

### Comparison of optical mapping with contact bipolar electrodes to analyze action potential propagation

We examined the action potential propagation within the myocardial cell sheets to determine whether an electrical connection was established between the two myocardial cell sheets. Recordings of extracellular electrical potentials at both ends of the sheets using a pair of contact bipolar electrodes were compared with the data obtained using the optical mapping system. With the use of bipolar electrodes, electrical activation was detected simultaneously on sheets A and B (Fig. 4A,C). The electrical spikes in sheets A and B were synchronous, which suggested that the two myocardial cell sheets had established an electrical connection. Subsequent optical mapping (Fig. 4D) performed on the same samples (Fig. 4B) demonstrated that the action potential arose from the lower left of sheet A, conducted to the upper right before passing through the upper junction and spreading to sheet B, meaning that action potential propagation did not follow a direct route. Thus, the optical mapping system was the more effective means of electrophysiological analysis of the action potential propagation and electrical communication between the myocardial cell sheets.

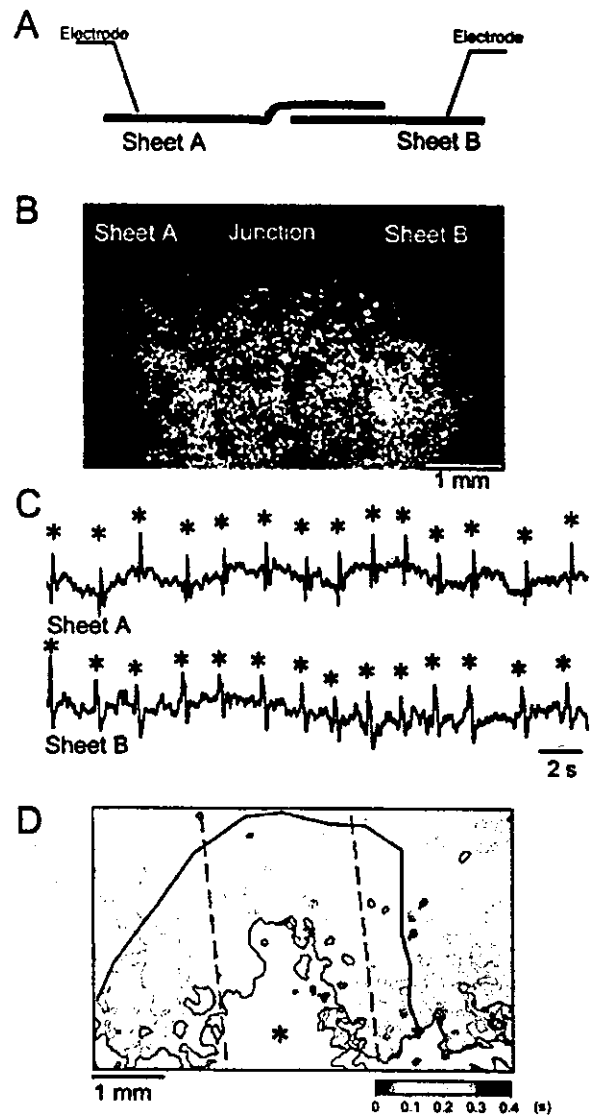
### Constitution process of the electrical connection between the two cell sheets

To investigate when the electrical connection between the two myocardial cell sheets was constituted, we performed optical mapping on days 1 and 3. The action potential did not propagate from one myocardial cell sheet to the other in the P4-S1 samples (Fig. 5A-C). The contour map of propagation of the action potential (Fig. 5E) revealed that the action potential was blocked at site t. These data suggested that electrical connection was not established in the P4-S1 samples.

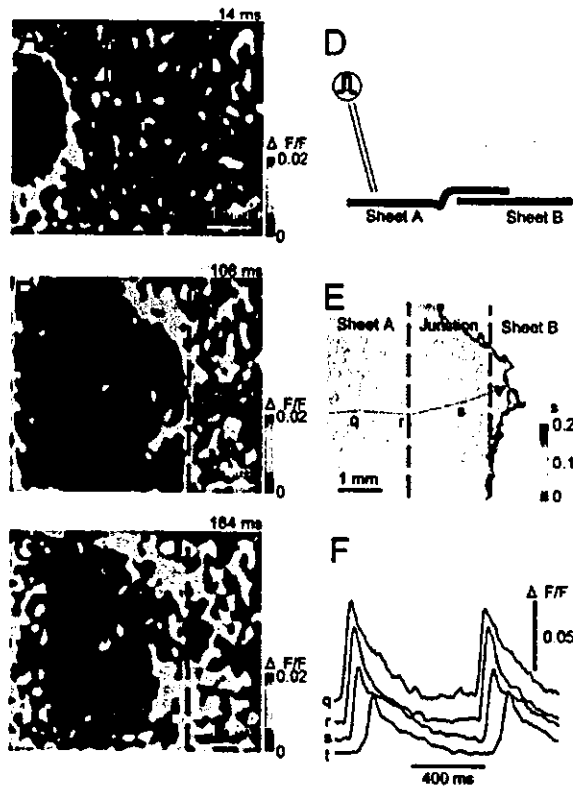
In contrast, the action potential propagated from sheet A to sheet B without conduction delay in the P4-S3 myocardial cell sheets (Fig. 6). All P4-S3 tissue samples had sufficient electrical communication between the two myocardial cell sheets (10/10) without any delay in conduction speed.

### Histological evidence of communication between two myocardial cell sheets in vitro

Immunofluorescent staining of the P4-S3 myocardial cell sheets (Fig. 7) showed that cardiomyocytes had well-organized sarcomeres, and connexin43 was localized at the junctions between cardiomyocytes. The two-layered myocardial cell sheets were approximately  $15 \pm 2 \mu\text{m}$  thick, and the two layers



**FIG. 4.** Comparison of optical mapping and extracellular electrical potential recording using a pair of contact bipolar electrodes for analysis of electrical connection between the two overlaid myocardial cell sheets. (A) Schema of the two overlaid myocardial cell sheets and position of contact bipolar electrodes, and (B) representative microscopy. (C) Extracellular electrical potentials obtained from each myocardial cell sheet, which was beating spontaneously, showing synchronization. (D) Optical image of the action potential was recorded for same sample, and an activation map was drawn from the recorded action potentials. The interval between each isochronal line was 35 ms. The spontaneous excitation originated from the left lower site of sheet A, went around the lower half of the junction which was an electrically unexcitable area (\*), and propagated to sheet B via the upper half of the junction. The wave front of the action potential proceeded along the black curved line with arrowed head.



**FIG. 5.** Optical mapping of the action potential propagation and electrical connection of the overlaid myocardial cell sheets at day 1. Representative data at day 1. (A–C) Optical images obtained at 14, 108, and 164 ms after pacing at the left margin of sheet A, respectively. (D) Cross-sectional schematic image of the myocardial cell sheets and the site of pacing. (E) The activation map, in which the interval between each isochronal line is denoted 7 ms. There was crowding of the isochronal line at the left margin of the junction, suggesting significant conduction delay. Action potential propagation was blocked at the end of the junction. The front of the action potential proceeded along the curved line with arrowed head. (F) The action potential traces along the excitation wave front were superimposed. The character corresponds to the position of the myocyte from which the action potential was recorded.

were completely connected and indistinguishable (Fig. 7A).

