

Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes

K Fukuda

Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

Summary:

Bone marrow cells have been suggested to have multilineage plasticity including formation of cardiac tissue. 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. *Bone Marrow Transplantation* (2003) 32, S25–S27. doi:10.1038/sj.bmt.1703940

Keywords: bone marrow; mesenchymal stem cell; cardiomyocytes; regenerative medicine

Loss of cardiomyocytes leads to regional contractile dysfunction, and necrotized cardiomyocytes in infarcted ventricular tissues are progressively replaced by fibroblasts to form scar tissues. Recent studies revealed that transplanted fetal cardiomyocytes could survive in this heart scar tissue, and that these transplanted cells limited scar expansion and prevented postinfarction heart failure.¹ The transplantation of cultured cardiomyocytes into the damaged myocardium has been proposed as a future method for the treatment of heart failure. Although this is a revolutionary idea, it remains unfeasible in the clinical setting, since it is difficult to obtain donor fetal heart. A cardiomyogenic cell line could potentially substitute for fetal cardiomyocytes in this therapy. Therefore, both developmental biologists and the cardiologists eagerly await the development of a cardiomyogenic cell line.

Recent reports have revealed that bone marrow stromal cells have many characteristics of mesenchymal stem cells. Pluripotential progenitor marrow stromal cells may differentiate into various types of cell types including bone, muscle, fat, tendon or cartilage.² Based on these findings, we hypothesized that marrow stromal cells might also differentiate into cardiomyocytes, and repeatedly screened marrow stromal cells that began spontaneous beating after exposing them to 5-azacytidine, a cytosine analog capable

of altering expression of certain genes that may regulate differentiation. We finally isolated a cell line that differentiates into cardiomyocytes *in vitro*, named CMG (cardiomyogenic), from adult marrow stromal cells.³ The use of adult tissues as a source of cardiomyocytes makes this system particularly appropriate for the development of cardiomyocyte transplantation.

CMG cells form myotubes and show spontaneous contraction

We repeated limiting dilutions several times, and isolated hundreds of clones, and observed several clones that could differentiate into the cardiomyocytes and show spontaneous beating. These experiments were repeated and reproducible, but the percentage of cardiomyocyte differentiation was distinct among these clones. Phase contrast photography revealed that CMG cells showed a fibroblast-like morphology before 5-azacytidine treatment (0 week), and this phenotype was retained through repeated subcultures under nonstimulating conditions. After 5-azacytidine treatment, the morphology of the cells gradually changed. Approximately 30% of the CMG cells gradually increased in size, formed a ball-like appearance, or lengthened in one direction, and formed a stick-like morphology at 1 week. They connected with adjoining cells after 2 weeks, and formed myotube-like structures at 3 weeks. The differentiated CMG myotubes maintained cardiomyocyte phenotype and beat vigorously for at least 8 weeks after final 5-azacytidine treatment, and did not de-differentiate. Most of the other nonmyocytes showed adipocyte appearance.

CMG cells have a cardiomyocyte-like ultrastructure (Figure 1)

Transmission electron microscopy photographs revealed that the differentiated CMG myotubes had the typical striation and pale-staining pattern of the sarcomeres. Nuclei were positioned in the center of the cell, not beneath the sarcolemma. The most conspicuous feature of the differentiated CMG myotubes was the presence of membrane-bound dense secretory granules measuring 70–130 nm in diameter. These granules were thought to be atrial granules, and were especially concentrated in the juxtannuclear cytoplasm, but some were also located near

Correspondence: K Fukuda, Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 1608582, Japan

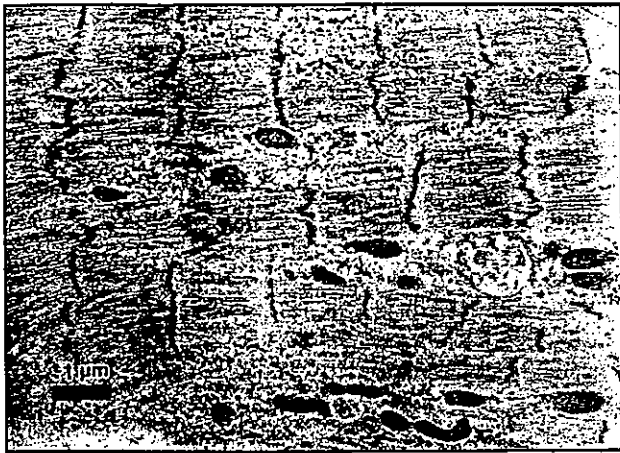


Figure 1 CMG cells electron microscopy after 5-azacytidine treatment of cultured marrow cells.

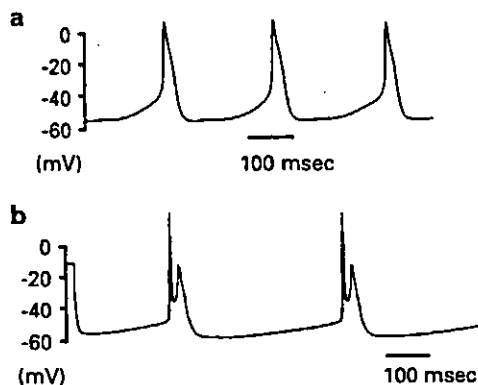


Figure 2 Representative tracing of the action potential of CMG cells. Action potential recordings were obtained from the spontaneous-beating cells at day 28 after 5-azacytidine treatment using a conventional microelectrode. We categorized these action potentials into two groups; a sinus-node-like action potential (a) or a ventricular cardiomyocyte-like action potential (b).

the sarcolemma. These findings indicated that CMG cells had a cardiomyocyte-like ultrastructure.

CMG cells have several types of action potential

An electrophysiological study was performed on differentiated CMG cells at 2–5 weeks after 5-azacytidine treatment. There were at least two types of distinguishable morphological action potentials; sinus node-like potentials (Figure 2a), and ventricular myocyte-like potentials (Figure 2b). The sinus node-like action potential showed a relative shallow resting membrane potential with late diastolic slow depolarization, like a pacemaker potential. Peak and dome-like morphology were observed in ventricular myocyte-like cells. A cardiomyocyte-like action potential recorded from these spontaneous beating cells had the following properties: (1) a relatively long action potential duration or plateau, (2) a relatively shallow resting membrane potential, and (3) a pacemaker-like late diastolic slow depolarization.

All the action potentials recorded from the CMG cells until 3 weeks revealed sinus node-like action potential. The

ventricular myocyte-like action potentials could be recorded after 4 weeks, and the percentage of these action potentials gradually increased thereafter. It is possible that the percentage of the ventricular myocyte-like action potentials at 5 weeks was underestimated. Most of the action potentials recorded from differentiated CMG cells revealed ventricular myocyte-like appearance, but the action potential of the differentiated CMG cells was difficult to record. The glass microelectrode was frequently damaged, because the spontaneous contraction of the differentiated cells at 5 weeks was too big.

Cardiomyocyte-specific gene expression

Differentiated CMG cells expressed both atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) genes. Table 1 shows the summary of the expression of cardiac contractile proteins such as the α - and β -MHC (myosin heavy chain), α -cardiac and α -skeletal actin genes. Both α - and β -MHC expression could be detected by RT-PCR in differentiated CMG cells, but β -MHC expression was overwhelmingly stronger than that of α -MHC. CMG cells expressed both α -cardiac and α -skeletal actin. Northern blot analysis revealed that the α -skeletal actin gene was expressed at markedly higher levels than the α -cardiac actin gene in CMG cells. Interestingly, CMG cells expressed (myosin light chain-2v) (MLC-2v), but not -2a.

Cardiomyocytes expressed GATA4 (a GATA-motif-binding Zinc-finger-type transcription factor expressed in the early stage of the developing heart), TEF-1 (transcription enhancement factor), and Nkx2.5 (a homeobox-type transcription factor specifically expressed beginning in the early developing heart), while skeletal muscle cells only expressed TEF-1. Differentiated CMG cells expressed GATA4, TEF-1 and Nkx2.5 (Figure 3a). Interestingly, CMG cells already expressed these genes before 5-azacytidine treatment. Figure 3b shows the time course of muscle enhancement factor 2-A (MEF2-A), MEF2-C and MEF2-D gene expression. MEF-2C was already expressed before 5-azacytidine treatment, but MEF-2A and MEF-2D were induced after 5-azacytidine treatment.

