

図1 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるアドレナリン  $\alpha_1$  受容体の発現の解析  
 a : RT-PCR による  $\alpha_1$  受容体サブタイプ ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) の発現. CMG は再生心筋細胞を示す. 数字は分化誘導からの時間 (週数) を示す.  
 b : 受容体発現の定量的評価. 心筋分化が進むと  $\alpha_{1A}$  受容体の発現が上昇し,  $\alpha_{1D}$  受容体の発現が低下した.

ていることが知られている<sup>7)</sup>. 図1に示したように再生心筋細胞では分化誘導を行う前からすべての受容体アイソフォームの発現を認めたが, このときには主として  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1B}$  受容体が発現し, 若干の  $\alpha_{1A}$  受容体が発現していた. これに対し, 分化誘導後に心筋細胞の表現型を取るようになると,  $\alpha_{1A}$  受容体の発現は増加し,  $\alpha_{1B}$  受容体の発現は一定,  $\alpha_{1D}$  受容体の発現は低下するようになり, 心筋細胞の発現様式と類似した発現様式に変化する<sup>8)</sup>.

再生心筋細胞を  $\alpha_1$  刺激薬である phenylephrine で刺激すると, 受容体下流のシグナルである ERK1/2 が時間依存性, 用量依存性に活性化された. この活性化は  $\alpha_1$  受容体遮断薬である prazosin により抑制された<sup>8)</sup> (図2).

さらに, 再生心筋細胞を無血清培養条件下で phenylephrine 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3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カテコラミン  $\alpha_1$  受容体が遺伝子レベルで発現してるだけでなく, シグナル伝達機能, さらには心肥大作用という生理的機能を有していることが明らかとなった. また, 分化誘導前の骨髄幹細胞の状態から受容体を発現している理由に関しては骨髄間質の細胞も生体内で交感神経の支配を受けることが知られており, これに起因しているものと推測される. 交感神経の  $\alpha_1$  受容体の発現はアイソフォームの存在が知られる前は比較的組織特異性が低いとされてきた. アイソフォームの存在が明らかになるにつれ, 組織特異性が知られるようになってきた. 本研究により再生心筋細胞では心筋の表現型を獲得するとともに, より心筋型に近いものに変化したとも考えられる.

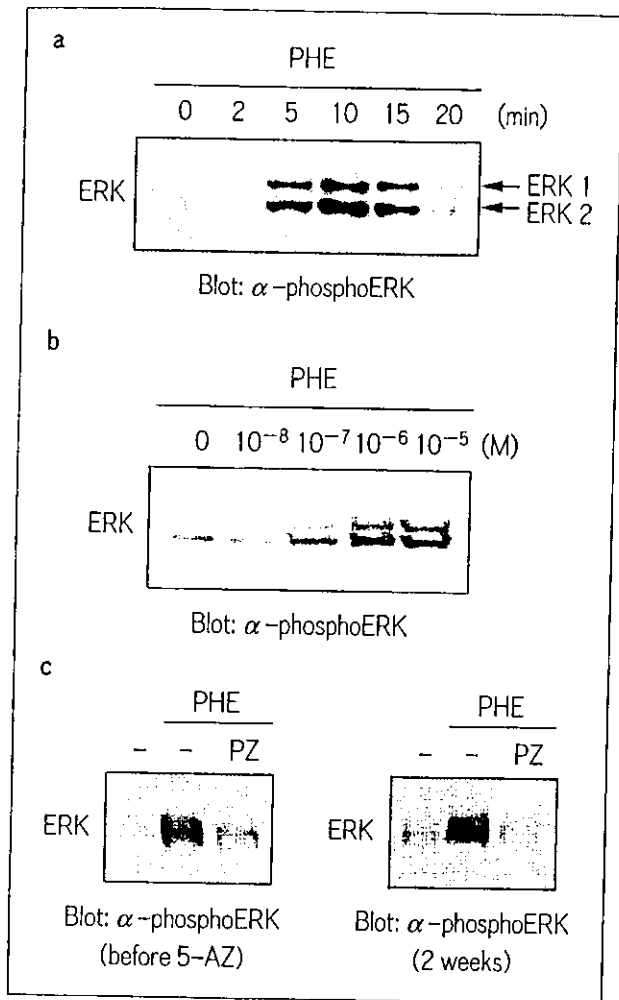


図2 再生心筋細胞を $\alpha_1$ 受容体刺激薬 phenylephrine で刺激した際のシグナルの活性化  
MAPKファミリーのERKの活性化をリン酸化ERKの抗体で解析した。aは時間経過，bは濃度依存性をみたものである。cは $\alpha_1$ 受容体遮断薬 prazosin を前投与した際のERKの活性化をみたもので，prazosin 前投与により完全にリン酸化が抑制されている。PHEはphenylephrineを示す。

### 再生心筋細胞における交感神経 $\beta$ 受容体の発現と機能

心筋細胞では交感神経 $\beta$ 受容体はよく知られているように $\beta_1$ ,  $\beta_2$ の2種類が存在する。 $\beta_1$ 受容体は心筋細胞特異的に発現するが， $\beta_2$ 受容体は気管支平滑筋や末梢血管にも存在する。心筋細胞では $\beta_1$ 受容体が約80%， $\beta_2$ 受容体が約20%の比率であるとされている<sup>9,10</sup>。

再生心筋細胞では $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体とも心筋細胞の

表現型を取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持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4)。

これらの受容体はいずれも7回膜貫通G蛋白共役型の受容体を有しており，Gs, cAMP合成酵素を介してセカンドメッセンジャーとしてcAMPを上昇させる。再生心筋細胞を $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体両方の刺激薬であるisoproterenolで刺激するとcAMPは用量依存的に上昇した。また， $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 両受容体の遮断薬であるpropranololを前投与しておくことこのcAMPの上昇は完全に抑制された(図5)。

一般的に心筋細胞を $\beta$ 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isoproterenolで刺激した際には前値に比して約50%の上昇が観察された。これに対し， $\beta_1$ 選択性遮断薬CGP20712A， $\beta_2$ 選択性遮断薬ICI118551を前投与しておくこと，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isoproterenolで刺激した際には心収縮力の指標である短縮率(% shortening)，収縮速度も同様にisoproterenol刺激により増大し，CGP20712Aによりほぼ対照レベルまで抑制された(表1)。

心筋細胞を $\alpha_1$ あるいは $\beta$ 刺激すると，心肥大のマーカー遺伝子とされるANPおよびBNPの発現が増強することが知られている。再生心筋細胞をphenylephrineおよびisoproterenol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6に示した。phenylephrine, isoproterenol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持つことが観察された。

これらの所見より，再生心筋細胞では心筋細胞の表現型を獲得すると $\beta_1$ ,  $\beta_2$ 受容体を発現し，これらを刺激すると心拍数の上昇，心収縮力の増強が観察されること，そしてこのシグナルは主として $\beta_1$ 受容体を介するものであることが明らかと

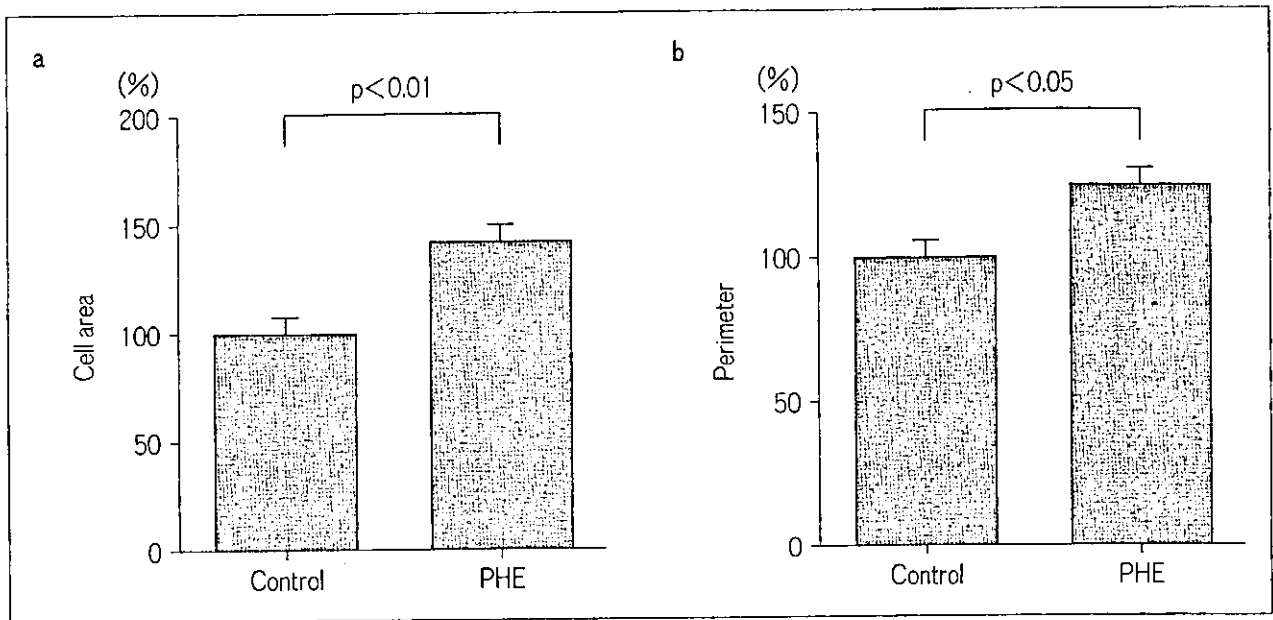


図3 再生心筋細胞を  $\alpha_1$  受容体刺激薬 phenylephrine で刺激した際の細胞表面積 (a) と周長 (b) の変化  
無血清下で再生心筋細胞を phenylephrine で48時間刺激した際の変化を示す。PHE は phenylephrine を示す。

