

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 remodeling. *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) Haegele 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-Sanjuan 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:

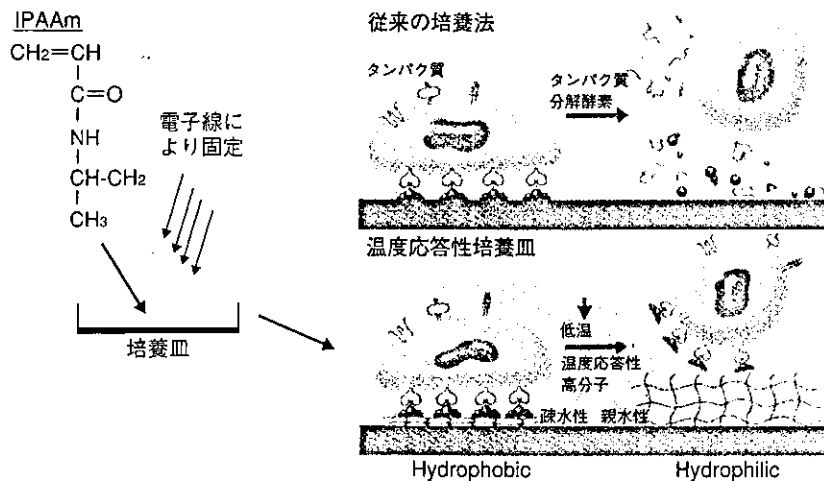


図7 温度応答性培養皿の原理 (→巻頭カラーグラビア参照)
 培養温度37℃では疎水性の表面となり細胞が接着し、低温(32℃以下)では親水化するため、細胞を培養皿から構造と機能を保ったままの状態でも回収できる。
 IPAAm: poly-N-isopropylacryl-amide



- 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¹⁾、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²⁾、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ないであろう (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とした。

●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。

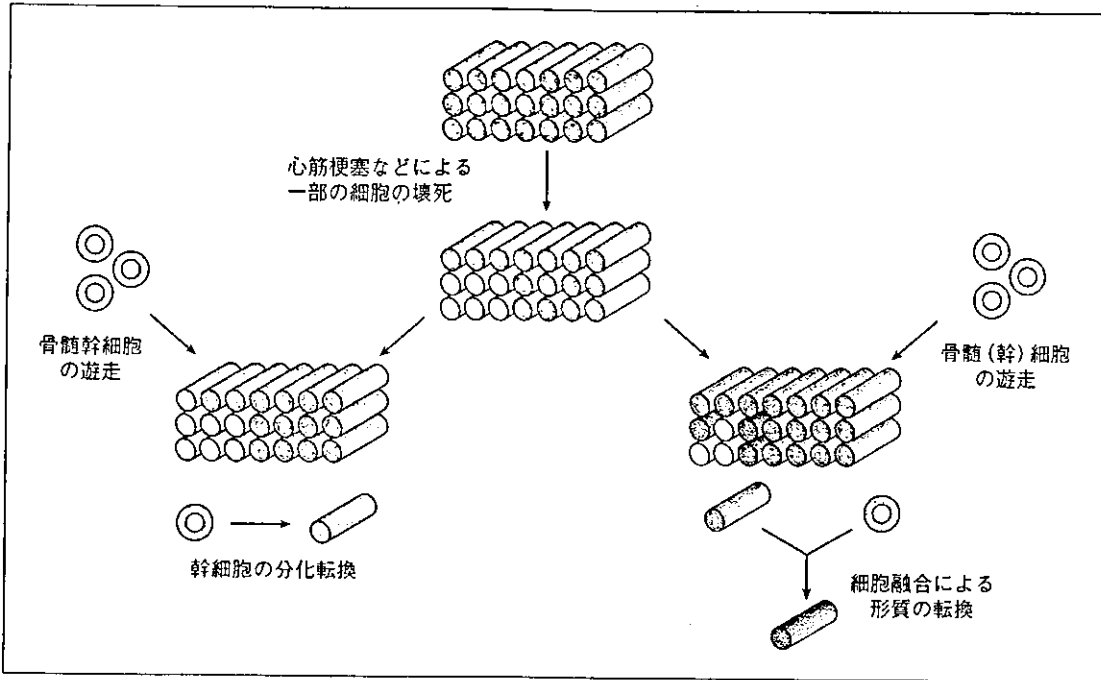


図1 細胞分化と細胞融合の概念

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見えるのか、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³⁾。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⁴⁾ (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⁵⁾。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⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁾。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 α 刺激に対しては主として α_{1A} , α_{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¹¹⁾。一方、交感神経 β 刺激には主として β_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¹²⁾。これらのc-kit陽性の細胞は心尖部および心耳に存