Discussion

These cells expressed a number of cardiomyocyte-specific genes including ANP, BNP, GATA4 and Nkx2.5. In ventricular muscle of small mammals, there is a developmental switch from expression of β -MHC, which is the predominant fetal form, to that of α -MHC around the time of birth. There is also a developmental switch from expression of α -skeletal actin, which is the predominant fetal and neonatal form, to that of α -cardiac actin, the predominant adult form. Differentiated CMG cells mainly expressed β -MHC and α -skeletal actin. Expression of α -MHC and α -cardiac actin was detected, but at low levels. MLC-2 genes are specifically expressed in the chamber. MLC-2v is specifically expressed in ventricular cells, while MLC-2a was specifically expressed in atrial cells. Differentiated CMG cells expressed MLC-2v, but not -2a. These

Table 1 Expression of the isoforms of the cardiac contractile proteins in CMG cell

	Atrium		Ventricle			CMG
	Fetal	Adult	Fetal	Neonatal	Adult	
α -actin	Skeletal	Cardiac	Skeletal > Cardiac	Skeletal	Cardiac	Skeletal > Cardiac
MHC	$\alpha > \beta$	α	$\beta > \alpha$	$\alpha > \beta$	α	$\beta > \alpha$
MLC	2a	2a	2v	2v	2v	2v

MHC, myosin heavy chain; MLC, myosin light chain.

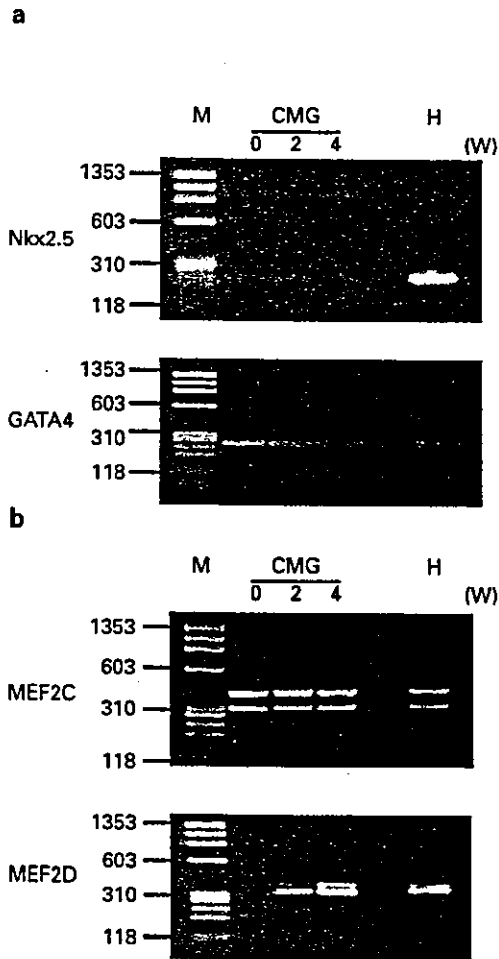


Figure 3 RT-PCR analysis of cardiomyocyte-specific transcription factors. (a) Time course of the expression of Nkx2.5 (a homeobox-type transcription factor specifically expressed beginning in the early developing heart) and GATA4 (a GATA-motif-binding Zinc-finger-type transcription factor expressed in the early stage of the developing heart). (b) Time course of the expression of muscle enhancement factor 2-C (MEF2-C) and muscle enhancement factor 2-D (MEF2-D) genes. Since the primers were designed to demonstrate the alternative splicing forms MEF-2 genes, several bands can be observed.

results indicated that differentiated CMG cells had a phenotype specific to fetal ventricular cardiomyocytes.

Differentiated CMG cells expressed Nkx2.5, GATA4, TEF-1 and MEF-2C before final 5-azacytidine treatment. The MEF-2A and MEF-2D genes were expressed after final 5-azacytidine treatment. This pattern of gene expression in CMG cells was similar to that of *in vivo* developing cardiomyocytes. These results indicated that the stage of differentiation of the CMG cell is between cardiomyocyte-progenitor and differentiated cardiomyocytes.

CMG cells have either sinus-node-like or ventricular myocyte-like action potential. Although action potentials can be seen in nonmyocyte cells such as skeletal muscle cells or nerve cells, the action potential in CMG cells is characterized by duration. The duration of action potentials in skeletal muscle cells or nerve cells are less than 5ms. The most diastolic potential, action potential amplitude, and the overshoot potential of the sinus-nodal-like CMG cells were close to the equivalent values reported *in vivo* rabbit sinus nodal cells. In rabbit ventricular cells, the most diastolic potential and action potential amplitudes were reported to be -90 to -95 mV and 120 mV, respectively. Although the most diastolic potential and action potential amplitudes of the ventricular cardiomyocyte-like CMG cells were slightly shorter than these values, the shape of the action potential was very close to *in vivo* ventricular cardiomyocyte. The observation of several distinctive patterns of action potential in CMG cells may reflect different developmental stages from marrow cells to cardiac cells.

References

- Leor J, Patterson M, Quinones MJ *et al.* Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996; 94 (Suppl II): 332-336.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
- 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.

骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞における交感神経・ 副交感神経受容体の発現と機能解析

慶應義塾大学 心臓病先進治療学 福田 恵一
同 呼吸循環器内科 伯野 大彦

はじめに

近年の再生医学の発達は次第に臨床医学に普及しつつあり、いくつかの領域ではすでに臨床応用されようとしている。心臓領域でもわれわれが骨髄中の幹細胞を用いることにより、心筋細胞が分化誘導できると報告して以来、さまざまな取り組みがなされてきた。再生心筋細胞を臨床応用してゆくにはさまざまなステップがあるが、まずなさねばならないことの1つに再生心筋細胞の性質の詳細な説明があげられよう。心筋細胞において心拍数、伝導速度、収縮力、肥大作用などの調節にはさまざまな神経体液性因子が密接に関係していることが知られている。なかでも交感神経および副交感神経は7回膜貫通型G蛋白共役型受容体である α_1 , β_1 , β_2 カテコラミン受容体, アセチルコリン受容体は心筋細胞の機能調節に重要な役割を担っている。 α_1 受容体には α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} の3つのサブタイプが存在するが、これらはいずれも心臓における発現が報告されている¹⁾。phenylephrineに代表される α_1 刺激薬は*in vitro*および*in vivo*で心肥大を強力に惹起する²⁾。 β 受容体には β_1 , β_2 , β_3 の3つのサブタイプが知られているが、心筋では主に β_1 受容体が陽性変力変時作用を規定している³⁾。一方、アセチルコリン受容体に関しては既知の M_1 から M_5 の5つのサブタイ

プが存在するが、心臓には主として M_2 が心筋に発現しており、陰性変力変時作用を担っている。

これに対し、骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるカテコラミンおよびアセチルコリン受容体の発現の有無はこれまで明らかではなく、今後再生心筋細胞を心筋細胞移植の有用なツールとするためにはこれらの受容体の発現解析が重要と考えられる。再生心筋細胞の作製⁴⁾、その性質の特徴の一部は既に本誌に解説してある⁵⁾ので、本稿では再生細胞における α_1 , β_1 , β_2 , M_1 , M_2 受容体の発現の有無およびそれらのシグナル伝達機能の有無につき解説することとした。

