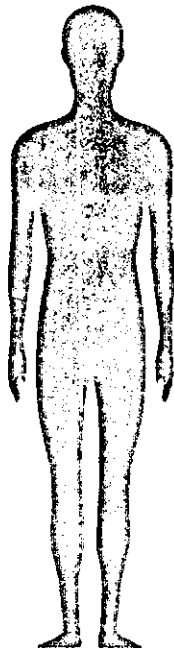


RA臨床の Q & A



最近，医学の分野で人工臓器が話題
になっていますが，RA でのその現
況はどうなっているのでしょうか。

〈正面像〉



KEY WORDS

- ・慢性関節リウマチ
- ・細胞移植
- ・軟骨細胞
- ・骨髄間質細胞
- ・間質細胞移植

A

〈解答者〉

いまげし ひであき うめざわ あきひろ
今林 英明, 梅澤 明弘

(慶應義塾大学医学部整形外科/同 病理学助教授)

慢性関節リウマチ(RA)における治療法において多くの研究が行なわれておりますが、関節損傷部位における軟骨細胞移植もその1つであります。

われわれは、広範囲軟骨欠損部位における軟骨再生治療において、骨髄間質細胞を用いた細胞治療の研究を行なっております。本来骨髄の間質細胞は、血液細胞の造血支持細胞と考えられていましたが(図1)、骨、軟骨、脂肪、(心筋)筋肉細胞などへ分化することが近年報告されるようになりました。現在、臨床的に行なわれている自家軟骨細胞移植(autologous chondrocyte transplantation)においては、自家組織の軟骨を採取し、その軟骨を培養増殖させ軟骨欠損部に移植するものでありますが、この方法ではRAにおける広範囲の軟骨欠損の症例において、必要軟骨量を確保できず、移植が広範囲になるほど細胞が剥がれやすいという欠点があります。骨髄間質細胞を用いる場合、細胞の増殖能力が高く、必要細胞数が得られる可能性が高いこと、また間質細胞をそのまま移植を行なう場合において、移植部位で軟骨への分化誘導が行なわれ、周囲との親和性が強まることがあげられます。

現在、マウスにおいて、骨髄細胞由来の骨細胞へ分化する骨芽細胞株、軟骨へ分化する細胞株を用いて骨軟骨の関節をつくる研究を行なっております。ヒトへの応用においては、骨髄間質細胞より、骨、軟骨への特異的に分化する細胞を取り出し、軟骨細胞への分化誘導を行ない、またもしくは間質細胞の状態での移植を行なうことを検討しております。

現在この研究はスタートしたばかりであります。近い将来骨髄より骨軟骨の細胞治療として再生医学の中心となることが十分考えられると思われれます。

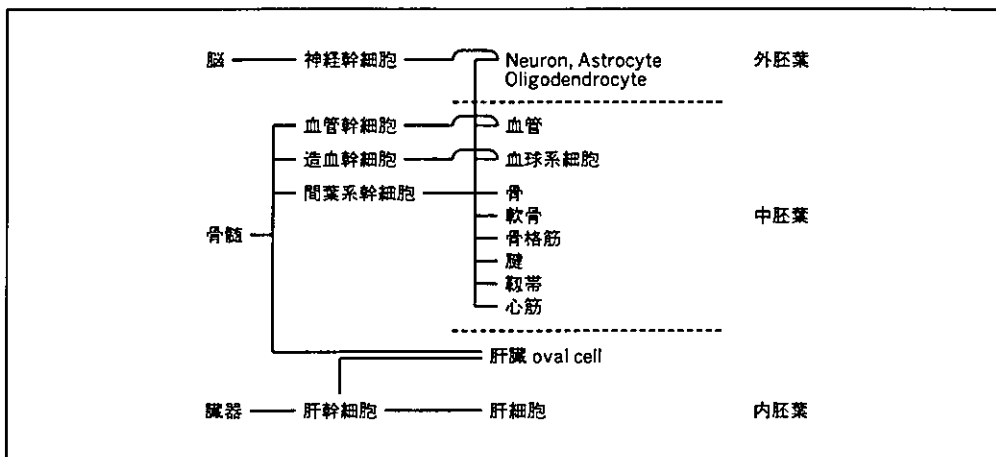


図1 生体における幹細胞の分類

骨髄間質を用いた臓器再生と細胞移植

梅澤明弘 秦 順一

慶應義塾大学医学部病理学教室

◎組織に細胞を移植するさいに、骨髄間質細胞がさまざまな細胞のソースになる事実を紹介したい。間質細胞は骨、心筋、神経への分化能を示し、幹細胞の性格を有する。

*

キーワード：骨髄間質細胞、脱メチル化、幹細胞、細胞移植、再生

細胞をヒトに移植することで本来の臓器の機能を補充することができる。このように、臓器の機能を回復するために細胞を導入することを“細胞移植”とよぶ。細胞移植が従来の臓器移植と異なる点は、他人の臓器そのものを移植しようという考えではなく、自分の細胞を含めた範囲のなかで細胞レベルで臓器の機能を補填することをめざすことにある。

本稿では、臨床的に“細胞移植”を行ううえで、骨髄間質細胞の細胞移植ソースとしての可能性を概説したい。

骨髄には大きく分けて2種類の細胞がある。血液の細胞と、それを支持する間質細胞である。その骨髄間質細胞は骨髄中に存在し、骨髄穿刺で容易に採取でき、造血を支持する細胞として知られ、間葉系の細胞と同じかたちをしており、骨髄のなかで細網構造をとっている。骨髄間質細胞は培養により浮遊状態で増殖する血液細胞とは異なり、壁に付着して増殖する^{1,2)}。培養そのものは通常の線維芽細胞と同様であり、比較的容易である。マウスならびにヒトのいずれでも造血に対する意義

● Akihiro UMEZAWA and Jun-ichi HATA
Bone marrow as a source of cellular transplantation

がすでに多く報告されている。

1999年5月に細胞製剤としてオサイリス社(アメリカ)が Allogen 製剤を発表した。Allogen 製剤のなかには骨髄間質細胞が含まれており、骨髄間質細胞を用いた細胞移植のさきがけとして注目されている。この製剤は、治療では患者の造血を促

サイドメモ

脱メチル化剤による分化誘導

細胞のゲノムのDNAはその細胞に特有のDNAの修飾をもつ。DNAの一次情報に加え、付加される情報としてはDNAメチル化とクロマチンがある。DNAのメチル化とは、CpGのシトシンの部位にメチル化が生じ、メチル化シトシンとなることである。このメチル化シトシンは、転写因子のDNAの結合に関する親和性を変化させる。一般に転写因子が結合できなくなることによって遺伝子の発現がなくなる。昨年(1999)、このメチル化の状態とクロマチン状態が密接にリンクしていることが分子レベルで明らかにされ、ホットな領域となっている。5-azacytidineはゲノムのDNAに取り込まれてDNAのメチル化を阻害する(または、methyltransferaseの活性を阻害する)。この細胞に特有のDNAメチル化状態を脱メチル化剤で変化させること自体は細胞が分裂するとその細胞でいられなくなることを意味し、細胞の分化状態のリセットがかかることになる。ゆえに、脱メチル化剤で処理することは、①細胞の分化状態をもとに戻す(リセットをかける)、②細胞の分化に必要な(マスター)転写因子の発現を誘導するといった2つの作用がある。

