

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14年度 総括研究報告書

主任研究者 福田恵一

平成15（2003）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	15
梅澤明弘	
2. 心筋細胞移植法の検討	23
中谷武嗣	
III.研究成果に関する一覧表	30
IV.研究成果の刊行物・別冊	41

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、 湯浅慎介、板橋裕史、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。本研究では骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導法の開発、再生心筋細胞の遺伝子発現、交感神経・副交感神経受容体の発現と機能解析、心筋細胞に分化した CMG 細胞が発現するイオンチャネルを解析し、心筋分化に伴ってこれらのチャ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。さらに、骨髄移植モデルマウスを用いて、骨髄多能性幹細胞の *in vivo* での移動と組織再生機能を解析した。心筋梗塞急性期に G-CSF を用いると梗塞部位に骨髄幹細胞が動員され、心筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞が分化誘導されることを明らかにした。また、この治療法は心機能の改善、梗塞後リモデリングの防止、予後の改善につながるものであった。

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。2000 年度の研究では骨髄由来の心筋細胞（CMG 細胞）の性質を明らかにするため、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。2002 年度には心筋梗塞部位に骨髄幹細胞が誘導され心筋再生が行われるか否か、さらにサイトカインを用いることにより骨髄幹細胞による心筋組織再生が促進されるか否かを解析した

## B.方法

(2000年度)

### ①CMG細胞の作成

C3H/He マウス大腿骨より骨髓を摘出し、Dexter法により初代培養を行った。骨髓間質細胞は付着系の細胞であり浮遊系の骨髓芽細胞、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(Cardiomycogenesis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 $\alpha_1$ 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。

(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ICa,L、If、IK1、IK,Ach、IK,ATP、Ito、IKs、Ikr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IK1(IRK1、IRK2)、IKr(MERG)、IKs(KvLQT1、minK)、Ito(KV1.2、KV1.4、KV2.1、KV4.2、KV4.3)、IK,ATP(KIR6.1、KIR6.2、SUR2A、SUR2B)、IK,Ach(GIRK1、GIRK4)、If(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。

②GFP発現およびLacZ発現トランスジェニックマウスの骨髓細胞を採取し、致死量の放射線を照射したNOD-SCIDマウスに骨髓移植をおこなった。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。

(2002年度)

GFPトランスジェニックマウスの骨髓細胞を採取し、致死量放射線照射後の同系マウス(C57BL/6)に骨髓移植した。2ヶ月後マウスの末梢血を採取し、血球系細胞をFACS解析した。血球系細胞のキメラ率が90%を超えるマウスに関して、麻酔開胸し左冠動脈結紮により心筋梗塞を作成した。梗塞作成の翌日より10日間G-CSF、GM-CSFを投与した。生存率を観察するとともに、2ヶ月後心エコーにて心機能を評価後に心臓を摘出した。レーザー顕微鏡により抗心筋アクチニン抗体、抗平滑筋アクチン、抗von Willebrand Factor(vWF)抗体とDAPI(核染色)の共染色により心筋組織再生について解析した。

## C.結果

(2000年度)

### ①骨髓間質細胞より心筋細胞への分化誘導法の確立:

骨髓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週頃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ノ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。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か月以上、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 $\alpha$ 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<sub>CaL</sub>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IK<sub>ATP</sub>、I<sub>to</sub>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IK<sub>s</sub>、IK<sub>ACh</sub>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骨髓移植マウスでは心筋梗塞作成後梗塞部位に骨髓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か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。

(2002年度)

梗塞後2ヶ月の時点での生存率は生食投与群では約60%、G-CSF投与群で約90%であり、著明な生存率の改善を認められた。一方、GM-CSF投与群では生食投与群に比し急性期の死亡率の増加が観察された。心エコーによる解析ではG-CSF投与群では生食投与群に比べて左室駆出率(EF)の上昇、左室拡張末期径(LVEDD)の短縮が観察され、心機能の改善を認められたが、GM-CSF投与群ではEFの低下、LVEDDの拡大を認め、心機能の増悪が観察された。梗塞後2ヶ月の時点での組織では梗塞部位に一致してGFP陽性細胞が多数観察され、その一部は心筋、血管内皮、平滑筋細胞の抗体と共染色され、骨髓幹細胞により組

