

図3 心筋組織中のSP細胞分画  
骨髄や各種組織をHoechst33342で染色し、blueとredの2波長で展開させたFACS解析を示した。四角で囲んだ領域がSP細胞分画である(左図)。SP細胞分画はレセルピン前投与で完全に消失する特徴がある(右図)。

在するとされ、心筋梗塞などで梗塞巣に移動して心筋梗塞部位を修復する可能性を示唆している。一方Ohらは、成体心筋組織中に存在するSca-1 (stem cell antigen-1) 陽性の細胞を分化誘導剤である5-アザシチジンを用いて分化誘導すると、心筋特異的遺伝子を発現し、拍動は観察されないものの心筋細胞に分化すると報告した。また、これらの細胞を標識してマウス尾静脈より投与すると、心臓にホーミングすると報告している<sup>13)</sup>。

両者の報告する細胞は表面抗原の解析からすると異なる細胞であり、Beltramiらの報告した細胞は多分化能をもつ細胞、Ohらの報告した細胞は心筋前駆細胞的な性質をもつことが推測される。これらの細胞が心臓局所に存在するのか、骨髄から遊走してくるのかは明らかではない。今後の解析が待たれる。

そのほかに幹細胞の指標として、DNA染色色素Hoechst33342弱陽性の集団がある。Hoechst33342で骨髄細胞を染色しFACSで二次元展開すると、特徴的な形態を示すHoechst弱陽性の集団が認められた<sup>14)</sup>。これが造血幹細胞と考えられside population (SP) 細胞と名付けられた。SP細胞ははじめに骨髄で報告されたが、その後ほかの組織にも確認され、筆者らの実験でも心筋組織で観察している(図3)。

### ●骨髄移植による種々の疾患の治療

骨髄移植は、従来白血病や再生不良性貧血の治療

法として開発され、確立されてきた。これに対し、近年その適応が拡大され、試験的ではあるが種々の自己免疫疾患に対し骨髄移植が行われるようになってきた<sup>15, 16)</sup>。米国を中心として全身性エリテマトーデス(SLE)や多発性筋炎などの膠原病や多発性硬化症などに対し骨髄移植が行われ、原疾患が根治したとの報告が数多くなされている。この場合の骨髄移植には免疫系の細胞を置換するという意味があり、理論的にも正しいことになる。骨髄移植自体にある程度の危険があることを考えると、原病が致死的な疾患では有効であるといえよう。このように骨髄移植は血液疾患に限らず自己免疫疾患にも応用されようとしているが、骨髄間葉系幹細胞の移植が組織修復に有効であるか否かを検証することは今後の課題であろう。

### ●筋ジストロフィー治療における骨髄移植の可能性

骨格筋細胞中には筋細胞の前駆細胞である衛星細胞が存在するが、それ以外にも幹細胞が存在することが報告されている。骨格筋中の多能性幹細胞が造血機能を代償できると報告されたが<sup>17)</sup>、これは骨髄からきた造血幹細胞が骨格筋中に一時とどまっているためであることが明らかとなった<sup>18)</sup>。しかし、骨髄造血幹細胞以外にも多能性幹細胞が存在するのではないかと考えられ研究がなされている。

骨髄間葉系幹細胞は骨格筋細胞に分化することは

表1 骨髄間葉系幹細胞とES細胞の比較

細胞の単離、樹立	すでに確立した方法がある 一度樹立すれば多くの症例で使用可能	単離法はまだ未確立 個々の症例で樹立する必要あり
細胞分裂能	無限に増殖すると考えられる	70 継代は可能とされるが無限かどうかは不明
分化誘導法	胚様体を作る方法がすでに確立しているが、効率が悪い 特異的な方法はまだ確立していない	特異的な方法はまだ確立していない
腫瘍形成	可能性あり	可能性はない、あるいは低い
拒絶反応	あり	なし
免疫抑制剤の使用	必要	不要
ドナー	ドナーが必要だが、一度ES細胞を樹立すればその後は必要ない	ドナーは不要だが、本人の骨髄から採取する必要あり
倫理的問題	慎重な検討が必要	なし
大量生産化	可能、比較的安価	労力と費用がかかる
コメント	工業生産化に向いているが、オーダーメイドの細胞を作ることはできない	オーダーメイドの心筋細胞が作れるが、時間と経費はかなり掛かると予想される

これまでの研究から明らかになっているが、この細胞自身を他から移植することは免疫拒絶のため困難である。そこで、骨髄移植を行い造血幹細胞および骨髄間葉系幹細胞を取り出して同時に移植し、免疫拒絶のない形にし、その後に骨髄間葉系幹細胞を利用して骨格筋再生を行えば正常なジストロフィン遺伝子が発現した筋細胞を自己細胞として再生することが可能となるものと考えられる。

骨髄中には造血幹細胞、間葉系幹細胞を中心にさ

まざまな細胞が存在する。また、受精卵からは分化の多能性をもつES細胞（胚性幹細胞）が樹立されている。これらを利用して医療に应用する再生医学が近年急速に発達している。骨髄間葉系幹細胞とES細胞の研究について、その現状を表1に示す。いうまでもなく、臨床応用を考えた場合にも確実な根拠に基づいた治療を行うべきであり、臨床を念頭においたトランスレーショナルリサーチが重要であると考えられる。

## 文献

- 1) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103, 697-705 (1999)
- 2) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-5 (2002)
- 3) Bianchi DW, Johnson KL & Salem D. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346, 1410-2 (2002)
- 4) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-70 (1999)
- 5) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL & Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-9 (2002)
- 6) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-73 (2003)
- 7) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-4 (1997)
- 8) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7 (1999)

