

(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>23)</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  $M_1$ ,  $M_2$  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 ( $\alpha_1$  受容体刺激薬) で刺激すると CMG 細胞は肥大反応を示し, イソプレテノール ( $\beta$  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

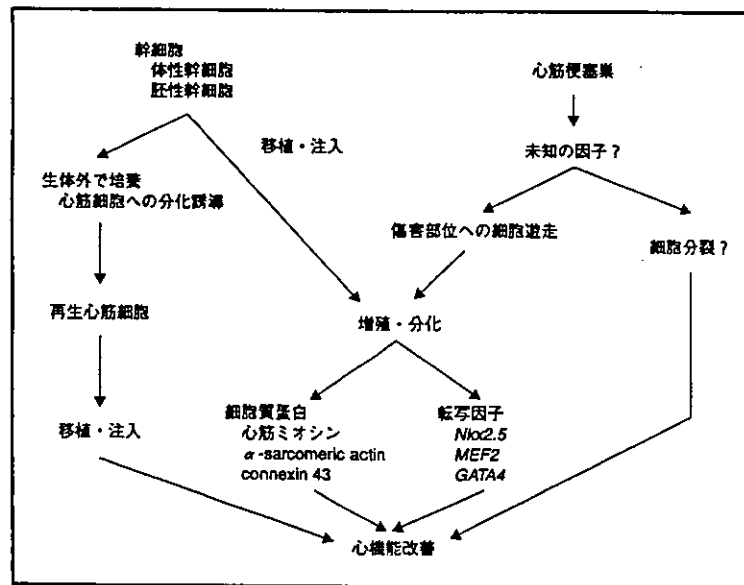


図 心筋細胞再生による心機能改善の模式図

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>14)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>15)</sup>、造血幹細胞<sup>16)</sup>、血管内皮前駆細胞<sup>17)</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>18)19)</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 cardiomyocyte 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な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

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。

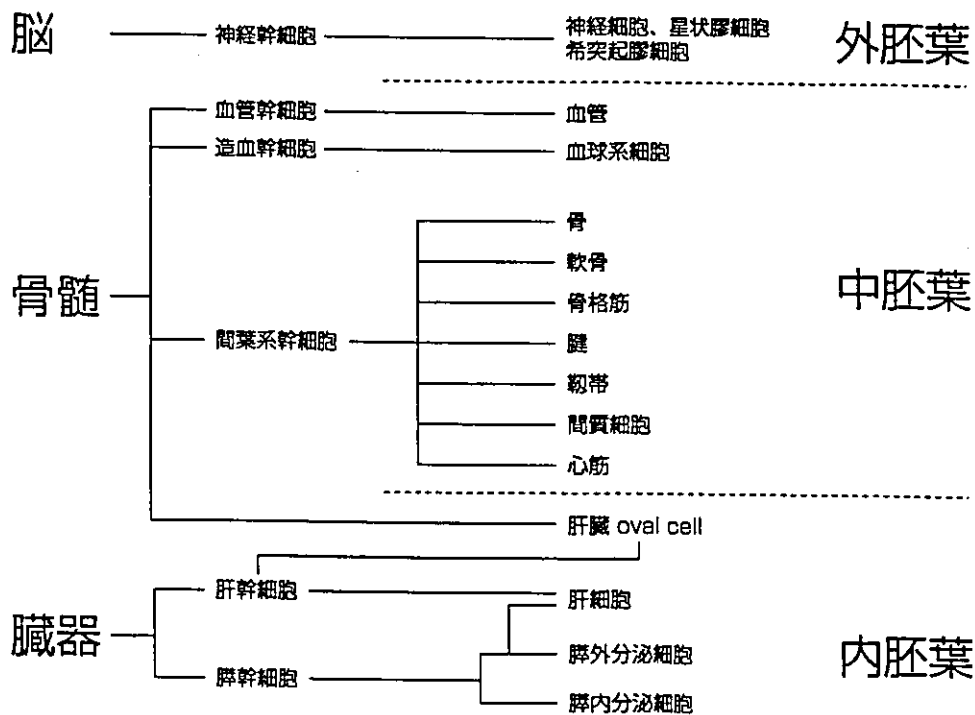
われわれ<sup>4)</sup>は、多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞に5-アザシチジンによる分化誘導をおこなうことで自己拍動能を有する心筋細胞を誘導しCMG細胞(cardiomyogenesisより)と命名した。

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CD34(-)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)

すると考えられている<sup>9)</sup>。また、Sataら<sup>7)</sup>は造血幹細胞から平滑筋細胞が誘導されることを報告している。一方、間葉系幹細胞は骨髄間質中に存在する稀有な細胞で、血球および内皮以外の他の中胚葉系の細胞に分化する幹細胞であると考えられる。これまで、骨髄間葉系幹細胞から骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等が分化誘導できることが報告されてきた<sup>8)~10)</sup>。また、ミネソタのパーファイルらは、骨髄間質より多能性幹細胞 (Multipotent Adult Stem Cell : MAPC)<sup>11)</sup>の分化誘導に成功しており、Orlicら<sup>12)13)</sup>はマウスの生体内で骨髄由来の幹細胞が心筋、平滑筋、血管内皮に分化したと報告した。これらの骨髄細胞から分化した細胞が間葉系幹細胞から分化したのか血液幹細胞から分化したのかは、現在のところ結論がでない。

筋細胞を分化誘導することに成功した<sup>4)</sup>。まず C3H/He マウスの骨髄初代培養をおこない、骨髄間質細胞を分離する。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、血液細胞を分離した骨髄間質細胞を長期培養することによって不死化した細胞株を作製した。ここに5-アザシチジンを付加し、分化誘導後さらに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る。これらをさらに2週間程度培養し、数百以上のクローンのなかから自己拍動を有する細胞を含むクローンをスクリーニングした。自己拍動を開始した細胞の周辺をクローニングシリンジを用いて採取し、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細胞を最終的にCMG細胞株として樹立した。CMG細胞の分化誘導後の自己拍動を開始する比率はおよそ30%であった(図2)。