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、 α_{1D} 受容体はわずかに発現し

[Key words] 成体幹細胞, 再生, 心筋細胞, 受容体, シグナル伝達

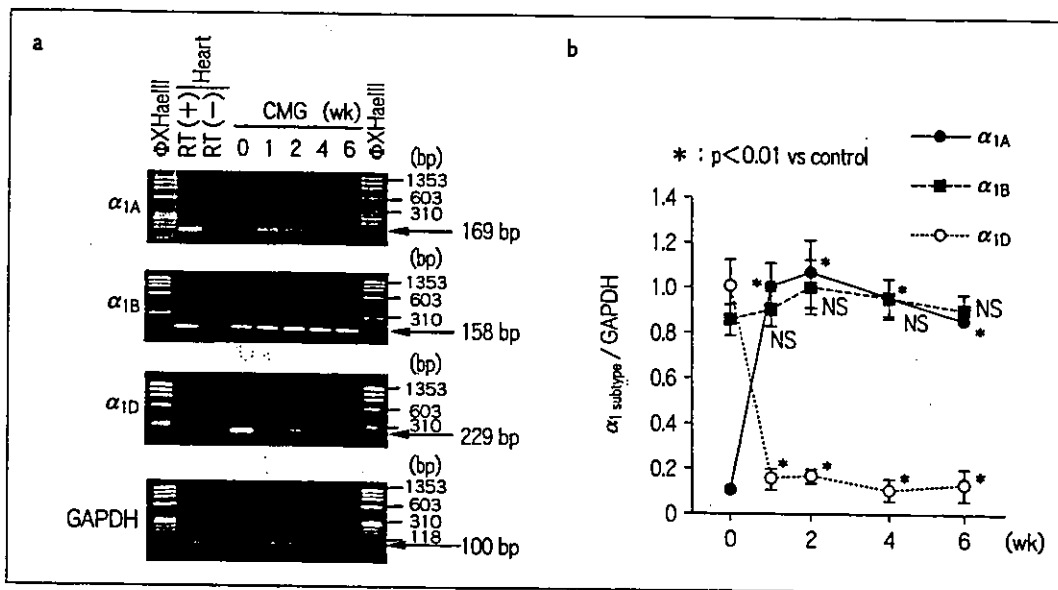


図1 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるアドレナリン α_1 受容体の発現の解析
 a: RT-PCRによる α_1 受容体サブタイプ (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) の発現. CMGは再生心筋細胞を示す. 数字は分化誘導からの時間 (週数) を示す.
 b: 受容体発現の定量的評価. 心筋分化が進むと α_{1A} 受容体の発現が上昇し, α_{1D} 受容体の発現が低下した.

ていることが知られている⁷⁾. 図1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ようになると, 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, 心筋細胞の発現様式と類似した発現様式に変化する⁸⁾.

再生心筋細胞を α_1 刺激薬である phenylephrine で刺激すると, 受容体下流のシグナルである 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 prazosin により抑制された⁹⁾ (図2).

さらに, 再生心筋細胞を無血清培養条件下で phenylephrine 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3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カテコラミン α_1 受容体が遺伝子レベルで発現してるだけでなく, 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.

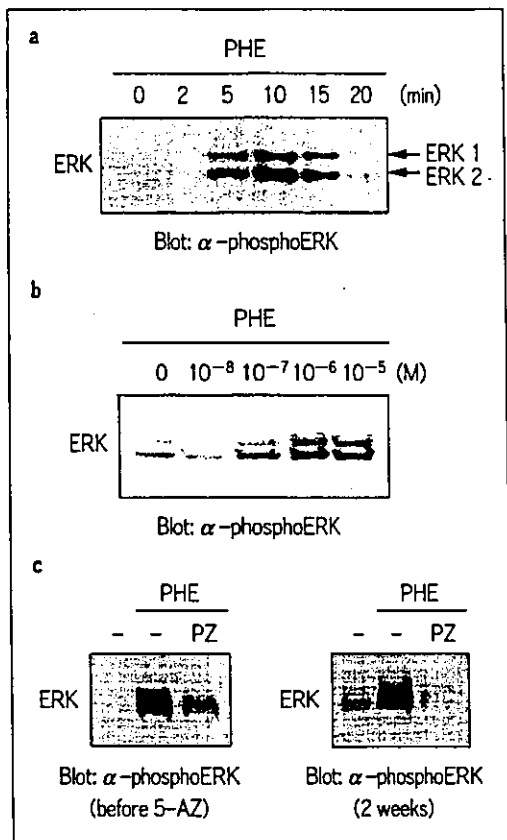


図2 再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬 phenylephrine で刺激した際のシグナルの活性化
MAPKファミリーのERKの活性化をリン酸化ERKの抗体で解析した。aは時間経過、bは濃度依存性をみたものである。cは α_1 受容体遮断薬 prazosin を前投与した際のERKの活性化をみたもので、prazosin 前投与により完全にリン酸化が抑制されている。PHEは phenylephrine を示す。

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種類が存在する。 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%の比率であるとされている^{9,10}。

再生心筋細胞では β_1 , β_2 受容体とも心筋細胞の

表現型を取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持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4)。

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を上昇させる。再生心筋細胞を β_1 , β_2 受容体両方の刺激薬である isoproterenol で刺激するとcAMPは用量依存的に上昇した。また、 β_1 , β_2 両受容体の遮断薬である propranolol を前投与しておくとのcAMPの上昇は完全に抑制された(図5)。

一般的に心筋細胞を β 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 isoproterenol 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 CGP 20712A, 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 isoproterenol で刺激した際には心収縮力の指標である短縮率(% shortening)、収縮速度も同様に isoproterenol 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 phenylephrine および isoproterenol 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6に示した。phenylephrine, isoproterenol 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持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

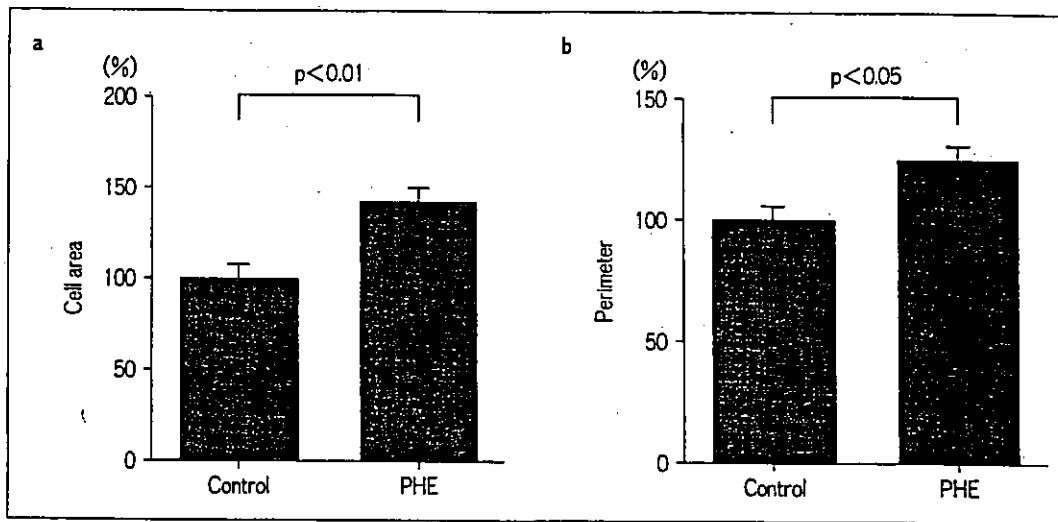


図3 再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬 phenylephrine で刺激した際の細胞表面積 (a) と周長 (b) の変化
無血清下で再生心筋細胞を phenylephrine で48時間刺激した際の変化を示す。PHE は phenylephrine を示す。

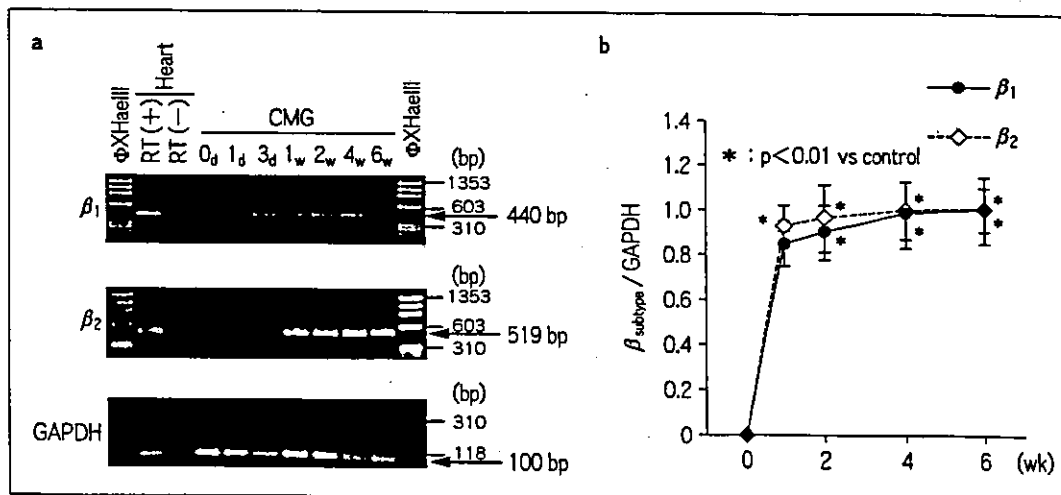


図4 骨髓細胞由来の再生心筋細胞におけるアドレナリン β_1 , β_2 受容体の発現の解析
a: RT-PCR による β_1 , β_2 受容体サブタイプの発現。
b: 受容体発現の定量的評価。心筋分化が進むと β_1 , β_2 両受容体の発現が上昇した。

