

# 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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>、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にした。

## ●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。

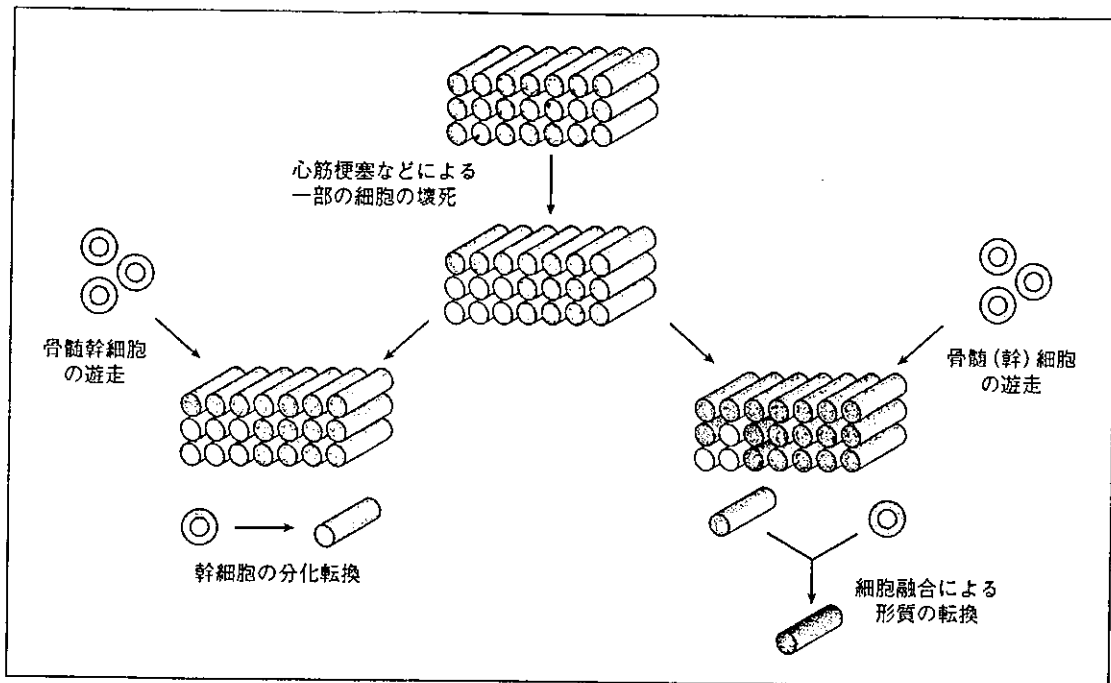


図1 細胞分化と細胞融合の概念

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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup> (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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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 $\alpha$ 刺激に対しては主として $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ 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<sup>11)</sup>。一方、交感神経 $\beta$ 刺激には主として $\beta_1$ 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られるに至っている。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<sup>12)</sup>。これらのc-kit陽性の細胞は心尖部および心耳に存

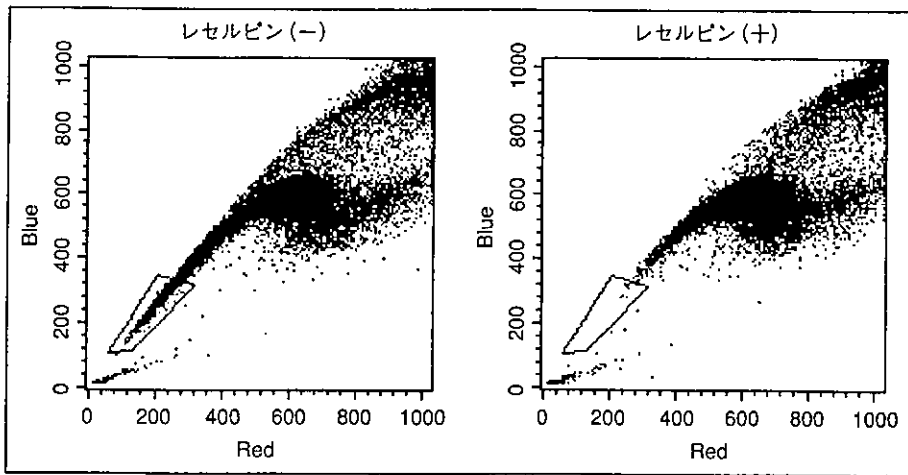


図3 心筋組織中のSP細胞分画  
骨髄や各種組織をHoechst33342で染色し、blueとredの2波長で展開させたFACS解析を示した。四角で囲んだ領域がSP細胞分画である(左図)。SP細胞分画はレセルピン前投与で完全に消失する特徴がある(右図)。

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<sup>13)</sup>。

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

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

## ● 骨髄移植による種々の疾患の治療

骨髄移植は、従来白血病や再生不良性貧血の治療

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

## ● 筋ジストロフィー治療における骨髄移植の可能性

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

骨髄間葉系幹細胞は骨格筋細胞に分化することは

表1 骨髄間葉系幹細胞とES細胞の比較

	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, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-73 (2003)
- 7) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-4 (1997)
- 8) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7 (1999)

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

特集

細胞移植と再生医療—血管新生から心筋再生へ—

## 心筋再生と細胞移植の現状\*

福田 恵一\*\*

**Key Words** : mesenchymal stem cell, embryonic stem cell, regeneration therapy, cardiomyocyte, heart failure

## 要 旨

これまでの研究により胚性幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞などから心筋細胞が分化誘導できることが示された. 再生心筋細胞を純化し移植する技術も開発され, 移植再生心筋細胞はレシピエント心臓に長期間生着できることが証明された. 新たな移植法として組織工学を応用した細胞シートの作成が可能となり, ドナーの不要な細胞移植による心不全治療が臨床の前段階にまで来ている. また, サイトカインを利用した幹細胞の動員による心不全治療法も模索されている.

## はじめに

心筋細胞は出生直後までは細胞分裂するが, その後は細胞分裂をせず肥大により心負荷に適応すると長らく考えられてきた. 最近の研究で心筋梗塞直後にごくわずかな心筋細胞が細胞分裂することがわかったが, 心不全を改善するほどの効果には至らないものである. 拡張型・肥大型心筋症による難治性重症心不全に対してはこれまで心臓移植が行われてきたが, ドナー不足は将来的にも解消される見通しはない. これらの疾患あるいは重症心筋梗塞による新たな治

療として, 多能性幹細胞を用いた心筋再生とこれを用いた心不全治療が提唱されている. 研究段階では非常に期待をもたせる成果が出ており, これをいかに臨床に応用すべきかが今後の課題となっている. 本稿では, これらの現状と展望を述べることにする.

## 心筋細胞再生と幹細胞

多能性幹細胞といっても, 胚性幹細胞のように全身のすべての臓器になるものから, 造血幹細胞のように特定の細胞群にしか分化できないものまで多段階の幹細胞が存在する. われわれは, 1999年に骨髄間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することを報告したが<sup>1)</sup>, それ以後身体の中にあるさまざまな幹細胞が心筋分化能力を有することが報告された. 表1にこれらのなかの代表的なものの特徴を示した.

