

**Figure 4.** Effect of Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, PKM, Csk, or d.n.Jak2 on ET-induced activation of JNK and ERK in cardiomyocytes. **A**, Cells were transfected with 2  $\mu$ g HA-JNK1 together with 10  $\mu$ g of mock plasmid, Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, Csk, PKM, or d.n.Jak2. **B**, Cells were transfected with 2  $\mu$ g HA-ERK2 together with 10  $\mu$ g of mock plasmid, Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, Csk, PKM, or d.n.Jak2. Cells were incubated with ET (100 nmol/L) for 15 minutes. HA-JNK1 or HA-ERK2 was immunoprecipitated (IP), and activity was measured by *in vitro* kinase reactions with GST-c-Jun(1-79) or MBP as a substrate. Shown are GST-c-Jun(1-79) or MBP phosphorylation on an autoradiogram, together with levels of HA-JNK1 or HA-ERK2 expression analyzed by immunoblotting with an anti-HA monoclonal antibody (upper panel). The amount of  $^{32}$ P incorporated into GST-c-Jun(1-79) or MBP was determined by densitometry. Graph indicates the fold increase in JNK or ERK activity relative to values obtained in mock-transfected cells (lower panel). Shown is the mean  $\pm$  SD,  $n=3$ , \* $P<0.05$ .

(Figure 4A). In contrast, ERK activation was attenuated solely by 533delEGFR (Figure 4B). These results, taken together with the inhibitor experiment, indicated that the p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src-mediated pathway was selectively involved in ET-induced JNK activation in cardiomyocytes.

#### ET-Induced Increase in *c-jun* but Not *c-fos* Promoter Activity Is Significantly Inhibited by Cas $\Delta$ SD, CrkSH2 m, PKM, or Csk

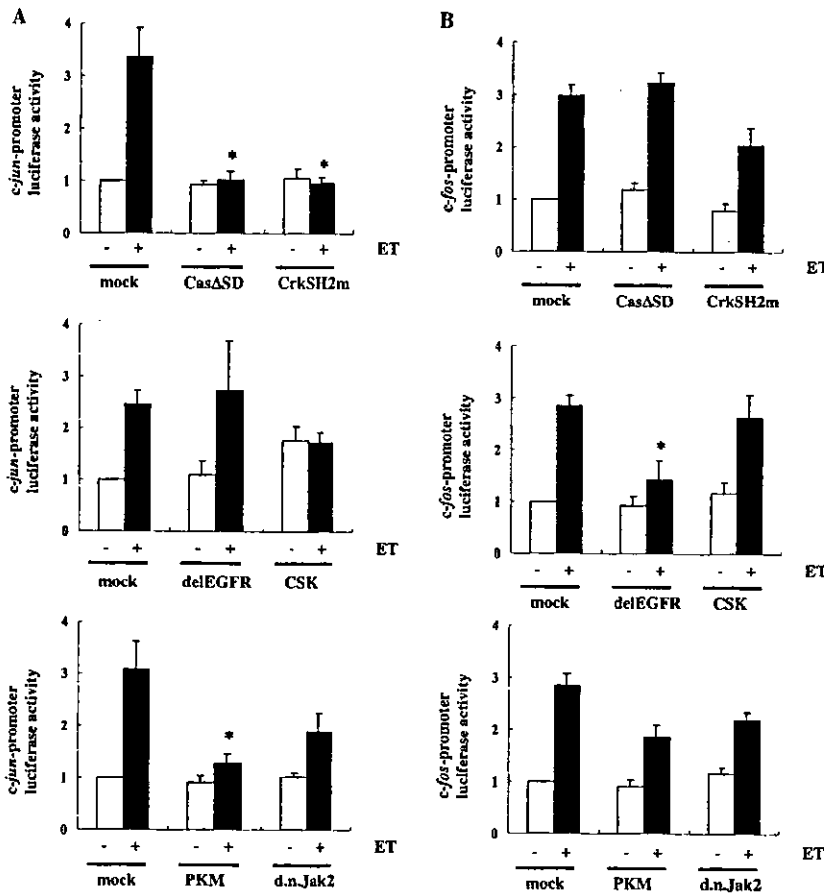
It had been demonstrated that JNK phosphorylates c-Jun at the putative regulatory N-terminal serine residues and increases their transcriptional activities.<sup>23,29</sup> The phosphorylated c-Jun forms a homodimer or a heterodimer with itself or c-Fos, thus forming the transcription factor activator protein-1, and transactivate many genes, including *c-jun* itself. We further analyzed the involvement of p130Cas, Crk1, Pyk2, c-Src, and EGFR in ET-induced *c-jun* or *c-fos* gene expression by transfecting the cells with *c-jun-luc* or *c-fos-luc*, together with Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, Csk, PKM, or d.n.Jak2. The ET-induced increase in *c-jun* promoter activity was significantly suppressed by Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, PKM, and Csk but was not inhibited by 533delEGFR (Figure 5A). On the other hand, the ET-induced increase in *c-fos* promoter activity was significantly suppressed by 533delEGFR and partially suppressed by PKM but was not significantly inhibited by Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, or

Csk (Figure 5B). The results shown are also consistent with our previous observation that the ET-induced increase in *c-fos* mRNA levels was attenuated by inhibition of EGFR; however, activation of c-Src or focal adhesion integrity was not required.<sup>16</sup>

#### Discussion

Tyrosine phosphorylation and protein/protein complex formation of diverse signaling molecules have been identified as prominent early events in cells stimulated by growth factors to regulate cell proliferation, migration, and apoptosis.<sup>2,3</sup> There is considerable evidence that both FAK family kinases and p130Cas/Crk complex formation play a critical role in integrin-mediated signaling. However, most of the studies supporting the role of p130Cas, Crk, or Pyk2 have used immortalized cells, especially fibroblasts, plated on fibronectin-coated dishes, and the significance of integrin-mediated signaling in cardiomyocytes remained to be clarified.

Earlier studies from our laboratory indicated that cytoskeletal protein Pyk2 was tyrosine-phosphorylated in a  $Ca^{2+}$ - and PKC-dependent manner after ET stimulation and that the signaling pathways involving Pyk2 or c-Src and EGFR-mediated Shc/ERK activation were distinct pathways.<sup>16</sup> In the present study, we found that p130Cas, like Pyk2, was regulated by both  $[Ca^{2+}]_i$  and PKC, independent of transac-

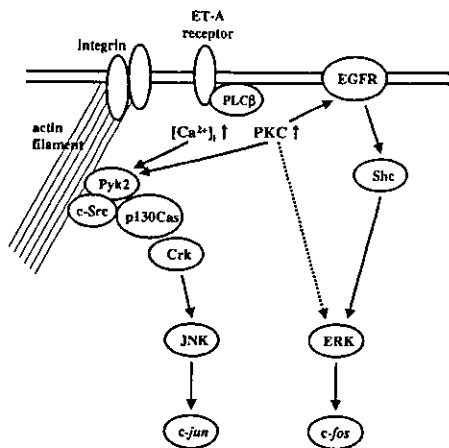


**Figure 5.** Effect of Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, PKM, Csk, or d.n.Jak2 on ET-induced increase in *c-jun* and *c-fos* promoter activity in cardiomyocytes. **A**, After transfection of *c-jun-luc* together with mock plasmid, Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, Csk, PKM, or d.n.Jak2, cells were treated with ET (100 nmol/L) for 10 hours. **B**, After transfection of *c-fos-luc* together with mock plasmid, Cas $\Delta$ SD, CrkSH2m, 533delEGFR, Csk, PKM, or d.n.Jak2, cells were treated with ET (100 nmol/L) for 3 hours. Cells were harvested and lysed for luciferase assay. Graph indicates the fold increase in *c-jun* or *c-fos* promoter luciferase activity relative to values obtained in mock-transfected cells. Shown is the mean  $\pm$  SD, n=5, \*P<0.05.

