

の幹細胞が存在することが明らかにされた。図2に生体内に残存する幹細胞を分類して示した。従来再生が困難と考えられてきた神経細胞の幹細胞は海馬の脳室周囲に存在する⁶⁾。一方、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⁷⁾。骨髄はもともと造血の場であり、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、骨髄には血球系の細胞以外にも骨髄間質細胞とよばれる細胞が存在し、造血支持細胞として働いていることが知られていた。骨髄間質細胞は数多くの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・分化を維持している。骨髄間質細胞はその一部が骨や軟骨になることは早くから知られていた。現在は骨髄間質細胞に含まれる間葉系幹細胞とよ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⁷⁾。

IV. CMG細胞の作製

C3H/Heマウス大腿骨より骨髄を摘出し、Dexter法により初代培養を行った⁸⁾(図3)。骨髄間質細胞は付着系の細胞であり浮遊系の骨髄芽細胞、血球系の細胞を除去した後、3ヵ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

細胞株を作製し、この多クローンの細胞株に対し、limiting dilutionによる単一ある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なか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ッジより採取し、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なか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10~30%であった。

V. CMG細胞の特徴

CMG細胞は5-azacytidineによる最終的な分化誘導前を行う前には単核の線維芽細胞様の形状を呈するが、分化とともに形態は著しく変化する。図4にCMG細胞の位相差顕微鏡写真を示した。分化誘導1週目ごろより一部の細胞の細胞質が大きくなり円形を呈してくる。これらの細胞が後に自動拍動を開始する細胞となるが、この時点では自動拍動を行うことは、ごくまれである。分化誘導後2週になると、すでにこうした細胞の多くは自己拍動を開始する。

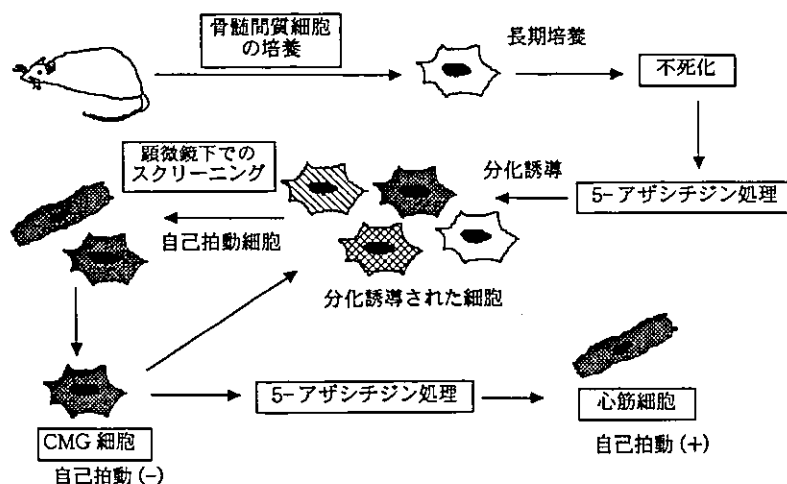


図3 骨髄細胞の初代培養とCMG細胞の作製

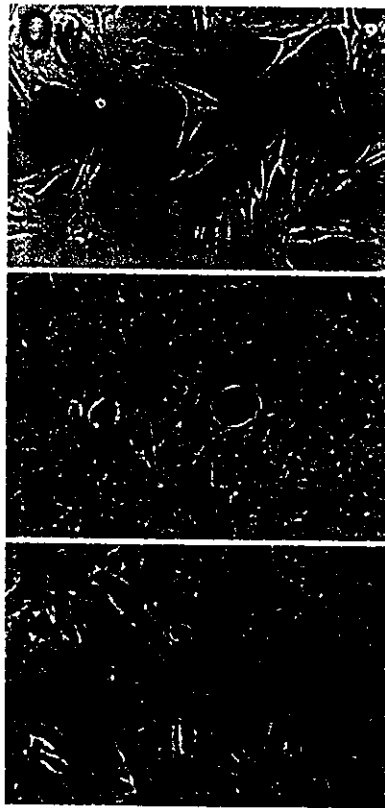


図4 分化前後のCMG細胞の位相差顕微鏡写真
数字は5-azacytidine投与からの週数を示す。スケールは
100 μ m. [文献4]より引用]

図5に透過型電顕写真を示した。電顕的には典型的な横紋構造に加えて、細胞中央部に存在する核、豊富なグリコーゲン顆粒、大型のミトコンドリアが観察された。核周囲には膜に包まれた直径70~130nmのhigh densityの分泌顆粒様の構造物が多数認められた。このhigh densityの分泌顆粒様の構造物を拡大した写真を図5-Bに示した。成獣マウスの心房で観察されるANPの分泌顆粒である心房顆粒は直径が150~200nmであり、CMG細胞で観察される分泌顆粒はそれよりもやや小さい傾向があるが、その電顕的特徴より心房顆粒の可能性が高いと判断した。デスモソーム、SR等も観察された。

VI. CMG細胞の活動電位

図6にガラス微小電極により記録したCMG筋管細胞の活動電位を示した。活動電位は洞結節細胞型S-3-6

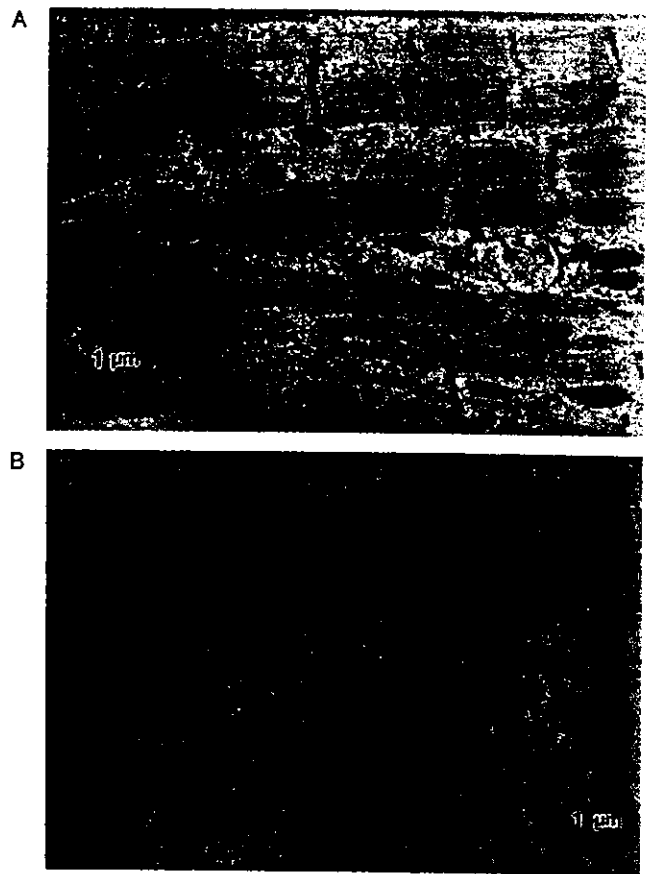


図5 CMG細胞の透過型電子顕微鏡写真
A：典型的な横紋構造が観察される。B：核周囲には幼弱な分泌顆粒(心房顆粒)が観察された。[文献4]より引用]

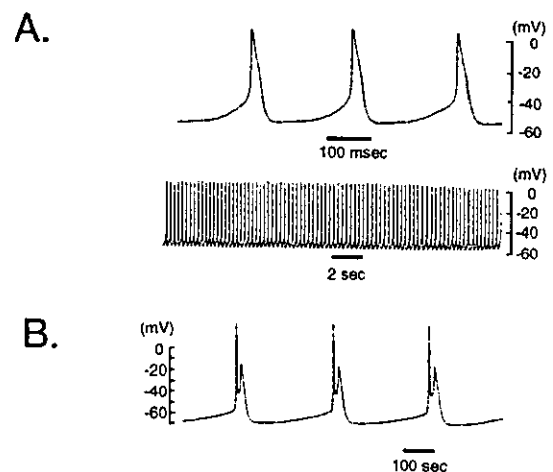


図6 CMG細胞の活動電位
CMG細胞の活動電位はおおむね2通りの形が観察された。A：洞結節型活動電位。B：心室筋型活動電位。
[文献4]より引用]

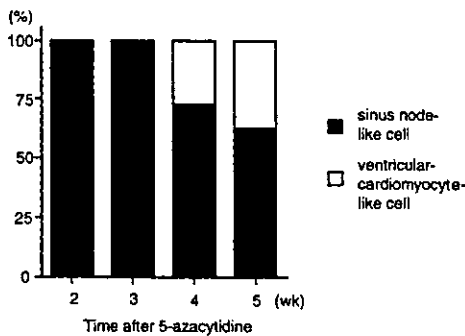


図7 CMG細胞の活動電位の経時的変化

分化誘導初期には洞結節型を呈するが、時間とともに心室筋型に移行した。〔文献4〕より引用

と心室筋細胞型の2種類に大別された。両者に共通した活動電位の特徴は①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅い静止期電位をもつこと、③ペースメーカー細胞にみられるような静止期電位の緩やかな脱分極が認められることである。また、心室筋細胞型では活動電位はPeak & Dome型を呈した。その後の研究でこれ以外の活動電位も見受けられ、分化誘導初期には洞結節細胞型が多く、時間とともに心室細胞型が多くなることも明らかとなった。また、Ca²⁺遮断薬であるベラパミルを投与すると、この活動電位の幅は狭小化することから、この活動電位がカルシウム電流に起因するものであることも明らかとなった。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は、従来ウサギ⁹⁾やラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋型はこれに比し、拡張期膜電位は深く、活動電位振幅は大きい傾向を示した。図7に洞結節型と心室筋細胞型の活動電位の比率の経時的変化を示した。分化誘導当初にはすべて洞結節型を示したが、成熟とともに心室筋細胞型が増加した。