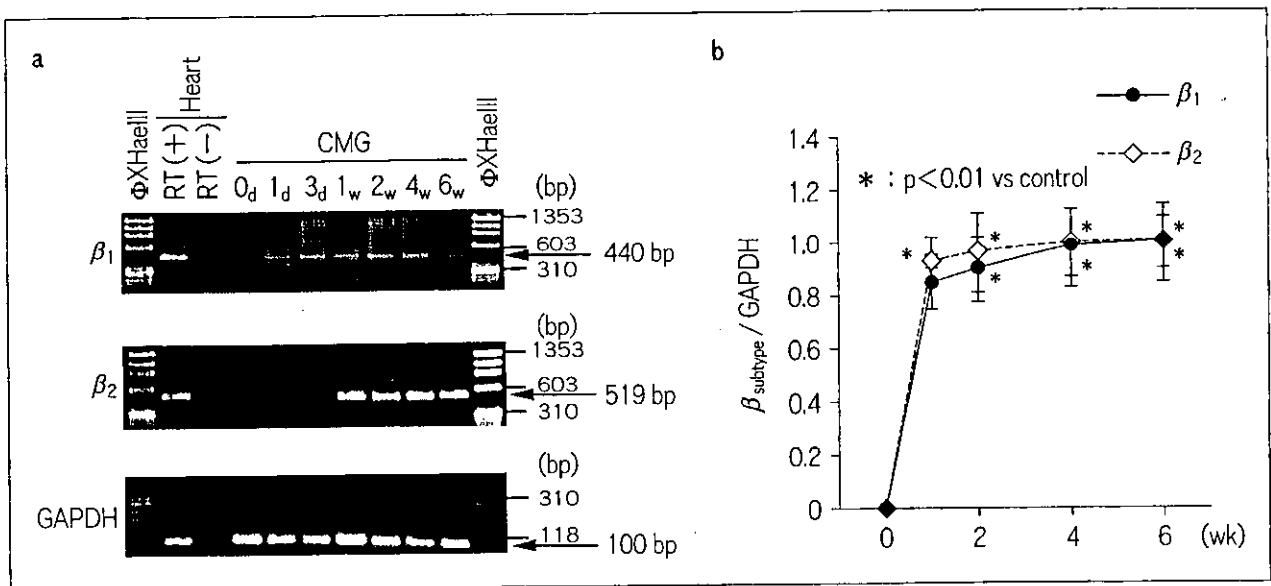


図4 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるアドレナリン  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  受容体の発現の解析  
a: RT-PCR による  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  受容体サブタイプの発現。  
b: 受容体発現の定量的評価。心筋分化が進むと  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  両受容体の発現が上昇した。

なった。

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  $M_1$  受容体か

ら  $M_5$  受容体まで5種類の受容体が存在する。心筋細胞にはこれらの受容体のうち主として  $M_2$  受容体が存在する。近年の研究により心筋細胞には  $M_1$  受容体も存在することが知られている<sup>11)</sup>。再生心筋細胞では分化誘導前の状態では  $M_1$ ,  $M_2$  受容体とも発現は認められなかったが、分化誘導の

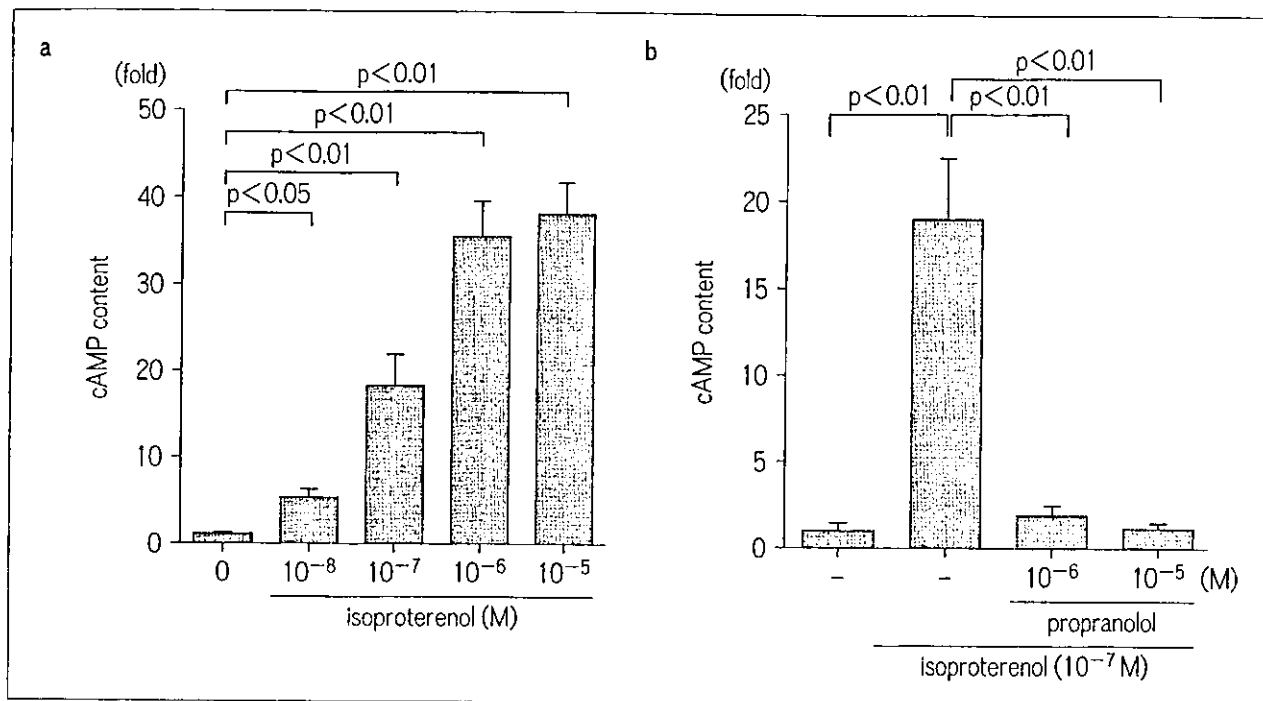


図5 再生心筋細胞をβ刺激薬 isoproterenol で刺激した際のセカンドメッセンジャー cAMP の変化  
 a: 再生心筋細胞をさまざまな濃度の isoproterenol で刺激した際の cAMP 含量の変化. 用量依存的に cAMP が上昇することが観察された.  
 b: 非特異的β受容体遮断薬 propranolol を前投与した際の isoproterenol 刺激時の cAMP 濃度. propranolol 前投与によりほぼ完全に cAMP の上昇が抑制された.

表1 再生心筋細胞における isoproterenol 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	isoproterenol (10 <sup>-7</sup> mol/l)			
		生理食塩水	propranolol (10 <sup>-7</sup> mol/l)	CGP20712A (10 <sup>-7</sup> mol/l)	ICI118551 (10 <sup>-7</sup> 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 (μm)	5.0±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 (μm/s)	71.1±5.2	100.9±11.0*	71.3±8.8‡	70.6±6.6‡	ND

\*: p<0.05 vs control, †: p<0.01 vs vehicle (isoproterenol only), ‡: p<0.05 vs vehicle, ND: not determined

後, 心筋細胞の表現型を持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7). 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, この発現様式は容易に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ことが知られている. M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 受容体は異な

るG蛋白, すなわち各々G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub>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<sub>qα</sub>, G<sub>iβγ</sub>を介してホスホリパーゼC<sub>β</sub>を活性化しIP<sub>3</sub>産生を惹起することが以前に報告されている<sup>12)</sup>. そこでアセチルコリンの類似化合物であるカルバコールで再生心筋細胞を刺激すると, セカンドメッセンジャージャーのIP<sub>3</sub>が濃度依存性に上昇した. このIP<sub>3</sub>の上昇はムスカリン