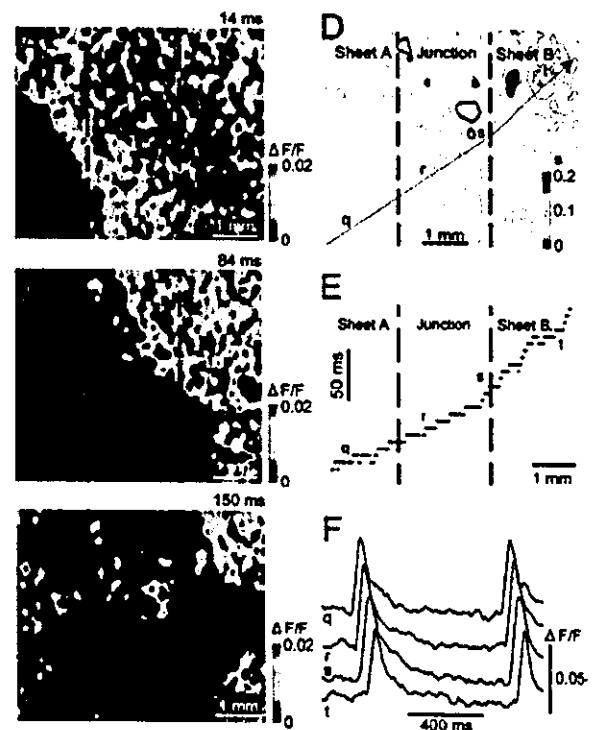
#### Transplantation of the trilayered myocardial cell sheets in vivo

Three-layered myocardial cell sheets transplanted onto the subcutaneous tissue of nude rats showed strong rhythmical beating on posttransplant day 14 (Fig. 8A) (see supplemental Movie 3). Hematoxylin-eosin and Azan staining showed that the attached myocardial cell sheets were sandwiched between the host-derived connective tissues (Fig. 8B,C). The layers of the myocardial cell sheets were  $102 \pm 11 \mu\text{m}$  thick (Fig. 8E), and confocal laser microscopy

showed that the length of the cardiomyocytes in vivo was greater than that of the cardiomyocytes in the cell sheets in vitro (compare Fig. 7A,B and 8E). In addition, some layers of transplanted myocardial cell sheets had rich neovascularization, not only at the capillary level but also of vessels 10–25  $\mu\text{m}$  in diameter (Fig. 8D). The sarcomere of the cardiomyocytes was well organized and oriented in the same direction (Fig. 8E). These findings indicate that myocardial cell sheets obtained from the polymerized fibrin-coated dishes remained functional in vivo.

#### DISCUSSION

Since PIPAAm-coated dishes were first reported, significant advances have been made in cell sheet engineering of various organs, with the generation of two- and three-dimensional tissues. Cell sheet engineering has now become an important tool in the field of regenerative medicine. Cell sheets have been



**FIG. 6.** Optical mapping of the action potential propagation and electrical connection of the overlaid myocardial cell sheets at day 3. Representative data at day 3. (A–C) Optical mapping images obtained at 14, 84, and 150 ms after pacing at the left margin of sheet A. (D) The calculated activation map suggested that the propagation of action potential was quite smooth with no delay between the two myocardial cell sheets. (E) The impulse propagation sequence along the excitation wave front suggested the formation of tight electrical communication between the two myocardial cell sheets. (F) The action potential traces along the excitation wave front were superimposed.

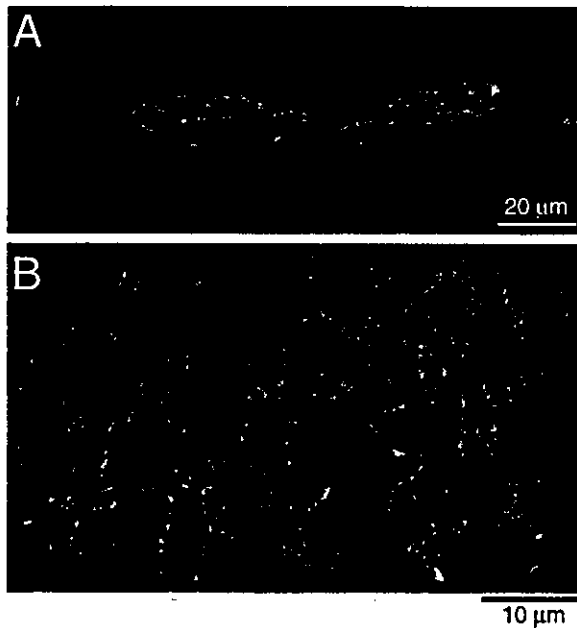


FIG. 7. Histological evidence of electrical communication between overlaid cardiomyocyte cell sheets in vitro. Laser confocal microscopy of the overlaid myocardial cell sheets (day 3), which was triple stained with antiactinin (green), anticonnexin43 (red) antibody, and TOTO-3 to stain the nucleus. (A) Side view, (B) Top view. Note that the cardiomyocytes formed a confluent sheet, and that connexin43 was clearly present at the cell junctions.

created by using temperature-sensitive culture dishes with vascular endothelial cells (14), hepatocytes (21), renal epithelial cells (22), and corneal epithelial cells.

The new method we describe here has several characteristics that were different from previous approaches using the temperature-responsive dishes. First, it does not require any specialized equipment, using only widely available fibrin polymers, nor any high level of technical expertise. Second, sheets can be generated with almost any cell type, because almost all cells will attach to polymerized fibrin-coated dishes, even those that do not attach readily to noncoated or fibronectin-coated dishes. Third, it is quick and easy to harvest the cell sheets.

Other more specialized approaches have been used to successfully generate functional tissue grafts. Li et al. used a piece of gelform, a biodegradable gelatin mesh, to form cardiac grafts from primary cultured cardiomyocytes that were transplanted into myocardial scar tissue in a cryoinjured heart (9). The cells attached to the gelatin mesh grew in three dimensions to form a beating cardiac graft, and when grafted formed cardiac tissue that contracted spontaneously. Zimmerman et al. reported that engineered heart tissue could be reconstituted by mixing cardi-

omyocytes from neonatal rats with liquid collagen type I, called matrigel, and that engineered heart tissue might serve as graft material to repair diseased myocardium (13). These pioneering studies, which greatly advanced research in bioengineering of cardiac grafts, both used biodegradable scaffold or collagen from other species. A scaffold can help form grafts in an appropriate shape, but they may also limit the function of the graft because of inflammation, inhibition of mechanical movement, and

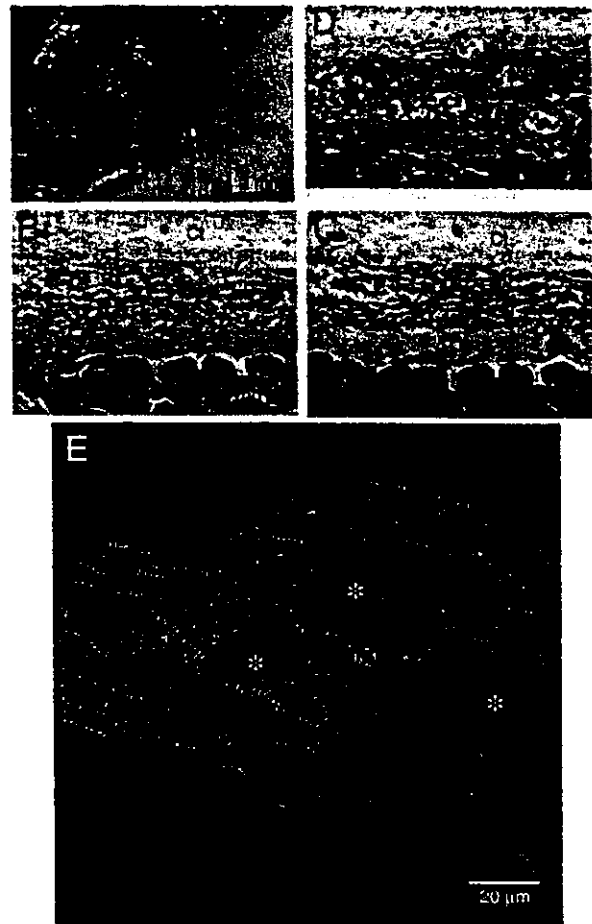


FIG. 8. Transplantation of trilayered myocardial cell sheets in vivo. The tri-layers of myocardial cell sheets were transplanted into the subcutaneous tissue of nude rats, and the samples were observed at day 14. (A) The transplanted area (black dotted line) showed rhythmical spontaneous beating (200 bpm). (B) Hematoxylin and eosin staining of the cross-sectional view of the trilayered myocardial cell sheet graft. Sk, skeletal muscle of the host rat; Ct, connective tissue; Cs, grafted trilayered myocardial cell sheets. (C) Azan staining of serial sections. (D) Note that microvessels are apparent in the grafted myocardial cell sheets. \*Microvessels. (E) Triple staining of the grafted trilayered myocardial cell sheets, as described in Fig. 7. Note that the grafted cardiomyocytes show a well-organized sarcomere with a coincident direction of orientation.

adverse effects on organ function. A graft of cardiomyocytes must contract smoothly and form electrical connections with the recipient heart tissue, which a long-lived scaffold may interfere with. This is one potential advantage of our method, which has no scaffold.