VII. CMG細胞のイオンチャネル発現

図8にCMG細胞の分化過程におけるイオンチャネルの発現を示した。静止膜電位を形成するI_{K1}(IRK1)、再分極時に発現するI_{Kr}(MERG)は分化誘導以前より発現が観察された。自己拍動を開始する2週目ごろよりペースメーカー電位を形成するIf

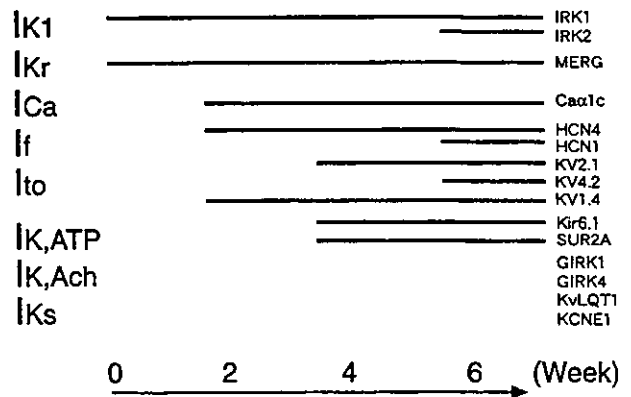


図8 遺伝子レベルでみたイオンチャネルの発現形式
横軸は分化誘導からの時間経過を週数で示した。

〔文献4〕より引用

(HCN4)、L型Ca²⁺電流I_{CaL}(Cav1.2)の発現が観察された。心室筋の活動電位を示す分化誘導後4週になると一過性外向き電流I_{to}(Kv2.1, Kv4.2, Kv1.4)およびI_{K,ATP}(Kir6.2, SUR2A)等が発現した。心房筋に発現するI_{K,Ach}(GIRK1, GIRK4)、成体心筋で発現するI_{Ks}(KvLQT1, KCNE1)の発現は観察されなかった。活動電位が経時的に洞結節細胞型から心室筋細胞型に変化したのは、上記のようなイオンチャネルの経時的変化に伴う現象であると考えられた。

VIII. CMG細胞の遺伝子発現

CMG細胞の心筋細胞としての表現形を解析するため、心筋細胞特異的蛋白の発現を観察した。図9に

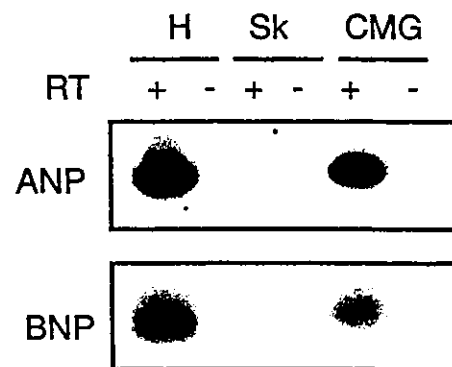


図9 CMG細胞におけるANP、BNPの発現
Hは心臓、Skは骨格筋、CMGはCMG細胞を示す。

〔文献4〕より引用

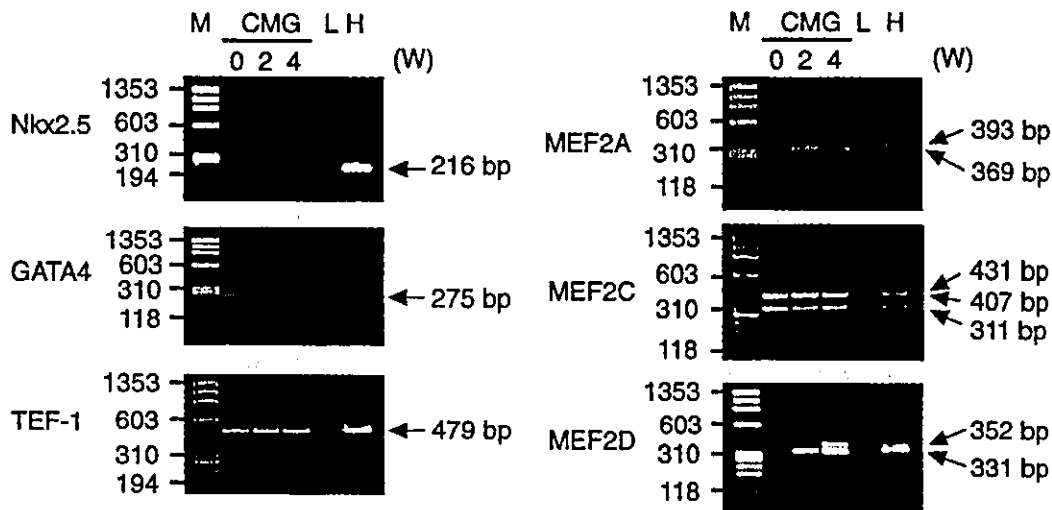


図10 CMG細胞における心筋特異的転写因子の発現

MEF2遺伝子群で複数のバンドが見られるのは alternative splicing による isoform の存在を示すものである。

心筋特異的蛋白である ANP および BNP, 心筋特異的な転写因子である *Csx/Nkx2.5*^{(10), (11)}, *GATA-4*, 筋細胞特異的な転写因子である *TEF-1* の mRNA の発現を心筋, 骨格筋を陽性, 陰性対照として RT-PCR-Southern 法により解析した結果を示した。CMG細胞では ANP, BNP の発現が観察された。転写因子に関しては心筋細胞, CMG細胞では *Csx/Nkx2.5*, *GATA-4*, *TEF-1* 遺伝子の発現が認められたが, 骨格筋では *TEF-1* のみの発現が観察された。筋細胞特異的な転写因子である MEF2 遺伝子群の発現を RT-

PCR法で観察した結果を図10に示した。バンドが複数観察されるのは MEF2 遺伝子群の alternative splicing のアイソフォームが明らかになる部位で primer を設定したことによる。CMG細胞は MEF2 遺伝子群のうち MEF2A, MEF2C⁽¹²⁾, 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されることが示された。図11に心臓の myogenesis, morphogenesis が起きる段階に発現している転写因子のパターンを示した。左右の心筋芽細胞が集合して1本の原始心筒になり, やがて looping が起き心臓が形成される。分化誘導前の CMG細胞は発生段階の中胚葉細胞より下流で心筋芽細胞が形成される前後の位置にあり, 分化誘導がかかると心筋細胞に分化されると考えられた。

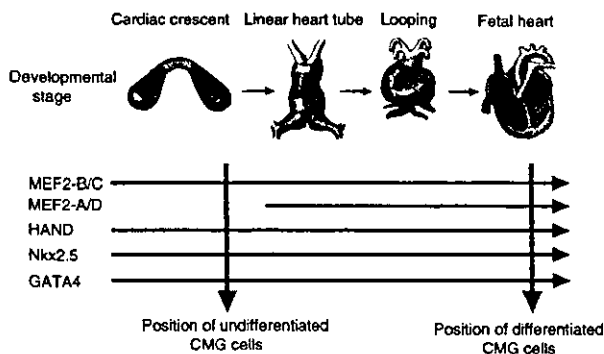


図11 心臓の分化過程における転写因子の発現と CMG細胞の遺伝子発現

[Fukuda K : Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*, 2001 ; 25 : 187~193より引用]

S-3-8

IX. 再生心筋細胞における交感神経 α_1 受容体の発現と機能

心筋細胞には α_1 受容体が存在し, 主として心筋細胞の肥大現象に関与していることが知られている。近年の研究により, 交感神経 α_1 受容体には3種類のアイソフォーム (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) が存在することが

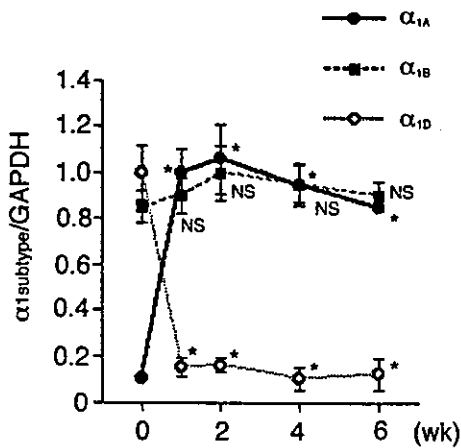


図12 骨髄細胞由来の再生心筋細胞における交感神経 α_1 受容体の発現の解析

RT-PCRによる α_1 受容体サブタイプ(α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})発現の定量的評価。横軸は分化誘導からの時間(週数)を示す。心筋分化が進むと α_{1A} 受容体の発現が増加し、 α_{1A} 受容体の発現が低下した。〔文献5〕より引用

知られている。選択的遮断薬がないことからその役割分担は今のところ解明されていない。心筋細胞にはこれら3種の受容体すべてが発現しているが主として発現しているのは α_{1A} , α_{1B} 受容体であり、わずかに α_{1D} 受容体が発現していることが知られている^{13), 14)}。図12に示したように再生心筋細胞では分化誘導を行う前からすべての受容体アイソフォームの発現を認めたが、このときには主として α_{1D} , α_{1B} 受容体が発現し、若干の α_{1A} 受容体が発現していた。これに対し、分化誘導後に心筋細胞の表現型を取ると、 α_{1A} 受容体の発現は増加し、 α_{1B} 受容体の発現は一定、 α_{1D} 受容体の発現は低下するようになり、心筋細胞と類似した発現様式に変化する。

再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬であるフェニレフリンで刺激すると、受容体下流のシグナルである

