

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に
関する研究 (H15-再生-007)

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
骨髓細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト骨髓由来の間葉系幹細胞の調整と寿命延長法の開発-----	10
梅澤 明弘	
2. ヒト幹細胞の完全ヒト型培養システムの開発と臨床材料の提供-----	21
藤本 純一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	30

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究

主任研究者 小室 一成 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授

研究要旨

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞に加えて、寿命を延長したヒト子宮内膜由来細胞も胎児心筋細胞との共培養により心筋細胞に分化することが明らかになった。ストローマ細胞である OP9 細胞は P19CL6 細胞を心筋細胞に分化させる因子を分泌しているが、DNA chip による解析によりその因子の一つを同定した。造血サイトカインが心筋梗塞後の左室機能に保護的に作用する機序を解明した。血清成分比率を可能な限り低下させた、臨床応用可能な完全ヒト型幹細胞培地を開発した。

分担研究者

梅澤明弘 国立成育医療センター成育医療研究部長

藤本純一郎 国立成育医療センター研究所副所長

A. 研究目的

心筋梗塞や心筋症による重症心不全に対する根本治療には、脳死患者よりの生体心移植以外存在しないが、ドナー不足は社会問題となっていることは周知である。したがって、心筋再生療法は心不全・心筋梗塞の新しい治療法として注目されている。本研究において、①ヒト骨髄間葉系幹細胞を *in vitro* で心筋細胞へ形質転換させる方法の開発とそれを誘導する分子の単離、② *in vivo* で骨髄細胞が心臓へ遊走し、心筋細胞へ形質転換する分子機序の解明、③ヒト骨髄間葉系幹細胞をモデルとした完全ヒト型培養システムの開発と幹細胞の規格化の3点を目的としているが、平成16年度はストローマ細胞に由来する心筋誘導分子の精製、単離、

梗塞心における骨髄細胞やケモカインやサイトカインの心機能改善における役割および機序の解明、不死化ないし寿命を延長させたヒト骨髄間葉系幹細胞を高率に心筋細胞に分化させる方法の開発、心筋分化誘導可能なヒト骨髄以外の間葉系細胞の探索、寿命延長化した間葉系幹細胞を用い細胞増殖性を指標に血清代替組成のスクリーニングを行い、培地の無血清化を試みた。

B. 研究方法

1)心筋誘導因子の解明

ストローマ細胞である OP9、PA6 細胞の培養液中には、ES 細胞や P19CL6 細胞を心筋細胞に形質転換させる因子が存在する。ES 細胞、P19CL6、ヒト骨髄間葉系幹細胞を、OP9 または PA6 細胞培養上清内で培養して自律拍動、心筋収縮蛋白の発現により最も高率に心筋細胞に形質転換する組み合わせを検討した結果から OP9 と P19CL6 細胞を選択した。次に、OP9 培養上清中に存在する心筋

細胞分化誘導因子を発現クローニングまたは DNA Chip により同定を試みた。また、心筋細胞分化誘導因子蛋白をゲル濾過法やイオン交換クロマトグラフィー法などにより精製を試みた。

2) 骨髄細胞の心筋細胞へ形質転換する分子機序の解明

G-CSF は心筋梗塞後のリモデリングを抑制するが、その際、骨髄細胞から心筋細胞に形質転換する細胞数の増加はない。G-CSF による梗塞後リモデリング改善の分子機序を解析した。

3) ヒト間葉系細胞の寿命延長と心筋分化誘導

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて in vitro と in vivo において心筋に分化するかどうかを検討した。ヒト骨髄間葉系細胞を限外希釈法でサブクローニングをして得られた細胞に、レトロウィルスを用いて TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入した。得られたヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を GFP で標識し、マウス胎児心筋細胞と共培養することで心筋へ分化させ、さらに免疫組織化学を用いて抗心筋トロポニン抗体で評価した。また、免疫不全マウスの心筋にヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を注射し、心筋への分化を免疫組織化学により評価した。

4) 心筋細胞への分化能を有する細胞の単離

ヒトの子宮内膜細胞または月経血由来細胞を単離した後に、ウシ等の血清を 5~20% 添加した、 α -MEM (α -minimum essential medium)、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、DMEM/F-12、IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium) 等の細胞培養液内で、33~37℃、5~10% の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養した。これらの細胞をマウスの胎児心筋細胞と共培養、DNA の脱メチル化剤処理による分化誘導、胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子による分化誘導、心筋細胞への分化能を有する細胞または該細胞から分化した心筋

細胞の培養上清による分化誘導などの方法により、心筋細胞へ分化する能力があるか心筋特異的遺伝子、蛋白の発現、活動電位を指標として検討した。

5) 完全ヒト型幹細胞培養法の確立

遺伝子導入により寿命を延長したヒト間葉系幹細胞を用い、培地組成、増殖因子、細胞増殖動態などについて有効な成分・濃度を検討し、至適化を行った。具体的には、間葉系幹細胞を 24 穴プレートに播種し、各組成を添加した後、4~5 日培養後の WST-1 による細胞量並びに顕微鏡観察による細胞形態を評価した。骨髄より細胞を採取し、至適化した培地と従来培地 (10% 血清含有培地) でそれぞれ継代培養を行い、それぞれの細胞増殖動態を比較検討した。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を 10% 牛胎児血清含有 DMEM (従来培地) と完全ヒト型幹細胞培地で継代培養を行い、30 日以上継代した細胞について細胞表面マーカーの発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている (国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認)。

実験動物を用いる研究については、千葉大学並びに国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して (動物実験委員会に現在・申請済み) 研究を実施する。特に実験は、動物愛護と動物福祉の観点から動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際の手技は、麻酔等手段により苦痛を与えない配慮をおこなう。実験者は、管理

者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1) 心筋誘導因子の解明

ES 細胞、P19CL6、ヒト骨髄間葉系幹細胞を、OP9 または PA6 細胞培養上清内で培養した結果、OP9 細胞の培養液の心筋分化誘導効率がよいことが明らかになった。また、OP9 の全長 DNA より発現ベクターライブラリーを作成し、P19CL6 細胞に cDNA を導入し、P19CL6 細胞の心筋細胞への分化効率を自律拍動の有無、心筋蛋白、遺伝子の発現をもとに検討した結果、心筋への分化を促進する cDNA ライブラリーが存在することが明らかになった。OP9 細胞の DNA chip 解析の結果から、OP9 細胞に多く発現している分泌蛋白について解析し、P19CL6 細胞を高率に心筋細胞に分化させる因子を同定した。