We concluded that the attachment of the myocardial cell sheets to the dishes was probably loosened as fibrin was steadily degraded by proteases secreted from the grafted cardiomyocytes, as the addition of aprotinin to culture media blocked the digestion of fibrin polymers. Proteolytic degradation of fibrin probably began from the beginning of primary culture, and we observed that the residual fibrin had disappeared 6–7 days after plating of the cardiomyocytes. Loss of fibrin may vary between different cell types depending on the proteases secreted and on cell density. Plasmin is the most potent protease for fibrin *in vivo*, and is secreted from the liver (23). Therefore, even if the fibrin polymer remains undigested in the myocardial cell sheets after detachment from the plate, plasmin in host tissue might digest residual fibrin following transplantation. Therefore, the polymerized fibrin-coated dishes that we used provide a practical and convenient method for cell sheet engineering.

The use of a cell scraper to detach the cell sheet from the dishes did not cause any significant damage to cells. We found that cell damage at detachment was mainly dependent upon the strength of attachment of the cells to the dishes. We tested combinations of various concentrations of fibrinogen and thrombin solution and different harvest times and cell density, to find an optimal combination that left the myocardial cell sheet only very loosely attached to the dish at the time of harvest. This meant that the cell sheet could be detached with minimal cell damage or loss by just touching the margin of the dishes with a cell scraper. Moreover, in some experiments we counted the average number of cardiomyocytes in a cell sheet as  $1.69 \times 10^6$  from  $2.0 \times 10^6$  of primary cultured cardiomyocytes plated into a polymerized fibrin-coated dish (precise data not shown). This estimate confirmed that there was no marked loss of cells with scraping.

Finally, the conduction and propagation of action potential within and between the myocardial cell sheets is critical for successful cardiac tissue engineering. We found that measurement of P4–S3 samples by optical mapping was an effective way to evaluate conduction. This approach showed that even if the two overlaid myocardial cell sheets seemed to beat synchronously under microscopic observation, the propagation of action potential fol-

lowed an indirect route via the narrowed conduction pathway. We found that 3 days are necessary to establish a sufficient electrical connection between the two myocardial cell sheets without any conduction disturbance. Thus, we think that optical mapping analysis will provide important basic data for the transplantation of myocardial cell sheets in future studies.

In the present study, we used primary cultured neonatal cardiomyocytes as the cell source, but this may not be possible for clinical use because of ethical issues. However, we hope that multipotent stem cells may, with some methodological advances, provide a sufficient source of cardiomyocytes in the near future, thereby obviating this problem.

## CONCLUSIONS

We have developed a new method for generating myocardial cell sheets using polymerized human fibrin-coated dishes. Intact cell sheets of primary cultured rat cardiomyocytes were easily obtained by scraping confluent cells after the polymerized fibrin had been digested by intrinsic proteases. Two overlaid and cocultured myocardial cell sheets exhibited synchronized spontaneous beating and captured artificial pacing. Optical mapping revealed that an action potential was propagated from the junction without any delay in the two partially overlaid cell sheets. Transplanted three-layered myocardial cell sheets exhibited strong spontaneous beating, well-differentiated striations, and an increase in cell size. This technique promises to be a useful and convenient tool for generation of sheets of myocardial cells and possibly various other cell types.

**Acknowledgments:** This study was supported in part by research grants to K. Fukuda from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan, and Health Science Research Grants for Advanced Medical Technology to K. Fukuda from the Ministry of Welfare, Japan. This work was performed at the Keio Integrated Medical Research Center.

## REFERENCES

1. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:501–8.
2. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98:216–24.
3. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999;103:697–705.

4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
5. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.
6. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83.
7. Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, et al. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002;105:1720-6.
8. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 1999;100:193-202.
9. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999;100:II63-II9.
10. Matsubayashi K, Fedak PW, Mickle DA, Weisel RD, Ozawa T, Li RK. Improved left ventricular aneurysm repair with bioengineered vascular smooth muscle grafts. *Circulation* 2003;108(Suppl 1):II219-25.
11. McDevitt TC, Woodhouse KA, Hauschka SD, Murry CE, Stayton PS. Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair. *J Biomed Mater Res* 2003;66A:586-95.
12. Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Nokavic G, Freed LE. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H168-H78.
13. Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 2002;106:1151-17.
14. Kikuchi A, Okuhara M, Karikusa F, Sakurai Y, Okano T. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1331-48.
15. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002;90:e40-8.
16. Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res* 2003;92:1217-24.
17. Kodama H, Fukuda K, Pan J, et al. Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1997;81:656-63.
18. Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, et al. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 2004;113:876-84.
19. Murata M, Fukuda K, Ishida H, et al. Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, enhances L-type Ca<sup>2+</sup> current and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:237-45.
20. Koura T, Hara M, Takeuchi S, et al. Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical mapping: preferential direction of conduction block changes from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation* 2002;105:2092-8.
21. Hirose M, Yamato M, Kwon OH, et al. Temperature-responsive surface for novel co-culture systems of hepatocytes with endothelial cells: 2-D patterned and double layered co-cultures. *Yonsei Med J* 2000;41:803-13.
22. Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive culture dishes allow non-enzymatic harvest of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets. *J Biomed Mater Res* 2000;51:216-23.
23. Ritchie DG, Levy BA, Adams MA, Fuller GM. Regulation of fibrinogen synthesis by plasmin-derived fragments of fibrinogen and fibrin: an indirect feedback pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:1530-4.

## 心筋細胞の再生

### *Current topics and future in cardiomyocyte regeneration*

林田健太郎 / 福田 恵一†

*Kentaro Hayashida / Keiichi Fukuda†*

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科 / 慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学・講師†  
*Cardiopulmonary Division, Department of Internal Medicine, Keio University /  
Assistant Professor†, Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University*

#### Key Words

bone marrow, mesenchymal stem cell, cardiomyocyte,  
regenerative medicine, ES cell, adult stem cell, cell transplantation

#### Summary

Recent studies revealed that cardiomyocytes can be regenerated from both embryonic- and adult bone marrow-stem cells in animal experiment. We have established a cardiomyogenic (CMG) cell line from mouse bone marrow stromal cells that can be induced to differentiate into cardiomyocytes *in vitro* by 5-azacytidine treatment. A number of lines of evidence confirm the cardiomyocyte characteristics of CMG cells. These cells could be transplanted into the recipient heart, and survive for long period. Clinical application of these cells had some problems at present. Embryonic stem cells had ethical problems, and had a possibility of making teratoma when undifferentiated cells could not be eliminated. Adult stem cells had a difficulty in isolation and culture expansion, since they were not yet well characterized. However, transplantation of regenerated cardiomyocytes would become a future method for the treatment of severe heart failure.

## Key Sentence

Recent studies revealed that cardiomyocytes can be regenerated from stem cells in animal experiment.

### はじめに

従来心筋細胞は出生直後よりその増殖能を失うため、心臓は再生しない臓器と考えられていた。しかし近年における再生医学研究の目覚ましい発達により、心筋再生は実現可能なものとなりつつある。胚性幹細胞(ES細胞)や骨髄体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が現実のものとなり、再生心筋細胞移植により心機能が改善された、とする報告も出始めている。また幹細胞を壊死した心筋梗塞領域周辺に注入すると、心筋細胞へと分化しうることも報告されている。また、いまだ動物実験の段階ではあるものの、再生心筋細胞を利用した心不全治療への試みも始まっている。近年心臓内にも心筋幹細胞といえるような、side population(SP)細胞の存在に関する報告と、これらを用いた心筋再生による心機能の改善も報告されており、心臓再生における研究は、将来の臨床応用に向けて着実に前進しつつある。

本稿では、心臓再生の現状として現在研究されているいくつかの方法について、これらの心機能回復への応用法や問題点、さらに将来の展望について紹介していく。

### I 心筋細胞再生に関する最近の話題

心筋細胞は胎生期には増殖能を有し細胞分裂を行っているが、生後まもなく最終分化してからは増殖能を失い、細胞分裂を停止すると考えられてきた。しかし近年、割合は非常に低いものの、心筋梗塞巣周囲のごく一部の心筋細胞が細胞分裂していることが報告されたため、既存の概念に対する再検討が必要となってきた<sup>1)-4)</sup>。この分裂像を