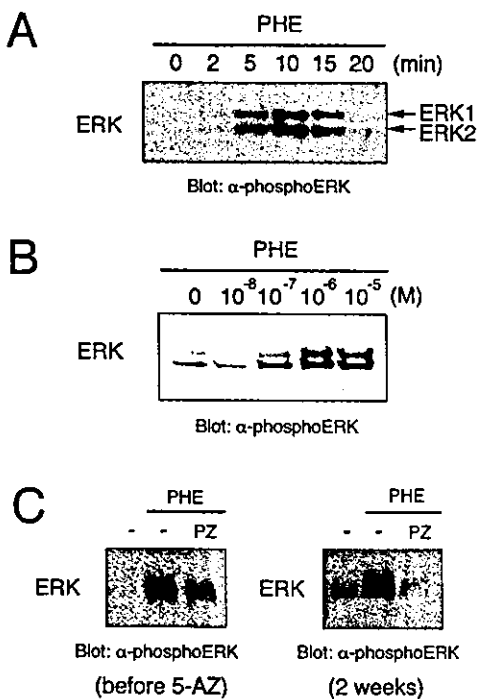


図13 再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬フェニレフリン(PHE)で刺激した際のシグナルの活性化MAPKファミリーのERKの活性化をリン酸化ERKの抗体で解析した。Aは時間経過, Bは濃度依存性をみたものである。Cは α_1 受容体遮断薬プラゾシン(PZ)を前投与した際のERKの活性化をみたもので、プラゾシン前投与により完全にリン酸化が抑制されている。〔文献5〕より引用

JPN. J. ELECTROCARDIOLOGY Vol. 24 SUPPL. 3 2004

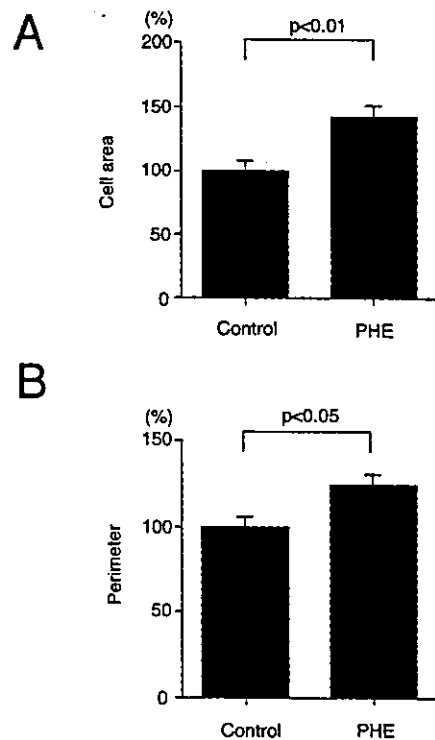


図14 再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬フェニレフリン(PHE)で刺激した際の細胞表面積(A)と周長(B)の変化

無血清培養条件下で再生心筋細胞をフェニレフリンで48時間刺激した際の変化を示す。〔文献5〕より引用

S-3-9

ERK1/2が時間依存性、用量依存性に活性化された。この活性化は α_1 受容体遮断薬であるプラゾシンにより抑制された(図13)。

さらに、再生心筋細胞を無血清培養条件下でフェニレフリンにより48時間刺激し、細胞を固定・染色した後に細胞の表面積、周長を測定した。その結果、心筋細胞の表面積、周長は図14に示したように増大した。

以上の現象より再生心筋細胞では交感神経 α_1 受容体が遺伝子レベルで発現しているだけでなく、シグナル伝達機能、さらには心肥大作用という生理的機能を有していることが明らかとなった。また、分化誘導前の骨髄幹細胞の状態から受容体を発現している理由に関しては骨髄間質の細胞も生体内で交感神経の支配を受けることが知られており、これに起因しているものと推測される。交感神経の α_1 受容体の発現はアイソフォームの存在が知られる前は比較的組織特異性が低いとされてきた。アイソフォームの存在が明らかになるにつれ、組織特異性が知られるようになってきた。本研究により再生心筋細胞では心筋の表現型を獲得するとともに、より心筋型に近いものに変化したものと考えられる。

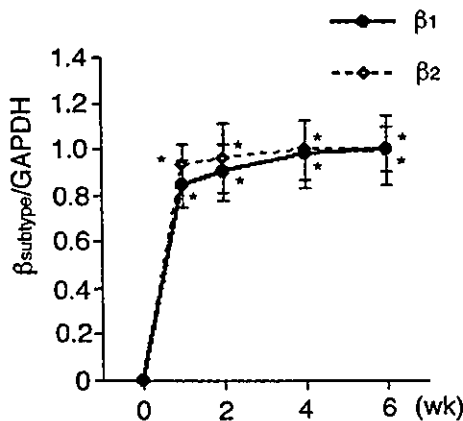


図15 骨髄細胞由来の再生心筋細胞における交感神経 β_1 、 β_2 受容体の発現の解析

RT-PCRによる β_1 、 β_2 受容体サブタイプ発現の定量的評価。心筋分化が進むと β_1 、 β_2 両受容体の発現が増加した。

[文献5)より引用]

S-3-10

X. 再生心筋細胞における交感神経 β 受容体の発現と機能

心筋細胞では交感神経 β 受容体はよく知られているように β_1 、 β_2 の2種類の受容体が存在する^{15), 16)}。 β_1 受容体は心筋細胞特異的に発現するが、 β_2 受容体は気管支平滑筋や末梢血管にも存在する。心筋細胞では β_1 受容体が約80%、 β_2 受容体が約20%の比率で存在するとされている。

再生心筋細胞では β_1 、 β_2 受容体とも心筋細胞の

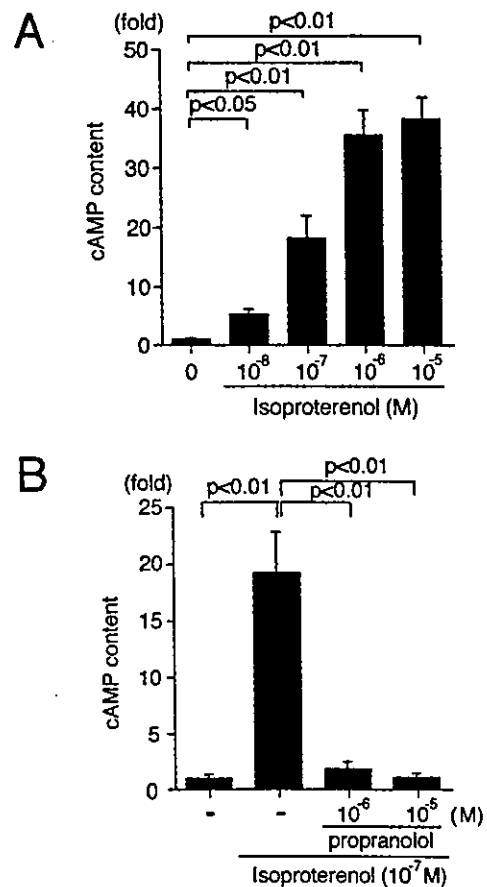


図16 再生心筋細胞を β 受容体刺激薬イソプロテレンオールで刺激した際のセカンドメッセンジャーcAMPの変化[文献5)より引用]

A: 再生心筋細胞を様々な濃度のイソプロテレンオールで刺激した際のcAMP含量の変化。濃度依存的にcAMPが上昇することが観察された。

B: 非特異的 β 受容体遮断薬プロプラノロールを前投与した際のイソプロテレンオール刺激時のcAMP含量。プロプラノロール前投与によりほぼ完全にcAMPの上昇が抑制された。

JPN. J. ELECTROCARDIOLOGY Vol. 24 SUPPL. 3 2004

表1 再生心筋細胞におけるイソプロテレノール刺激に伴う拍動数、細胞収縮距離、%収縮率、収縮速度の変化

| | 対 照 | イソプロテレノール(10^{-7} mol/L) | | | |
|------------------|------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 生理食塩水 | プロプラノロール(10^{-7} mol/L) | CGP20712A(10^{-7} mol/L) | ICI118551(10^{-7} mol/L) |
| %拍動数増加 | — | 47.6 ± 8.4* | 10.0 ± 1.9 † | 13.8 ± 2.4 † | 37.6 ± 1.9 ‡ |
| 細胞収縮距離(μ m) | 75.0 ± 0.3 | 6.8 ± 0.7* | 5.6 ± 0.8 ‡ | 5.3 ± 0.6 ‡ | ND |
| %収縮率(%) | 6.9 ± 0.5 | 8.5 ± 1.2* | 7.2 ± 0.8 ‡ | 5.6 ± 0.6 ‡ | ND |
| 収縮速度(μ m/s) | 71.1 ± 5.2 | 100.9 ± 11.0* | 71.3 ± 8.8 ‡ | 70.6 ± 6.6 ‡ | ND |

表現型をとる前には発現が認められなかったが、分化誘導後に心筋細胞の形質をもつようになると両者とも発現が観察された。これは、両受容体が組織特異的に発現することからも容易に説明しうると考えられた(図15)。

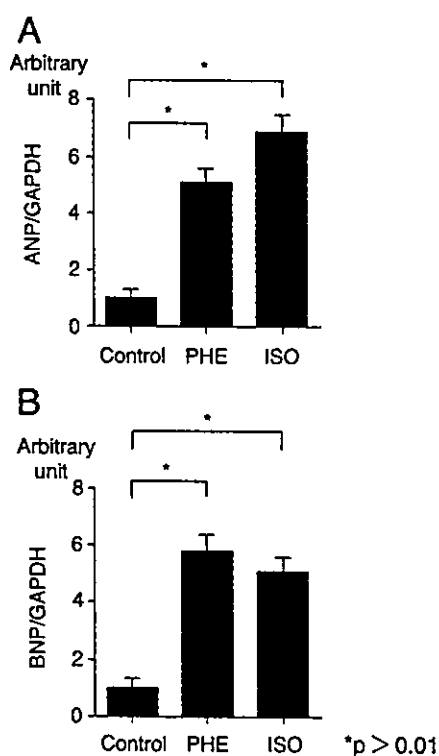


図17 再生心筋細胞をフェニレフリン(PHE)あるいはイソプロテレノール(ISO)で刺激した際の肥大マーカー遺伝子ANP、BNPの遺伝子発現の変化 [文献5]より引用