### CMG細胞

#### 1) CMG細胞の作製

われわれの研究室ではDNA脱メチル化剤の5-アザシチジンをを用いることによって骨髄間葉系幹細胞から心

#### 2) CMG細胞の性質

CMG細胞は、5-アザシチジンによる最終的な分化誘導をおこなう以前は単核の線維芽細胞様の形状を呈す

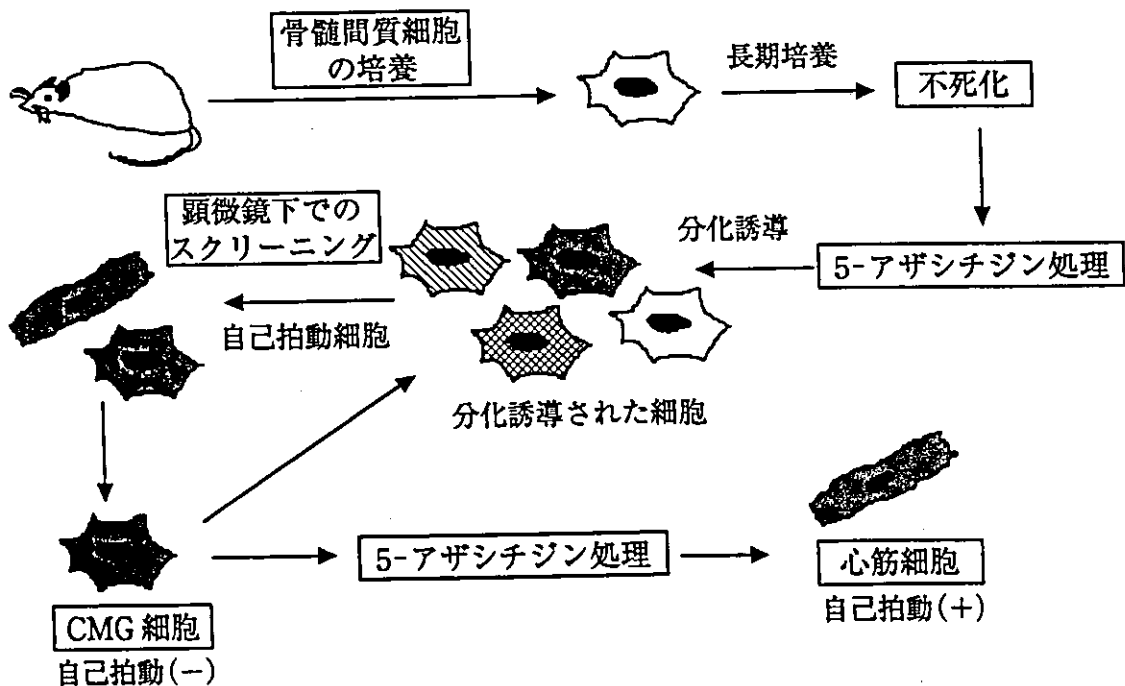


図2 CMG細胞の作製 (著者作成)

る。分化誘導後第一週目ごろより一部の細胞質が大きくなり、円形を呈してくる。この時点ですでにミオシンを発現している。分化誘導後第2週になると、こうした細胞の多くは自己拍動を開始する。第2週では、近接するミオシン陽性の細胞が互いに引き合うように連結し、筋管を形成する。第3週になると多くの細胞の筋管が連結し、並走して同期的に収縮する。筋管の全長は最長のもので約3mmに達し、拍動数120~250/分で収縮した。

### 3) CMG細胞の活動電位

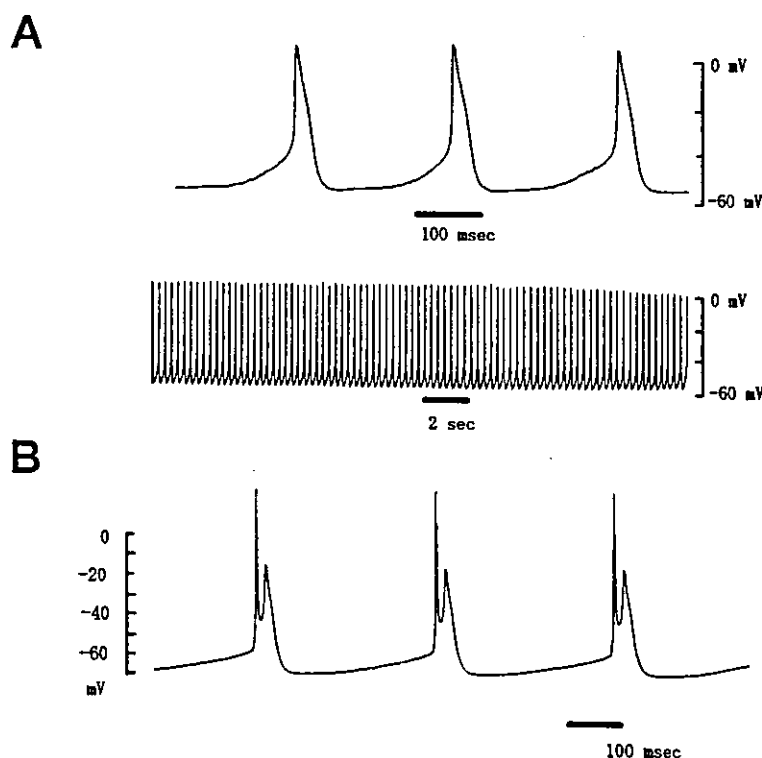
CMG細胞の活動電位は、洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類に分類された。両者に共通した活動電位の特徴は①長い活動電位持続時間、②浅い静止期電位、③緩やかな脱分極(ペースメーカー電位)である。また、心室筋細胞型では活動電位はpeak & dome型を呈した。分化誘導初期には洞結節細胞型(図③A)が多く、時間とともに心室筋細胞型(図③B)が多くなることも明らかとなった。

### 4) CMG細胞の遺伝子発現

CMG細胞では、心筋細胞と同様にANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain natriuretic peptide) の発現が観察された。転写因子に関しては転写因子(Nkx 2.5, GATA 4, TEF-1, MEF 2 A, MEF 2 C, MEF 2 D, eHAND)を発現していることを確認した。収縮蛋白に関しては、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 $\alpha$ -アクチンの場合Skletal型>Cardiac型、ミオシン重鎖では $\beta$ 型> $\alpha$ 型であった。ミオシン軽鎖の場合は、2v型が発現していたが2a型は見られなかった。これらより、CMG細胞の心筋細胞としての表現型は胎児型心室筋細胞の形質をもつと考えられた。また、カテコールアミン $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体、アセチルコリンM1, M2受容体を発現しシグナル伝達機構を有していることも確認した<sup>14)</sup>。

### 5) CMG細胞の移植

再生心筋細胞を移植する実験をおこなった結果、レシピエントマウスの心臓にCMG細胞は移植された。成体



図③ A: CMG細胞活動電位の洞結節細胞型, B: 心室筋細胞型 (Makino S *et al*, 1999<sup>14)</sup>より改変引用)