2) 骨髄細胞の心筋細胞へ形質転換する分子機序の解明

心筋梗塞組織では G-CSF 受容体の発現増加と Stat3 のリン酸化が認められたが、G-CSF 投与により梗塞後早期から Stat3 のリン酸化が認められた。Dominant negative Stat3-発現マウスと野生型マウスの比較により、G-CSF 投与による梗塞面積、左室拡張末期径、短縮率、左室拡張末期圧の改善、アポトーシス抑制、毛細血管数増加効果は G-CSF を介する JAK-Stat シグナルが関与していることが明らかになった。

3) ヒト間葉系細胞の寿命延長と心筋分化誘導

寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞にアデノウイルスにより green fluorescent protein(GFP)を発現させた後に、脱メチル化剤である 5-azacytidine 処理し、マウス胎児心筋細胞と共培養した。GFP 陽性細胞は共培養 2 日後に筋管細胞様に延長し、3 日後には GFP 陽性の横紋構造を有する細胞が拍動する像が認められ、トロポニン I を発現していた。また、ヒト心房性ナトリウム

利尿ホルモン (hANP)、心筋特異的転写因子である Csx、およびミオシン軽鎖の発現も認められた。分化心筋細胞の活動電位は、共培養 7 日目では、膜電位が浅い胎児型的心筋細胞様であり、不規則なリズムを示したが、3 週間の培養により、膜電位は深く、リズムは規則的になり、培養を継続することによって、より成熟した心筋細胞に分化することが証明された。

GFP 陽性ヒト骨髄間質細胞と Lac-Z 陽性マウス心筋細胞の共培養を行ったが、GFP およびトロポニン I 陽性の分化誘導細胞は Lac-Z を発現していなかった。また、コラーゲンフィルムを挟んで、マウス心筋細胞とヒト骨髄間質細胞を培養した際も、GFP 陽性細胞中にトロポニン I 陽性の細胞を認めた。2つの結果より、ヒト分化心筋細胞はマウス心筋細胞と細胞融合していないと考えられた。

骨髄以外にも、胃大網組織、陰茎皮下組織、胎盤組織、臍帯血、子宮内膜などに、間葉系幹細胞が存在することが知られている。骨髄間葉系幹細胞と同様の手法でこれら細胞の心筋への分化能を検討した結果、幾つかのサブクローンにおいて、90%以上の細胞が心筋へと分化することが確認された。

4) 心筋細胞への分化能を有する細胞の単離

ヒト月経血およびヒト子宮内膜由来細胞にレトロウイルスベクターを用いて不死化遺伝子を導入し、さらに、レトロウイルスベクター LXSN-16E7、LXSH-hTERT および MSCVpuro-16E6SDD151 を導入してヒト子宮内膜由来不死化細胞株を得た。このヒト子宮内膜由来不死化細胞株にアデノウイルスにより GFP を発現させた後に、未処理または 5-aza-C 処理後に、マウス胎児由来心筋細胞と共培養した。1 週間マウス胎児由来心筋細胞と共培養を行った後に、抗ヒト CD59 抗体を用いて磁気マイクロビーズを用いてヒト由来の細胞のみ回収して、細胞内抗原でヒト心筋特異的なタンパク質である Troponin I に対する抗体を用いて染色を行

った。その結果、マウス胎児由来心筋細胞と共培養した条件では、5-aza-C 処理した2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株は、ほぼ100%、従来心筋誘導に不可欠と考えられていた5-aza-Cの処理をしなかった2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株においても約80%のTroponin I陽性率を示した。また、コラーゲンフィルムを挟んだ培養法により、分化心筋細胞が細胞融合によるものでは無いことを確認した。ヒト子宮内膜由来不死化細胞株由来心筋細胞は、心筋細胞特異的な遺伝子として、ナトリウム利尿ペプチドであるANPおよびBNP、筋肉収縮を調節するタンパク質であるTroponin TおよびTroponin I、アクチンであるcardiac actin、ミオシン軽鎖であるMLC-2a、心筋細胞特異的転写因子であるCsx、GATA4のmRNAが発現していることが観察され、収縮蛋白による横紋構造を呈した。電氣的結合を示すコネキシン43は分化心筋細胞間に発現し、作業心筋型および、洞結節細胞型の活動電位を示した。

ヒト子宮内膜由来不死化細胞株には、心筋細胞特異的遺伝子mRNAが、共培養する前から発現していることが観察された。不死化による遺伝子導入によって、間葉系細胞の性質自体が変化しないことから、このような心筋先祖細胞と呼べるような間葉系幹細胞が子宮内膜には多量に存在している可能性が示唆された。

5)完全ヒト型幹細胞培養法の確立

寿命延長したヒト骨髓間質細胞株UEET-12を用いて、MEM系、HAM系或いはこれらの改変・混合培地など約30種類の基礎培地から低血清下で良好な増殖性を示す培地を選定した。ついで、入手可能な既知の増殖因子(十数種類)について増殖性を検討した。その結果、UEET-12についてはPDGFが極めて良好な、更にEGF、bFGF、LIFについても良好な増殖性を示した。より十分な増殖を得る為、PDGFに他の増殖因子を組み合わせた場合も検討した。その結果、LIF或いはVEGFの添加により相乗的効果が認められた。これら増

殖因子に対する反応性は細胞のクローン間で共通する傾向はあるものの、最適な増殖因子、及びその組合せは異なった。よって、最終的な増殖因子の最適化は複数のクローンでの成績を総合的に評価した。

更に、ホルモン、脂質など約20種類の成分を評価・最適化することで改良培地を得た。このようにして得られた改良培地では従来培地と異なり無血清化でも10%血清存在化と同等の増殖性を示した。ただし継代培養に供した場合、無血清下では著しい接着性の低下が認められた。接着性の低下はフラスコ表面をファイブロネクチンコートすることで緩和しうるが、十分な接着性を回復するに至らなかった。ただし、1%程度の低濃度の血清を加えることで接着機能の低下を抑制することができた。そこで、最終的に1%の血清成分を含む改良培地組成を確立した。

ヒト間葉系幹細胞を従来の10%牛血清含有培地と本改良培地で継代培養したのちFACSにより細胞表面マーカーの発現を調べたが相違は認められなかった。また、ヒト骨髓液を等量に分け、10%牛血清含有培地と本改良培地で分離培養を行ったところ、本改良培地では培養初期において多数のクローン増殖が認められ、増殖能が高く、14日間の培養で10%牛血清含有培地より約100倍量の細胞数を得ることができた。