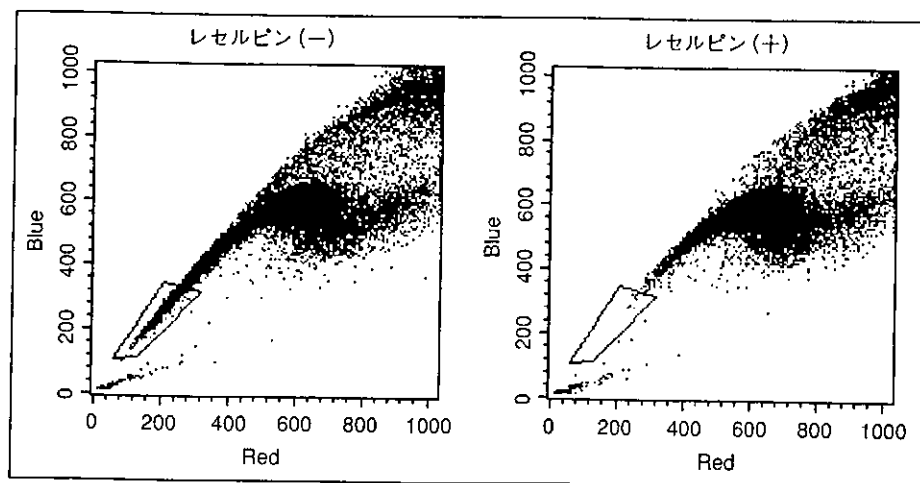


図3 心筋組織中のSP細胞分画
 骨髄や各種組織をHoechst33342で染色し、blueとredの2波長で展開させたFACS解析を示した。四角で囲んだ領域がSP細胞分画である(左図)。SP細胞分画はレセルピン前投与で完全に消失する特徴がある(右図)。

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¹³⁾。

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¹⁴⁾。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^{15, 16)}。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¹⁷⁾、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¹⁸⁾。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

	ES細胞	骨髄間葉系幹細胞
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応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, Pardo 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^{1), 2)}、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³⁾。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⁴⁾。

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 α_1 、 β_1 、 β_2 カテコラミン受容体、アセチルコリン受容体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、 α_1 、 β_1 、 β_2 カテコラミン受容体、アセチルコリン受容体⁵⁾、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

