

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13年度 総括研究報告書

主任研究者 福田恵一

平成14（2002）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. 骨髄間葉系幹細胞樹立に関する研究	11
梅澤明弘	
2. 心筋細胞移植法の検討	16
中谷武嗣	
III.研究成果に関する一覧表	21
IV.研究成果の刊行物・別冊	29

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	慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学 講師
研究協力者	渋谷功、川口治子 伯野大彦、富田雄一、藤田淳、 鈴木雄介、湯浅慎介、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 細胞が発現するイオンチャンネルを解析し、心筋分化に伴ってこれらのチャンネルが時々変化することを明らかにした。また、GFP あるいは LacZ トランスジェニックマウスの骨髄細胞を SCID マウスに骨髄移植すると、心筋梗塞時に骨髄より移動し一部が心筋細胞に分化することを明らかにした。

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。2000 年度の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アセチルコリン

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。2001 年度は CMG 細胞が発現するイオンチャンネルが心筋細胞の分化と共にどのように変化してゆくか、また生体内で骨髄多能性幹細胞が心筋梗塞後に心筋細胞に分化するか否かを明らかにすることを計画した。

B.方法

(2000 年度)

①CMG細胞の作成

C3H/He マウス大腿骨より骨髄を抽出し、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。

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 α_1 受容体(α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D})および β 受容体(β_1 、 β_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(α_1 agonist)にて刺激し、ERK1/2 の活性化を測定した。さらに α_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。

(2001 年度)

①CMG細胞のイオンチャネルの発現：

CMG細胞に最終分化誘導を行う前後で RNA を採取した。心筋細胞に発現することが知られているイオンチャネル I Ca_L、I_f、I_{K1}、I_{K,Ach}、I_{K,ATP}、I_{to}、I_{Ks}、I_{Kr}を形成するサブユニットの発現を RT-PCR 法を用いて観察した。具体的には I_{K1} (IRK1, IRK2)、I_{Kr} (MERG)、I_{Ks} (KvLQT1, minK)、I_{to} (KV1.2, KV1.4, KV2.1, KV4.2, KV4.3)、I_{K,ATP} (KIR6.1, KIR6.2, SUR2A, SUR2B)、I_{K,Ach} (GIRK1, GIRK4)、I_f (HCN1, HCN2, HCN3, HCN4)の発現を解析した。同時に CMG細胞にパッチクランプ法と活動電位を記録することにより遺伝子発現と機能の相関を

検討した。

② GFP 発現および LacZ 発現トランスジェニックマウスの骨髄細胞を採取し、致死量の放射線を照射した NOD-SCID マウスに骨髄移植をおこなった。1 カ月後にマウスを麻酔開胸し心筋梗塞を作成した。経時的に心臓を摘出し、組織切片を作成した。

C.結果

(2000 年度)

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 α_1 受容体の 3 種のサブタイプの内、 α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{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 α_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 α_1 遮断薬であるプラゾシンにより抑制された。 β 受容体に関しては β_1 受容体、 β_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 β 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 α_1 、 β_1 、 β_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。CMG細胞ではアセチルコリンのムスカリン M1/M2 受容体を発現し、アセチルコリン類似のカルバコールで刺激するとセカンドメッセンジャーの IP₃が増加した。

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：

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。

(2001 年度)

①CMG 細胞では 5-アザシチジンによる最終分化誘導をかける前より IRK1 と MERG の発現が観察された。これは最終分化誘導をかける以前に静止膜電位を呈することが示唆された。洞結節型の活動電位を呈する分化誘導後2週頃より HCN4、Ca α 1c、Kv1.4 の発現が観察された。これはこの時期にペースメーカー電位を生じる If 電流と I CaL 電流が記録されることを示唆していた。心室筋細胞型を呈する4週以後には HCN1、Kv2.1、Kv4.2、IRK2、KIR6.1、KIR6.2、SUR2A の発現が観察された。これは CMG 細胞が I KATP 、I to 電流を発現することを示し、この時期に心室筋細胞型活動電位を呈することを説明し得る現象と考えられた。分化誘導後6週までの時点では Kv1.2、Kv4.3、KvLQT1、minK、GIRK1、GIRK4 の発現は認められなかった。これは CMG 細胞が I Ks 、I KAch を発現しないことを示し、CMG 細胞が心房筋の表現型を取らないことと一致する所見と考えられた。

②骨髄移植マウスでは心筋梗塞作成後梗塞部位に骨髄からの細胞が遊走し、梗塞巣に多数の細胞浸潤が観察された。梗塞作成後1カ月の時点で多くの浸潤細胞のほとんどは消失していたが、一部の細胞が血管壁周囲の平滑筋細胞として、またさらに少ない頻度であるが心筋細胞に分化していると考えられた。

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ことで報告された。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 で増幅した後に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

2000年度の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。

2001年度の研究により骨髄細胞由来の心筋細胞はin vivoの心筋細胞と同様にイオンチャンネルを発現し、かつ経時的に発現が変化することが明らかとなった。このイオンチャンネルの変化が活動電位の変化をもたらすものと考えられた。再生心筋細胞は移植された後、レシピエントの心筋細胞と連結し、長期間生体心に生着することが明らかとなった。