tivation of the EGFR. Furthermore, both c-Src and focal adhesion integrity are relevant for its activation. Our data also demonstrated that p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src signaling was a predominant pathway leading to JNK/*c-jun* activation, in contrast with the prominent EGFR-mediated ERK/*c-fos* activation observed in cardiomyocytes (Figure 6). Many lines of evidence suggest that focal adhesion and receptor tyrosine kinases can function as independently regulated scaffolds, especially in GPCR signaling. Della Rocca et al<sup>26</sup> showed the preference of signaling to be determined by the cell itself,

because the expressed cellular context was significantly different among cell types. In Rat-1 cells, which do not detectably express Pyk2, GPCR-induced FAK phosphorylation is dissociable from ERK activation. Conversely, in Pyk2-expressing cells, Pyk2 can serve as a link from c-Src to the downstream ERK and JNK cascade.<sup>11-13,30</sup> Recent data have also shown that Pyk2 expression and activation can enhance the tyrosine phosphorylation of p130Cas. Thus, in cardiomyocytes abundantly expressing both Pyk2 and p130Cas, Pyk2 can recruit p130Cas and thereby efficiently transduce signaling to the downstream effectors.

Src family tyrosine kinases have been implicated in GPCR signaling, including the ET-A receptor.<sup>27</sup> In vascular smooth muscle cells, angiotensin II stimulation has been shown to induce an association of active c-Src with EGFR, the recruitment of Shc, and EGFR-mediated ERK activation.<sup>22</sup> Overexpression of Csk impairs lysophosphatidic acid (LPA)-induced EGFR phosphorylation in COS-7 cells.<sup>31</sup> In cardiomyocytes, however, overexpression of Csk or a selective Src family kinase inhibitor did not affect ET-induced tyrosine phosphorylation of EGFR, the recruitment of Shc, or ERK activation, as described previously.<sup>16</sup> Dikic et al<sup>12</sup> demonstrated GPCR-induced association of Pyk2 with c-Src through the binding of autophosphorylated Tyr-402 of Pyk2 to the SH2 domain of c-Src, thereby leading to c-Src activation, thus suggesting that Pyk2 phosphorylation mediated by c-Src might generate a docking site for an additional signaling protein recruited by



**Figure 6.** Scheme showing sequence of events in ET signaling.

Pyk2. The functional significance and mechanisms behind the formation of the Pyk2/c-Src complex resemble those described for interactions between FAK and c-Src.<sup>11</sup> The phosphorylation of Tyr-579 and 580 of Pyk2 by c-Src appears to be necessary for maximal Pyk2 kinase activity. Activated c-Src bound to Pyk2 might directly phosphorylate adjacent cellular proteins, such as p130Cas, and thus amplify signals from Pyk2 to downstream effectors. These scenarios are also supported by the present observation that the ET-induced association of Pyk2 with an active c-Src preceded the autophosphorylation of Pyk2, the association of Pyk2 with p130Cas, and that of p130Cas with c-Src and Crk. Furthermore, ET-induced p130Cas tyrosine phosphorylation was significantly inhibited by PP2. Once tyrosine-phosphorylated, p130Cas has been shown to act as a docking protein to recruit Crk and its effectors.<sup>6,7</sup> The SH3 domains of Crk bind to several effectors able to activate JNK, including C3G and DOCK180.<sup>32,33</sup> Dolfi et al<sup>18</sup> reported that JNK activation by the transient expression of p130Cas or Crk was effectively blocked by a dominant-negative mutant of Rac, thus suggesting a linear pathway from the p130Cas/Crk complex to the Rac-mediated JNK pathway. Furthermore, either the SH2 or SH3 mutant of Crk efficiently blocked v-Src-induced JNK activation. Recent studies have demonstrated that c-Src was specifically involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated JNK activation by way of the p130Cas/Crk signaling pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts.<sup>34</sup> We also found that c-Src played a critical role not only in the phosphorylation and complex formation of Pyk2 or p130Cas but also in the activation of JNK, which was independent of EGFR-mediated signaling in cardiomyocytes. These data further indicate that p130Cas/Crk signaling involving Pyk2 and c-Src might be selectively recruited in ET-induced JNK activation in cardiomyocytes.

We demonstrated that overexpression of CasASD, CrkSH2m, PKM, or Csk could significantly attenuate ET-induced JNK activation, whereas 533delEGFR had no such effect. It is interesting to find that the MAPK subfamily, including ERKs and JNKs, are mediated through different scaffolds, receptor tyrosine kinases and focal adhesion complexes, respectively. The reason for this differential regulation in the MAPK subfamily is largely unknown. It might be partly due to the fact that tissue-specific expression and/or mutual interactions of Pyk2 or p130Cas/Crk with adaptor proteins, including Shc, Grb2, or Sos, will critically regulate the threshold activation of a target pathway, ERK or JNK, in a given cell type.<sup>26,30</sup>

The physiological significance of cytoskeleton-dependent signaling in cardiac hypertrophy has yet to be clarified. Because ET-induced *c-fos* and *c-jun* gene expression was also differentially regulated by independently regulated scaffolds in a similar manner as ERK and JNK activation in cardiomyocytes, one could anticipate that a predominant scaffold will selectively regulate specific cardiac hypertrophic gene induction in response to specific stimuli. Further examination of the functional significance of these cytoskeletal molecules will ultimately improve our understanding of the diversity and heterogeneity in cardiac hypertrophy.

## References

1. Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper G 4th, Menick DR, Zile MR, Kuppuswamy D. Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. 2000;275:35624–35630.
2. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991;87:1–5.
3. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11–25.
4. Kovacic-Milivojevic B, Roediger F, Almeida EAC, Damsky CH, Gardner DG, Ilic D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell*. 2001;12:2290–2307.
5. Matsuda M, Mayer BJ, Fukui Y, Hanafusa H. Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science*. 1990;248:1537–1539.
6. Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y, Hirai H. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J*. 1994;13:3748–3756.
7. Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E. Introduction of p130Cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*. 1996;16:2606–2613.
8. Polte TR, Hanks SK. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10678–10682.
9. Sayeski PP, Ali MS, Harp JB, Marrero MB, Bernstein KE. Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca<sup>2+</sup>, and protein kinase C. *Circ Res*. 1998;82:1279–1288.
10. Casamassima A, Rozengurt E. Tyrosine phosphorylation of p130Cas by bombesin, lysophosphatidic acid, phorbol esters, and platelet-derived growth factor: signaling pathways and formation of a p130Cas-Crk complex. *J Biol Chem*. 1997;272:9363–9370.
11. Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*. 1995;376:737–745.
12. Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*. 1996;383:547–550.
13. Yu H, Li X, Marchetto GS, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson TL, Wilm M, Anderregg R, Graves LM, Earp HS. Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase: correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 1996;271:29993–29998.
14. Honda H, Oda H, Nakamoto T, Honda Z, Sakai R, Suzuki T, Saito T, Nakamura K, Nakao K, Ishikawa T, Katsuki M, Yazaki Y, Hirai H. Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nat Genet*. 1998;19:361–365.
15. Komuro I, Yazaki Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:55–75.
16. Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, Hakuno D, Sato T, Manabe T, Konishi F, Ogawa S. Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:139–150.
17. Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y, Gotoh N, Shibuya M, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ Res*. 1998;82:1338–1348.
18. Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:15394–15399.
19. Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, Hattori S. CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol Cell Biol*. 1994;14:5495–5500.
20. Hata S, Shimizu T, Fujimoto M. A short region containing an AP-1 binding site is essential for transforming growth factor- $\beta$ -induced c-jun gene expression in osteoblastic cells. *IUBMB Life*. 2000;49:229–234.
21. Tabuchi A, Sano K, Nakaoka R, Nakatani C, Tsuda M. Inducibility of BDNF gene promoter I detected by calcium-phosphate-mediated DNA