織再生がなされていること、G-CSF 投与によりこの GFP 陽性細胞が著しく増強することが観察された。

#### 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ということが報告された。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。

本年度の研究では、生体内の骨髄幹細胞が心筋梗塞という現象の際に G-CSF 等のサイトカインを使用すると組織の傷害部位に移動し、組織再生に働くことが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞を *in vitro* で増幅させるだけでなく、*in vivo* で動員する様な研究を行うべきであると考えられた。

#### 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。

2002 年度の研究では心筋梗塞後に G-CSF 等のサイトカインを使用すると骨髄から幹細胞が動員され、心筋梗塞の局所で幹細胞が心筋細胞、平滑筋細胞に分化すること、そして局所での組織再生が梗塞後のリモデリングの防止、心不全の改善をもたらす、動物実験レベルでは予後の改善につながる事が明らかとなった。

#### 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.
  - 8 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<sup>+</sup> 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-kB, 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. *Cardiovascular genomics: New pathophysiological concepts* Pieter Doevendans, Stefan Kaab. Kluwer Academic Publishers (The Netherlands). 245-256, 2002
  - 15 Keiichi Fukuda. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Competes Rendus Biologies* 325:1-12. 2002
  - 16 Keiichi Fukuda. Stem cell transplantation as a mode of regenerative medicine. *Jpn Med Ass J.* 2003 (in press)
  - 17 Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Eiichi Takahashi, Satoko tahara, Yuichi Tomita, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Koji M Owada, Kristiina Vuori, Satoshi Ogawa, Selective involvement of p130Cas/Crk /Pyk2/c-Src in endothelin-I-induced JNK activation. *Hypertention* (in press)2003
  - 18 Keiichi Fukuda. Use of adult mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocyte and its application to cell transplantation therapy. *J Bone Marrow Transplant.* 2003 (in press)
  - 19 Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Isao Shibuya, Haruko Kawaguchi, Toshikazu Nakamura, Hidezo Mori, Koji Kimura, Naoto Fukuyama, Kenichiro Kosai, Satoshi Ogawa. Powerful and

- controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase. *Circulation* (Revised)
- 20 Naoichiro Hattan, Kiyoshi Ando, Jun Fujita, Hiroko Miyatake, Eriko Kuwabara, Hidezo Mori, Yusuke Suzuki, Yuichi Tomita, Isao Shibuya, Akihiro Umezawa, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Cardiovascular tissue engineering: purification and transplantation of bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes into *in vivo* heart. *J Clin Invest* (Revised)
- 21 Keiichi Fukuda. Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and its application to cell transplantation therapy. *Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Clinical Use*. pp121-145. Santiagi Grisolia, M. Dolores Minana, Elena Bendala-Tufanisco, Edit. 2003. Ministerio De Sanidad Y Consumo (Madrid, Spain)
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 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
- 26 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
- 27 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。
- 28 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
- 29 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
- 30 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
- 31 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
- 32 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
- 33 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
- 34 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
- 35 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
- 36 福田恵一。心筋幹細胞。Bio Clinica。15:345-350。2000年 北隆館
- 37 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
- 38 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。
- 39 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
- 40 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
- 41 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。
- 42 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。
- 43 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。
- 44 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。2001年、109-116、南山堂。
- 45 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



- 46 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.
- 47 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。
- 48 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。
- 49 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
- 50 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。
- 51 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。
- 52 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。
- 53 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
- 54 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
- 55 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。
- 56 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)
- 57 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』
- 58 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
- 59 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。
- 60 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
- 61 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
- 62 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。
- 63 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。
- 64 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。
- 65 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。
- 66 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。
- 67 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。
- 68 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
- 69 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
- 70 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
- 71 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。