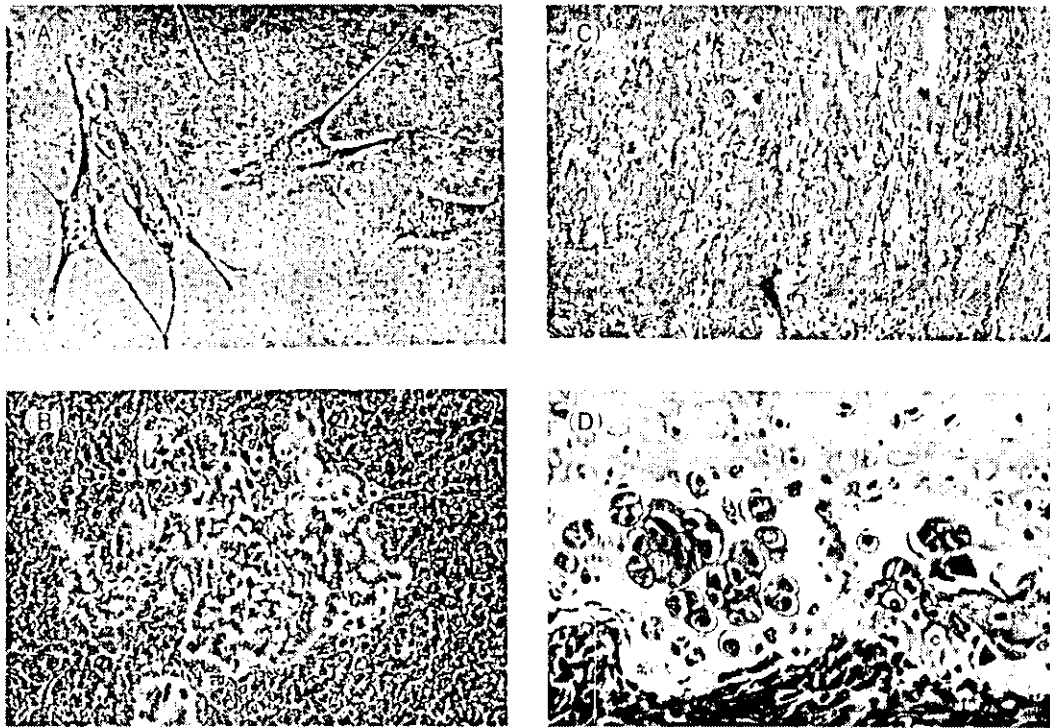


図1 骨髄間質細胞 KUSA の培養上での形態と生体内への移植による骨形成

- A: KUSA 細胞は線維芽細胞様の形態をとり、増殖する。細胞間はギャップ結合で連絡している。
 B: コンフルエント後、細胞外に基質を産生する。この基質とそれからなる結節を形成し、カルシウムの沈着をみる。
 C: ノードマウスに移植して 21 日目には明瞭な骨形成をみる。骨梁がめだつが、骨梁間には骨髓腔をみる。移植後 28 日目までには骨髓腔に造血が明らかになる。
 D: 筋肉周囲に移植した場合に軟骨様の構造をみる。

す意味で白血病やリンパ腫の患者に使用されるように用意されている。骨髄間質の造血に対する意義ではなく、近年、他の細胞に転換させる（他の分化した細胞の機能を有するようになる）ことによって臓器再生の一助になる可能性に注目が集まっている。

■骨髄間質細胞の脱メチル化剤による種々の細胞への分化

細胞移植は従来知られている治療とは異なり、あらたな可能性を秘めている。自分の細胞を用いて、本来の元となる細胞の機能とは異なる細胞にしてから治療に用いる。すなわち、この骨髄間質細胞をさまざまな細胞に分化させ、再生医学として治療に応用する。骨髄間質細胞は成人由来の細胞であり、基本的に“骨髄間質細胞”として分化した細胞である。その分化した細胞が別の種類の分化した細胞になる。

間質細胞は間葉系由来の細胞であり、いろいろ

な細胞に分化する。骨髄間質細胞が分化誘導されることにより骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞になる。骨髄には骨や脂肪があり、骨髄間質細胞が骨や脂肪になることは当然予想される¹⁾。正確に言えば、骨をつくる骨芽細胞になる。この骨芽細胞を用いれば、生体内に移植することで骨をつくるのが可能となる。おもに膜性骨化であるが、軟骨性の骨化も可能である。著者が再現性よくつくれるのは骨だけだが、移植する場所によっては軟骨を形成した（図1）。

骨髄間質細胞が心臓になるということを1999年3月に慶應義塾大学の内科と病理が共同で発表した（図2）³⁾。前述したオサイリス社（アメリカ）は、さっそくその発表を追って骨髄間質細胞を心臓に移植したと発表した。その後も続々と骨髄細胞の心臓への移植の学会発表が続き、1999年12月のアメリカ心臓学会では、gelatin mesh 上で間質細胞を心筋に分化させ、右心房に移植すること

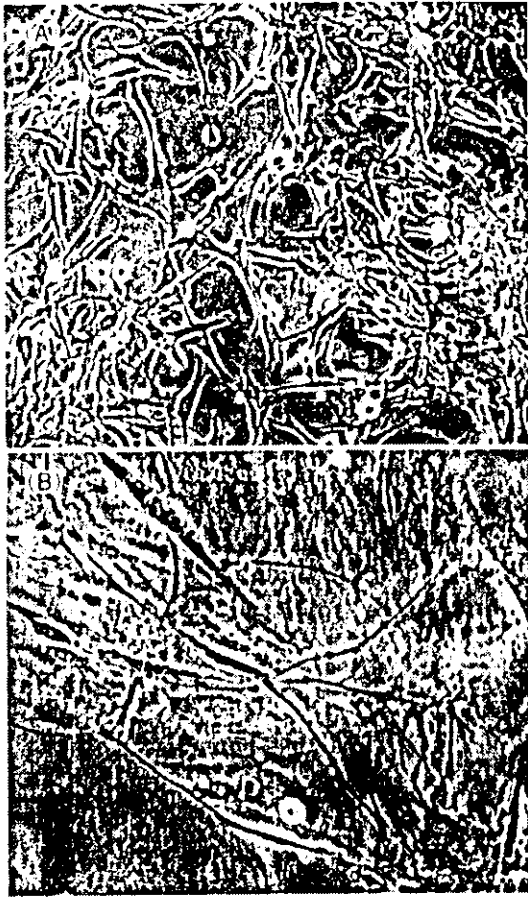


図3 骨髄間質細胞 NRG はニューロンに分化するか

A: NRG 細胞の増殖期の形態。誘導剤を処理していない場合、NRG 細胞は他の間質細胞同様に線維芽細胞の形態をとる。しかし NRG 細胞は、KUSA 細胞、CMG 細胞とは明らかに異なる。

B: NRG 細胞に対し脱メチル化剤である 5-azacytidine を処理すると、neurite をうかがわせる突起をだす。この時期の細胞は RT-PCR 法でニューロン特異的分子である Mash-1 を発現しているが、グリア細胞に認められる GFAP を発現していない。ゆえに、グリア細胞ではなくニューロンに分化した可能性があるかと推察している。

という低分子の天然有機化合物を使わなくてはならないのが現状である。この 5-azacytidine は分化誘導にとって必須であるが、分化誘導にさいしてはサイトカインも大事になってくる。どのようなサイトカインを入れると目的の細胞に分化してくれるかがわかっていれば、間質細胞の分化を制御できる。サイトカインだけでなく、細胞外物質でも分化をコントロールすることが可能である。逆に、分化させることができるサイトカインではなくて、特定の系統に分化するのを防いでくれる

場合もサイトカインは有効ということになる。

■“骨髄間質細胞による細胞再生治療”のヒトへの応用

ここで紹介した研究は、ヒトへの応用というきわめて現実的な側面をもっている。ヒトに応用できた場合のメリットはたくさんある。まず、自らの細胞を用いて行うので拒絶がない。また、別のヒトをつくるわけではないので倫理的問題が生じてこない。間質細胞を用いることによって本来とは異なる細胞をつくりだし、細胞移植に用いる。