- transfection is confined to neuronal but not to glial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:818–823.
22. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kaswakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:8890–8896.
  23. Derjard B, Hibi M, Wu I, Barret T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994;76:1025–1037.
  24. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1994;269:1110–1119.
  25. Hiregowdara D, Avraham H, Fu Y, London R, Avraham S. Tyrosine phosphorylation of the related adhesion focal tyrosine kinase in megakaryocytes upon stem cell factor and phorbol myristate acetate stimulation and its association with paxillin. *J Biol Chem.* 1997;272:10804–10810.
  26. Della Rocca GD, Maudsley S, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen-activated protein kinase cascade: role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1999;274:13978–13984.
  27. Kovacic B, Ilic D, Damsky CH, Gardner DG. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J Biol Chem.* 1998;273:35185–35193.
  28. Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Takekoshi N, Yazaki Y. Angiotensin II stimulates c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ Res.* 1997;80:139–146.
  29. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 1994;369:156–160.
  30. Balukat A, Ivankovic-Dikic I, Gronroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I. Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1999;274:14893–14901.
  31. Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. Gβγ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor: a scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem.* 1997;272:4637–4644.
  32. Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 1998;12:3331–3336.
  33. Tanaka S, Hanafusa H. Guanine-nucleotide exchange protein C3G activates JNK1 by a ras-independent mechanism: JNK1 activation inhibited by kinase-negative forms of MLK3 and DLK mixed lineage kinases. *J Biol Chem.* 1998;273:1281–1284.
  34. Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000;275:11706–11712.

## Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes

K. Fukuda

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

### Summary:

Bone marrow cells have been suggested to have multi-lineage plasticity including formation of cardiac tissue. We have established a cardiomyogenic (CMG) cell line from mouse bone marrow stromal cells that can be induced to differentiate into cardiomyocytes *in vitro* by 5-azacytidine treatment. A number of lines of evidence confirm the cardiomyocyte characteristics of CMG cells. *Bone Marrow Transplantation* (2003) 32, S25–S27. doi:10.1038/sj.bmt.1703940

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

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

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

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

### CMG cells form myotubes and show spontaneous contraction

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

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

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

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

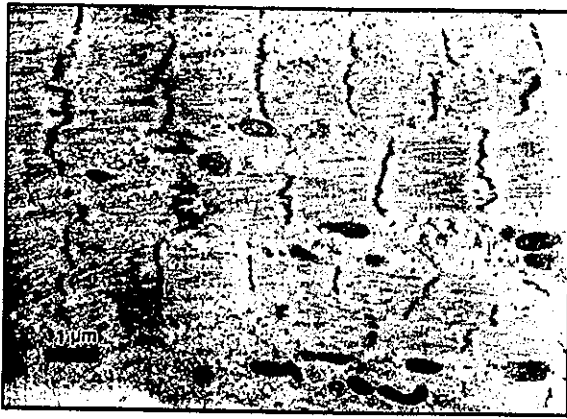


Figure 1 CMG cells electron microscopy after 5-azacytidine treatment of cultured marrow cells.

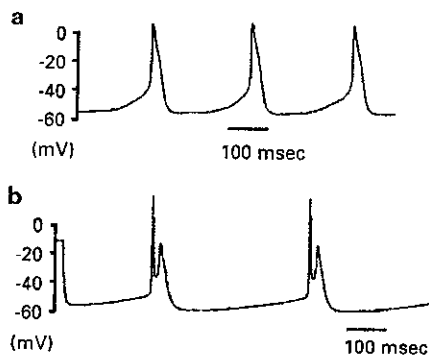


Figure 2 Representative tracing of the action potential of CMG cells. Action potential recordings were obtained from the spontaneous-beating cells at day 28 after 5-azacytidine treatment using a conventional microelectrode. We categorized these action potentials into two groups; a sinus-node-like action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

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

#### CMG cells have several types of action potential

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

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

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

#### Cardiomyocyte-specific gene expression

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

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

#### Discussion

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

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

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

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

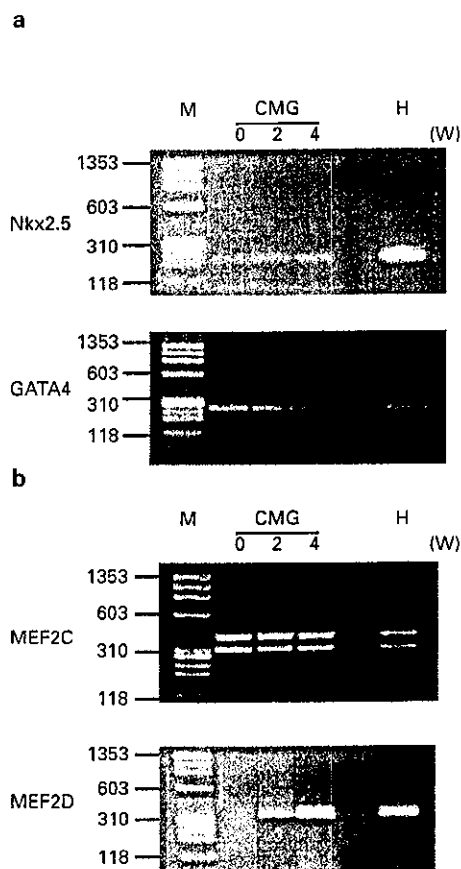


Figure 3 RT-PCR analysis of cardiomyocyte-specific transcription factors. (a) Time course of the expression of Nkx2.5 (a homeobox-type transcription factor specifically expressed beginning in the early developing heart) and GATA4 (a GATA-motif-binding Zinc-finger-type transcription factor expressed in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

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

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

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

### References

- 1 Leor J, Patterson M, Quinones MJ *et al.* Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996; **94** (Suppl II): 332-336.
- 2 Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997; **276**: 71-74.
- 3 Mäkinen S, Fukuda K, Miyoshi S *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; **103**: 697-705.