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 angiotensinII-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.
- 1 Satoko Tahara, Keiichi Fukuda, Hiroaki Kodama, Takahiro Kato, Shunichiro Miyoshi, Yuichi Tomita, Satoshi Ogawa. Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal Regulated Kinases via Pyk2 and EGF Receptor in Rat Cardiomyocytes K⁺ Channel Blocker-Evoked Signals in Cardiomyocyte. *J AM Coll Cardiol* 38:1554-1563, 2001
- 9 Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Takahiro Kato, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Makoto Suematsu, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu, Hideo Matsui, Keiko Yamauchi-Takahara, Satoshi Ogawa. ERK and p38MAPK, but not NF- κ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 89:661 - 669, 2001
- 10 Daihiko Hakuno, Keiichi Fukuda, Shinji Makino, Fusako Konishi, Yuichi Tomita, Tomohiro Manabe, Yusuke Suzuki, Yasuyo Hisaka, Akihiro Umezawa, Satoshi Ogawa. Bone marrow-derived cardiomyocytes

- (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. **Circulation** 105:380-386, 2002
- 11 Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Toshiyuki Takahashi, Motoaki Sano, Takahiro Kato, Satoko Tahara, Daihiko Hakuno, Toshihiko Sato, Tomohiro Manabe, Fusako Konishi, Satoshi Ogawa. Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 34:139-50, 2002.
 - 12 Keiichi Fukuda Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. **Congenital anomalies.** 42:1-9, 2002
 - 13 Keiichi Fukuda. Generation of regenerated cardiomyocytes and its therapeutic use for cell transplantation into failing heart. **JAACT 2000.** 2001.9. (in press)
 - 14 Keiichi Fukuda. Use of mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes and its application to the treatment of congestive heart failure. **European Science Foundation Workshop 2001.** (in press)
 - 15 Keiichi Fukuda. Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and its application to cell transplantation therapy. **Stem cell therapy 2002** (in press)
 - 16 Keiichi Fukuda. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. **International symposium on Stem cell and cell therapy 2002** (in press)
 - 17 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
 - 18 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
 - 19 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3月、9巻3号 265-270。先端医学社
 - 20 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
 - 21 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1月25巻1号 55-63。真興交易医書出版部
 - 22 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。
 - 23 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。メジカルビュー社
 - 24 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
 - 25 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
 - 26 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
 - 27 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
 - 28 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
 - 29 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
 - 30 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
 - 31 福田恵一。心筋幹細胞。Bio Clinica。15:345-350。2000年 北隆館
 - 32 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
 - 33 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。
 - 34 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 pp 2078-2084、2000年
 - 35 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。2002年
 - 36 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。101-109。2001年。メジカルレビュー社。

- 37 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。
- 38 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。
- 39 福田恵一。再生心筋細胞を用いた心血管 Tissue engineering。第 2 4 回阿蘇シンポジウム記録集。2001 年、109-116、南山堂。
- 40 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。2001 年 33 巻：47-50. 丸善
- 41 伯野大彦、福田恵一、小西総子、富田雄一、真鍋知宏、鈴木雄介、梅沢明弘、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・アセチルコリン受容体の発現および機能解析 心筋の構造と代謝。2001 年；23 巻：145-154.
- 42 福田恵一。再生医療。先端医療シリーズ 12 心臓病『心臓病の最新医療』2001 年 7 月 53-59. 先端医療技術研究所。
- 43 川口治子、福田恵一。生物の科学 遺伝 別冊 13 号 112-121。2001 年 7 月。浅島誠、吉里勝利編『発生・分化・再生-幹細胞生物学から臓器再生まで』心筋形成と再生医学。
- 44 湯浅慎介、福田恵一。『造血幹細胞の可塑性と再生医学：心筋/骨格筋』造血幹細胞：基礎から遺伝子治療・再生医療へ 中外医学社 2002 年
- 45 福田恵一、真鍋知宏。実験医学別冊「ポストゲノム時代の実験講座」4 巻『幹細胞・クローン研究プロトコール』～再生医学にかかわる基礎技術 間葉系幹細胞の分化転換 145-152、2001 年 羊土社刊 中辻憲夫編。
- 46 福田恵一 1. 心血管系の発生・分化 『骨髄細胞間葉系幹細胞から心筋細胞へ』循環器フロンティア：ベーシック&クリニカルサイエンス メジカルビュー社 小室一成編 2002 年 31-36.
- 47 真鍋知宏、福田恵一。心筋形成と再生医学。実験医学。『再生医学がわかる』横田崇編 2002 年。110-115.
- 48 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 18 巻 1148-1149. 文光堂
- 49 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 16 巻、6 月号 500-504. 北隆館
- 50 真鍋知宏、福田恵一。心不全に対する再生医学。今日の心不全治療。『特集：心不全に対する新しい治療』2001 年 8 月、3 巻 2 号 20-21.
- 51 真鍋知宏、福田恵一。分化誘導因子。分子心血管病「分子生物学理解のための用語解説」Vol.2 No.3 392-393. (2001 年 6 月 1 日発行)
- 52 鈴木雄介、福田恵一。組織幹細胞の分化転換と再プログラム化：骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞分化誘導における DNA メチル化の役割。実験医学 2001 年 19 巻 12 号 1518-1522. 8 月号特集『細胞の再プログラム化と万能性はどこまで可能か』
- 53 福田恵一、澁谷功。体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生と心臓の tissue engineering。実験医学 9 月増刊号「幹細胞システムと再生医学」幹細胞研究の最前線
- 54 藤田淳、福田恵一。心臓と再生医学。Organ Biology。2001 年 12 月第 8 巻 4 号 251-257.
- 55 川口治子、福田恵一。骨髄細胞による心筋細胞の新生・再生療法。ファルマシア 特集 再生医療 38 巻 1 号 2002 年 1 月
- 56 福田恵一、富田雄一。心不全の遺伝子治療・細胞移植治療の展望。治療学 第 35 巻 12 号 99-100. 2001 年特集 慢性心不全：新しい治療
- 57 藤田淳、福田恵一。再生心筋細胞と細胞移植療法。最新医学 2001 年 56 巻 12 号 2671-2675.
- 58 福田恵一、伯野大彦、富田雄一、牧野伸司、藤田淳、鈴木雄介、澁谷功、小川聡。骨髄細胞を用いた再生心筋細胞の開発とその応用。適応医学。5 巻 2 号、2002 年。
- 59 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 2001 年第 2 巻 1 号 1-14.
- 60 福田恵一。骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の再生。心臓 2001 年 33 巻 12 号 12 月 937-943.
- 61 福田恵一。間葉系幹細胞を用いた心筋の再生 medicina 2002 年 3 月 39 巻 3 号 510-512.