では心臓は心筋細胞が最低3層構造をしており、心外膜側では短軸面に平行になるように輪状に走行する。移植したCMG細胞はレシピエントの心筋細胞と並列して走行した。移植後3ヵ月の時点でも、CMG細胞はレシピエントの心臓に生着していることを確認した。

### 骨髄幹細胞の生体内動員

骨髄幹細胞が生体内で局所に遊走し、組織特異的な細胞に分化することが報告されている<sup>15)</sup>。Goodellらは、Hoescht dyeを用いて骨髄中の幹細胞であるSP (Side Population)細胞を分離した。このSP細胞を骨髄移植したマウスに心筋虚血再灌流モデルを作製すると骨髄細胞が心臓へ動員され、血管および心筋細胞に分化することを報告した<sup>16)</sup>。また、Orlicらは、心筋梗塞後にG-CSFとSCFのサイトカイン投与によって心機能が改善し、その原因として骨髄細胞の動員および血管、心筋細胞への分化を挙げている<sup>15)</sup>。これらの報告により、骨髄中の幹細胞が生体内においても多分化能を獲得している可能性が示唆された。現在のところ、これらの細胞がどのような種類の細胞であるのかはわかっていない。分化能をもつ骨髄細胞の候補としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞などが考えられている。動員される細胞の種類にかかわらず、骨髄中の幹細胞を梗塞巣に有効的に動員する方法が確立されれば、心筋梗塞の新しい治療法になりうると考えられる。

### 細胞融合

最近、骨髄細胞もしくは胚性幹細胞の一部が他の細胞と融合する可能性が報告された<sup>17)18)</sup>。とくに骨髄細胞は、肝臓や神経細胞および心筋細胞と細胞融合することが報告されている<sup>19)</sup>。この細胞融合が分化を促進するものなのか、あるいはアポトーシスなどを起こす前過程なのかはわかっていない。今後、これらの細胞が分化の促進や増殖に効いているのか否かを検討する必要がある。また、前述の生体内で分化したと報告された細胞が細胞融合によるものかどうかを検討する必要があるであろう。

### おわりに

骨髄由来の幹細胞を再生心筋細胞のソースとして用いることは十分可能と考えられるが、今後は治療に十分な量の幹細胞をいかに確保するかが臨床応用の鍵となるであろう。われわれのおこなった研究では、マウス骨髄細胞中の生体幹細胞の割合は約20万分の1であり、なんらかの方法で細胞数を増幅しなくてはとて心機能を改善する量の心筋細胞が得られるとは思えない。また、再生心筋細胞を臨床応用するためには十分な動物実験のうえに確実なデータを積み上げる必要がある。倫理的、科学的な問題がすべてクリアされ、再生心筋細胞を用いた心筋梗塞の治療が現実となる日も遠い未来の話ではないだろう。



### 文 献

- 1) Murry CE *et al* : Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 98 : 2512-2523, 1996
- 2) Beltrami AP *et al* : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114 : 763-776, 2003
- 3) Oh H *et al* : Cardiac progenitor cells from adult myocardium : homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 12313-12318, 2003
- 4) Makino S *et al* : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 5) Osawa M *et al* : Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273 : 242-245, 1996
- 6) Asahara T *et al* : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-966, 1997
- 7) Sata M *et al* : Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8 : 403-409, 2002
- 8) Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 : 71-74, 1997
- 9) Rickard DJ *et al* : Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161 : 218-228, 1994
- 10) Ferrari G *et al* : Muscle regeneration by bone marrow-



- derived myogenic progenitors. *Science* 279 : 1528-1530, 1998
- 11) Jiang Y *et al* : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002
- 12) Orlic D *et al* : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
- 13) Orlic D *et al* : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10344-10349, 2001
- 14) Hakuno D *et al* : Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 105 : 380-386, 2002
- 15) Bittner RE *et al* : Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 199 : 391-396, 1999
- 16) Jackson KA *et al* : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 : 1395-1402, 2001
- 17) Terada N *et al* : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 : 542-545, 2002
- 18) Ying QL *et al* : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416 : 545-548, 2002
- 19) Alvarez-Dolado M *et al* : Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425 : 968-973, 2003

## FUJITA Jun

ふじた・じゅん  
1970年、群馬県生まれ。  
1996年、慶應義塾大学医学部卒業。  
1996年、同医学部内科入局。  
1998年～同医学部内科助手。  
専門：循環器内科。  
研究テーマ：骨髄からの心筋再生。  
趣味：読書。



# 心筋の細胞治療

## Cell Therapy of Heart Disease

慶應義塾大学医学部医化学

Department of Biochemistry And Integrative Medical Biology, School of Medicine, Keio University

川口 治子

Kawaguchi Haruko

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科(講師)

Cardiopulmonary division, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

福田 恵一

Fukuda Keiichi

### KEY WORDS

- 再生心筋細胞
- 心筋内幹細胞
- 胚性幹(ES)細胞
- 心筋シート
- 多能性幹細胞

### SUMMARY

心筋梗塞が発症すると、心筋細胞が壊死し、繊維芽細胞の増殖および間質の線維化を引き起こし、心不全を呈するようになる。さらに心不全が進行すると心筋細胞は傷害され、細胞死に陥る。しかし、心筋細胞は生後まもなく、細胞分裂をほとんど起こさなくなるといわれており、心筋細胞数は徐々に低下し、心機能もさらに悪化していく。

再生医療の発展が目覚ましい近年、心筋の収縮力増強の切り札として心筋再生療法の早期臨床応用に大きな期待が集められている。心筋再生にはさまざまなアプローチが検討されており、胚性幹(embryonic stem cell: ES)細胞や骨髄中の体性幹細胞をツールに用いた再生心筋細胞の移植、多能性幹細胞移植、骨格筋芽細胞移植などの研究が進められている。また、tissue engineeringを駆使した心筋シートの開発なども進行中である。

現在、循環器領域における再生医学は血管内治療や薬物による治療困難な重症の閉塞性血管病変や狭心症への臨床応用がすでに開始されており、さらなる臨床応用に向けて着実に前進している。

## はじめに

心筋細胞は中胚葉由来の組織で、生後2週ぐらいまでは細胞分裂する能力を有するが、これ以後細胞増殖を停止するといわれてきた。しかし近年、心筋梗塞部位の周囲のごく一部で心筋細胞が細胞分裂するという報告や<sup>1)~3)</sup>、最終分化した心筋細胞を細胞分裂させたという報告がなされ<sup>4)</sup>、「心筋細胞は出生後、早期に細胞分裂が止まる」という概念は覆されつつある。再生医学の発達により、胚性幹(embryonic stem cell: ES)細胞や骨髄体性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。