## 培養尿管芽細胞周期的伸展刺激による p38 MAP キナーゼの活性化

藤田 尚代\*<sup>1</sup>・長田 道夫\*<sup>2</sup>・金本 勝義\*<sup>2</sup>・福田 恵一\*<sup>3</sup>  
大森 さゆ\*<sup>1</sup>・飛弾麻里子\*<sup>1</sup>・粟津 緑\*<sup>1</sup>

## 要 旨

多嚢胞性異形成腎の嚢胞，異形成上皮では p38 MAP キナーゼ (p38) の発現・活性が増加している。また異形成腎には尿路閉塞が高率に合併する。本研究は尿路閉塞の流体力学的変化を尿管芽細胞周期的伸展により *in vitro* で再現し，p38 活性および異形成上皮に特徴的な細胞増殖，Pax2，TGF- $\beta$  1 発現への影響を検討した。p38 は周期的伸展により時間依存性に活性化された。BrdU 取込みは 24 時間伸展で有意に増加したが，p38 阻害剤 SB203580 存在下では抑制された。Pax2 蛋白発現も時間依存性に増加したが，p38 阻害により対照と同レベルに抑制された。培養上清 TGF- $\beta$  1 蛋白は 24 時間周期的伸展では変化せず，p38 阻害にも影響されなかった。以上，周期的伸展は尿管芽細胞において p38 活性化を介した細胞増殖および Pax2 発現を誘導した。p38 の活性化が胎児期尿路閉塞による嚢胞形成に参与する可能性が考えられる。

\*<sup>1</sup>慶應義塾大学 小児科  
(〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

\*<sup>2</sup>筑波大学 病理

\*<sup>3</sup>慶應義塾大学 心臓病先進治療学

Cyclic stretch stimulates proliferation and Pax2 expression *via* p38 mitogen-activated protein kinase in a ureteric bud cell line

Hisayo Fujita\*<sup>1</sup>, Michio Nagata\*<sup>2</sup>,  
Katsuyoshi Kanemoto\*<sup>2</sup>, Keiichi Fukuda\*<sup>3</sup>,  
Sayu Omori\*<sup>1</sup>, Mariko Hida\*<sup>1</sup>, Midori Awazu\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine

\*<sup>2</sup>Department of Pathology, University of Tsukuba

\*<sup>3</sup>Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine

## 序 言

MAP キナーゼ (MAPK) ファミリーは細胞内シグナル伝達の中核的酵素である<sup>1)</sup>。主なものに extracellular signal-regulated kinase (ERK)，p38 MAPK (p38)，c-Jun N-terminal kinase (JNK)がある。ERK は成長因子により活性化され，細胞増殖，分化を媒介する。一方 p38，JNK はストレス，サイトカインにより活性化され，主にストレス応答，増殖抑制，アポトーシスに参与する。

私たちは，ラット腎発生において ERK，p38 は胎児腎に，JNK は成熟腎に発現することを報告した<sup>2)</sup>。またラット後腎器官培養による実験で ERK はネフロン形成に，p38 は腎成長，ネフロン形成に必要であることを示した<sup>3)</sup>。MAPK が正常腎発達に必要であることからその発現異常が腎発生異常を生じる可能性が考えられる。多嚢胞性異形成腎は，最も頻度の高い腎奇形で，尿管芽の分化異常と考えられる異形成尿細管，嚢胞とそれらの周囲の未分化間葉組織から形成される。私たちはヒト多嚢胞性異形成腎の嚢胞，異形成尿細管において p38，ERK の発現・活性が増加し，JNK の発現・活性が減少していることを報告した<sup>4)</sup>。

多嚢胞性異形成腎には尿路閉塞が高頻度に合併することからその病態への関与が推測されている。私たちはヒト胎仔尿路閉塞モデル腎を免疫組織学的に検討し，ヒト多嚢胞性異形成腎と同様に嚢胞，尿管上皮において p38，ERK の発現が増加し，JNK の発現が減少している

Key words : p38

尿管芽細胞

周期的伸展

細胞増殖

Pax2



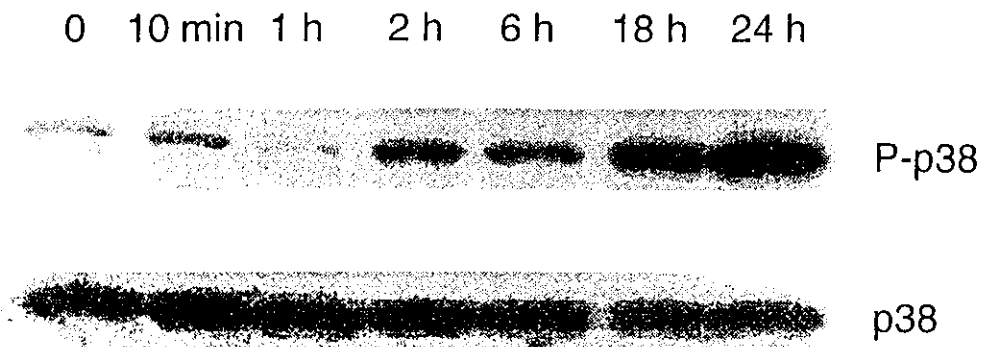


図1 尿管芽細胞周期的伸展による p38 の活性化  
尿管芽細胞を 0~24 時間周期的伸展し、バッファーに溶解後、抗活性型 p38 (P-p38)、抗 p38 抗体によるウェスタンブロットに供した。n=3。

### BrdU incorporation

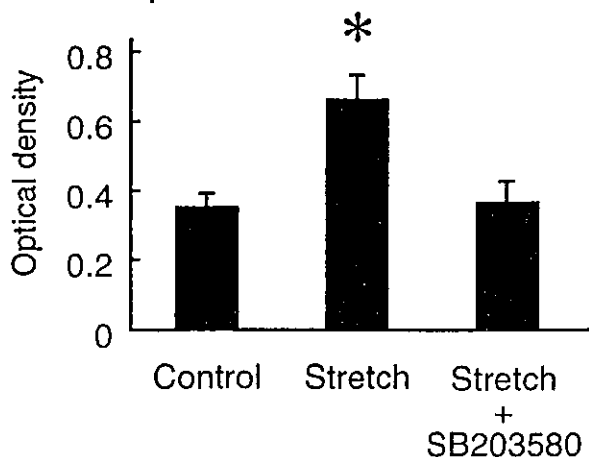


図2 p38 阻害による周期的伸展刺激 BrdU 取込み増加の抑制  
尿管芽細胞を p38 阻害剤 SB203580 5 μM 存在下 (stretch+SB203580) または非存在下 (stretch) で周期的伸展し、BrdU 取込みを測定した。平均値±標準誤差。\*P<0.05 vs control, n=7。

ことを報告した<sup>5)</sup>。ヒト多嚢胞性異形成腎、ヒツジ胎仔尿路閉塞モデル腎の嚢胞、異形成上皮において、細胞増殖が亢進し、転写因子 Pax2、サイトカイン transforming growth factor-β 1 (TGF-β 1) の発現が増加していることが知られている<sup>6)~8)</sup>。そこで今回、尿路閉塞の流体力学的変化を尿管芽細胞周期伸展により *in vitro* で再現し、p38、細胞増殖、Pax2、TGF-β 1 発現への影響を検討した。また p38 が細胞増殖亢進、Pax2 発現、TGF-β 1 発現に関与しているか否かを検討した。