D. 考察

ストローマ細胞は支持細胞として分泌因子、接着因子、マトリックスを産生し、細胞の分化制御、誘導に関与している。Teratcarcinoma由来のP9CL6細胞はDMSOにより高率に心筋細胞へ分化するが、その機序は明らかではない。現在我々がスクリーニングしているストローマ細胞由来の心筋誘導因子が同定されれば、心筋細胞への分化の分子機序の解明に大きく前進すると考えられる。細胞が他の細胞の形質を獲得する機序にtransdifferentiationと細胞融合が存在する。我々

は、GFP陽性のヒト骨髄間葉系細胞とLac-Z陽性マウス心筋細胞を共培養したが、GFPおよびトロポニンI陽性の分化誘導細胞はLac-Zを発現しておらず、ヒト骨髄間葉系細胞はマウス心筋細胞との細胞融合ではなく、transdifferentiationにより分化していると考えられた。また、子宮内膜細胞をはじめとして、骨髄以外のさまざまな臓器に存在する間葉系幹細胞が、高率に心筋に分化する能力を有していることが判明した。したがって、不特定多数の若年者から容易に採取できる体細胞を用いて、無痛性で、繰り返し、大量に採取出来、あらゆるHLAに対応した細胞バンクシステムを形成する事が可能と考えられる。無血清化には至らなかったが、1%血清及び増殖因子(ヒト型組替え体)、ヒト由来蛋白質を含む改良培地を確立した。本培地は血清成分を自己血清に代替することで完全ヒト型合成培地とすることができる。これにより本件研究の目標である「臨床試験に適応できる安全な培地」を提供することが可能である。患者から採取可能な自己血清の量的限界を考慮すると、血清成分を1%に低下させることは、10~20%量の患者自己血清を含有する培地と比較して、その有用性は明らかである。また、優れた増殖性を示す点は培養期間を短縮する上で有利である。

本研究では間葉系幹細胞のクローンにより最適な増殖因子が必要なことを明らかにした。ある分化特性を有する細胞だけを選択的に増殖させるクローン選択培地が作製できる可能性がある。また、分裂回数に限界がある初代細胞においては大量の細胞を得る為には細胞寿命をのばすことが必要である。細胞寿命には活性酸素や浸透圧などの培養ストレスが関与している。より大量の細胞を得る為には今後はこれら培養ストレスを除去する検討が必要である。

E. 結論

ストローマ細胞は心筋分化誘導因子を発現して

いた。また、寿命延長したヒト骨髄間葉系細胞は心筋細胞に分化することがin vitro、in vivoの実験から明らかになった。ヒト骨髄間質細胞においてはCD34-、CD90+、CD105+、CD117-の細胞群は、少なくとも心筋分化能を有する細胞であると考えられる。また、骨髄間質細胞以外にも、心筋への分化能を有する間葉系幹細胞が存在することを確認した。ヒト間葉系幹細胞に対して優れた増殖性を示す低血清ヒト型合成培地を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ohtsuka, M., Takano, H., Suzuki, M., Zou, Y., Akazawa, H., Tamagawa, M., Wakimoto, K., Nakaya, H., Komuro, I. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in myocardial ischemia/reperfusion injury: evaluation using a heterozygous Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 849-853, 2004.
- (2) Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H., Komuro, I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J* 23: 212-220, 2004.
- (3) Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., Komuro, I. Adult cardiac Sca-1 positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279:11384-11391, 2004.
- (4) Ohsawa, Y., Toko, H., Katsura, M., Morimoto, K., Yamada, H., Ichikawa, Y., Murakami, T., Ohkuma, S., Komuro, I., Sunada, Y. Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in association with increased endothelial nitric oxide

- synthase activity. *Hum Mol Genet* 13: 151-157, 2004.
- (5) Funabashi, N., Sekine, T., Komuro, I. Patency of the left subclavian artery following implantation of stent graft to rectify a stenosis, as demonstrated by multislice computed tomography. *Heart* 90:362, 2004.
- (6) Minamino, T., Miyauchi, H., Tateno, K., Kunieda, T., Komuro, I. Akt-induced Cellular Senescence: Implication for Human Disease. *Cell Cycle* 3:449-451, 2004.
- (7) Ohtsuka, M., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Akazawa, H., Qin, Y., Suzuki, M., Hasegawa, H., Nakaya, H., Komuro, I. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 18:851-853, 2004.
- (8) Toko, H., Zou, Y., Minamino, T., Sakamoto, M., Sano, M., Harada, M., Nagai, T., Sugaya, T., Terasaki, F., Kitaura, Y., Komuro, I. Angiotensin II Type 1a Receptor Is Involved in Cell Infiltration, Cytokine Production, and Neovascularization in Infarcted Myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:664-670, 2004.
- (9) Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Tateno, K., Kunieda, T., Komuro, I. Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol* 36:175-183, 2004.
- (10) Akazawa, H., Kudoh, S., Mochizuki, N., Takekoshi, N., Takano, H., Nagai, T., Komuro, I. A novel LIM protein Cal promotes cardiac differentiation by association with CSX/NKX2-5. *J Cell Biol* 164:395-405, 2004
- (11) Kasai, H., Yao, A., Oyama, T., Hasegawa, H., Akazawa, H., Toko, H., Nagai, T., Kinugawa K, Kohmoto, O., Maruyama, K., Takahashi, T., Nagai, R., Miyawaki, A., Komuro, I. Direct measurement of Ca²⁺ concentration in the SR of living cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 314:1014-1020, 2004.
- (12) Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., Toko, H., Tamura, K., Kihara, M., Nagai, T., Fukamizu, A., Umemura, S., Iiri, T., Fujita, T., Komuro, I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6:499-506, 2004.
- (13) Ogihara, T., Asano, T., Katagiri, H., Sakoda, H., Anai M., Shojima, N., Ono, H., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Noguchi, N., Aburatani, H., Gotoh, Y., Komuro, I., Fujita, T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappaB pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia* 47:794-805, 2004.
- (14) Takano, H., Hasegawa, H., Zou, Y. and Komuro, I. Pleiotropic Actions of PPAR Activators Thiazolidinediones in Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 10:2779-2786, 2004.
- (15) Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Tateno, K., Komuro, I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol* 2:141-148, 2004.
- (16) Funabashi, N., Ishida, A., Yoshida, K., Komuro, I. Images in cardiovascular medicine. Double aortic arch with a compressed trachea demonstrated by multislice computed tomography. *Circulation* 110:e68-e69, 2004.
- (17) Hayashi, D., Kudoh, S., Shiojima, I., Zou, Y., Harada, K., Shimoyama, M., Imai, Y., Monzen, K., Yamazaki, T., Yazaki, Y., Nagai, R., Komuro, I. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 322:310-319, 2004.
- (18) Teramoto K, Daimon M, Hasegawa R, Toyoda T, Sekine T, Kawata T, Yoshida K, Komuro, I. Acute effect of oral vitamin C on coronary circulation in young healthy smokers. *Am Heart J*: 148:300-305, 2004.
- (19) Funabashi, N., Kobayashi, Y., Kudo, M., Asano, M., Teramoto, K., Komuro, I., Rubin, G.D. New method