- 62 福田恵一。特集『再生医療時代の幕開けを知る』
心筋再生—現状と展望。外科治療 2002 年度 1 月
号 21-26。
- 63 福田恵一。『再生医学～ 臓器移植と機能再建』心
血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞
の開発。31 巻 6 号 277-283。日本臨床生理学学
会雑誌。2002 年
- 64 福田恵一。骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の
再生。東京矯正歯科学会雑誌 2002 年 6 月号
- 65 福田恵一。『再生医療としての幹細胞移植』日
本医師会雑誌 2002 年 3 月号
- 66 伯野大彦、福田恵一。『再生医学』 循環器
科 『特集：循環器内科学における再生医療』。
2002 年 3 月号、51 巻 3 号 216-223。
- 67 福田恵一『骨髄細胞から心筋細胞をつくる』メジ
カルビューポイント 2002 年 3 月 20 日 p2

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 Keiichi Fukuda: Development of regenerated
cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for
cardiovascular tissue engineering. International Workshop
in muscular dystrophy. Cellules Souches et Thepapie
Cellilae (Stem cell and cell therapy) International
Symposium. 2002.3.26 フランス・パリ・フランス学
士院会館 (招聘講演)
- 5 Keiichi Fukuda. Development of regenerated
cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for
cardiovascular tissue engineering. International Workshop
in muscular dystrophy. Development of New Therapy for
Muscular Dystrophy: -Progress in Basic Research. Tokyo.
2002.1.17 (招請講演)
- 6 Keiichi Fukuda. Bone marrow derived cardiomyocyte.
European Science Foundation Workshop. Symposium:
Cardiovascular Genomics: New pathophysiological
Concept. Maastricht, Netherlands. 2001.12.1 (招請講演)
- 7 Keiichi Fukuda. The 13th world congress of international
society for artificial organs. Osaka, Japan. 2001.11.6. (招
請講演)
- 8 Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda. Leukemia inhibitory
factor activates cardiac L-type Ca²⁺ channels: ERK1/2 is a
putative α 1 subunit kinase. The 18th International
symposium for heart research. Symposium. 2001.9.30.
Akita, Japan
- 9 Keiichi Fukuda. Autologous bone marrow for
cardiomyocyte transplantation. European Society of
Cardiology. Symposium: Cell therapy. Stockholm,
Sweden. 2001.9.3 (招請講演)
- 10 Keiichi Fukuda. Use of adult mesenchymal stem for
regeneration of cardiomyocytes and its application to cell
transplantation. Tokai University International Symposium:
New frontier in cell therapy and regenerative medicine.
Keio Plaza Hotel. Tokyo, Japan. 2001.8.28 (招請講演)
- 11 Keiichi Fukuda. Stem cells and Heart Formation.
Perspectives to studies on Myogenesis and Therapeutics of
Muscular Diseases. A Workshop on Muscular Dystrophy.
March 22, 2001. in Kyoto, Japan (招請講演)
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 第 30 回 日本創傷治癒学会 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
- 16 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

- 17 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
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 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
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 28 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
- 29 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
- 30 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- κ 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
- 31 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
- 32 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
- 33 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

- 34 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
- 35 富田雄一、伯野大彦、真鍋知宏、小西総子、小川聡、福田恵一：マウス骨髄間質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
- 36 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
- 37 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
- 38 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：endothelin-1によるNADH/NADPH酸化酵素を介した心筋細胞内でのH₂O₂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
- 39 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Ca²⁺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
- 40 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
- 41 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EGFRPyk2,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
- 42 Keiichi Fukuda. Stem cells and Heart Formation. Perspectives to studies on Myogenesis and Therapeutics of Muscular Diseases. A Workshop on Muscular Dystrophy. March 22, 2001. in Kyoto, Japan
- 43 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 Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release, and Are Involved in GPI30-Mediated Cardiac Hypertrophy. 73rd Scientific meeting New Orleans LU, USA 2000.11.
- 44 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.
- 45 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.
- 46 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. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free radical research. 2000.10.16-20. Kyoto
- 47 第31回日本心臓血管動物学シンポジウム 心血管領域における再生医学と組織工学の最前線 『成体幹細胞を用いた心筋再生と細胞移植による心

