管細胞を骨髄細胞より作る Annual Review 循環器 2001。2001年、pp20-23。中外医学社。杉下靖郎、門間和夫、矢崎義男、高本真一編。
  32. 福田恵一。再生心筋細胞を用いた心血管 Tissue engineering。第24回阿蘇シンポジウム記録集。(in press)2001年、南山堂。
2. 学会発表
    1. Keiichi Fukuda Development of regenerated cardiomyocytes from mesenchymal stem cell for the cardiovascular tissue engineering. COE international Symposium 2001. 2001.02.09. Osaka, Japan (招待講演)

2. Keiichi Fukuda IL-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rat cardiomyocytes. Gordon Research Conferences on Angiotensin in 2001. Ventura, CA, USA. 2001. 03.11-16. (招待講演)
3. Keiichi Fukuda Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. German cardiology Society. 2000. 4. (招待講演)
4. 第 65 回 日本循環器学会 AHA/JCA ジョイントシンポジウム Development of Cardiomyocyte for Cardiovascular Tissue Engineering. 福田恵一：平成 13 年 3 月 27 日 京都
5. 第 78 回 日本生理学会 シンポジウム福田恵一：平成 13 年 3 月 29 日 京都
6. 第 28 回 日本集中治療医学会 フロンティアセッション 福田恵一：心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 13 年 3 月 8 日 東京
7. 第 30 回 日本創傷治療学会 記念シンポジウム 福田恵一：心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 12 年 12 月 9 日東京
8. 第 23 回 日本造血細胞移植学会 福田恵一：教育講演 骨髄からの心筋再生とその臨床応用 平成 12 年 12 月 8 日京都国際会議場
9. 第 13 回 日本動物細胞工学会 福田恵一：シンポジウム 平成 12 年 11 月 20 日福岡
10. 第 53 回 日本細胞生物学会 シンポジウム『細胞移植と細胞コミュニケーション』福田恵一：『心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発』平成 12 年 10 月 31 日福岡
11. 第 4 回 日本心不全学会 プレナリーセッション Cardiac Signaling and its Therapeutic Use 平成 12 年 10 月 9 日神戸
12. 第 48 回 日本心臓病学会 サテライトシンポジウム『心筋細胞移植』 心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 12 年 9 月 12 日大阪
13. 第 73 回 日本組織培養学会 シンポジウム『細胞治療の基礎と応用』 心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 12 年 9 月 31 日岡山
14. 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference：指定講演「心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発」：福田恵一：平成 12 年 9 月 2 日：北海道
15. 第 24 回 阿蘇シンポジウム：テーマ“発生・再生と医学” 「再生心筋細胞を用いた心血管 issue engineering：福田恵一：平成 12 年 7 月 29 日：宮崎
16. 再生医工学推進シンポジウム：「組織再生のための細胞分化制御」心筋細胞：福田恵一：平成 12 年 7 月 7 日：東京
17. 第 21 回 日本炎症学会 ワークショップ：『心血管の tissue engineering』心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発：福田恵一、伯野大彦、小西総子、牧野伸治、富田雄一、小川聡：平成 12 年 7 月 4 日：東京
18. Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Eiichi Takahashi, Takahiro Kato, Daihiko Hakuno, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Yusuke Suzuki, Jun Fujita and Satoshi Ogawa. Endothelin-1 activates JNK through cytoskeleton-dependent p130Cas/Crk/c-Src-mediated pathway in cardiomyocytes. 第 65 回日本循環器学会：平成 12 年 3 月 25 日：京都
19. Takahiro Kato, Motoaki Sano, Shunichiro Miyoshi, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Hiroaki Kodama, Daihiko Hakuno, Yuichi Tomita, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Calmodulin kinase-II, -IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. 第 65 回日本循環器学会：平成 12 年 3 月 25 日：京都
20. Toshihiko Sato, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano, Satoko Tahara, Takahiro Kato, Hiroaki Kodama, Haruko Kawaguchi, Eiichi Takahashi, Satoshi Ogawa. Reactive oxygen species modulate ET-1-induced cardiac hypertrophy through activation of Akt and p70S6K pathway. 第 65 回日本循環器学会：平成 12 年 3 月 25 日：京都
21. Satoko Tahara, Keiichi Fukuda, Takahiro Kato, Shunichiro Miyoshi, Hiroaki Kodama, Toshihiko Sato, Yuichi Tomita, Satoshi Ogawa. Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal Regulated Kinases via Pyk2 and EGF Receptor in Rat Cardiomyocytes. 第 65 回日本循環器学会：平成 12 年 3 月 25 日：京都
22. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Toshihiko Sato, Haruko Kawaguchi, Takahiro Kato, Satoko Tahara, Makoto Suematsu, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu, Hideo Matsui,