- 9) Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 24, 634-8 (2002)
- 10) 福田恵一. 心臓の組織工学：上田 実編. 別冊「医学の歩み」再生医学と組織工学：現状と今後の課題, p38-43 (医歯薬出版, 東京, 2002)
- 11) Hakuno D, Fukuda S, Makino S, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 105, 380-6 (2002)
- 12) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-76 (2003)
- 13) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium : Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12313-8 (2003)
- 14) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS & Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 183, 1797-806 (1996)
- 15) Ikehara S. Bone marrow transplantation : A new strategy for intractable diseases. *Drugs Today (Barc)* 38 (2), 103-11 (2002 )
- 16) van Bekkum DW. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 72, 609-20 (2002)
- 17) Jackson KA, Mi T & Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14482-6 (1999)
- 18) Kawada H & Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 98, 2008-13 (2001)

---

# 骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞の特徴と機能解析

---

福田恵一\*

## I. はじめに

心筋細胞は胎生期には細胞分裂を行うが、生後間もなく終末分化し、以後は細胞分裂を行わない。このため心筋梗塞等により心筋細胞が壊死した場合には、残存心筋細胞の肥大により代償される。一方、分子生物学の発達により遺伝子操作動物や人工臓器の研究が進歩し、遺伝子操作により細胞の運命を人工的に転換させることも可能となった。骨格筋細胞ではMyoD遺伝子群がクローニングされ<sup>1), 2)</sup>、この1つの遺伝子を強制発現させることにより、線維芽細胞や神経細胞等の細胞を骨格筋細胞に転換することが可能となった。多くの研究者が心筋細胞の発生学的研究の手段として、あるいは心不全に対する根本治療の確立を目指して心筋細胞株の樹立や心筋細胞特異的転写因子の研究を行ってきた。しかし、その目的を満足できる心筋細胞株の開発や、MyoDのように単独の遺伝子で他の細胞を心筋細胞に変えうる転写因子は見つかっていない<sup>3)</sup>。我々は心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に転換させる技術を研究開発してきた。我々は多分化能を有する骨髄間質細胞に分化誘導を加えることにより、自己拍動能を有する心

筋細胞類似の細胞を得ることに成功しCMG細胞(cardiomyogenesisより)と命名した<sup>4)</sup>。

再生心筋細胞を臨床応用してゆくには様々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解明があげられよう。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様々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 $\alpha_1$ 、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$ カテコラミン受容体、アセチルコリン受容体を通じて心筋細胞の機能調節に重要な役割を担っている。また、イオンチャネルの発現は活動電位の発生に必須のものである。本稿ではCMG細胞の作製法とその形態学的、電気生理学的特徴および、心筋特異的遺伝子の発現、 $\alpha_1$ 、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$ カテコラミン受容体、アセチルコリン受容体<sup>5)</sup>、イオンチャネルの発現等を解説する。

## II. 心筋細胞の発生学的由来

図1に心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞の発生学的な由来を示した。受精卵が原腸陥入の後、内、中、外の3胚葉に分化し、平滑筋細胞はlateral

---

\* 慶應義塾大学呼吸循環器内科

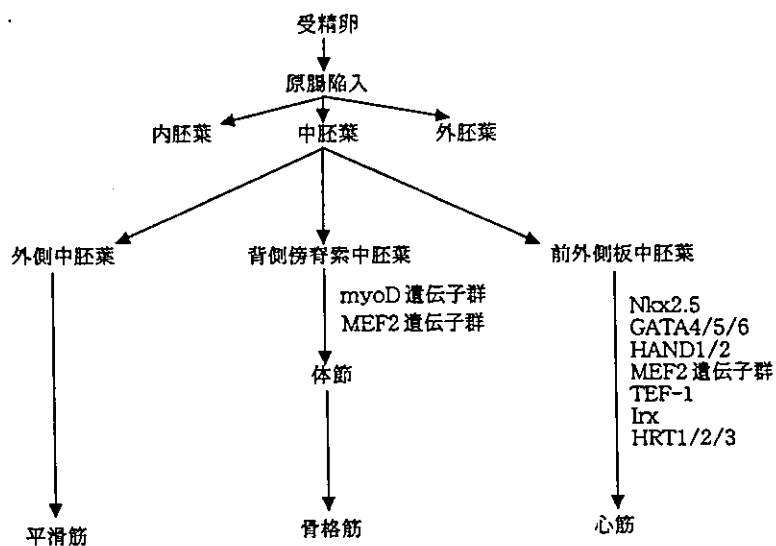


図1 心筋細胞の発生学的由来

心筋細胞は前外側板中胚葉に由来し、種々の転写因子がmyogenesisに関与するがマスター遺伝子は今のところ見出されていない。

mesodermから、骨格筋はdorsal paraxial mesodermから体節を形成した後に発生してくる。一方、心筋細胞は中胚葉のうちanterolateral plate mesodermから発生し、心筋芽細胞に分化することが決定された後、胎生期には細胞分裂を行い、生後間もなく終末分化する。骨格筋細胞においてはMyoD遺伝子をはじめ発生分化に関する研究が進み、転写因子のカスケードが明らかとなってきた。

心筋細胞においてもいくつかの心筋細胞特異的転写因子の存在が明らかにされてきたが、単独の転写因子のみで心筋細胞の形質が獲得できるような強力なあるいは上流の転写因子は見つかっていない。