- 血管 tissue engineering』平成 14 年 2 月 2 日於
東京医科歯科大学 福田恵一
- 48 第 24 回 日本分子生物学会 シンポジウム 『再
生工学と細胞核の再プログラム化』福田恵一 成体
幹細胞の再プログラム化による心筋分化。平成 13
年 12 月 10 日 福田恵一
- 49 第 5 回日本心不全学会 プレナリーセッション
1 :New strategy for the treatment of severe
heart failure 『Development of regenerated
cardiomyocyte for cardiovascular tissue
engineering』平成 13 年 10 月 25 日 福田恵一
- 50 第 38 回 日本臨床生理学会 『心血管 Tissue
engineering を目指した再生心筋細胞の開発』シン
ポジウム 平成 13 年 9 月 28 日 福田恵一
- 51 第 49 回 日本心臓病学会教育講演 平成 13 年 9
月 23 日 福田恵一。
- 52 ACCP 日本部会 日本部会賞特別講演 平成 13
年 9 月 8 日 福田恵一
- 53 第 41 回 日本先天異常学会 シンポジウム 福
田恵一：間葉系幹細胞と再プログラム化による心筋
分化 平成 13 年 7 月 4 日 パシフィコ横浜
- 54 第 60 回 東京矯正歯科学会 福田恵一。特別講
演 平成 13 年 7 月 12 日 東京有楽町
- 55 第 5 回東京国際臍帯血移植シンポジウム 特別講
演 『 Development of regenerated
cardiomyocytes for the cardiovascular tissue
engineering』平成 13 年 6 月 23 日 東京大学医
科学研究所
- 56 第 33 回 日本結合組織学会 シンポジウム『再
生医学とマトリックス』：心血管 issue engineering
を目指した再生心筋細胞の開発、 福田恵一：平成
13 年 6 月 7 日 東京国際フォーラム
- 57 第 49 回 日本輸血学会 ミレニアムシンポジウ
ム『輸血医学と再生医学』：心血管 issue engineering
を目指した再生心筋細胞の開発、 福田恵一： 平
成 13 年 6 月 1 日 東京京王プラザホテル
- 58 第 5 回 日本適応医学会 シンポジウム『適応限
界を超えた重症臓器不全に対する治療戦略』：心血
管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開
発、福田恵一：平成 13 年 6 月 1 日 グランキュー
ブ大阪
- 59 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 Ca²⁺-
Induced Ca²⁺ Release, and Are Involved in GP130-
Mediated Cardiac Hypertrophy. 73rd Scientific meeting
New Orleans LU, USA 2000.11.
- 60 木村謙介、福田恵一、佐野元昭、家田真樹、佐藤
敏彦、伯野大彦、川口治子、久下康代、竹下栄子、
山崎一人、二宮真一、黒沢裕之、井上実、岡野栄之、
小川聡。肥大心における neurocrine crosstalk の破
綻。第 24 回心筋代謝研究会。大分県別府市。平成
13 年 12 月 8 日
- 61 藤田尚代、長田道夫、金本勝義、福田恵一、大森
さゆ、飛騨麻里子、栗津緑。培養尿管芽細胞周期的
伸展刺激による p38 MAP キナーゼの活性化。日本
腎臓学会。
- 62 第 101 回 日本外科学会 特別企画シンポジウム
『Regeneration and Surgery』 福田恵一： 平
成 13 年 4 月 12 日 仙台 宮城県民会館 『心血
管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開
発』

H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

1. 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内 (第
372826 号、平成 11 年 12 月 28 日)
「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際 (PCT/JP00/001148、平成 12 年 2 月
28 日)
「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際 (PCT/JP00/07741、平成 12 年 11 月 2 日)
「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際
(PCT/JP00/09323、平成 12 年 12 月 27 日)
2. 「遺伝子細胞治療剤」国内 出願中 (特願
2002-028717、平成 14 年 3 月 20 日)

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

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中胚葉性幹細胞の分離・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。この移植細胞に用いる細胞を採取選択する方法を確立するため、マウスにおける骨軟骨へ分化する骨髄間質細胞株の作製及び細胞表面マーカーの同定を行うとともにヒト骨髄間質細胞の細胞表面マーカーの検索を行い、細胞採取における細胞表面マーカーの検討を行った。

A. 研究目的

骨髄間質細胞に関する分化能と細胞の表面マーカーについてマウスにおける検索を行い、同様にヒト骨髄間質細胞の表面マーカーを検索することで、細胞移植に用いる細胞の採取マーカーの決定を行うことを目的とする。

B. 研究方法

慶應義塾大学病理学教室において樹立したマウス骨髄間質由来の細胞株を用いて、マウスに細胞移植を行い細胞分化能の検索を行った。Fluorescence-activated cell sorting (FACS)を用いて細胞株及び軟骨分化能を有するヒト骨髄間質細胞の細胞表面マーカーの検索を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト骨髄間質細胞を本研究に使用するにあたり慶應大学医学部倫理委員会承認(13-11)を得ており、実験動物においては医学部動物実験委員会の承認(011021)を得ている。

C. 研究結果

マウス骨髄間質細胞株 KUM2、KUM9、KUSA0、KUSA/A1 の細胞移植を試行した。KUM2 は心筋・骨格筋・骨に分化し多分化能を有する中胚葉系幹細胞

と判明した。KUM9 は骨格筋・骨・脂肪に分化し間葉系幹細胞と、KUSA0 は骨・脂肪に分化するため骨脂肪前駆細胞と判定し、KUSA/A1 は骨のみの分化能を有していたため骨前駆細胞と考えられた。

これらの細胞表面マーカーは、未熟な幹細胞において CD34、CD117 が陽性であり、分化能が制限される前駆細胞に行くに従い CD117、CD34 の発現は消失していた。また、幹・前駆細胞全般に CD140a の発現が認められた。軟骨分化能を有するヒト骨髄間質細胞においては、CD34、CD117 の発現は認めず、マウスでは陰性であった CD90、CD105 の発現を認めた。