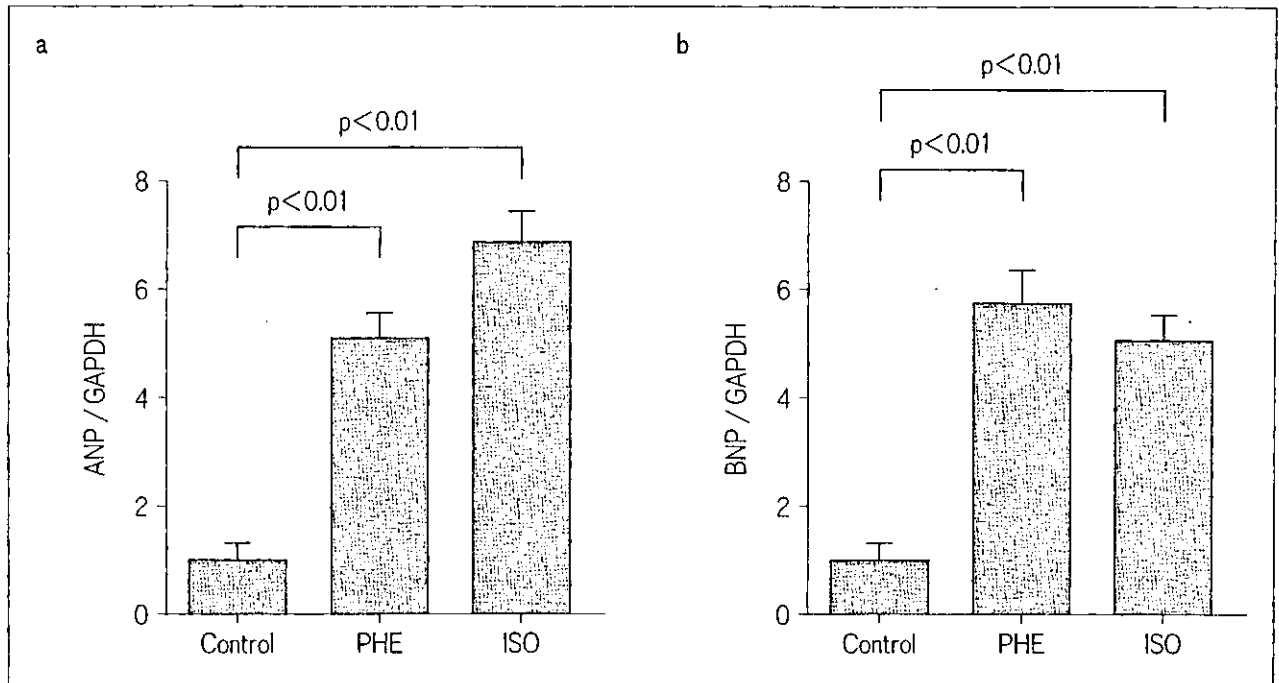


図6 再生心筋細胞を phenylephrine あるいは isoproterenol で刺激した際の肥大マーカー遺伝子 ANP, BNP の遺伝子発現の変化  
再生心筋細胞を  $\alpha_1$  刺激あるいは  $\beta$  刺激した場合, いずれの場合も ANP(a), BNP(b) の発現の上昇が観察された。

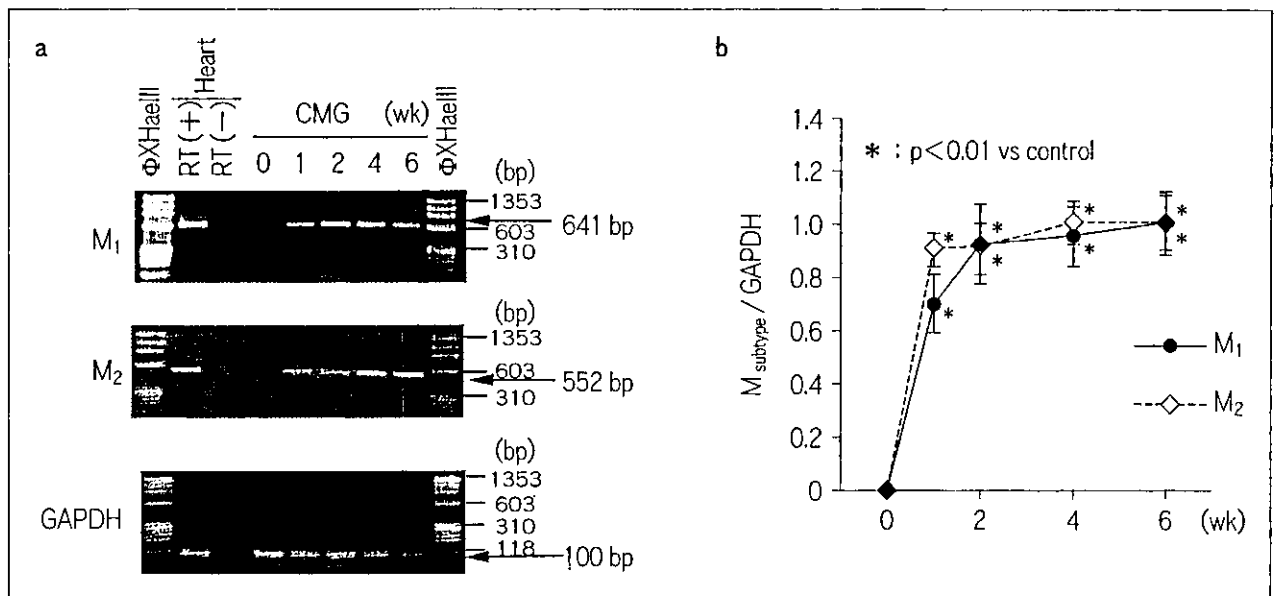


図7 骨髄細胞由来の再生心筋細胞におけるムスカリン M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 受容体の発現の解析  
a: RT-PCR による M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 受容体サブタイプが発現。  
b: 受容体発現の定量的評価. 心筋分化が進むと M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 両受容体の発現が上昇した。

受容体共通の非特異的遮断薬 atropine, および M<sub>2</sub> 受容体特異的遮断薬 AFDX116により強く抑制された (図8)。

以上の現象は再生心筋細胞が副交感神経ムスカリン M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 受容体を発現し, さらにシグナル伝達機能を持つこと, その中心は M<sub>2</sub> 受容体である

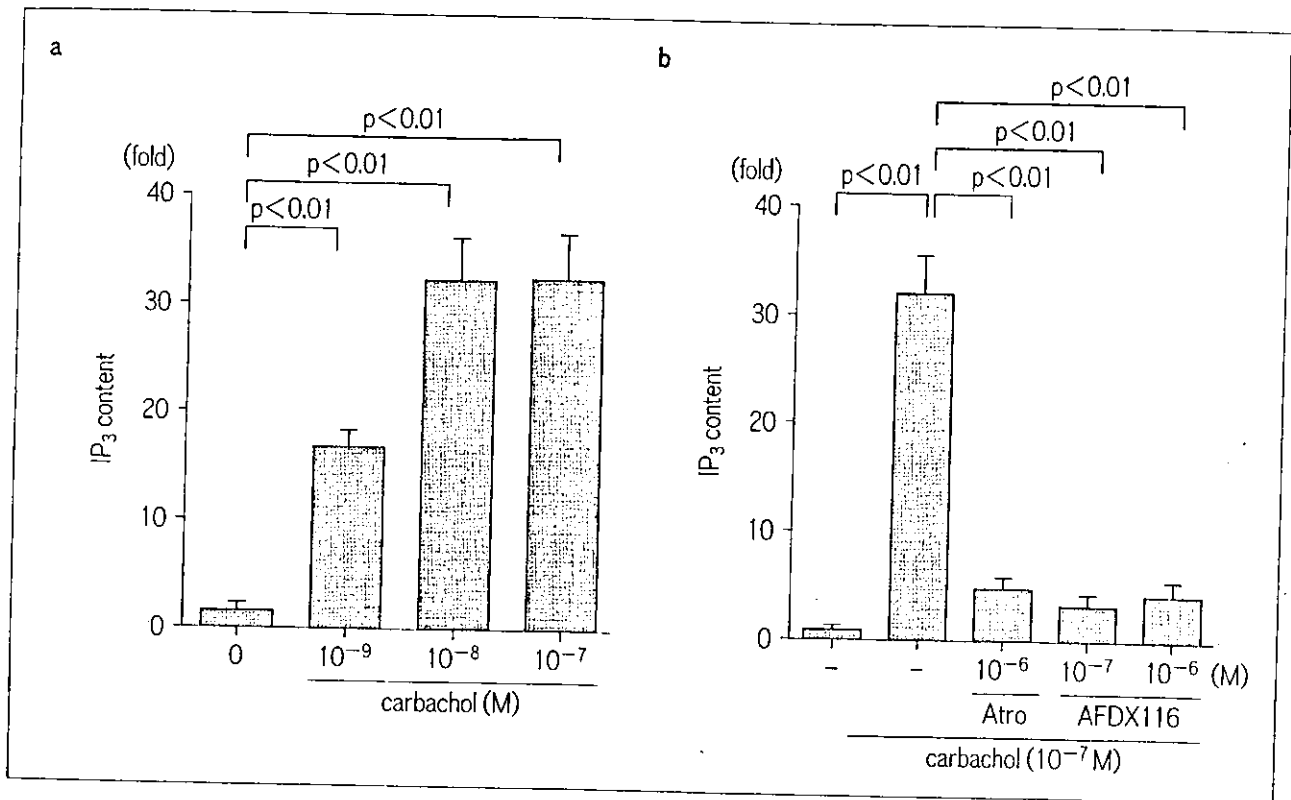


図8 再生心筋細胞をムスカリン刺激薬 carbachol で刺激した際のセカンドメッセンジャー IP<sub>3</sub> の変化  
 a: 再生心筋細胞をさまざまな濃度の carbachol で刺激した際の IP<sub>3</sub> 含量の変化. 用量依存的に IP<sub>3</sub> が上昇することが観察された.  
 b: 非特異的ムスカリン受容体遮断薬 atropine, M<sub>2</sub> 選択的遮断薬 AFDX116 を前投与した際の carbachol 刺激時の IP<sub>3</sub> 濃度. atropine, AFDX116 前投与によりほぼ完全に IP<sub>3</sub> の上昇が抑制された.