再生心筋細胞を α_1 刺激あるいは β 刺激したところ、いずれの場合もANP、BNPの発現の上昇が観察された。

これらの受容体はいずれも7回膜貫通G蛋白共役型の受容体を有しており、Gs、cAMP合成酵素を介してセカンドメッセンジャーとしてcAMPを増加させる。再生心筋細胞を β_1 、 β_2 受容体両方の刺激薬であるイソプロテレノールで刺激するとcAMPは濃度依存的に上昇した。また、 β_1 、 β_2 両受容体の遮断薬であるプロプラノロールを前投与しておく、このcAMPの増加は完全に抑制された(図16)。

一般的に心筋細胞を β 受容体刺激薬で刺激すると、心拍数の上昇、心収縮力の増大、興奮伝導速度の上昇が観察される。再生心筋細胞をイソプロテレノールで刺激した際には前値に比して約50%の上昇が観察された。これに対し、 β_1 選択性遮断薬CGP20712A、 β_2 選択性遮断薬ICI118551を前投与しておく、心拍数の上昇は主としてCGP20712Aにより強く抑制され、ICI118551により軽度抑制された。また、再生心筋細胞をイソプロテレノールで刺激した際には心収縮力の指標である収縮率(% shortening)、収縮速度も同様にイソプロテレノール刺激により増大し、CGP20712Aによりほぼ対照レベルまで抑制された(表1)。

心筋細胞を α_1 あるいは β 刺激すると、心肥大のマーカー遺伝子とされるANPおよびBNPの発現が増強することが知られている。再生心筋細胞をフェニレフリンおよびイソプロテレノールで刺激した際のANPおよびBNPの発現量を定量化したものを図17に示した。フェニレフリン、イソプロテレノール

ルの両者とも ANP および BNP の発現量を対照に比して有意に増加させる作用をもつことが観察された。

これらの所見より、再生心筋細胞では心筋細胞の表現型を獲得すると β_1 、 β_2 受容体を発現し、これらを刺激すると心拍数の上昇、心収縮力の増強が観察されること、そしてこのシグナルは主として β_1 受容体を介するものであることが明らかとなった。

Ⅺ. 再生心筋細胞における副交感神経ムスカリン受容体の発現

副交感神経ムスカリン受容体には M_1 から M_5 受容体まで5種類の受容体が存在する。心筋細胞にはこれらの受容体のうち主として M_2 受容体が存在する。近年の研究により心筋細胞には M_1 受容体も存在することが知られている^{17)~19)}。再生心筋細胞では分化誘導前の状態では M_1 、 M_2 受容体とも発現は認められなかったが、分化誘導の後、心筋細胞の表現型をもつようになると両受容体の発現が認められるようになった(図18)。ムスカリン受容体の発現も β 受容体の発現と同様に組織特異的に発現することから、この発現様式は理解しやすいものと考えられる。

ムスカリン受容体はアイソフォームが異なると、共役するG蛋白も異なりシグナル伝達機構も異なる

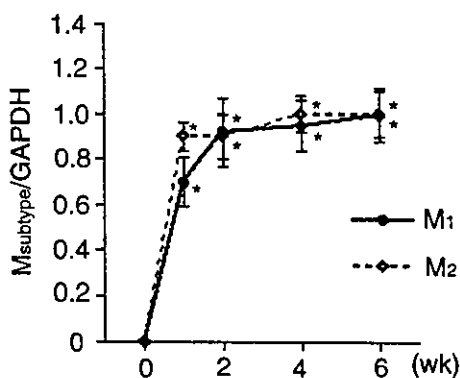


図18 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるムスカリン M_1 、 M_2 受容体の発現の解析

RT-PCRによる M_1 、 M_2 受容体サブタイプ発現の定量的評価。心筋分化が進むと M_1 、 M_2 両受容体の発現が認められるようになった。〔文献5)より引用〕

S-3-12

ことが知られている。 M_1 、 M_2 受容体は異なるG蛋白、すなわち各々 G_q 、 G_i を介してシグナルが伝達される。しかし、両受容体の共通の性質として、 $G_{\alpha q}$ 、 $G_{i\beta\gamma}$ を介してホスホリパーゼ C_β を活性化し IP_3 産生を惹起することが以前に報告されている²⁰⁾。そこでアセチルコリンの類似化合物であるカルバコールで再生心筋細胞を刺激すると、セカンドメッセンジャーの IP_3 が濃度依存性に上昇した。この IP_3 の上昇はム

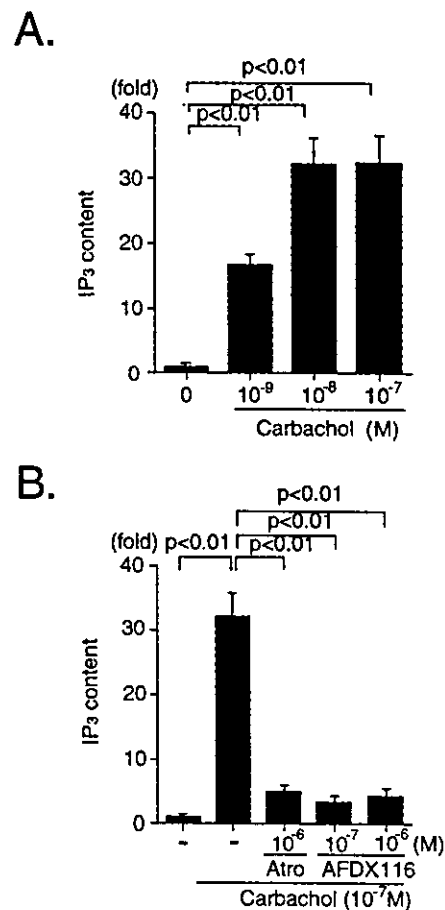


図19 再生心筋細胞をムスカリン刺激薬カルバコールで刺激した際のセカンドメッセンジャー IP_3 の変化〔文献5)より引用〕

A: 再生心筋細胞を様々な濃度のカルバコールで刺激した際の IP_3 含量の変化。濃度依存的に IP_3 が上昇することが観察された。

B: 非特異的ムスカリン受容体遮断薬アトロピン、 M_2 選択的遮断薬 AFDX116 を前投与した際のカルバコール刺激時の IP_3 濃度。アトロピン (Atro)、AFDX116 前投与によりほぼ完全に IP_3 の上昇が抑制された。

スカリン受容体共通の非特異的遮断薬アトロピン、およびM₂受容体特異的遮断薬AFDX116により強く抑制された(図19)。

以上の現象は再生心筋細胞が副交感神経ムスカリンM₁, M₂受容体を発現し、さらにシグナル伝達機能をもつこと、その中心はM₂受容体であることを示している。

Ⅷ. 再生心筋細胞における受容体発現の意義

心筋細胞は生体内において、交感神経と副交感神経により、様々な調節を受けている。再生心筋細胞におけるこれらの受容体の発現は、様々な点で重要な意味をもつと考えられる。胚性幹細胞・骨髄細胞いずれの由来であれ、これらの再生心筋細胞の究極の目的は重症難治性心不全の治療にあることはいうまでもない。細胞移植あるいはスカフォールドを用いて組織様にした心筋塊を生体内に移植した際には電気生理学的にも血行動態的にもレシピエントの心筋と協調して収縮することが求められる。また、交感神経・副交感神経の刺激により拍動数、収縮力が調節可能であることも重要であろう。したがって、移植された再生心筋細胞は交感神経および副交感神経により神経支配を受け、シナプスを形成することが求められるが、今回の研究成果をみると、骨髄細胞由来の再生心筋細胞は少なくともこれらの受容体を発現しており、交感神経・副交感神経とシナプス形成を最低限の基準は満たしている。実際に生体内で神経支配を受けるか否かの解明は今後の研究を待たねばならない。

現在臨床で行われている心臓移植では、切断された神経断端の縫合はなされていない。もちろん、仮に縫合されたからといってドナーとレシピエントの神経が連結される保証はない。整形外科領域では切断された末梢神経の断端を縫合すると神経は連結するが、この場合にはあくまで自己の細胞である。移植心の場合、結果として神経支配を受けないために、運動や緊張、安静などに応じた心拍数の変動、収縮力の調整が行えない。これらの点を考慮し、再生

心筋細胞の移植を考えたときには、移植細胞の神経支配を考慮することは重要であると考えている。今後のさらなる研究が必要であろう。

Ⅸ. おわりに

心臓、腎臓、肝臓等の臓器移植は目の前にいる臓器不全の患者を救う治療法として優れた治療法であることはいうまでもない。しかし、これらの治療法が、ドナーの不足、HLA抗原不適合による移植拒絶反応、免疫抑制剤使用による副作用、感染症の発症、脳死判定の問題等の様々な問題を抱えていることも事実である。再生医学はこれらの問題を解決しうる可能性を秘めているが、それには生命現象の解明と技術革新が必須であり、これからも多くの基礎研究を必要としている。骨髄細胞中からの間葉系幹細胞の単離、試験管内での増殖、特定のサイトカインや細胞増殖因子を用いた分化誘導法の確立、分化した心筋細胞の選択的回収、移植法の確立など難問が山積している。これらの壁を乗り越え、生命科学の進歩が再生医学のさらなる発展をもたらすことを希望している。

【文 献】

- 1) Weintraub H : The MyoD family and myogenesis : redundancy, networks, and thresholds. Cell, 1993 ; 75 : 1241 ~ 1244
- 2) Olson EN, Klein WH : bHLH factors in muscle development : dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. Genes Dev, 1994 ; 8 : 1 ~ 8
- 3) Olson EN, Srivastava D : Molecular pathways controlling heart development. Science, 1996 ; 272 : 671 ~ 676
- 4) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest, 1999 ; 103 : 697 ~ 705
- 5) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S : Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation, 2002 ; 105 : 380 ~ 386