- Keiko Yamauchi-Takahara, Satoshi Ogawa. ERK and p38MAPK, but not NF- $\kappa$ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
23. Toshiyuki Takahashi, Keiichi Fukuda, Jing Pan, Hiroaki Kodama, Takahiro Kato, Eiichi Takahashi, Satoko Tahara, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Analysis of the role and the upstream signals of LIF-induced p38MAPK activation in cardiomyocytes 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
24. Kensuke Kimura, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano, Masaki Ieda, Toshihiko Sato, Daihiko Hakuno, Yasuyo Hisaka, Satoshi Ogawa. Disorder of neurocrine cross talk in the failing heart: Analysis of the expression of norepinephrine, NGF, trkA and sympathetic nerve terminal in monocrotaline-induced right ventricular failure 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
25. Takahiro Kato, Keiichi Fukuda, Shunichiro Miyoshi, Motoaki Sano, Kensuke Kimura, Eiichi Takahashi, Hiroaki Kodama, Satoko Tahara, Satoshi Ogawa. Calmodulin kinase-II and -IV mediate Insulin-like growth factor-1-induced cardiac hypertrophy in rats 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
26. 伯野大彦、富田雄一、小西総子、真鍋知宏、鈴木雄介、小川聡、福田恵一。骨髄間質細胞由来の心筋細胞におけるカテコラミン・アセチルコリン受容体の発現および機能解析。心筋代謝研究会。平成12年9月：大阪
27. 富田雄一、伯野大彦、真鍋知宏、小西総子、小川聡、福田恵一：マウス骨髄間細胞由来の心筋芽細胞 (CMG細胞) におけるサイトカインの発現：第21回日本炎症学会：平成12年7月5日：東京
28. 高橋暁行、牧野伸司、福田恵一、小玉博明、佐野元昭、加藤隆弘、高橋栄一、真鍋知宏、佐藤敏彦、伯野大彦、潘静、堀進悟、小川聡、：心筋細胞におけるIGF-1刺激によるSTATリン酸化の機序：第64回日本循環器学会：平成12年4月2日：大阪
29. 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、佐藤敏彦、富田雄一、小西総子、真鍋知宏、高橋栄一、小川聡：心筋細胞におけるEndothelin-1によるCaMK IIを介したシグナル伝達機構の解析：第64回日本循環器学会：平成12年4月3日：大阪
30. 伯野大彦、福田恵一、牧野伸司、小西総子、高橋栄一、小玉博明、佐野元昭、高橋暁行、加藤隆弘、佐藤敏彦、真鍋知宏、田原聡子、富田雄一、小川聡：骨髄間質細胞由来の心筋細胞におけるカテコラミン受容体の発現および機能解析：第64回日本循環器学会：平成12年4月3日：大阪
- 佐藤敏彦、福田恵一、小玉博明、高橋栄一、佐野元昭、高橋暁行、加藤隆弘、伯野大彦、田原聡子、富田雄一、真鍋知宏、小西総子、小川聡、末松誠：ebdotherin-1によるNADH/NADPH酸化酵素を介した心筋細胞内でのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>での生成と心肥大への関与：第64回日本循環器学会：平成12年4月1日
31. 田原聡子、福田恵一、小玉博明、高橋栄一、高橋暁行、佐野元昭、加藤隆弘、佐藤敏彦、伯野大彦、富田雄一、真鍋知宏、小西総子、小川聡：Kチャンネル遮断薬は心筋細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇、ERKの活性化を介し心肥大マーカー遺伝子を発現する：第64回日本循環器学会：平成12年4月2日：大阪
32. 真鍋知宏、福田恵一、小玉博明、高橋栄一、佐野元昭、高橋暁行、加藤隆弘、佐藤敏彦、伯野大彦、小西総子、富田雄一、田原聡子、小川聡：心肥大刺激はラット心筋細胞においてzinc finger型転写調節因子cMG1/ERF-1の発現を誘導する：第64回日本循環器学会：平成12年4月3日：大阪
33. 小玉博明、福田恵一、高橋暁行、佐野元昭、加藤隆弘、佐藤敏彦、伯野大彦、田原聡子、富田雄一、真鍋知宏、小西総子、高橋栄一、小川聡：心筋細胞におけるGq結合型受容体(GqCR)を介したEGFR,Pyk2,c-Srcの活性化とERK活性化に至る経路の解析：第64回日本循環器学会：平成12年4月3日：大阪
34. Keiichi Fukuda. Stem cells and Heart Formation. Perspectives to studies on Myogenesis and Therapeutics of Muscular Diseases. A Workshop on Muscular Distrophy. March 22, 2001. in Kyoto, Japan
35. Takahiro Kato, Hiroaki Kodama, Toshiyuki Takahashi, Motoaki Sano, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Tomohiro Manabe, Eiichi Takahashi, Mitsushige Murata, Keiichi Fukuda. Calmodulin Kinase-II, -IV and Calcineurin Are Activated by Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Via Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release, and Are Involved in GP130-Mediated Cardiac Hypertrophy. 73rd Scientific meeting



New Orleans LU, USA 2000.11.

36. Satoshi Gojo, Hiroaki Tanabe, Noriko Gojo, Keiichi Fukuda, Jun-Ichi Hata, Shunei Kyo, Akihiro Umezawa, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation into the Pulmonary Vasculature after Gene Modification. 73rd Scientific meeting New Orleans LU, USA 2000.11.

37. Prospective Identification of Cardiomyocyte Progenitors in Cardiomyogenic (CMG) Cell Line and Their Application to Cell-Transplantation. - Naoichiro Hattan, Kiyoshi Ando, Akihiro Umezawa, Hiroko Miyatake, Satoko Konishi, Hirofumi Kasahara, Etsuro Tanaka, Keiichi Fukuda 73rd Scientific meeting New Orleans LU, USA 2000.11.