of measuring coronary diameter by electron-beam computed tomographic angiography using adjusted thresholds determined by calibration with aortic opacity. *Circ J* 68:769-777, 2004.

(20) Akazawa, H., Komazaki, S., Shimomura, H., Terasaki, F., Zou, Y., Takano, H., Nagai, T., Komuro I. Diphtheria toxin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in mouse model of heart failure. *J Biol Chem* 279:41095-41103, 2004.

(21) Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, Nosaka T, Morikawa Y, Hisaoka T, Manabe I, Maemura K, Nakaoka T, Imamura T, Miyazono K, Komuro I. Nagai R, Kitamura T. Vascularin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10732-10737, 2004.

(22) Yamamoto, M., Komiyama, N., Koizumi, T., Nameki, M., Yamamoto, Y., Toyoda, T., Okuno, T., Tateno, K., Sano, K., Himi, T., Kuriyama, N., Namikawa, S., Yokoyama, M., Komuro. I. Usefulness of rapid quantitative measurement of myoglobin and troponin T in early diagnosis of acute myocardial infarction. *Circ J* 68:639-644, 2004.

(23) Toyoda, T., Akasaka, T., Watanabe, N., Akiyama, M., Neishi, Y., Kume, T., Komuro. I., Yoshida K. Evaluation of abnormal motion of interventricular septum after coronary artery bypass grafting operation: assessment by ultrasonic strain rate imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 17:711-716, 2004

(24) Matsuura, K., Wada, H., Nagai, T., Iijima, Y., Minmino, T., Sano, M., Akazawa, H., Molkenstin J.D, Kasanuki, H., and Komuro. I. Cardiomyocytes fuse with surrounding non-cardiomyocytes and re-enter the cell cycle. *J Cell Biol* 167:351-363, 2004.

(25) Naito, A.T., Minamino, T., Tateno, K., Nagai, T., Komuro. I. Steroid-responsive thromboangiitis obliterans. *Lancet* 364:1098, 2004.

(26) Komuro. I., Ohtsuka, M. Forefront of Na⁺/Ca²⁺

exchanger studies: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger-lessons from knockout mice. *J Pharmacol Sci* 96:23-26, 2004.

(27) Toyoda, T., Baba, H., Akasaka, T., Akiyama, M., Neishi, Y., Tomita, J., Sukmawan, R., Koyama, Y., Watanabe, N., Tamano, S., Shinomura, R., Komuro. I., Yoshida, K. Assessment of regional myocardial strain by a novel automated tracking system from digital image files. *J Am Soc Echocardiogr* 17:1234-1238, 2004.

(28) Iwanaga, K., Takano, H., Ohtsuka, M., Hasegawa, H., Zou, Y., Qin, Y., Odaka, K., Hiroshima, K., Tadokoro, H., Komuro. I. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun* 325:1353-1359, 2004.

(29) Iwamoto, T., Kita, S., Zhang, J., Blaustein, M.P., Arai, Y., Yoshida, S., Wakimoto, K., Komuro. I., Katsuragi, T. Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca²⁺ entry via Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med* 10:1193-1199, 2004.

(30) Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., Akazawa, H., Kunieda, T., Zhu, W., Hasegawa, H., Kunisada, K., Nagai, T., Nakaya, H., Yamauchi-Takahara, K., Komuro. I. G-CSF prevents cardiac Remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes. *Nat Med* 11:305-311, 2005.

(31) Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A: Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316: 141-153, 2004

(32) Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical

Carcinogenesis and Tumor Progression. Cancer Res, 64: 3545-3549, 2004

(33) Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A.: Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?, J Gene Med, 6:833-845,2004

(34) Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.: Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes, Biomacromolecules, in press.

2. 学会発表

小室 一成

(1) 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会ランチョンセミナー(平成 16 年 3 月 27 日～29 日、東京) 学術集会ランチョンセミナー「Inverse agonist としての ARB」

(2) 第 65 回冠循環器談話会(平成 16 年 3 月 28 日、東京)「心筋障害と心不全」

(3) 日本内科学会北陸支部主催第 32 回生涯教育講演会(平成 16 年 6 月 6 日、石川)「心不全治療の新たな展望」

(4) 日本心臓病学会アドバンスコース・ランチョンセミナー(平成 16 年 6 月 20 日、東京)「Cardiovascular continuum における ARB の有用性～Inverse Agonist の可能性～」

(5) 第 77 回日本内分泌学会ランチョンセミナー(平成 16 年 6 月 24 日、京都)「心臓におけるアルドステロンの作用機構」

(6) 第 80 回日本獣医循環器学会学術集会(平成 16 年 6 月 27 日、東京)「心臓の発生と再生」

(7) 第 52 回日本心臓病学会学術集会(平成 16 年 9 月 14 日、京都)「心臓障害における AT1 受容体の役割とその新しい活性化機構」

(8) 第 52 回日本心臓病学会学術集会ファイアーサイド・シンポジウム(平成 16 年 9 月 14 日、京都)「21 世紀における慢性心不全治療の新展開」

(9) 第 32 回日本救急医学会総会・ランチョンセミナー(平成 16 年 10 月 27 日、千葉)「慢性心不全治療法の進歩と将来展望」

(10) 第 8 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会・ランチョンセミナー(平成 16 年 11 月 25 日、宮崎)「THE VALUE Study」

(海外)

(1) Komuro I. Expert Workshop Asia Pacific Novel Aspects of Endothelial Dysfunction. (January 12-15, 2004, Singapore, China) Introduction of Telomere Restores Endothelial Dysfunction Associated with Aging.