#### 対象・方法

SV40 immortal マウスから樹立した尿管芽細胞<sup>9)</sup>を、

I 型コラーゲンをコーティングしたシリコンラバー培養皿上でコンピューター制御細胞伸展装置を用い 0~24 時間周期的伸展した (20%, 20 サイクル/分)。細胞をバッファーで溶解後、遠心、上清を抗 p38 (Santa Cruz Biotechnology)、抗活性型 p38 (P-p38) (New England Biolabs)、抗 Pax2 (Zymed) 抗体を用いたウェスタンブロットに供した。また細胞に BrdU を添加し 24 時間伸展下、非伸展下で培養、BrdU 取込みを ELISA で測定した。また培養上清を HCl で活性化後 NaOH で中和し、総 TGF-β 1 (活性型+不活性型) を Quantikine: Human TGF-β 1 Immunoassay Kit (R&D Systems Inc) を用い測定した。

0 10 min 1 h 2 h 6 h 18 h 24 h

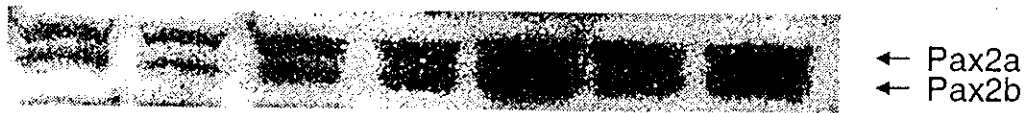


図3 尿管芽細胞周期的伸展による Pax2 発現の増加

尿管芽細胞を 0~24 時間周期的伸展し、バッファーに溶解、上清 93  $\mu$ g を抗 Pax2 抗体によるウェスタンブロットに供した。

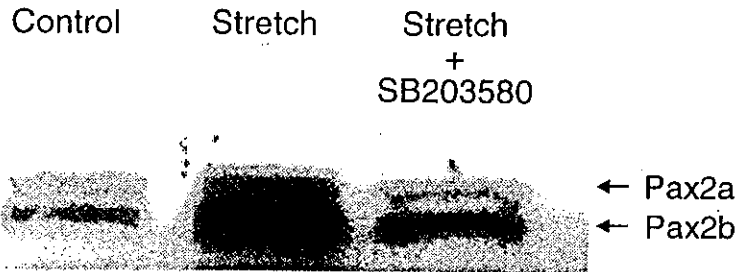


図4 p38 阻害による周期的伸展刺激 Pax2 発現の抑制

尿管芽細胞を 24 時間 SB203580 5  $\mu$ M 存在下 (stretch+SB) または非存在下 (stretch) で周期的伸展し、バッファーに溶解、上清 91  $\mu$ g を抗 Pax2 抗体によるウェスタンブロットに供した。

結果を平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。平均値の差の統計学的解析は ANOVA および多重比較で行い、 $P < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

### 結 果

周期的伸展により活性型 p38 は 10 分で増加し、1 時間では一旦基礎値に低下したが、2 時間後より再び増加、24 時間で基礎値の 5 倍となった (図 1 上段)。p38 の蛋白量には変化がなかった (図 1 下段)。

BrdU 取込みは 24 時間周期的伸展により対照群に比し有意に増加した ( $0.659 \pm 0.078$  vs  $0.349 \pm 0.148$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ , 図 2)。しかし p38 阻害剤 SB203580 5  $\mu$ M 存在下で伸展した細胞の BrdU 取込みは非刺激細胞と同レベルに抑制された ( $0.364 \pm 0.168$ )。

ウェスタンブロットによる Pax2 発現の検討では 48 kDa の Pax2a と 46 kDa の Pax2b が同定された (図 3)。周期的伸展により Pax2b 発現は時間依存性に増加し、24 時間で基礎値の 1.7 倍に増加した。Pax2a も同様に時間依存性に増加し、24 時間で基礎値の 1.5 倍となった。SB203580 5  $\mu$ M 存在下で 24 時間伸展培養した細胞では Pax2 発現は対照と同レベルに抑制された (図 4)。

培養上清総 TGF- $\beta$  1 濃度は 24 時間伸展により有意に変化せず、SB203580 による影響も認められなかった (図 5, 対照  $0.066 \pm 0.004$ , 伸展  $0.057 \pm 0.002$ , SB203580 存在下伸展  $0.064 \pm 0.003$ ,  $n = 6$ )。

### 考 察

本研究により尿管芽細胞を周期的に伸展すると p38 が活性化されることが明らかになった。また周期的伸展により細胞増殖、Pax2 発現が増加すること、これらの現象が p38 により媒介されることが示された。

ヒト多嚢胞性異形成腎、ヒツジ胎仔尿路閉塞腎の嚢胞、異形成尿管において p38 の発現・活性化、細胞増殖、Pax2、TGF- $\beta$  1 発現が亢進していることが私たちおよび Winyard ら、Yang らにより報告されている<sup>4)~7)</sup>。本研究は尿路閉塞による細胞伸展という物理的刺激を *in vitro* で再現し、細胞増殖、Pax2 発現と尿路閉塞との因果関係を明らかにした。すなわち細胞周期的伸展は p38 活性化、細胞増殖、Pax2 発現亢進を誘導することが示された。また p38 阻害剤 SB203580 存在下では BrdU 取込み、Pax2 発現共に抑制されたことから、異形成上皮に特徴的な細胞増殖、Pax2 発現亢進は p38 活性化に媒介さ

## TGF-β production

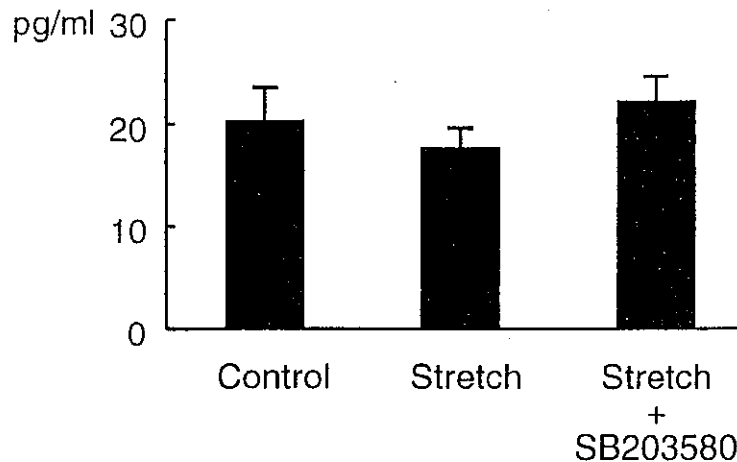


図5 尿管芽細胞周期的伸展による TGF-β1 発現  
尿管芽細胞を 24 時間, SB203580 5 μM 存在下 (stretch+SB) または非存在下 (stretch) で周期的伸展し, 上液中総 TGF-β1 を ELISA 法で測定した, n=6.