## 1. 胚性幹細胞(ES細胞)

胚性幹細胞は受精直後の胚盤胞と呼ばれる時期に, 将来胎児になる内部細胞塊の部分を取り出してきたもので, マウス, ヒツジ, ウシ, サルなどだけでなく, ヒトでもすでに樹立されている. 米国, オーストラリアなどでヒトの胚性幹細胞が先行して樹立されたが, 本邦でも京都大学中辻教授らのグループにより3株ほど樹立されている. 心筋細胞は胎生早期より分化してくる細胞であることもあり, 胚性幹細胞からはとくに分化誘導を行わなくとも少量の心筋細胞

\* The present state of cardiac regeneration and cell transplantation.

\*\* Keiichi FUKUDA, M.D.: 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35); Cardiopulmonary Division, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, JAPAN

表1 心筋幹細胞の分類と特徴

	報告者	特徴	存在頻度・単離の難度	分化できる細胞
胚性幹細胞	多数	大量培養可能. 同種移植となるため 免疫抑制剤が必要.	比較的容易に単離. ヒト胚性幹細胞がすでに 樹立.	あらゆる細胞が分化可能だが, <i>in vitro</i> では胎生早期に分化でき る細胞が得られやすい.
骨髄間葉系 幹細胞	慶大福田ら	培養法が比較的容易	骨髄中の数千万～ 数百万分の1	骨芽細胞・軟骨芽細胞・脂肪細胞 ・心筋細胞など
MAPC細胞	米国 ミネソタ大学 Verfeilleら	培養法がきわめて 難しい. 大量培養不可.	10億分の1(きわめて稀). 単離は難しいが, ヒトの 細胞でも単離されている.	あらゆる細胞が可能だが, 神経 細胞, 肝臓細胞, 骨格筋細胞な どで確立.
心筋組織 幹細胞 (c-kit細胞)	ニューヨーク 州立大学 Anversaら	単離が難しい. 大量培養不可.	心臓組織を材料とするため 難しい. バイオブシーで できるか不明.	心筋, 平滑筋, 血管内皮細胞
心筋組織 幹細胞 (Sca-1細胞)	バイラー大学 Schneiderら	単離が難しい. 大量培養不可.	ヒトではSca-1抗原がない ため不可.	心筋

は得られることが知られている。胚性幹細胞を一定の大きさの細胞塊を作成し浮遊状態で培養すると、中空状の疑似胚(これを胚様体という)を形成する。一部の胚様体は部分的に心筋細胞に分化する。現在、胚様体から心筋細胞により効率的に分化誘導させる方法として、BMP2, FGF, IGF-1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, アスコルビン酸, レチノイン酸などさまざまな方法が知られているが、これらの方法もそれほど効率的なものではない。しかし、心筋分化にかかわる因子の研究が急速に進んでおり、近い将来胚性幹細胞から特異的に心筋細胞を分化誘導できる方法が開発されるものと考えられる。

## 2. 骨髄間葉系幹細胞

骨髄は造血幹細胞を頂点として血球系の細胞が99%以上を占めるが、間葉系幹細胞は骨髄中に稀な頻度で存在する。この細胞は骨芽細胞, 軟骨芽細胞, 脂肪細胞などに分化することが従来から知られ, このほかにも骨格筋細胞, 心筋細胞, 神経細胞にも分化すると報告されている。骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導はこれまでDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを用いて行われており, 特異的な分化誘導法は胚性幹細胞以上に知られていない。しかし, 後述のように生体内でこの細胞は心筋細胞に分化誘導されること, 心筋細胞との共培養で心筋細胞に分化するという報告があることなどより, 今後, 解明されてゆくものと思われる。骨髄間

葉系幹細胞の最大の利点は患者本人の細胞を使用することが可能である点であり, 拒絶反応やドナーの問題は解決できる。問題点としては, 生体内では一生を通じて自己複製しているものと考えられるが, *in vitro*では継代数に限度があり, 大量に培養できない点が問題であろう。間葉系幹細胞から心筋細胞に分化した細胞は当初胎児期心室筋の表現型をとるが, 次第に成熟し成人型の遺伝子発現をみるようになる<sup>1)</sup>。また, 交感神経・副交感神経の受容体も生体の心筋細胞と同様な発現, 機能を有する<sup>2)</sup>。

## 3. 心臓内に存在する組織幹細胞

近年, 心臓組織中よりc-kit陽性あるいはSca-1 (stem cell antigen-1)陽性の細胞をセルソーターを用いて回収すると, これらのなかに心筋に分化可能な細胞が存在することが報告された。これらの細胞は心臓特異的な組織幹細胞と考えられ, その存在頻度は低いものの心筋細胞や平滑筋細胞, 血管内皮細胞に分化する能力を有するとされている。c-kit陽性細胞とSca-1陽性細胞はその特徴も異なり, 分化能力なども異なっている。これらの細胞は*in vitro*でもある程度の増殖は可能であり, 心筋細胞の再生に有用なツールと考えられる。c-kit抗原はサイトカインstem cell factorの受容体であり, ヒトでも応用可能である。これに対し, Sca-1はマウス特異的な抗原であり, ヒトでの対応する抗原はないためヒトでの応用は難しい。いずれにしてもこれらの組織幹細胞



は存在頻度が低く、バイオプシー程度の心筋から分離することは難しいため、大量に心臓を採取しなければならない点が問題で臨床応用は今後の課題であろう。

### 心筋細胞移植

心筋細胞移植の概念はすでに1990年代後半から提唱されてきた。動物実験では、胎児あるいは新生児ラット心筋細胞などを成体の心臓に移植できること、移植した細胞は比較的長期間生着できること、周囲の細胞とGAP結合することなどが報告されている。

多能性幹細胞由来の心筋細胞を心臓に移植する際には、未分化細胞やほかの細胞に分化した細胞を除去しなければならない。これまでの研究では胚性幹細胞から分化させた心筋細胞をセルソーターで回収する方法が有効と報告されている。心筋細胞特異的蛋白の遺伝子プロモーターに蛍光色素GFP (green fluorescent protein) などの遺伝子を組み替えた遺伝子を胚性幹細胞などに遺伝子導入し、心筋細胞をマーキングする方法が取られている。われわれはミオシン軽鎖遺伝子プロモーターとGFP遺伝子の組替え遺伝子を作成し、骨髄間葉系幹細胞に導入した<sup>3)</sup>。この細胞を分化誘導すると、図1のように心筋細胞に分化した細胞のみを緑色に標識でき、さらにFACSセルソーターにより99%以上の純度で心筋細胞のみを回収することができた。これを同種マウスの心臓に注射針を用いて移植すると、図2に示すように再生心筋細胞はレシピエントの心筋細胞の隙間に移植され、周囲の細胞とGAP結合を介して結合していた<sup>3)</sup>。また、これらの細胞は長期間レシピエントの心臓に生着していた。これらの現象は、再生心筋細胞が胎児・新生児心筋細胞の代替細胞と