ことを示している。

### 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、さまざま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さまざまな点で重要な意味を持つと考えられる。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、レシピエントの心筋と電気生理学的にも血行動態的にも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、移植した再生心筋

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に因して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は今後の研究を待たねばならない。

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

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

## 文 献

- 1) Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Casanova E et al: 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
- 2) Chien KR, Knowlton KU, Zhu H et al: Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 1991; **5**: 3037-3046
- 3) Steinberg SF: The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 1999; **85**: 1101-1111
- 4) Hosey MM: Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 1992; **6**: 845-852
- 5) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; **103**: 697-705
- 6) 福田恵一, 牧野伸司, 梅澤明弘: 骨髄細胞から心筋細胞への分化誘導とその形態学的, 電気生理学的, 分子生物学的解析. *循環器専門医* 1998; **6**(2): 185-190
- 7) Rokosh DG, Stewart AF, Chang KC et al: 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
- 8) Hakuno D, Fukuda K, Makino S et al: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; **105**: 380-386
- 9) Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB et al: Beta 2-adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1995; **76**: 40-52
- 10) Steinberg SF: The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 1999; **85**: 1101-1111
- 11) Sharma VK, Colecraft HM, Wang DX et al: Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1996; **79**: 86-93
- 12) Subers EM, Nathanson NM: Muscarinic acetylcholine receptor function in chick heart cells cultured in serum-free medium. *J Mol Cell Cardiol* 1988 Feb; **20**(2): 131-140

# 7 フローサイトメトリー (FCM)

真鍋知宏 (慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科)  
福田恵一 (慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学)

フローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) は、単一の細胞の複数の特徴を同時に高速で測定する技術である。細胞表面に発現している分子を利用して、細胞の性質を解析することができる。これを応用して、目的の細胞を生きた状態で採取することも可能である (ソーティング)。当初は血液学、免疫学の分野で利用されていたが、再生医学の進歩とともに、循環器領域においても、幹細胞や前駆細胞を選択するための手法として用いられるようになってきている。

FCMと並列してFACS (fluorescence activated cell sorter) という言葉が使われているが、FACSはBecton Dickinson社の商品名である (Beckman Coulter社の商品名はEPICSという)。

### 原理

FCMのシステムは流路系、光学系、電気系の3つの系から成り立っている (図1)。シース液 (サンプル流を鞘状に包んで流れるリン酸緩衝液) の層流中に細胞を流して、細胞の散乱光と蛍光を検出する。検出された光から細胞の相対的な大きさ、内部構造、細胞膜・細胞質・核内に存在するさまざまな抗原、核酸の量などの情報を得ることができる。細胞にレーザービームを当てると、レーザー光は散乱して、細

胞が蛍光物質で染色されていると蛍光を発する。散乱光と蛍光はレンズにより集光され、光学フィルターを通過し、検出器に入る。その後、電気信号に変換されて解析データが得られる。

散乱光は散乱する方向により前方散乱光 (forward scattered light; FSC) と側方散乱光 (side scattered light; SSC) の2種類に分類される (図2)。前者は細胞の表面積や大きさを表し、後者は細胞の核、顆粒など細胞内部構造を表している。

FCMで用いられる抗体は、蛍光色素で標識したモノクローナル抗体で、用途に合わせて各社がさまざまな製品を出している。よく用いられる蛍光色素にはFITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), PerCP (peridinin chlorophyll protein), Cy5, TR (Texas red), APC (Allophycocyanin) などがある。前4者は488nmの吸収域を、後2者は598nmの吸収域を有している。それぞれの励起波長は図3のとおりである。

ソーティング法には水滴荷電方式とセルキャプチャー方式がある。前者はFACS Ariaなどで採用されている方式で、荷電した水滴に電圧をかけることにより目的の細胞を得る。水滴を+と-に帯電できるので、同時に複数の細胞群をソートできる。後者はFACS Caliburなどで採用されている方式である。レーザー光照射により細胞

情報をキャッチされた水流は一定の時間後、圧電振動子により移動した管により捕集される。水滴荷電方式のように機器の細かい設定が不要ではあるが、回収率が低いことや時間がかかることが欠点である。

### FACSの利用法

#### (1) 細胞表面抗原解析

hematological malignancyの診断に利用されている。CD (cluster of differentiation) 抗原により細胞の性質を分類できる。蛍光色素のついたモノクローナル抗体を用いて、特定のCD抗原が発現しているかがわかる。

#### (2) 細胞周期

propidium iodide (PI) はDNA二重鎖に架橋結合する色素である。したがって蛍光強度がDNA量を反映しており、G0/G1, S, G2/M期の3つに分類される。PIは固定した細胞に用いる際には単にDNA量を判定するものであるが、生細胞を用いる際には細胞膜を通過しないので、死細胞を選別することが可能となる。

#### (3) 稀有な細胞の単離

複数の蛍光色素抗体で標識した細胞から、目的の抗原陽性、あるいは陰性の細胞だけ選択する (ソーティング)。



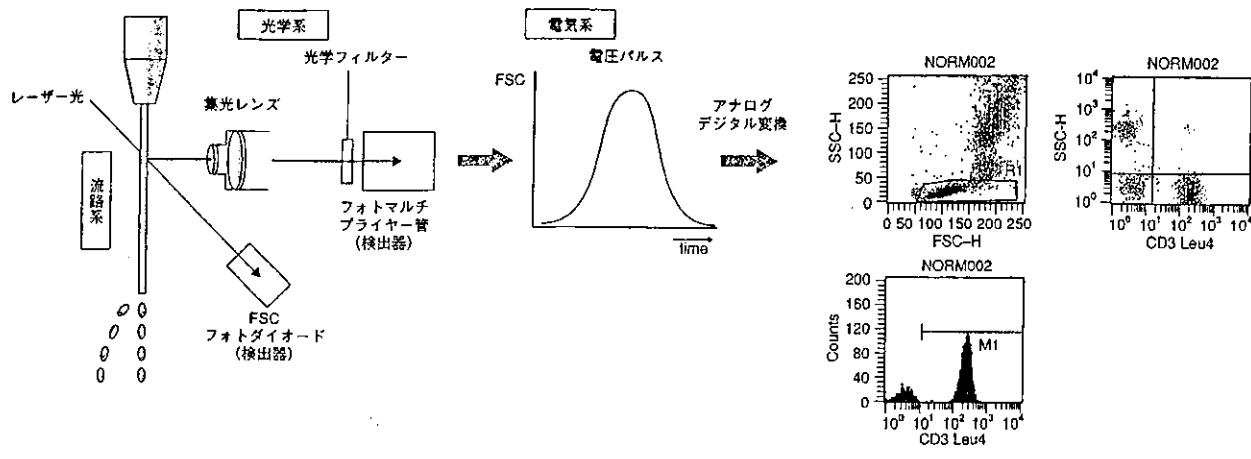


図1 FCMの原理

レーザー光を細胞に照射すると、散乱光が発される。そこから発された散乱光はband pass filterなどの光学フィルターを経て、検出器に入る。検出器では光学信号に比例した電気信号を出力する。電気振動のデータは各細胞ごとに収集される。その後データ変換が行われ、コンピュータの画面上、ヒストグラムやドットプロットの形式で表示される。さらにプロット上の領域を指定すると、特定の細胞集団の解析を行える。

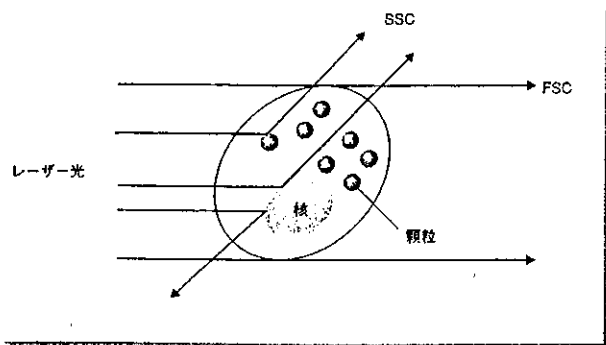


図2 細胞にレーザー光が当たった際に発される散乱光

前方散乱光 (forward scattered light; FSC) : レーザービームの光軸に対して前方で検出される散乱光で、細胞の表面積や大きさにほぼ比例している。  
側方散乱光 (side scattered light; SSC) : レーザービームの光軸に対して90°の角度で検出される散乱光で、細胞の核、顆粒など細胞内部構造にほぼ比例している。

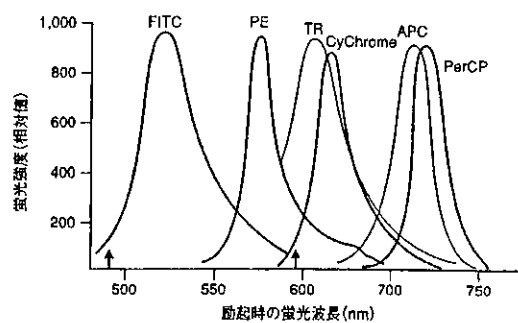


図3 波長488nmおよび598nm励起時の各蛍光波長

矢印は488nmのアルゴンレーザーの波長、598nmのdyeレーザーの波長を示す。FITC、PE、CyChrome、PerCPは488nmの吸収域を有し、TR、APCは598nmの吸収域をもつ。

例えば母体末梢血中に存在する胎児細胞の分離やさまざまな臓器の幹細胞の単離が可能となっている。

また発光オワンクラゲ (*aequorea victoria*) から得られた green fluorescent protein (GFP) は、遺伝子導入のためのレポーター遺伝子として、さらには発生分化を追跡するマーカーとして広く用いられている。このGFP

を導入した細胞だけをFACSにより選別することが可能である。

### まとめ

FCMは循環器領域においても、再生医学の進歩とともに必要な手法となっている。論文にもプロットの図が頻繁に出ており、これを機会に習熟さ

りたい。機器の操作法についてはメーカーのマニュアルを参照されたい。メーカー主催の講習会もあるので、初心者は参加をお薦めする。

### 文献

- 1) FACSCalibur Training Manual: Becton Dickinson, 2000.
- 2) 中内啓光監修：フローサイトメトリー自由自在。秀潤社、東京、1999.