示す細胞の性質は明らかになっていないが、あまりにわずかな細胞であり失われた心機能は代償されない。心筋細胞の増殖能を制御する研究は以前より行われてきたが、最近になって*in vitro*の実験ではあるが、細胞周期調節蛋白の1つであるcyclin D1やサイクリン依存性キナーゼCDK4の発現を制御することにより、最終分化した心筋細胞を増殖させたという報告がされ<sup>5)</sup>、今後の発展が期待される。

また、心臓移植後の症例の病理学的検討から興味深い報告がなされている<sup>6)</sup>。女性ドナーから男性レシビエントに移植された心臓に、Y染色体をもつ心筋細胞が認められた、というものである。この事実から、Y染色体をもつ心筋細胞は心臓以外の部位から幹細胞、あるいは前駆細胞として心臓に到達した、と推測されている。またヒトの骨髄移植患者4例を検討した最近の報告<sup>7)</sup>ではそれらの細胞の由来を骨髄と考えているが、今後さらなる検討が必要であろう。

心筋細胞の再生には幹細胞を用いる方法以外に、非心筋細胞を心筋細胞に形質転換させる方法も以前から研究されてきた。骨格筋のマスター遺伝子であるmyoDを線維芽細胞に遺伝子導入すると、その細胞が骨格筋細胞になるためのすべての遺伝子を発現し、骨格筋細胞としての性質をもつようになる。心臓でも同様なマスター遺伝子の単離が試みられてきた。心筋特異的に発現する転写因子はNkx2.5, GATA4, dHAND, eHAND, HRTなど10個以上単離されているが、マスター遺伝子は現在のところ同定されていない。

以上に挙げられた方法も試みられているが、現在最も有望であると考えられているのは、ES細胞

Cardiomyogenic (CMG) cell line was established from mouse bone marrow stromal cells that can be induced to differentiate into cardiomyocytes *in vitro* by 5-azacytidine treatment.

胞 (embryonic stem cell) や体性幹細胞を利用した心筋細胞再生であろう。

### II ES細胞を用いた心筋再生

ES細胞は受精早期の胚盤胞由来の細胞で、内・中・外胚葉のいずれにも分化することができ、かつ大量に増殖することができる。ES細胞は、生体のすべての細胞に分化できる万能性幹細胞と呼ばれ、現在この細胞を用いて血液、血管内皮、神経、心筋、インスリン分泌細胞などの再生が行われている。以前からマウスでは、ES細胞を浮遊培養し、細胞を凝集させた胚様体 (embryoid body) を形成させると、一部の細胞が心筋細胞となり拍動を開始することが知られていた。ヒトES細胞からもこの方法により心筋細胞が得られたと報告された<sup>9)</sup>。

ES細胞を用いた再生にはいくつかの問題点がある。第1に、胚様体から心筋細胞が得られる確率が低く、特定の分化誘導方法が定まっていないこと。第2に、ES細胞から分化させた細胞を実際に移植する際に、未分化状態の細胞が混入すると奇形腫を形成してしまうこと。第3に、ES細胞は第三者の細胞であるため、移植後に免疫抑制剤の投与が必要となることである。以上の問題点はあるが、国内においてもヒトのES細胞作製が開始されており、さらなる発展が期待される。

### III 体性幹細胞を用いた心筋再生

近年の研究により、これまで再生能をもたないと考えられていた神経や心臓にも幹細胞が存在することが明らかにされた。中胚葉由来の臓器では幹細胞は骨髄に存在すると考えられている<sup>9)</sup>が、

骨髄は元来造血の場であり造血幹細胞から血球系細胞の増殖分化が起きている。しかし、骨髄には骨髄間質細胞や造血支持細胞と呼ばれる血球系以外の細胞も存在する。骨髄間質細胞は多彩なサイトカインや細胞増殖因子を分泌し、血球系細胞の再生増殖分化を維持しており、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞などに分化することが知られていた。現在では骨髄間質細胞のうち、間葉系幹細胞と呼ばれる一部の細胞が多分化能を有することが知られ、中胚葉由来の多くの細胞の幹細胞となりうると考えられている。

間葉系幹細胞は骨髄中にわずかに存在する細胞で、ヒト新生児骨髄中の細胞の10,000個に1個しか存在せず、その数は出生後急速に減少し高齢者では新生児の200分の1程度に減少するといわれている。間葉系幹細胞の同定には表面抗原が用いられているが、報告者により異なっており<sup>10)11)</sup>、今後の研究が必要であろう。

### IV 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

われわれは骨髄間葉系幹細胞が中胚葉のさまざまな臓器の細胞に分化することより、同じ中胚葉由来の心筋細胞にも分化するのではないかと考え、間葉系幹細胞に各種の分化誘導剤を投与する実験を施行した。その結果、自己拍動をする心筋細胞に分化することを明らかにした<sup>12)</sup>。まずマウス骨髄初代培養を行い付着系の細胞である骨髄間質細胞を分離し、長期培養することで不死化した細胞株を作製した。この多クローン細胞株にDNA脱メチル化剤である5-azacytidineを負荷しさらに2週間程度培養を続けると、非常に少ない確率ではあるが自己拍動する細胞が得られた。こ



## Key Sentence

Clinical application of these stem cells had some problems at present.

の周辺の細胞を採取し同様の操作を繰り返すと、自己拍動を開始した細胞自体は継代不可能であるが心筋芽細胞と考えられる細胞は分裂、増殖を繰り返すことができる。自己拍動する割合の高いクローンを最終的にCMG(cardiomyogenesisより命名)細胞株として樹立した。CMG細胞は5-azacytidineにより最終的に分化誘導を行うと心筋細胞の表現型を獲得するが、最終分化誘導後に自己拍動を開始する比率は約30%であった。CMG細胞は培養条件下において毎分120~250程度の速さで定期的に収縮した。電顕では典型的な横紋構造に加え、心房顆粒を多数認めた。心筋細胞に分化したCMG細胞の収縮蛋白( $\alpha$ -アクチン, ミオシン重鎖, ミオシン軽鎖)のアイソフォームを表1に示す。心筋細胞は胎仔期, 新生仔期, 成獣期および心房, 心室で異なる収縮蛋白のアイソフォームを示すが, CMG細胞のアイソフォームを解析すると, 胎仔型心室筋に一致した表現型を取ることが明らかとなった。

ガラス微小電極によりCMG細胞の活動電位を記録すると, 洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類が観察された(図1)。両者に共通した活動電位の特徴は, ①活動電位持続時間が長いこと, ②

比較的浅い静止期電位をもつこと, ③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また, 心室筋細胞型では活動電位はpeak & dome型を呈した。分化誘導後早期(2~3週間)にはすべての細胞で洞結節型が記録されたが, 分化誘導後後期(4週後)には心室筋細胞型が観察され, 次第に増加した。

CMG細胞の心筋細胞としての表現型を解析するため, 心筋細胞特異的蛋白の発現を調べた。CMG細胞では心房利尿ホルモンANPおよびBNPを発現していた。心筋分化に関与する転写因子としてNkx2.5, GATA4, TEF-1, eHAND, HRTなどが発現していた。MEF2 familyではMEF2A, MEF2C, MEF2Dの発現が観察された。しかし, その発現時期は3者で異なり, MEF2Cは分化誘導前で発現が認められたが, MEF2A, MEF2Dは分化誘導後に発現していた(図2)。

生体内の心筋細胞はカテコラミン $\alpha_1$ 受容体,  $\beta$ 受容体, アセチルコリンのムスカリン受容体が発現し, 心拍数や心収縮力, 興奮伝導速度などの調節を行っている。CMG細胞では $\alpha_1$ 受容体の3つのサブクラス( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ )を発現し,  $\alpha_1$

表1 心筋収縮蛋白のアイソフォームからみたCMG細胞の表現型

	心房筋		心室筋			CMG細胞
	胎仔型	成獣型	胎仔型	新生仔型	成獣型	
$\alpha$ -アクチン	skeletal	cardiac	skeletal > cardiac	skeletal	cardiac	skeletal > cardiac
ミオシン重鎖	$\alpha$ 型 > $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型 > $\alpha$ 型	$\alpha$ 型 > $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型 > $\alpha$ 型
ミオシン軽鎖	2a	2a	2v	2v	2v	2v

# Key Sentence

Embryonic stem cells had ethical problems, and had a possibility of making teratoma when undifferentiated cells could not be eliminated.