本稿では心筋細胞再生方法のいくつかを紹介し、再生心筋細胞の臨床応用および問題点、tissue engineeringを駆使した心筋細胞移植について概説する。

## 心筋細胞の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、心筋の最終分化説という既存の概念に対し再検証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、細胞周期調節蛋白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報告され<sup>5)</sup>、今後の発展が期待される。

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る。幹細胞はES細胞と体性幹細胞に大別される。次にこの幹細胞を用いた心筋細胞

再生の現状を紹介する。

## 心筋細胞に分化が可能な多能性幹細胞

近年、心筋細胞に分化可能な幹細胞がいくつも明らかにされている。将来的に臨床応用可能と考える細胞はES細胞、骨髄間葉系幹細胞、心筋内組織幹細胞といわれている。以下各々の細胞の特徴と現状について、利点・欠点を含め、説明する。

### 1. 胚性幹(ES)細胞

ES細胞は受精直後の胚盤胞という時期の内部細胞塊から取り出された細胞(図1)で、すべての臓器・組織に分化しうる多分化能を有している。*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が確立している。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。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。ES細胞を培養条件下で未分化状態に維持するには、マウスでは白血球抑制因子(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すでになされている<sup>6)</sup>。ES細胞から心筋細胞への分化には図2のようにBMP2やWntといったシグナル伝達経路が重要であるとされているが、その詳細は明らかではない<sup>7)</sup>。ES細胞の臨床応用上の問題点として、第一に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。第二に、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。第三に、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。

2. 骨髄間葉系幹細胞

骨髄細胞を用いた心筋再生も可能となってきた。骨髄は造血の場であるが、血液系以外にも造血を助ける骨髄間質細胞が存在している。骨髄間質細胞の

一部に、さまざまな細胞に分化能を有する間葉系幹細胞が存在することが明らかとなり、*in vitro*, *in vivo*でさまざまな細胞に分化することが知られている<sup>9)</sup>。骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に主として分化するが、一部神経細胞などの外胚葉系の細胞にも分化することが報告されている<sup>10)</sup>。

2001年、Orlic Dらにより骨髄細胞に存在する造血幹細胞は多分化能があることが報告された(図3)。Orlic DらはGFPトランスジェニックマウスか

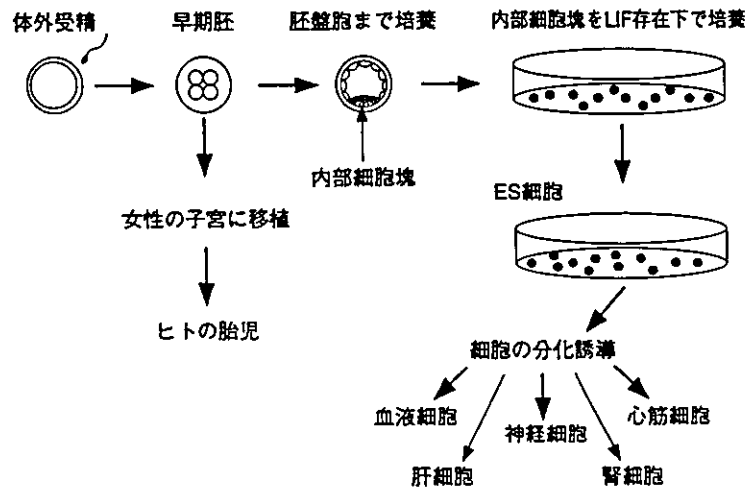


図1 ES細胞の樹立と利用

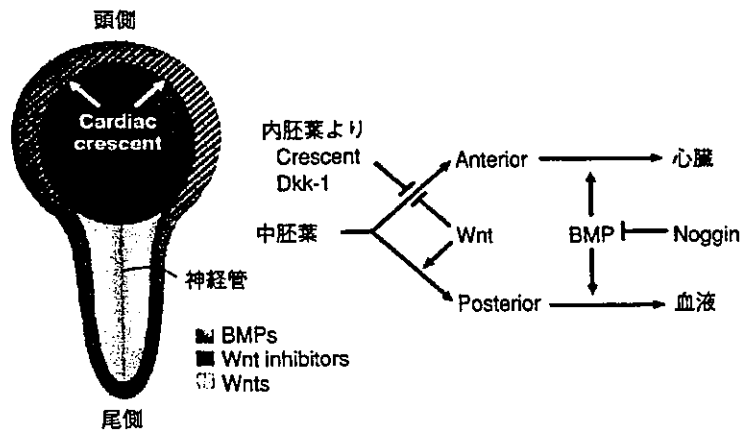


図2 中胚葉から心臓への分化経路 (→巻頭カラーグラビア参照)

ら得られたLin<sup>-</sup>c-kit<sup>pos</sup>細胞(造血幹細胞)を、梗塞部位との境界部分に注射し、骨髄細胞移植後9日の時点で新生した心筋層が心室の梗塞部位の68%を占めていたことを示した<sup>10)</sup>。この新生心筋層には収縮蛋白と血管構造が作られており、局所的に注入し

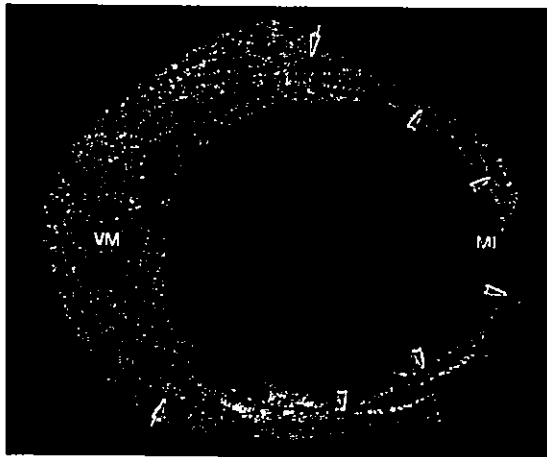


図3 梗塞心への骨髄幹細胞移植後の心筋再生<sup>10)</sup>  
(→巻頭カラーグラビア参照)

骨髄細胞由来のLin<sup>-</sup>c-kit<sup>pos</sup>細胞を梗塞心モデルマウスに投与した。赤：残存心筋，緑：PIラベルした核，Arrows：梗塞部位に骨髄細胞由来のLin<sup>-</sup>c-kit<sup>pos</sup>細胞を投与した部分，Arrowheads：再生心筋