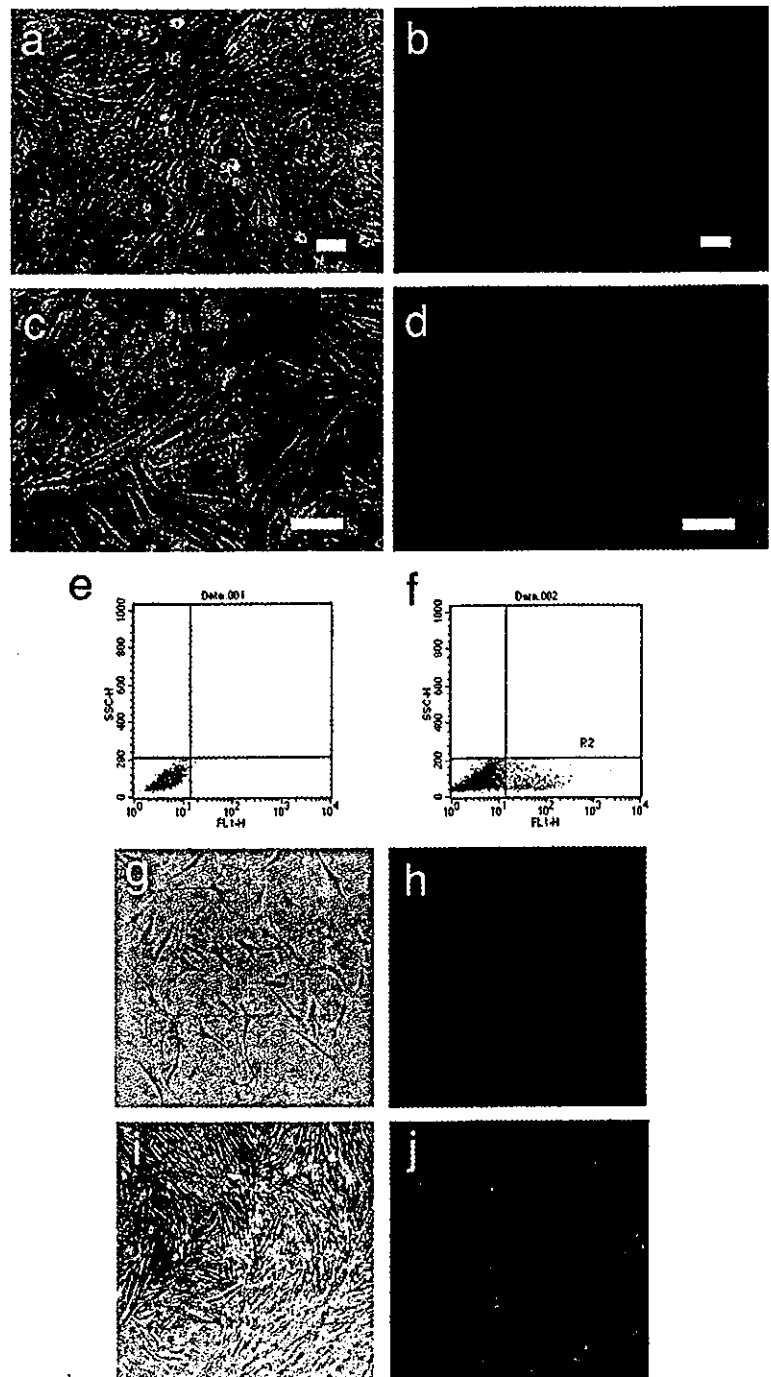


図1 再生心筋細胞の単離

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

(文献<sup>3)</sup>より一部改変引用)

して心筋細胞移植のツールとして使用可能であることを示しており、今後の発展が期待される。

注射針による細胞移植は簡便であるが、大量の細胞を移植できないこと、細胞の生着率が低いことより移植法としては完成されたものでは

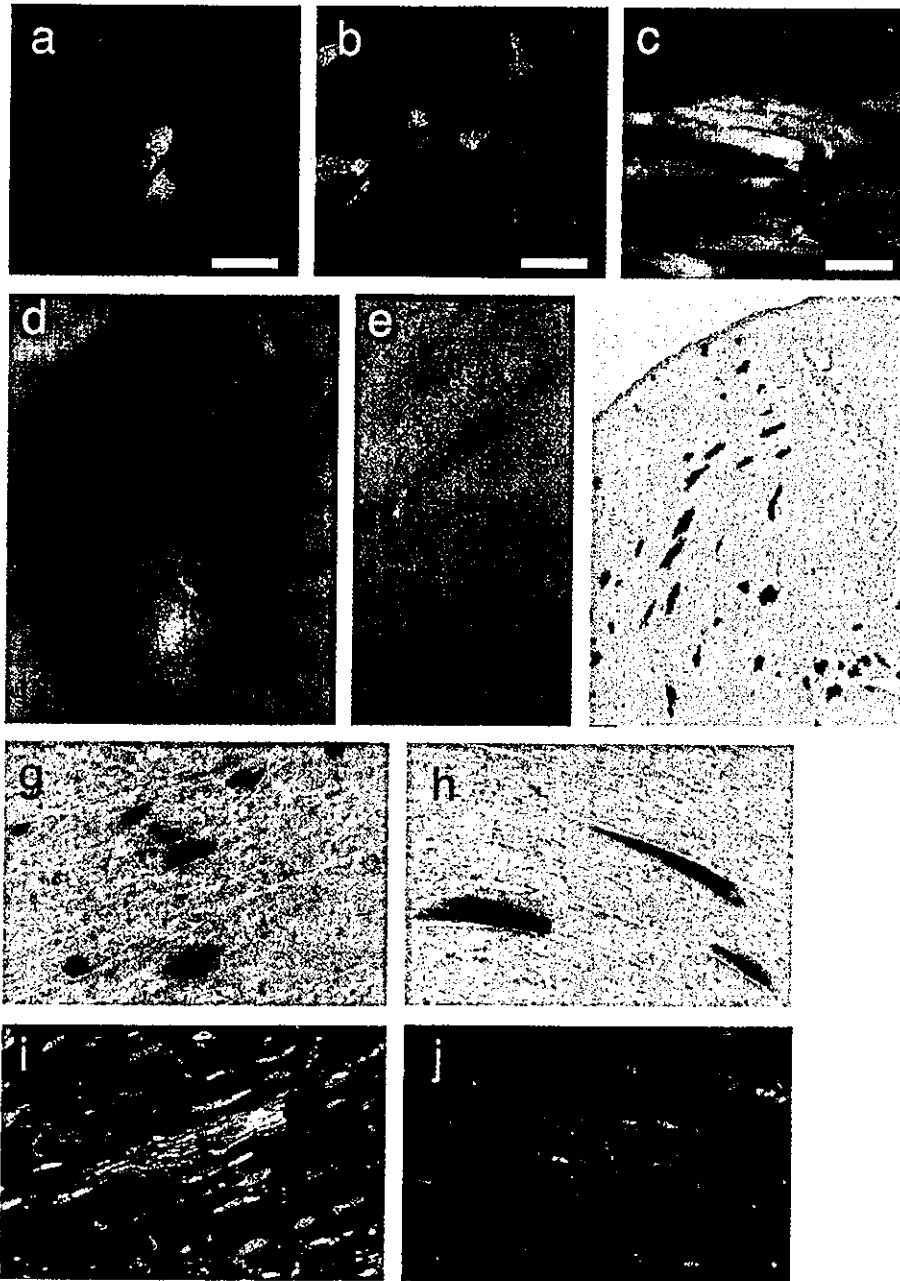


図2 再生心筋細胞の移植

図1で得られた細胞を注射針で成体のマウス心臓に移植したもの、移植された心筋は心臓に生着し、長期間生存することが確認できる。これらの細胞は心臓に島嶼状に分散し、周囲の心筋細胞に密着して短冊状の成熟心筋細胞の形態を取っていた。a~cはGFPの蛍光を観察したもの、d~hはLacZ遺伝子を導入染色したものである。これらはconnexin43と共免疫染色をすると周囲の心筋細胞とGAP結合をしている様子が観察された(i, j)。緑はGFP、青はTOTO-3による核染色、赤はconnexin43を示す。  
(文献<sup>3)</sup>より一部改変引用)