D. 考察

ヒト、マウスにおける骨髄間質細胞の細胞表面マーカーは、多くの点で差異を認めた。マウス骨髄間質細胞における未分化能を示す指標として CD34、CD117 が挙げられる。しかし、ヒト間質細胞においてはいずれも陰性となりこれらは有効な指標となりえないと思われる。ヒト骨髄間質細胞においては CD34⁻、CD90⁺、CD105⁺、CD117⁻の細胞群が軟骨分化能を有する細胞であると考えられる。

E. 結論

ヒト骨髄間質細胞から軟骨分化能を有する細胞採取においては CD34⁻、CD90⁺、CD105⁺、CD117⁻の細胞群がよいと考えられる。

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 Yabe, H., Fukuma, M., Urano, F., Yoshida, K., Toyama, Y., Hata, J., and Umezawa, A.: Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing's sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press
- 2 Hakuno, D., Fukuda, D., Makino, S., Konishi, F., Tomita, Y., Manabe, T., Suzuki, Y., Umezawa, A. and Ogawa, S.: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, 105: 380-386, 2002
- 3 Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nishikawa, T.: Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 118: 199-204, 2002
- 4 Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J. and Umezawa, A.: Brain from Bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. *Differentiation (Special issue on stem cells)* 68: 235-244, 2001
- 5 Shinoda, K., Nakamura, Y., Matsushita, K., Shimoda, K., Okita, H., Fukuma, M., Yamada, T., Ohde, H., Oguchi, Y., Hata, J. and Umezawa, A.: Light-induced apoptosis is accelerated in transgenic retina overexpressing human EAT/mcl-1, an anti-apoptotic bcl-2-related gene. *Br J Ophthalmol* 85: 1237-1243, 2001
- 6 Muto A, Kizaki M, Kawamura C, Matsushita H, Fukuchi Y, Umezawa A, Yamada T, Hata J, Hozumi N,

Yamato K, Ito M, Ueyama Y, Ikeda Y.: A novel differentiation-inducing therapy for acute promyelocytic leukemia with a combination of arsenic trioxide and GM-CSF. *Leukemia* 15(8):1176-84, 2001

- 7 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*, 266 (1): 114-125, 2001
- 8 Fukuzawa, R., Umezawa, A., Monkawa, Y., Chang Kim, K., Nagai, T., Hata, J-i: Nesidioblastosis and mixed hamartoma of the liver in Beckwith-Wiedemann syndrome: a case study including analysis of H19 methylation and insulin-like growth factor 2 genotyping and imprinting. *Pediatr Dev Pathol*. 4(4):381-90, 2001
- 9 Hamatani, T., Sasaki, H., Ishihara, K., Hida, N., Maruyama, T., Yoshimura, Y., Hata, J-i, and Umezawa, A.: Epigenetic mark sequence of the H19 gene in human sperm. *Biochim Biophys Acta*. 1518(1-2):137-44, 2001.
- 10 Ochi, K., Nozaki, H., Tanaka, F., Kato, K., Fukuzawa, F., Sobue, G., Fukuuchi, F., Toyama, Y., Hata, J-i, and 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
- 11 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
- 12 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.
- 13 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
- 14 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 (As₂O₃)-induced apoptosis and differentiation in retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in hGM-CSF-producing transgenic SCID mice. *Leukemia*, 14: 431-438, 2000
 - 15 Suzuki, A., Umezawa, A., Sano, M., Nozawa, S., and Hata, J-i: Involvement of EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene, in the apoptotic mechanisms underlying human placental development and maintenance. *Placenta*, 21(2):177-183, 2000
 - 16 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
 - 17 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
 - 18 桜田一洋、梅澤明弘：間葉系幹細胞と再生医学、わかる実験医学シリーズ「再生医学がわかる」、pp84-92, 羊土社、2002
 - 19 梅澤明弘：間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell)による造血再生 血液・腫瘍科 44: 126-136, 2002
 - 20 梅澤明弘：間葉系幹細胞をもちいた再生医療研究 分子細胞治療 1(1): 31-37, 2002
 - 21 梅澤明弘：間葉系幹細胞 ゲノム医学 2(1): 87-94, 2002
 - 22 五條理志, 梅澤明弘, 秦順一：多能性体性幹細胞としての間葉系幹細胞 最新医学 57(1): 38-46, 2002
 - 23 五條理志, 梅澤明弘：間葉系幹細胞の分化制御機構 炎症と免疫 10(1): 13-18, 2002
 - 24 梅澤明弘, 神山淳, 阿部仁, 秦順一：間葉系幹細胞-新しい生体マイクロデバイス・骨髄間質細胞の可塑性を利用したグローバルな"臓器"再構築- 医学のあゆみ 199(13): 973-979, 2001
 - 25 梅澤明弘：細胞不死化・臓器再生・置換から寿命延長の可能性をさぐる (4章-3, pp114-120) 「老化研究が分かる」(編集/井出利憲) 羊土社, 2002
 - 26 梅澤 明弘：間葉系幹細胞の応用展望-細胞移植に対する病理組織学的な評価システムの提言- 遺伝子医学 5(4): 53-58, 2001
 - 27 梅澤明弘：骨髄間質細胞由来の間葉系幹細胞を用いた臓器再生・細胞移植およびその評価システムの確立 実験医学 19(15): 151-158, 2001
 - 28 梅澤明弘：骨髄間質による骨形成 現代医療 (特集：幹細胞の基礎と臨床応用への挑戦、須田年生編集) 33(8): 125-130, 2001
 - 29 梅澤明弘：臓器再生-骨髄細胞の場合 生物の科学 遺伝 別冊No. 13: 100-110, 2001
 - 30 越智健介, 今林英明, 戸山芳昭, 秦順一, 梅澤明弘：骨髄間質細胞-再生医療における新たなる治療戦略- 臨床整形外科 36(9): 1034-1036, 2001
 - 31 森泰昌, 梅澤明弘, 秦順一：骨髄間質細胞 治療学 35(35): 21-24, 2001
 - 32 越智健介, 戸山芳昭, 秦順一, 梅澤明弘：未分化幹細胞による骨・軟骨再生の試み *Rheumatology Clinical Update* 6: 40-41, 2001
 - 33 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
 - 34 梅澤明弘：骨髄間質細胞 分子細胞治療 2(1): 17-24, 2001
 - 35 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
 - 36 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
 - 37 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
 - 38 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 (学会発表)
 - 1 梅澤明弘：間葉系幹細胞の部分全能性とその細胞移植に対する病理学的評価システムの確立、シンポジウム「明日の病理学：分子と人体の対話」、3月、第 91 回日本病理学会総会、東京、2002