た骨髄細胞により新たな心筋層が生じることがわかった。またヒトにおいても、心臓移植後の症例検討から興味深い報告がなされた<sup>11)</sup>。これは女性ドナーから男性レシビ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、男性の心臓以外の組織から造血幹細胞あるいは前駆細胞のようなかたち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例を検討した報告ではその由来を骨髄としている。しかし、現在、造血幹細胞の多能性に関しては否定的な見解が多く示されている。造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因という説がいくつか示され<sup>12)-14)</sup>、われわれのGFPトランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも、造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている(図4)。また梗塞心への骨髄移植モデルにおける検討でも、造血幹細胞は心筋梗塞部位において心筋細胞に分化せず、むしろ成熟した造血細胞になりうる(図5)、という所見が2004年4月に入り相次いで報告されている<sup>15)16)</sup>。

しかし、間葉系幹細胞に関しては*in vitro*の実験

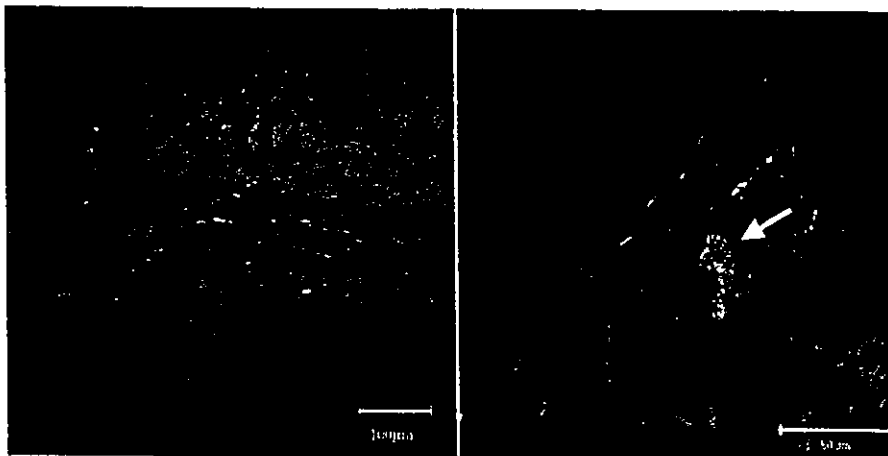


図4 骨髄細胞と心筋細胞の細胞融合(→巻頭カラーグラビア参照)  
GFPトランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を梗塞モデルに移植した。  
赤：残存心筋，緑：GFP，青：DAPI染色の核

同様、*in vivo*でも心筋細胞に分化する所見が得られており、骨髄由来細胞の多能性は間葉系幹細胞に起因するものと考えられる。成人骨髄内に存在するMAPC (multipotent adult progenitor cell)<sup>19)</sup>はあらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であるとVerfeillie Kらにより報告されている<sup>20)</sup>。しかし、MAPCの培養法はきわめて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しい。MAPCに関しては、今後の研究をみたくうえで慎重に判断されるべきである。

### 3. 心筋内幹細胞

Anversaらは成体の心臓内に多能性幹細胞が存在することを報告した<sup>21)22)</sup>。心臓内幹細胞には3種類あり、c-kit陽性、MDR1陽性、あるいはSca-1陽性細胞とがある。c-kit, MDR1, Sca-1自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを図6に示した。

MDR1陽性細胞はSP (side population)細胞とも呼ばれている。SP細胞は骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発されたもので、DNA結合色素のHoechst33342をABCトランスポーターであるMRD1を介して細胞外への汲み出し能力を指標として分離する。MDR1を発現する細胞は幹細胞としての能力が高いとされる。MDR1陽性細胞の一部は骨格筋や心筋細胞に分化すると報告されている。Sca-1の陽性細胞がマウス<sup>23)</sup>、ラット<sup>24)</sup>、イヌ<sup>25)</sup>、ブタ、そしてヒトの心臓中で発現していることが報告された<sup>21)24)26)</sup>。Sca-1は幹細胞だけでなく内皮細胞にも発現しており、血管機能の構築において各種の成長因子に特に感受性の高い抗原であるといわれている。このようにそれぞれの幹細胞の表面抗原の発現が異なることが、結果として異なる細胞の成長や心筋および冠静脈形成の誘因となると考えられている。

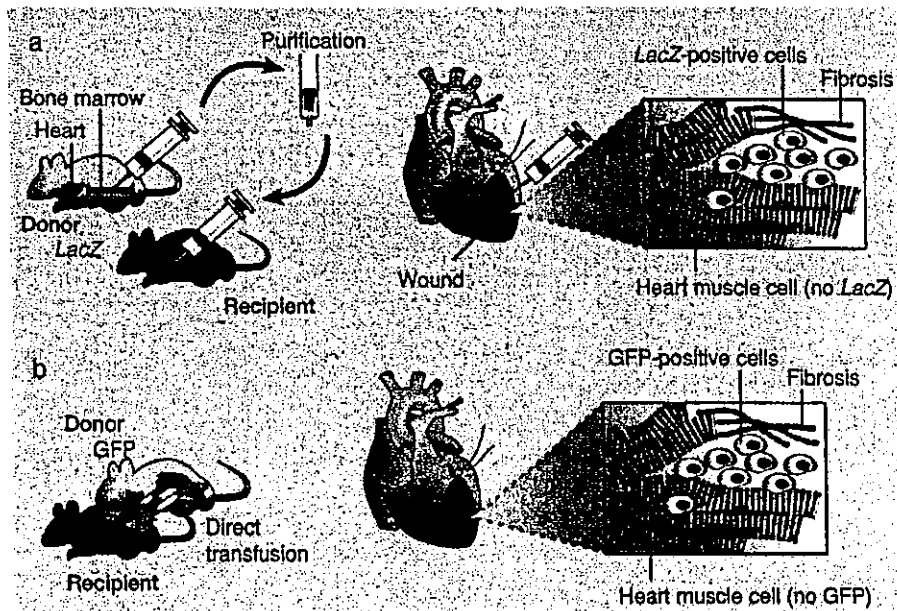


図5 造血幹細胞は心筋細胞以外に分化する(→巻頭カラーグラビア参照)

a: 梗塞部位にLacZ標識の骨髄細胞を投与したが、心筋細胞内にはLacZ標識細胞は存在しなかった。

b: 梗塞部位にGFP標識の骨髄細胞を投与したが、心筋細胞内にはGFP標識細胞は存在しなかった。

Nature 428: 607, 2004より引用

### 細胞移植による心不全治療への応用

心筋梗塞部位において、未分化な造血幹細胞系が心筋細胞や心筋幹細胞に分化するという報告から、この細胞を利用した移植についても研究が進められている。Kamihataらは、血管内皮および心筋に存在する幹細胞と、血管内皮増殖因子を含む骨髓単核球移植が血管再生に有効であることをブタ急性心筋梗塞モデルを用いた実験から示した<sup>20)</sup>。また同グループによって、虚血冬眠心筋を同定し、経カテーテル的に細胞移植が可能なNOGAマッピングシステムという新たなシステムが開発され、冬眠心筋への骨髓単核球移植による心筋の運動機能の改善が報告されている<sup>21)</sup>。現在、このシステムを用いた重症狭心症への臨床応用がすでに始まっている。