れると考えられる。

p38 は MAPK ファミリーに属する酵素で, 従来, ストレス応答, アポトーシス, 増殖抑制への関与が示唆されていたが, 近年肥大, 増殖などにも関与することが明らかになった。本研究において p38 は 10 分で活性化され, 一旦基礎値に復帰した後再び 24 時間まで時間依存性に活性化された。細胞伸展による p38 の活性化はメサンギウム, 平滑筋, 心筋, 上皮細胞で報告されている<sup>10)~13)</sup>。これらの細胞においては p38 活性化は一過性であることが多いが持続性に活性化される場合もある。成長因子による ERK の活性化は 2 相性で, 後半の持続性活性化が増殖に関与することが知られている。本研究における 2 相性の p38 活性化がどのような意義を持つのかについては今後の検討が必要である。本研究では活性化された p38 は細胞増殖, Pax2 発現を誘導したが, メサンギウム, 平滑筋, 心筋, 上皮細胞においては p38 は伸展による細胞外基質産生, アポトーシス, 肥大, サイトカイン産生を媒介した。細胞伸展により活性化された p38 は細胞により異なる生物学的作用を及ぼすと考えられる。

ヒト多嚢胞性異形成腎, ヒツジ胎仔尿路閉塞腎の嚢胞, 異形成尿管において TGF-β1 発現が亢進していることが Yang らにより報告されている<sup>7B)</sup>。TGF-β1 産生は私たちの実験条件では細胞伸展により有意な変化が見られず, SB203580 による影響も認められなかった。この理由として使用した ELISA の感度が低い, 24 時間では

蛋白レベルでの変化がまだ見られない, *in vitro* の実験条件が *in vivo* の状態を再現していない, TGF-β1 発現は細胞伸展に起因しないなどの可能性が考えられる。現在 mRNA レベルでの TGF-β1 発現および長期伸展刺激の TGF-β1 蛋白発現への影響を検討中である。周期的伸展条件は過去の上皮細胞を用いた同様の実験<sup>14)</sup>を参考に前実験を行い, 有意な変化が見られる 20%, 20 サイクル/分に設定した。本研究における実験条件が *in vivo* の状態を反映しているか否かも今後の検討課題である。

私たちの過去の検討では p38 と同様に, ERK もヒト多嚢胞性異形成腎, ヒツジ胎仔尿路閉塞腎の嚢胞, 異形成尿管において発現, 活性化されていた。ERK についても尿管芽細胞周期的伸展で活性化されるか否か, また細胞増殖亢進, Pax2 発現増加との因果関係を今後検討予定である。

腎発生異常は遺伝子異常, 尿路閉塞, 母体栄養, 催奇形因子により生じる<sup>15)</sup>。本研究は種々の細胞外因子が中間シグナル伝達分子 MAPK を介し遺伝子発現に影響を与え腎発生異常を生じるという私たちの仮説を支持するものである。今後 MAPK 修飾による腎発生異常の予防, 治療の可能性を考慮しつつ, 尿路閉塞以外の因子の MAPK への影響を検討する予定である。

### 結 論

周期的伸展刺激は, 尿管芽細胞において p38 活性化を

介した細胞増殖および Pax2 発現亢進を誘導した。これらの結果は、p38 の活性化が胎児期尿路閉塞による嚢胞形成に関与することを示唆する。

#### 文 献

- 1) Schaeffer, H.J. and weber, M.J. : Mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 2435-2444, 1999.
- 2) Omori, S., Hida, M., Ishikura, K., Kuramochi, S. and Awazu, M. : Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int.* 58 : 27-37, 2000.
- 3) Hida, M., Omori, S. and Awazu, M. : ERK and p38 MAP kinase are required for rat renal development. *Kidney Int.* 61 : 1252-1262, 2002.
- 4) Omori, S., Fukuzawa, R., Hida, M. and Awazu, M. : Expression of mitogen-activated protein kinases in human renal dysplasia. *Kidney Int.* 61 : 899-906, 2002.
- 5) Fujita, H., Nagata, M., Kanemoto, K., Fukuda, K., Omori, S., Hida, M. and Awazu, M. : Cyclic stretch stimulates proliferation and Pax2 expression via p38 mitogen-activated protein kinase in a ureteric bud cell line. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 : 104 A, 2002.
- 6) Winyard, P.J., Risdon, R.A., Sams, V.R., Dressler, G.R. and Woolf, A.S. : The PAX2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J. Clin. Invest.* 98 : 451-459, 1996.
- 7) Yang, S.P., Woolf, A.S., Yuan, H.T., Scott, R.J., O'Hare, M.J. and Winyard, P.J. : Potential biological role of transforming growth factor- $\beta$  1 in human congenital kidney malformations. *Am. J. Pathol.* 157 : 1633-1647, 2000.
- 8) Yang, S.P., Woolf, A.S., Quinn, F. and Winyard, P.J. : Deregulation of renal transforming growth factor- $\beta$  1 after experimental short-term ureteric obstruction in fetal sheep. *Am. J. Pathol.* 159 : 109-117, 2001.
- 9) Barasch, J., Qiao, J., McWilliams, G., Chen D., Oliver, J.A. and Herzlinger, D. : Ureteric bud cells secrete multiple factors, including bFGF, which rescue renal progenitors from apoptosis. *Am. J. Physiol.* 273 : F 757-767, 1997.
- 10) Gruden, G., Zonca, S., Hayward, A., Thomas, S., Maestrini, S., Gnudi, L. and Viberti, G.C. : Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor- $\beta$  1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 49 : 655-661, 2000.
- 11) Sotoudeh, M., Li, Y.S., Yajima, N., Chang, C.C., Tsou, T.C., Wang, Y., Usami, S., Ratcliffe, A., Chien, S. and Shyy, J.Y. : Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282 : H 1709-1716, 2002.
- 12) Aikawa, R., Nagai, T., Kudoh, S., Zou, Y., Tanaka, M., Tamura, M., Akazawa, H., Takano, H., Nagai, R. and Komuro, I. : Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* 39 : 233-238, 2002.
- 13) Oudin, S. and Pugin, J. : Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27 : 107-114, 2002.
- 14) Ricardo, S.D., Ding, G., Eufemio, M. and Diamond, J.R. : Antioxidant expression in experimental hydronephrosis : role of mechanical stretch and growth factors. *Am. J. Physiol.* 272 : F 789-798, 1997.
- 15) Woolf, A.S. and Winyard, P.J. : Advances in the cell biology and genetic of human kidney malformations. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 : 1114-25, 1998.

## 心筋細胞の新生・再生療法と細胞移植療法

*Regeneration of cardiomyocyte and cellular transplantation therapy*

### Keywords

心筋細胞  
細胞移植  
骨髄間質細胞  
心不全 分化誘導

吉岡 正豊<sup>1)</sup> 福田 恵一<sup>2)</sup>

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

### Summary

心筋細胞は骨格筋細胞と異なり、生後まもなく終末分化して細胞分裂を行わなくなる。そのため、虚血性心疾患などにより傷害を受けた心筋の終末像である心不全に対する唯一の治療法は心臓移植しか存在しなかった。しかしながら、ドナー数の不足や免疫抑制療法の副作用などの問題点は克服されていない。近年の研究により、胚性幹細胞や骨髄細胞より心筋細胞が分化誘導されることが報告されてきており、同時にそれらの分化誘導された心筋細胞を心臓へ移植することによって心機能の改善をもたらすことも報告されている。心臓移植に取って代わる新しい治療法として、心筋再生療法が期待されている。

### はじめに

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

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

重要な遺伝子が単離され、機能解析がなされてきた。

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

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

### 再生心筋細胞移植による心不全治療への試み

細胞移植による心不全治療は、心筋細胞を補充することにより心不全へと

つながるリモデリングの過程を改善し、また、血管新生も補充することができると期待されている。歴史的にES細胞、胎仔・新生仔心筋細胞、胎仔平滑筋細胞、腫瘍細胞(AT-1細胞)、自己心房筋、皮膚線維芽細胞など、さまざまな種類の細胞がその移植源として試されてきた。胎仔心筋細胞は心臓の線維化された組織に生着し、ホスト心筋細胞と介在板を介して電気的に結合し、心臓のポンプ能を改善させることが報告された<sup>1)</sup>。ここ10年に、骨格筋細胞<sup>2)-4)</sup>、ES細胞<sup>5)-7)</sup>、骨髄間葉系細胞<sup>8)-11)</sup>、純化血液幹細胞<sup>12)-17)</sup>、血管内皮前駆細胞<sup>18)-20)</sup>により傷害心筋の機能改善がなされたとの報告が相次いでおり、これらについて紹介することとする。