- 2 福間真理子、秦順一、梅澤明弘：Ewing 肉腫特異的キメラ蛋白のターゲットとしての分化抑制遺伝子、ワークショップ「キメラ遺伝子と疾患」、3月、第91回日本病理学会総会、東京、2002
 - 3 梅澤明弘：生体マイクロデバイスとしての「骨髄間質由来の間葉系幹細胞」、再生医学・治療研究開発センター公開シンポジウム 2002、文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業、3月、東京、2002
 - 4 梅澤明弘：「細胞移植による再生医療について」、3月、第127回やさしい科学セミナー、国際科学技術財団、東京、2002
 - 5 梅澤明弘：幹細胞移植による人体の機能再生をめざして、2月、第205回DNA研究会、東京、2002
 - 6 梅澤明弘：DNA の脱メチル化に伴う骨芽細胞からニューロンへの細胞転換、2月、第1回メチレーションと小児神経学研究会、東京、2002
 - 7 梅澤明弘：骨・軟骨の再生・修復に対する細胞治療の可能性 -骨髄間質由来の間葉系幹細胞を用いた移植の試み-、第16回北海道整形外科基礎研究会、1月、札幌、2002
 - 8 梅澤明弘：DNA 脱メチル化剤による骨芽細胞からニューロンへの細胞転換、1月、京都大学医学部・学術講演会、京都、2002
 - 9 梅澤明弘：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るグローバルな臓器再構築、第17回京阪肉腫研究会、12月、城崎、2001
 - 10 梅澤明弘、シンポジウム「人体の機能再生はどこまで進か—遺伝子時代の老いと健康を考える」、東京テクノフォーラム、11月、東京、2001
 - 11 梅澤明弘：新しい生体マイクロデバイス・間質系幹細胞の細胞移植による臓器再構築、第7回小児H-SCT研究会・特別講演、11月、東京、2001
 - 12 Umezawa, A.: Brain from Bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent, The 6th International Symposium by Organized Research Combination System, Tokyo, 12th Oct, 2001
 - 13 梅澤明弘：骨・軟骨の再生・修復に対する細胞治療の可能性 -骨髄間質由来の間葉系幹細胞を用いた移植の試み-、骨粗鬆症研究会・特別講演、10月、長崎、2001
 - 14 梅澤明弘：生体マイクロデバイス（間葉系幹細胞）の分子シンクロナイゼーション、第48回応用物理学会関連連合講演会、シンポジウム「21世紀を拓く分子シンクロナイゼーション—分子シンクロ材料とデバイス・システム応用—」、3月28-31日、東京、2001
 - 15 梅澤明弘：骨髄間質細胞を用いた臓器再生と細胞移植、第22回日本炎症・再生医学会、ワークショップ「幹細胞システムと組織再生」、東京、7月、2001
 - 16 梅澤明弘：歯科領域における骨再生・修復に対する細胞治療—骨髄間質由来の間葉系幹細胞を用いた再生医療—、神奈川歯科大学同窓会、横須賀、7月、2001
 - 17 梅澤明弘：DNA メチル化の変化に伴う細胞の分化転換—再生医療の供給源としての骨髄間質を用いて—、大阪大学蛋白質研究所セミナー「遺伝子制御におけるエピジェネティックスの展開」大阪、6月、2001
 - 18 梅澤明弘：新しい生体マイクロデバイス・間質系幹細胞の細胞移植による臓器再構築、第90回日本病理学会総会、東京、4月、2001
 - 19 梅澤明弘：間葉系幹細胞の現状と展望、第19回川内カンファレンス、徳島、4月、2001
 - 20 梅澤明弘：再生医療・細胞移植に対する病理学的な評価システムの提言、第2回細胞病理談話会、東京、8月4,5日、2001
 - 21 大喜多肇、梅澤明弘、松下健一、鈴木淳、下田耕二、福間真理子、佐野誠、山田健人、秦順一：Bcl-2 関連遺伝子 EAT のトランスジェニック・マウスでは、多彩な腫瘍が発生する。第90回日本病理学会総会、東京、4月5-7日、2001
 - 22 福間真理子、梅澤明弘、秦順一：Ewing 肉腫細胞特異的 EWS-ETS 癒合蛋白による HLH 転写抑制遺伝子の活性化、第90回日本病理学会総会、東京、4月5-7日、2001
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
- 1 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内（第372826号、平成11年12月28日）
「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際（PCT/JP00/001148、平成12年2月28日）
「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際

(PCT/JP00/07741、平成12年11月2日)

「心筋細胞への分化能を有する細胞」 国際

(PCT/JP00/09323、平成12年12月27日)

- 2 「骨の再生方法」 国内 (第 251365 号、平成 13 年 8 月 22 日)