な細胞を用いて成体に存在するような3次元化組織を培養皿上で作成することが可能となった。Okanoらは、温度応答性高分子ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を培養皿の表面に電気的にグラフトしたものを作製した<sup>22)</sup>。培養温度37℃では疎水性の表面となるため細胞が接着するのに対し、低温(32℃以下)では親水化するため、細胞を培養皿から構造と機能を保ったままの状態でも回収することができる(図7)。トリプシンなどの蛋白分解酵素を用いずに温度を下げるだけで細胞をシート状に回収できるため、細胞間の接着にダメージを与えることがない。Shimizuらはこの技術を応用して心筋細胞シートを作製し、ラット皮下に長期間生着し、拍動を続ける層状の心筋組織の開発に成功した<sup>23)</sup>。今後はこの研究により、細胞レベルから組織レベルの再生をも可能となってゆくだろう。

### 心筋シートの開発

近年、tissue engineeringの発展により、さまざま

### おわりに

さまざまな細胞が開発され、心筋への移植が試み

	c-kit	MRD1	Sca-1
構造	<p>Ig-like domain Tyrosine Kinase domain Insert region</p>	<p>Extracellular compartment Intracellular compartment ATP</p>	<p>PtdIns anchor</p>
分布	Melanocytes Mast cells 生殖細胞 幹細胞	肝細胞、胆管細胞 Brush border cells 腎尿管細胞、癌細胞 脳血管内皮細胞 幹細胞	血管壁 腎皮質細胞 胸腺、脾臓 Tリンパ球 幹細胞
機能	増殖 遊走 分化 分泌	膜に存在する排出ポンプ アポトーシスの抑制	細胞接着 シグナル伝達 T細胞活性化

図6 c-kit, MDR1, Sca-1について (→巻頭カラーグラビア参照)

られているが、まだいくつかの問題点も残されている。例えば、移植した細胞とホストの心筋細胞との間に gap junction が形成される、またこの移植細胞がどのような電気特性を持っているかなどである。特に移植した細胞に異常な電気特性があった場合、移植細胞自体が不整脈の原因になりかねない。今後、心筋再生療法が21世紀における有望な心不全治療法になるためには、移植細胞群の詳しい解析が問題点の克服となり、循環器領域における再生医学のさらなる発展へと繋がっていくと考えられる。

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, Sumrejkanchanakij P, et al: Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res* 92: 12-19, 2003
- 5) Anversa P, Nadal-Ginard B: Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415: 240-243, 2002
- 6) Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, de Boer PA, et al: Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res* 58: 399-409, 2003
- 7) Haegel L, Ingold B, Naumann H, et al: Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci* 24: 696-708, 2003
- 8) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997
- 9) Munoz-Sarjuan I, Brivanlou AH: Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* 3: 271-280, 2002
- 10) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001
- 11) 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
- 12) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al: Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:

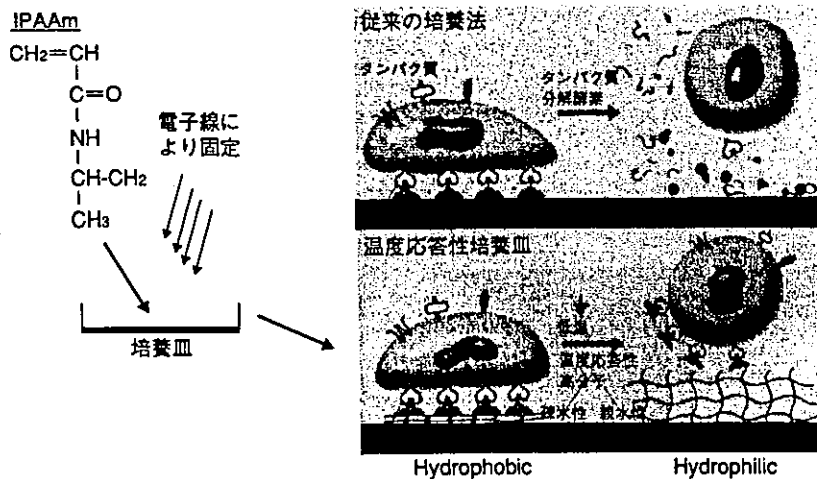


図7 温度応答性培養皿の原理 (→巻頭カラーグラビア参照)  
 培養温度37℃では疎水性の表面となり細胞が接着し、低温(32℃以下)では親水化するため、細胞を培養皿から構造と機能を保ったままの状態での回収できる。  
 IPAAm: poly-N-isopropylacryl-amide



- 968-973, 2003
- 13) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 : 542-545, 2002
  - 14) Ying QL, Nichols J, Evans EP, et al : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416 : 545-548, 2002
  - 15) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW : Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422 : 901-904, 2003
  - 16) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al : Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428 : 664-668, 2004
  - 17) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al : Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428 : 668-673, 2004
  - 18) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al : Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109 : 337-346, 2002
  - 19) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002
  - 20) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al : Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346 : 5-15, 2002
  - 21) Beltrami A, Chimenti S, Limana F, et al : Cardiac c-kit positive cells proliferate *in vitro* and generate new myocardium *in vivo*. *Circulation* 104 : II-324, 2001
  - 22) Cesselli D, Kajstura J, Jakoniuk I, et al : Cardiac stem cells are endowed in niches of the adult mouse heart and possess the ability to divide and differentiate in the various cardiac lineages. *Circulation* 106 : II-286, 2003
  - 23) Kajstura J, Leri A, Castaldo C, et al : Cardiac stem cells mediate myocyte replication in the young and senescent rat heart. *Circulation* 104 : II-220, 2001
  - 24) Linke A, Castaldo C, Chimenti S, et al : Mobilization of cardiac stem cells by growth factors promotes repair of infarcted myocardium improving regional and global cardiac function in conscious dogs. *Circulation* 106 : II-52, 2002
  - 25) Urbanek K, Quaini F, Bussani R, et al : Cardiac stem cell growth and death differs in acute and chronic ischemic heart failure in humans. *Circulation* 106 : II-382, 2002
  - 26) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T : Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104 : 1046-1052, 2001
  - 27) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T : Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 : 1804-1810, 2002
  - 28) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27 : 1243-1251, 1993
  - 29) 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* 90 : e40, 2002