# 心筋再生研究の現状

真鍋 知宏・福田 恵一\*

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科  
慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師\*

## はじめに

心臓は再生しない臓器と考えられていたが、日進月歩の再生医学研究により、心筋細胞は再生可能であることが示されている。胚性幹細胞や骨髄体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が現実のものとなり、再生心筋細胞移植を利用した心機能の改善に関する報告もある。また幹細胞を壊死した心筋梗塞領域周辺に注入すると、心筋細胞へと分化しうることも報告されている。いまだ実験動物段階ではあるものの、再生心筋細胞を利用した心不全治療への試みも開始されている。近年心臓内にも心臓幹細胞のようなSP細胞 (side population cell) の存在に関する報告も出されている。これらを用いた心筋再生による心機能の改善も報告され、心臓領域における再生医学は、臨床応用に向けて着実に前進している。

本稿ではいくつかの心筋細胞再生方法を述べ、これらの心機能回復への応用法や問題点を概説する。

## 心筋細胞再生に関する最近の知見

心筋細胞は胎生期には細胞分裂を

行いが、生後まもなく最終分化して細胞増殖を停止するものと考えられてきた。一方で頻度は低いものの、心筋梗塞巣周囲のごく一部の心筋細胞が細胞分裂することが報告されており、既存の概念に対する再検討が必要となってきた<sup>1)4)</sup>。この分裂像様の形態を示す細胞の起源は明確になっていないが、これのみで生理学的に心機能の代償を期待することはできない。*In vitro*の実験ではあるが、細胞周期調節蛋白の1つであるcyclin D1やサイクリン依存性キナーゼCDK4を制御することにより、最終分化した心筋細胞を細胞分裂させたという報告があり<sup>5)</sup>、今後の発展が期待される。

心臓移植後の症例検討から興味深い報告がなされている<sup>6)</sup>。女性ドナーから男性レシピエントに移植された心臓内に、Y染色体を有する心筋細胞が認められたというものである。このY染色体を有する心筋細胞は心臓以外の部位から幹細胞あるいは前駆細胞のような形で心臓に到達したと推測されている。ヒトの骨髄移植患者4例を検討した最近の報告<sup>7)</sup>ではその由来を骨髄としているが、今後詳細な検討が必要である。

心筋細胞の再生には幹細胞を用い

る方法以外に、非心筋細胞を心筋細胞に形質転換させる方法も以前から検討されていた。骨格筋のマスター遺伝子である*myoD*と同様な“心臓版*myoD*”遺伝子の単離が試みられた。しかし*myoD*のように単一遺伝子で他の細胞を心筋細胞に形質転換しうる遺伝子は現在のところ同定されていない。その過程において心臓特異的に発現される転写因子として、*Nkx2.5*, *GATA4*, *dHAND*, *eHAND*, *HRT*などがクローニングされてきた。現在も“心臓版*myoD*”をクローニングする研究は継続されている。

以上のような取り組みは精力的になされているものの、近年最も注目されているのは、幹細胞を利用した心筋細胞再生であろう。幹細胞はES細胞 (embryonic stem cell) と体性幹細胞に大別される。これら2種類を用いた心筋細胞再生の現状を紹介する。

## 胚性幹細胞を用いた心筋再生

ES細胞は受精直後の早期胚 (胚盤胞の内部細胞塊) から取り出された細胞である。そして、すべての臓

器・組織に分化しうる多分化能を有している。またES細胞を*in vitro*で大量に増殖させることが可能となっており、多分化能を維持しながら培養する技術も確立している。現在、ES細胞を用いて血液、血管内皮、神経、心筋、インスリン分泌細胞などの再生が行われている。ES細胞を培養条件下で未分化状態を維持するには、マウスではLIF(白血球抑制因子)を培養液中に入れておくだけでよいが、ヒトES細胞ではLIFに依存せず、マウス胎児フィーダー細胞との共培養が必要となる。ES細胞を心筋細胞に分化させるにはLIFを除去し、細胞を凝集塊(胚様体)にして培養すると一部の細胞が心筋細胞となり、拍動を開始する。ヒトES細胞から心筋細胞が分化できるとの報告がすでになされている<sup>9)</sup>。

ES細胞を用いた再生にはいくつかの問題点がある。第1にES細胞は第3者の細胞であるため、移植後に免疫抑制剤の投与を必要とすることである。第2に、ES細胞から分化させた細胞を実際に移植する際に、未分化状態の細胞が混入すると奇形腫を形成してしまう点である。第3に、発生段階の早期に分化してくる細胞は得やすいが、発生後期に出現する細胞を得るのは難しいことである。問題点はあるものの、国内においてもヒトのES細胞作製が成功しており、さらなる発展が期待される。

## 体性幹細胞を用いた心筋再生

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の幹細胞が存在することが明らかにされた。中胚葉由来の臓器では幹細胞は骨髓に存在すると考えられている<sup>9)</sup>。骨髓は元来造血の場であり、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、骨髓には骨髓間質細胞や造血支持細胞と呼ばれる血球系以外の細胞も存在する。骨髓間質細胞は多彩な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おり、その一部が骨や軟骨にも分化しうることは以前より知られていた。現在は骨髓間質細胞すべてが多分化能をもつのではなく、これらに含有される間葉系幹細胞と呼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。

間葉系幹細胞は骨髓中にわずかに存在する細胞で、ヒト新生児骨髓中の細胞の10000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。従来、間葉系幹細胞の同定は骨髓間質細胞に種々の方法により分化誘導を行い、他の細胞に分化すればretrospectiveに間葉系幹細胞が含有されていたのであろうとされてきた。間葉系幹細胞の同定は、現在ではある程度表面抗原が同定されてきたが、報告者により

異なっており<sup>10)11)</sup>、さらなる研究が必要とされる。

## 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

われわれは骨髓間葉系幹細胞が中胚葉のさまざまな臓器の細胞に分化することより、同じ中胚葉由来の心筋細胞にも分化するのではないかと考え、間葉系幹細胞に各種の分化誘導剤を投与する実験を施行した。その結果、自己拍動を開始する心筋細胞に分化しうることを明らかにした<sup>12)</sup>。マウス骨髓初代培養を行い、付着系の細胞である骨髓間質細胞を分離した。分離した骨髓間質細胞を長期培養することで不死化した細胞株を作製した。この多クローン細胞株にDNA脱メチル化剤である5-azacytidineを負荷し、さらに2週間程度培養を続けると非常に少ない確率ではあるが、自己拍動する細胞が得られる。この周辺の細胞を採取して同様の操作をくり返した。自己拍動を開始した細胞自体は継代不可能であるが心筋芽細胞と考えられる細胞は分裂、増殖をくり返すことができる。自己拍動する割合の高いクローンを最終的にCMG(cardiomyogenesisより命名)細胞株として樹立した。CMG細胞は5-azacytidineにより最終的に分化誘導を行うと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約30%であった。CMG細胞は培養条件下において毎分120~250回程度の速さで規則的に収縮した。電顕では典型的な横紋構造に加え心房顆粒を多数認め

表1 心筋収縮蛋白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

た。心筋細胞に分化したCMG細胞の収縮蛋白( $\alpha$ -アクチン, ミオシン重鎖, ミオシン軽鎖)のアイソフォームを表1に示す。心筋細胞は胎仔期, 新生仔期, 成獣期および心房, 心室で異なる収縮蛋白のアイソフォームを示すが, CMG細胞のアイソフォームを解析すると胎仔型心室筋に一致した表現型を取ることが明らかとなった。

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1)。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型を呈した。分化誘導後早期(2~3週後)にはすべての細胞で洞結節型が記録されたが, 分化誘導後後期(4週後)には心室筋細胞型が観察され, 次第に増加した。

CMG細胞の心筋細胞としての表現型を解析するため, 心筋細胞特異的蛋白質の発現を調べた。CMG細胞では心房利尿ホルモンANPおよびBNPを発現していた。心筋分化に関与する転写因子として *Nkx2.5*,