- 6) Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA : *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*, 2000 ; 6 : 271 ~ 277
- 7) Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997 ; 276 : 71 ~ 74
- 8) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG : Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol*, 1977 ; 91 : 335 ~ 344
- 9) Noma A, Irisawa H : Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch*, 1976 ; 364 : 45 ~ 52
- 10) Komuro I, Izumo S : *Csx* : a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993 ; 90 : 8145 ~ 8149
- 11) Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP : Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev*, 1995 ; 9 : 1654 ~ 1666
- 12) Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN, : Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *MEF2C*. *Science*, 1997 ; 276 : 1404 ~ 1407.
- 13) Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC, Bailey BA, Karliner JS, Camacho SA, Long CS, Simpson PC, :
 Alpha1-adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by alpha1-adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and *in vivo*. Repression of alpha1B and alpha1D but induction of alpha1C. *J Biol Chem*, 1996 ; 271 : 5839 ~ 5843
- 14) Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Casanova E, Ovalle S, Calvo P, Chinchetru MA : Molecular cloning of alpha 1d-adrenergic receptor and tissue distribution of three alpha 1-adrenergic receptor subtypes-in mouse. *J Neurochem*, 1995 ; 65 : 2387 ~ 2392
- 15) Steinberg SF : The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res*, 1999 ; 85 : 1101 ~ 1111
- 16) Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF : Beta 2-adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 1995 ; 76 : 40 ~ 52
- 17) Hosey MM : Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J*, 1992 ; 6 : 845 ~ 852
- 18) Sharma VK, Colecraft HM, Wang DX, Levey AI, Grigorenko EV, Yeh HH, Sheu SS : Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 1996 ; 79 : 86 ~ 93
- 19) Subers EM, Nathanson NM : Muscarinic acetylcholine receptor function in chick heart cells cultured in serum-free medium. *J Mol Cell Cardiol*, 1988 ; 20 : 131 ~ 140

特集

細胞移植と再生医療—血管新生から心筋再生へ—

心筋再生と細胞移植の現状*

福田 恵一**

Key Words : mesenchymal stem cell, embryonic stem cell, regeneration therapy, cardiomyocyte, heart failure

要 旨

これまでの研究により胚性幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞などから心筋細胞が分化誘導できることが示された。再生心筋細胞を純化し移植する技術も開発され, 移植再生心筋細胞はレシビエント心臓に長期間生着できることが証明された。新たな移植法として組織工学を応用した細胞シートの作成が可能となり, ドナーの不要な細胞移植による心不全治療が臨床の前段階にまで来ている。また, サイトカインを利用した幹細胞の動員による心不全治療法も模索されている。

はじめに

心筋細胞は出生直後までは細胞分裂するが, その後は細胞分裂をせず肥大により心負荷に適應すると長らく考えられてきた。最近の研究で心筋梗塞直後にごくわずかな心筋細胞が細胞分裂することがわかったが, 心不全を改善するほどの効果には至らないものである。拡張型・肥大型心筋症による難治性重症心不全に対してはこれまで心臓移植が行われてきたが, ドナー不足は将来的にも解消される見通しはない。これらの疾患あるいは重症心筋梗塞による新たな治

療として, 多能性幹細胞を用いた心筋再生とこれを用いた心不全治療が提唱されている。研究段階では非常に期待をもたせる成果が出ており, これをいかに臨床に応用すべきかが今後の課題となっている。本稿では, これらの現状と展望を述べることにする。

心筋細胞再生と幹細胞

多能性幹細胞といっても, 胚性幹細胞のように全身のすべての臓器になるものから, 造血幹細胞のように特定の細胞群にしか分化できないものまで多段階の幹細胞が存在する。われわれは, 1999年に骨髄間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することを報告したが¹⁾, それ以後身体の中にあるさまざまな幹細胞が心筋分化能力を有することが報告された。表1にこれらのなかの代表的なものの特徴を示した。

1. 胚性幹細胞(ES細胞)

胚性幹細胞は受精直後の胚盤胞と呼ばれる時期に, 将来胎児になる内部細胞塊の部分を取り出してきたもので, マウス, ヒツジ, ウシ, サルなどだけでなく, ヒトでもすでに樹立されている。米国, オーストラリアなどでヒトの胚性幹細胞が先行して樹立されたが, 本邦でも京都大学中辻教授らのグループにより3株ほど樹立されている。心筋細胞は胎生早期より分化してくる細胞であることもあり, 胚性幹細胞からはとくに分化誘導を行わなくとも少量の心筋細胞

* The present state of cardiac regeneration and cell transplantation.

** Keiichi FUKUDA, M.D.: 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35); Cardiopulmonary Division, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, JAPAN

表1 心筋幹細胞の分類と特徴

| | 報告者 | 特徴 | 存在頻度・単離の難度 | 分化できる細胞 |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--|--|
| 胚性幹細胞 | 多数 | 大量培養可能. 同種移植となるため 免疫抑制剤が必要. | 比較的容易に単離. ヒト胚性幹細胞がすでに 樹立. | あらゆる細胞が分化可能だが, <i>in vitro</i> では胎生早期に分化でき る細胞が得られやすい. |
| 骨髄間葉系 幹細胞 | 慶大福田ら | 培養法が比較的容易 | 骨髄中の数千万~ 数百万分の1 | 骨芽細胞・軟骨芽細胞・脂肪細胞 ・心筋細胞など |
| MAPC細胞 | 米国 ミネソタ大学 Verfeilleら | 培養法がきわめて 難しい. 大量培養不可. | 10億分の1(きわめて稀). 単離は難しいが, ヒトの 細胞でも単離されている. | あらゆる細胞が可能だが, 神経 細胞, 肝臓細胞, 骨格筋細胞な どで確立. |
| 心筋組織 幹細胞 (c-kit細胞) | ニューヨーク 州立大学 Anversaら | 単離が難しい. 大量培養不可. | 心臓組織を材料とするため 難しい. バイオプシーで できるか不明. | 心筋, 平滑筋, 血管内皮細胞 |
| 心筋組織 幹細胞 (Sca-1細胞) | バイラー大学 Schneiderら | 単離が難しい. 大量培養不可. | ヒトではSca-1抗原がない ため不可. | 心筋 |

は得られることが知られている。胚性幹細胞を一定の大きさの細胞塊を作成し浮遊状態で培養すると、中空状の疑似胚(これを胚様体という)を形成する。一部の胚様体は部分的に心筋細胞に分化する。現在、胚様体から心筋細胞により効率的に分化誘導させる方法として、BMP2, FGF, IGF-1, H₂O₂, アスコルビン酸, レチノイン酸などさまざまな方法が知られているが、これらの方法もそれほど効率的なものではない。しかし、心筋分化にかかわる因子の研究が急速に進んでおり、近い将来胚性幹細胞から特異的に心筋細胞を分化誘導できる方法が開発されるものと考えられる。

2. 骨髄間葉系幹細胞

骨髄は造血幹細胞を頂点として血球系の細胞が99%以上を占めるが、間葉系幹細胞は骨髄中に稀な頻度で存在する。この細胞は骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞などに分化することが従来から知られ、このほかにも骨格筋細胞、心筋細胞、神経細胞にも分化すると報告されている。骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導はこれまでDNAの脱メチル化剤である5-アザシジンを用いて行われており、特異的な分化誘導法は胚性幹細胞以上に知られていない。しかし、後述のように生体内でこの細胞は心筋細胞に分化誘導されること、心筋細胞との共培養で心筋細胞に分化するという報告があることなどより、今後、解明されてゆくものと思われる。骨髄間

葉系幹細胞の最大の利点は患者本人の細胞を使用することが可能である点であり、拒絶反応やドナーの問題は解決できる。問題点としては、生体内では一生を通じて自己複製しているものと考えられるが、*in vitro*では継代数に限度があり、大量に培養できない点が問題であろう。間葉系幹細胞から心筋細胞に分化した細胞は当初胎児期心室筋の表現型をとるが、次第に成熟し成人型の遺伝子発現をみるようになる¹⁾。また、交感神経・副交感神経の受容体も生体の心筋細胞と同様な発現、機能を有する²⁾。

3. 心臓内に存在する組織幹細胞

近年、心臓組織中よりc-kit陽性あるいはSca-1 (stem cell antigen-1)陽性の細胞をセルソーターを用いて回収すると、これらのなかに心筋に分化可能な細胞が存在することが報告された。これらの細胞は心臓特異的な組織幹細胞と考えられ、その存在頻度は低いものの心筋細胞や平滑筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有するとされている。c-kit陽性細胞とSca-1陽性細胞はその特徴も異なり、分化能力なども異なっている。これらの細胞は*in vitro*でもある程度の増殖は可能であり、心筋細胞の再生に有用なツールと考えられる。c-kit抗原はサイトカインstem cell factorの受容体であり、ヒトでも応用可能である。これに対し、Sca-1はマウス特異的な抗原であり、ヒトでの対応する抗原はないためヒトでの応用は難しい。いずれにしてもこれらの組織幹細胞

は存在頻度が低く、バイオプシー程度の心筋から分離することは難しいため、大量に心臓を採取しなければならない点が問題で臨床応用は今後の課題であろう。

心筋細胞移植

心筋細胞移植の概念はすでに1990年代後半から提唱されてきた。動物実験では、胎児あるいは新生児ラット心筋細胞などを成体の心臓に移植できること、移植した細胞は比較的長期間生着できること、周囲の細胞とGAP結合することなどが報告されている。

多能性幹細胞由来の心筋細胞を心臓に移植する際には、未分化細胞やほかの細胞に分化した細胞を除去しなければならない。これまでの研究では胚性幹細胞から分化させた心筋細胞をセルソーターで回収する方法が有効と報告されている。心筋細胞特異的蛋白の遺伝子プロモーターに蛍光色素GFP (green fluorescent protein) などの遺伝子を組み替えた遺伝子を胚性幹細胞などに遺伝子導入し、心筋細胞をマーキングする方法が取られている。われわれはミオシン軽鎖遺伝子プロモーターとGFP遺伝子の組換え遺伝子を作成し、骨髄間葉系幹細胞に導入した³⁾。この細胞を分化誘導すると、図1のように心筋細胞に分化した細胞のみを緑色に標識でき、さらにFACSセルソーターにより99%以上の純度で心筋細胞のみを回収することができた。これを同種マウスの心臓に注射針を用いて移植すると、図2に示すように再生心筋細胞はレシピエントの心筋細胞の隙間に移植され、周囲の細胞とGAP結合を介して結合していた³⁾。また、これらの細胞は長期間レシピエントの心臓に生着していた。これらの現象は、再生心筋細胞が胎児・新生児心筋細胞の代替細胞と