(2) Komuro I. 2004 International Society for Heart Research World Congress. (August 6-11, 2004, Brisbane, Australia) A novel mechanism of AT1 activation.

(3) Komuro I. The La-Jolla-Capri (Rome)-Research Conference. (October 1-3, 2004, Capri, Italy) G-CSF prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

梅澤 明弘

1) 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内(第 372826 号、平成 11 年 12 月 28 日)

「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際(PCT/JP00/001148、平成 13 年 2 月 28 日)

「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際(PCT/JP00/07741、平成 13 年 11 月 2 日)

「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際(PCT/JP00/09323、平成 13 年 12 月 27 日)

出願人：協和醗酵株式会社

2) 「骨の再生方法」

発明者：梅澤明弘、秦順一、立石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日：第 251365 号、平成 13 年 8 月 22 日

出願人：梅澤明弘、牛田多加志、独立行政法人産
業技術総合研究所

3) 「間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法」

発明者：梅澤明弘、伊澤良兼

出願日：平成 14 年 4 月 17 日

出願番号 特願 2002-115201、

出願人：大塚製薬株式会社

2. 実案新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の調整と寿命延長法の開発

分担研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋に分化するかどうかを検討した。GFP で標識した各種細胞を心筋への分化誘導後、抗心筋トロポニン抗体で評価した。またそれらの細胞をマウスへ移植後、免疫組織科学的な検討を行った結果、寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが明らかとなった。また、骨髄以外の間葉系幹細胞においても、同様の手法を用いて、心筋への分化能を検討した。

A. 研究目的

再生医療が広く注目されている理由のひとつとして、胚性幹細胞（ES 細胞）の樹立、多能性体性幹細胞の発見があげられる。体性幹細胞は成体の臓器に広く存在し、再生医療への応用を目的とした培養、移植実験の報告が多数なされている。心臓は一旦、障害が生ずると十分に再生できないために、これまでに胎児、新生児心筋細胞、骨格筋芽細胞などの移植研究が行われてきた。実際、臨床において急性心筋梗塞患者に骨髄単核球や骨格筋芽細胞を用いた心筋再生治療がすでに用いられ、心機能の改善を得るといった結果が得られている。しかし、障害心筋において機能的にはある程度の改善が得られているものの、実際に十分量の心筋が再生されているかどうかまた、どのようにして心筋が再生されるのかは依然、解明されていない。骨髄には未分化なま

まで増殖を続けることが可能な幹細胞が存在し、種々の細胞に分化しうる事が報告されている。骨髄間葉系幹細胞は *in vitro* におけるマウスの心筋分化が報告されて以来、*in vivo* を中心に研究されてきた。骨髄間葉系幹細胞は自己由来の幹細胞であり、免疫抑制剤が不要であること、骨髄移植と同様の方法で採取でき確立された方法であること、腫瘍化しないことなどから有用な移植源と考えられている。骨髄間葉系幹細胞から分化した心筋細胞は典型的なサルコメア構造と、心房性ナトリウム利尿ペプチドやミオシンなどの心筋特異的遺伝子および蛋白を発現し、ペースメーカー細胞または心室筋様の活動電位とイオンチャンネルの発現を呈する。また、移植された分化心筋細胞は周囲の細胞と Gap junction を形成しすると報告されており、機能的にも十分働きうるものであると考えら

れる。最近では *in vivo* においてヒト骨髄間葉系幹細胞をマウス心臓に移植することで心筋細胞への分化が認められている。本研究は、当研究室で行われてきたマウス骨髄間葉系幹細胞の心筋分化の技術を用いて、ヒト間葉系幹細胞株を樹立し、*in vitro* において心筋へと分化させることを目指す。さらに分化心筋細胞を用いて、心筋分化のメカニズムを解明することにより、より効率よく多量の分化心筋細胞の獲得することにより、従来の細胞移植医療の欠点を克服することを目指す。

また本研究では、子宮内膜または月経血からヒト子宮内膜組織細胞を得て、これらから樹立した不死化細胞株が、心筋細胞との共培養により、不死化細胞を脱メチル化処理しなくとも高頻度で心筋細胞に分化するとの知見を得た。本研究はかかる知見に基づき、子宮内膜または月経血から得られた、心筋細胞に分化する能力を有する細胞の提供をその目的としている。この細胞は、月経血から得ることが出来ることから、その採取にあたり、新たな苦痛を与えることなく、繰り返し、比較的少量の試料を採取することができ、多数の HLA タイプを供給できる点で、従来の心筋細胞に分化する能力を有する細胞に比較して極めて有利である。またこの細胞は不死化されてもよく、その不死化はテロメラーゼまたは Bmi-1 の細胞内発現またはヒトパピローマウイルスの E6 または E7 遺伝子の細胞内発現によりなされている。

B. 研究方法

1) ヒト間葉系細胞の寿命延長

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋に分化するかどうかを検討した。ヒト骨髄間葉系細胞を限外希釈法でサブクローニングをして得られた細胞に、レトロウイルスを用いて TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入した。得られたヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を GFP で標識し、マウス胎児心筋細胞と共培養することで心筋へ分化させ、さらに免疫組織化学を用いて抗心筋トロポニン抗体で評価した。また、免疫不全マウスの心筋にヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を注射し、心筋への分化を免疫組織化学により評価した。

2) フィーダー細胞の準備

骨髄間質細胞と心筋細胞の共培養に使用する心筋細胞を得るために、培養心筋細胞を用いた。具体的に、妊娠 14 日目マウスを頸椎脱臼後、開腹し、胎児を摘出する。さらに開胸した胎児から心臓を摘出し、細断する。心筋細胞塊をトリプシン液で単細胞に分離した後に培養皿に移して培養を開始した。

3) 心筋細胞への分化能を有する細胞の単離

ヒトの子宮内膜より心筋細胞への分化能を有する子宮内膜細胞を取得する方法としては、安全かつ効率的に取得される方法であれば特に限定されないが、*Am. J. Pathol.*, 163, 2259-2269 (03)に記載された方法に基づき行った。