### AT-1細胞を用いた細胞移植

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

### 胎仔心筋を用いた細胞移植

心筋細胞の場合、初代培養を行ってある程度の収率で生きた細胞が得られるのは、胎仔もしくは新生仔の心筋細胞に限られる。胎仔心筋細胞を心臓内に移植すると、移植した心筋細胞は心臓の線維化された組織中に生着できること、さらに移植したドナー細胞とホストの心筋細胞が介在板を介した電気的結合を取り得ることが報告された<sup>23)</sup>。さらに、胎仔心筋細胞の移植は心臓の収縮能、拡張能を改善することが報告されたが、倫理的問題の克服は困難であると思われる。

### 骨格筋を用いた細胞移植

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

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

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

### ES細胞を用いた細胞移植

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

と、その一部が心筋細胞になることが知られている。ES細胞は、これまで心筋細胞の発生・分化の研究に用いられ、*in vitro*における細胞増殖因子による心筋誘導や遺伝子発現の解析に主として用いられてきた。しかし、これらの細胞は発生・分化の研究には有用であるが、*in vivo*に移植した際には未分化な細胞が少しでも残存していると奇形腫となり、腫瘍化することが知られている。収縮を認める胚様体中に心筋細胞が占める割合が5%と少量であることから、心筋細胞を高い純度で選別することがES細胞を用いた細胞移植には鍵となることがわかる。Klugらは、 $\alpha$ ミオシン重鎖( $\alpha$ MHC)プロモーターの下流にネオマイシン耐性遺伝子を導入したマウスES細胞において、G418(ネオマイシン耐性遺伝子を導入する細胞を選択する目的で用いられるアミノグルコシド系抗生物質)を用いて、心筋細胞へと分化した細胞を特異的に選択した。この純化したES細胞由来心筋細胞がホスト心筋細胞へ生着し、さらに介在板を形成することを示した<sup>51</sup>。さらにはラット心筋梗塞モデルにおいて、心機能を改善することも示されている<sup>52</sup>。これらの報告の欠点としては、移植源であるES細胞由来心筋細胞が均一の細胞集団でなく、心房筋、心室筋、骨格筋などさまざまな種類の細胞を含んでいるという点があげられる。その欠点を補うために、心室筋の表現型を示す細胞のみを移植源として用いるべく、ミオシン軽鎖2v(MLC-2v)プロモーターと

CMVのエンハンサーの下に蛍光蛋白であるenhanced green fluorescent protein(EGFP)をレポーター遺伝子として用いる報告<sup>53</sup>もされている。その有用性についてはいまだ不明であるが、均一な細胞集団を用いることで、より実用性が高いであろうと思われる。

最近、ヒトES細胞が樹立<sup>54</sup>され、さらにマウスES細胞と同じく心筋細胞へと分化する<sup>55</sup>ことが報告されている。移植への有用性が期待されるが、ヒトES細胞由来心筋細胞は早期の心筋細胞としての表現型を示し、マウスES細胞由来心筋細胞と性質を異にしていることから、今後更なる解析を待つ必要がある。また、胚細胞を使用するという倫理問題も今後克服される必要があるだろう。

### 骨髄細胞を用いた細胞移植

#### 1. 骨髄細胞を用いた心筋細胞の再生

骨髄細胞は血液幹細胞とその支持細胞である間質細胞より構成される。骨髄間質細胞中には間葉系細胞の幹細胞が存在し、中胚葉由来のさまざまな細胞に分化することが知られている。間葉系幹細胞はこれまで骨芽細胞や軟骨芽細胞、脂肪細胞などに分化することが報告されていることから、我々は間葉系幹細胞が心筋にも分化するのではないかと考え、心筋への分化誘導を試み、ほぼ心筋細胞と考えられる細胞への分化誘導に成功した<sup>56</sup>。これらの骨髄間質細胞由来の心筋細胞を car-

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

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

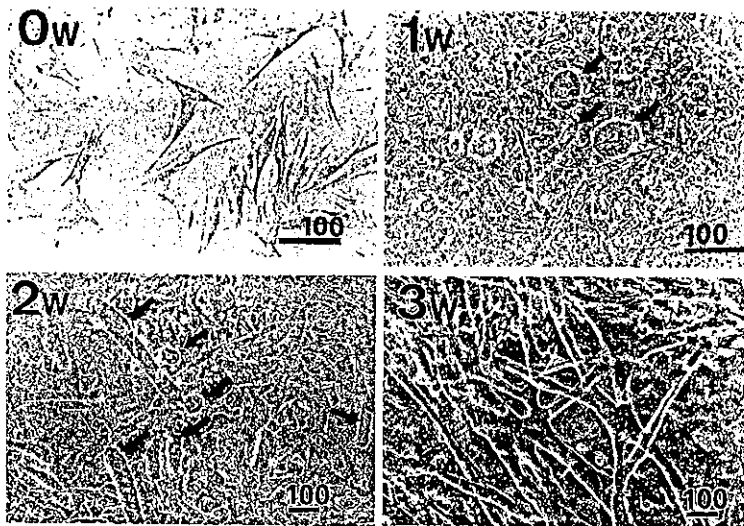
する。分化誘導4週以後には培養皿の上の直接連結される細胞はすべて同期して収縮し、心筋組織様になる。マウスの細胞は毎分300~400回程度の心拍数で収縮する。これに対し、CMG細胞は毎分120~250回の速さで規則

的に収縮した。

## 2. CMG細胞の表現型

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

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



骨髄由来の心筋細胞(CMG細胞)は最終分化誘導後2週目頃より自己拍動を開始し、周囲の細胞と連結し、同期して収縮する。矢印で示した細胞が自己拍動を開始し、心筋細胞となる。スケールバーは100 $\mu$ m。

図1 最終分化誘導前、誘導後1~3週目のCMG細胞

表 心筋収縮蛋白質のアイソフォームからみたCMG細胞の表現型

	心房筋		心室筋			CMG細胞
	胎仔型	成獣型	胎仔型	新生仔型	成獣型	
$\alpha$ -アクチン	Skeletal	Cardiac	Skeletal>Cardiac	Skeletal	Cardiac	Skeletal>Cardiac
ミオシン重鎖	$\alpha$ 型> $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型> $\alpha$ 型	$\alpha$ 型> $\beta$ 型	$\alpha$ 型	$\beta$ 型> $\alpha$ 型
ミオシン軽鎖	2a	2a	2v	2v	2v	2v



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

### 3. CMG 細胞の活動電位

ガラス微小電極により CMG 細胞の活動電位を記録すると、洞結節細胞型と心室筋細胞型の 2 種類が観察された (図 3)。両者に共通した活動電位の特徴は、①活動電位時間が長いこと、②比較的浅い (より脱分極側) 静止期電位をもつこと、③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められること、であった。また、心室筋細胞型では活動電位は Peak & Dome 型 (活動電位第一相をもつ) を呈した。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は、従来ウサギやラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋細胞型はこれに比し、静止膜電位は深く (より過分極側)、活動電位振幅は大きい傾向を示した。分化誘導後 2~3 週の細胞ではすべて洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後 4 週頃より心室筋細胞型が観察され、時間経過とともに次第に増加した。