逆に、骨髄間質細胞を用いることによる問題点はないのだろうか。基本的に生物学的ならびに倫理的なことは問題とならない。それよりも最大の問題点は、現時点でヒトの骨髄間質細胞をさまざまな細胞に分化させることができるかどうかかわからないことである。

1999 年 4 月の『Science』誌にヒトの間質細胞を分化させることができたという論文⁹⁾をオサイリス社が発表した。著者自身はあまり信じていない。論文に記載されているのと同じ方法に従ってみても、マウスの細胞のようには分化してくれない。

つぎの問題点は、うまく分化させることができてでもそれらの細胞数を十分確保できるかどうかである。十分な細胞数とは、治療に使えるくらいまでの細胞数という意味である。細胞移植には、まず目的とする細胞の前駆細胞を間質細胞よりつくる。前駆細胞は増殖能力を有しているので細胞を大量に増やす。その後、増えた前駆細胞を誘導剤を利用して分化させ、生体に戻す。誘導剤を用いることで分化させることはいくつかの種類で可能となったが、前駆細胞という状態で増殖させることに関してはわかっていない。

最後の問題点は、それぞれの分化形質を完全にコントロールすることができるかどうかである。分化形質を誘導することは可能となったが、それらはたぶん確率的要素を含んでおり、すべての細胞を目的の細胞にすることまでには至っていない。例をあげれば、心臓の細胞が欲しいのに、そのなかに骨の細胞が混じっていたのではよいわけがない。腱の細胞が欲しいのに、そのなかに軟骨が混じっては嬉しくない。心臓をつくる

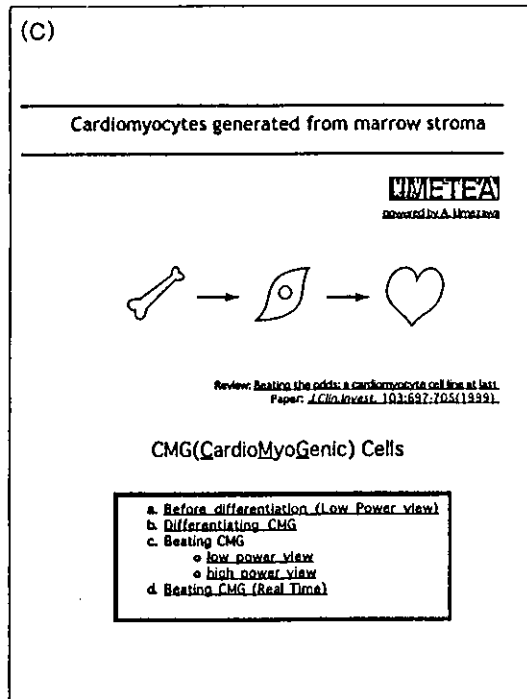
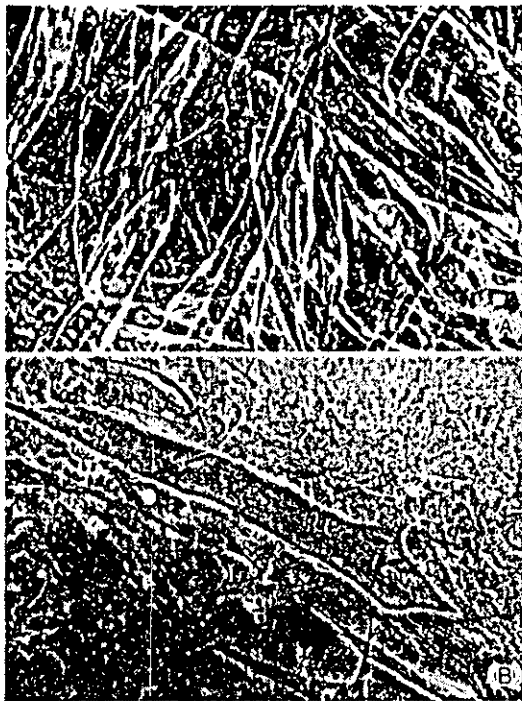


図2 骨髓間質細胞 CMG は心筋に分化する

A : CMG 細胞に対し脱メチル化剤である 5-azacytidine を処理した, 28 日後には心筋の tube を形成し, 収縮を開始する. 形態学的にも心筋線維に特徴的な分岐と構造をみる.

B : 通常では CMG 細胞は線維芽細胞の形態をとっているが, 5-azacytidine 処理後 2 週間では tube 状に細胞がなる. 明らかな収縮は現時点ではない.

C : 写真では動く様子がわからないので, ウェブサイト上に動画で供覧可能とした. アドレスは, <http://www.med.keio.ac.jp/~au/HTML/index.html>

に成功したと報告されている。

ここで大事な点は、骨髓細胞はいろいろな細胞になるといっても、心筋をはじめとする中胚葉由来の細胞になるということである。例外は、1999年の5月に【Science】誌に発表された“骨髓の細胞から肝細胞ができる”である⁴⁾。肝細胞は内胚葉由来であるから、中胚葉から内胚葉の細胞へと胚葉を越えて分化していると報告されている。この内容はその意味の重大性から、CNN やワシントンポストといったマスコミにも紹介された。その論文では“骨髓細胞”と書いてあるだけで、内容を読んでも肝の細胞になるのが骨髓中の血液細胞なのか間質細胞なのかはわからない。いずれにせよ、“肝細胞や胆管細胞になる前駆細胞が骨髓の細胞からできる”と主張している。

もし、胚葉を越えて分化するというのであれば、骨髓間質細胞が外胚葉由来である神経に分化することができるかもしれないし、皮膚の表皮ができるかもしれない。そうなれば、脊髄損傷や火傷の患者への骨髓間質細胞移植の可能性が開か

れる。事実、間質細胞からグリアができると報告されている。しかし、間質細胞からニューロンができるという報告はない。医学部の学生の神山淳氏が夏の終りに、“間質細胞が神経になった(と思う)”と著者に伝えにきた。“間質細胞が生体内で骨をつくり造血を誘導する”と以前伝えにきたのも当時の学生だったから、期待して見にいった。樹立した骨髓間質由来の細胞株のひとつは、5-azacytidine により神経のような突起を出している(図3)。また、PCR により神経に特異的にみられる分子の発現がある。免疫組織化学法では、分化したと思われた細胞に神経特異的なフィラメントの発現は確認していないので、まだ神経になるとはいえない。

間質細胞を用いて身体を形成するすべての種類の細胞を生み出すという夢がある。しかし現実的には、著者らの研究室では、間質細胞はきわめて限られた細胞(すなわち、心臓、骨、脂肪)にしかならない。部分全能性しか示さない。この部分全能性を示すためにも、5-azacytidine

にはほとんどの細胞は心筋細胞からつくるのがベストだが、心臓だけの細胞をつくるようにコントロールするのは難しいのである。

成人ヒトには多くの分化した細胞が存在し、個体の維持のためにそれぞれが機能している。大部分の細胞は分化しきっているため、その細胞の系列に分化することはあっても別の分化形質を示すことはない。もちろん、未分化な幹細胞が血液細胞や消化管といった分裂の多い組織では存在し、いろいろな細胞になる。また、癌細胞はひとつの分化形質だけでなく2つの分化形質を示したり、いくつかの分化形質を示すことがある。しかし原則として、血液の細胞は神経の細胞になることはないし(ただし、【Science】誌の1999年1月号に“血液の細胞が神経になる”と発表されていた⁶⁾)、心臓の細胞は肝の細胞になることはない。

“どのような細胞が細胞移植に利用できるか”という根元的な疑問がある。骨髄間質細胞は骨髄中に存在し、骨髄穿刺で容易に採取でき、培養技術も確立している⁷⁾。著者がここで繰り返したいことは、臨床再生医学に用いることができるもっとも現実的な細胞は骨髄間質細胞であるということである。“再生”という言葉はふさわしくないかもしれない。骨髄間質細胞を骨髄の造血を指示する

細胞として用いるのではなく、分化誘導させることによってまったく別の細胞に生まれ変わらせるので、“細胞治療”という言葉が適切かもしれない。

田島信哉君は自主学習に参加してくれた学生であるが、彼らの示唆の多くは必要不可欠のものであった。

文献

- 1) Umezawa, A. et al.: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J. Cell Physiol.*, **151**: 197-205, 1992.
- 2) Umezawa, A. et al.: Colony-stimulating factor 1 expression is down-regulated during the adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells and induced by cachectin/Tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 920-927, 1991.
- 3) Makino, S. et al.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **103**: 697-705, 1999.
- 4) Petersen, B. E. et al.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, **284**(5417): 1168-1170, 1999.
- 5) Pittenger, M. F. et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**: 143-147, 1999.
- 6) Christopher, R. R. et al.: Turning Brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science*, **283**: 534-537, 1999.