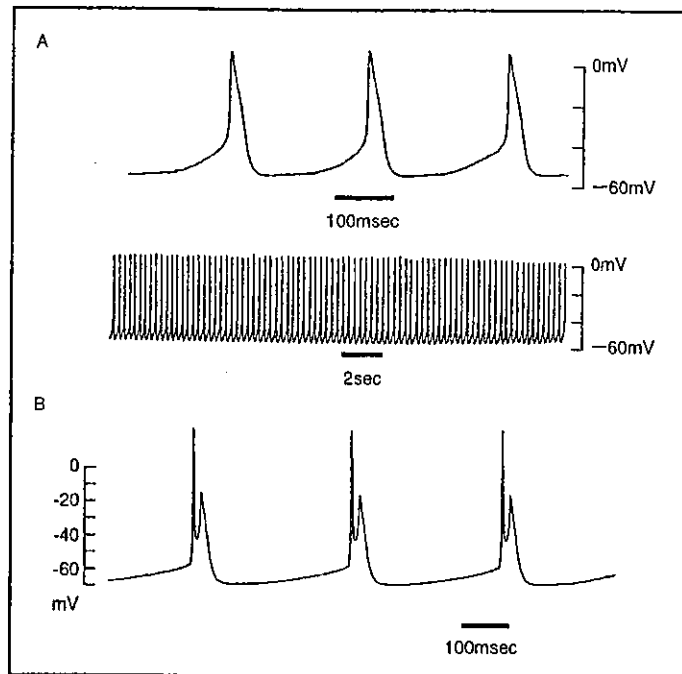


図1 骨髄由来心筋の活動電位  
A: 洞結節型, B: 心室筋細胞型

*GATA4*, *TEF-1*, *eHAND*, *HRT*などが発現していた。*MEF2* familyでは*MEF2A*, *MEF2C*, *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していた(図2)。

生体内の心筋細胞はカテコラミン  $\alpha_1$ 受容体,  $\beta$ 受容体, アセチルコリンのムスカリン受容体が発現し, 心

拍数や心収縮力, 興奮伝導速度などの調節を行っている。CMG細胞では  $\alpha_1$ 受容体の3つのサブクラス( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ )を発現し,  $\alpha_1$ 刺激薬フェニレフリンで刺激すると, シグナルの活性化と細胞肥大が観察された<sup>13)</sup>。一方,  $\beta$ 受容体は  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ともに発現し,  $\beta$ 刺激薬イソプロテレノールで刺激するとセカンドメッセンジャーのcAMPの上昇と拍動数の増加, 収縮速度・収縮距離の増加が観察さ

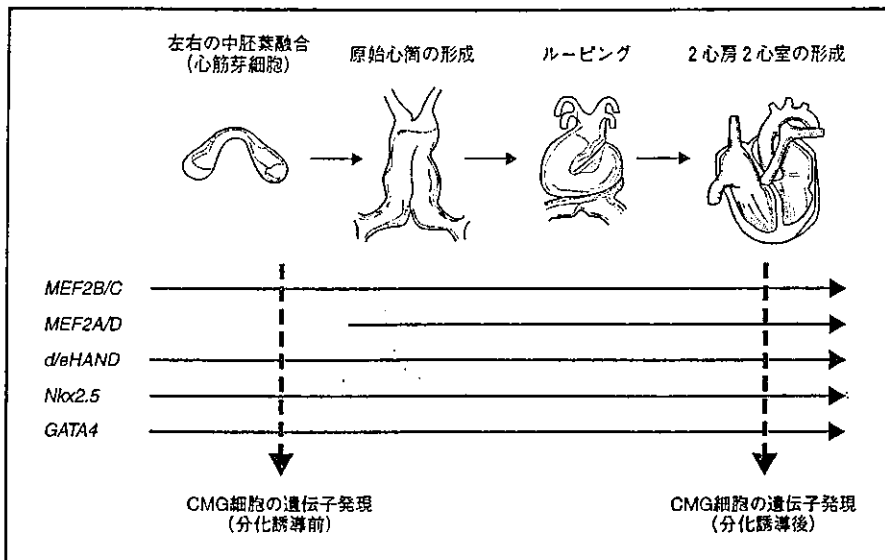


図2 心筋細胞の分化過程における転写因子の発現とCMG細胞の関係  
前外側板中胚葉から心筋前駆細胞に分化した状態では、*Nkx2.5*, *GATA4*, *TEF-1*, *HAND*遺伝子などの心筋分化に必要な転写因子は発現している。CMG細胞も心筋分化に必要な遺伝子は最終分化誘導前にすでに発現していることがわかる。

表2 CMG細胞の受容体発現と受容体刺激薬による効果

受容体の種類	受容体のサブクラス	発現時期	シグナル伝達の確認	確認できた作用
α受容体	α1A	最終分化誘導前より(漸増)	ERK活性化	細胞肥大
	α1B	最終分化誘導前より(不変)	ERK活性化	
	α1D	最終分化誘導前より(漸増)	ERK活性化	
β受容体	β1	最終分化誘導後1週より	cAMP上昇	拍動数上昇, 収縮力増強
	β2	最終分化誘導後1週より	cAMP上昇	
ムスカリン受容体	M1	最終分化誘導後1週より	IP <sub>3</sub> 上昇	
	M2	最終分化誘導後1週より	IP <sub>3</sub> 上昇	

れた。ムスカリン受容体はM<sub>1</sub>~M<sub>5</sub>まで5種類あることが知られているが、CMG細胞では本来の心筋細胞と同様にM<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>の発現が認められ、ムスカリン受容体刺激薬カルバコールで刺激するとセカンドメッセンジャーのIP<sub>3</sub>が増加した(表2)。これらの性質はCMG細胞が心筋としての特徴をほぼ有していることを意味している。

### 再生心筋細胞を利用した心不全治療の試み

心筋再生を利用した治療法は、幹細胞を直接壊死した心臓内に注入してその部位で心筋細胞へと分化させる方法と、*in vitro*で幹細胞を心筋細胞に分化させてそれを心臓に注入する方法の2つに大別される(図3)。前者は現在実験動物において用いられているが、ヒトを対象として心機能の回復を目指すには相当数の細胞

が必要と想像される。また注入した細胞が目標とする心筋細胞へと確実に分化し、元来存在する細胞と同期して収縮するかなどの疑問点が多い。後者の生体外で幹細胞を分化させる方がハードルを低くできると思われる。この場合ある程度のmassとして移植を行うので、移植細胞塊の強度や細胞塊内部への血流の確保などの問題点がある。また再生心筋細胞が生着し心機能の改善が得られたとしても、この細胞が新たな致死

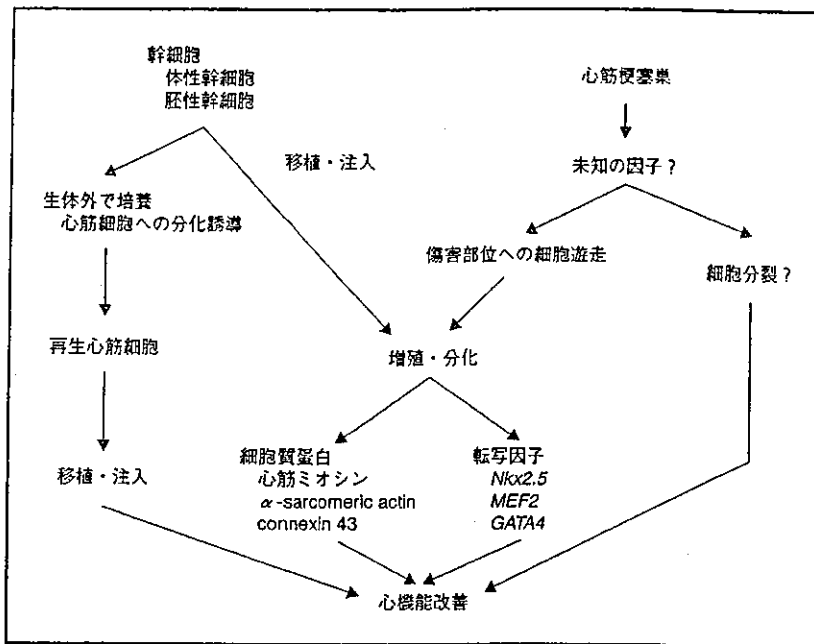


図3 心筋細胞再生による心機能改善の模式図

性不整脈の原因となる可能性もある。これらの問題点を1つ1つ検討しながら、克服していくことにより、臨床応用への道が開けると思われる。

また再生心筋細胞を臓器として機能させるにはtissue engineering(組織工学)の考え方が不可欠である。再生細胞を培養するスカフォールド(鑄型)の開発、複数の種類の細胞の配列、血管系・神経系の構築など解決すべき課題は多い。

これまでに再生心筋により傷害心筋の機能改善を認めた例として、ES細胞<sup>14)</sup>、骨髄間葉系幹細胞<sup>15)16)</sup>、造血幹細胞<sup>17)18)</sup>、血管内皮前駆細胞<sup>19)</sup>などが報告されている。残念ながらいずれの報告も移植した細胞の心筋細胞への分化を免疫染色で確認しているのみである。外見上心筋細胞に見える細胞が機能的・電気生理学的

に心筋細胞となっているかについても今後検証する必要がある。

### おわりに

心筋細胞の再生の材料として、胚性幹細胞と体性幹細胞のどちらを選択するかについては、今後さらに検討が行われるであろう。また体性幹細胞より多能性を有し上位に存在すると考えられているmultipotent adult progenitor cellも忘れてはならない。