なった。

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 受容体か

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¹¹⁾。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

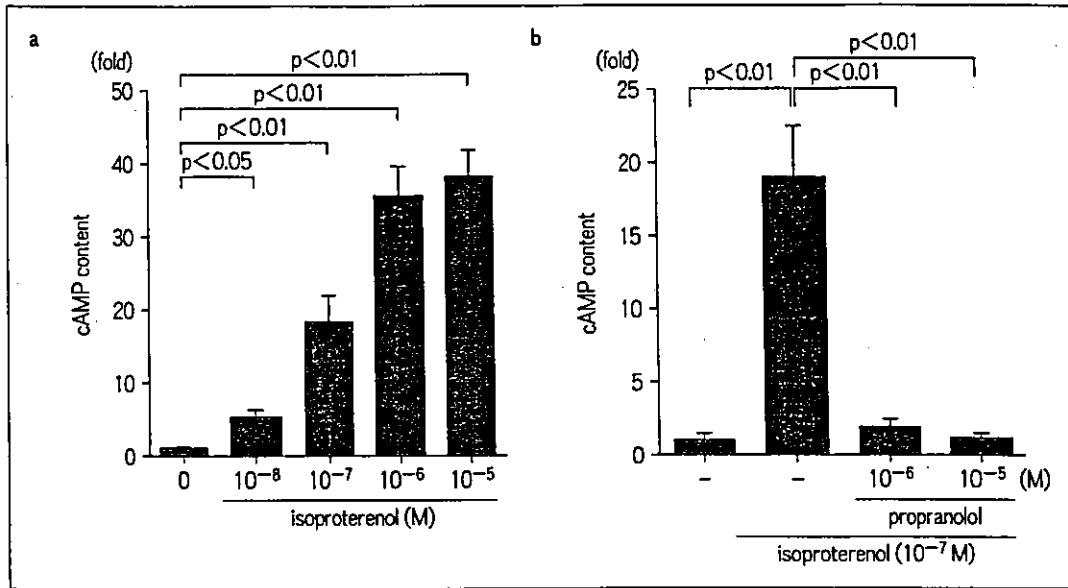


図5 再生心筋細胞をβ刺激薬 isoproterenol で刺激した際のセカンドメッセンジャー cAMP の変化
 a: 再生心筋細胞をさまざまな濃度の isoproterenol で刺激した際の cAMP 含量の変化。用量依存的に cAMP が上昇することが観察された。
 b: 非特異的β受容体遮断薬 propranolol を前投与した際の isoproterenol 刺激時の cAMP 濃度。propranolol 前投与によりほぼ完全に cAMP の上昇が抑制された。

表1 再生心筋細胞における isoproterenol 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	isoproterenol (10 ⁻⁷ mol/l)			
		生理食塩水	propranolol (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 (μm)	5.0±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 (μm/s)	71.1±5.2	100.9±11.0*	71.3±8.8‡	70.6±6.6‡	ND

*: p<0.05 vs control, †: p<0.01 vs vehicle (isoproterenol only), ‡: p<0.05 vs vehicle, ND: not determined

後, 心筋細胞の表現型を持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7)。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, この発現様式は容易に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ことが知られている。M₁, M₂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_{qα}, G_{iβγ} を介してホスホリパーゼ C_β を活性化し IP₃ 産生を惹起することが以前に報告されている¹²⁾。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ジャーの IP₃ が濃度依存性に上昇した。この IP₃ の上昇はムスカリン

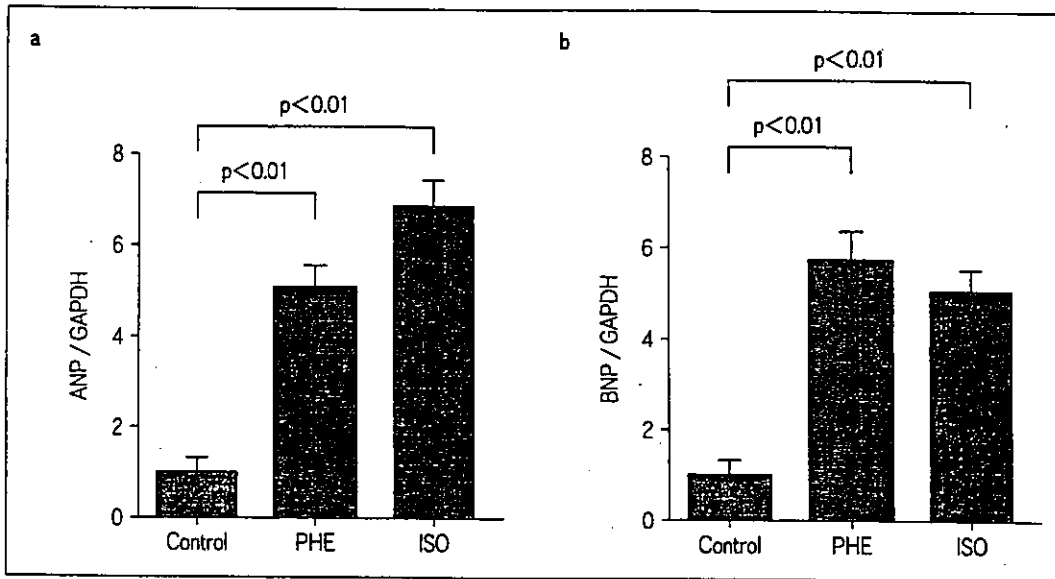


図6 再生心筋細胞を phenylephrine あるいは isoproterenol で刺激した際の肥大マーカー遺伝子 *ANP*, *BNP* の遺伝子発現の変化
再生心筋細胞を α_1 刺激あるいは β 刺激した場合、いずれの場合も *ANP*(a), *BNP*(b) の発現の上昇が観察された。

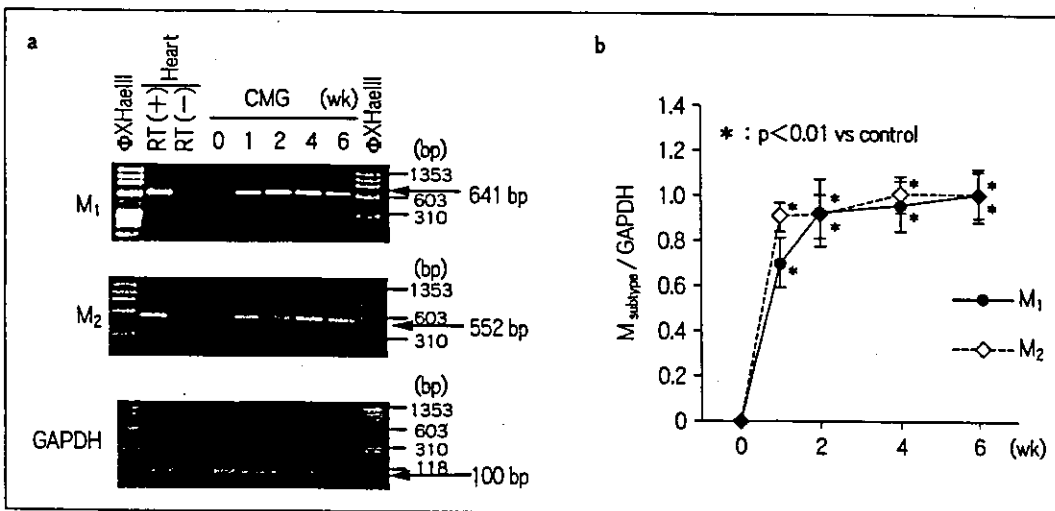


図7 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるムスカリン *M1*, *M2* 受容体の発現の解析