●お知らせ●

■第10回精神科医による心身医療研究会

日時:平成12年4月8日(土)16:00~18:00

場所:エーザイ株式会社 別館4F406会議室(TEL 03-3817-3897)

〒112-8088 東京都文京区小石川5-5-5

16:00~17:00

特別講演:「総合診療部における心身医学の意義と精神科医への希望」

北海道大学総合診療部教授 前沢政次先生

17:00~18:00

質疑応答

18:00~

講師との懇親および情報交換会

*終了後、地下食堂にて情報交換の場をご用意しております。

意しております。

事務局:北里大学医学部精神医学教室

宮岡 等

TEL 042-748-9111

FAX 042-765-3570

e-mail: miyaoka@ehp.kitasato-u.ac.jp

世話人:福西勇夫(東京都精神医学総合研究所), 樋口輝彦(国立精神・神経センター国府台病院), 堀川直史(東京女子医科大学精神医学教室), 保坂隆(東海大学医学部精神医学教室), 片山義郎(井之頭病院), 宮岡等(北里大学医学部精神医学教室)

共催:精神科医による心身医療研究会

エーザイ株式会社



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

慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 福田恵一, 牧野伸司
同 病理学 梅沢明弘

はじめに

心筋細胞は胎生期には細胞分裂を行うが、生後間もなく終末分化し、以後は細胞分裂を行わない。このため心筋梗塞等により心筋細胞が壊死した場合には、残存心筋細胞の肥大により代償される^{1,2)}。一方、分子生物学の発達により遺伝子操作動物や人工臓器の研究が進歩し、遺伝子操作により細胞の運命を人工的に転換させることも可能となった。骨格筋細胞では MyoD 遺伝子群がクローニングされ、この1つの遺伝子を強制発現させることにより、線維芽細胞や神経細胞等を骨格筋細胞に転換することが可能となった^{3,4)}。多くの研究者が心筋細胞の発生学的研究の手段として、あるいは心不全に対する根本治療の確立を目指して心筋細胞株の樹立や心筋細胞特異的転写因子の研究を行ってきた^{5,6)}。しかし、その目的を満足できる心筋細胞株の開発や、MyoDのように単独の遺伝子で他の細胞を心筋細胞に変えうる転写因子は見つかっていない。

われわれはこの常識を覆し、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に転換させる技術を研究開発してきた。そして多分化能を有する骨髄間質細胞に分化誘導を加えることにより、自己拍動能を有する心筋細胞類似の細胞を得ることに成功し、CMG細胞 (cardiomyogenesis より) と命名した。本稿では

CMG細胞の作製法とその形態学的、電気生理学的特徴、心筋特異的遺伝子の発現等を解説する。

心筋細胞の発生学的由来

図1に心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞の発生学的な由来を示す。受精卵が原腸陥入の後、内、中、外の3胚葉に分化し、平滑筋細胞は lateral mesoderm から、骨格筋は dorsal paraxial mesoderm から体節を形成した後に発生してくる。一方、心筋細胞は中胚葉のうち anterolateral plate mesoderm から発生し、心筋芽細胞に分化することが決定された後、胎生期には細胞分裂を行い、生後間もなく終末分化する。骨格筋細胞においては MyoD 遺伝子をはじめ発生分化に関する研究が進み、転写因子のカスケードが明らかになってきた。心筋細胞においてもいくつかの心筋細胞特異的転写因子の存在が明らかにされてきたが、単独の転写因子のみで心筋細胞の形質が獲得できるような強力なあるいは上流の転写因子は見つかっていない。

骨髄間質細胞の特徴

われわれは本研究を開始するにあたり、未分化で心筋細胞と発生学的に同一あるいは近い細胞を

[Key words] 骨髄細胞, 心筋細胞, 分化誘導, 転写因子, 遺伝子発現

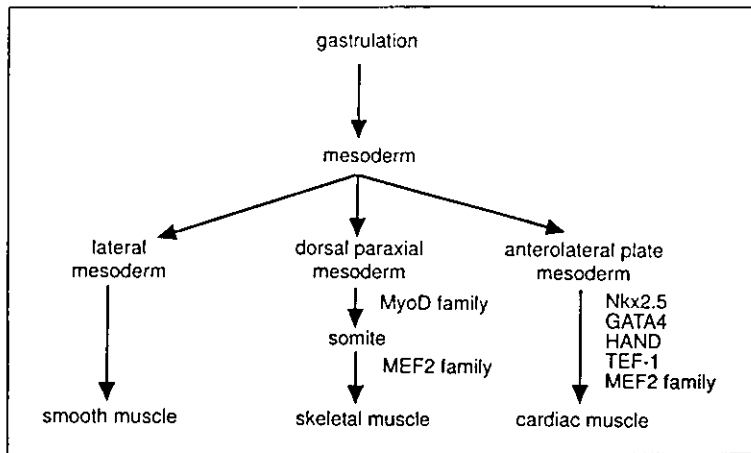


図1 心筋細胞の発生学的由来

材料にしなければならないと考え、骨髄間質細胞を用いた。骨髄間質細胞は発生学的には将来血球、血管に分化する blood island (血島) と呼ばれる細胞に由来する中胚葉系の未分化な細胞である。血球系の幹細胞の増殖と分化を維持するため多彩なサイトカインや細胞増殖因子を分泌する性質があり、また骨髄間質細胞自身が多分化能をもつ中胚葉系の幹細胞で、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞等に分化することが知られている⁷⁻¹⁰⁾。

CMG 細胞の作製

C3H/He マウス大腿骨より骨髄を摘出し、Dexter 法¹¹⁾により初代培養を行った。骨髄間質細胞は付着系の細胞であり、浮遊系の骨髄芽細胞、血球系の細胞を除去致した後3ヵ月以上の長期間培養を行った。長期培養後、不死化した細胞による多クローンの細胞株を作製し、この多クローンの細胞株に対し、limiting dilutionによる単一あるいは数クローンによる細胞株を作製した。

各々のクローンに対しDNA脱メチル化剤5-azacytidine¹²⁾により分化誘導を行った後に4週間培養し、数百以上のクローンの中から自己拍動を行う細胞を含むクローンをスクリーニングした。自己拍動を開始した細胞の周辺をクローニングシリンジより採取し、さらにサブクローニングを反復した。得られたサブクローンの中から自己

拍動する割合の高いクローンを最終的にCMG細胞株として樹立した。CMG細胞は凍結融解を繰り返しても性質は変わらず、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 細胞の特徴