月経血からの単離は以下のとおり行った。まず、月経 1 日目の月経血からの方が獲得される細胞数が多いことから、または月経 1 日

目の月経血を、生理用品ないしは直接、外陰部より採取する。採取した月経血を、1%牛胎仔血清入りの DMEM (Dulbecco's modified MEM) 培地 (ペニシリン・ストレプトマイシンの抗生物質を添加) に入れ、遠心分離により月経血に含まれる細胞を回収した。この細胞を、10%の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM (α -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM) または IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium) 等の細胞培養用培地に再浮遊させることにより、月経血に由来する細胞液を得た。

この方法により単離した細胞の培養は、公知の細胞培養用培地より行われてよいが、または牛等の血清を 10~20% 添加した、 α -MEM、DMEM あるいは IMDM 等の細胞培養用培地や MF 培地 (Toyobo, 大阪) なども可能である。培養条件は、細胞が培養可能であれば特に限定されない。月経血に由来する細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着して増殖した。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシン EDTA 溶液を加えることで細胞を浮遊させる。浮遊した細胞は、PBS あるいは該細胞培養用の培地で洗浄後、該細胞培養用の培地で 5 倍から 20 倍希釈して新しい培養皿に添加することで、さらに継代培養した。

4) 心筋細胞への分化能を有する細胞の培養

上記の方法により単離した、心筋細胞への分化能を有する細胞を培養するために用いる培地としては、公知の細胞培養用培地を用いることができるが、またはウシ等の血清を 5~20% 添加した、 α -MEM、DMEM、DMEM/F-12

または IMDM 等の細胞培養用培地なども可能である。培養条件は、細胞が培養可能であれば特に限定されないが、培養温度は 33~37°C が好ましく、5~10%の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養した。心筋細胞への分化能を有する子宮内膜由来細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着して増殖した。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシン EDTA 溶液を加えることで細胞を浮遊させた。浮遊した細胞は、PBS あるいは該細胞培養用の培地で洗浄後、該細胞培養用の培地で 5 倍から 20 倍希釈して新しい培養皿に添加することで、さらに継代培養した。

5) 心筋細胞への分化能を有する細胞からの心筋細胞の誘導方法

心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞に分化誘導する方法としては、心筋由来細胞との共培養、DNA の脱メチル化剤処理による分化誘導、胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子による分化誘導、心筋細胞への分化能を有する細胞または該細胞から分化した心筋細胞の培養上清による分化誘導などの方法を挙げることができる。

心筋由来細胞として、マウスの胎児心筋細胞を用いた [The Journal of Gene Medicine, 6, 833-845 (2004)]。培地は特に限定されないが、5~10%のウシ等の血清を含む DMEM 培地、DMEM/F-12 培地などが好ましい。胎児マウスの匹数については特に指定は無いが、同培地に浮遊させる。浮遊させた心臓は、眼科用ハサミにて鈍的に切断する。同組織から蛋

白分解酵素を用いて心筋細胞を単離する。

初代心筋細胞の培養開始直後～10日後、または1～2日後に、その培養細胞上に心筋細胞への分化能を有する細胞を $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 、または $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ の密度で添加する。心筋細胞への分化能を有する細胞の心筋への分化を確認するために、心筋細胞への分化能を有する細胞を共培養前に標識した。

数日後には、同期して収縮する初代マウス培養心筋細胞とは異なった動きをする緑色蛍光を示す細胞が観察でき、心筋細胞への分化能を有する細胞が心筋へ分化したことを確認した。心筋の活動電位は心筋特異的な電位波形を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認)。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター動物実験指針に準拠して研究を実施している。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこな

っている。

C. 研究結果

ヒト骨髄液から浮遊細胞と接着細胞を分離し、得られた接着細胞のうち増殖能の良好な骨髄間質細胞を限外希釈法でサブクローニングした。得られた細胞に、レトロウィルスを用いてTERT、E6、E7、またはBmi-1を遺伝子導入した。遺伝子を導入した組み合わせにより、4種類の細胞を得た。

さらに、寿命を延長したヒト骨髄間質幹細胞にGFP遺伝子を組み込んだアデノウィルスを感染させることで細胞を標識し、脱メチル化剤である5-azacytizine処理した後にマウス胎児心筋細胞と共培養した。GFP陽性細胞は共培養2日後に筋管細胞様に延長し、3日後にはGFP陽性の横紋構造を有する細胞が拍動する像が認められた。拍動細胞は培養を継続すると経時的に増加した。拍動細胞は遺伝子導入前の骨髄細胞でも検討し、拍動細胞を認めたことから、遺伝子導入の心筋分化への関与は否定された。これらの細胞を心筋特異的蛋白である抗トロポニンI抗体で染色した。GFP陽性細胞はトロポニンIを発現しており、GFP陽性骨髄間質細胞が心筋に分化したと考えられた。さらにRT-PCRを用いてヒト心房性ナトリウム利尿ホルモン(hANP)、心筋特異的転写因子であるCsx、およびミオシン軽鎖の発現も認められた。

分化心筋細胞の活動電位は、3週間の培養により、より成熟した心筋細胞に分化することが証明された。

GFP陽性のヒト骨髄間質細胞とLac-Z陽性マウス心筋細胞の共培養を行ったが、GFPおよびトロポニンI陽性の分化誘導細胞はLac-Zを発現していなかった。また、コラーゲンフィルムを挟んで、マウス心筋細胞とヒト骨髄間質細胞を培養した際も、GFP陽性細胞中にトロポニンI陽性の細胞を認められた。2つの結果より、ヒト分化心筋細胞はマウス心筋細胞と細胞融合していないと考えられた。これらの検討により、寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが証明された。

ヒト月経血からの心筋細胞への分化能を有する子宮内膜由来細胞の取得と培養

(1) ヒト月経血からの細胞の分離と培養

月経1日目の月経血をプラスチック・ディッシュに移行させ、20mlの培養液を入れた50mlプラスチック・チューブに移動させた。取得した月経血が含まれる培養液を遠心分離により月経血に含まれる細胞を回収した後、月経血細胞を10%のFBSを含む α -MEM培地に再浮遊させることにより月経血に由来する細胞液を得た。単離した月経血に含まれる細胞を、牛等の血清を10~20%添加した α -MEM培地に分散し、組織培養用のプラスチック製培養皿に入れ、培養温度33~37°Cで、5~10%の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養した。培養開始後2日目に、赤血球を除去するために、培地交換を行った。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシンEDTA溶液を加えることで細胞を浮遊させた。