a: RT-PCR による *M1*, *M2* 受容体サブタイプの発現。

b: 受容体発現の定量的評価。心筋分化が進むと *M1*, *M2* 両受容体の発現が上昇した。

受容体共通の非特異的遮断薬 atropine, 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8)。

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持つこと、その中心は *M2* 受容体である

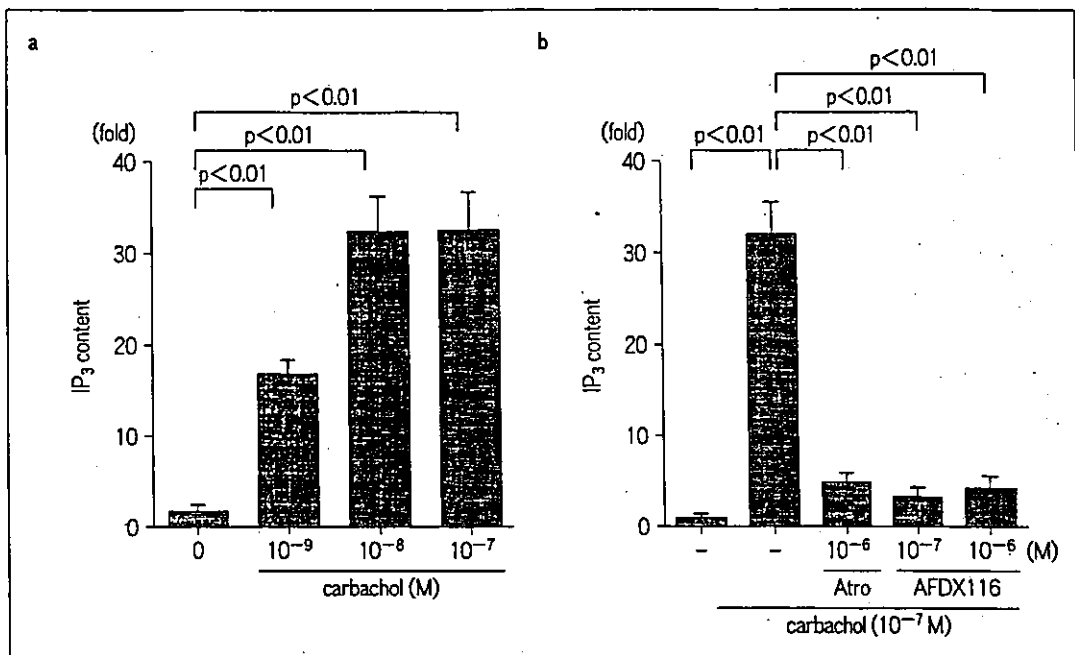


図8 再生心筋細胞をムスカリン刺激薬 carbachol で刺激した際のセカンドメッセンジャー IP₃ の変化
 a: 再生心筋細胞をさまざまな濃度の carbachol で刺激した際の IP₃ 含量の変化。用量依存的に IP₃ が上昇することが観察された。
 b: 非特異的ムスカリン受容体遮断薬 atropine, M₂ 選択的遮断薬 AFDX116 を前投与した際の carbachol 刺激時の IP₃ 濃度。atropine, AFDX116 前投与によりほぼ完全に IP₃ の上昇が抑制された。

ことを示している。

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、さまざま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さまざまな点で重要な意味を持つと考えられる。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caffolding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、レシビエントの心筋と電気生理学的にも血行動態的にも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、移植した再生心筋

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に関して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ビ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。

文 献

- 1) Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Casanova E et al: 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
- 2) Chien KR, Knowlton KU, Zhu H et al: Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 1991; 5: 3037-3046
- 3) Steinberg SF: The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 1999; 85: 1101-1111
- 4) Hosey MM: Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 1992; 6: 845-852
- 5) 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
- 6) 福田恵一, 牧野伸司, 梅澤明弘: 骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導とその形態学的, 電気生理学的, 分子生物学的解析. *循環器専門医* 1998; 6(2): 185-190
- 7) Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC et al: 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
- 8) Hakuno D, Fukuda K, Makino S et al: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; 105: 380-386
- 9) Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB et al: Beta 2-adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1995; 76: 40-52
- 10) Steinberg SF: The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 1999; 85: 1101-1111
- 11) Sharma VK, Colecraft HM, Wang DX et al: Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1996; 79: 86-93
- 12) Subers EM, Nathanson NM: Muscarinic acetylcholine receptor function in chick heart cells cultured in serum-free medium. *J Mol Cell Cardiol* 1988 Feb; 20(2): 131-140

心筋細胞の新生・再生療法と細胞移植療法

Regeneration of cardiomyocyte and cellular transplantation therapy

Keywords

心筋細胞
細胞移植
骨髄間質細胞
心不全 分化誘導

吉岡 正豊¹⁾ 福田 恵一²⁾

1) 慶應義塾大学医学部 呼吸・循環器内科
2) 慶應義塾大学医学部 心臓病先進治療学

Summary

心筋細胞は骨格筋細胞と異なり、生後ほとんど終末期において細胞分裂を行わない。そのため、虚血性心疾患など、心臓損傷を受けた心筋の終末期である心不全に対する唯一の治療法は心臓移植である。しかしながら、心臓移植の不足を免疫抑制療法の副作用などの問題点は克服されておらず、近年の研究により、心臓性幹細胞や骨髄細胞より心筋細胞が分化誘導されることが報告されてきた。同時にそれらの分化誘導された心筋細胞を心臓へ移植することによって心機能の改善をきたらすことも報告されている。心臓移植に取って代わる新しい治療法として、心筋再生療法が期待されている。

はじめに

心不全は心筋梗塞をはじめとして、心筋症、弁膜症、代謝性疾患などさまざまな疾患による最終形態であり、生活習慣の変化や高齢化に伴って、近年発症頻度は年々増加してきている。心不全に対するこれまでの治療は、心収縮力の増強、血管拡張薬による圧負荷・容量負荷の軽減、利尿薬による体液量の減少などの対症療法を中心に行われてきた。これに対し、心臓移植は根本的治療となり得るが、臓器提供者の圧倒的な数不足、移植後の拒絶反応や免疫抑制療法による感染症などの副作用、移植臓器の長期的不全化などにより、必ずしも満足のいく治療とは考えられない。そのため、心不全に対する新たな治療戦略の開発が必要とされている。

近年、Nkx-2.5, GATA-4, MEF2C といった、心臓の発生・分化に関する

重要な遺伝子が単離され、機能解析がなされてきた。

骨格筋細胞においてはマスター遺伝子である MyoD が発見されており、MyoD 遺伝子を導入することにより骨格筋細胞を分化誘導することができるが、心筋細胞においてはマスター遺伝子は発見されておらず、転写因子の遺伝子導入による心筋再生は行われていないのが現状である。

一方で、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) や骨髄細胞などさまざまな多能性を有する幹細胞より心筋細胞への分化誘導が成功しており、これら分化誘導させた心筋細胞を移植するという細胞移植療法が注目を集めている。

再生心筋細胞移植による心不全治療への試み

細胞移植による心不全治療は、心筋細胞を補充することにより心不全へと

つながるリモデリングの過程を改善し、また、血管新生も補充することができる」と期待されている。歴史的にES細胞、胎仔・新生仔心筋細胞、胎仔平滑筋細胞、腫瘍細胞(AT-1細胞)、自己心房筋、皮膚線維芽細胞など、さまざまな種類の細胞がその移植源として試されてきた。胎仔心筋細胞は心臓の線維化された組織に生着し、ホスト心筋細胞と介在板を介して電氣的に結合し、心臓のポンプ能を改善させることが報告された¹⁾。ここ10年に、骨格筋細胞²⁾⁻⁴⁾、ES細胞⁵⁾⁻⁷⁾、骨髄間葉系細胞⁸⁾⁻¹⁰⁾、純化血液幹細胞¹¹⁾⁻¹³⁾、血管内皮前駆細胞¹⁴⁾⁻²⁰⁾により傷害心筋の機能改善がなされたとの報告が相次いでおり、これらについて紹介することとする。