CMG細胞は5-azacytidineによる最終的な分化誘導前を行う以前には単核の線維芽細胞様の形状を呈するが、分化とともに形態は著しく変化する。図2にCMG細胞の位相差顕微鏡写真を示した。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を呈してくる。一部は棒状を呈し、横長になった。これらの細胞が後に自動拍動を開始する細胞となるが、この時点では自動拍動を行うことはごくまれである。分化誘導後2週になるとすでにこうした細胞の多くは自己拍動を開始する。ここで興味深いのは自己拍動を開始した細胞が互いに一列に連結し合い、筋管細胞様を呈したことである。3週では多くの細胞が縦に一列に並び、同期して収縮する。

図3にミオシンに対するモノクロー抗体を用いた免疫染色を示した。分化誘導後1週ではすでにミオシンを発現し、細胞体が円形をしている。2週では近接するミオシン陽性の細胞が互いに引き合うように連結し、筋管を形成してゆく様子が観察された。3週ではミオシン陽性の細胞が完全に

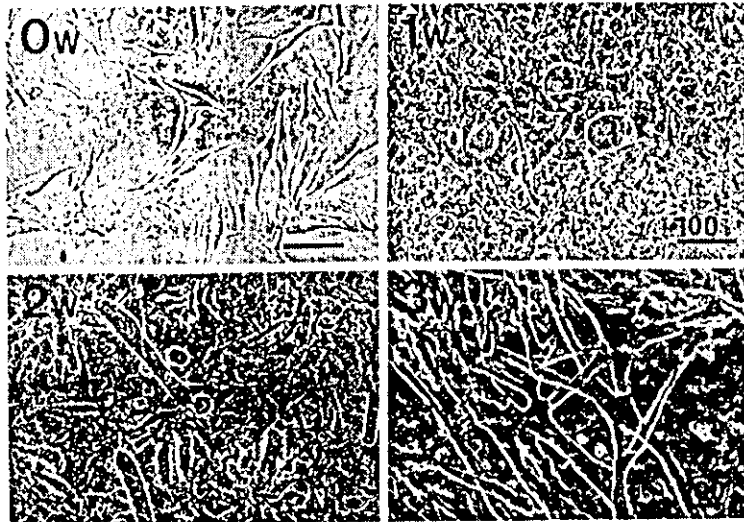


図2 CMG細胞の位相差顕微鏡写真
 上段左より分化誘導前、以下、
 分化誘導後1週、2週、3週の
 細胞を示す。バーは100μを示す。

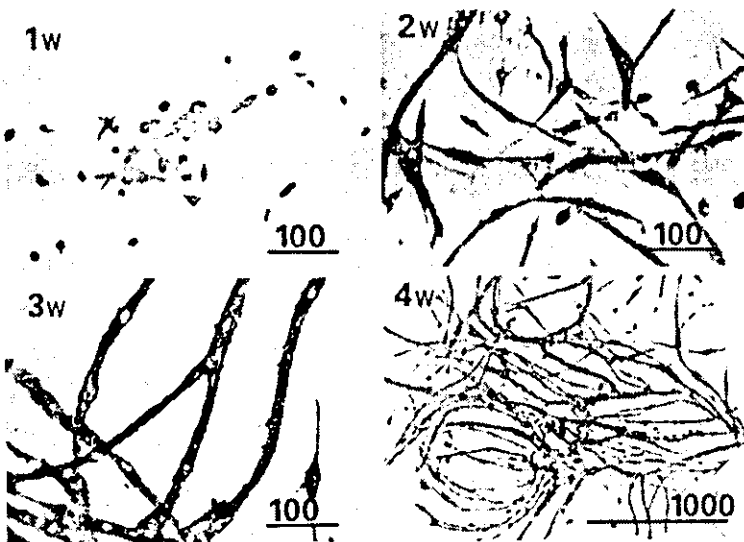


図3 CMG細胞の抗ミオシン抗体
 による免疫染色
 CMG細胞は分化誘導後1週頃
 より、ミオシンを発現し、2週
 頃より周囲のミオシン陽性の
 細胞と連結し筋管細胞を形成
 する。自動拍動は2週以後の
 細胞で活発に観察される。バ
 ーは100μまたは1000μを示
 す。

連結し、同期して収縮した。CMG筋管細胞は分枝により他の筋管細胞と連結し、全体としては網の目状の外観を示した。筋管の長さは最長のもので約3mmに達し、拍動数120~250/分で収縮した。CMG筋管細胞は基本的には単核の細胞が90%程度であり、これが縦列していたが、10%程度の細胞は3~10核の多核であった。

図4に心房利尿ホルモン(ANP)とデスミンに対する抗体を用いた免疫染色写真を示した。筋管細胞に一致して染色が観察され、CMG細胞がANPとデスミンを発現していることが観察され

た。

図5に透過型電顕写真を示した。電顕的には典型的な横紋構造に加えて、細胞中央部に存在する核、豊富なグリコーゲン顆粒、大型のミトコンドリアが観察された。核周囲には膜に包まれた直径70~130nmの高密度の分泌顆粒様の構造物が多数認められた。この高密度の顆粒の拡大写真を図5Bに示した。成獣マウスの心房で観察されるANPの分泌顆粒である心房顆粒¹³⁾は直径が150~200nmであり、CMG細胞で観察された顆粒はそれよりもやや小さいが、電顕的特徴より心



図4 CMG細胞の抗ANP(A), 抗デスミン抗体(B)による免疫染色

房顆粒の可能性が高いと判断した。デスモゾーム, SR等も観察された。

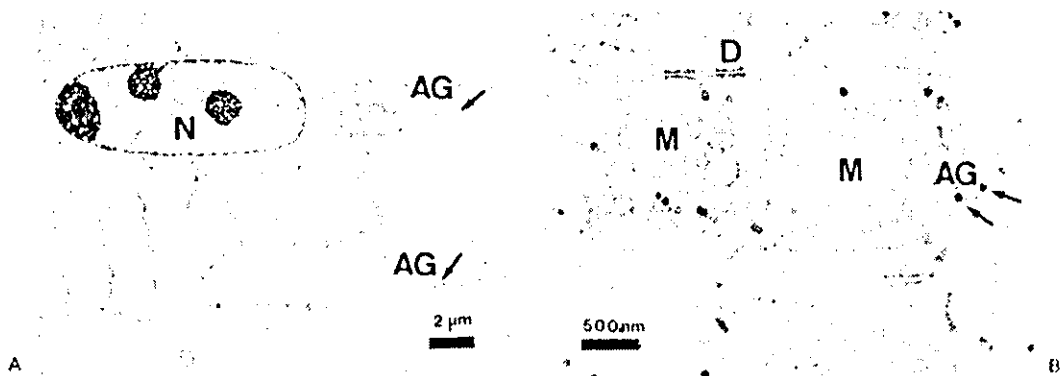


図5 CMG細胞の電子顕微鏡写真

典型的な横紋構造に加え, 細胞中央部に存在する核, 豊富なグリコーゲン顆粒, 大型のミトコンドリアが観察された。心房顆粒と考えられる高密度の分泌顆粒が多数認められた。
N: 核, AG: 心房顆粒, M: ミトコンドリア, D: デスモゾーム

CMG細胞の活動電位

図6にガラス微小電極により記録したCMG筋管細胞の活動電位を示した。活動電位は洞結節細胞型とプルキンエ細胞型の2種類に大別された。両者に共通した活動電位の特徴は①活動電位持続時間が長いこと, ②比較的浅い静止期電位を持つこと, ③ペースメーカー細胞に見られるような静止期電位の緩やかな脱分極が認められることである。また, プルキンエ細胞型では活動電位はPeak & Dome型を呈した。これ以外の活動電位も見受けられ, 分化誘導初期には洞結節型が多く, 時間とともにプルキンエ細胞型が多くなることも明らかとなった。また, カルシウム遮断薬であるverapamilを投与すると活動電位の幅は狭小化し, この活動電位がカルシウム電流に起因するものであることも明らかとなった。洞結節細胞型の活動電位持続時間, 拡張期膜電位, 活動電位振幅は, 従来ウサギ¹⁴⁾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。プルキンエ型はこれに比し, 拡張期膜電位は深く, 活動電位振幅は大きい傾向を示した。