ない。東京女子医科大学の岡野らは、培養皿表面を特殊な樹脂でコーティングすることにより、温度感受性培養皿を作成した。この皿の表面は低温にすると親水性になり、培養細胞がシート状に剥離できることを利用して心筋細胞シートを作成した。われわれもこの方法にヒントを得

て、独自に心筋細胞シートの作成方法を開発した<sup>4)</sup>(図3)。この方法は外科手術の際に使用されるフィブリン糊を応用した方法で、フィブリンノーゲン溶液とトロンピン溶液を一定濃度で反応させ、培養皿上にフィブリンポリマーを薄くコーティングする。この培養皿上で心筋細胞を培養

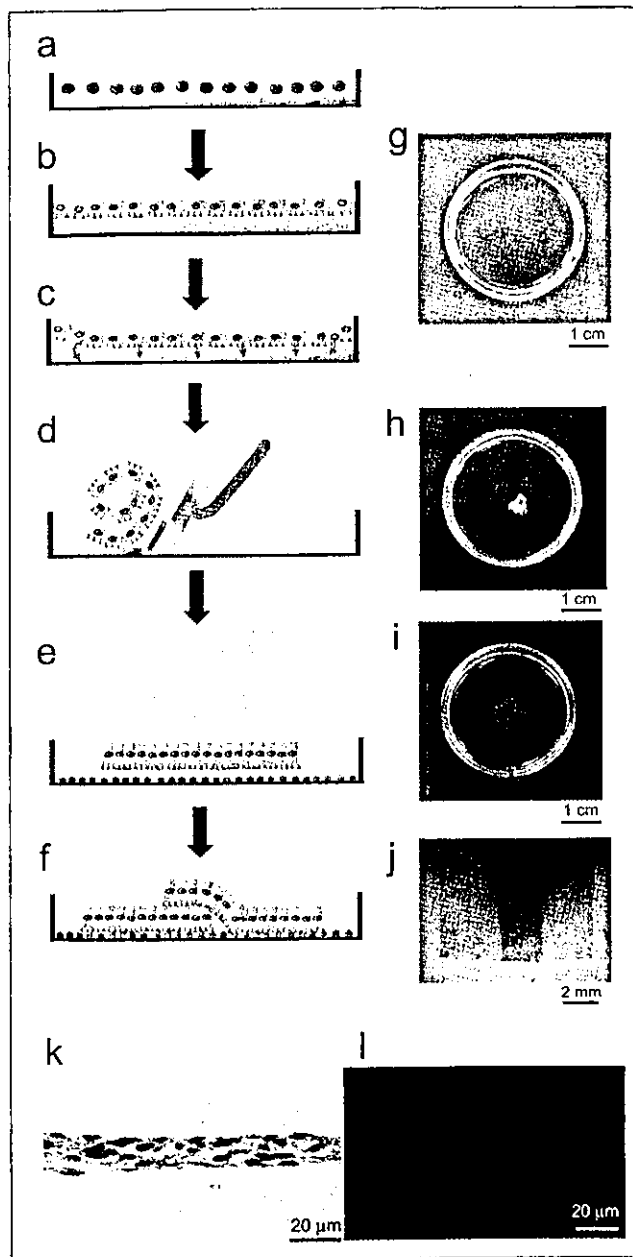


図3 心筋細胞シートの作成

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

(文献<sup>4)</sup>より一部改変引用)

すると、心筋細胞より種々の内因性プロテアーゼが分泌され、このプロテアーゼにより3日目くらいにはフィブリンポリマー膜が分解され、シート状の心筋細胞を得ることができる。培養開始7日目までは完全にフィブリンが除去される。心筋細胞シートの特徴は注射針による移植

と異なり、細胞の生存率、生着率が良いことである(図4)。注射針による移植の場合、細胞の生着率は多くの報告で10%未満の細胞しか生着しない。これに対し、心筋シートを皮下に移植した場合には細胞が移植後に失われることは少なく、今後の細胞移植法の重要な手法のひとつとなるであろう。心筋細胞シートは重層することによりある程度厚みのある組織を作ることができる。移植後は小血管網が形成されるが、太い血管の構築は現状ではできておらず、今後の研究の進展が望まれる。

### 成体における幹細胞からの心筋再生

これまでの研究で、骨髄幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化することが明らかとなったが、生体内でこれらの幹細胞が心臓に移動し、心筋細胞に分化するか否かは知られていなかった。また、最近2年間の議論で造血幹細胞の多能性や多能性幹細胞の細胞融合も報告され、骨髄細胞の生体修復機能が混沌としていた。そこでわれわれは骨髄中のいずれの細胞(造血幹細胞あるいは間葉系幹細胞)が生体内で心筋細胞に分化するかを検証するため、マウスの骨髄移植モデルを用いた解析を行った<sup>5)</sup>。すなわち、GFPでマーキングした造血幹細胞と間葉系幹細胞の双方を別々に致死量の放射線を照射した同種マウスに移植した。造血幹細胞はGFPトランスジェニックマウスからFACSを用いてKSL-SP法という手法により、単一の造血幹細胞を採取し当座の造血を担うGFP非標識のradioprotective cellとともに骨髄移植を行った。また、間葉系幹細胞は以前われわれが単離したCMG細胞を上述のように心筋細胞に分化した際にGFPを発現するように標識し、骨髄内骨髄移植という特殊な方法で骨髄移植を行った。間葉系幹細胞は造血幹細胞に比して細胞径が大きく、肺やその他の組織にトラップされる可能性が大きく、この方法を選択した。このように造血幹細胞、間葉系幹細胞を移植したマウスで心筋梗塞を作成し、2か月後に心臓を解析したところ、興味深い結果が示された。造血幹細胞を移植した群ではGFP陽性に心筋細胞はほとんど観察されず、これまで報告されている細胞融合の頻度程度のものだけであった。これ