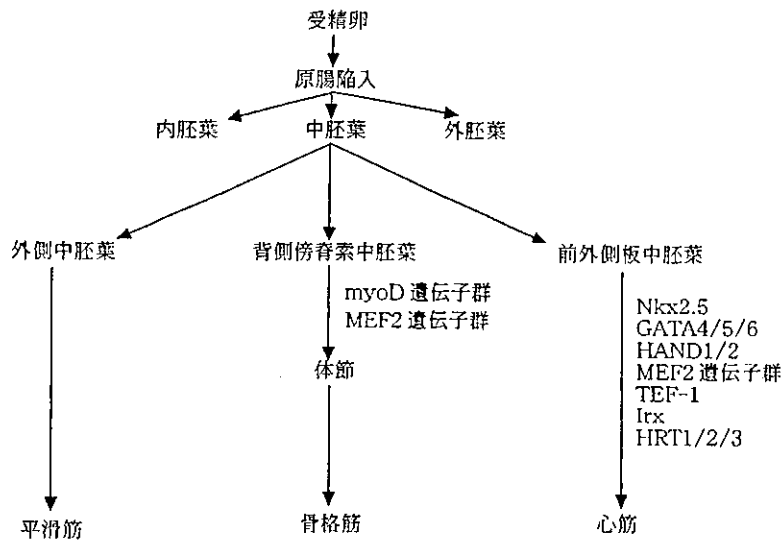


図1 心筋細胞の発生学的由来

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

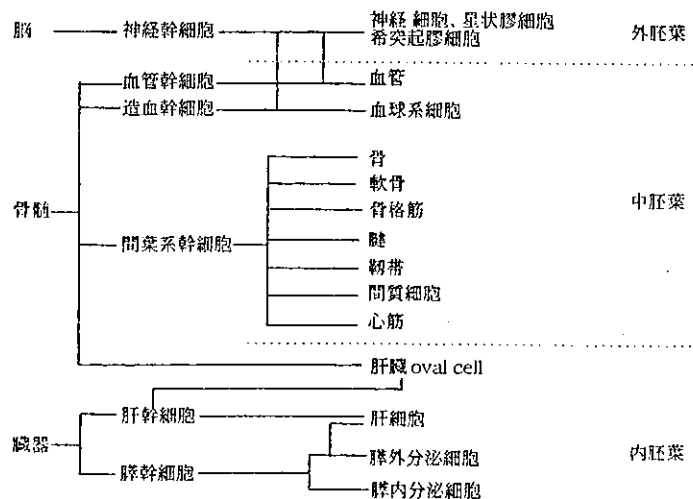


図2 成人組織における幹細胞の分類

[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⁶⁾。一方、中胚葉由来の臓器では幹細胞は骨髄に存在すると考えられている⁷⁾。骨髄はもともと造血の場であり、そこには造血幹細胞を頂点とした血球系細胞の増殖分化が営まれている。しかし、骨髄には血球系の細胞以外にも骨髄間質細胞とよばれる細胞が存在し、造血支持細胞として働いていることが知られていた。骨髄間質細胞は数多くのサイトカインや細胞増殖因子を分泌し、血球系細胞の再生・増殖・分化を維持している。骨髄間質細胞はその一部が骨や軟骨になることは早くから知られていた。現在は骨髄間質細胞に含まれる間葉系幹細胞とよばれる一部の細胞が多分化能を有することが知られ、中胚葉由来の多くの細胞の幹細胞となりうると考えられている⁷⁾。

IV. CMG細胞の作製

C3H/Heマウス大腿骨より骨髄を抽出し、Dexter法により初代培養を行った⁸⁾(図3)。骨髄間質細胞は付着系の細胞であり浮遊系の骨髄芽細胞、血球系の細胞を除去した後、3ヵ月以上の長期間培養を行った。長期培養後、不死化した細胞による多クローンの

細胞株を作製し、この多クローンの細胞株に対し、limiting dilutionによる単一あるいは数クローンによる細胞株を作成し、各々のクローンに対しDNA脱メチル化剤5-azacytidineにより分化誘導を行った。分化誘導後およそ4週間培養し、数百以上のクローンのなかから自己拍動を行う細胞を含むクローンをスクリーニングした。自己拍動を開始した細胞の周辺をクロ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には単核の線維芽細胞様の形状を呈するが、分化とともに形態は著しく変化する。図4にCMG細胞の位相差顕微鏡写真を示した。分化誘導1週目ごろより一部の細胞の細胞質が大きくなり円形を呈してくる。これらの細胞が後に自動拍動を開始する細胞となるが、この時点では自動拍動を行うことは、ごくまれである。分化誘導後2週になると、すでにこうした細胞の多くは自己拍動を開始する。