CMG細胞の遺伝子発現

CMG細胞の心筋細胞としての表現形を解析す

図6 CMG細胞の活動電位
CMG細胞の活動電位は洞結節細胞型とプルキンエ(Purkinje)細胞型の2つに大別された。活動電位の特徴としては①活動電位持続時間が長く、②比較的浅い静止期電位をもち、③ペースメーカー細胞に見られるような静止期電位の緩やかな脱分極が認められることがあげられる。

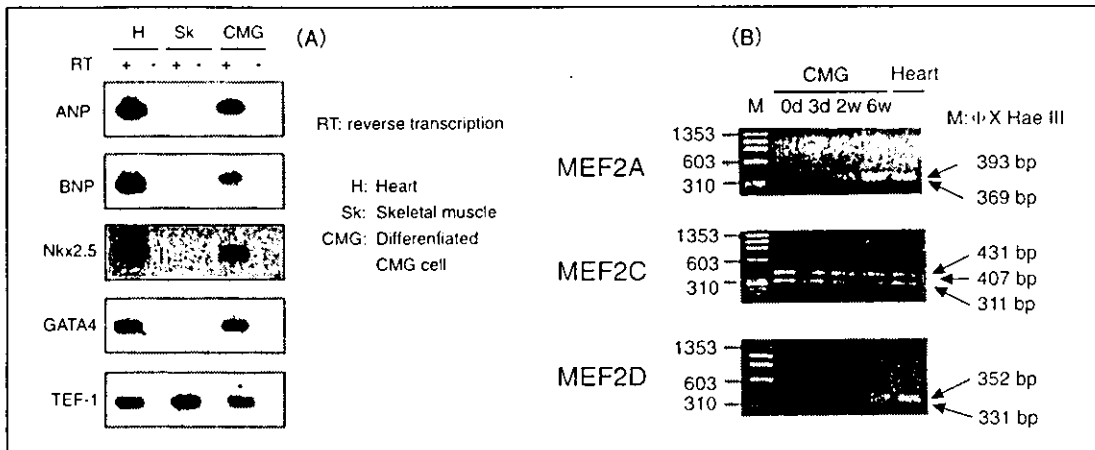
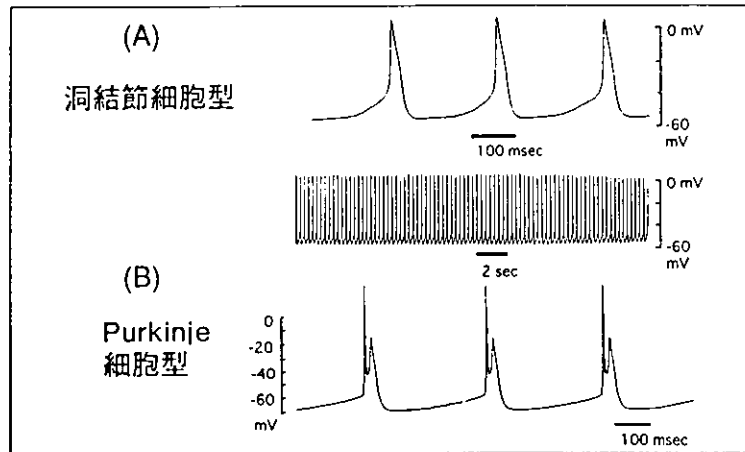


図7 心筋細胞特異的蛋白の発現
A: ANP, BNP, 心筋特異的転写因子 Csx/Nkx2.5, GATA-4, 筋肉細胞特異的転写因子 TEF-1 の mRNA の発現を心筋, 骨格筋を陽性, 陰性対照として RT-PCR-Southern 法により解析した。RT(-)は逆転写酵素を添加していないサンプルを示す。
B: 筋肉特異的転写因子 MEF2 family の RT-PCR の結果を示した。バンドが複数観察されるのは MEF2 family の alternative splicing の form が明らかになる部位で primer を設定したことによる。MEF2C は分化誘導前にすでに発現が認められ、MEF2A, MEF2D は分化誘導後に発現が誘導された。

るため、心筋細胞特異的蛋白質の発現を観察した。図7Aに心筋特異的蛋白であるANPおよびBNP、心筋特異的転写因子であるCsx/Nkx2.5^{15,16)}、GATA-4、筋肉細胞特異的転写因子であるTEF-1のmRNAの発現を心筋、骨格筋を陽性、陰性対照としてRT-PCR-Southern法により解析した結果を示した。CMG細胞ではANP、BNPの発現が観察された。転写因子に関してはCsx/Nkx2.5、GATA-4、TEF-1遺伝子の

発現を認めた。筋細胞特異的転写因子であるMEF2 familyの発現をRT-PCR法で観察した結果を図7Bに示した。CMG細胞はMEF2 familyのうちMEF2A、MEF2C¹⁷⁾、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は分化誘導前にすでに発現が認められたが、MEF2A、MEF2Dは分化誘導後に発現が誘導された。

形質転換心筋細胞の応用

骨格筋の発生分化についてはこれまでC2C12等の骨格筋細胞に分化する細胞を用いた研究が数多く行われ多大な貢献をもたらしている。心筋細胞の分化に関する研究がこれまで骨格筋に比しておいてきた理由の1つに心筋細胞に*in vitro*で分化する細胞が得られなかったことがあげられる。CMG細胞の性質は現在のところきわめて心筋に近いことが示されたが、その詳細は不明の点も多く今後さらに明らかにしなければならないと考えられる。

心筋細胞の発生分化の研究領域において近年の研究により心筋梗塞による心不全モデルに対し、培養胎児心筋を移植する治療法が報告された^{18,19)}。移植した胎児心筋はrecipientの心臓に長期間生着可能なことが報告され、さらに心機能を改善することができたとの報告もある。これらの研究は実験動物レベルでの報告であり、ヒトを対象とした研究は倫理上行いえないものである。一方、骨髄間質細胞はdonorという点では倫理的問題は少ない。しかし、本研究で示した骨髄間質細胞を用いた形質転換心筋細胞の作製がヒトの細胞でも可能なのか否か、そしてこれを用いた心筋細胞移植が可能であるか否かは現在のところ明らかでなく、今後明らかにしなければならない問題である。

文 献

- 1) Kodama H, Fukuda K et al: Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1997; **81**: 656-663
- 2) Pan J, Fukuda K et al: Role of angiotensin II in activation of the JAK/STAT pathway induced by acute pressure overload in the rat heart. *Circ Res* 1997; **81**: 611-617
- 3) Weintraub H: The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 1993; **75**: 1241-1244
- 4) Olson EN, Klein WH: bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* 1994; **8**:1-8
- 5) Olson EN, Srivastava D: Molecular pathways controlling heart development. *Science* 1996; **272**: 671-676
- 6) Fishman MC, Chien KR: Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 1997; **124**: 2099-2117
- 7) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; **276**: 71-74
- 8) Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ et al: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994; **161**: 218-228
- 9) Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV: Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; **20**: 263-272
- 10) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K et al: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol* 1992; **151**: 197-205
- 11) Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG: Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; **91**: 335-344
- 12) Taylor SM, Jones PA: Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; **17**: 771-779
- 13) Tagoe CN, Ayettey AS, Yates RD: Comparative ultrastructural morphometric analysis of atrial specific granules in the bat, mouse, and rat. *Anat Rec* 1993; **235**: 87-94
- 14) Noma A, Irisawa H: Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflügers Archiv* 1976; **364**: 45-52
- 15) Komuro I, Izumo S: Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8145-8149
- 16) Lyons I, Parsons LM, Hartley L et al: Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene Nkx2-5. *Genes Dev* 1995; **9**: 1654-1666
- 17) Lin Q, Schwarz J, Olson EN et al: Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997; **276**: 1404-1407
- 18) 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
- 19) Li RK, Mickle DA, Weisel RD et al: Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. *Circulation* 1997; **96** (Suppl II): 179-86