38. Toshihiko Sato, Motoaki Sano, Takahiro Kato, Kensuke Kimura, Satoko Tahara, Makoto Suematsu, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda Reactive oxygen species modulates ET-1-induced cardiac hypertrophy through activation of Akt and p70s6k pathway. 10<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Free radical research. 2000.10.16-20. Kyoto

#### H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

特許出願番号： 11-372826

特許出願日： 平成 11 年 12 月 28 日

特許出願タイトル： 心筋形成能を有する生体骨髄由来細胞

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究

分担研究者 中谷武嗣 国立循環器病センター実験治療開発部 部長  
研究協力者 富田伸司 国立循環器病センター実験治療開発部 室長

研究要旨

本研究では、骨髄細胞の *in vivo* における動向や、ラット、ブタ心筋梗塞モデル、心筋症モデルを用いて心機能の評価をおこない、ヒト細胞を用いた心筋細胞分化を *in vivo* で行い、他動物と同様の現象を確認し、臨床応用化をめざすことを目的とする。本年度は細胞標識法を検討した。骨髄細胞、成獣心室筋、心房筋細胞、胎児心筋細胞では標識時点において標識率は 100%であり、顕微鏡下細胞毒性は認められなかった。1 ヶ月の経代培養の場合、標識率は急激に低下し 3%以下となった。

A.目的

心筋梗塞や拡張型心筋症などの高度の心筋障害を伴った重症心不全に対しては、収縮力の増強、圧および容量付加の軽減など薬物療法が行われてきた。心臓移植は最も有効な手段であり、補助人工心臓がそのブリッジとして用いられてきたが、ドナー不足、補助人工心臓の合併症などにより限界があり、新たな治療手段の開発が望まれる。

心臓は、心筋細胞の収縮によるポンプ作用により生命維持を行っているが、この心筋細胞は胎生期には活発に細胞分裂を行うものの、出生とともにその増殖能を失い、以後障害をうけても残存心筋細胞が肥大することで障害に適応する。この特質は、心臓の各障害における病態さらには治療法の限界に関与しており、心筋細胞の再生が可能となれば、画期的な新たな治療法の開発となる。骨髄細胞から心筋細胞が分化することが最近あきらかになり、マウスにおける自己拍動能を有する心筋芽細胞株が樹立され、心筋再生が現実のものとなりつつある。現在 *in vitro* での心筋分化誘導は 5-azacytidine によりなされているが、*in vivo* では人工的な誘導なくとも骨髄細胞が心筋細胞分化することが報告されており、*in vitro* と *in vivo* の間に大きな分化誘導におけるギャップが存在し、心臓環境因子の影響が推測される。また、われわれは、心臓に対する骨髄細胞移植による心機能改善が報告してきたが、そのメカニズムには詳細は解明されていない。そこで、

本研究では、骨髄細胞の *in vivo* における動向（どのくらいの割合で、そしていかなるメカニズムで、心筋分化誘導されるかを検討することや増殖と分化能の関係）や、ラット、ブタ心筋梗塞モデル、心筋症モデルを用いて心機能の評価をおこない、さらにヒト細胞を用いた心筋細胞分化を *in vivo* で行い、他動物と同様の現象を確認し、臨床応用化をめざすことを目的とする。まず、平成 12 年度は以下の研究をおこなった。

B.方法

1)細胞標識法の確立

骨髄細胞の心筋細胞への分化誘導をあらゆる角度から検証する。移植した骨髄細胞の何%が生着し、さらに各種の phenotype にいかなる割合で変わるのかを *in vivo* で長期にわたり定量化して経時的に観察するためには安定した細胞標識を行う必要がある。

そのために、まず、以下の細胞標識する方法を検討する。

- 1) 蛍光色素(DAPI,PKH26)
- 2) BrdU
- 3) GFP plasmid の transfection(Lipofection, electroporation)

(倫理面への配慮)

動物はラットを使用した。手術前にはケタミンで麻酔

をかけ、疼痛を感じることがない様に配慮した。手術後は安静を保ち全身状態に問題がないことを確認したうえで動物管理棟にもどした。移植実験後犠牲死させる際には、同様にケタミンで麻酔をかけた後、吸入麻酔薬のイソフルレンを用いて深麻酔とし、心臓を摘出した。

### C.結果

DAPI-骨髄細胞、成獣心室筋細胞、心房筋細胞、胎児心筋細胞において検討したところ、標識した時点では、標識率は100%であり、顕微鏡下細胞毒性は認められなかった。しかし、1ヶ月にわたり経代培養をおこなった場合、その標識率は細胞分裂にともない急激に低下し、3%以下となった。細胞をDAPI標識後心臓へ移植した場合、凍結標本においてのみ、検出可能であった。

PKH26-成獣心室筋細胞、心房筋細胞においては、標識率はほぼ100%であった。経時的には標識率は低下しないが、蛍光の強度が減弱し、判別が困難となった。骨髄細胞では標識率は50%と低値であった。DAPI,PKH26陽性細胞は、通常の蛍光顕微鏡を用いて強拡大で観察した場合、焦点が不鮮明となった。今後共焦点顕微鏡で観察が必要と考える。

BrdU-安定して、80%の標識率が得られた。BrdUにて標識直後は増殖のスピードは抑制され、論文に指摘されているように、増殖能への影響がみられた。GFP plasmid-標識率は30%と低値であった。

移植細胞が注入部位の領域に存在することを証明するには、どの方法でも問題なく行うことができた。しかし、細胞間の相互作用の観察を目的とした場合、強拡大で行う必要があり、今後、共焦点顕微鏡の使用が妥当と考える。

### D.考察

#### 1) 達成度について

細胞を *in vivo* で追跡するための標識法にはそれぞれ一長一短があるが、Qualitative analysisは十分可能であった。しかし、移植細胞の各種の Phenotype への変化を定量的かつ長期間にわたり検討するためには、不十分であった。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について  
細胞移植の領域において代表的な標識法を比較検討した。