### Ⅲ. 骨髄間質細胞の特徴

近年の研究により、これまで再生能力がないと考えられていた神経や心筋細胞にも生体内にある程度

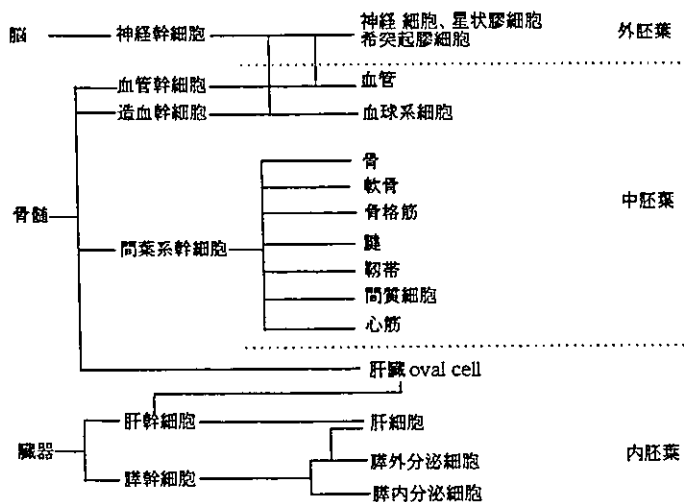


図2 成人組織における幹細胞の分類

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

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辺に存在する<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>7)</sup>。

#### 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<sup>8)</sup>(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ニングシリンジより採取し、さらにサブクロニングを反復した。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。