追加発言：骨髄間質細胞の心筋細胞への分化

梅澤 明弘*

骨髄間質細胞が、心筋細胞への分化能を有していることを明らかにいたしましたので簡単に紹介させていただきます。

ここで紹介したい細胞は、われわれが単離し、クローニングしましたマウス由来の骨髄間質細胞である CMG 細胞です。

この細胞は、通常は線維芽細胞の形態をとり、増殖します。誘導剤として用いました 5-azacytidine 処理により円形・tube 状の細胞が出現します。2 週、3 週と徐々に tube 状の構造が明らかとなり、収縮を始めます。

その細胞の形態をより見やすくするために抗ミオシン抗体を用いて免疫染色を行いました。誘導剤をかける以前は、ミオシンで染色されませんが、処理後は陽性細胞が出現します。最終的には、心筋に特徴的な分岐を伴った tube 状を呈し、拍動します。この拍動はコロニーによって異なりますが毎分 60~180 です。3 週目に自己拍動を始めてから少なくとも観察しつづけた 2 ヶ月以上の間、ずっと拍動しつづけます。その動きをビデオでご覧い

ただきます。それぞれの分化した細胞が、同調して収縮している様子がお分かり頂けたことと存じます。

これらの CMG 細胞が、骨格筋ではなく「心筋」の性格を有しているかどうかを心筋特異的な遺伝子の発現、また活動電位の面から検討しました。まず、心筋特異的な遺伝子の発現を RT-PCR サザン法にて左から心臓、骨格筋、そして、私どもの CMG 細胞で検討しました。解析しました遺伝子は、心房由来利尿ホルモンである ANP、心室由来利尿ホルモンである BNP、転写因子であるホメオ box 遺伝子 Csx/Nkx 2.5., GATA 4 です。いずれも心筋で発現し、骨格筋では全く発現しない遺伝子ですが、紹介しました CMG 細胞では明らかに発現しています。

次は、CMG 細胞の活動電位です。CMG 細胞は、コロニーによって 2 通りの活動電位を示します。まず洞結節細胞型の活動電位では第 4 相にて電位が浅くなっていき、活動電位の持続時間は 60msec と非常に長いのです。

Cardiomyogenic differentiation of marrow stromal cells

AKIHIRO UMEZAWA Department of Pathology, Keio University School of Medicine



うめざわ・あきひろ：慶應義塾大学医学部病理学専任講師。平成元年慶應義塾大学大学院修了。平成3年米国 UCSD 内科学研究員。平成4年米国バーナム研究所研究員。平成7年現職。主研究領域／病理学、発生学、小児腫瘍、DNAメチル化。

Key words

骨髄間質細胞
心筋細胞
自己拍動
活動電位

E-mail au@med.keio.ac.jp.

一方、Purkinje細胞型では、2峰性を示し、その持続時間は100msecです。骨格筋の持続時間は3msecですので、このCMG細胞の持続時間はきわめて長く、心臓に特徴的です。また、活動電位の第4相が浅くなるのは自動能を有する細胞であり、いずれもCMG細胞が骨格筋ではなく心筋細胞であることを示しています。

4週目のtube状の細胞の電顕像をご覧ください。細胞質には、Z bandを伴ったmyofilamentsがみられ、典型的な横紋構造を示しています。また、細胞質にはANP顆粒と思われる黒い顆粒状の構造を認めます。

以上、骨髄間質細胞が心筋細胞へ分化することをお示ししました。ヒトが自らの間質細胞を用いて、心筋を代償することが可能なることをこのことは示しています。また、CMG細胞がペースメーカーとしての機能を有していることも同時に示しています。

なお、本研究は秦 順一教授、小川 聡教授の指導のもとで、福田恵一博士、牧野伸司先生により行われました。

終わります。

質 疑 応 答

座長(西川) それではご討議をお願いします。

中村(大阪大) これは、分化誘導をするために、骨髄間質細胞に何を入れられたのですか。

梅澤 demethylating agentの5-azacytidineです。

中村 その時に間葉系の細胞は骨髄の間葉に特異的なのでしょうか。つまり間葉に同じ操作をした時に、心筋の細胞と同じようなのか、特異的なのか、もし特異的であれば、何

がそのことを担っているのか、おうかがいしたいと思います。

梅澤 私自身お答えする実験結果を持っておりません。線維芽細胞を用いて同様の実験を行っていますが、心臓になるような事実は認めていません。しかしながら、先ほど西川先生がお示しになられたように、ES細胞は簡単に心臓にすることは可能です。

末松(慶應大) 先ほどの西川先生のお話とも関係するのですが、以前にこのpreparationをビデオで見せていただいた時に、心筋細胞がたくさんできているところに、ここかしこに小さな脂肪細胞のようなものが観察できたことを記憶しています。人為的に培養条件をいろいろ変えることで、できてくる細胞の種類をできるだけ心筋細胞にコミットするような条件づけなどは、何かわかっているのでしょうか。

梅澤 残念ながらわかっておりません。しかしこれは非常に重要な課題で、これを完全に心臓だけのクローンに、今subcloningを続けていまして、その割合はどんどん上昇しています。最終的には先ほどご指摘がありましたように、化学的にdefinedされたmediaでスクリーニングする、または選択するということがもっとも大事になってくると思います。特にヒトの骨髄の間質細胞に応用を考える上では、化学的に条件が決まっている培養液または培養条件を見つけることは大事になってきます。

埜中(国立精神・神経センター) すばらしいお仕事をありがとうございました。私は先ほど筋衛星細胞のことを少しお話ししたのですが、骨格筋の再生の時に、やはり骨髄由来の細胞が筋芽細胞として再生に関与するというようなペーパーが【Science】誌に載ったのですが、先生のその実験系で、何か骨格筋に関する知見がございましたでしょうか。

梅澤 あの論文に関しては、私自身は彼ら

は勘違いをしている可能性があるかもしれないと思っています。あれは cardiomyocyte の可能性が十分あると思っています。調べているかどうかだけの問題で、あの構造から、心骨格筋の場合は細胞が癒合してチューブ状に

なりますが、この細胞はそういうことはしません。よく観察すれば、あれはどちらなのか、検討しきれていないというふうに私は考えております。

座長 ありがとうございます。

原 著

骨髓間質細胞前脂肪細胞株 H-1/A の細胞間交流と
その脂肪細胞分化との関係

慶應義塾大学医学部病理学教室

(指導: 渡辺陽之輔教授)

うめ りろ あき ひろ
梅 澤 明 弘

(平成元年6月14日受付)

Key Word: bone marrow, intercellular communication

骨髓は血液細胞の増殖分化の場として知られている。骨髓では血液細胞の他に間質細胞の存在が知られており、間質細胞と血液細胞との間には種々の連絡 (communication) があることが解明されてきている。細胞間連絡としては、現在、3通りのものが挙げられている¹⁾。即ち、①液性因子、②ギャップ結合、及び③膜上の分子を介するシグナル伝達である。この細胞間のシグナル伝達の研究では、血液の系は他の系に比べて解析が容易である。その理由の第一として、血液細胞は培養液中で浮遊しており、dish壁に付着する骨髓間質細胞上に血液細胞が付着するか否かを判定することにより、血液細胞と骨髓間質細胞との接着を *in vitro* で検討できること、第2として、骨髓間質細胞の存在下で血液幹細胞の維持が可能である長期骨髓培養系が²⁾ 確率していること、第3として、血液細胞は、リンパ球系を含め、様々な系の細胞株が樹立され、また、骨髓間質細胞、リンパ節ナース細胞株も樹立されており、*co-culture* の系に利用できる点が挙げられる。