#### 3) 後の展望について

GFP mouse を使用することにより、長期間にわたる100%の標識率を獲得することが可能となると考えられる。現在入手交渉中である。現存の方法でさらにくわしく Qualitative analysis を行う予定である。

### E.結論

細胞標識に関しては、現状では、Qualitative analysisは十分可能である。さらに、Quantitative analysisをおこなうために長期100%の標識率を獲得する方法の確立がのぞまれる。

### F.健康危険情報

本年度はヒトの細胞を用いた実験やヒトに対する移植実験は行っておらず、健康上問題となる点は存在しない。

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

1. S. Tomita, R-K, Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle, Zhi-Qiang, Jia. Bone marrow cells transplanted into a porcine infarcted region induced angiogenesis and improved heart function. *Circulation* ;102[suppl II]:A3153,2000
2. S.Tomita, R-K, Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle: Myocardial cell engineering. In press
3. K-J Yoo, R-K. Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle, Z-Q. Jia, E.J. Kim, S. Tomita, TM Yau: Cardiomyocyte transplantation improved heart function in hamsters with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000 ;102[suppl III]:III-204-209
4. 富田伸司, R-K, Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle: 心臓病に対する細胞移植療法とその一法 今日の移植,13(3):561-566,2000
5. 富田伸司, R-K, Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle: 心臓病に対する細胞移植療法 細胞工学;19(6): 860-863,2000
6. K-J Yoo, R-K. Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle, Z-Q. Jia, GM Li, E.J. Kim, S. Tomita, TM Yau: Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg*;79(3):859-65,2000
7. R-K, Li, R.D. Weisel, D.A.G. Mickle, Zhi-Qiang, Jia, E.J.

- Kim, S. Tomita, L. Schwartz, M. Iwanochko, M. Husain, RJ. Cusimano, RJ. Burns, Yau, T.M. : Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg*;119:62-8T,2000.
8. 富田伸司、中谷武嗣、先端医療シリーズ12：心臓病 {心臓病—その最新医療と21世紀への展望}
9. 中谷武嗣・人工心臓 拍動型 VAS. *Cardiovascular Med Surg* 2:9-14, 2000
10. 森井恵、上野和行、中谷武嗣、他：当センター代1例目の心臓移植後患者の薬剤管理指導報告：腎機能変化に伴う薬物相互作用を含む。月刊薬事：42:303-309, 2000
11. 中谷武嗣. 末期的慢性心不全治療について *Osaka Heart Club* 23:1-2, 2000
12. 板東興、中谷武嗣、他. 小児の心臓・肺・心肺移植の今後の課題. *Heart Nursing* 7:970-974, 2000
13. 北村惣一郎中谷武嗣他. 国内で提供を受けた肺動脈ホモグラフト弁を用いた Ross 手術. *胸部外科* 53: 275-280, 2000
14. Kitamyra S, Nakatani T, et al. Cardiac transplantation under new legislation for transplantation in Japan: Report of two cases. *Jap Circ J* 64: 333-339, 2000
15. 公文啓二、中谷武嗣他. 心移植に対する周術期 critical care. 集中治療 12: 845-852, 2000
16. 中谷武嗣 心臓移植2例の経験：移植とヘルペスウイルス. *感染症* 55-58, 2000
17. 北村惣一郎、中谷武嗣他. 同種心臓弁（ホモグラフト弁）移植. *CURRENT THERAPY*. 18:62-69, 2000
18. 宮武邦夫、中谷武嗣他. 心臓移植患者の管理. *循環器専門医* 8:271-274, 2000
19. 今中秀光、中谷武嗣. 心臓移植術後 2 症例の急性期管理の経験. *日集中医誌* 7:365-372, 2000
20. 松崎益徳、中谷武嗣他. 循環器病の診断と治療に関するガイドライン：慢性心不全治療ガイドライン. *Jap Circ J* 64:1023-1079, 2000
21. 北村惣一郎、中谷武嗣他. 心臓移植とその他の外科治療. *CURRENT THERAPY* 18:158-165, 2000
22. 中谷武嗣、北村惣一郎他. 国立循環器病センターにおける心臓移植実施例の経験. *循環器病研究の進歩* 2-13, 2000
23. Nakamura A, Nakatani T, et al. Mixed venous oxygen saturation as a promising parameter for physiological control of total artificial heart. *ASAIO J* 43:761-766, 2000
24. 中谷武嗣他. 臓器移植法下における心臓移植2例について. *移植* 35:364, 2000
25. 池田善彦、中谷武嗣他. 脳死移植. *移植* 35:363-364, 2000
26. 中谷武嗣、高野久輝. :Cardiomyoplasty 川島康生編 心臓血管外科 (朝倉書店) 2000年 pp846-850
27. Nakatani T: Treatment of profound heart failure by ventricular assist system. Kitabatake A, Sasayama S, Fraicis GS Edit. *Heart Failure Frontiers in Cardiology* (Springer Verlag) 2000. pp 237-247
2. 学会発表
1. 富田伸司, R-K. Li, D.A.G. Mickle, R.D. Weisel 自家骨髄細胞移植による心不全治療 (パネル) 日本心臓病学会 2000
2. 富田伸司, R-K. Li, D.A.G. Mickle, R.D. Weisel : 自家平滑筋細胞移植における心機能の検討 . ワークショップ、日本胸部外科学会 2000
- H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況  
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