- 72 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
- 73 福田恵一。『心筋幹細胞』血液・腫瘍科 特集：幹細胞-最近の進歩 44巻6号 449-456。 2002年6月
- 74 林田健太郎、福田恵一。『心筋再生療法の展望』循環器科2002年9月号52巻3号223-230。
- 75 福田恵一。成体幹細胞を用いてどう心筋再生するか。Heart View 2002年。6巻、10号。38-44。
- 76 木下正嘉、福田恵一。『心疾患に対する再生』日本臨床。特集「再生医療」2003年3月 61巻3号480-484
- 77 戸金裕子、福田恵一。細胞移植による心筋再生。Mebio2003年1月号120巻2号20-27。
- 78 福田恵一。『心筋の再生』 特集：再生医療の現状と将来展望：日本医師会雑誌 2003年3月号129巻3号365-368。
- 79 吉岡正豊、福田恵一。『心筋細胞の新生・再生療法と細胞移植療法』再生医療 2003年2巻1号57-63。
- 80 福田恵一。『Rebuilding myocardium- Stem cell therapy』AHA ハイライト 2002 2003年2月146-151。

## 2. 学会発表

1. Keiichi Fukuda. 『Generation of cardiomyocyte from mesenchymal stem cells』 International symposium on Mesenchymal stem cells: Biology and Clinical Use. Valencia. 10.14-15,2002. スペイン、バレンシア。(招請講演)
2. Keiichi Fukuda, Stem Cell Therapy for Tolerance and Tissue Regeneration Conference. 『Use of adult mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocyte and its application to cell transplantation therapy』2002.6.6. アメリカ合衆国ユタ州スノーバード (招請講演)
3. Keiichi Fukuda. Cardiomyocytes generated from marrow mesenchymal stem cell. 26<sup>th</sup> International Congress of Internal Medicine. 京都国際会議場 2002.5.26 (招請講演)
4. Keiichi Fukuda: Development of regenerated cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. International Workshop in muscular dystrophy. Cellules Souches et Therapie Cellulaire (Stem cell and cell therapy) International Symposium. 2002.3.26 フランス・パリ・フランス学術院会館 (招請講演)
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 13<sup>th</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> channels: ERK1/2 is a putative  $\alpha$  subunit kinase. The 18<sup>th</sup> 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. 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)
12. 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)