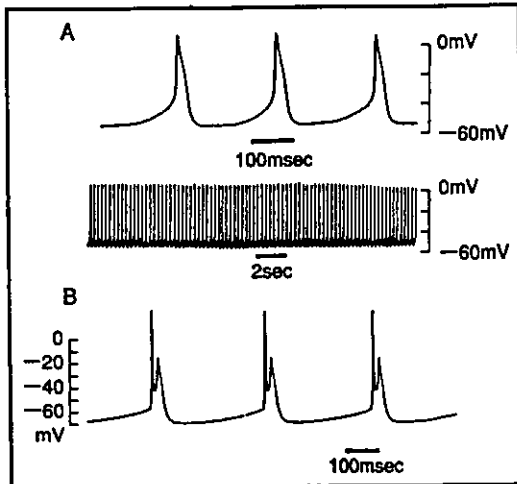


図1 骨髄由来心筋の活動電位  
A: 洞結節型, B: 心室筋細胞型

刺激薬フェニレフリンで刺激すると、シグナルの活性化と細胞肥大が観察された<sup>13)</sup>。一方、 $\beta$ 受容体は $\beta_1$ 、 $\beta_2$ ともに発現し、 $\beta$ 刺激薬イソプロテレンールで刺激するとセカンドメッセンジャーのcAMPの上昇と拍動数の増加、収縮速度・収縮距離の増加が観察された。ムスカリン受容体は $M_1$ ～ $M_5$ まで5種類あることが知られているが、CMG細胞では本来の心筋細胞と同様に $M_1$ 、 $M_2$ の発現が認められ、ムスカリン受容体刺激薬カルバコールで刺激するとセカンドメッセンジャーの $IP_3$ が増加した(表2)。これらの性質はCMG細胞が心筋としての特徴をほぼ有していることを意味

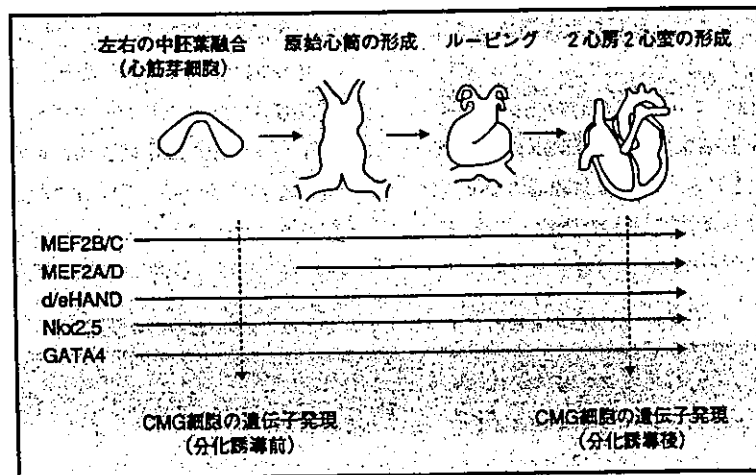


図2 心筋細胞の分化過程における転写因子の発現とCMG細胞の関係  
前外側板中胚葉から心筋前駆細胞に分化した状態では、 $Nkx2.5$ 、 $GATA4$ 、 $TEF-1$ 、 $HAND$ 遺伝子などの心筋分化に必要な転写因子は発現している。CMG細胞も心筋分化に必要な遺伝子は最終分化誘導前にすでに発現していることがわかる。

# Key Sentence

Adult stem cells had a difficulty in isolation and culture expansion.

している。

## V 再生心筋細胞を利用した心不全治療の試み

心筋再生を利用した治療法は、幹細胞を直接壊死した心臓内に注入してその部位で心筋細胞へと

分化させる方法と、*in vitro*で幹細胞を心筋細胞に分化させ、それを心臓に注入する方法の2つに大別される(図3)。前者は現在実験動物において用いられているが、ヒトを対象として心機能の回復を目指すには、より多くの細胞が必要であると予想される。また、注入した細胞が確実に心筋

表2 CMG細胞の受容体発現と受容体刺激による効果

受容体の種類	受容体のサブクラス	発現時期	シグナル伝達の確認	確認できなかった作用
α1受容体	α1A	最終分化誘導前より(漸増)	ERK活性化	細胞肥大
	α1B	最終分化誘導前より(不変)	ERK活性化	
	α1D	最終分化誘導前より(漸増)	ERK活性化	
β受容体	β1	最終分化誘導後1週より	cAMP上昇	拍動数増加, 収縮力増強
	β2	最終分化誘導後1週より	cAMP上昇	
ムスカリン受容体	M1	最終分化誘導後1週より	IP <sub>3</sub> 上昇	
	M2	最終分化誘導後1週より	IP <sub>3</sub> 上昇	

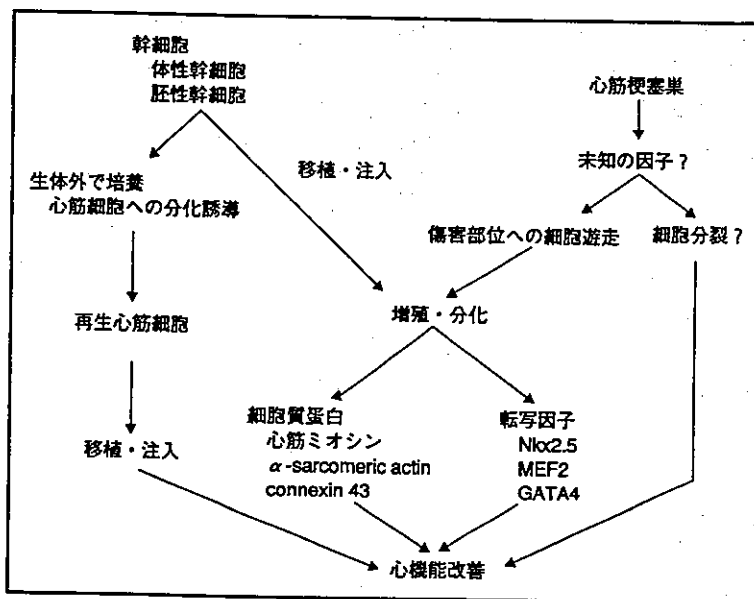


図3 心筋細胞再生による心機能改善の模式図

Interface

Transplantation of regenerated cardiomyocytes would become a future method for the treatment of severe heart failure.

細胞へと分化し、もともと存在する細胞と同期して機能的に収縮するかなどの問題点も多い。後者の方法では生体外で幹細胞を分化させて移植に用いることになるが比較的实现しやすいと考えられる。しかしこの場合にはある程度の大きさの細胞集団として移植を行うので、移植細胞塊の強度や細胞塊内部への血流の確保などの問題点が生じてくることが予想される。また再生心筋細胞が生着し心機能の改善が得られたとしても、この細胞が新たな致死性不整脈の原因となる可能性もある。臨床応用に至るまでには、これらの問題点を1つずつ克服していくことが必要である。

また再生心筋細胞を臓器として機能させるには tissue engineering (組織工学) の考え方が不可欠である。再生細胞を培養するスcaffolds (鋳型) の開発、異なった種類の細胞の配列、血管系・神経系の構築など解決すべき課題は多い。

これまでに再生心筋により傷害心筋の機能改善を認めた例として、ES細胞<sup>14)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>15)16)</sup>、造血幹細胞<sup>17)18)</sup>、血管内皮前駆細胞<sup>19)</sup>などが報告されている。残念ながらいずれの報告も移植した細胞の心筋細胞への分化を免疫染色で確認しているのみであり、実際そのようにみえる細胞が機能的・電気生理学的に心筋細胞となっているかについても、今後検証していく必要がある。さらに最近Cre/lox組み換えに基づく方法を用いて、骨髄由来の細胞が*in vivo*で心筋細胞およびプルキンエ神経細胞と融合する、つまり骨髄細胞のもつ広い分化能、可塑性がtransdifferentiation (分化転換)ではなくcell fusion (細胞融合)による、とする報告もされている(図4)<sup>20)</sup>が、一概にそうとはいいい切れず、今後のさらなる詳細な検討が必



図4 心筋細胞と融合している骨髄由来の細胞 (巻頭カラーグラフィア:写真1参照)  
Nature 425: 968-973, 2003より抜粋

要である。

### おわりに

心筋細胞の再生の材料として、胚性幹細胞と体性幹細胞のどちらを選択するかについては、今後さらに検討が行われるであろう。また体性幹細胞より多能性を有し上位に存在すると考えられている、multipotent adult progenitor cellの利用も期待される。