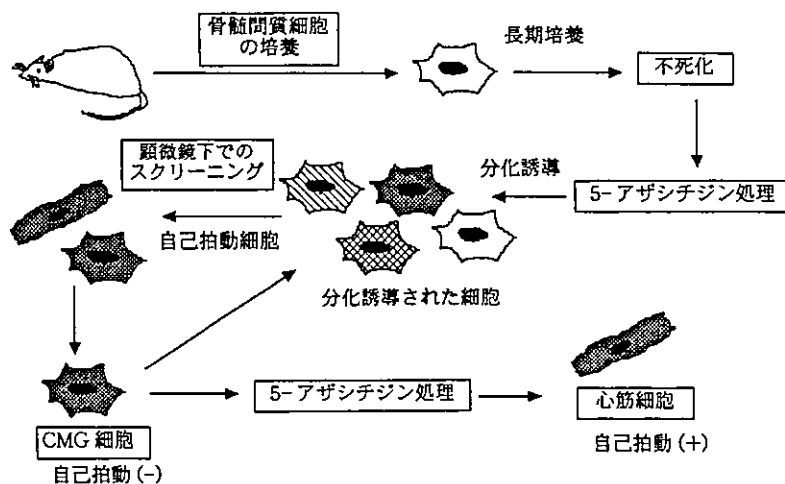


図3 骨髄細胞の初代培養とCMG細胞の作製

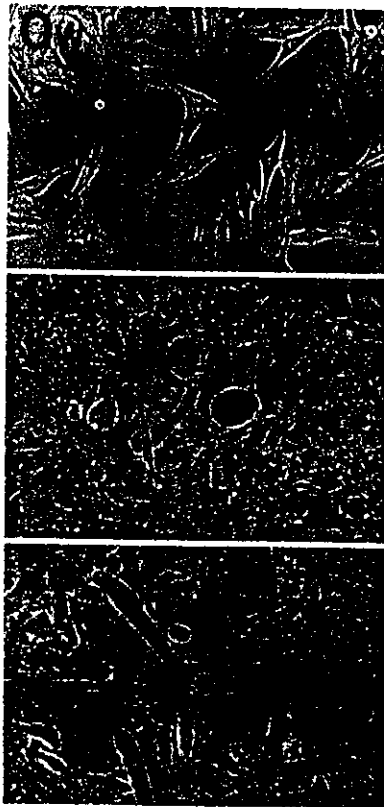


図4 分化前後のCMG細胞の位相差顕微鏡写真  
数字は5-azacytidine投与からの週数を示す。スケールは100 $\mu$ m。〔文献4〕より引用

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

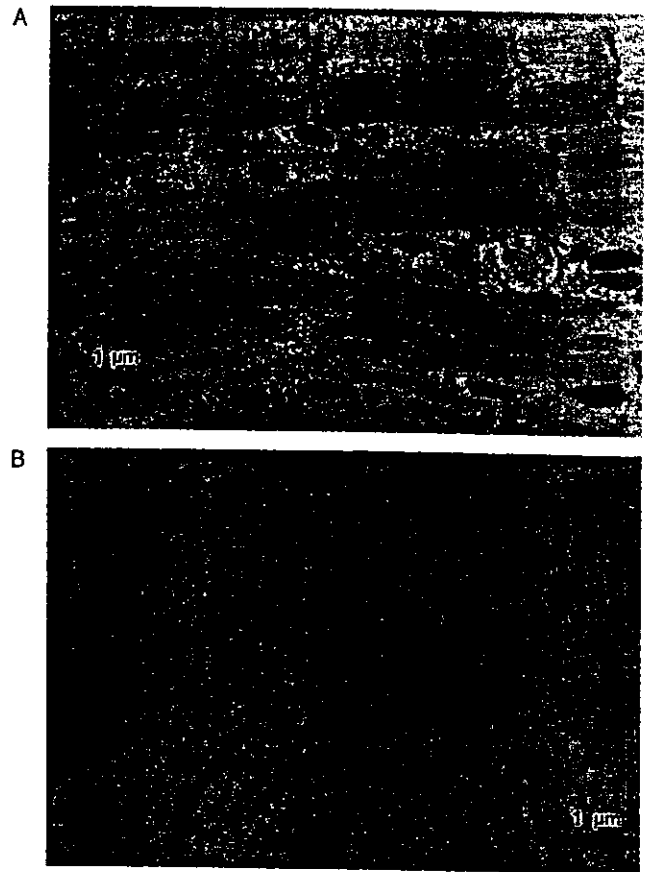


図5 CMG細胞の透過型電子顕微鏡写真  
A：典型的な横紋構造が観察される。B：核周囲には幼弱な分泌顆粒(心房顆粒)が観察された。〔文献4〕より引用

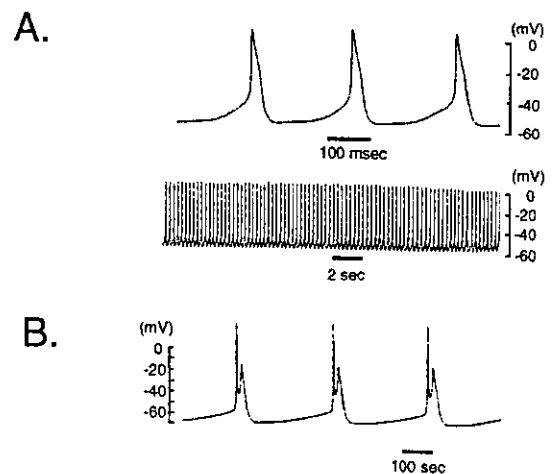


図6 CMG細胞の活動電位  
CMG細胞の活動電位はおおむね2通りの形が観察された。A：洞結節型活動電位。B：心室筋型活動電位。  
〔文献4〕より引用

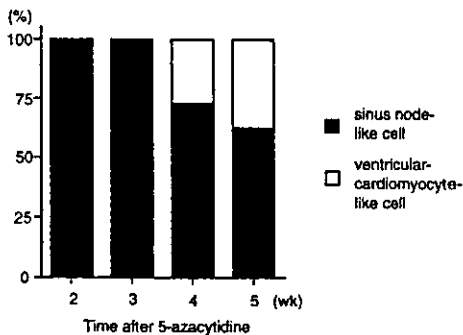


図7 CMG細胞の活動電位の経時的变化

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、Ca<sup>2+</sup>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<sup>9)</sup>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变化を示した。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<sub>K1</sub>(IRK1)、再分極時に発現するI<sub>Kr</sub>(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I<sub>f</sub>

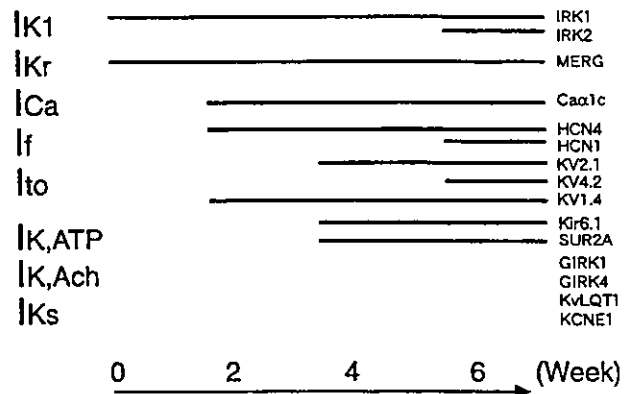


図8 遺伝子レベルでみたイオンチャネルの発現形式  
横軸は分化誘導からの時間経過を週数で示した。

〔文献4〕より引用

(HCN4)、L型Ca<sup>2+</sup>電流I<sub>CaL</sub>(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<sub>o</sub>(Kv2.1, Kv4.2, Kv1.4)およびI<sub>K,ATP</sub>(Kir6.2, SUR2A)等が発現した。心房筋に発現するI<sub>K,Ach</sub>(GIRK1, GIRK4)、成体心筋で発現するI<sub>Ks</sub>(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变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