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

平成12年度には、マウス・ラットを用いた研究の環境整備を行った後、In vitro 実験を開始した。細胞追跡に必要な細胞標識法を比較検討した。平成13年度には、さらに、Green Fluorescent Protein 発現遺伝子組み替えマウス(GFP マウス)由来細胞を用いた場合に、細胞追跡に関して最適であることが判明した。この GFP マウス由来骨髄細胞とラット新生児心筋細胞とを共培養することで、骨髄細胞の同期収縮および筋原性タンパクの発現を経時的に観察した。その結果、心筋細胞との直接接着が骨髄細胞の心筋分化に重要な環境因子の一つであることが判明した。また、GFP マウス由来骨髄細胞を用いてキメラマウスを作成し、心筋梗塞モデルに対して、骨髄細胞の遊走能・分化能を検討した。さらに、ブタ心筋梗塞モデルを作成し、骨髄単核球細胞や骨髄 stoma 細胞を直接注入法で移植した。細胞移植手技による、急性期における心機能に対する影響を、圧-容積曲線を用いて解析したところ、有意な心機能の低下は認められなかった。

A. 研究目的

心筋梗塞や拡張型心筋症に対する新たな治療法として細胞療法が注目を集めている。本研究では、心臓への細胞療法を臨床へ応用するために必要な情報を得るために、目的に応じて動物を使い分け、平成13年度は以下の研究を行なった。

① 細胞標識法の比較—GFP 遺伝子組み替えマウス由来細胞

前年には、各細胞標識法を用いて一定の細胞標識率を得ることができたが、3週間後の細胞標識率は急激に低下し、細胞の定量化を行なうことができなかった。そこで、今回は、GFP マウスを用いて細胞標識率を in vitro および in vivo において検討した。

② 心筋細胞との共培養システムによる骨髄細胞の心筋分化の解析

骨髄細胞が生体内で心筋へ分化する証拠の報告が散見される。しかし、in vivo での現象であるがゆえに、環境因子の詳細は不明である。われわれは、この in vivo での現象を、in vitro で模擬化することにより、環境因子による骨髄細胞の分化誘導の解析を行なった。

③ GFP-キメラモデルによる骨髄細胞の遊走、心筋再生の研究

最近の報告で、障害心内での心筋の自己再生の現象の報告が見られるようになった。その再生像を示す細胞の由来が心臓自体なのか、骨髄からなのかは不明である。本研究では、この心臓の自己心筋復生能を検討する。

④ 大型動物(ミニブタ)を用いた細胞移植による急性期副作用関する研究

細胞移植を臨床応用化するための課題として、細胞移植手技自体による影響に関する研究がある。適正な投与量や投与方法を決定する場合に、まず、薬効を期待できる方法の開発は当然であるが、一方で副作用が発現する投与量を知ることもまた重要な課題である。本研究では、世界的に全般で行なわれている細胞数・液を投与した場合の、特に急性期の心機能に対する影響を検討する。さらに、投与量の増大により、心機能にいかなる影響が出るのかを検討する。

B. 研究方法

①細胞標識法の比較—GFP 遺伝子組み替えマウス由来細胞

GFP マウス (C57BL/6Tg14(act-EGFP)OsbY01) を大阪大学岡部教授から分与していただき、繁殖させた。この GFP マウスを用いて以下の実験を行なった。深麻酔下、両側下肢を切断し、骨髄を採取した。細胞培養皿で培養を開始し、播種直後、1, 2, 3 週間にわたり細胞標識率を蛍光顕微鏡下で解析した。In vivo の実験では、培養した骨髄細胞を C57b6 マウス心臓内へ直接注入法にて移植し、3 週間後細胞の存在の有無を検討した。

②心筋細胞との共培養システムによる骨髄細胞の心筋分化の解析

ラット新生児心筋細胞(CM)と GFP マウス骨髄細胞(GFP-BM)を用いて、Group1:GFP-BM 単独培養、Group2:GFP-BM と CM(insert 内)培養、Group3:GFP-BM と CM の同一培養皿内共培養のモデルを作成した。GFP-BM の CM との同期的収縮の現象と免疫組織学的検討により心筋分化を解析した。

③GFP-キメラモデルによる骨髄細胞の遊走、心筋再生の研究

致死放射線(900Gy)照射後、GFP-BM(106)を尾静脈から移植する。一ヵ月後、骨髄を採取し、キメラの状態を検討する。同処置をした別個体のマウスで、脾臓摘出を施行後、さらに、2 週間後に、全身麻酔下、冠動脈をケツサツし、心筋梗塞を作成する。1 ヶ月後犠牲死させ病理組織学的検討を行う。

④大型動物(ミニブタ)を用いた細胞移植に関する研究(急性期副作用)

NIBS ミニブタ(日本生物科学研究所、日本農産工業)を用いた。全身麻酔下側開胸し、左前下降枝をケツサツし、心筋梗塞を作成した。1 ヶ月後、培養した骨髄細胞、骨髄単核球、生理食塩水を虚血部位に直接注入法にて移植した。梗塞心に対しては、細胞移植前、細胞移植直後に Millar 及び Conductance カテーテルを用いて Pressure-Volume loop を作成し、各種パラメーターを算出し解析した。細胞移植急性期の心機能のおよぼす影響に関する追加実験として、正常心に対して、生理食塩水や血液を注入し、心機能の変動を解析した。

C. 研究結果

①細胞標識法の比較—GFP 遺伝子組み替えマウス由

来細胞

骨髄細胞は in vitro において培養・増殖可能であった。細胞培養開始から 3 週間まで 100%の細胞が強い緑色蛍光を放っていた。In vivo においては移植した部位に、強い緑色蛍光を放った細胞集落を容易に観察できた。心筋細胞や background の自家蛍光とは、完全に識別可能であった。