日常の臨床において重症心不全患者を救命できない状況を目前にすると、新たなより効果的、根本的な治療法の必要性を痛感させられる。再生心筋細胞を用いた治療が重症心疾患治療の選択肢の1つとなることが期待される。

### References

- 1) Anversa P, Kajstura J: Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83: 1-14, 1998

- 2) Kajstura J, Leri A, Finato N, et al : Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 8801-8805, 1998
- 3) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al : Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med 344 : 1750-1757, 2001
- 4) Anversa P, Nadal-Ginard B : Myocyte renewal and ventricular remodelling. Nature 415 : 240-243, 2002
- 5) Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchankij P, et al : Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. Circ Res 92 : e12-e19, 2003
- 6) Laffamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al : Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. Circ Res 90 : 634-640, 2002
- 7) Deb A, Wang S, Skelding KA, et al : Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart : A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. Circulation 107 : 1247-1249, 2003
- 8) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al : Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 108 : 407-414, 2001
- 9) Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 276 : 71-74, 1997
- 10) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284 : 143-147, 1999
- 11) Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al : The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin(CD105). Biochem Biophys Res Commun 265 : 134-139, 1999
- 12) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 103 : 697-705, 1999
- 13) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al : Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 105 : 380-386, 2002
- 14) Min JY, Yang Y, Converso KL, et al : Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. J Appl Physiol 92 : 288-296, 2002
- 15) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation 100 : II247-256, 1999
- 16) Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al : The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration ; Pathophysiologic and therapeutic implications. J Thorac Cardiovasc Surg 122 : 699-705, 2001
- 17) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410 : 701-705, 2001
- 18) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al : Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science 297 : 2256-2259, 2002
- 19) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al : Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med 5 : 434-438, 1999
- 20) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al : Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature 425 : 968-973, 2003

## 外科領域における再生医療の現況と展望

## 6. 心筋細胞の新生, 再生療法の現況と展望

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

真鍋 知宏, 福田 恵一

キーワード 心筋細胞, 分化誘導, ES 細胞, 間葉系幹細胞, 細胞移植

## I. 内容要旨

近年の分子発生生物学の発展により, 神経細胞など従来は不可能と考えられていた細胞の再生も可能となってきた。心筋細胞もその1つで胚性幹細胞 (Embryonic stem cell, ES 細胞), 骨髄間葉系幹細胞, 心臓幹細胞などから再生出来ると報告されている。また G-CSF などのサイトカインを用いてこれら幹細胞を効率的に動員させる試みもなされている。実験動物レベルでは心筋梗塞巣周囲に幹細胞を注入・移植すると, 再生心筋細胞や新生血管が認められ, 心機能の改善が得られる。しかしながら再生心筋細胞の数はごくわずかであり, 再生心筋細胞によって心機能の改善が得られたとは言いがたい。また幹細胞から心筋細胞へと分化誘導される詳細な機序についても解明されていない。ただ, 自家骨髄単核球細胞を用いた重症狭心症治療など臨床応用を目指した試験も行われ, 少数例ではあるが好ましい結果が得られている。循環器領域における再生医学は, 臨床応用可能な再生医療に向けて着実に前進している。

## II. はじめに

1997年10月16日に臓器移植法(正式名称は「臓器の移植に関する法律」)の施行以来, 29例の脳死判定が行われ, 28例の脳死臓器摘出がなされている。このうち心臓移植が行われたのは19例にとどまっている(2004年3月末現在)。この一方で, 2004年3月末現在の心臓移植希望登録患者数(心肺同時移植を除く)は73人(日本臓器移植ネットワークホームページ <http://www.jotnw.or.jp/datafile/index.html>)となっており, 臓器移植を待ちながら死を迎える患者がいる。臓器提供意志表示カード保有者数は増加してきているが, 臓器移植が一般的な治療法として浸透するにはまだ時間がかかるものと思われる。このような背景の中で再生医療に対する期待が高まっている。

ES細胞や骨髄体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が現実のものとなり, 再生心筋細胞を利用した心機能の改善に関する報告もある。また幹細胞を壊死した心筋梗塞領域周囲に注入すると, 心筋細胞へと分化しうることも報告されている。いまだ実験動物段階ではあるものの, 再生心筋細胞を利用した心不全治療への試みも開始されている。近年心臓内にも心臓幹細胞のようなSP細胞(side population cell)の存在に関する報告も出されている。これらを用いた心筋再生による心機能の改善も報告され, 心臓領域における再生医学は, 臨床応用に向けて着実に前進している。

本稿では心筋細胞再生方法のいくつかを紹介し, これらの心機能回復への応用法, 問題点, ならびに将来の展望を概説する。

III. 心筋細胞再生に関する最近の知見

## III. 心筋細胞再生に関する最近の知見

心筋細胞は胎生期には細胞分裂を行うが, 生後まもなく最終分化して細胞増殖を停止するものと考えられてきた。一方で頻度は低いものの, 心筋梗塞巣周囲のごく一部の心筋細胞が細胞分裂することが報告されており, 既存の概念に対する再検討が必要となってきた<sup>1)-3)</sup>。この分裂像様の形態を示す細胞の起源は明確に

REGENERATIVE MEDICINE IN CARDIOLOGY

Tomohiro Manabe and Keiichi Fukuda

Cardiopulmonary Division, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

なっていないが, これのみで生理学的に心機能の代償を期待することは出来ない. *in vitro* の実験ではあるが, 細胞周期調節蛋白の1つであるサイクリンやサイクリン依存性キナーゼを制御することにより, 最終分化した心筋細胞を細胞分裂させたという報告があり<sup>9)</sup>, 今後の発展が期待される.

心臓移植後の症例検討から興味深い報告がなされている<sup>9)</sup>. 女性ドナーから男性レシピエントに移植された心臓内に, Y染色体を有する心筋細胞が認められたというものである. このY染色体を有する心筋細胞は心臓以外の部位から幹細胞あるいは前駆細胞のような形で心臓に到達したと推測されている. ヒトの骨髄移植患者4例を検討した最近の報告<sup>9)</sup>ではその由来を骨髄としているが, 今後詳細な検討が必要である.

心筋細胞の再生には幹細胞を用いる方法以外に, 非心筋細胞を心筋細胞に形質転換させる方法も以前から検討されていた. 骨格筋のマスター遺伝子である *myoD* と同様な“心臓版 *myoD*” 遺伝子の単離が試みられた. しかし *myoD* のように単一遺伝子で他の細胞を心筋細胞に形質転換しうる遺伝子は現在のところ同定されていない.

以上のような取り組みは精力的になされているものの, 近年最も注目されているのは, 幹細胞を利用した心筋細胞再生であろう. 幹細胞はES細胞と体性幹細胞に大別される. これら2種類を用いた心筋細胞再生の現状を紹介する.

#### IV. 胚性幹細胞を用いた心筋再生

ES細胞は受精直後の早期胚(胚盤胞の内部細胞塊)から取り出された細胞である. そして, すべての臓器・組織に分化しうる多分化能を有している. またES細胞を *in vitro* で大量に増殖させることが可能となっており, 多分化能を維持しながら培養する技術も確立している. 現在, ES細胞を用いて血液, 血管内皮, 神経, 心筋, インスリン分泌細胞などの再生が行われている. ES細胞を培養条件下で未分化状態を維持するには, マウスではLIF(白血病抑制因子)を培養液中に入れておくだけでよいが, ヒトES細胞ではLIFに依存せず, マウス胎児フィーダー細胞との共培養が必要となる. ES細胞を心筋細胞に分化させるにはLIFを除去し, 細胞を凝集塊(胚様体)にして培養すると一部の細胞が心筋細胞となり, 拍動を開始する. ヒトES細胞から心筋細胞が分化できるとの報告が既になされている<sup>7)</sup>.

ES細胞を用いた再生にはいくつかの問題点がある.

第1にES細胞は第三者の細胞であるため, 移植後に免疫抑制剤の投与を必要とすることである. 第2に, ES細胞から分化させた細胞を実際に移植する際に, 未分化状態の細胞が混入すると奇形腫を形成してしまう点である. 第3に, 発生段階の早期に分化してくる細胞は得やすいが, 発生後期に出現する細胞を得るのは難しいことである. 問題点はあるものの, 国内においてもヒトのES細胞が作製されており, さらなる発展が期待される.