AT-1細胞を用いた細胞移植

Fieldらは、心房性ナトリウム利尿ホルモンのプロモーターにSV40のlargeT抗原を組み換えたトランスジェニックマウスの心房に生じた腫瘍を細胞株化したAT-1細胞を作製した。このAT-1細胞は自己拍動能を有し、心筋としての表現型を保持していた²¹⁾。これらの細胞をマウスの正常心筋もしくはブタの心筋梗塞後心筋に移植したところ、生着したとの報告がある²²⁾。しかし、AT-1細胞はもともと腫瘍細胞のため、人体への移植には適さないとの問題点があった。

胎仔心筋を用いた細胞移植

心筋細胞の場合、初代培養を行ってある程度の収率で生きた細胞が得られるのは、胎仔もしくは新生仔の心筋細胞に限られる。胎仔心筋細胞を心臓内に移植すると、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、さらに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た電氣的結合を取り得ることが報告された²³⁾。さらに、胎仔心筋細胞の移植は心臓の収縮能、拡張能を改善することが報告されたが、倫理的な問題の克服は困難であると思われる。

骨格筋を用いた細胞移植

失われた心筋を骨格筋もしくは骨格筋由来細胞株により代償する方法である。骨格筋由来細胞株として、マウス由来のC2C12細胞とラット由来のL6細胞があげられる。C2C12細胞は長期培養により収縮を行うことが知られており、C2C12細胞を心筋に直接注入、もしくは経冠動脈的に移植した際に生着し、横紋構造を取ることが報告された²⁴⁾。しかし、マウスの細胞であること、細胞株であることから人体への臨床応用は難しい。

骨格筋には衛星細胞と呼ばれる未分化な筋芽細胞が存在し、骨格筋の傷害により、衛星細胞が活性化されて骨格筋への分化・誘導が起こることが知られている。骨格筋衛星細胞自体は生体

骨格筋細胞の3~4%²⁵⁾と少ないものの、患者本人からの骨格筋衛星細胞を採取・培養し、増殖させることで、十分量の骨格筋を用意し、移植に用いることが可能であると考えられる。さらに、自己の細胞を用いることにより、免疫抑制療法を行う必要がなく、腫瘍化の危険も減らすことができるという利点もある。実際に自己骨格筋芽細胞が心筋へ生着したという報告がいくつかあり、さらに、ギャップジャンクションの形成および機能の回復を認めたとの報告もされている²⁶⁾。しかし、心筋と協調して収縮しないとの報告²⁷⁾もされていることや、傷害に対する正常心筋との反応性の違いや形態上の違いなど、まだまだ論議に決着がつかない部分も多い。また、骨格筋と心筋に存在するジヒドロピリジン(dihydropyridine : DHP)受容体が、心筋においては急速に活性化されるCa受容体であるのに対し、骨格筋においては緩徐に活性化されるCa受容体としての機能と電位感知器としての二通りの働き²⁸⁾が電氣的結合に因る障害となることが推察され、更なる改良が必要であることは間違いないと考えられる。

ES細胞を用いた細胞移植

ES細胞は受精後早期胚由来の細胞で、多分化能を有し、内・中・外胚葉のいずれにも分化することが可能である。浮遊培養により細胞を凝集させたembryoid body(胚様体)を形成させる

と、その一部が心筋細胞になることが知られている。ES細胞は、これまで心筋細胞の発生・分化の研究に用いられ、*in vitro*における細胞増殖因子による心筋誘導や遺伝子発現の解析に主として用いられてきた。しかし、これらの細胞は発生・分化の研究には有用であるが、*in vivo*に移植した際には未分化な細胞が少しでも残存していると奇形腫となり、腫瘍化することが知られている。収縮を認める胚様体中に心筋細胞が占める割合が5%と少量であることから、心筋細胞を高い純度で選別することがES細胞を用いた細胞移植には鍵となることがわかる。Klugらは、 α ミオシン重鎖(α MHC)プロモーターの下流にネオマイシン耐性遺伝子を導入したマウスES細胞において、G418(ネオマイシン耐性遺伝子を導入する細胞を選択する目的で用いられるアミノグルコシド系抗生物質)を用いて、心筋細胞へと分化した細胞を特異的に選択した。この純化したES細胞由来心筋細胞が宿主心筋細胞へ生着し、さらに介在板を形成することを示した⁹⁾。さらにはラット心筋梗塞モデルにおいて、心機能を改善することも示されている¹⁰⁾。これらの報告の欠点としては、移植源であるES細胞由来心筋細胞が均一の細胞集団でなく、心房筋、心室筋、骨格筋などさまざまな種類の細胞を含んでいるという点があげられる。その欠点を補うために、心室筋の表現型を示す細胞のみを移植源として用いるべく、ミオシン軽鎖2v(MLC-2v)プロモーターと

CMVのエンハンサーの下に蛍光蛋白である enhanced green fluorescent protein (EGFP) をレポーター遺伝子として用いる報告¹¹⁾もされている。その有用性に関してはいまだ不明であるが、均一な細胞集団を用いることで、より実用性が高いであろうと思われる。

最近、ヒトES細胞が樹立¹²⁾され、さらにマウスES細胞と同じく心筋細胞へと分化する¹³⁾ことが報告されている。移植への有用性が期待されるが、ヒトES細胞由来心筋細胞は早期の心筋細胞としての表現型を示し、マウスES細胞由来心筋細胞と性質を異にしていることから、今後更なる解析を待つ必要がある。また、胚細胞を使用するという倫理問題も今後克服される必要があるだろう。

骨髄細胞を用いた細胞移植

1. 骨髄細胞を用いた心筋細胞の再生

骨髄細胞は血液幹細胞とその支持細胞である間質細胞より構成される。骨髄間質細胞中には間葉系細胞の幹細胞が存在し、中胚葉由来のさまざまな細胞に分化することが知られている。間葉系幹細胞はこれまで骨芽細胞や軟骨芽細胞、脂肪細胞などに分化することが報告されていることから、我々は間葉系幹細胞が心筋にも分化するのではないかと考え、心筋への分化誘導を試み、ほぼ心筋細胞と考えられる細胞への分化誘導に成功した¹⁴⁾。これらの骨髄間質細胞由来の心筋細胞を car-

diomyogenic cell (CMG細胞)と名付け、その解析を行った。

我々はマウス骨髄細胞の初代培養を行い、付着系の細胞である骨髄間質細胞を分離した。そして、分離した骨髄間質細胞を長期培養することにより細胞株を樹立した。この細胞株にDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを負荷し、さらに2週間ほど培養を続けると、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る。この細胞周囲を採取し、同様の操作を反復した。このうち自己拍動を開始した細胞自体は継代できないが、心筋芽細胞と考えられる細胞は細胞分裂し、細胞増殖を繰り返すことができる。このうち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5-アザシチジンにより最終的に分化誘導を行うことによって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およそ30%であった。CMG細胞は最終分化誘導前には単核の線維芽細胞様の形態を呈し、心筋収縮蛋白質はほとんど発現していない(図1)。5-アザシチジンによる最終分化によって形態は著しく変化する。分化誘導1週目頃より一部の細胞の細胞質が大きくなり、円形あるいは棒状を呈し、後に自動拍動を開始する細胞となるが、この時点では自己拍動を行うことは少ない。分化誘導後2週になると、こうした細胞は互いに連結し合い、縦に連結し、筋管細胞様となる。3週以後には多くの細胞が縦に一列に並び、同期して収縮

する。分化誘導4週以後には培養皿の上の直接連結される細胞はすべて同期して収縮し、心筋組織様になる。マウスの細胞は毎分300~400回程度の心拍数で収縮する。これに対し、CMG細胞は毎分120~250回の速さで規則