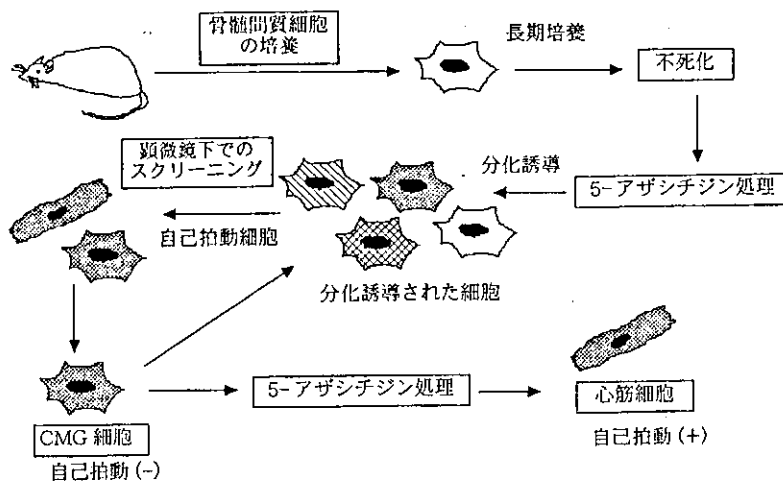


図3 骨髄細胞の初代培養とCMG細胞の作製

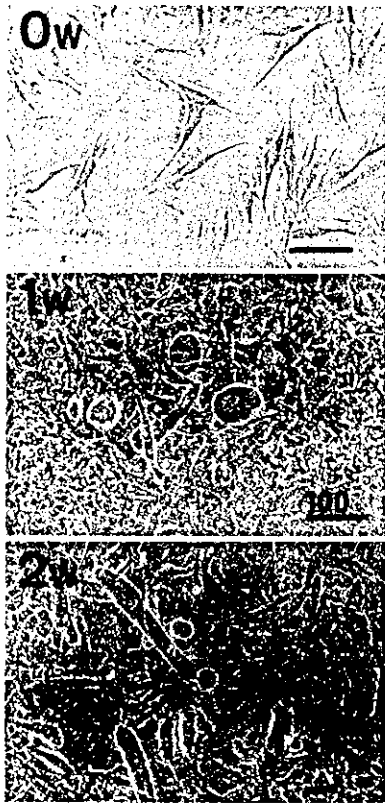


図4 分化前後のCMG細胞の位相差顕微鏡写真
数字は5-azacytidine投与からの週数を示す。スケールは
100 μ m。〔文献4〕より引用〕

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

VI. CMG細胞の活動電位

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

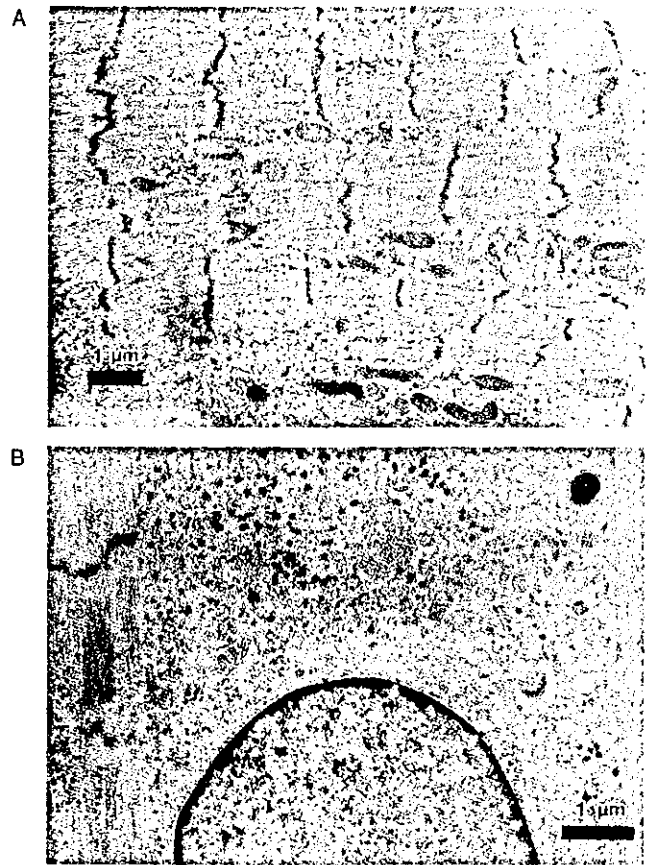


図5 CMG細胞の透過型電子顕微鏡写真
A：典型的な横紋構造が観察される。B：核周囲には幼弱な分泌顆粒(心房顆粒)が観察された。〔文献4〕より引用〕

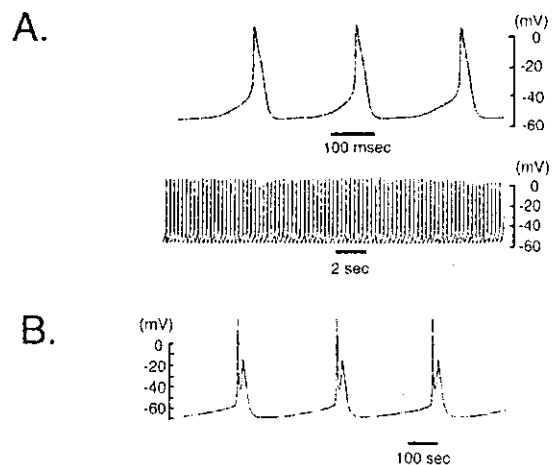


図6 CMG細胞の活動電位
CMG細胞の活動電位はおおむね2通りの形が観察された。A：洞結節型活動電位。B：心室筋型活動電位。
〔文献4〕より引用〕

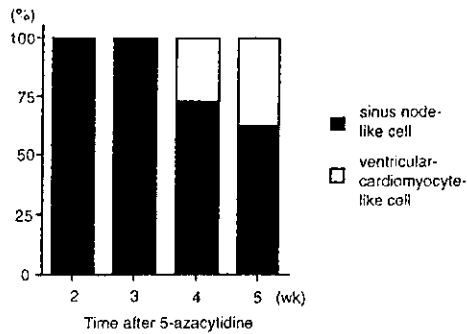


図7 CMG細胞の活動電位の経時的変化

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