②心筋細胞との共培養システムによる骨髄細胞の心筋分化の解析

Group1 と 2 において、GFP-BM の拍動や心筋原性分化は認められなかった。それに対して、Group3 では、共培養開始 2 日後から、一部の GFP-BM は拍動する CM に接着し同期収縮をしているのが観察された。共培養開始 1 日後から Myosin Heavy Chain 陽性 GFP-BM が認められ(0.14%)、5 日後に有意に増加した。Connexin43 陽性と ANP 陽性(0.78%)GFP-BM は、2 日後から認められた。Troponin I 陽性 GFP-BM は 4 日後に初めて認められ、その後増加した。

③ GFP-キメラモデルによる骨髄細胞の遊走、心筋再生の研究

GFP キメラ(骨髄細胞中、GFP 陽性率約 70%)を作成することができた。このキメラマウスを用いることで、心筋への遊走を確認した。冠動脈ケツサツし心筋梗塞を作成することにより、GFP-BM が心筋に遊走、生着することが明らかになった。

④大型動物(ミニブタ)を用いた細胞移植による急性期副作用に関する研究

細胞移植後の死亡例はなかった(0%)。(なお、ブタは、移植 1 ヶ月後に犠牲死させた。)

細胞移植による HR, BP, 各種パラメーターの変動はなかった。心筋梗塞後の細胞移植では、細胞は癒痕部、境界部に残存し、集塊を形成していた。正常心に対して行なった実験では、1cc, 10cc においてもパラメーターの変動は見られなかった。刺入部からの漏出は若干見られるが、多くは、冠静脈へ drainage されるようであった。断面をみると注入部内出血はみられるものの注入量相当の容積の増大はなく、注入の大部分が静脈に還流することが示唆された。それに対して、心停止下同様に注入した場合、心拍動下よりも多量の細胞塊を心筋内に確認した。

D. 考察

①細胞標識法の比較—GFP 遺伝子組み替えマウス由来細胞

GFP マウス由来細胞は、細胞を *in vitro* あるいは *in vivo* で確実に追跡すること、あるいは他細胞と識別できることにおいて、他のどの方法 (DAPI, PKH26, BrdU, GFP lipofection) よりも優れていた。マウスを用いた研究において、GFP マウス細胞は大変有効な方法であることが明らかになった。

②心筋細胞との共培養システムによる骨髄細胞の心筋分化の解析

共培養システムを用いて心臓内環境モデルを作成することができた。In vitro において人工的化合物を用いることなく骨髄細胞の心筋分化を報告した。今まで、漠然と環境因子といわれてきた骨髄細胞の心筋分化のメカニズムの解明に一つの方法論を提供した。さらに、*in vivo* での条件を模擬化することにより、*in vitro* で心筋分化に関する研究の発展に貢献すると考えられる。

③ GFP-キメラモデルによる骨髄細胞の遊走、心筋再生の研究

キメラモデルを作成し、自己修復による心筋再生のメカニズムを検討した。現在まで、骨髄細胞が具体的にどのような機転で、虚血部から情報を得、遊走し、浸潤し、生着、分化してゆくメカニズムの詳細は不明である。今後、自然治癒力を増幅させる方法論の確立に貢献するものと考えられる。

④大型動物(ミニブタ)を用いた細胞移植に関する研究(急性期副作用)

心筋への細胞移植の手技自体では、心機能に大きな影響はないことが判明した。体外循環下心停止下に注入することを想定した場合、心拍動の再開が得られた際に、一気に冠静脈へ還流することが危惧されるため、心拍動での条件と同等量を注入するほうが安全と考えられる。冠血行が正常な心臓の領域あるいはほぼ正常な心臓(拡張型心筋症)では、心筋細胞や細胞外器質は堅牢であり、移植細胞浮遊液が停滞できる空間は少なく、多くの溶液は冠循環に還流することが考えられる。心筋内に生着する空間的問題から一度に投与しえる量には限界があると考えられ、今後の細胞移植法の方法論に関して重要な情報を提供した。

E. 結論

①細胞標識法の比較—GFP 遺伝子組み替えマウス由来細胞

GFP マウス由来細胞は、細胞移植の研究を行なう上で必要な細胞追跡に関して大変強力なツールとなることが判明した。

②心筋細胞との共培養システムによる骨髄細胞の心筋分化の解析

本研究で用いた共培養システムは心臓内環境を模擬化するものとして有用である。骨髄細胞は心筋細胞との直接接着により、経時的に心筋特異的タンパクの発現を認め、心筋原性分化をすることが明らかになった。

③ GFP-キメラモデルによる骨髄細胞の遊走、心筋再生の研究

キメラマウスにより、心筋梗塞作成後、骨髄から細胞が、病変部遊走し生着することが明らかになった。

④大型動物(ミニブタ)を用いた細胞移植による急性期副作用に関する研究

現存の方法論における注入量では、心機能に影響はなかった。余剰な溶液成分の多くは冠静脈へ還流されることが判明した。拍動心に比し、停止心の場合、注入時に低圧で注入しえ、残存量は多く見られたが、その後の再拍動後の心臓外への漏出の可能性が危惧される。

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. S.Fukuhara, S. Tomita, T.Nakatani, T. Morisaki, A. Kishida, C. Yutani, S. Kitamura: Comparison of cell labeling methods for cell transplantation to treat heart failure: Quantitative analysis in the long term.