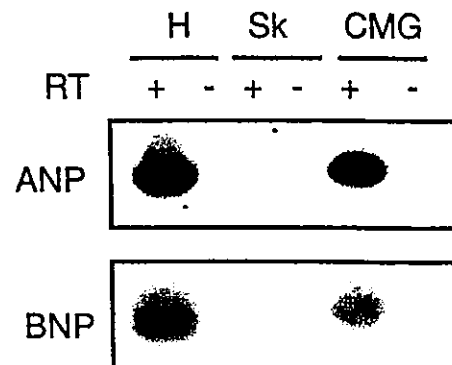


図9 CMG細胞におけるANP、BNPの発現  
Hは心臓、Skは骨格筋、CMGはCMG細胞を示す。

〔文献4〕より引用



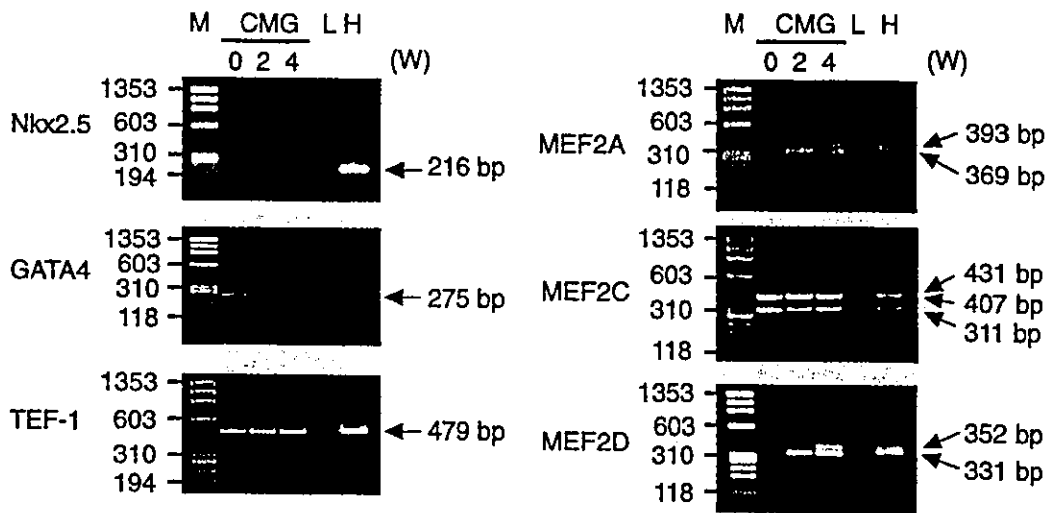


図10 CMG細胞における心筋特異的転写因子の発現

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<sup>10), 11)</sup>，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<sup>12)</sup>，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。

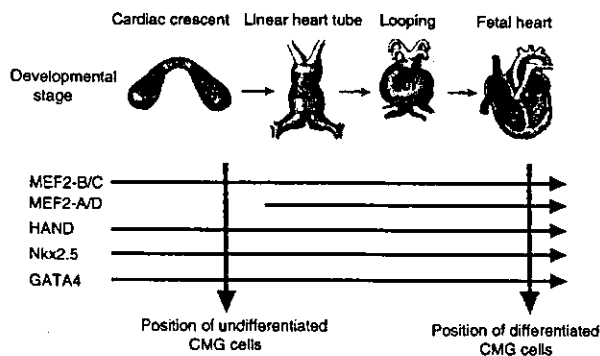


図11 心臓の分化過程における転写因子の発現とCMG細胞の遺伝子発現

[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 $\alpha_1$ 受容体の発現と機能

心筋細胞には $\alpha_1$ 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 $\alpha_1$ 受容体には3種類のアイソフォーム( $\alpha_{1A}$ ， $\alpha_{1B}$ ， $\alpha_{1D}$ )が存在することが

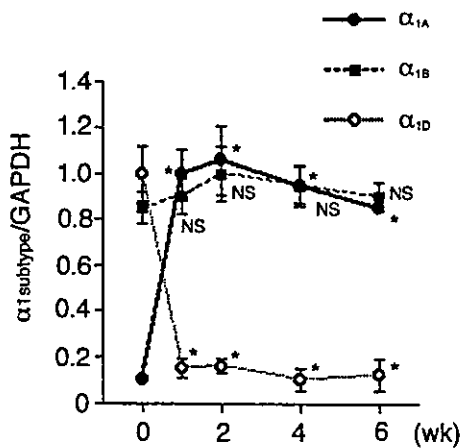


図12 骨髄細胞由来の再生心筋細胞における交感神経 $\alpha_1$ 受容体の発現の解析  
RT-PCRによる $\alpha_1$ 受容体サブタイプ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ )発現の定量的評価。横軸は分化誘導からの時間(週数)を示す。心筋分化が進むと $\alpha_{1A}$ 受容体の発現が増加し、 $\alpha_{1B}$ 受容体の発現が低下した。〔文献5〕より引用]

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 $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ 受容体であり、わずかに $\alpha_{1D}$ 受容体が発現していることが知られている<sup>13), 14)</sup>。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 $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1B}$ 受容体が発現し、若干の $\alpha_{1A}$ 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、 $\alpha_{1A}$ 受容体の発現は増加し、 $\alpha_{1B}$ 受容体の発現は一定、 $\alpha_{1D}$ 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 $\alpha_1$ 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

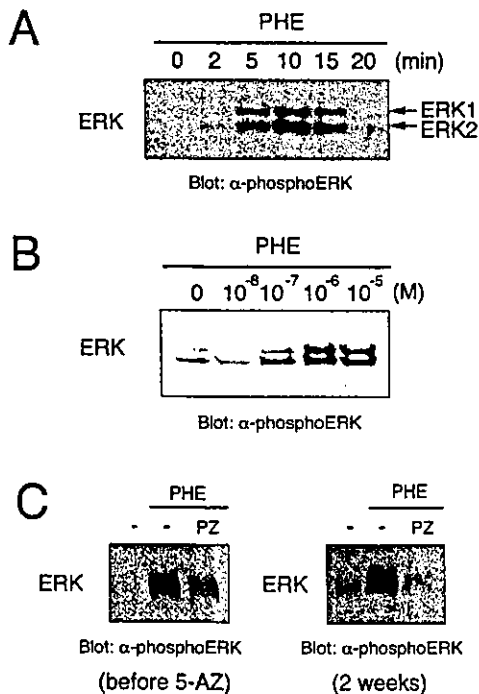


図13 再生心筋細胞を $\alpha_1$ 受容体刺激薬フェニレフリン(PHE)で刺激した際のシグナルの活性化MAPKファミリーのERKの活性化をリン酸化ERKの抗体で解析した。Aは時間経過、Bは濃度依存性をみたものである。Cは $\alpha_1$ 受容体遮断薬プラゾシン(PZ)を前投与した際のERKの活性化をみたもので、プラゾシン前投与により完全にリン酸化が抑制されている。〔文献5〕より引用]