### 用語解説

#### ●骨髄間葉系幹細胞

骨髄には造血支持細胞と呼ばれる血球系以外の細胞や骨髄間質細胞が存在する。間葉系幹細胞は骨髄間質細胞に含有される細胞で、多分化能を有し、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。また、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。

#### ●MAPC細胞 (multipotent adult progenitor cell)

あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞で、MAPCを別のマウスの受精卵の胚盤胞に注射してキメラマウスを形成させると、MAPCは胚性幹細胞と同様にほぼすべての細胞に分化する。

#### ●Hoechst33342

核染色剤、細胞染色用色素で、DNAのAT配列に結合する蛍光色素で生細胞にも容易に取り込まれる。また、細胞毒性が低く細胞膜透過性が高いという性質から生きた細胞での細胞周期解析に用いられてきた。

# 骨髄幹細胞を用いた筋組織再生 心筋細胞の再生

福田恵一

慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学

骨髄中には造血幹細胞と間葉系幹細胞の2種類の幹細胞が存在する。近年、この両者の骨髄幹細胞の多様性が指摘されてきたが、造血幹細胞の多様性に関しては細胞融合ではないかとの指摘もあり、再評価の時期を迎えている。一方、間葉系幹細胞に関しては*in vitro*では骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞等の多彩な細胞に分化することが知られており、その利用が期待される。骨髄移植は血液疾患以外でも行われるようになってきており、間葉系幹細胞を用いた筋疾患の治療研究が進められている。

Key words cardiomyocyte, bone marrow stromal cell, cell transplantation

1999年に筆者らが骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞が誘導できると報告して以来<sup>1)</sup>、多くの研究がなされ、現在に至っている。その後、いくつかの研究室でも同様に心筋細胞が得られることが確認された。骨髄細胞が自己の細胞であり、骨髄移植などの経験もあったことから、その後臨床例も含めて骨髄細胞を直接あるいは骨髄単核球成分にしてから心筋内に注入することも行われている。しかし、いかなる方法が患者に有用であるか、科学的に最も優れているかを検証しながら、基礎研究、臨床研究を進めてゆかねばならない。また、最近では造血幹細胞と分化した組織の細胞融合も大きな話題となっており<sup>2)</sup>、共培養や*in vivo*での再生の仕事の見直しをしなければならぬであろう(図1)。

本稿では、骨髄細胞を用いた心筋再生の現状を述べ、さらに筋ジストロフィーなどの遺伝子欠損に基

づく疾患の治療法との関連でも私見を述べることにした。

## ● 骨髄の幹細胞：造血幹細胞と間葉系幹細胞のいずれが主役か

骨髄は従来よりよく知られているように、造血の主たる場であること以外に、組織修復のための細胞のプールであることが明らかとなってきた。骨髄中には造血幹細胞と間葉系幹細胞の少なくとも2種の幹細胞が存在する。ここ数年の研究で造血幹細胞の多分化能が叫ばれ多くの研究が試みられた。これらの研究の考えのもとになったのは、女性ドナーより心臓移植を受けた男性患者が別の原因で死亡した症例で心臓を解析したところ、心筋細胞にY染色体を有する細胞が多数報告され、実際に成体でも骨髄由来の細胞が心筋細胞に分化するのではないかと考え

### Regeneration of cardiomyocytes by bone marrow stem cell

Keiichi Fukuda

ふくだ・けいいち 1983年慶應義塾大学医学部卒業、87年同大学院修了。92年米国ハーバード大学留学、94年米国ミシガン大学留学を経て、95年慶應義塾大学内科助手、99年同心臓病先進治療学講師(現在に至る)。研究テーマ：心臓病の分子生物学的解析、心筋細胞の再生。