4. 骨髄細胞を用いた細胞移植  
我々の CMG 細胞の樹立以来、骨髄細胞を用いた心筋細胞の再生は注目を

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

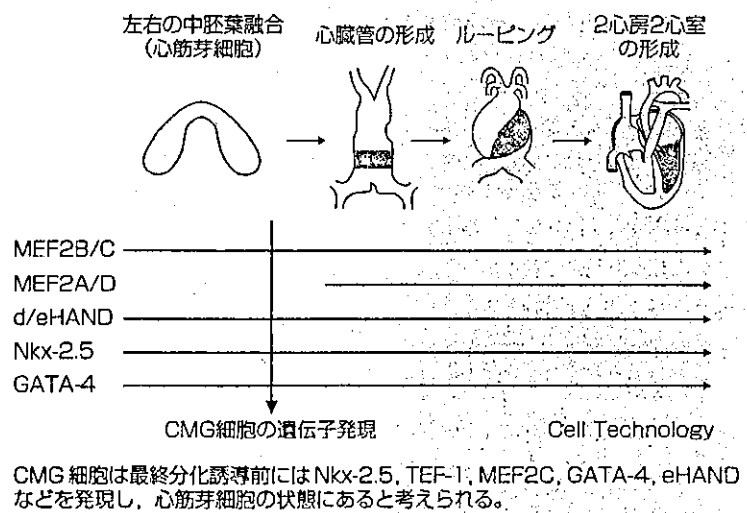


図 2 転写因子発現様式からみた CMG 細胞の発生学的位置

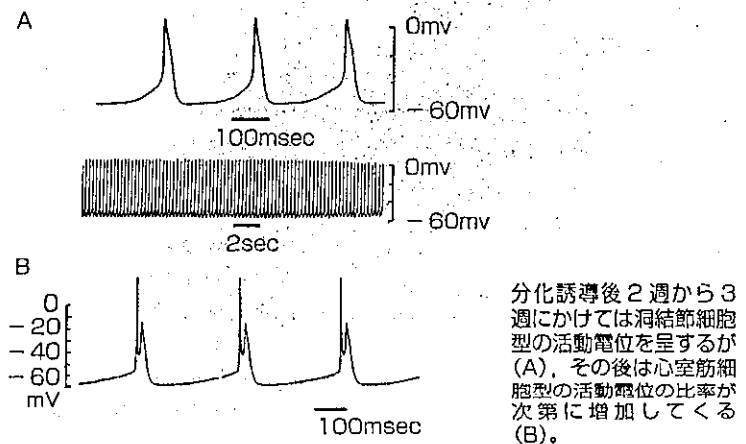


図 3 骨髄間質細胞より分化誘導した心筋細胞 (CMG 細胞) の活動電位

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

## おわりに

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

## 文献

- 1) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al : Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 62 : 654-661, 1996
- 2) Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al : Regenerating functional myocardium : improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4 : 929-933, 1998
- 3) Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, et al : Cell transplantation for myocardial repair : an experimental approach. *Cell Transplant* 1 : 383-390, 1992
- 4) Kessler PD, Byrne BJ : Myoblast cell grafting into heart muscle : cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 61 : 219-242, 1999
- 5) Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al : Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98 : 216-224, 1996
- 6) Min JY, Yang Y, Converso KL, et al : Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 92 : 288-296, 2002
- 7) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92-96, 2000
- 8) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al : Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty : feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120 : 999-1005, 2000
- 9) Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al : The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration : pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122 : 699-705, 2001
- 10) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 : II247-II256, 1999
- 11) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al : Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105 : 93-98, 2002
- 12) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 938 : 221-229, 2001
- 13) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
- 14) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 10344-10349, 2001
- 15) Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al : Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann NY Acad Sci* 938 : 208-218, 2001
- 16) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 : 1395-1402, 2001
- 17) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al : Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7 : 430-436, 2001
- 18) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 19) Shi Q, Rafi S, Wu MH, et al : Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92 : 362-367, 1998
- 20) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al : Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5 : 434-438, 1999
- 21) Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, et al : Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 264 : H1727-H1733, 1993
- 22) Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, et al : Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant* 7 : 239-246, 1998
- 23) Leor J, Patterson M, Quinones MJ, et al :

- Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat ; A potential method for repair of infarcted myocardium ? *Circulation* 94 : 11332-11336, 1996
- 24) Campion DR : The muscle satellite cell ; a review. *Int Rev Cytol* 87 : 225-251, 1984
- 25) El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, et al : Myocyte transplantation for myocardial repair ; a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 71 : 1724-1733, 2001
- 26) Garcia J, Tanabe T, Beam KG : Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors. *J Gen Physiol* 103 : 125-147, 1994
- 27) Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, et al : Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*. *FASEB J* 14 : 2540-2548, 2000
- 28) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998
- 29) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al : Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108 : 407-414, 2001
- 30) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999

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

慶應義塾大学 心臓病先進治療学 福田 恵一  
同 呼吸循環器内科 伯野 大彦

### はじめに

近年の再生医学の発達は次第に臨床医学に普及しつつあり、いくつかの領域ではすでに臨床応用されようとしている。心臓領域でもわれわれが骨髄中の幹細胞を用いることにより、心筋細胞が分化誘導できると報告して以来、さまざまな取り組みがなされてきた。再生心筋細胞を臨床応用してゆくにはさまざまなステップがあるが、まずなさねばならないことの1つに再生心筋細胞の性質の詳細な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さまざまな神経体液性因子が密接に関係していることが知られている。なかでも交感神経および副交感神経は7回膜貫通型G蛋白共役型受容体である $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  カテコラミン受容体, アセチルコリン受容体は心筋細胞の機能調節に重要な役割を担っている。 $\alpha_1$  受容体には $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  の3つのサブタイプが存在するが、これらはいずれも心臓における発現が報告されている<sup>1)</sup>。phenylephrine に代表される $\alpha_1$  刺激薬は *in vitro* および *in vivo* で心肥大を強力に惹起する<sup>2)</sup>。 $\beta$  受容体には $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  の3つのサブタイプが知られているが、心筋では主に $\beta_1$  受容体が陽性変力変時作用を規定している<sup>3)</sup>。一方、アセチルコリン受容体に関しては既知の $M_1$  から $M_5$  の5つのサブタイ

プが存在するが、心臓には主として $M_2$  が心筋に発現しており<sup>4)</sup>、陰性変力変時作用を担っている。

これに対し、骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるカテコラミンおよびアセチルコリン受容体の発現の有無はこれまで明らかではなく、今後再生心筋細胞を心筋細胞移植の有用なツールとするためにはこれらの受容体の発現解析が重要と考えられる。再生心筋細胞の作製<sup>5)</sup>、その性質の特徴の一部は既に本誌に解説してある<sup>6)</sup>ので、本稿では再生細胞における $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $M_1$ ,  $M_2$  受容体の発現の有無およびそれらのシグナル伝達機能の有無につき解説することとした。

### 再生心筋細胞における交感神経 $\alpha_1$ 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、 $\alpha_{1D}$  受容体はわずかに発現し

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