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

Ⅶ. CMG細胞のイオンチャネル発現

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

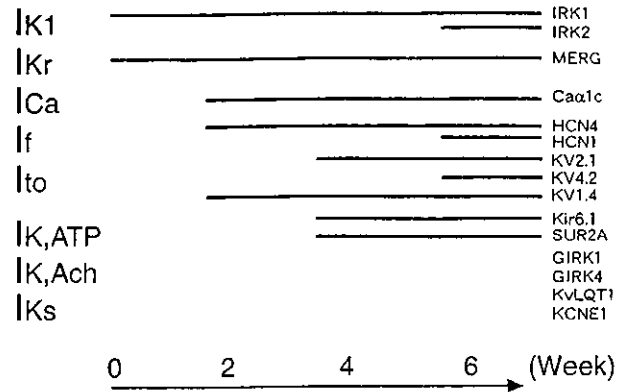


図8 遺伝子レベルでみたイオンチャネルの発現形式
横軸は分化誘導からの時間経過を週数で示した。

〔文献4〕より引用

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

Ⅷ. CMG細胞の遺伝子発現

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

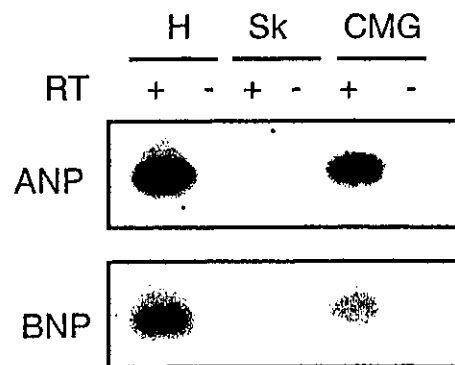


図9 CMG細胞におけるANP、BNPの発現
Hは心臓、Skは骨格筋、CMGはCMG細胞を示す。

〔文献4〕より引用

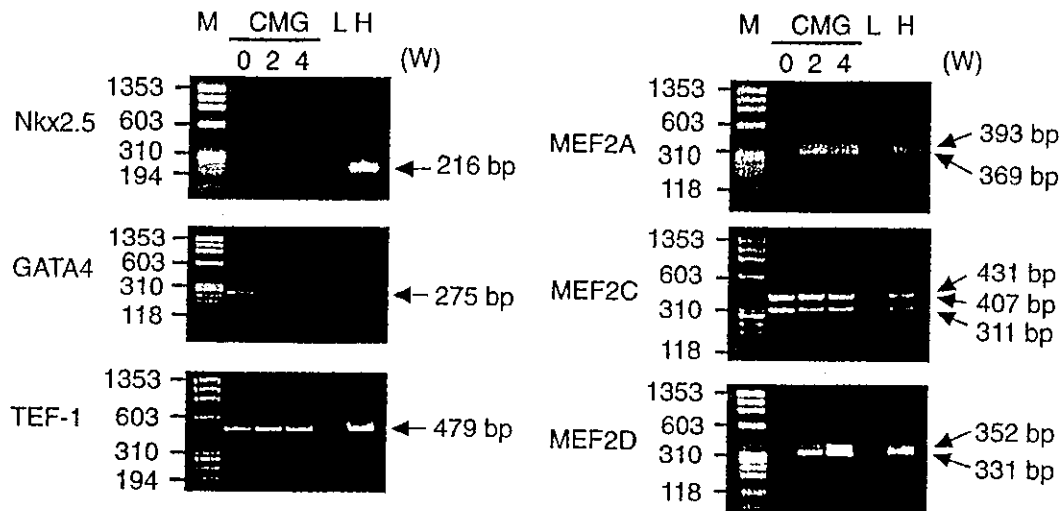


図10 CMG細胞における心筋特異的転写因子の発現

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