#### V. 体性幹細胞を用いた心筋再生

近年の研究により, これまで再生能力がないと考えられていた神経や心筋細胞にも生体内にある程度の幹細胞が存在することが明らかにされた. 中胚葉由来の臓器では幹細胞は骨髄に存在すると考えられている<sup>8)</sup>. 骨髄は元来造血の場であり, そこには造血幹細胞を頂点とした血球系細胞の増殖分化が営まれている. しかし, 骨髄には骨髄間質細胞や造血支持細胞と呼ばれる血球系以外の細胞も存在する. 骨髄間質細胞は多彩なサイトカインや細胞増殖因子を分泌し, 血球系細胞の再生増殖分化を維持しており, その一部が骨や軟骨にも分化しうることは以前より知られていた. 現在は骨髄間質細胞すべてが多分化能を持つのではなく, これらに含有される間葉系幹細胞と呼ばれる一部の細胞が多分化能を有することが知られ, 中胚葉由来の多くの細胞の幹細胞となりうると考えられている.

間葉系幹細胞は骨髄中にわずかに存在する細胞で, ヒト新生児骨髄中の細胞の10,000個に1個が間葉系幹細胞であり, その頻度は出生後急速に減少し高齢者では新生児の200分の1程度に減少する. 従来, 間葉系幹細胞の同定は骨髄間質細胞に種々の方法により分化誘導を行い, 他の細胞に分化すればretrospectiveに間葉系幹細胞が含有されていたのであろうとされてきた. 間葉系幹細胞の同定は, 現在ではある程度表面抗原が同定されてきたが, 報告者により異なっており<sup>10)</sup>, さらなる研究が必要とされる.

#### VI. SP細胞からの心筋再生

成体の心臓内に心筋幹細胞のような細胞が存在することが示されている<sup>11)</sup>. 造血幹細胞はHoechst33342という蛍光のDNA結合色素を強く排出する性質を有しており, flow cytometerで解析するとほとんど蛍光を発しない稀な細胞集団として検出される. 図にプロットすると横に突き出ていることからSide Population

(SP)細胞と呼ばれる。このSP細胞のほとんどはCD45 (+), CD34 (-)/low, c-kit (+), Sca-1 (+)で、造血幹細胞と非常に近い性質を有している。SP細胞は造血幹細胞のみならず、他の体性幹細胞にも共通に保存された性質である可能性が示唆されている。心臓内に存在するSP細胞は心筋細胞以外には分化しないと考えられているが、詳細については今後の検討が必要と思われる。

### VII. 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

筆者らの樹立したCMG細胞は骨髄細胞を分化誘導させたものである<sup>12)13)</sup>。心筋細胞は胎児期、新生児期、成獣期および心房、心室で異なる収縮蛋白のアイソフォームを示すが、CMG細胞のアイソフォームを解析すると胎仔型心室筋の表現型と一致していた。

CMG細胞は心筋分化に関与する転写因子としてNkx2.5, GATA4, TEF-1, MEF2C, eHAND, HRTなどを発現していた。またカテコラミン $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体, アセチルコリンM<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>受容体を発現し、これらのシグナル伝達機構も有していた。またフェニレフリン( $\alpha_1$ 受容体刺激薬)で刺激するとCMG細胞は肥大反応を示し、イソプレテレンール( $\beta$ 刺激薬)で刺激するとCMG細胞は拍動数、収縮力の増強を示した。

### VIII. 再生心筋細胞を利用した心疾患治療の試み

心筋再生を利用した治療法は、幹細胞を直接壊死した心臓内に注入してその部位で心筋細胞へと分化させる方法と、in vitroで幹細胞を心筋細胞に分化させてそれを心臓に注入する方法であるの2つに大別される(図)。前者は現在実験動物において用いられているが、ヒトを対象として心機能の回復を目指すには相当数の細胞が必要と想像される。また注入した細胞が目標とする心筋細胞へと確実に分化し、元来存在する細胞と同期して収縮するかなどの疑問点が多い。後者の生体外で幹細胞を分化させる方がハードルを低く出来ると思われる。この場合ある程度のmassとして移植を行うので、移植細胞塊の強度や細胞塊内部への血流の確保などの問題点がある。また再生心筋細胞が生着し心機能の改善が得られたとしても、この細胞が新たな致死性不整脈の原因となる可能性もある。これらの問題点を一つ一つ検討しながら、克服していくことにより、臨床応用への道が開けると思われる。

また再生心筋細胞を臓器として機能させるにはtissue engineering(組織工学)の考え方が不可欠である。再生細胞を培養するスカフォールド(鋳型)の開発、複

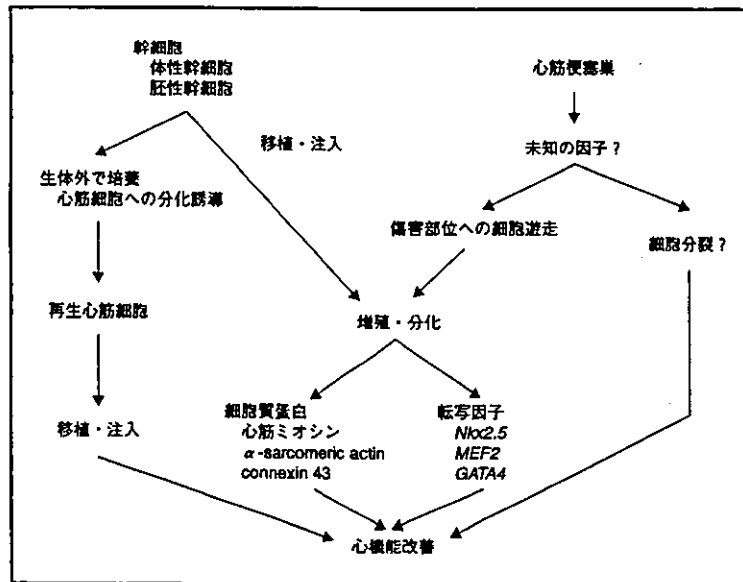


図 心筋細胞再生による心機能改善の模式図



数の種類の細胞の配列, 血管系・神経系の構築など解決すべき課題は多い。

これまでに再生心筋により傷害心筋の機能改善を認めた例として, ES細胞<sup>10</sup>, 骨髄間葉系幹細胞<sup>11</sup>, 造血幹細胞<sup>12</sup>, 血管内皮前駆細胞<sup>13</sup>などが報告されている。残念ながらいずれの報告も移植した細胞の心筋細胞への分化を免疫染色で確認しているのみである。最近造血幹細胞の心筋細胞への分化を否定する論文が出されており<sup>14,15</sup>, 外見上心筋細胞に見える細胞が機能的・電気生理学的に心筋細胞となっているかについても今後検証する必要がある。

臨床応用としては, 重症虚血下肢患者に対する自家骨髄単核球移植が挙げられる (Japan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation; J-TACT)<sup>20</sup>。2003年に再生医療として初めて高度先進医療の保険適応を受けており, 既に100人以上が治療を受けている。これを重症狭心症に応用し, 心臓カテーテルを介して心筋内に細胞移植を行う試みもなされている。冠動脈造影上, 新生血管は同定されないものの, 心機能の改善は得られる。臨床応用可能な心筋細胞再生ソースが確立していない現段階では, 治療抵抗性虚血性心疾患に対しては自家骨髄単核球を用いた血管再生療法が最先端となっている。

### IX. おわりに

幹細胞から心筋細胞への再生方法は確立されてきているが, その詳細な機序については不明である。今後臨床応用を考える際には安全性を確保するためにその機序の理解は不可欠であろう。

日常臨床で重症心不全患者を救命出来ない状況を目前にすると, 早急に治療法を確立する必要性を痛感させられる。再生心筋細胞を用いた治療が心疾患治療の選択肢の1つとなる日を願ってやまない。

### 文 献

- 1) Anversa P, Kajstura J: Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*, 83: 1—14, 1998.
- 2) Kajstura J, Leri A, Finato N, et al.: Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8801—8805, 1998.
- 3) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al.: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 344: 1750—1757, 2001.
- 4) Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchankij P, et al.: Critical role of cyclin D1 nuclear import in car-

- diomyocyte proliferation. *Circ Res*, 92:e12—e19, 2003.
- 5) Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, et al.: Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res*, 90: 634—640, 2002.
- 6) Deb A, Wang S, Skelding KA, et al.: Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*, 107:1247—1249, 2003.
- 7) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al.: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 108: 407—414, 2001.
- 8) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71—74, 1997.
- 9) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143—147, 1999.
- 10) Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al.: The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*, 265: 134—139, 1999.
- 11) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al.: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 107: 1395—1402, 2001.
- 12) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103: 697—705, 1999.
- 13) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al.: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, 105: 380—386, 2002.
- 14) Min JY, Yang Y, Converso KL, et al.: Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol*, 92:288—296, 2002.
- 15) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al.: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, 100: II247—256, 1999.
- 16) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701—705, 2001.
- 17) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al.: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5: 434—438, 1999.
- 18) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al.: Hae-

6. 心筋細胞の新生, 再生療法の現況と展望

matopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428: 664—668, 2004.

19) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al.: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic

fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 428: 668—673, 2004.

20) 松原弘明: 細胞移植による血管新生療法の現状—TACT 研究グループ中間報告—. *Angiology Frontier*, 301: 53—56, 2003.

REGENERATIVE MEDICINE IN CARDIOLOGY

Tomohiro Manabe and Keiichi Fukuda

Cardiopulmonary Division, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Emerging evidence indicates that cardiomyocytes can be regenerated from embryonic stem cells, adult mesenchymal stem cells, and cardiac side population cells (cardiac stem cells). When these cells were injected into diseased hearts, indices of cardiac function improved. There are ethical difficulties involved in the use of embryonic stem cells. The ratio of differentiation into cardiomyocytes is still relatively low at present. Transplantation of regenerated cardiomyocytes or stem cells, however, will become a future therapy for severe heart failure.



藤田 淳\*, 福田恵一\*

FUJITA Jun, FUKUDA Keiichi

\*慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

#### SUMMARY

近年の幹細胞を用いた再生医学によって、さまざまな疾患を治療する方法が開発されている。重症心不全の新しい治療法として、再生心筋細胞による細胞移植療法が注目を集めている。われわれの研究室で開発した CMG (cardiomyogenic) 細胞をはじめとして、胚性幹細胞および骨髄幹細胞が移植細胞として期待されており、臨床応用へ向けて世界中で研究されている。

#### POINTS

- 骨髄間葉系幹細胞は、再生心筋細胞の重要な細胞源となりうる。
- 生体内での幹細胞誘導が注目されている。
- 細胞融合は再生医療の重要な鍵となる可能性がある。

#### KEY WORDS

骨髄間葉系幹細胞, 再生医学, 心筋細胞, 細胞移植

#### はじめに

現在、先進諸国の死亡率の第一位を占めるのは虚血性心疾患である。わが国においても年々その罹患率は増加している。心筋梗塞後の再灌流療法による急性期の生存率の改善はめざましいものがあるが、末期の心不全状態となった心臓に対しては心臓移植以外の有効な治療法が存在しない。ところが、心臓移植の先進国である米国においてもドナー不足は深刻な問題であり、わが国においては脳死に対する倫理的問題から臓器提供が少なく、現実的な治療法としてまったく機能していないといわざ

るをえない。

そこで心臓移植にかわる新たな治療法が模索されてきた。実験室レベルでは、初期にはラットの心臓に心筋梗塞を作成し壊死瘢痕領域に骨格筋細胞を移植する実験がおこなわれ、心筋梗塞後のリモデリングの改善に有効であったことが報告された<sup>1)</sup>。しかし、骨格筋細胞などは、ホストの心筋細胞と電気的に連結した結合を取り得ず不整脈源となる可能性があるため、移植細胞は心筋細胞が望ましいと考えられる。

心筋細胞移植による心筋梗塞治療は、心臓移植にかわる革新的な治療となる可能性を秘めてはいるが、問題と

19(233)

なるのは移植細胞の確保である。移植可能な幹細胞の候補としては、胚性幹細胞(Embryonic Stem cell: ES細胞)と体性幹細胞が挙げられる。

ES細胞についての詳細は他稿に譲るが、ES細胞を用いた際の問題点は、多分化能を有するがゆえに奇形腫を形成する可能性があり、特異的に心筋細胞に分化させる方法が確立されていないことである。また、ES細胞は同種移植となるため、免疫抑制剤を内服する必要がある、個体発生を経ていないため重篤な遺伝子異常が存在する細胞も生き長らえてしまう危険性が存在する。ES細胞は再生医療の核となる存在であることに変わりはないが、臨床応用までにはこれらの問題を一つずつ確実に解決していく必要がある。これに対し、体性幹細胞は拒絶反応や倫理的問題がなく理想的な細胞ソースといえる。体性幹細胞としては心臓内幹細胞<sup>23)</sup>と骨髄中の幹細胞が存在すると考えられている。

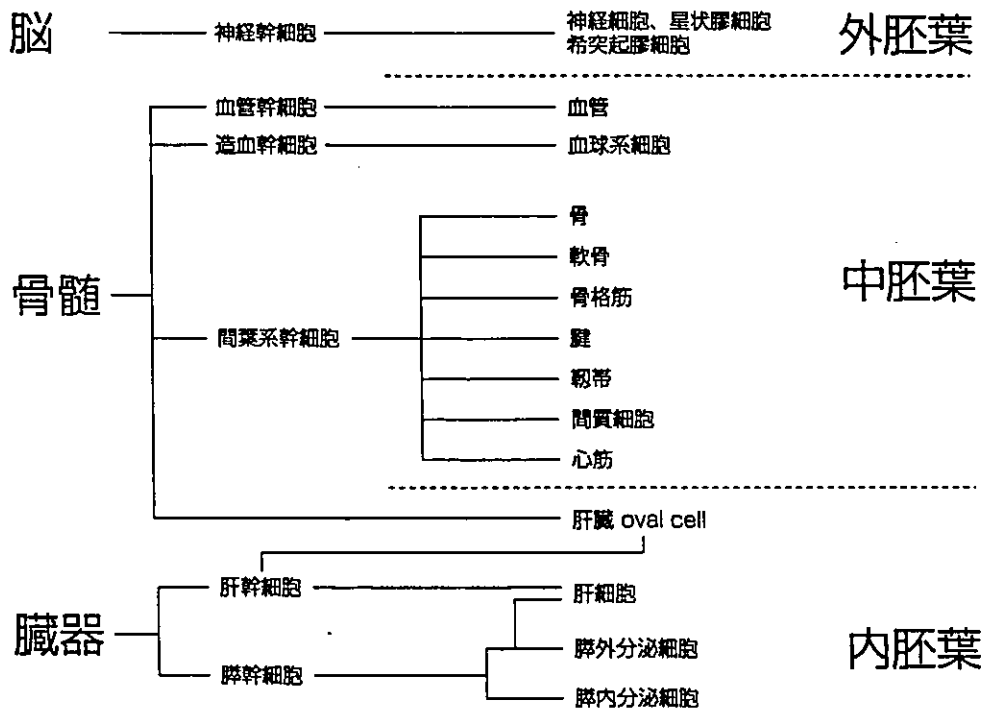
われわれ<sup>9)</sup>は、多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞に5-アザシチジンによる分化誘導をおこなうことで自己拍動能を有する心筋細胞を誘導しCMG細胞(cardiomyogenesisより)と命名した。

われわれは現在、分離した骨髄由来の幹細胞を臨床応用に用いるべく、日夜研究を続けている。本稿では、骨髄由来の再生心筋細胞の開発の経緯と展望を解説する。

### 骨髄間葉系幹細胞

1990年代に造血幹細胞を中心とした骨髄の研究は、飛躍的に進歩した。マウスではCD 34(-) c-kit(+) Sca-1(+)-Lin(-)の細胞を移植すると放射線照射したマウスの造血系が完全に補われることが証明された<sup>9)</sup>。さらに、骨髄中には造血細胞以外にも間質細胞が存在し、造血系の細胞を支持しているだけでなく、この細胞自身が多分化能をもつことが報告された。この細胞は中胚葉系の幹細胞という意味で、間葉系幹細胞と呼ばれるようになった。

図①に成人における幹細胞の分類を示す。骨髄中の幹細胞は、血液幹細胞と間葉系幹細胞とに分けられる。血液幹細胞は、白血球をはじめとした血球成分に分化する。骨髄中には血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)が存在し、末梢血中で血管内皮細胞に分化



図① 成人における幹細胞の分類 (著者作成)