的に収縮した。

2. CMG細胞の表現型

心筋細胞は心筋収縮の心拍数やエネルギー効率に違いをもたせるため、胎仔期、新生仔期および成獣期によって、

あるいは心房筋と心室筋との相違によって、心筋収縮蛋白質のアイソフォームに違いが存在する(表)。心筋細胞に分化したCMG細胞の場合、アイソフォームの発現様式は α -アクチンの場合Skeletal型>Cardiac型、ミオシン重鎖の場合 β 型> α 型であった。ミオシン軽鎖では2v型が発現しているのに対し、2a型の発現はみられなかった。また、CMG細胞では分化誘導後にはナトリウム利尿ペプチドであるANP、BNPの発現が観察された。心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、CMG細胞の心筋細胞としての表現型は胎仔型心室筋細胞の形質をもつと考えられた。心筋細胞に分化したCMG細胞では、心筋特異的転写因子として*Csx/Nkx-2.5*、*GATA-4*、*MEF2A*、*MEF2C*、*MEF2D*、*TEF-1*遺伝子の発現が認められた。これらの転写因子の発現時期に関しては、さらに興味深い知見が得られた。初代培養した骨髄間質細胞にはこれらの転写因子の発現は認められないが、CMG細胞では最終分化誘導前にすでに*Csx/Nkx-2.5*、*GATA-4*、*MEF2C*の発

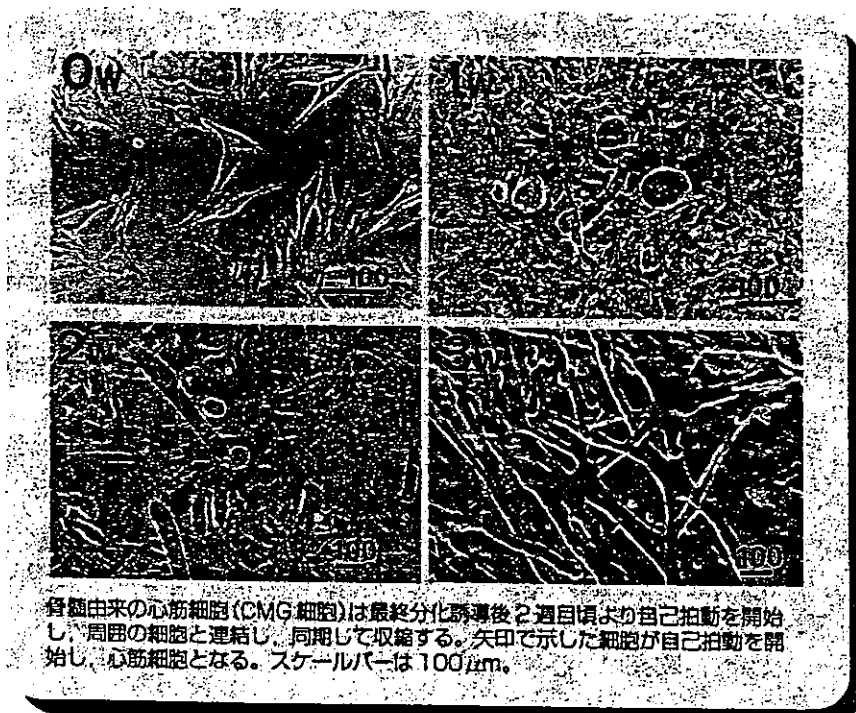


図1 最終分化誘導前、誘導後1~3週目のCMG細胞

表 心筋収縮蛋白質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	
α -アクチン	Skeletal	Cardiac	Skeletal>Cardiac	Skeletal	Skeletal>Cardiac
ミオシン重鎖	α 型> β 型	α 型	β 型> α 型	α 型> β 型	β 型> α 型
ミオシン軽鎖	2a	2a	2v	2v	2v

現が観察され、最終分化誘導後に遅れて *MEF2A*, *MEF2D* の発現が誘導された。 *in vivo* の発生過程におけるこれらの転写因子の発現時期に関しても、同様な順序で発現することが知られている。したがって、最終分化させる前の段階の CMG 細胞は未分化な中胚葉系の幹細胞から、より心筋芽細胞に分化した状態にあり、分化誘導後には胎仔型心室筋に分化するものと考えられた (図 2)。

3. CMG 細胞の活動電位

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 3)。両者に共通した活動電位の特徴は、①活動電位時間が長いこと、②比較的浅い(より脱分極側)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(活動電位第一相をもつ)を呈した。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。心室筋細胞型はこれに比し、静止膜電位は深く(より過分極側)、活動電位振幅は大きい傾向を示した。分化誘導後 2-3 週の細胞ではすべて洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後 4 週頃より心室筋細胞型が観察され、時間経過とともに次第に増加した。

4. 骨髄細胞を用いた細胞移植

我々の CMG 細胞の樹立以来、骨髄細胞を用いた心筋細胞の再生は注目を

集め、さまざまな種類の骨髄細胞より心筋細胞が再生され、生着が確認されている。骨髄を用いた細胞移植が確立

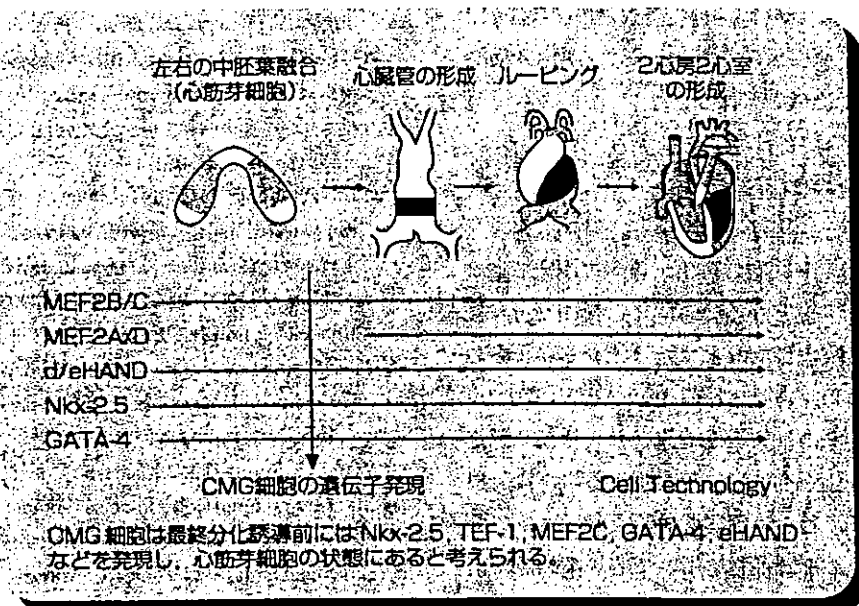
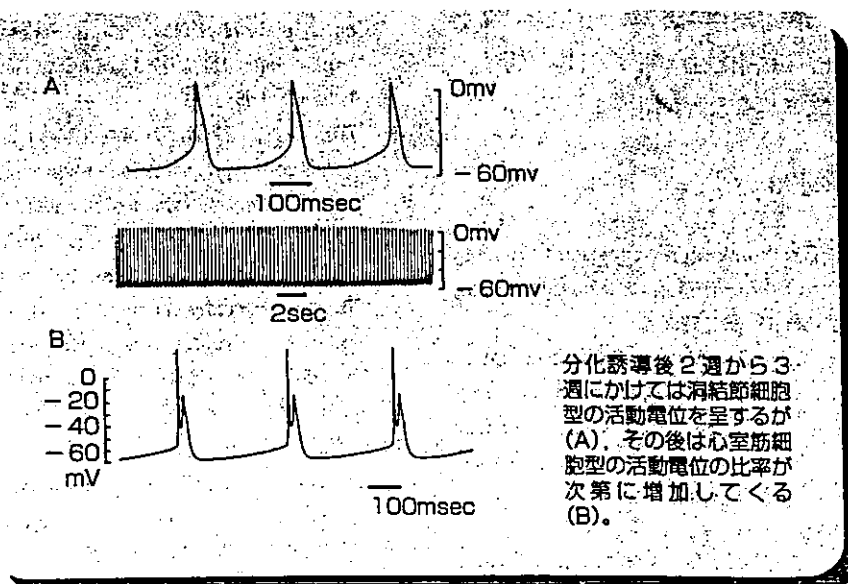