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

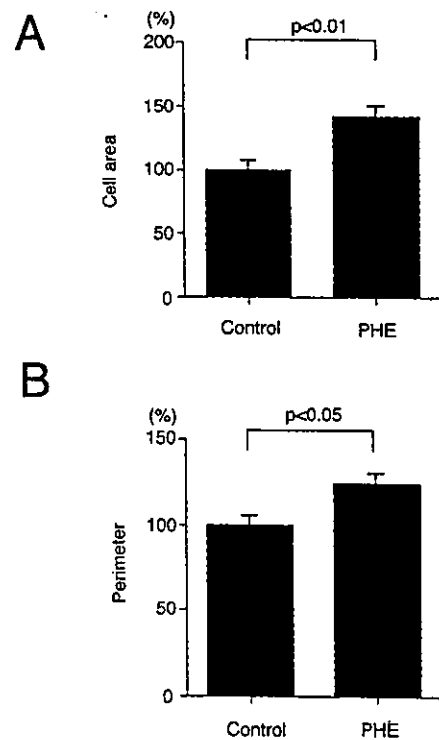


図14 再生心筋細胞を $\alpha_1$ 受容体刺激薬フェニレフリン(PHE)で刺激した際の細胞表面積(A)と周長(B)の変化

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 $\alpha_1$ 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 $\alpha_1$ 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 $\alpha_1$ 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.

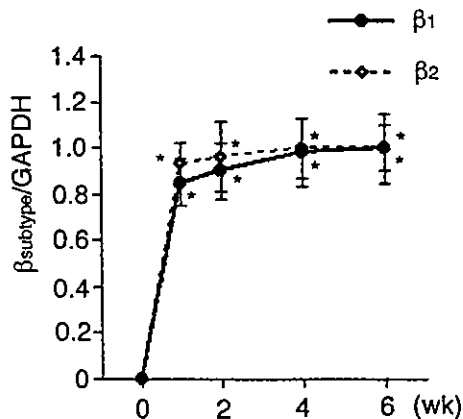


図15 骨髄細胞由来の再生心筋細胞における交感神経 $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体の発現の解析

RT-PCRによる $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体サブタイプ発現の定量的評価. 心筋分化が進むと $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 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 $\beta$ 受容体の発現と機能

心筋細胞では交感神経 $\beta$ 受容体はよく知られているように $\beta_1$ ,  $\beta_2$ の2種類の受容体が存在する<sup>15), 16)</sup>.  $\beta_1$ 受容体は心筋細胞特異的に発現するが,  $\beta_2$ 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 $\beta_1$ 受容体が約80%,  $\beta_2$ 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 $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体とも心筋細胞の

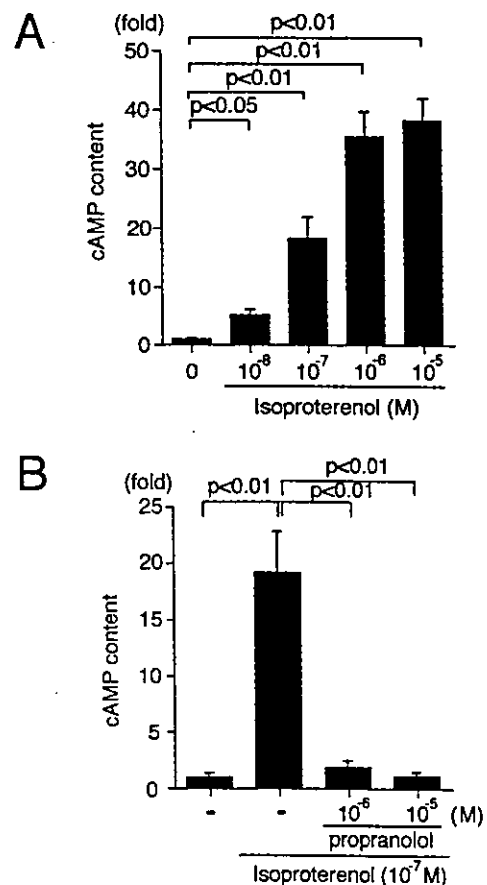


図16 再生心筋細胞を $\beta$ 受容体刺激薬イソプロテレンールで刺激した際のセカンドメッセンジャーcAMPの変化(文献5)より引用

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 $\beta$ 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*	100 ± 19 †	138 ± 24 †	37.6 ± 19 ‡
細胞収縮距離 ( $\mu$ 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 ( $\mu$ 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)。

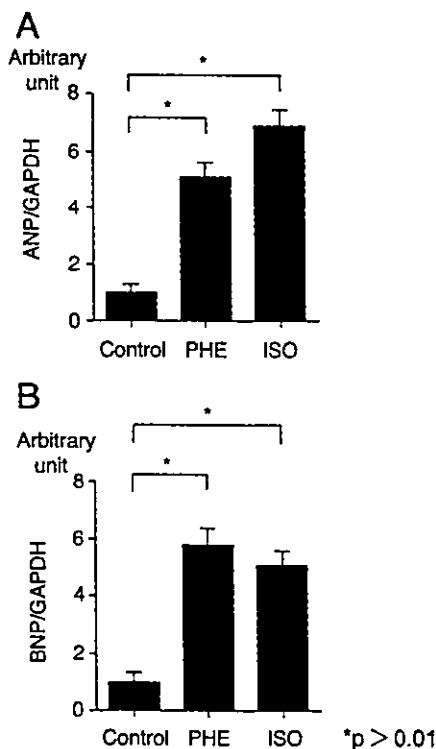


図17 再生心筋細胞をフェニレフリン(PHE)あるいはイソプロテレノール(ISO)で刺激した際の肥大マーカー遺伝子ANP, BNPの遺伝子発現の変化 [文献5)より引用]