日常臨床で重症心不全患者を救命できない状況を目前にすると、早急に治療法を確立する必要性を痛感させられる。再生心筋細胞を用いた治療が心疾患治療の選択肢の1つとなる日を願ってやまない。

### 文献

- 1) Anversa P, Kajstura J: Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83: 1-14, 1998
- 2) Kajstura J, Leri A, Finato N, et al: Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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) Anversa P, Nadal-Ginard B: Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 415: 240-243, 2002
- 5) Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanhankij P, et al: Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res* 92: e12-e19, 2003
- 6) 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
- 7) Deb A, Wang S, Skelding KA, et al: Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart; a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107: 1247-1249, 2003
- 8) 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
- 9) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997
- 10) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem

- cells. *Science* **284** : 143-147, 1999
- 11) Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, et al : The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin(CD105). *Biochem Biophys Res Commun* **265** : 134-139, 1999
- 12) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103** : 697-705, 1999.
- 13) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al : Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes(CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* **105** : 380-386, 2002
- 14) Min JY, Yang Y, Converso KL, et al : Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* **92** : 288-296, 2002
- 15) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* **100** : II 247-256, 1999
- 16) 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
- 17) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410** : 701-705, 2001
- 18) Wagers AJ, Sherwood RL, Christensen JL, et al : Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* **297** : 2256-2259, 2002
- 19) 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

# 心筋の再生戦略

*The strategy for deriving cardiomyocytes*

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

湯浅 慎介

*Shinsuke Yuasa*

同 心臓病先進治療学

福田 恵一

*Keiichi Fukuda*

(講師)

## Summary

近年、再生医学が取り沙汰される機会が増えてきた。外科手術や薬物療法などが飛躍的に進歩してきたものの、これらの治療では治癒しえない疾患がまだ数多く残されている。これらの疾患に対して、臓器を再生させ治療しようという再生医学が目ざされてきた。なかでも細胞を補うことにより治療しようとする細胞移植医療も期待される。細胞移植医療を臨床的に可能にするためには、補うべき細胞をどこからそしてどのように手に入れるかが重要となってくる。

われわれは各種心疾患の終末像といわれる心不全の治療を目標に置き、細胞移植医療の実現を目指し研究を行っている。細胞の供給源の候補として胚性幹細胞由来心筋細胞、骨格筋細胞、胎児心筋細胞などが研究されているが、われわれは骨髄間葉系幹細胞を用い心筋細胞に分化しうることを示した。骨髄間葉系幹細胞の利点として、自家骨髄より得ることができるために、移植医療への応用に至った際の免疫拒絶の問題がないことが挙げられる。

Surgery Frontier 10(3) : 31-35, 2003

## Key Words

mesenchymal stem cell, CMG cell,  
5-azacytidin cell transplant.

## はじめに

心不全はあらゆる心疾患の終末像であり、薬物療法に抵抗性である末期心不全に至った際には心臓移植しか治療法がないのが現状である。心臓移植をはじめとする各種臓器移植医療は圧倒的なドナー不足が背景としてあり、事実上は多くの患者が十分な移植医療を受けることができていない。心臓移植を受けることができた場合にも、移植後も免疫学的拒絶に対して免疫抑制剤を生産にわたって服用していく必要が

あり、また移植後の冠動脈に狭窄を来したりするなどさまざまな問題が生じてくる。

一方、この10年間に細胞の発生・分化の基礎研究が躍進的に進み、さまざまな細胞を幹細胞から再生させることができるようになってきた。幹細胞とは自己複製能と多分化能を有する細胞と定義され、各種臓器に存在することが知られており、さらに成人(成獣)においても存在することがわかってきた。一昔前には再生することはありえないとされてきた神経系の組織に

## ◆メモランダム◆

### 5-アザシチジン

5-アザシチジンとは、5-メチルシトシンからメチル基を取り除きシトシンに変換する脱メチル化剤である。メチル化の生理的機能としては、DNAあるいはヒストンなどをメチル化することにより遺伝子の発現を調節することがよく知られている。遺伝子の発現には転写因子がプロモーター領域に結合し転写活性を上昇させることが重要であるということは以前から知られているが、プロモーター領域がメチル化されクロマチンの立体構造が密になることにより、各種転写因子が結合できなくなり、その転写因子が存在していても遺伝子の転写が起りづらくなる。このようにDNAのメチル化とは転写因子のさらに上流に存在し遺伝子のスイッチのon/offを決定している因子の1つであると考えられている。



も幹細胞が存在していることが同定されており、神経幹細胞を用いて多くの神経疾患をターゲットとした臨床応用に向けて基礎研究が進んでいる。また同様に再生が不可能であると考えられていた心筋細胞においても、急性心筋梗塞の直後には心筋梗塞層の近傍において再生しうることが近年ヒトの剖検例において報告された<sup>2)</sup>。しかし現在のところ、心筋細胞における幹細胞は正確には同定されておらず、これらを用いた移植医療というものは今のところ困難である。

しかしながら、心筋細胞は骨髄中の骨髄間質細胞<sup>2)</sup>や胚性幹細胞(ES細胞)<sup>3)</sup>を用いて再生できることが明らかになり、心不全治療を目的として臨床応用できるのではないかと期待が膨らんでいる。なかでも成体幹細胞を用いた場合には自己の骨髄を用いることで免疫学的拒絶から免れることができ有意義であると考えられる。本稿では心筋細胞の再生と骨髄間質細胞を用いた心不全の細胞治療の現状と将来展望を述べることとする。

#### 成人に残存する間葉系幹細胞

幹細胞の定義は自己複製能・増殖能を保ちながら、多分化能を有する細胞をいう。近年の研究により成人(成獣)にも多分化能をもつ細胞が存在することが明らかとなった。以前より骨髄に存在する幹細胞のなかで最も知られているものとして造血幹細胞がある。骨髄は元来造血の場であるとされており、事実そこには造血幹細胞を頂点とした血球系細胞が多数存在している。

実際に骨髄の99%以上の細胞は造血に関与しているといわれている。しかし、同時に骨髄には骨髄間質細胞と呼ばれる造血支持細胞も存在する。骨髄間質細胞は造血細胞ではないが、多彩なサイトカイン・細胞増殖因子などを分泌し、また造血幹細胞が生存・機能していける微小環境を構築し、血球系細胞の再生・増殖・分化を補佐するという機能をもつ。骨髄間質細胞は骨のなかにあり、そのなかで一部が骨や軟骨にも分化することは以前より知られていた。さらに現在では、骨髄間質細胞すべてが多分化能をもつのではなく、非常に低い確率ではあるがこれらに含有される間葉系幹細胞と呼ばれる細胞が多分化能を有し、中胚葉由来あるいは胚葉を越えて多くの細胞の幹細胞となりうると考えられている。

#### 間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導

骨髄間葉系幹細胞は中胚葉のさまざまな臓器の細胞に分化しうることが知

られており、われわれは同じ中胚葉由来の心筋細胞にも分化しうるのではないかと考え、間葉系幹細胞に種々の分化誘導剤(表1)を投与する実験を行った<sup>2)</sup>(図1)。その結果骨髄間葉系幹細胞から、拍動する心筋細胞に分化しうることを明らかにした。具体的にはマウスを麻酔し大腿骨から骨髄間質細胞を分離し、分離した骨髄間質細胞を長期培養することで不死化した細胞株を作成した。こうして得られた細胞にさまざまな分化誘導剤を投与し、細胞に分化誘導を行った。2~4週間培養を行う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。この周辺の細胞を採取して同様の操作を繰り返した。これらの薬剤のうち最も効率がよかった薬剤はDNAの脱メチル化剤の5-アザシチジンと呼ばれる薬剤であった。自己拍動を開始した細胞自体は継代不可能であるが、最終分化誘導前の心筋芽細胞と考えられる細胞は分裂、増殖を繰り返すことができる。自己拍動する割合の高いクローンを最

表1 分化誘導剤

種類	物質名
DNA 脱メチル化剤	5-アザシチジン
核内受容体リガンド	レチノイン酸(ATRA)、ビタミンD、T3
細胞増殖因子	アクチビン、IGF-1、FGF、PDGF、TGF $\beta$ 、BMP2/4
サイトカイン	LIF、IL-2、IL-6 など
その他	HMBA (ヘキサメチレンビスアセタミド)、DMA (ジメチルアセタミド)、dbcAMP (ジブチルcAMP)、DMSO (ジメチルスルホキシド)、IdU (ヨードデオキシウリジン)、HU (ヒドロキシウレア)、AraC (シトシンアラビノシド)、MMC (マイトマイシンC)、NaB (ソデウムブチレイト)、Ap (アフィディコリン)、FdU (フルオロデオキシウリジン)、ポリブレン、セレンウム