成体体性幹細胞樹立に関する研究

分担研究者 梅澤明弘

慶應義塾大学医学部病理学 助教授

研究要旨

成体組織には従来から知られている体性幹細胞が存在することが明らかになってきた。このような成体体性幹細胞の機能を賦活させる再生誘導治療法は再生医療の重要な柱の一つと考えられている。本研究の目的は再生誘導治療ならびに細胞補充療法に対する基盤技術を確立することである。これまで間葉系幹細胞に関する実験としてマウス骨髄の間質細胞に注目し、クローン解析法により多数の性質の異なる間葉系幹細胞株の樹立に成功した。本間葉系幹細胞株を同系統の成体マウスへの移植することにより、本細胞は腫瘍や異所性の分化を起こすことなく骨格筋、心筋、血管、小腸・胃の間用系組織、脳、胸腺、子宮、腎臓の組織に分化し取り込まれことを見出した。

分担研究者 梅澤明弘

A. 研究目的

成体組織には従来から知られている体性幹細胞が存在することが明らかになってきた。このような成体体性幹細胞の機能を賦活させる再生誘導治療法は再生医療の重要な柱の一つと考えられている。また、これら成体体性幹細胞の一部には高い増殖能・自己複製能と部分全能性の性質を合わせ持つことから、細胞補充療法のための移植デバイスとしても注目される。しかし、各種体性幹細胞を分離・培養する技術はまだほとんど確立していないのが現状である。我々は、マウスの成体からの間葉系幹細胞の分離・培養ならびに多分化能間葉系幹細胞の株化に成功し、これら培養幹細胞が移植により組織に生着することも見出している。そこで本研究では成体体性幹細胞の臨床応用を実現するために、

- 1) マウス成体骨髄由来の多分化能体性幹細胞 (MASS cell / Multipotent Adult Somatic Stem cell) の株化、
- 2) 多様なマウス性幹細胞を識別するためのマーカー分子の同定と各幹細胞を効率的に分離する技術の確立、
- 3) マウス間葉系幹細胞を安全にかつ効率的に培養する技術の確立、
- 4) 間葉系幹細胞から多分化能体性幹細胞(MASS cell)を誘導するための脱分化技術の確立、

5) 多分化能体性幹細胞(MASS cell)、間葉系幹細胞から特定の細胞を分化誘導するための分化因子の同定を目指し、近い将来実施されるであろう再生誘導治療ならびに細胞補充療法に対する基盤技術を確立することが本研究の目的である。これら成体体性幹細胞技術は自己細胞を用いた再生医療を可能とすることから、再生医療の臨床応用の範囲を広げる極めて大きな意義があるものと考えている。

B. 研究方法

1. マウス骨髄由来の体性幹細胞の分離・株化

間葉系幹細胞は密度勾配遠心と MACS を組み合わせることで、CD45, GlyA 陰性の間葉系幹細胞を濃縮した。間葉系幹細胞濃縮画分は、GFP を発現するレトロウイルスベクターに感染させた後に GFP 陽性細胞/ウエルに分離して株化を実施する (方法1)。これ以外にも、特異的な抗体を用いた FACS による分離 (方法2) あるいは Hoechst 33342 を用いた SP 細胞の分離 (方法3) の手法を用いて間葉系幹細胞株を分離した。

2. マウス体性幹細胞の分離・同定株化したマウス成体体性幹細胞を利用して特異的なマーカー分子を同定することで、各幹細胞株を分類した。既存の細胞表面抗原を認識する抗体と FACS を組み合わせ、細胞株の

分類を行う。モノクローナル抗体を新規の作製する。

### 3. 体性幹細胞培養法の開発

培養体性幹細胞を実際に臨床応用するためには、株化したヒト成体体性幹細胞株を利用して、臨床応用を可能とする無血清培養の条件確立を目指す。また多分化能体性幹細胞(MASS cell)の培養条件を検討することで、造血幹細胞や間葉系幹細胞から多分化能体性幹細胞(MASS cell)を脱分化誘導させる技術確立する。増殖因子・サイトカイン(PDGF, FGF, EGF, VEGF, Insulin, IGF 等)、細胞外基質(ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲン等)、組織抽出物(骨、基底膜等)などを組み合わせることで株化した成体体性幹細胞が自己複製する条件を見出す。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は、慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに従っている。また、本研究内容は動物実験委員会に計画書を提出し、適切な計画であることが承認されている(承認番号000024)。ヒト細胞に関しては、慶應義塾大学医学部倫理委員会(いわゆるミレニアムタイプの倫理委員会)に現在、その妥当性を申請中であり、承認を得た後に計画を進める。

### C. 研究結果

これまで間葉系幹細胞に関する実験としてマウス骨髄の間質細胞に注目し、クローン解析法により多数の性質の異なる間葉系幹細胞株の樹立に成功している。免疫染色と RT-PCR 法を組み合わせることでそのなかの1株は *in vitro* で脂肪細胞、骨格筋細胞、骨、軟骨に加え心筋細胞、神経細胞などに分化することを見出した。一方、本間葉系幹細胞株を同系統の成体マウスへの移植することにより、本細胞は腫瘍や異所性の分化を起こすことなく骨格筋、心筋、血管、小腸・胃の間葉系組織、脳、胸腺、子宮、腎臓の組織に分化し取り込まれことを見出した。また本間葉系幹細胞株の表面マーカーを解析することで、従来の間葉系幹細胞とは異なるマーカー分子の発現特性が観察された。

### D. 考察

マウスより我々が独自に単離した間葉系幹細胞が多分化能体性幹細胞(MASS cell)の特性を保有していることを示唆しており、再生医療のための移植用デバイスとして理想的な性状を保有していることを示して