(2) ヒト子宮内膜由来細胞への遺伝子導入

と不死化細胞の樹立

上記(1)で得られた、ヒト子宮内膜由来細胞にレトロウイルスベクターを用いて不死化遺伝子を導入し、ヒト子宮内膜由来不死化細胞株を樹立した。

上記で得られた細胞株に、さらにヒトTERT(hTERT)を含むレトロウイルスベクターLXSH-hTERTを感染させた。文献[J. Gene Med., 6, 833-845 (2004)]に記載されている方法で調製したhTERTを発現するレトロウイルスベクターLXSH-hTERTを含む溶液に、終濃度8 μ g/mlとなるようにpolybreneを添加し、HPV16由来のE7遺伝子を導入したヒト子宮内膜由来細胞株の培養上清2mlをウイルス液2mlと置換し、37°C、5%CO₂濃度の孵卵器で一晩培養した。100 μ g/mlのG418と50 μ g/mlのハイグロマイシンBを含む同培地に交換して更に同様の条件で培養し、レトロウイルスベクターLXSN-16E7およびLXSH-hTERTの組み込まれた細胞株を得た。

得られた細胞株にさらにHPV16由来のE6遺伝子の形質転換活性を消失した欠変異体である16E6SDD151遺伝子を含むレトロウイルスベクターMSCVpuro-16E6SDD151を感染させた。文献[J. Gene Med., 6, 833-845 (2004)]に記載されている方法で調製した16E6SDD151遺伝子が発現するレトロウイルスベクターMSCVpuro-16E6SDD151を含む溶液に、終濃度8 μ g/mlとなるようにpolybreneを添加し、HPV16由来のE7遺伝子およびhTERTを導入したヒト子宮内膜由来細胞株の培養上清2mlをウイルス液2mlと置換し、37°C、5%CO₂濃度の孵卵器で一晩培養した。100 μ g/mlの

G418、50 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシン B および 1 $\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンを含む同培地に交換して更に同様の条件で培養し、レトロウイルスベクターLXSN-16E7、LXSH-hTERT および MSCVpuro-16E6SDD151 の組み込まれた細胞株を得た。約4ヶ月上記条件で培養し、不死化した細胞を選択した後、希釈により独立した単一細胞 (single cell) 由来の細胞株を2種、樹立した。

(3) ヒト子宮内膜由来不死化細胞株からの心筋細胞の誘導

ヒト子宮内膜由来不死化細胞株の心筋細胞への分化能について、以下の通り検討した。上記(2)で得られた2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株について、GFPを発現するアデノウイルスを感染させた。GFPの発現は、蛍光共焦点顕微鏡にて確認した。

GFPで標識したヒト子宮内膜由来不死化細胞株は、5-aza-C処理群としては、3 $\mu\text{mol/l}$ の濃度になるように5-aza-Cを添加した10% FCSを含むDMEM培地を用いて、5%CO₂濃度の孵卵機にて24時間、37°Cで培養することにより脱メチル処理を行った。培地を交換することで5-aza-Cを除去し、1日後に細胞を回収して、単独で培養するものとマウス胎児由来心筋細胞と共培養するものに分けた。一方、5-aza-C未処理群としては、5-aza-Cを含まない培地を用いて全く同様の培養を行い、細胞を回収して単独で培養するものとマウス胎児由来心筋細胞と共培養するものに分けた。

1週間マウス胎児由来心筋細胞と共培養を行った2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株の培養皿は、目視でほぼ100%自己拍動を生

じ、GFP蛍光を示す細胞同士が同期して収縮しているものが観察されたが、すべての細胞が同期してしまうため、正確に心筋誘導を生じている細胞の割合を評価することは困難であった。そこで、この2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株について1週間マウス胎児由来心筋細胞と共培養したサンプル及び、共培養せず単独で培養したサンプルを準備した。培養液中の血清を除去するためPBSで一回洗浄し、その後0.05%トリプシン及び、0.25mmol/lのEDTAを含有するPBSを加えて37°Cの加湿した孵卵器の中で5分間酵素反応を行った。細胞はペトリ培養皿より一塊となって剥離した。剥離した組織を0.5%コラゲナーゼとBDM 10mmol/lを含有するPBS内に投入し、37°Cの恒温槽内でさらに20分間反応させ、細胞を単離した。これらの細胞には、マウス由来細胞が混入しているため、ヒト子宮内膜由来不死化細胞株に発現している抗原に対する抗体である、抗ヒトCD59抗体を用いて磁気マイクロビーズを用いて細胞単離を行った。抗ヒトCD59抗体を用いて細胞を分離すると、GFP陰性の細胞は混入せず、ほぼヒト由来の細胞のみが回収された。

この細胞について、細胞内抗原でヒト心筋特異的なタンパク質であるTroponin Iに対する抗体を用いて染色を行った。その結果、5-aza-C処理の有無に関らず、マウス胎児由来心筋細胞との共培養を行わず、単独で培養した2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株では、Troponin I陽性細胞の比率は極めて低かった。一方、マウス胎児由来心筋細胞と共培養した条件では、5-aza-C処理した2種の

ヒト子宮内膜由来不死化細胞株は、5-aza-C の処理をしなかった2種のヒト子宮内膜由来不死化細胞株においても約80%のTroponin I陽性率を示した。従来ヒト心筋細胞への誘導率と比較して、ヒト子宮内膜由来不死化細胞株は、心筋細胞との共培養を行うことにより、5-aza-C処理の有無に関らず、極めて高率に自己拍動し、培養皿上ですでに生理的な機能を有した心筋になることが明らかになった。

(4) コラーゲンゲルフィルムによる分離条件での共培養

(3) で示した高い心筋誘導率が、マウス胎児由来心筋細胞とヒト子宮内膜由来不死化細胞株との細胞融合の結果である可能性を否定する実験を行った。本培養条件ではヒト子宮内膜由来不死化細胞株 (E-MSc) が、培養1週間後より自己拍動を開始した。同細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察することにより、明瞭なヒトTroponin Iの発現を認めた。

E-MSc から誘導される心筋細胞の特性

E-MSc はマウス胎児由来心筋細胞との共培養後2日目より自己拍動を開始し、3~4日でE-MSc同士が同期して収縮し始めた。E-MScを5-aza-C処理せず、マウス胎児由来心筋細胞との共培養のみで心筋に誘導した。このような条件で心筋に誘導したE-MScに発現している、心筋特異的なタンパク質のmRNAをRT-PCR法により測定した。RT-PCR解析の結果、マウス胎児由来心筋細胞と共培養したE-MScには、心筋細胞特異的な遺伝子として、ANPおよびBNP、Troponin TおよびTroponin I、cardiac actin、MLC-2a、Csx、GATA4のmRNA