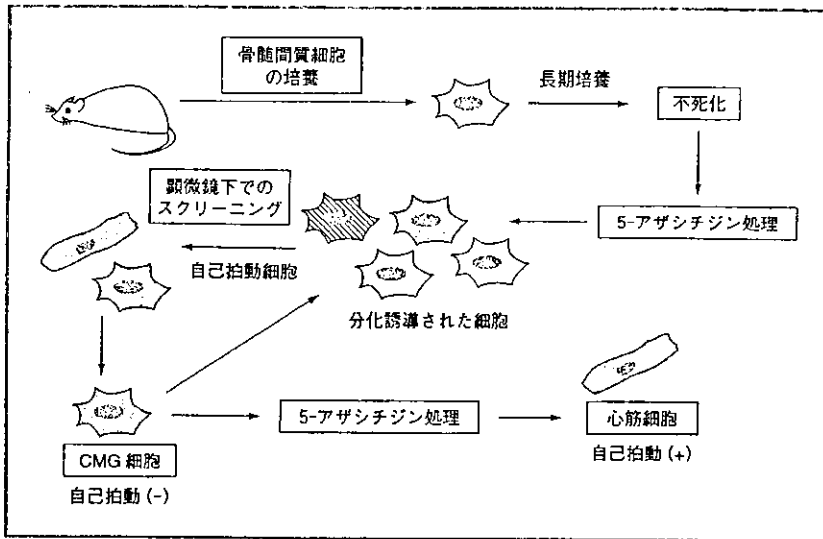


図1 骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導

最終的に CMG (心筋形成を意味する cardiomyogenesis という言葉より命名)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と心筋細胞となるが、最終分化誘導後に自己拍動を開始する比率は約 10 ~ 30%で、残りの細胞は脂肪細胞などに分化する。

骨髄由来の心筋細胞の特徴<sup>5)</sup>  
(表 2, 3)

マウスの心筋細胞は生体内において

毎分 300 ~ 400 回で規則的に収縮する。一方、CMG 細胞は培養条件下において毎分 120 ~ 250 回程度の速さで規則的に収縮した。心筋細胞は横紋筋であるが、CMG 細胞を電子顕微鏡で観察すると典型的な横紋構造が観察され、また心房性ナトリウム利尿ペプチドを含有する心房顆粒と思われる高密度顆粒を多数認めた。遺伝子レベルでの解析では、CMG 細胞は心筋細胞特異的とされる心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) および脳性ナトリウ

ム利尿ペプチド (BNP) を発現していた。心筋細胞は筋肉が収縮するための蛋白として  $\alpha$ -アクチン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖などをもっている。この収縮蛋白にはアイソフォームと呼ばれる類似蛋白が何種か存在する。収縮蛋白のアイソフォームは胎児 (胎仔) 期と成人 (成獣) 期、あるいは心房と心室で筋肉の収縮速度、エネルギー効率などが異なるためとされている。生体内の心筋細胞と CMG 細胞の収縮蛋白のアイソフォームを表 2 に示した。CMG 細胞における心筋収縮蛋白のアイソフォームを解析すると胎仔型心室筋に一致した表現パターンを示した。

心筋細胞が規則的に拍動するのは電気的に興奮し、細胞膜が規則的に脱分極するためである。また、この脱分極の際に記録される活動電位は同じ心筋細胞でも部位 (心房筋と心室筋あるいは洞結節など) によって異なる様式を示す。ガラス微小電極により CMG 細胞の活動電位を記録すると 2 種類のものが観察された。この 2 種類の活動電位は生体の心筋細胞の活動電位としては、洞結節細胞および心室筋細胞の活動電位に酷似していた。両者に共通した活動電位の特徴は、①活動電位

表 2 心筋収縮蛋白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

表3 骨髄由来の再生心筋細胞の受容体発現と受容体刺激による効果

受容体の種類 受容体のサブクラス	α 受容体			β 受容体		ムスカリン受容体	
	α <sub>1A</sub>	α <sub>1B</sub>	α <sub>1D</sub>	β <sub>1</sub>	β <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
発現時期	最終分化誘導前より(漸増)	最終分化誘導前より(不変)	最終分化誘導前より(漸減)	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より	最終分化誘導後1週より
シグナル伝達の確認	ERK 活性化	ERK 活性化	ERK 活性化	cAMP 上昇	cAMP 上昇	IP3 上昇	IP3 上昇
確認できた作用		肥大作用		心拍数上昇、心収縮力増強			

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 型を呈した。分化誘導後早期(2~3週間)にはすべての細胞で洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後後期(4週間後)には心室筋細胞型が観察され、次第に増加した。この

CMG 細胞の活動電位が時間経過とともに変化する現象は胎仔期の心室筋細胞がとる活動電位の変化様式と同様の変化をしていた。

### 心筋細胞移植による心不全治療の試み

細胞移植による心不全治療への取り組みはここ数年の循環器領域のトピックである(表4)。一般にヒトが心筋梗

塞を発病すると、梗塞領域の心筋細胞は壊死し、その後線維芽細胞に置換される。この壊死領域は心臓の収縮に貢献しないばかりではなく、瘤状に突出して心臓のポンプ機能を著しく障害する。この壊死瘢痕領域に心筋細胞を移植し、心臓のポンプ機能を改善させようというのが心筋細胞移植の考え方である。初期の研究ではラット・ウサギの心臓に心筋梗塞を作成し、壊死瘢痕

表4 細胞移植による心不全の治療

細胞の種類	利点	欠点	機序その他
胎児心筋細胞	収縮能の改善	ヒトでは胎児心筋細胞の入手が困難	ドナー細胞がレシピエントの細胞に介在板を介して結合
骨格筋細胞 平滑筋細胞 線維芽細胞	心筋梗塞後のリモデリングの改善 拡張能の改善	収縮様式が心筋と異なるため収縮能の改善には至らない	細胞が比較的得られやすい
血管内皮前駆細胞	虚血領域に血管新生を促す	収縮能の改善は血流改善を介した間接的なものとなる	流血中より自己細胞が得られるが移植のためには <i>in vitro</i> で増殖させる必要がある
骨髄細胞(初代培養あるいは直接採取)	虚血領域に血管新生を促す リモデリングの改善	骨や軟骨を形成する可能性がある	自己細胞を得やすい 拒絶反応がない
CMG 細胞	収縮能の改善	骨髄細胞から単離する方法を確立する必要がある <i>in vitro</i> で増殖させる必要あり	自己細胞由来のものであれば拒絶反応がない

領域に平滑筋細胞、骨格筋などの細胞を移植することにより、心不全が改善されるか否かなどの研究が行われてきた。骨格筋の場合には細胞がある程度心筋細胞化するとされ、心収縮能の改善・心筋梗塞後のリモデリング(心室の拡大、心室瘤の形成)の改善に有用であったと報告されている<sup>9)</sup>。しかし不整脈の出現などの問題点は、依然として解決はされておらず、さらなる研究課題は多く残されている。

心筋細胞の場合、移植前に培養状態にすることが必要となる。初代培養により生きた細胞が得られるのは胎仔あるいは新生仔の心筋細胞に限られ、成獣の心筋細胞は初代培養すると、多くが死んでしまい、効率よく心筋細胞を得ることができない。これまでに実験的に行われた心臓に対する心筋細胞移植はすべてラットあるいはウサギの胎仔細胞が用いられてきた。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レシピエントの心筋細胞が電気的に連結した結合をとりうるということが報告された。さらに胎仔心筋細胞の移植は心臓のポンプとしての収縮能・拡張能を改善することが報告され、一気に心筋細胞移植の臨床応用が注目されるようになった。

ヒトを対象とした場合には胎児の心筋細胞を初代培養することは倫理的に

不可能であり、現実的なものではなかった。骨髄間葉系幹細胞由来の心筋細胞を大量に増殖・分化させ、心臓に移植することができればこれらの問題は解決できる可能性がある。さらに、移植を希望するレシピエントの骨髄から得た心筋細胞でできるとすれば移植に伴う拒絶反応も生じない。現在、多くの世界中の研究者がヒトの骨髄細胞による心筋細胞分化に取り組んでおり、今後の発展が期待される。

### おわりに

再生医学は日進月歩で進んでおり、細胞レベルでは多くの細胞が新たに作り出されるようになってきた。しかし、これらの細胞を組織あるいは臓器として働かせるまでには至っていない。細胞をそのまま移植すればよいのか、あるいは組織工学的手法を用いてある程度体外で組織に類似した構造を作成後に移植したらよいか、複数の種類の細胞の配列、血管系の構築などさまざまな問題が残されている。再生心筋細胞の場合も、動物実験レベルでは注射針やカテーテルを用いて移植しているが、将来的にヒトで心筋細胞移植を行う場合、いかなる方法がよいのかなども今後の研究課題となるであろう。重症心不全患者が次々と亡くなる現状をみるにつけ、早急な治療法の確立が望まれる。

### 文 献

- 1) Beltrami AP, Urbane k, Kajstura J, et al : Evidendce that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344 : 1750-1757, 2001
- 2) 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
- 3) Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J : Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>+</sup> channel blockers. *Differentiation* 48 : 173-182, 1991
- 4) Prockop DJ : Stem cell research has only just begun. *Science* 276 : 71-74, 1997
- 5) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al : Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 105 : 380-386, 2002
- 6) Soopnaa MH, Kof GY, Field LJ, et al : Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264 : 98-101, 1997
- 7) Delcarpio JB, Claycomb WC : Cardiomyocyte transfer into the mammalian heart. *Cell-to-cell interactions in vivo and in vitro. Ann NY Acad Sci* 27 : 267-285, 1995