いる。本研究成果はヒト骨髄より間葉系幹細胞ならびに多分化能体性幹細胞(MASS cell)を分離するのに直接応用することが可能であり、安全で有効な細胞補充療法を実現させるためにヒト間葉系幹細胞ならびにヒト多分化能体性幹細胞(MASS cell)を分離・培養する研究が必要であると考えに至った。

これまでの研究と異なる本研究の最大の特徴は、将来の再生医療に対する臨床応用を視点にいれ、ヒト成体体性幹細胞の同定ならびに分離・培養技術の確立を目指しているところにある。そのために、1) クローン解析法による様々なヒト体性幹細胞の株化、2) 特異的な表面マーカーの取得と FACS ソーターを利用した幹細胞分離、3) 組織工学技術を駆使した培養条件の確立という大きく3つの技術を駆使し、ヒト体性幹細胞のカタログ化を行い、成体体性幹細胞の性状についての議論に解答を与えるとともに、再生医療開発のためのプラットフォーム技術確立することを考えている。この成果は、再生医療の応用に限定されず、生体の恒常性維持や加齢による生体機能の低下といった医学の基本原則を世界に発信できる研究になる。

### E. 結論

成体組織には様々な体性幹細胞が存在し、組織の恒常性維持に機能している。一方、高齢者や慢性疾患の患者において組織修復能が十分に機能しない原因として、再生環境の消失あるいは成体体性幹細胞の枯渇の二つが考えられている。すなわち再生医療とは内在性の成体体性幹細胞を賦活する再生誘導治療と幹細胞を移植の材料として利用する細胞補充療法に分類することができる。成体体性幹細胞を用いた細胞補充療法は ES 細胞や胎児由来の体性幹細胞とは異なり、自己細胞による治療を可能とすることから、応用範囲は広い。しかし、ヒト成体組織に存在する様々な体性幹細胞を高純度で分離・培養する技術の開発は遅れている。本研究ではヒト間葉系幹細胞、造血幹細胞ならびに多分化能体性幹細胞(MASS cell)の分離・培養ならびに分化制御法を開発することを最終的に目指し、近い将来実施される再生医療のための基盤技術を築くことが本研究の目的である。本年度にマウスより得られた研究本成果は、骨・軟骨・骨格筋・血液・血管・心筋・神経・膵臓・肝臓、腎臓等の各組織の再生に応用できる可能性があり、痴呆、糖尿病、動脈硬化、心筋症、骨粗鬆症などの疾患治療に再生医療の手法を応用する

ための重要な一歩になる。

#### F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

#### G. 研究発表 (論文発表)

1. Sano, M., Umezawa, A., Abe, H., Akatsuka, A., Nonaka, S., Shimizu, H., Fukuma, M., Hata, J-i.: EAT/mcl-1 expression in the human embryonal carcinoma cells undergoing differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res*, in press
2. Hamatani, T., Sasaki, H., Ishihara, K., Hida, N., Maruyama, T., Yoshimura, Y., Hata, J-i., Umezawa, A.: Epigenetic mark sequence of the H19 gene in human sperm. *Biochim Biophys Acta*. in press
3. Ochi, K., Nozaki, H., Tanaka, F., Kato, K., Fukuzawa, F., Sobue, G., Fukuuchi, F., Toyama, Y., Hata, J-i., Umezawa, A.: Specific bisulfite modification of CTG triplet repeats of the androgen receptor gene, a gene associated with the triplet repeat disease X-linked spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy Disease), *Neuroscience Research Communications*, 28(1): 1-10, 2001
4. Fukuchi, Y., Kizaki, M., Yamato, K., Kawamura, C., Umezawa, A., Hata, J-i., Nishihara, T. and Ikeda, Y.: Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene*, 20: 704-713, 2001
5. Sano, M., Umezawa, A., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., and Hata, J-i: Involvement of EAT/mcl-1, an anti-apoptotic bcl-2 related gene, in murine embryogenesis and human development. *Exp. Cell Res.* 259(1):127-139, 2000.
6. Wakabayashi, K., Saito, H., Ebinuma, H., Saito, Y., Takagi, T., Nakamura, M., Umezawa, A., Hata, J., and Ishii, H.: Bcl-2 related proteins are dramatically induced at the early stage of differentiation in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor projecting an anti-apoptotic role during this period. *Oncol Rep.* 7(2):285-288, 2000
7. Kinjo, K., Kizaki, M., Muto, A., Fukuchi, Y., Umezawa, A., Yamato, K., Nishihara, T., Hata, J., Ito, M., Ueyama, Y., and Ikeda, Y.: Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-induced apoptosis and differentiation in retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in hGM-CSF-producing transgenic SCID mice. *Leukemia*, 14: 431-438, 2000
8. Suzuki, A., Umezawa, A., Sano, M., Nozawa, S., and Hata, J-i: Involvement of
9. EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene, in the apoptotic mechanisms underlying human placental development and maintenance. *Placenta*, 21(2):177-183, 2000
10. Yamada, T., Hashiguchi, A., Fukushima, S., Kakita, Y., Umezawa, A., Maruyama, T., and Hata, J-i.: Function of 90-kDa heat shock protein in cellular differentiation of human embryonal carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 36: 139-146, 2000
11. Okita, H., Umezawa, A., Fukuma, F., Ando, T., Urano, F., Sano, M., Nakata, Y., Mori, T., and Hata, J-i: Acute myeloid leukemia possessing jumping translocation is related to highly elevated levels of EAT/mcl-1, a Bcl-2 related gene with anti-apoptotic functions. *Leukemia Res.* 24(1): 73-77, 2000
12. 梅澤明弘：間葉系幹細胞による「臓器」再構築—新しい生体マイクロデバイスとしての骨髄間質細胞の可塑性を用いた細胞移植— *Biotherapy* 15(2): 119-125, 2001
13. 梅澤明弘：骨髄間質細胞 分子細胞治療 2(1): 17-24, 2001
14. 梅澤明弘：間葉系幹細胞研究の現状と展望 *実験医学* 19(3): 350-356, 2001
15. 梅澤明弘：骨髄間質を用いた臓器再生と細胞治療 第 117 回日本医学会シンポジウム記録集「幹細胞と細胞療法」(2000年8月) p107-113,