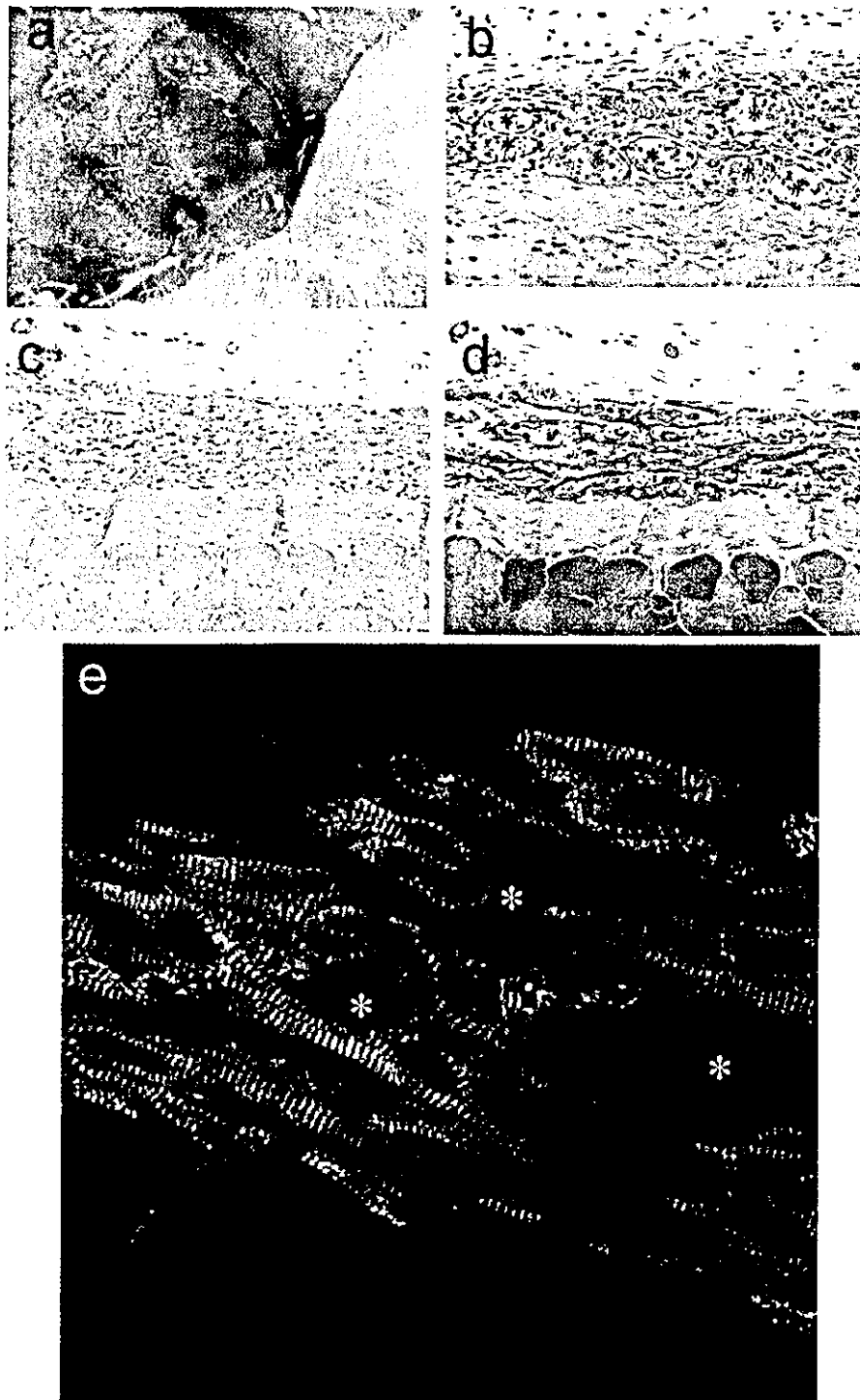


図4 心筋細胞シートの皮下移植

aは皮下に移植したシートの外観を示し、b~eはその組織像を示した。b,cはHE染色、dはAzan染色、eは免疫蛍光染色を示す。緑はアクチニン、赤はconnexin43、青はTOTO-3で核を示す。  
(文献より引用)

に対し間葉系幹細胞であるCMG細胞を移植した群では、梗塞巣にGFP陽性アクチニン染色陽性の心筋細胞が確認された。これらの解析の結果の示すところは、心筋梗塞などの心筋組織の壊死を伴うような障害の際には骨髄より間葉系幹細胞が動員されること、そしてこの間葉系幹細

胞は梗塞巣において心筋細胞に分化し得るものであるということである。われわれは、骨髄から幹細胞が動員される際にサイトカインであるG-CSFを投与しているが、非投与群とG-CSF投与群の間で再生心筋細胞の数は大きく異なることより、G-CSFは従来知られているように造血幹細

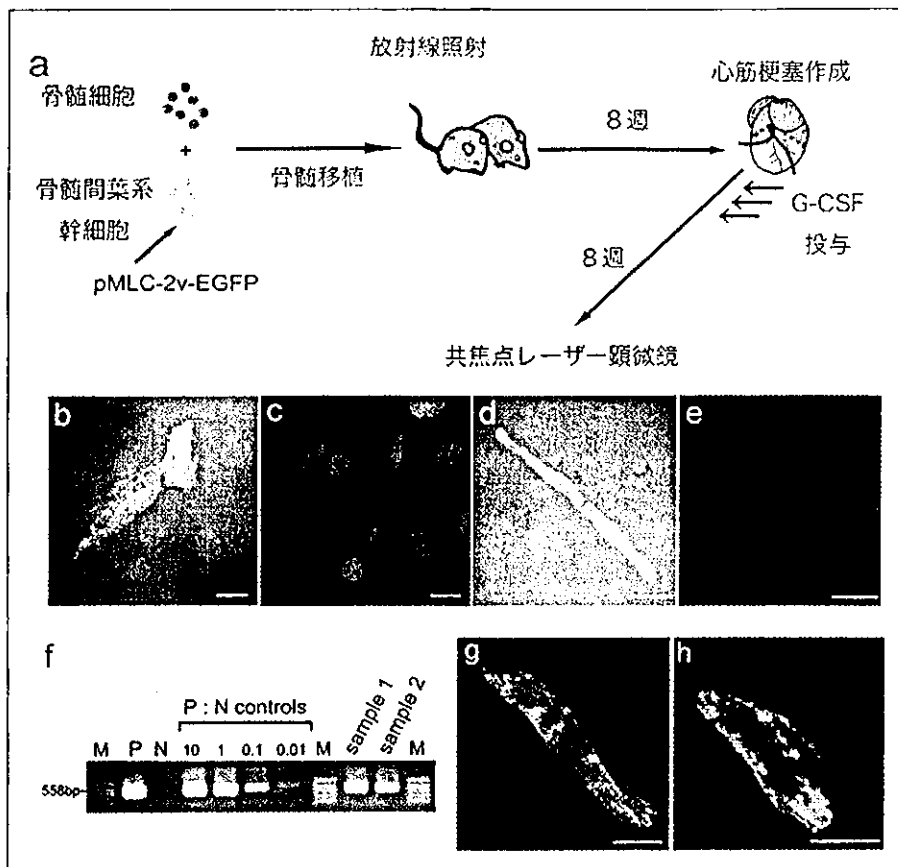


図5 骨髄間葉系幹細胞の生体内における心筋分化

骨髄間葉系幹細胞に図2で紹介したプラスミドを遺伝子導入し、致死量の放射線を照射したマウスの脛骨内に骨髄内骨髄移植を行った。骨髄が再構築した3か月後にマウスに心筋梗塞を作成し、梗塞巣を観察した。梗塞部にはGFP陽性の心筋細胞が観察された。これより、心筋細胞を再生するのは間葉系幹細胞であることが証明された。(文献<sup>5)</sup>より引用)

胞を流血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞も動員できるものであることが明らかとなった(図5)。

G-CSFはすでに一部の臨床でも使用されているが、その評価はいまだ定まっていない。ヒトでもマウスと同様に間葉系幹細胞を動員し、梗塞巣の再生に有用であるか否かは明らかとなっていない。われわれは、心筋梗塞症例にむやみにこうしたサイトカインを使用するのではなく、その分子メカニズムを同時に明らかにするような研究も平行して進めなければならないと考えている。