心筋特異的蛋白であるANPおよびBNP、心筋特異的な転写因子であるCsx/Nkx2.5^{(10), (11)}、GATA4、筋細胞特異的な転写因子であるTEF-1のmRNAの発現を心筋、骨格筋を陽性、陰性対照としてRT-PCR-Southern法により解析した結果を示した。CMG細胞ではANP、BNPの発現が観察された。転写因子に関しては心筋細胞、CMG細胞ではCsx/Nkx2.5、GATA-4、TEF-1遺伝子の発現が認められたが、骨格筋ではTEF-1のみの発現が観察された。筋細胞特異的な転写因子であるMEF2遺伝子群の発現をRT-

PCR法で観察した結果を図10に示した。バンドが複数観察されるのはMEF2遺伝子群のalternative splicingのアイソフォームが明らかになる部位でprimerを設定したことによる。CMG細胞はMEF2遺伝子群のうちMEF2A、MEF2C⁽¹²⁾、MEF2Dの発現が観察された。しかし、その発現時期は3者で異なり、MEF2Cは分化誘導前で発現が認められたが、MEF2A、MEF2Dは分化誘導後に発現されることが示された。図11に心臓のmyogenesis, morphogenesisが起きる段階に発現している転写因子のパターンを示した。左右の心筋芽細胞が集合して1本の原始心筒になり、やがてloopingが起き心臓が形成される。分化誘導前のCMG細胞は発生段階の中胚葉細胞より下流で心筋芽細胞が形成される前後の位置にあり、分化誘導がかかると心筋細胞に分化されることが考えられた。