2001

16. 今林英明, 梅澤明弘: RA 臨床の Q and A RA & セラピー 7(1): 58-59, 2001
17. 梅澤明弘, 秦順一: 骨髄間質を用いた臓器再生と細胞移植 医学のあゆみ 192(8):833-837, 2000

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

再生医療を一般的な医療へと普及させるためには、組織再生機能の中心を担う成体体性幹細胞を制御する基盤技術を開発し、産業化が可能になるよう知的財産権を取得することが不可欠である。具体的には移植に有効な成体体性幹細胞の同定・分離法、培養法、分化誘導法の3つの基盤技術を開発することが、将来の工業生産を考えた場合に重要である。本研究は体性幹細胞のカタログ化により、この3つの技術の開発を目指し、各技術について特許化を実施する予定である。

本研究の準備段階で得られた知見である、マウス多分化能幹細胞(MASS cell)の同定・分離法、培養法、分化誘導法に関しては特許を出願済みである。さらにヒト多分化能体性幹細胞(MASS cell)に関する3つの技術を確立することで、世界的に競争力のある基盤技術の知的財産権の取得を目指す。



6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tahara S, Fukuda K, et al.	Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal Regulated Kinases via Pyk2 and EGF Receptor in Rat Cardiomyocytes K <sup>+</sup> Channel Blocker-Evoked Signals in Cardiomyocyte.	J AM Coll Cardiol.			2001
Fukuda K	Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering.	Artificial Organs	25	183-193	2001
Kato T, Fukuda K, et al.	Calmodulin kinase-II, -IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats.	Circ Res	87	937-945	2000
Kodama H, Fukuda K, et al.	Significance of Raf-1/MEK/ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated Cardiac Hypertrophy.	AM. J. Physiol.	279	H1635-H1644	2000
Fukuda K, Makino S, et al.	A Cardiomyocyte Cell Line To Overcome Fibrotic Myocardium.	Microcirculation annual	16	17-18	2000
Sano M, Fukuda K, et al.	IL-6 Family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes.	J. Biol. Chem	25	29717-29723	2000
Sano M, Fukuda K, et al.	Autocrine/Paracrine Secretion of IL-6 Family Cytokines Causes Angiotensin II-Induced Delayed STAT3 Activation.	Biochem. Biphys. Res. Com.	269	798-802	2000
福田恵一	心血管 tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発	心臓	33	47-50	2001
鈴木雄介, 福田恵一	骨髄間質細胞から心筋細胞への分化誘導。特集：心血管の発生。分化と再生医学への展開	Bio Clinica			2001
福田恵一	心筋再生療法の現状と未来。特集 慢性心不全—実地医家に必要な診療のすべて	Medical Practice			2001
伯野大彦, 福田恵一	心筋細胞の再生、新生療法	細胞	33	80-83	2001
福田恵一	心筋梗塞後の心不全治療の未来	循環器科	49	252-258	2001
福田恵一	骨髄細胞から心筋細胞の分化誘導	炎症と免疫			2001
福田恵一、 真鍋知宏	骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導	外科	63	291-295	2001

田原聡子、 福田恵一	心筋細胞の培養：麻酔医が知っておきたい基礎知識	臨床麻酔			2001
福田恵一	心臓の組織工学	医学のあゆみ	196	321-326	2001
福田恵一 真鍋知宏	幹細胞移植	Heart View	5	116-122	2001
福田恵一	心筋再生	総合臨床	50	44-46	2001
福田恵一	心臓疾患と Tissue Engineering	臨床外科	56	35-43	2001
福田恵一	骨髄細胞から心筋細胞への分化	Molecular Medicine	38	22-28	2001
福田恵一	臓器再生医学	組織培養工学	27	124-129	2001
福田恵一	心筋細胞の再生	医工学治療	12	870-870	2001
福田恵一、 鈴木雄介	骨髄間質細胞から心筋細胞への分化誘導	血液・免疫・腫瘍	5	363-366	2000
福田恵一、 伯野大彦	骨髄細胞と心臓移植	今日の移植	13	349-354	2000
福田恵一	心筋幹細胞	Bio Clinica	15	345-354	2000
福田恵一	心筋細胞再生と細胞移植	Cardiac Practice	11	261-265	2000
福田恵一	間葉系幹細胞とその利用	遺伝子医学	4	241-250	2000
福田恵一 岡野英之 中西啓介 室原豊明	『再生医学が変える 21 世紀の医療』分子心 血管病座談会	分子心血管病	2	1-14	2001
門田守人 雨宮浩 赤池敏広 福田恵一	移植と再生医学—21 世紀を占う—	カレントセラピ ー 特集『移植 と再生医学』		140-166	2000
K-J Yoo, R-K. Li, S. Tomita, et al.	Cardiomyocyte transplantation improved heart function in hamsters with dilated cardiomyopathy.	Circulation			2001
K-J Yoo, R-K. Li, S. Tomita, et al.	Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy	Ann Thorac Surg	79	859-865	2000
R-K, Li, Tomita S, et al.	Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction.	J Thorac Cardivasc Surg,	119	62-68	2000
富田伸司, R-K Li, et al.	心臓病に対する細胞移植療法とその一法	今日の移植	13	561-566	2000