おわりに

心不全の心筋再生療法というものは言葉としては美しい。しかし、その根底には大地に根を張ったしっかりとした基礎研究が裏打ちしたも

のでなくてはならないし、その効果の評価も主観的なものであってはならない。幹細胞研究は日進月歩で進んでおり、胚性幹細胞、間葉系幹細胞のいずれかあるいは両者から心筋細胞を大量に生産できる日もそう遠い先ではないであろう。また、サイトカインを用いた治療はより近い将来臨床で行われるものと推測される。かかる現状をみた時、より深い理解が必要な時代になってきたと痛感する毎日である。

文 献

- 1) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999 ; 103 : 697-705.
- 2) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic re-

- ceptors. *Circulation* 2002 ; 105 : 380-6.
- 3) Hattan N, Kawaguchi H, Fukuda K, et al. Cardiovascular tissue engineering : purification and transplantation of bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes into *in vivo* heart. *Cardiovasc Res*. In press 2005.
  - 4) Itabashi Y, Miyoshi S, Fukuda K, et al. A novel method for manufacturing cardiac cell-sheets using fibrin-polymer-coated dishes and its application for electrophysiological studies by optical mapping. *Artifi Org*. In press 2005.
  - 5) Kawada H, Fujita J, Fukuda K, et al. Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. In press 2004.

\* \* \*

# G-CSFによる 骨髄筋前駆細胞の動員

Mobilization of the Cardiomyocyte Precursor Cells  
From Bone Marrow by G-CSF

福田 恵一

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

Key Words

G-CSF, cardiomyocyte,  
mesenchymal stem cell,  
bone marrow,  
hematopoietic stem cell

## ■ Abstract ■

我々はこれまで骨髄中の間葉系幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化できることを報告してきた。骨髄細胞の多分化能に関して最近さまざまな議論が為されてきた。造血幹細胞の多分化能には否定的な見解が示され、細胞融合が問題をさらに複雑にしている。我々は*in vitro*において骨髄の心筋分化能のある細胞を同定するため、GFPで標識した細胞を用いて3種の骨髄移植（全骨髄細胞、単一造血幹細胞、間葉系幹細胞移植）と行った。その結果、間葉系幹細胞が*in vivo*においても心筋分化能を有することを明らかにした。その過程の中で、サイトカインであるG-CSFがこれまで知られているように骨髄より顆粒球や造血幹細胞を末梢血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞の動員にも深く関わっていることが明らかとなった。心筋梗塞や創傷など治療などG-CSFの新たな臨床への応用が視野に入ってきたといえるであろう。

## ■ はじめに

よく知られているように骨髄には造血幹細胞を頂点とした血液系の細胞が多数存在する。その比率は99%以上であるが、血液細胞以外にも造血を助ける働きを持つ間質細胞（ストローマ）と呼ばれる細胞があり、造血の微小環境を保っている。1990年代初頭より、この間質細胞の一部の細胞に骨や軟骨、脂肪細胞に分化するものが存在することが知られ、間質細胞とは分けて間葉系幹細胞と呼ばれるようになった。

Keiichi Fukuda  
Cardiopulmonary Division, Department of Internal  
Medicine, Keio University School of Medicine

## ■ 1. 骨髄において心筋に分化可能な幹細胞

我々は1990年代中頃よりこの間葉系幹細胞が多様な分化能を有することに着目し、心筋細胞に分化するのではないかと考え、研究を行った。その結果、分化誘導剤を用いることによって自律拍動能を有する心筋細胞が分化誘導できることを明らかにした。同時期に浅原らが血管内皮前駆細胞も骨髄から得られることを証明し、骨髄細胞を用いた再生医学が注目され、大きな研究の流れができた。その後の研究で血管内皮細胞が心筋細胞に分化したとする報告や造血幹細胞がいろいろな細胞に分化できるとの報告、細胞融合の報告などがなされ、混沌とした状況が続いたが、*in vitro*で心筋細胞との共培養によることなく完全に心筋に分化可能であることが証明されているのは間葉系幹細胞だけであろう。

## ■ 2. G-CSFによる末梢血幹細胞移植の発展

白血病などの血液疾患に対し、従来は骨髄移植が中心に行われてきた。しかし、近年はサイトカインであるG-CSF（顆粒球コロニー形成因子）を用いた末梢血幹細胞移植が行われるようになった。末梢血幹細胞移植は全身麻酔で骨髄を穿刺する必要が無く、侵襲度が低い。このためG-CSFは本来、抗癌剤などの影響で白血球が減少している症例に使用されるサイトカインであるが、同時に骨髄から造血幹細胞を末梢血中に強力に誘導することが

報告され、末梢血幹細胞移植に用いられるようになった。

### ■ 3. G-CSFによる骨髄細胞の動員

我々は生体内で造血幹細胞と同様に間葉系幹細胞がendosteal nicheと呼ばれる部位に存在することよりG-CSFが間葉系幹細胞を末梢血中に誘導するのではないかと考えた。また、最近様々に報告されている骨髄内の細胞の内、我々が報告したように間葉系幹細胞が心筋分化能を有するのか、それとも造血幹細胞も心筋分化能を有するかという問題に決着を付けるため、マウスを用いて3種類の骨髄移植の実験を行った。骨髄ドナーマウスにはGFPトランスジェニックマウスを使用した。図に示すように致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに(1)全骨髄細胞(造血幹細胞+間葉系幹細胞)を移植した群、(2)KSL-SP法という特殊な方法を用いて、GFPマウスから造血幹細胞のみを1個のみ単離し、当座の造血を助ける非標識の少量の骨髄細胞(放射線保護細胞)と混合して

移植したもの(単一造血幹細胞移植)、(3)我々が骨髄より単離した間葉系幹細胞(CMG細胞)を心筋細胞に分化するとGFPを発現するように遺伝子導入した細胞(CMG-ME細胞)と非標識の少量の骨髄細胞(放射線保護細胞)を脛骨内に骨髄内骨髄移植したもの(間葉系幹細胞移植群)、の3群に分けて骨髄移植を行った。造血能の回復を待ち心筋梗塞を作成し、直後にG-CSFを10日間投与し、2ヶ月後に梗塞巣を観察した。(1)全骨髄細胞移植群ではGCFを使用しない場合には梗塞巣にGFP陽性細胞(白血球あるいは線維芽細胞)は散在するものの、GFP陽性の心筋細胞はごく稀に観察される程度であった。これに対し、GCFを使用した場合には梗塞部および境界部領域に多くのGFP陽性が存在し、またGFP陽性の心筋細胞も多数観察された。(2)単一造血幹細胞移植ではGFP陽性細胞は梗塞巣内に認められるものの、GFP陽性心筋細胞はほとんど観察されなかった。GFP陽性の心筋細胞は全実験を通じて3個だけしか観察されず、最近報告されている細胞融合の頻度と同程度であ