13. Yuasa S, Hakuno D, Shibuya I, Fujita J, Suzuki Y, Ieda M, Tahara S, Itabashi Y, Yagi T, Kawaguchi H, Hisaka Y, Fukuda K. Adult rat cardiomyocytes can divide after myocardial infarction American Heart Association. 74th Scientific meeting Atlanta Georgia, USA 2002.11.17-20, Chicago, USA
14. Fujita J, Kawada H, Ando K, Suzuki Y, Tomita Y, Kawaguchi H, Shibuya I, Yuasa Y, Fukuda K. Transplanted bone marrow stem cells move to the infarcted myocardium and differentiate into smooth muscle cells and cardiomyocytes 74th Scientific meeting Atlanta Georgia, 2002.11.17-20, Chicago, USA
15. Jun Fujita, Hiroshi Kawada, Kiyoshi Ando, Yusuke Suzuki, Yuichi Tomita, Haruko Kawaguchi, Isao Shibuya, Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda. G-CSF improves post-infarction heart failure by mobilizing bone marrow stem cells, but GM-CSF increases the mortality by deteriorating heart function in mice 74th Scientific meeting. 2002.11.17-20, Chicago, USA
16. Eiichi Takahashi, Shunichiro Miyoshi, Mitsushige Murata, Takahiro Kato, Makoto Ita, Tsutomu Tanabe, Keiichi Fukuda LIF activates cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels via phosphorylation of serine 1829 of rabbit  $\alpha_1c$  subunit 74th Scientific meeting Atlanta Georgia, USA 2002.11.17-20, Chicago, USA
17. Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, Toshikazu Nakamura, Hidezo Mori, Satoshi Ogawa. Development of powerful but controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase. International Vascular Biology Meeting. Karuizawa Nagano, May 13, 2002
18. 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
19. 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  $Ca^{2+}$ -Induced  $Ca^{2+}$  Release, and Are Involved in  $GP130$ -Mediated Cardiac Hypertrophy. 73rd Scientific meeting New Orleans LA, USA 2000.11.
20. 第2回日本再生医療学会 シンポジウム 「骨髄幹細胞動員による心筋梗塞治療法の開発」 福田恵一、藤田淳、津間光代、川田浩志、安藤潔。平成15年3月11日
21. 第47回日本人類遺伝学会 シンポジウム4 「先端医療としての再生医学」 福田恵一「成体幹細胞を用いた心筋細胞の再生と心血管 tissue engineering」平成14年11月14日 名古屋 Hilton ホテル
22. 第25回日本高血圧学会 教育講演1 「再生医療」 福田恵一『成体幹細胞を用いた心筋細胞の再生と心血管 tissue engineering』
23. 第3回心血管再生医学研究会 平成14年10月5日 八重洲富士屋ホテル、藤田淳、福田恵一 サイトカインを用いた骨髄幹細胞動員による心筋梗塞治療法の開発
24. 第6回日本心不全学会 MEET THE EXPERT 平成14年10月3日 京王プラザホテル 福田恵一『G-CSF improves post-infarction heart failure by mobilizing bone marrow stem cells, but GM-CSF increases the mortality by deteriorating heart function in mice』
25. 第3回日本炎症・再生医学会 平成14年7月2日 京王プラザホテル ワークショップ『心血管疾患と再生医学』 福田恵一『成体幹細胞を用いた心筋細胞の再生と細胞移植による心不全治療』
26. 第66回 日本循環器学会 プレナリーセッション『Myocyte development, apoptosis and regeneration』 福田恵一、『Molecular characterization of regenerated cardiomyocyte derived from adult stem cells』平成14年4月25日
27. 第66回 日本循環器学会 ECS/JCA ジョイントシンポジウム『New therapeutic development and their impact on heart failure management』 福田恵一、『Development of cell transplantation therapy for heart failure using bone-marrow-derived regenerated cardiomyocyte』平成14年4月26日
28. 第1回日本再生医療学会シンポジウム 21世紀の医療の現状とその実用化に向けて。福田恵一。平成14年4月19日 成体幹細胞を用いた心筋細胞の再生と細胞移植による心不全治療法の開発。
29. 第31回日本心臓血管作動物質学会 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
30. 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
  31. 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
  32. 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
  33. 第49回 日本心臓病学会教育講演 未来の心不全治療。平成13年9月23日 福田恵一。
  34. ACCP 日本部会 日本部会賞特別講演 Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. 平成13年9月8日 福田恵一
  35. 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
  36. 第60回 東京矯正歯科学会 福田恵一。特別講演 心血管 Tissue Engineering を目指した再生心筋細胞の開発 平成13年7月12日 東京有楽町
  37. 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
  38. 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
  39. 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
  40. 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
  41. 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』
  42. 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 京都国際会議場
  43. 第78回 日本生理学会 シンポジウム『心臓生理学の将来を考える』福田恵一:『心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発』平成13年3月29日 京都 同志社大学新町キャンパス
  44. 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
  45. 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
  46. 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
  47. 第13回 日本動物細胞工学会 福田恵一: シンポジウム Generation of regenerated cardiomyocytes and its therapeutic use for cell transplantation into failing heart 平成12年11月20日福岡
  48. 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
  49. 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』Development of regenerated cardiomyocyte for cardiovascular tissue engineering 平成12年10月9日神戸
  50. 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
  51. 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