富田 伸司, R-K Li, et al.	心臓病に対する細胞移植療法	細胞工学	19	860-863	2000
中谷武嗣	人工心臓 拍動型 VAS	Cardiovascular Med Surg	2	9-14	2000
森井 恵、上 野 和行、中 谷武嗣、他	当センター代 1 例目の心臓移植後患者の薬剤管理 指導報告：腎機能変化に伴う薬物相互作用を含む	月刊薬事	42	303-309	2000
中谷武嗣	末期的慢性心不全治療について	Osaka Heart Club	23	1-2	2000
板東 興、中 谷武嗣、他	小児の心臓・肺・心肺移植の今後の課題	Heart Nursing	7	970-974	2000
北村 惣一郎 中谷武嗣他	国内で提供を受けた肺動脈ホモグラフト弁を用い た Ross 手術	胸部外科	53	275-280	2000
Kitamyra S, Nakatani T, et al	Cardiac transplantation under new legislation for transplantation in Japan: Report of two cases	Jap Circ J	64	333-339	2000
公文 啓二、 中谷武嗣他	心移植に対する周術期 critical care	集中治療	12	845-852	2000
中谷武嗣	心臓移植 2 例の経験：移植とヘルペスウイルス	感染症		55-58	2000
北村 惣一郎 中谷武嗣他	同種心臓弁（ホモグラフト弁）移植	CURRENT THERAPY	18	62-69	2000
宮 武 邦 夫、 中谷武嗣他	心臓移植患者の管理	循環器専門医	8	271-274	2000
今中 秀 光、 中谷武嗣	心臓移植術後 2 症例の急性期管理の経験	日集中医誌	7	365-372	2000
松崎 益 徳 中谷武嗣他	循環器病の診断と治療に関するガイドライン：慢 性心不全治療ガイドライン	Jap Circ J	64	1023-1079	2000
北村 惣一郎 中谷武嗣他	心臓移植とその他の外科治療	CURRENT THERAPY	18	158-165	2000
中谷武嗣、 北村 惣一郎 他	国立循環器病センターにおける心臓移植実施例の 経験	循環器病研究の 進歩	XX	2-13	2000
Nakamura A, Nakatani T, et al	Mixed venous oxygen saturation as a promising parameter for physiological control of total artificial heart.	ASAIO J	43	761-766	2000
中谷武嗣 他	臓器移植法下における心臓移植 2 例について	移植	35	364	2000
池田 善 彦 中谷武嗣他	脳死移植	移植	35	363-364	2000
Sano M, Umezawa A, et al	Involvement of EAT/mcl-1, an anti-apoptotic bcl-2- related gene, in murine embryogenesis and human development.	Exp Cell Res. 2000	259	123-139	2000

Suzuki A, Umezawa A, et al.	Involvement of EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene, in the apoptotic mechanisms underlying human placental development and maintenance	Placenta.	21	177-183	2000
Kinjo K, Umezawa A, et al.	Arsenic trioxide (As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )-induced apoptosis and differentiation in retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in hGM-CSF-producing transgenic SCID mice.	Leukemia	14	431+438	2000
Yamada T, Umezawa A, et al.	Function of 90-kDa heat shock protein in cellular differentiation of human embryonal carcinoma cells.	In Vitro Cell Dev Biol Anim.	36	139-146	2000
Wakabayashi K, Umezawa A, et al.	Bcl-2 related proteins are dramatically induced at the early stage of differentiation in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor projecting an anti-apoptotic role during this period.	Oncol Rep.	7	285-288	2000
Sano M, Umezawa A, et al.	EAT/mcl-1 expression in the human embryonal carcinoma cells undergoing differentiation and apoptosis.	Exp Cell Res,		In press	2001
Hamatani T, Umezawa A, et al.	Epigenetic mark sequence of the H19 gene in human sperm.	Biochim Biophys Acta.		In press	2001
Ochi K, Umezawa A, et al.	Specific bisulfite modification of CTG triplet repeats of the androgen receptor gene, a gene associated with the triplet repeat disease X-linked spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy Disease)	Neuroscience Research Communications	28	1-10	2001
Fukuchi Y, Umezawa A, et al.	Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells.	Oncogene	20	704-713	2001
Umezawa A, et al.	Acute myeloid leukemia possessing jumping translocation is related to highly elevated levels of EAT/mcl-1, a Bcl-2 related gene with anti-apoptotic functions.	Leukemia Res.	24	7377	2000
梅澤明弘	間葉系幹細胞による「臓器」再構築—新しい生体マイクロデバイスとしての骨髄間質細胞の可塑性を用いた細胞移植—	Biotherapy	15	119-125	2001
梅澤明弘	骨髄間質細胞	分子細胞治療	2	17-24	2001
梅澤明弘	間葉系幹細胞研究の現状と展望	実験医学	19	350-36	2001
梅澤明弘	骨髄間質を用いた臓器再生と細胞治療	第 117 回日本医学会シンポジウム記録集		107-113	2001
今林英明、 梅澤明弘	RA 臨床の Q and A	RA & セラピー	7	58-59	2001
梅澤明弘、 秦順一	骨髄間質を用いた臓器再生と細胞移植	医学のあゆみ	192	833-837	2000