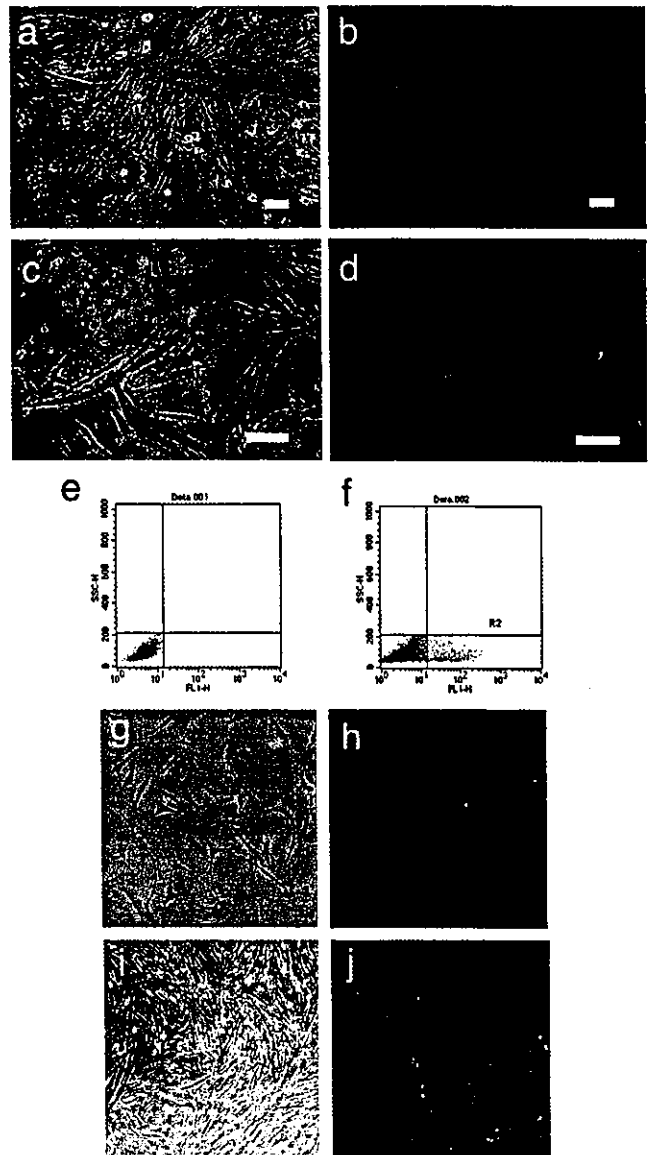


図1 再生心筋細胞の単離
心室筋特異的蛋白であるミオシン軽鎖-2vの遺伝子のプロモーターに蛍光色素GFPを組み替えたプラスミドを骨髄間葉系幹細胞に遺伝子導入し、分化誘導を行ったもの。一部の細胞がGFP陽性になり(a, b)、拍動を開始する(c, d)。GFP陽性になった時期にFACSセルソーターにより細胞を分取する(e, f)と心筋細胞のみが得られる(g~j)。(文献³⁾より一部改変引用)

して心筋細胞移植のツールとして使用可能であることを示しており、今後の発展が期待される。

注射針による細胞移植は簡便であるが、大量の細胞を移植できないこと、細胞の生着率が低いことより移植法としては完成されたものでは

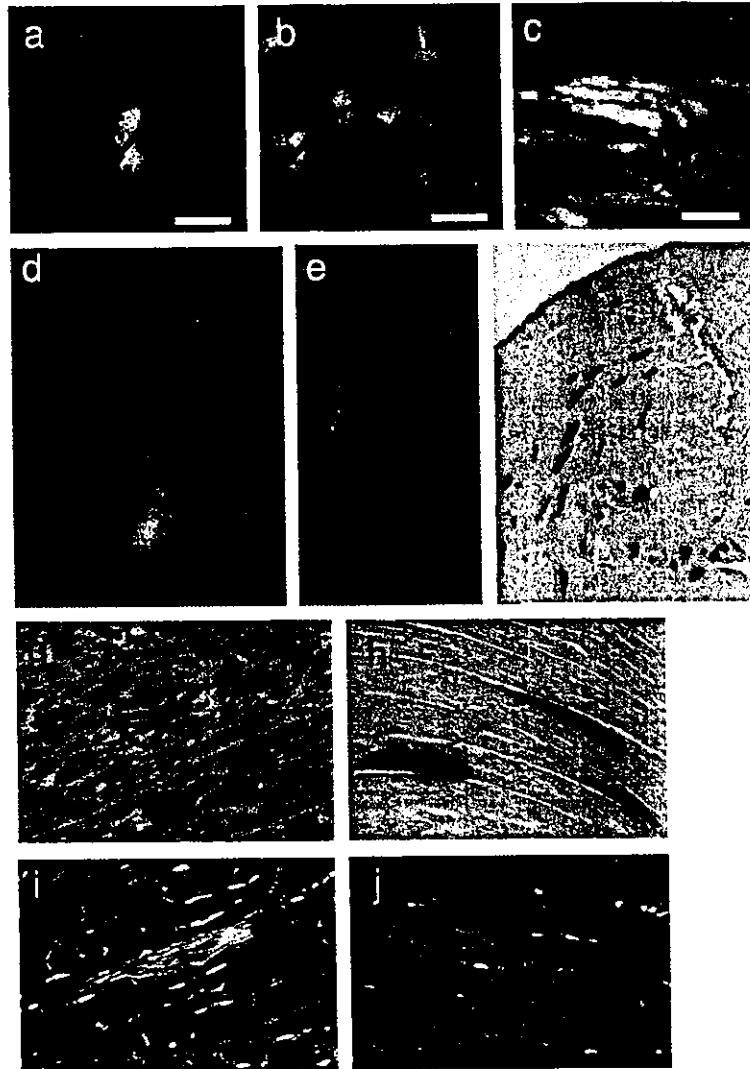


図2 再生心筋細胞の移植

図1で得られた細胞を注射針で成体のマウス心臓に移植したもの。移植された心筋は心臓に生着し、長期間生存することが確認できる。これらの細胞は心臓に島嶼状に分散し、周囲の心筋細胞に密着して短冊状の成熟心筋細胞の形態を取っていた。a~cはGFPの蛍光を観察したもの、d~hはLacZ遺伝子を導入染色したものである。これらはconnexin43と共免疫染色をすると周囲の心筋細胞とGAP結合をしている様子が観察された(i,j)。緑はGFP、青はTOTO-3による核染色、赤はconnexin43を示す。
(文献³⁾より一部改変引用)

ない。東京女子医科大学の岡野らは、培養皿表面を特殊な樹脂でコーティングすることにより、温度感受性培養皿を作成した。この皿の表面は低温にすると親水性になり、培養細胞がシート状に剥離できることを利用して心筋細胞シートを作成した。われわれもこの方法にヒントを得

て、独自に心筋細胞シートの作成方法を開発した⁴⁾(図3)。この方法は外科手術の際に使用されるフィブリン糊を応用した方法で、フィブリンノーゲン溶液とトロンビン溶液を一定濃度で反応させ、培養皿上にフィブリンポリマーを薄くコーティングする。この培養皿上で心筋細胞を培養

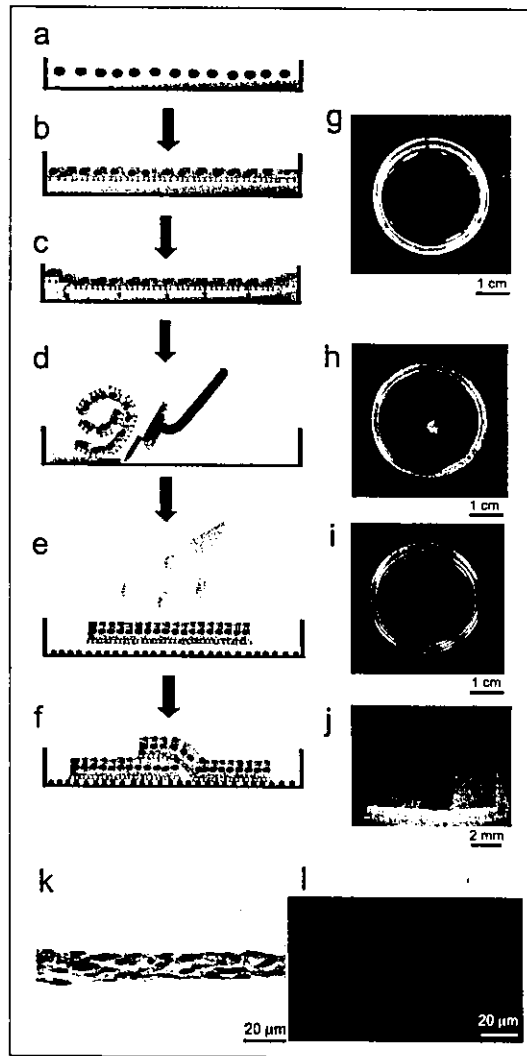


図3 心筋細胞シートの作成

フィブリンポリマー膜でコートした培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法。フィブリンポリマーは心筋細胞より分泌される種々の内因性プロテアーゼにより次第に分解され、容易に培養皿表面から剥離できる。これを利用すると簡便に心筋細胞シートが作成できる。a~fは概念図、g~jは実際の様子、k,lは心筋細胞シートをHE染色あるいは免疫蛍光染色したもの。

(文献⁴⁾より一部改変引用)