が発現していることが観察された。E-MScには、これらの心筋細胞特異的な遺伝子mRNAが、共培養する前から発現していることが観察された。不死化による遺伝子導入によって、間葉系細胞の性質自体が変化しないことから、このような心筋先祖細胞と呼べるような間葉系幹細胞が子宮内膜には多量に存在している可能性が示唆された。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、心筋細胞に分化したE-MScはヒト心筋細胞特異的なTroponin Iを強発現しており、強い収縮を生じる細胞に特徴的な横紋構造を観察することができた。緑色のGFP蛍光を発するE-MScにのみ、心筋Troponin Iの反応が検出された。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、心筋細胞に分化したE-MScの α アクチニン染色と、心筋同士が電氣的に結合し心筋が共同して収縮するのに必要なCx43タンパク質の免疫染色について検討した。 α アクチニン染色によって明瞭で、ある一定の配向構造を持つ発達した横紋構造を観察することができた。このことは本細胞が非常に強く収縮していたことを意味する。また、核を中心に細胞質の辺縁を取り囲むように、非常に強いCx43の染色像が観察された。本細胞が周辺の細胞と強固に電氣的に結合していたことを示している。自発的な興奮収縮を起こす細胞は心筋だけとは限らないため、本細胞が心筋細胞であることを証明するためには、活動電位の測定が必要である。心筋細胞の活動電位は心筋特異的な、L型Ca電流によって生じる特異的なプラトー相を有しており、そのため活動電位持続時間は200-300m秒程度の幅を有していた。

2種の E-MSC をマウス胎児由来心筋細胞との共培養のみで心筋に誘導し、心筋に誘導した E-MSC から活動電位を記録した。E-MSC はマウス胎児由来心筋細胞の上に存在しているため、E-MSC 細胞に記録電極を刺入した場合、その直下のマウス心筋細胞に電極が挿入されている可能性が否定できない。そこで、文献の方法に基づき、活動電位を測定した。記録した活動電位は自動能を有する細胞に特徴的なペースメーカー電位を有しており、いずれも心筋特異的な電位波形を有していた。以上の結果より、E-MSC は、マウス胎児由来心筋細胞と共培養することにより、作業心筋型の心筋細胞および、洞結節細胞型の心筋細胞に分化することが示された。

D. 考察

研究開始当初の目的であった、『ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の調整と寿命延長法の開発』において、成果を得ることができた。最終的に目指すところは、我々が示した、高率に心筋へと分化する細胞の移植を臨床に応用することであり、重要となる4つの点がある。一つは現在、心筋誘導には他動物の心筋細胞との共培養が必須であることで、これは移植時に異種の細胞をヒトに移植する事を意味し、未知なる病原体の混入の可能性や、倫理的な問題がクリアできない。そこで、今後更に、心筋細胞の共培養無しでヒト間葉系幹細胞を心筋へと分化するための条件を検討する必要がある。未だ十分な分化誘導率ではなく、再現性も未確認ではあるが、種々の薬剤刺激や、物理的な刺激を与えることにより、共培養心

筋細胞無しでヒト間葉系細胞を心筋分化させる事に成功しているため、この現象を精査することによって、共培養心筋細胞無しで、ヒト間葉系細胞を効率良く心筋へと分化させる事が出来ると考えている。第2点は、培養に使用する血清である。ひとたび血清に暴露した細胞をヒトに再移植することは病原体の感染を引き起こす可能性が高い。そこで無血清培地での誘導法を検討する。第3に、調整出来る移植心筋細胞数に限りがある点がある。細胞には最大分裂回数に限りがあり、そのため一定以上の心筋細胞数を採取することが困難である。細胞数を増やすためには残存している細胞分裂可能数の多い若年患者からのサンプル採取が必要であるが、該当する患者の大部分は高齢者であり、従来の骨髄を細胞源とする方法では限界がある。また高齢者ではしばしば骨髄は低形成で、不死化などの遺伝子操作を行わない限り、十分な細胞量を確保するのは不可能であった。しかし我々の未発表のデータでは、骨髄以外のさまざまな臓器に存在する数種類の間葉系幹細胞が、高率に心筋に分化する能力を有していることが判明した。すなわち、最終的には不特定多数の若年者から容易に採取できる体細胞を用いて、無痛性で、繰り返し、大量に採取出来、あらゆる HLA に対応した細胞バンクシステムを形成する事を到達点と考えている。この方法の確立によって近い将来、拒絶反応の無いヒト心筋細胞移植が安定して行えるようになるであろう。第4に再生させた心筋細胞をどのようにホストに生着させるかと言う点である。たとえ1万個の細胞を作り出したとしても、

その細胞を単離し、組織内に注入しただけでは、生着するのは 10 個以下であると言われている。そのため我々はこの移植法には限界があると考えている。その点を改善するため、移植効率と催不整脈作用などに対する安全性の検討を動物実験にて行っている。心筋細胞を培養し、酵素反応による単離ではなく、細胞工学技術を利用して細胞外接着因子を保ったままの自己拍動するシート片を心臓に移植しているが、移植シート片がホスト心臓と同期して収縮しなくては、心臓のポンプ機能の改善にはならないばかりか、逆に致命的な不整脈発生の素地となりとなりうる。そこで、移植心筋シート片とホスト心臓との間の電氣的同期の成立を、膜電位感受性蛍光色素 (Di-4ANEPPS) を用いた光マッピング法で検討を加えている。これらの問題を解決することによって、自己細胞より誘導した分化心筋細胞の移植の実現が可能となると考えられる。

E. 結論

ヒト骨髄間質細胞においては CD34⁻、CD90⁺、CD105⁺、CD117⁻ の細胞群は、少なくとも心筋分化能を有する細胞であると考えられる。寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが明らかとなった。

骨髄間質細胞以外にも、心筋への分化能を有した、間葉系幹細胞が存在することを確認した。

寿命を延長したヒト骨髄間質細胞に関する表を以下のサイトにおいた。

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/ce>

<11s/name1.html>

ヒト骨髄間質から分化した心筋細胞に関し、以下のサイトに動画をおいた。

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/jgm/ubet7>

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A: Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316: 141-153, 2004

Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Cancer Res*, 64: 3545-3549, 2004

Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A.: Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?", *J Gene Med*, 6:833-845, 2004