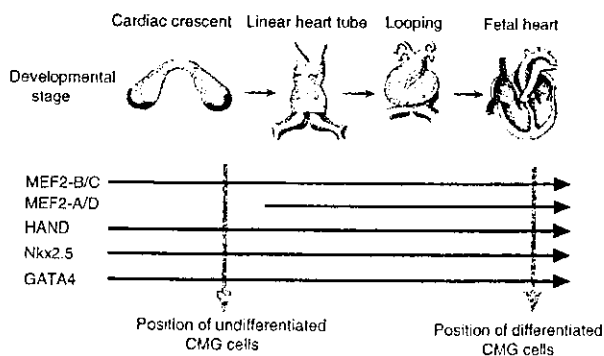


図11 心臓の分化過程における転写因子の発現とCMG細胞の遺伝子発現

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

S-3-8

IX. 再生心筋細胞における交感神経 α_1 受容体の発現と機能

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

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

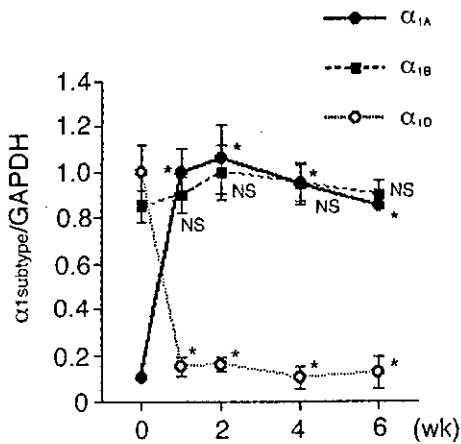


図12 骨髄細胞由来の再生心筋細胞における交感神経 α_1 受容体の発現の解析

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

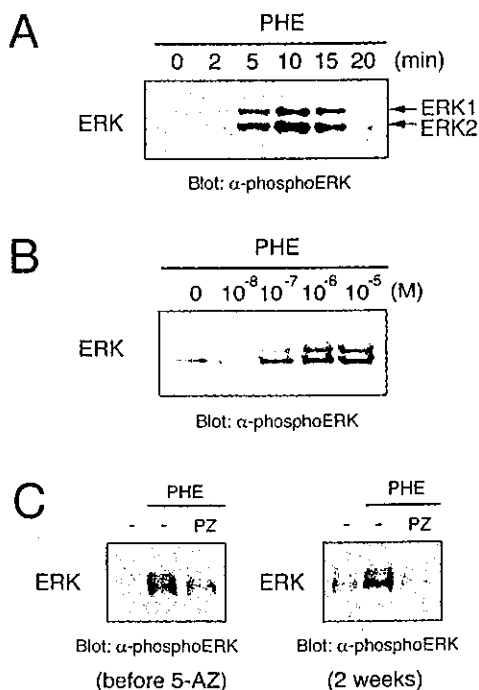


図13 再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬フェニレフリン(PHE)で刺激した際のシグナルの活性化MAPKファミリーのERKの活性化をリン酸化ERKの抗体で解析した。Aは時間経過、Bは濃度依存性をみたものである。Cは α_1 受容体遮断薬プラゾシン(PZ)を前投与した際のERKの活性化をみたもので、プラゾシン前投与により完全にリン酸化が抑制されている。〔文献5)より引用〕

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

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

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

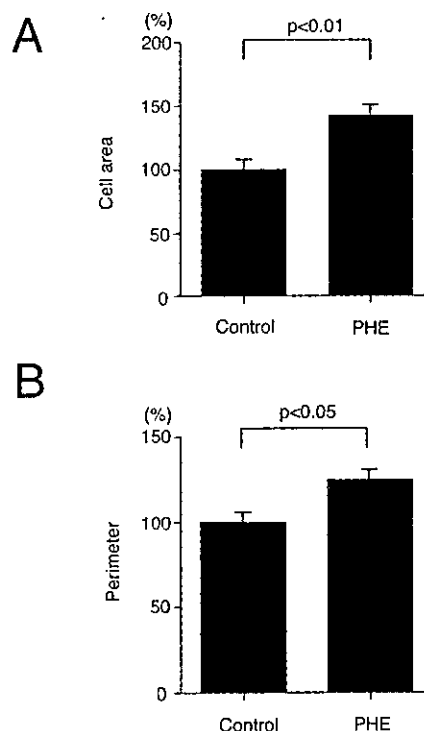


図14 再生心筋細胞を α_1 受容体刺激薬フェニレフリン(PHE)で刺激した際の細胞表面積(A)と周長(B)の変化

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

S-3-9

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

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

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

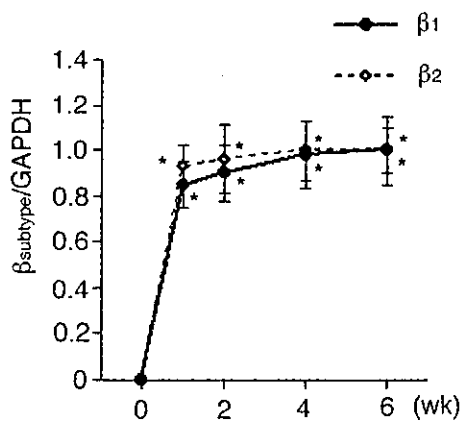


図15 骨髄細胞由来の再生心筋細胞における交感神経 β_1 、 β_2 受容体の発現の解析

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

(文献5)より引用)