すると、心筋細胞より種々の内因性プロテアーゼが分泌され、このプロテアーゼにより3日目くらいにはフィブリンポリマー膜が分解され、シート状の心筋細胞を得ることができる。培養開始7日目までは完全にフィブリンが除去される。心筋細胞シートの特徴は注射針による移植

と異なり、細胞の生存率、生着率が良いことである(図4)。注射針による移植の場合、細胞の生着率は多くの報告で10%未満の細胞しか生着しない。これに対し、心筋シートを皮下に移植した場合には細胞が移植後に失われることは少なく、今後の細胞移植法の重要な手法のひとつとなるであろう。心筋細胞シートは重層することによりある程度厚みのある組織を作ることができる。移植後は小血管網が形成されるが、太い血管の構築は現状ではできておらず、今後の研究の進展が望まれる。

成体における幹細胞からの心筋再生

これまでの研究で、骨髄幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化することが明らかとなったが、生体内でこれらの幹細胞が心臓に移動し、心筋細胞に分化するか否かは知られていなかった。また、最近2年間の議論で造血幹細胞の多能性や多能性幹細胞の細胞融合も報告され、骨髄細胞の生体修復機能が混沌としていた。そこでわれわれは骨髄中のいずれの細胞(造血幹細胞あるいは間葉系幹細胞)が生体内で心筋細胞に分化するかを検証するため、マウスの骨髄移植モデルを用いた解析を行った⁵⁾。すなわち、GFPでマーキングした造血幹細胞と間葉系幹細胞の双方を別々に致死量の放射線を照射した同種マウスに移植した。造血幹細胞はGFPトランスジェニックマウスからFACSを用いてKSL-SP法という手法により、単一の造血幹細胞を採取し当座の造血を担うGFP非標識のradioprotective cellとともに骨髄移植を行った。また、間葉系幹細胞は以前われわれが単離したCMG細胞を上述のように心筋細胞に分化した際にGFPを発現するように標識し、骨髄内骨髄移植という特殊な方法で骨髄移植を行った。間葉系幹細胞は造血幹細胞に比して細胞径が大きく、肺やその他の組織にトラップされる可能性が大きく、この方法を選択した。このように造血幹細胞、間葉系幹細胞を移植したマウスで心筋梗塞を作成し、2か月後に心臓を解析したところ、興味深い結果が示された。造血幹細胞を移植した群ではGFP陽性に心筋細胞はほとんど観察されず、これまで報告されている細胞融合の頻度程度のものだけであった。これ

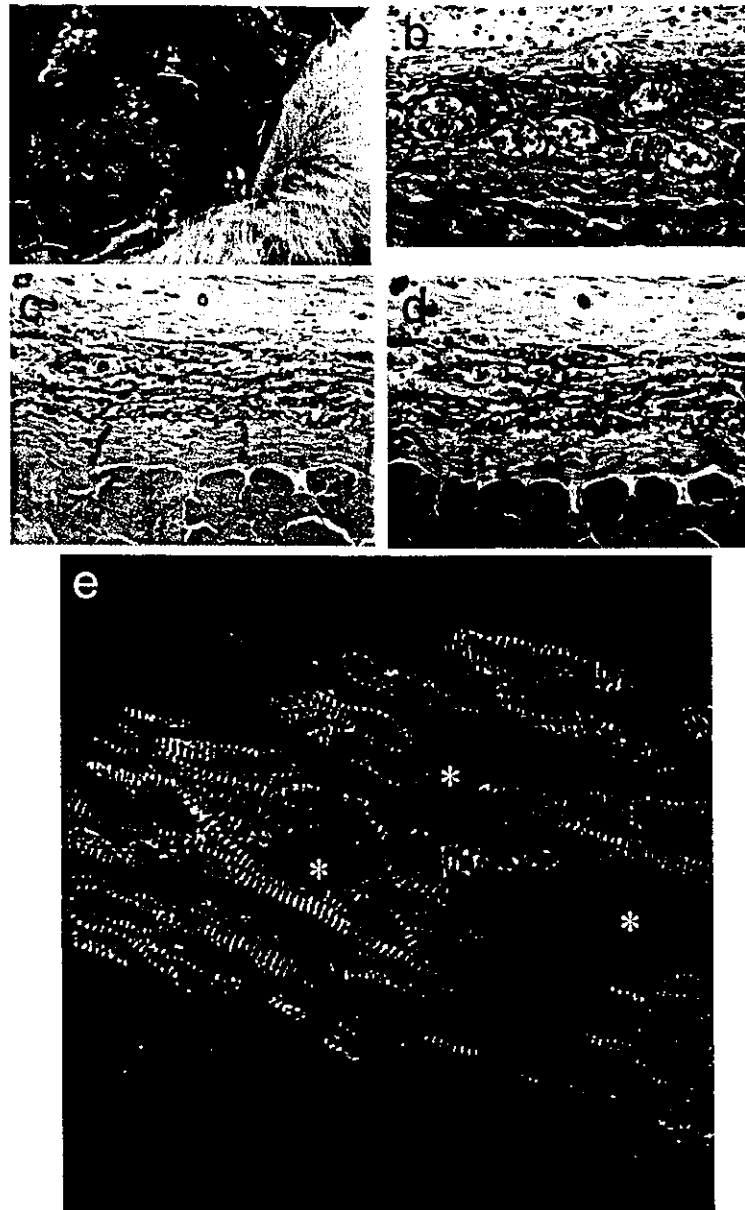


図4 心筋細胞シートの皮下移植

aは皮下に移植したシートの外観を示し、b~eはその組織像を示した。b,cはHE染色、dはAzan染色、eは免疫蛍光染色を示す。緑はアクチニン、赤はconnexin43、青はTOTO-3で核を示す。
(文献⁴⁾より引用)

に対し間葉系幹細胞であるCMG細胞を移植した群では、梗塞巣にGFP陽性アクチニン染色陽性の心筋細胞が確認された。これらの解析の結果の示すところは、心筋梗塞などの心筋組織の壊死を伴うような障害の際には骨髄より間葉系幹細胞が動員されること、そしてこの間葉系幹細胞

は梗塞巣において心筋細胞に分化し得るものであるということである。われわれは、骨髄から幹細胞が動員される際にサイトカインであるG-CSFを投与しているが、非投与群とG-CSF投与群の間で再生心筋細胞の数は大きく異なることより、G-CSFは従来知られているように造血幹細胞

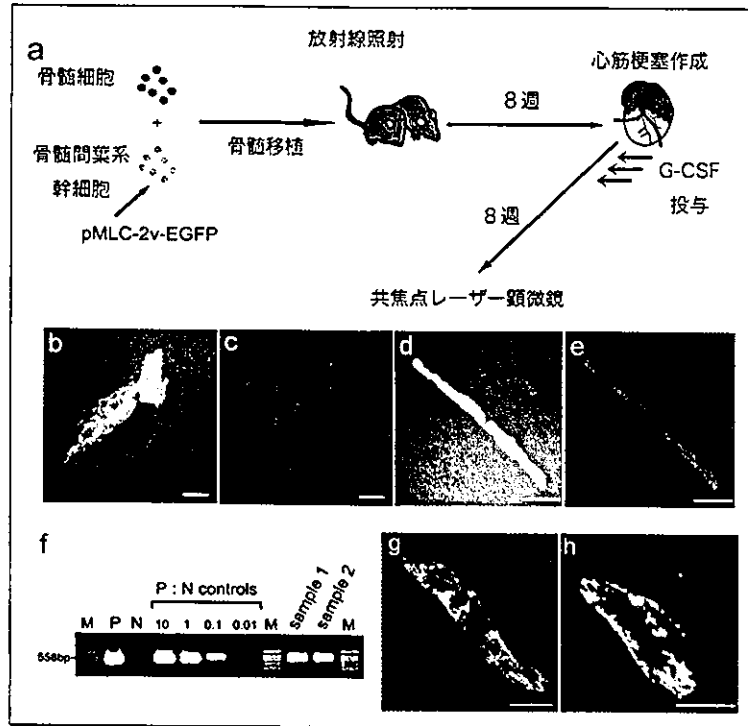


図5 骨髄間葉系幹細胞の生体内における心筋分化
 骨髄間葉系幹細胞に図2で紹介したプラスミドを遺伝子導入し、致死量の放射線を照射したマウスの脛骨内に骨髄内骨髄移植を行った。骨髄が再構築した3か月後にマウスに心筋梗塞を作成し、梗塞巣を観察した。梗塞部にはGFP陽性の心筋細胞が観察された。これより、心筋細胞を再生するのは間葉系幹細胞であることが証明された。(文献⁹⁾より引用)

胞を流血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞も動員できるものであることが明らかとなった(図5)。

G-CSFはすでに一部の臨床でも使用されているが、その評価はいまだ定まっていない。ヒトでもマウスと同様に間葉系幹細胞を動員し、梗塞巣の再生に有用であるか否かは明らかとなっていない。われわれは、心筋梗塞症例にむやみにこうしたサイトカインを使用するのではなく、その分子メカニズムを同時に明らかにするような研究も平行して進めなければならないと考えている。

おわりに

心不全の心筋再生療法というものは言葉としては美しい。しかし、その根底には大地に根を張ったしっかりとした基礎研究が裏打ちしたも

のでなくてはならないし、その効果の評価も主観的なものであってはならない。幹細胞研究は日進月歩で進んでおり、胚性幹細胞、間葉系幹細胞のいずれかあるいは両者から心筋細胞を大量に生産できる日もそう遠い先ではないであろう。また、サイトカインを用いた治療はより近い将来臨床で行われるものと推測される。かかる現状をみた時、より深い理解が必要な時代になってきたと痛感する毎日である。

文 献

- 1) 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.
- 2) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic re-

G-CSFによる 骨髄筋前駆細胞の動員

Mobilization of the Cardiomyocyte Precursor Cells
From Bone Marrow by G-CSF

福田 恵一

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

Key Words

G-CSF, cardiomyocyte,
mesenchymal stem cell,
bone marrow,
hematopoietic stem cell