再生心筋細胞を $\alpha_1$ 刺激あるいは $\beta$ 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 $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 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,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 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 $\beta$ 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,  $\beta_1$ 選択性遮断薬CGP20712A,  $\beta_2$ 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 $\alpha_1$ あるいは $\beta$ 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  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  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  $\beta_1$  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<sup>17)~19)</sup>。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  $\beta$  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

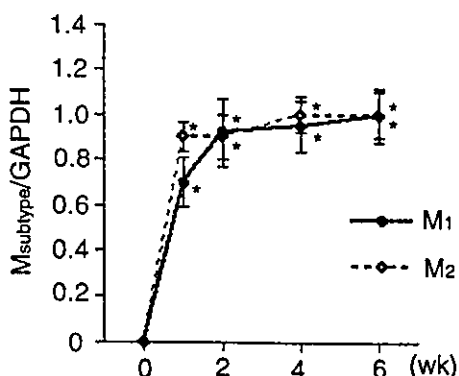


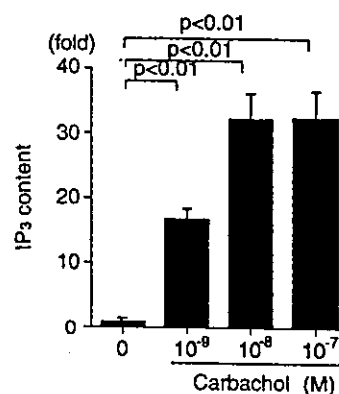
図18 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるムスカリン  $M_1$ ,  $M_2$  受容体の発現の解析

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  $C_\beta$  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<sup>20)</sup>。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

A.



B.

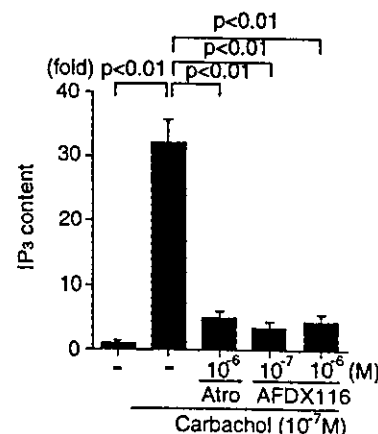


図19 再生心筋細胞をムスカリン刺激薬カルバコールで刺激した際のセカンドメッセンジャー  $IP_3$  の変化〔文献5〕より引用

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M<sub>2</sub>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M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>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M<sub>2</sub>受容体であることを示している。

### Ⅹ. 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、収縮力の調整が行いえない。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。

### Ⅺ. 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<sup>1)</sup>, 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	大量培養不可。	心臓組織を材料とするため難しい。バイオブ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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。

## 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<sup>3)</sup>。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<sup>3)</sup>。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

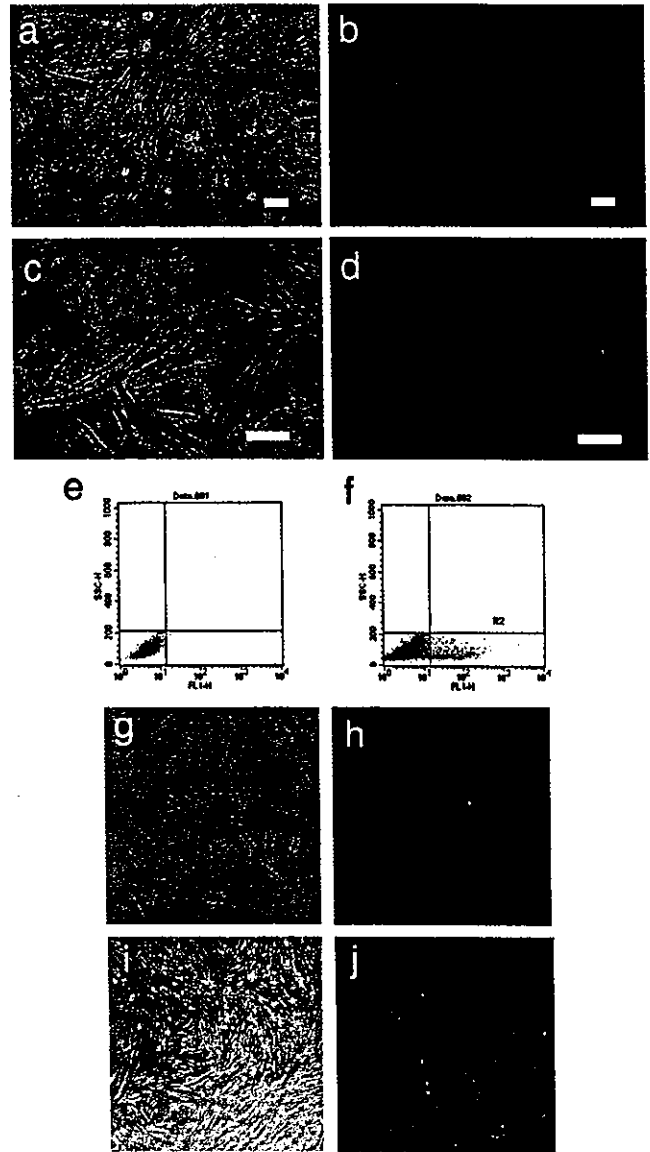


図1 再生心筋細胞の単離  
心室筋特異的蛋白であるミオシン軽鎖-2vの遺伝子のプロモーターに蛍光色素GFPを組み替えたプラスミドを骨髄間葉系幹細胞に遺伝子導入し、分化誘導を行ったもの。一部の細胞がGFP陽性になり(a, b)、拍動を開始する(c, d)。GFP陽性になった時期にFACSセルソーターにより細胞を分取する(e, f)と心筋細胞のみが得られる(g~j)。(文献<sup>3)</sup>より一部改変引用)