52. 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
53. 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
54. 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
55. 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
56. Yusuke Suzuki, Jun Fujita, Hitoshi Kawada, MD, PhD, Johbu Itoh, PhD, Tomomitu Hotta, Kiyoshi Ando, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. 3-Dimensional coronary angiography in mice using confocal laser scanning microscopy. (第 67 回日本循環器学会学術集会) 平成 15 年 3 月 28-30 日
57. Jun Fujita, Hiroshi Kawada, Mituyo Tuma, Kiyoshi Ando, Yusuke Suzuki, Tomomitu Hotta, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Transplanted bone marrow stem cells move to the infarcted myocardium and regenerate the heart. (第 67 回日本循環器学会学術集会) 平成 15 年 3 月 28-30 日
58. Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Isao Shibuya, Haruko Kawaguchi, Toshikazu Nakamura, Naoto Fukuyama, Hidezo Mori, Satoshi Ogawa Gene-modified cell transplantation therapy expressing hHGF and TK produces arteriolar level angiogenesis in murine hind limb ischemia. (第 67 回日本循環器学会学術集会) 平成 15 年 3 月 28-30 日
59. Haruko Kawaguchi, Makoto Suematsu, Satoko Tahara, Yuichi Tomita, Masaki Ieda, Jun Fujita, Tomohiro Manabe, Yuji Itabashi, Takashi Yagi, Shinsuke Yuasa, Masaki Kinoshita, Kentaro Hayashida, Masatoyo Yoshioka, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda. Neurotrophin-3, a neurotrophic factor, is a new member of cardiomyocyte hypertrophic factors (第 67 回日本循環器学会学術集会) 平成 15 年 3 月 28-30 日
60. Isao Shibuya, Yuichi Tomita, Yumi Matuzaki, Hideyuki Okano, Keiichi Fukuda. Existence of side population cells in primary heart cell culture (第 67 回日本循環器学会学術集会) 平成 15 年 3 月 28-30 日
61. Masaki Ieda (第 67 回日本循環器学会学術集会) 平成 15 年 3 月 28-30 日
62. 澁谷功、富田雄一、川口治子、久下康代、松崎有未、岡野栄之、福田恵一 「マウス心臓に存在する side population cells の解析」第 2 回日本再生医療学会総会 2003 年 神戸
63. 久下康代、家田真樹、木村謙介、澁谷功、川口治子、中村敏一、小財健一郎、福田恵一 「HGF 産生細胞移植による新生血管の評価」第 2 回日本再生医療学会総会 2003 年 神戸
64. 久下康代、福田恵一、家田真樹、木村謙介、澁谷功、川口治子、中村敏一、盛英三、福山直人、小川聡 「遺伝子改変細胞をベクターとして用いた強力かう制御可能な血管新生遺伝子治療の開発」第 8 回放射光医学研究会 2003 年 1 月 姫路
65. 久下康代、福田恵一、家田真樹、木村謙介、澁谷功、川口治子、中村敏一、盛英三、福山直人、小川聡 「遺伝子改変細胞をベクターとして用いた強力かう制御可能な血管新生遺伝子治療の開発」第 43 回日本脈管学会 2002 年 東京
66. 川口治子、末松誠、田原聰子、佐藤敏彦、真鍋知宏、林田健太郎、木下正嘉、澁谷功、小川聡、福田恵一。神経成長因子である Neurotrophin-3 は心筋細胞肥大を誘導する。第 6 回 Molecular cardiovascular Conference. 平成 14 年 9 月 1 日
67. 藤田 淳、川田 浩志、鈴木 雄介、安藤潔、津間光代、富田雄一、澁谷功、川口治子、湯浅慎介、小川聡、福田恵一。サイトカインを用いた骨髄幹細胞動員による心筋梗塞治療法の開発 第 6 回 Molecular cardiovascular Conference. 平成 14 年 9 月 1 日
68. 家田真樹 第 6 回 Molecular cardiovascular Conference. 平成 14 年 9 月 1 日
69. 久下康代、福田恵一、家田真樹、木村謙介、澁谷功、川口治子、中村敏一、盛英三、福山直人、小川聡 「遺伝子改変細胞をベクターとして用いた強力かう制御可能な血管新生遺伝子治療の開発」第 6 回 Molecular cardiovascular Conference. 平成 14 年 9 月 1 日
70. 第 25 回心筋代謝研究会 成獣ラット心筋細胞は