■ Abstract ■

我々はこれまで骨髄中の間葉系幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化できることを報告してきた。骨髄細胞の多分化能に関して最近さまざまな議論が為されてきた。造血幹細胞の多分化能には否定的な見解が示され、細胞融合が問題をさらに複雑にしている。我々は*in vitro*において骨髄の心筋分化能のある細胞を同定するため、GFPで標識した細胞を用いて3種の骨髄移植（全骨髄細胞、単一造血幹細胞、間葉系幹細胞移植）を行った。その結果、間葉系幹細胞が*in vivo*においても心筋分化能を有することを明らかにした。その過程の中で、サイトカインであるG-CSFがこれまで知られているように骨髄より顆粒球や造血幹細胞を末梢血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞の動員にも深く関わっていることが明らかとなった。心筋梗塞や創傷など治療などG-CSFの新たな臨床への応用が視野に入ってきたといえるであろう。

■ はじめに

よく知られているように骨髄には造血幹細胞を頂点とした血液系の細胞が多数存在する。その比率は99%以上であるが、血液細胞以外にも造血を助ける働きを持つ間質細胞（ストローマ）と呼ばれる細胞があり、造血の微小環境を保っている。1990年代初頭より、この間質細胞の一部の細胞に骨や軟骨、脂肪細胞に分化するものが存在することが知られ、間質細胞とは分けて間葉系幹細胞と呼ばれるようになった。

Keiichi Fukuda
Cardiopulmonary Division, Department of Internal
Medicine, Keio University School of Medicine

2 (38)

■ 1. 骨髄において心筋に分化可能な幹細胞

我々は1990年代中頃よりこの間葉系幹細胞が多様な分化能を有することに着目し、心筋細胞に分化するのではないかと考え、研究を行った。その結果、分化誘導剤を用いることによって自律拍動能を有する心筋細胞が分化誘導できることを明らかにした。同時期に浅原らが血管内皮前駆細胞も骨髄から得られることを証明し、骨髄細胞を用いた再生医学が注目され、大きな研究の流れができた。その後の研究で血管内皮細胞が心筋細胞に分化したとする報告や造血幹細胞がいろいろな細胞に分化できるとの報告、細胞融合の報告などがなされ、混沌とした状況が続いたが、*in vitro*で心筋細胞との共培養によることなく完全に心筋に分化可能であることが証明されているのは間葉系幹細胞だけであろう。

■ 2. G-CSFによる末梢血幹細胞移植の発展

白血病などの血液疾患に対し、従来は骨髄移植が中心に行われてきた。しかし、近年はサイトカインであるG-CSF（顆粒球コロニー形成因子）を用いた末梢血幹細胞移植が行われるようになった。末梢血幹細胞移植は全身麻酔で骨髄を穿刺する必要が無く、侵襲度が低い。このためG-CSFは本来、抗癌剤などの影響で白血球が減少している症例に使用されるサイトカインであるが、同時に骨髄から造血幹細胞を末梢血中に強力に誘導することが

報告され、末梢血幹細胞移植に用いられるようになった。

■ 3. G-CSFによる骨髄細胞の動員

我々は生体内で造血幹細胞と同様に間葉系幹細胞がendosteal nicheと呼ばれる部位に存在することよりG-CSFが間葉系幹細胞を末梢血中に誘導するのではないかと考えた。また、最近様々に報告されている骨髄内の細胞の内、我々が報告したように間葉系幹細胞が心筋分化能を有するのか、それとも造血幹細胞も心筋分化能を有するかという問題に決着を付けるため、マウスを用いて3種類の骨髄移植の実験を行った。骨髄ドナーマウスにはGFPトランスジェニックマウスを使用した。図に示すように致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに(1)全骨髄細胞(造血幹細胞+間葉系幹細胞)を移植した群、(2)KSL-SP法という特殊な方法を用いて、GFPマウスから造血幹細胞のみを1個のみ単離し、当座の造血を助ける非標識の少量の骨髄細胞(放射線保護細胞)と混合して

移植したもの(単一造血幹細胞移植)、(3)我々が骨髄より単離した間葉系幹細胞(CMG細胞)を心筋細胞に分化するとGFPを発現するように遺伝子導入した細胞(CMG-ME細胞)と非標識の少量の骨髄細胞(放射線保護細胞)を脛骨内に骨髄内骨髄移植したもの(間葉系幹細胞移植群)、の3群に分けて骨髄移植を行った。造血能の回復を待ち心筋梗塞を作成し、直後にG-CSFを10日間投与し、2ヶ月後に梗塞巣を観察した。(1)全骨髄細胞移植群ではGCFを使用しない場合には梗塞巣にGFP陽性細胞(白血球あるいは線維芽細胞)は散在するものの、GFP陽性の心筋細胞はごく稀に観察される程度であった。これに対し、GCFを使用した場合には梗塞部および境界部領域に多くのGFP陽性が存在し、またGFP陽性の心筋細胞も多数観察された。(2)単一造血幹細胞移植ではGFP陽性細胞は梗塞巣内に認められるものの、GFP陽性心筋細胞はほとんど観察されなかった。GFP陽性の心筋細胞は全実験を通じて3個だけしか観察されず、最近報告されている細胞融合の頻度と同程度であ

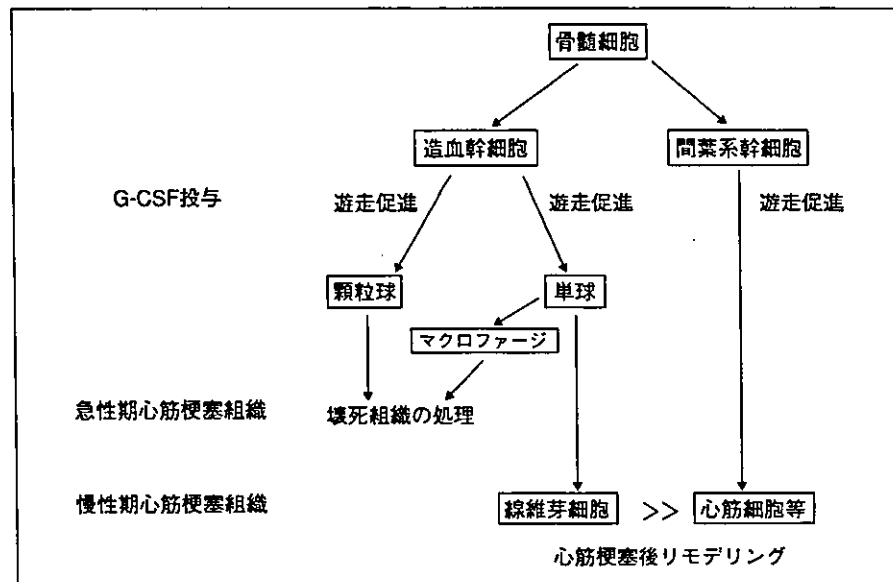


図 GFPを発現する骨髄細胞の移植実験から、骨髄中の造血幹細胞由来の細胞は心筋梗塞巣中の線維芽細胞になり、間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することが示された。また、G-CSFは造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞を流血中に動員することが明らかとなった。

心筋の再生

下地顕一郎*, 福田恵一*

SHIMOJI Kenichiro, FUKUDA Keiichi

* 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

KEY WORDS

骨髄間葉系幹細胞, 胚性幹細胞, 再生医学, 心筋細胞, 心不全

POINTS

- 重症難治性心不全に対する根治療法として再生医療が期待される。
- 利用できる細胞の候補として、胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞、心筋内組織幹細胞があげられる。
- 工学的手法の発達により個々の細胞を組織として移植する技術も発達してきた。
- 神経再支配、催不整脈性などの問題は残されている。
- 倫理上の議論が十分になされて初めて臨床応用が可能になる。

はじめに

心臓疾患への治療に関しては、近年、カテーテル治療や植え込み型除細動機の開発、アンジオテンシンIIレセプター遮断薬の一般臨床への普及、マルチスライスCTによる画像診断の進歩など、そのめざましい発展を遂げてきた。しかし難治性重症心不全に関しては、これらの領域ほどの進歩は残念ながらみられなかった。

難治性重症心不全の根治的治療としてはこれまで心臓移植が唯一とされてきた。しかしドナーの不足の問題から、その恩恵にあずかる例はごく一部にかぎられる。これに対し、細胞生物学、遺伝子工学の発達は新たな展開をもたらそうとしている。つまり、再生医学、すなわち未分化な幹細胞を心筋細胞に分化誘導してこれを移植するという試みが現実味を帯びてきた。本稿ではとくに心筋細胞に分化可能な多能性幹細胞に焦点をあて、心筋再生の現状を解説する。

心筋細胞に分化する多能性幹細胞

近年の精力的な研究により、心筋細胞に分化すること

が明らかにされている幹細胞のうち、将来的に臨床応用が可能と思われるものとして胚性幹細胞 (ES 細胞)、骨髄間葉系幹細胞、心筋内組織幹細胞があげられる。それぞれに利点・欠点を有しており、現時点ではどの細胞が有望であるかについて結論は出ていない。以下にそれぞれの細胞の特徴について概説する。

ES 細胞の利用

ES 細胞は、受精卵が胚盤胞に分化した段階の内部細胞塊から得られた細胞である。内部細胞塊は将来胎児になる部分であり、ここから得た ES 細胞は *in vivo* ではすべての組織の細胞に分化しうる。この意味で万能幹細胞ともよばれるが、*in vitro* で実際に分化が誘導できるのは胎生早期の段階で分化する細胞である。心筋細胞は胎児期の早期に分化する細胞であり、ES 細胞からは比較的得られやすい。マウスの場合には培養液中に白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を入れておくことによって未分化状態が維持されることが知られている。多くの細胞株ではフィーダーレイヤーとしてマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts :

61(313)