図 2 転写因子発現様式からみた CMG 細胞の発生学的位置



されれば、各種細胞株、胎仔心筋、ES細胞を用いた細胞移植の際に問題であった倫理面、拒絶反応などを克服でき、たいへん有用であると考えられる。しかし、その治療効果は報告によりさまざまであり、更なる今後の研究成果が待たれる。

おわりに

心筋細胞の再生・新生に関する研究は、鍵となる転写因子の解明や分子誘導法の確立などまだまだ新しい分野の研究であり、明らかになっていない点も多い。ヒトを対象とした移植を想定した場合には、臓器提供者の組織欠損を伴わない臓器は血液と骨髄だけであり、骨髄細胞を用いて心筋細胞が分化誘導され得るのであれば、移植に対する倫理的なハードルは心臓移植よりはるかに低いものとなる。難治性心不全の治療の現状を考えると、ヒトにおける心筋細胞再生・新生の技術が早急に確立されることが期待される。

●文 献

- 1) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al : Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 62 : 654-661, 1996
- 2) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al : Regenerating functional myocardium ; improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4 : 929-933, 1998
- 3) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, et al : Cell transplantation for myocardial repair ; an experimental approach. *Cell Transplant* 1 : 383-390, 1992
- 4) Kessler PD, Byrne BJ : Myoblast cell grafting into heart muscle ; cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 61 : 219-242, 1999
- 5) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98 : 216-224, 1996
- 6) 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
- 7) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Fkl1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92-96, 2000
- 8) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al : Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty ; feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120 : 999-1005, 2000
- 9) 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
- 10) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 : II247-II256, 1999
- 11) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al : Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105 : 93-98, 2002
- 12) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 938 : 221-229, 2001
- 13) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
- 14) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10344-10349, 2001
- 15) Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al : Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann NY Acad Sci* 938 : 208-218, 2001
- 16) 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
- 17) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al : Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7 : 430-436, 2001
- 18) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 19) Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al : Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92 : 362-367, 1998
- 20) 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
- 21) Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, et al : Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 264 : H1727-H1733, 1993
- 22) Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, et al : Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant* 7 : 239-246, 1998
- 23) Leor J, Patterson M, Quinones MJ, et al :

- Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat ; A potential method for repair of infarcted myocardium ? *Circulation* 94 : II332-II336, 1996
- 24) Campion DR : The muscle satellite cell ; a review. *Int Rev Cytol* 87 : 225-251, 1984
- 25) El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, et al : Myocyte transplantation for myocardial repair ; a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 71 : 1724-1733, 2001
- 26) Garcia J, Tanabe T, Beam KG : Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors. *J Gen Physiol* 103 : 125-147, 1994
- 27) Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, et al : Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*. *FASEB J* 14 : 2540-2548, 2000
- 28) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998
- 29) 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
- 30) 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

特集 体性幹細胞の臨床応用：進歩する再生医療

心筋形成と再生医療

Regenerative Medicine in Cardiology

真鍋知宏 福田恵一

Tomohiro Manabe, Keiichi Fukuda

最終分化を遂げた心筋細胞を再び細胞分裂させたり、壊死に陥った心筋を再生心筋で置換する試みがなされている。胚性幹細胞 (ES 細胞) や骨髄中の体性幹細胞が心筋再生のツールとして用いられているが、近年心臓内にも心臓幹細胞のような SP 細胞の存在が報告されている。またサイトカイン併用による効率的な幹細胞の動員も試みられている。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。

key words

心筋細胞, 分化誘導, ES 細胞, 体性幹細胞, 間葉系幹細胞, 細胞移植

① 真鍋知宏 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科 E-mail: tmanabe@cpnet.med.keio.ac.jp
2000年慶應義塾大学大学院医学研究科博士課程修了。同大学内科、清水市立病院循環器科医長を経て、2002年より現所属、助手。骨髄細胞からの心筋細胞再生と心肥大のシグナル伝達を研究。

福田恵一 慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学

はじめに

一昔前の“心筋細胞は再生しない”という概念は近年の再生医学の進歩により覆された。胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) や骨髄体性幹細胞 (組織幹細胞) を用いた心筋細胞の再生が可能となり、再生心筋細胞移植による心機能の改善も報告されている。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。これらは他の研究室で追試され、確認されたものばかりでない。しかし、実験動物段階ではあるが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。

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、および問題点、将来の展望を概説する。

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と考えられてきた。一方で頻度は低いものの、心筋梗塞層周囲のごく一部の心筋細胞が細胞分裂すると報告されており、既存の概念の再検証が必要となってきた^{1)~4)}。この分裂像様の形態を示す細胞の起源は明確になっていないが、生理学的に心機能の代償を期待するのは難しい。in vitro の実験ではあるが、細胞周期調節タンパク質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⁵⁾と最近報告され⁵⁾、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⁶⁾。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⁷⁾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できる遺伝子は現在のところ同定されていない。その過程において心臓特異的に発現される転写因子として、*Nkx2.5*, *GATA4*, *dHAND*, *eHAND*, *HRT* などがクローニングされてきた。現在も“心臓版 *myoD*”をクローニングする研究は継続されている。

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。この 2 種類を用いた心筋細胞再生の現状を紹介する。

II. ES 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、すべての臓器・組織に分化しうる多分

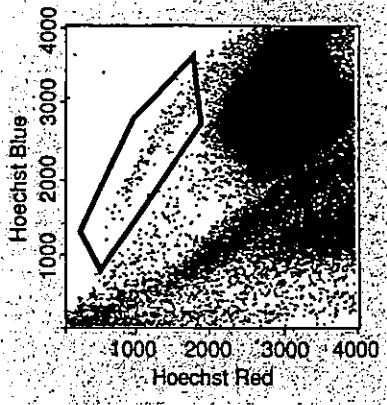


図1. SP細胞の解析

骨髓細胞をHoechst33342により染色し、FACSで解析した際のSP細胞。囲まれた領域がSP細胞の集団である。

化能を有している。*in vitro*で大量増殖が可能で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、マウスでは白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor; LIF)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、マウス胎仔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すでになされている⁹⁾。

ES細胞の問題点として、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を服用しなくてはならないことが挙げられる。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

体性幹細胞を用いた心筋再生も可能となってきた。骨髓は造血幹細胞を頂点とした造血の場であるが、血液系以外にも造血を助ける骨髓間質細胞が存在している。骨髓間質細胞の一部に、様々な細胞に分化能を有する幹細胞が存在することが明らかとなり、間葉系幹細胞と呼ばれるようになった⁹⁾。

間葉系幹細胞は骨髓中に存在する稀有な細胞で、ヒト新生児骨髓中の細胞の10000個に1個の割合で存在し、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程度になる。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、報告者により異なり、複数のものが存在するのか、その正体はいまだ明らかではない^{10), 11)}。

Ⅳ. 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^{12), 13)}。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、FACS (fluorescence-activated cell sorter) で解析するとほとんど蛍光を発しないまれ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SP (side population) 細胞と呼ばれる(図1)。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。

Ⅴ. 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(cardiomyogenesisより命名)は骨髓細胞を分化誘導させたものである^{14), 15)}。心筋細胞は胎仔期、新生仔期、成獣期および心房、心室で異なる収縮タンパク質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 α_1 , β_1 , β_2 受容体, アセチルコリン M_1 , M_2 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(α_1 受容体刺激薬)で刺激するとCMG細胞は肥大反応を示し、イソプロテノール(β 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¹⁶⁾。

Ⅵ. 再生心筋細胞移植による心不全治療への応用

細胞移植による心不全治療への取り組みは1990年代半ばから行われてきた。初期にはラット、ウサギの心臓に心筋梗塞などの傷害を作製し、その壊死瘢痕領域に平滑筋細胞、骨格筋細胞^{17), 18)}などの細胞を移植することによりリモデリングを防ぎ、心不全が改善されるかどうかなどの研究が行われてきた。平滑筋、骨格筋細胞の場合には心筋細胞と同