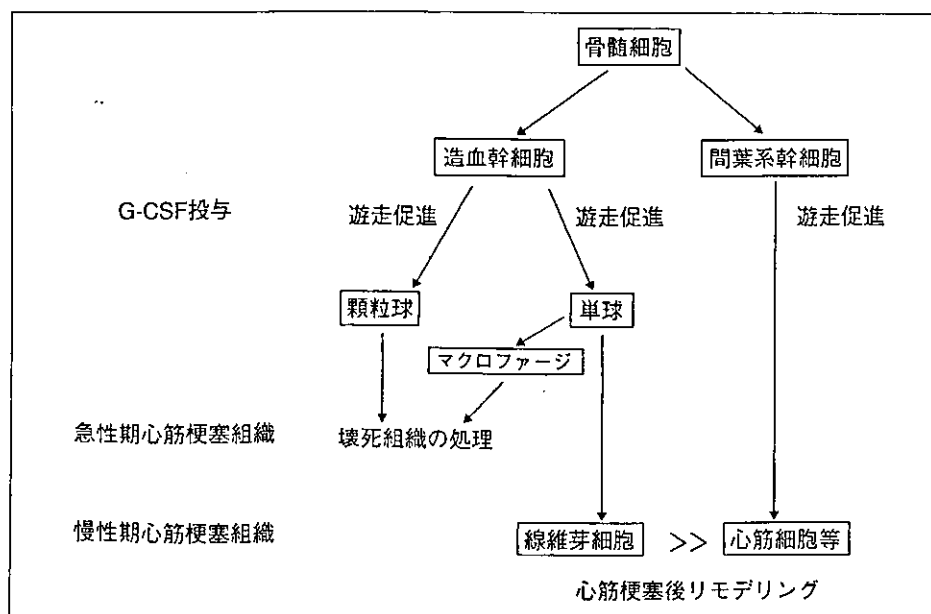


図 GFPを発現する骨髄細胞の移植実験から、骨髄中の造血幹細胞由来の細胞は心筋梗塞巣中の線維芽細胞になり、間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することが示された。また、G-CSFは造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞を流血中に動員することが明らかとなった。



った。(3) 間葉系幹細胞移植群では心筋梗塞巣に GFP陽性心筋細胞が散在している様子が観察された。以上を総合して、骨髄内の心筋細胞を再生出来る細胞は間葉系幹細胞であり、G-CSFは造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞も流血中に誘導する作用を持つことが証明された。臍帯血中には造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞も存在することが知られ、G-CSFの投与は末梢血を臍帯血と同様に組織修復能に富んだ血液に変えているものと推測される。

## ■ おわりに

我々の実験結果や他の研究者の報告をもとに現在さまざまな臨床応用が為されようとしている。臨床応用の際には効果の有無だけではなく、なぜ

そのような現象が引き起こされるかという観点に立って研究を進めるべきであろう。

## 文 献

- 1) Makino S, Fukuda K, *et al.*: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest.* 103: 697-705, 1999.
- 2) Hakuno D, Fukuda K, *et al.*: Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* 105: 380-386, 2002.
- 3) Hattan N, Fukuda K, *et al.*: Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* (in press), E-pub on line, Nov 2, 2004.
- 4) Kawada H, Fujita J, Fukuda K, *et al.*: Non-hematopoietic bone marrow cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction: possible contribution of mesenchymal stem cells. *Blood.* 104: 3581-3587, 2004.

☆

☆

☆

## 心筋の再生

下地顕一郎\*, 福田恵一\*

SHIMOJI Kenichiro, FUKUDA Keiichi

\*慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

## KEY WORDS

骨髄間葉系幹細胞, 胚性幹細胞, 再生医学, 心筋細胞, 心不全

## POINTS

- 重症難治性心不全に対する根治療法として再生医療が期待される。
- 利用できる細胞の候補として, 胚性幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞, 心筋内組織幹細胞があげられる。
- 工学的手法の発達により個々の細胞を組織として移植する技術も発達してきた。
- 神経再支配, 催不整脈性などの問題は残されている。
- 倫理上の議論が十分になされて初めて臨床応用が可能になる。

## はじめに

心臓疾患への治療に関しては, 近年, カテーテル治療や植え込み型除細動機の開発, アンジオテンシンIIレセプター遮断薬の一般臨床への普及, マルチスライスCTによる画像診断の進歩など, そのめざましい発展を遂げてきた。しかし難治性重症心不全に関しては, これらの領域ほどの進歩は残念ながらみられなかった。

難治性重症心不全の根治的治療としてはこれまで心臓移植が唯一とされてきた。しかしドナーの不足の問題から, その恩恵にあずかる例はごく一部にかぎられる。これに対し, 細胞生物学, 遺伝子工学の発達は新たな展開をもたらそうとしている。つまり, 再生医学, すなわち未分化な幹細胞を心筋細胞に分化誘導してこれを移植するという試みが現実味を帯びてきた。本稿ではとくに心筋細胞に分化可能な多能性幹細胞に焦点をあて, 心筋再生の現状を解説する。

## ① 心筋細胞に分化する多能性幹細胞

近年の精力的な研究により, 心筋細胞に分化すること

が明らかにされている幹細胞のうち, 将来的に臨床応用が可能と思われるものとして胚性幹細胞 (ES 細胞), 骨髄間葉系幹細胞, 心筋内組織幹細胞があげられる。それぞれに利点・欠点を有しており, 現時点ではどの細胞が有望であるかについて結論は出ていない。以下にそれぞれの細胞の特徴について概説する。

## ② ES 細胞の利用

ES 細胞は, 受精卵が胚盤胞に分化した段階の内部細胞塊から得られた細胞である。内部細胞塊は将来胎児になる部分であり, ここから得た ES 細胞は *in vivo* ではすべての組織の細胞に分化しうる。この意味で万能幹細胞ともよばれるが, *in vitro* で実際に分化が誘導できるのは胎生早期の段階で分化する細胞である。心筋細胞は胎児期の早期に分化する細胞であり, ES 細胞からは比較的得られやすい。マウスの場合には培養液中に白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を入れておくことによって未分化状態が維持されることが知られている。多くの細胞株ではフィーダーレイヤーとしてマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts :

61(313)

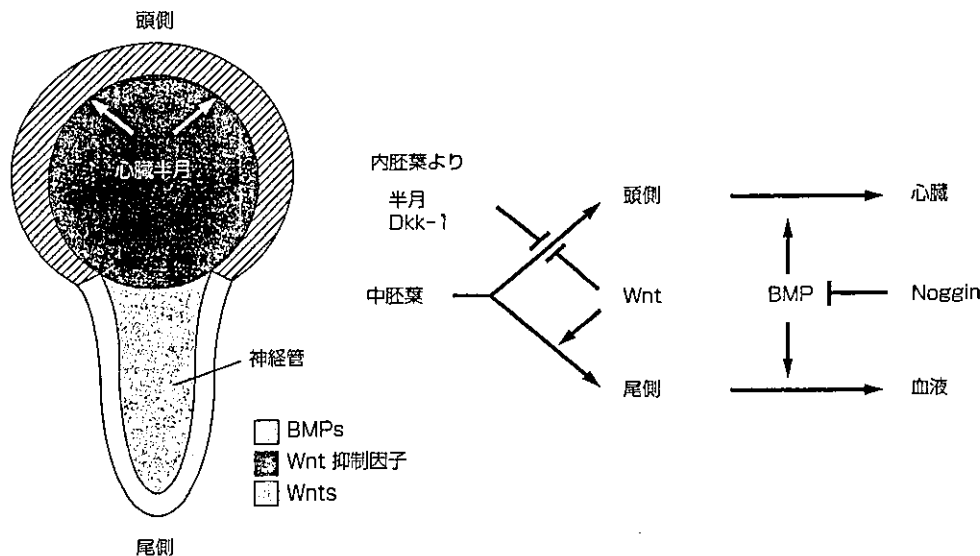


図1 中胚葉から心臓への分化経路

MEF) のうえに ES 細胞を重層して培養することが多いが、近年は技術の向上によりフィーダーレイヤーを必要としない培養も可能になった。ヒトの ES 細胞もすでに多数樹立され、わが国においても京都大学再生医科学研究所の中辻 憲夫教授により 3 株ほど ES 細胞が樹立されている。ヒトの ES 細胞は LIF により未分化機構が維持されることはなく、MEF との共培養が必須であるとされている。また、マウスと同様にヒトの ES 細胞からも心筋細胞に分化することがすでに報告されている。ES 細胞から心筋細胞への分化には BMP 2 や Wnt といったシグナル伝達経路が重要であるとされている (図1)。