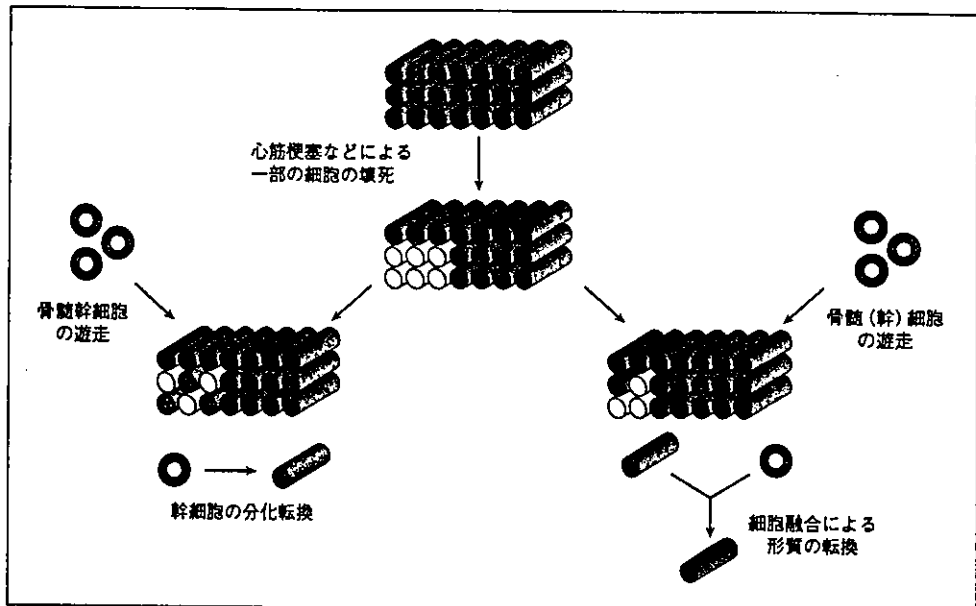


図1 細胞分化と細胞融合の概念

骨髄由来の幹細胞が末梢組織で分化するのか、あるいは局所の細胞と融合することにより分化しているようにみえるのか、現在多方面からの議論が展開されている。

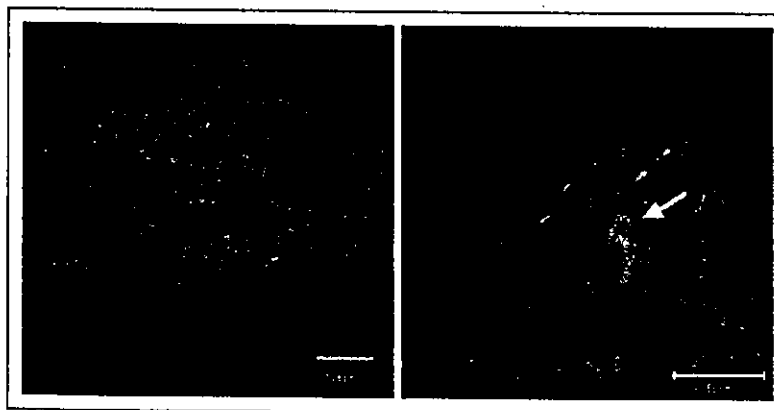


図2 骨髄移植マウスを用いた心筋再生の解析

GFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞を健常マウスに骨髄移植し、心筋梗塞を作製した。左は心筋梗塞作成部、右は梗塞部の拡大像を示す。赤はアクチニン、緑はGFP、青はTOTO3染色で核を示す。矢印はGFP陽性、アクチニン陽性の再生心筋を示す。

られたことによる<sup>3)</sup>。こうした考え方にに基づき、GFP (green fluorescent protein) トランスジェニックマウスの骨髄を骨髄移植したモデルマウスにおいて、さまざまな臓器でGFP陽性の細胞が確認された<sup>4)</sup> (図2)。

これらの事実より、造血幹細胞の多能性が唱えられたが、その考え方にWeissmanらは異論を唱えた。すなわち、WeissmanらはGFPトランスジェニックマウスより単一の骨髄造血幹細胞を取り出し、骨髄

移植したモデルを作製し、GFP陽性の体細胞を観察した。その結果、小脳のPurkinje細胞などのごくわずかの組織にGFP陽性が観察されたのみであった<sup>5)</sup>。その後の研究で、これらの細胞はGFP陽性の骨髄由来の細胞と体細胞が細胞融合した結果であることが示され、造血細胞の多分化能に疑問が抱かれるに至った<sup>6)</sup>。筆者らが行った単一骨髄造血幹細胞の骨髄移植実験でも造血幹細胞の心筋分化は否定的であり、多分化能の可能性は低いものと考えられた。

## ● 骨髄間葉系幹細胞の多分化能

骨髄間葉系幹細胞は骨髄間質中に存在するまれな細胞で、血球系細胞と異なり培養皿に接着する性質をもつ。これまでの研究ではその表面抗原の異なるものが報告されており、その詳細は明らかではない。CD29, CD44などが陽性であることが共通であるが、c-kitやCD34に関しては一定ではない。幹細胞としての分化能や上下関係があることが推測されるが、造血幹細胞で報告されているような明確なカスケードは現在のところ知られていない。よく混同されている事実として骨髄間質細胞がすべて多分化能を有するように誤解されているが、間質細胞のうち、間葉系幹細胞とされる細胞はごく一部でしかない。

これまで、間葉系幹細胞は*in vitro*の条件で脂肪細胞、軟骨芽細胞、骨芽細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などに分化することが示されている<sup>7)</sup>。このため、中胚葉系の幹細胞と考えられるに至っている。特に脂肪、軟骨、骨への分化は容易であり、培養皿上で細胞がconfluentの状態になると、特に特異的刺激を与えなくともこれらの細胞に分化することが観察され、また既知の細胞増殖因子や基質を加えるだけでこれらの細胞に分化することが知られている<sup>8)</sup>。近年、5-アザシチジンなどの脱メチル化剤を用いると間葉系幹細胞は心筋や神経細胞にも分化することが明らかとなった<sup>9)</sup>。また、間葉系幹細胞は骨格筋細胞にも分化することが知られ、細胞融合して筋管細胞を形成する。骨格筋細胞は脂肪、軟骨、骨に次いで分化しやすいが、現時点では特異的に分化させる方法は明らかにされていない。

## ● 骨髄間葉系幹細胞由来の心筋の特徴

詳細は既報に述べており割愛するが、要約すると分化誘導当初は胎生初期の心室筋細胞の特徴に合致する表現型（遺伝子発現形式、活動電位）を呈するが、次第に成熟心室筋型の表現型をとるに至る<sup>10)</sup>。また、交感神経、副交感神経のレセプターを発現し、次のような機能を有していた。つまり、交感神経 $\alpha$ 刺激に対しては主として $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ レセプターを介し、

シグナル伝達活性化に引き続き心肥大を呈した<sup>11)</sup>。一方、交感神経 $\beta$ 刺激には主として $\beta_1$ レセプターを介し、cAMP上昇に引き続き心拍数上昇、収縮力増強などを呈した。副交感神経刺激に対するムスカリンレセプターは主として $M_2$ レセプターを介し、シグナル伝達機能を有していた。

## ● 間葉系幹細胞の存在意義

これはまだ実証されていないことであり筆者の推測であるが、骨髄中に間葉系幹細胞が存在することの意義を考えてみると、以下のように考えられるのではないだろうか。すなわち、この細胞はその存在位置に最も近い部位の障害、すなわち骨折や軟骨の破損の修復のための材料として骨周辺の骨髄間質に存在する。生命の危機に及ぶような大規模な損傷、外傷に際しては、顆粒球、単球、マクロファージなどと同様に骨髄内で分裂・増殖して炎症局所に遊走し、局所でさまざまな細胞に分化する。この仮説を証明するには、炎症が生じた際に骨髄腔より間葉系幹細胞が血流中に遊走することを証明しなければならない。現時点ではこれらの証明はなされていないが、今後10年でこれらの現象の有無、その分子機序を解明しなければならないであろう。

造血幹細胞の多分化能が次第に否定されるとともに、間葉系幹細胞の多分化能が次第に明らかにされる状況より、筆者らは骨髄において多分化能をもつ細胞は間葉系幹細胞であると考えに至っている。これを実証するには間葉系幹細胞のさらなる研究が重要であると考えられる。

## ● 組織内幹細胞と骨髄幹細胞

近年、成体の心筋組織内にも多能性幹細胞あるいは心筋前駆細胞と考えられる細胞が存在することが報告された。

Beltramiらは成獣マウスの心臓内にc-kit陽性の細胞が存在し、モノクローナルに増殖すること、これらを他の成獣の心臓に移植すると心筋、血管内皮、血管平滑筋に分化する能力があることを報告した<sup>12)</sup>。これらのc-kit陽性の細胞は心尖部および心耳に存