- 心筋梗塞後に分裂像を呈する 湯浅慎介, 家田真樹, 富田雄一, 田原聡子, 藤田淳, 八木崇, 板橋裕史, 鈴木雄介, 川口治子, 小川聡, 久下康代, 澁谷功, 福田恵一, 北海道札幌 平成14年7月19-22日
71. 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, 粟津緑。培養尿管芽細胞周期的進展刺激による p38MAPK キナーゼの活性化第45回日本腎臓病学会 平成14年5月24日
72. Masaki Ieda, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Molecular characterization of endothelin-1-specific augmentation of nerve growth factor gene expression in cardiomyocyte. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
73. Yuichi Tomita, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Molecular mechanism of the changes in appearance of the action potentials in bone-marrow derived regenerated cardiomyocytes. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
74. Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Leukemia Inhibitory factor activates cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels; ERK1/2 is a putative  $\alpha$ 1 subunits kinase. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
75. Kensuke Kimura, Keiichi Fukuda, Takashi Yagi, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Disorder of the neurocrine network in the failing heart: Dissociation of elevated neuronal density and down regulation of norepinephrine metabolism. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
76. Daihiko Hakuno, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
77. Yuichi Tomita, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Determination of the autocrine/paracrine secreted cytokines and growth factors in bone marrow derived cardiomyogenic cells. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
78. Naoichiro Hattori, Keiichi Fukuda, Kiyoshi Ando, Yuichi Tomita, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Prospective isolation of regenerated cardiomyocytes from the mixture of mesenchymal stem cells. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
79. Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Adult rat cardiomyocytes can divide after myocardial infarction. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
80. Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Angiogenic gene cell therapy using hepatocyte growth factor improves ischemic limb. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
81. Toshihiko Satoh, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Satoko Tahara, Jun Fujita, Yuji Itabashi, Shinsuke Yuasa, Isao Shibuya, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Satoshi

- Ogawa. Differential response between cardiomyocytes and cardiac fibroblasts in reactive oxygen species(ROS)-mediated signal transduction pathways by endothelin-1. The 66<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Sapporo, Japan (第66回日本循環器学会学術集会) 平成14年4月24-26日
82. 久下康代、福田恵一、小川聡。HGF 産生細胞を用いた血管新生療法の開発。平成14年4月18日 第1回日本再生医療学会。京都国際会議場。
83. 伯野大彦、福田恵一、小川聡。骨髄由来の心筋細胞におけるカテコラミン、ムスカリン受容体の発現・機能解析。平成14年4月19日 第1回日本再生医療学会。京都国際会議場。
84. 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 rosstalk 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
85. 福田恵一、田原聡子、小玉博明、岩永史郎、朝倉靖、佐藤徹、吉川勉、三田村秀雄、小川聡：Kチャンネル遮断薬は心筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇を介し心肥大シグナル ERK を活性化する 第100回日本内科学会総会 平成13年4月12日
86. 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13年3月25日：京都
87. 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13年3月25日：京都
88. 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13年3月25日：京都
89. 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13年3月25日：京都
90. 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13年3月25日：京都
91. 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13年3月25日：京都
92. 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13年3月25日：京都
93. 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-I-induced cardiac hypertrophy in rats 第65回日本循環器学会：平成13年3月25日：京都
94. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Takahiro Kato, Kensuke Kimura, Toshihiko Sato, Daihiko Hakuno, Satoko Tahara, Yuichi Tomita, Tomohiro Manabe, Yusuke Suzuki, Satoshi Ogawa. Redox sensitive signaling pathways and transcription factors in IL-6 gene expression by abgiotensin II. 第4回日本心不全学会。平成13年10月10日神戸
95. 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
96. 佐藤敏彦、佐野元昭、小玉博明、加藤隆弘、伯野大彦、田原聡子、富田雄一、家田真樹、藤田淳、鈴木雄介、久下康代、高橋栄一、福田恵一、小川聡：endothelin-1によるNADH(P)H酸化酵素を介した心筋細胞内でのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の生成と心肥大への関与。第4回Molecular cardiovascular Conference。平成12年9月2日
97. 小玉博明、佐藤敏彦、佐野元昭、加藤隆弘、伯野大彦、田原聡子、富田雄一、家田真樹、藤田淳、鈴木雄介、久下康代、高橋栄一、小川聡、福田恵一。第4回Molecular cardiovascular Conference。平成12年9月2日
98. 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
99. 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
100. 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
101. 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
102. 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
103. 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
104. 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cMGI/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
105. 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
- 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)



成体体性幹細胞樹立に関する研究

分担研究者 梅澤明弘 国立成育医療センター研究部 部長

研究協力者

今林英明、槌谷宏平、松本智志、水村珠青 慶應義塾大学病理学教室  
竹田征治、森泰昌、肥田直子、井尻旬子  
伊藤愛主、多喜裕子

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。さらに、TERT、E6、E7、および Bmi を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* における心筋への分化を検討した。寿命を延長させたヒト骨髄間葉系幹細胞はラット心筋細胞と共培養することにより心筋細胞に分化した。