S-3-10

X. 再生心筋細胞における交感神経 β 受容体の発現と機能

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

再生心筋細胞では β_1 、 β_2 受容体とも心筋細胞の

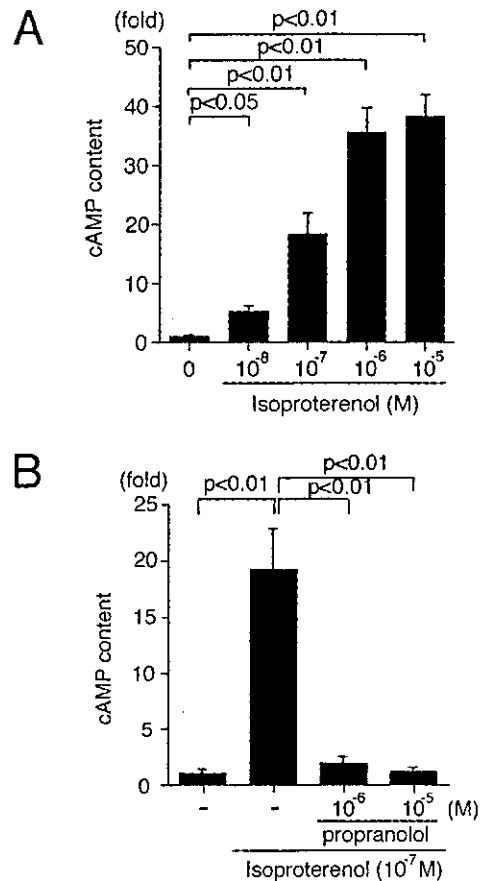


図16 再生心筋細胞を β 受容体刺激薬イソプロテレンールで刺激した際のセカンドメッセンジャーcAMPの変化〔文献5)より引用〕

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

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

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

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

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

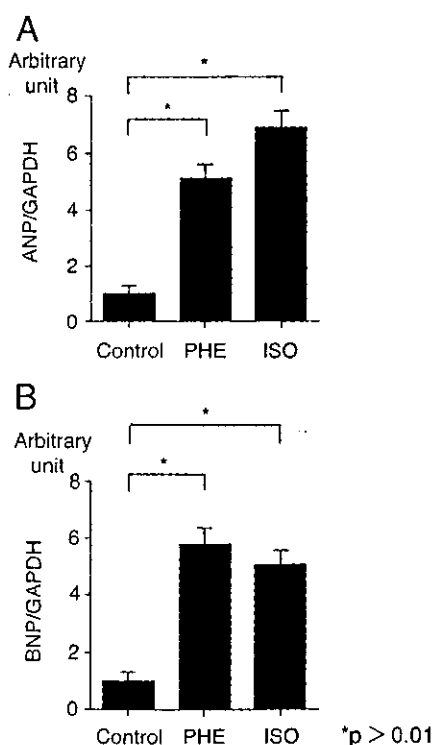


図17 再生心筋細胞をフェニレフリン(PHE)あるいはイソプロテレノール(ISO)で刺激した際の肥大マーカー遺伝子ANP, BNPの遺伝子発現の変化〔文献5〕より引用)

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

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

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

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

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

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

XI. 再生心筋細胞における副交感神経ムスカリン受容体の発現

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

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

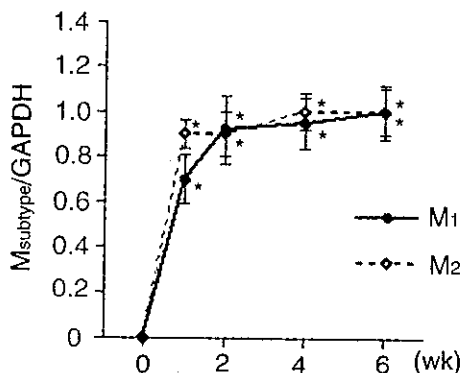


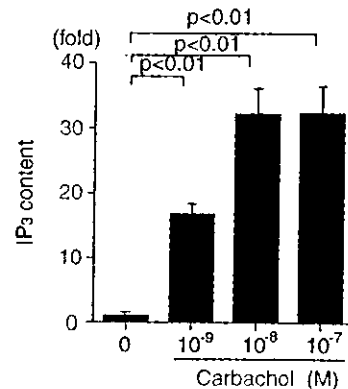
図18 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるムスカリン M_1 、 M_2 受容体の発現の解析

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

S-3-12

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

A.



B.

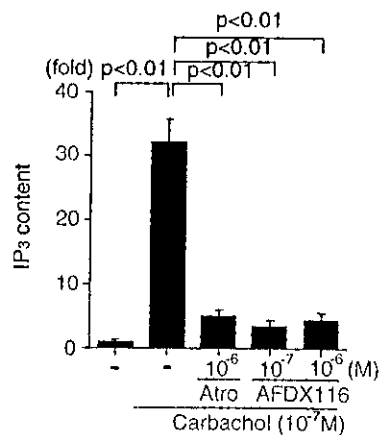


図19 再生心筋細胞をムスカリン刺激薬カルバコールで刺激した際のセカンドメッセンジャー IP_3 の変化〔文献5)より引用〕

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。

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

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

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

Ⅲ. 再生心筋細胞における受容体発現の意義

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

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

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

Ⅳ. 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 III, 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