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

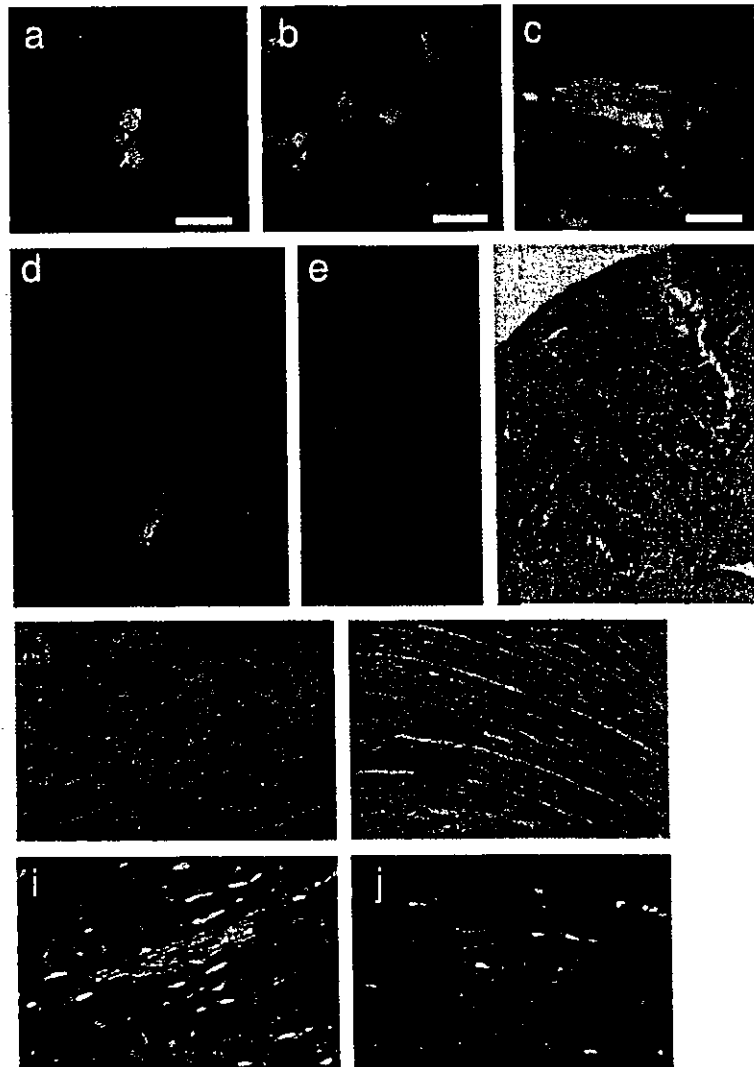


図2 再生心筋細胞の移植

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<sup>3)</sup>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<sup>4)</sup>(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

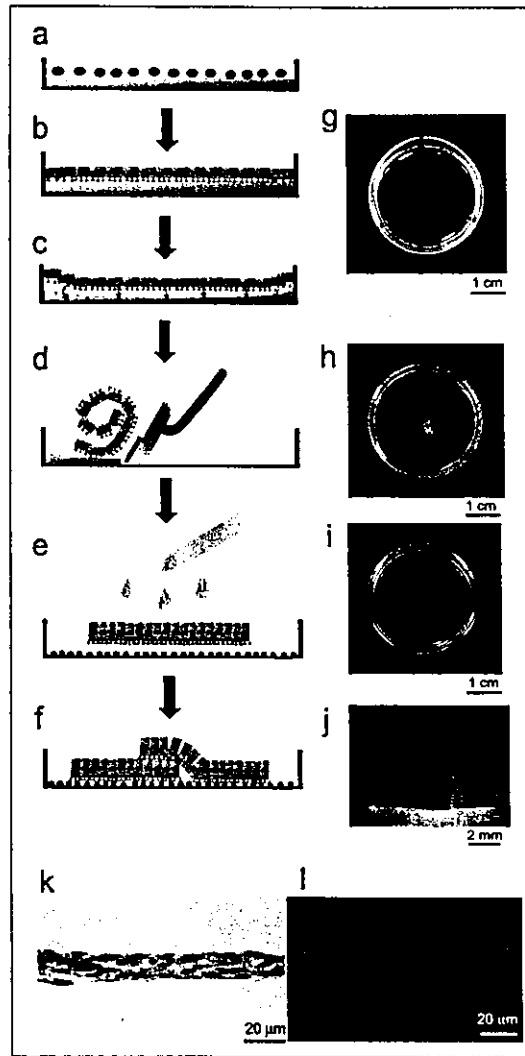


図3 心筋細胞シートの作成  
 フィブリンポリマー膜でコートした培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法。フィブリンポリマーは心筋細胞より分泌される種々の内因性プロテアーゼにより次第に分解され、容易に培養皿表面から剥離できる。これを利用すると簡単に心筋細胞シートが作成できる。a~fは概念図、g~jは実際の様子、k,lは心筋細胞シートをHE染色あるいは免疫蛍光染色したもの。  
 (文献<sup>9)</sup>より一部改変引用)

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<sup>9)</sup>。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