A. 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。

(2001年度)

2001年度は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した。

(2002年度)

2002年度は TERT、E6、E7、および Bmi を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* における心筋への分化を検討した。

## B. 方法

(2000年度)

### 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を確立する。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。

(2001年度)

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。

(2002年度)

ヒト骨髄間葉系細胞を限外希釈法でサブクローニングをして得られた細胞に、レトロウイルスを用いて TERT、E6、E7、および Bmi を遺伝子導入した。得られたヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を GFP で標識し、マウス胎児心筋細胞と共培養することで心筋へ分化させ、さらに免疫組織化学を用いて抗心筋トロポニン抗体で評価した。また、免疫不全マウスの心筋にヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を注射し、心筋への分化を免疫組織化学により評価した。

## C. 結果

(2000年度)

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。

(2001年度)

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。

(2002 年度)

in vitro で GFP 陽性細胞は 2 日後に筋管細胞様に延長し、7 日後には拍動する細胞を認めた。免疫組織化学では抗心筋トロポニン抗体陽性であった。また、in vivo においても抗心筋トロポニン抗体と抗  $\beta 2$  ミクログロブリン抗体陽性の移植細胞が認められた。心筋細胞への分化を示す、寿命を延長させたヒト骨髄間質細胞は、マウス骨髄間質細胞の細胞表面マーカーとは、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かった。ヒト骨髄間質細胞においては CD34<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup> の細胞群は、少なくとも心筋分化能を有する細胞であると考えられる。

#### D. 考案

心筋細胞への分化を示す、寿命を延長させたヒト骨髄間質細胞は、マウス骨髄間質細胞の細胞表面マーカーとは、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かった。ヒト骨髄間質細胞においては CD34<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup> の細胞群は、少なくとも心筋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心筋分化能を有する細胞採取においては CD34<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD117<sup>-</sup> の細胞群がよいと考えられる。さらに、TERT、E6、E7、および Bmi を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて in vitro と in vivo における心筋への分化を検討した。寿命を延長させたヒト骨髄間葉系幹細胞はラット心筋細胞と共培養することにより心筋細胞に分化した。

#### 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. 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
2. Shinoda, K., Nakanura, 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
3. 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
4. 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
5. Fukuzawa, R., Umezawa, A., Morikawa, 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
6. 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.
7. Ochi, K., Nozaki, H., Tanaka, F., Kato, K., Fukuzawa, F., Sobue, G., Fukuchi, 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
8. 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
  9. 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.
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., and Umezawa, A.: Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, in press
  16. Matsushita, K., Okita, H., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., Yamada, T., Urano, F., Honda, T., Sano, M., Iwanaga, S., Ogawa, S., Hata, J., and Umezawa, A.: Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. *Mol Cell Endocr.* in press
  17. Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and Umezawa, A.: Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 22(1): 1-9, 2003.
  18. Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J-i., and Umezawa, A.: The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J. Cell. Physiol.* 194:45-53, 2003
  19. Shibata, R., Hashiguchi, A., Sakamoto, J., Yamada, T., Umezawa, A., and Hata, J.: Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (Wt1) mutation and the histological findings in Wilms tumor (WT), *J Med Genet.* 39(12):E83, 2002
  20. Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. *Pathology international*, in press
  21. Shibata, R., Umezawa, A., Takehara, K., Aoki, D., Nozawa, S., Hata, J.: Primary carcinosarcoma of the vagina, *Pathology Int*, in press
  22. Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, and Kasugai S.: Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro. *J Biomed Mater Res.* 62(2):292-298, 2002.
  23. Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Umezawa, A., Hata, J., and Fukuchi, Y.: Expression of interleukin-6 in cerebral neurons and ovarian cancer tissue in Trousseau syndrome. *Clin Neuropathol.*, 21 (5): 232-235, 2002
  24. Ogawa, S., Matsumura, S., Yoshikawa, T., Satoh, T.,