ES 細胞の臨床応用上の利点は①大量培養が可能で、②分化を誘導する方法が確立している点である。逆に欠点は、まず手技的には、①ヒトで未分化維持のために MEF との共培養が必要であり、② ES 細胞から心筋細胞への選択的分化誘導法の確立が必要であり、また臨床的には、③未分化細胞が混入して移植後に奇形腫が生じてしまう可能性があり、④同種移植であるため移植後の免疫抑制剤の長期使用が必要となり、さらに、⑤倫理的問題が残されている点、などがあげられる。

近年、韓国よりヒトクローン胚の形成に成功したことが報じられた。しかし、その場合でも 100 個以上の卵を用いて 1 個成功した程度とされている。先進諸国のほとんどでクローン人間の作成は禁止されているが、臓器作

成を目的としたクローン ES 細胞は一部の国でおこなわれる可能性はある。この点に関しては今後国民的な議論がなされるべきである。技術革新により、卵細胞を用いずに ES 細胞レベルでのクローン化ができれば倫理的にはハードルが低くなって臨床応用される可能性もあり、更なる研究が望まれる。

### ③ 骨髄間葉系幹細胞の利用

骨髄は造血の主たる場であり、骨髄中の細胞のほとんどは造血幹細胞に由来する血液細胞である。しかし骨髄中には造血幹細胞に由来する細胞以外にも、一部間質細胞とよばれる接着系の細胞が存在し、造血幹細胞の機能維持にはたらいっている。これら間葉系の細胞は *in vitro*, *in vivo* で骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に分化するが、近年では一部外胚葉系の神経細胞に分化することが知られるようになり、体性幹細胞とよばれるようになった。なお、一時期造血幹細胞にも多分化能を有することが報告され、造血幹細胞の多分化能が誇張された。これは心臓移植後の剖検心臓を用いた研究よりはじまった。すなわち、女性ドナーから提供された心臓が男性レシピエントに移植され、一定時間後に別の理由で死亡し剖検したところ、心臓内に Y 染色体陽性の心筋細胞が観察されたと報告された。この現象は男性骨髄から多能性幹細胞が心臓に移

動し、心筋に分化したものであろうとされた。しかし、その後細胞融合という現象が報告され、造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因ではないかという否定的な見解が多く示された。

われわれの GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている。すなわち、骨髄移植モデルで心筋細胞に分化する細胞は間葉系幹細胞であると考えられる。

最近のトピックスは骨髄内の成人多能性幹細胞 (multipotent adult progenitor cell : MAPC) であろう。MAPC はミネソタ大学の Verfeillie 教授らのグループ<sup>21)</sup>が報告した多分化能を有する細胞で、あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であると報告されている。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ことが報告された。しかし、MAPC の培養法はきわめて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しいことから細胞を *in vitro* で長期間培養することによるアーチファクトではないかとする声もある。MAPC に関しては今後の研究をみたくうえで慎重に判断されるべきであろう。

#### ④ 心筋内の幹細胞の利用

Anversa らのグループ<sup>22)</sup>は心筋細胞中の幹細胞因子 (stem cell factor : SCF) レセプターである c-kit 陽性の小型細胞を単離して培養すると心筋、平滑筋、内皮細胞に分化すると報告した。この c-kit 陽性細胞は心尖部と心房内に存在、心筋梗塞の発症に伴って梗塞巣に移動し心筋細胞に分化することによって梗塞巣の修復に関与しているのではないかとしている。

また、Schneider らのグループ<sup>23)</sup>は心臓に幹細胞抗原-1 (stem cell antigen-1 : Sca-1) 陽性の細胞が存在し、これらの細胞を DNA 脱メチル化剤の 5-アザシチジンを用いて心筋細胞に分化が可能であることを示し、これらが心筋細胞の前駆細胞ではないかとしている。この Sca-1 陽性細胞は尾静脈より注射すると心筋梗塞部にホーミングするという。さらに Goodell らのグループ<sup>24)</sup>は心臓内に存在する side population (SP) 細胞を採取し

てくると一部の細胞が心筋細胞に分化すると報告した。SP 細胞は Mulligan らのグループ<sup>25)</sup>が骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発したもので、DNA 結合色素の Hoechst 33342 の細胞外へのくみ出し能力を指標として幹細胞を分離する方法である。Hoechst 33342 を細胞外にくみ出すポンプは ABC トランスポーターである MRD 1 が関与しているとされ、この蛋白を発現する細胞に幹細胞としての能力が高いとされる。c-kit, Sca-1, MRD 1 自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを表 1 に示す。これらの c-kit 陽性細胞、Sca-1 細胞、MRD 1 陽性の SP 細胞は一部重複する性質をもつが、基本的には異なる細胞であると思われ、その存在頻度、生体での機能と存在意義は今後の解決すべき問題であろう。

これらの心臓内に存在する幹細胞が心筋細胞として存在するとして、これらを生体外に取り出して大量培養し、*in vitro* で心筋細胞に分化させて、再移植するには *in vitro* での大量培養法の確立と心筋分化誘導法が必要不可欠のものとなる。むしろ、生体内で増殖・分化させるほうが現実的である。今後の更なる研究の発展が期待される。

#### ⑤ 再生心筋の移植方法

これまでの心臓への再生心筋細胞移植は、*in vivo* で心臓に直接細胞を注射するという方法がとられた。しかし、この方法では生着率が低く、また、移植できる細胞数もかぎられていた。

これに対し、東京女子医科大学の岡野 光夫教授らは温度により分子形態が変化し、脂溶性・水溶性が変化する化合物 poly-*N*-isopropylacryl-amide (PIPAAm) という化合物を用いた。この化合物を培養皿の表面にコーティングして温度感受性培養皿を作成し、これを用いて培養細胞をシート状に回収することに成功した。Shimizu ら<sup>26)</sup>はこの培養皿を用いて心筋細胞シートを作成し、ラット皮下に長期間生着して拍動をつづける層状の心筋組織の開発に成功した。しかし器官としての心臓を再生するには血管や神経支配、催不整脈性などクリアすべき問題も多く、今後の研究を待つことになる。

#### ⑥ 心臓の交感神経支配の形成

心臓は交感神経の分布密度が高い臓器の 1 つである。