細胞間連絡のうち、造血にかかわる液性因子、増殖因子に関しては、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、そしてイン

ターロイキン3 (IL-3) の cDNA が、クローニングされており、最も解析が進んでおり³⁻⁶⁾、それらの増殖因子を利用して臨床応用も始まっている。また、増殖因子の生体内の各臓器での発現の分布、ホルモン等による発現の調節が明らかになっている。増殖因子同様、ギャップ結合も、細胞の増殖分化また発生過程における重要性が強調されている^{1,7,8)}。血液造血域である骨髓の場でも、渡辺^{9,10)} が間質細胞間に、ギャップ結合の存在を電顕にて確認しており、間質細胞同士がギャップ結合を介し、協調的に働いていることが示唆された。膜上の分子を介する連絡に関しては、リンパ球系において接着分子の同定がなされ、接着に特異的な関係が明らかとなっている¹¹⁾。しかしながら、骨髓では間質細胞株、血液細胞株を利用してのロゼット形成、あるいは *co-culture* 実験より、細胞接着によって血液細胞の増殖分化が修飾を受けることは分かっているが、細胞間の接着の様式を明示する良いアッセイ系がないため、細胞間の分子はいまだ同定されていない¹²⁾。

この報告では、Dexter 型骨髓培養²⁾ 及び骨髓間質細胞株 (H-1/A 細胞¹³⁾) を用い、ギャップ結合と増殖因子による細胞間連絡に焦点をおき、前者に関してはその存在様式の変化を、後者に関してはその発現を特に細胞の分化との関連において検索した。ギャップ結合については細胞内色素微量注入法による細胞間の色素移動を指標として、また増殖因子の発現に関しては RNA プロット解析により検索した。H-1/A 細胞は、脂肪細胞への分化に伴い、ギャップ結合を介する連絡は消失するにもか

Intercellular communication of the marrow preadipocyte cell line, H-1/A
Akihiro Umezawa, M.D.
Department of Pathology, School of Medicine,
Keio University

かわらず、種々の線量の放射線照射によっては変化しなかった。更に、前脂肪細胞の状態では H-1/A 細胞は M-CSF を発現するが、脂肪細胞への分化後にはその発現は低下した。

材料および方法

1. 細胞培養

1) 長期骨髄培養

長期骨髄培養は、Dexter らの方法で通常通りに設立した²⁾。8週齢 C57/B1 マウス大腿骨髄腔内に注射器で培養液を強く入れることにより、骨髄の細胞を骨髄腔よりとりだし、よく攪拌した後、20%馬血清 (Flow laboratory) とフィッシャー培地 (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) で4週間培養した。4週間後、脂肪細胞の出現が認められるようになり、それらの培養を色素の微小注入用として準備した。

2) H-1/A 細胞株並びにそのサブクローン

マウス C57/B1 の骨髄間質細胞株である H-1 細胞¹⁴⁾ 及びそのサブクローンは、10%馬血清を加えたフィッシャー培地で培養した。培地交換は3日毎、継代は6日毎に行なった。H-1/A 細胞は、コンフルエント後、脂肪細胞への分化を示した。即ち、コンフルエント後1週で約60%の細胞が細胞内に多房性の小脂肪滴を有するようになる。いずれの培養も 37°C、5% CO₂ の条件下で行なった。H-1 細胞より limiting dilution によっていくつかのサブクローンを得た。

2. 色素移動法

蛍光色素である Lucifer Yellow CH (Sigma, St Louis) を微小注入器 (ナリシゲ製、東京) を利用してニコン製倒立顕微鏡下で脂肪細胞への分化前後で H-1/A 細胞に注入した。Lucifer Yellow CH は、分子量が457あり、隣接する細胞への移動はギャップ結合を介すると考えられている¹⁴⁾。従って色素を注入した細胞から、隣接した細胞に色素が移動した場合にはその細胞間にギャップ結合が存在することになる。今回は、色素を注入した細胞に隣接する全細胞数に対する色素の移動がみられた細胞数の割合を算出してギャップ結合の発達の程度を判断した (第1図説明参照)。色素の移動の有無は、蛍光顕微鏡下で注入後、30分以内に判断した。

3. H-1/A 細胞に対する放射線照射

H-1/A 細胞をコンフルエント直前の状態で種々の線量の照射を行った (200, 500, 1000 ならびに2000 rad)。

照射には、ML-GMA (Mitsubishi, Electric corporation, Tokyo, Japan) を用い、毎分 200 rad で行った。一部では、H-1/A 細胞を5000または、10000 rad 照射した。

4. RNA プロット解析

RNA 抽出は、細胞をグアニジンイソチオシアネート中でホモジナイズし、セウムクロライドの上のせ、遠心した。ポリ ARNA は、オリゴ(dT)セルロースカラムで抽出した。RNA 1%アガロースで電気泳動し、ナイロンフィルター (Gene Screen Plus, Du Pont Company NEN Products) に転写した。フィルターは、5XSSPE (0.9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 5mM EDTA), 5XDenhardt 液, 1% SDS, 0.01% ポリ A (Boehringer Mannheim) を含む溶液中で、30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、ランダムプライマー法¹⁵⁾により [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) で 0.5~2×10⁶ cpm/ μ g に標識した DNA プローブを加え、ハイブリダイゼーションを行った (65°C, 16時間)。フィルターの洗浄 (分別) は、1% SDS を含んだ 2X SSC (1X SSC=0.15 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA) で 65°C で行い、最終的には、0.1% SDS, 0.1X SSC, 65°C で洗った。

5. DNA プロット解析

H-1/A 細胞並びに C57/B1 マウス脾臓より高分子 DNA を抽出した。1レーン当り、それぞれ Bgl II, Bam HI, Hind III, Eco RI で消化した DNA 約 10 μ g のせ、0.7%アガロースで電気泳動後、ナイロンフィルターに移行した。DNA プロット解析の条件は、RNA プロット解析と同様に行なった。

結 果

1. H-1 細胞のサブクローニング

H-1 細胞より、種々の程度で脂肪細胞への分化を示すサブクローンを得た (第1表) いずれのサブクローンも位相差顕微鏡下で繊維芽細胞様であり、コンフルエント後は、細胞内に oil red O 染色陽性の小脂肪滴を多数有した。長期骨髄培養に認められるような大脂肪滴は、いずれの細胞にも見られなかった。H-1/A 細胞は、コンフルエント後1週間で高度の脂肪細胞への分化を示し (65.9%)、H-1/D 細胞は、ほとんど分化を示さなかった (1.3%)。dbc-AMP 及び caffeine 処理で 3T3-L1 で報告されている¹⁶⁾ ような脂肪細胞への分化の阻害はいずれのサブクローンでも認められなかった。

第1表 H-1/A 細胞のサブクローンにおける脂肪細胞の出現頻度

	無処理 *	dbcAMP及びカフェイン 処 理 **
H-1/A	65.9 ± 3.1	49.9 ± 11.3
H-1/B	4.5 ± 2.0	5.6 ± 2.4
H-1/C	9.6 ± 2.5	1.6 ± 0.5
H-1/D	1.3 ± 0.6	ND

* 脂肪細胞の出現頻度は、コンフルエント後7日で判断した。
脂肪細胞を数え、その割合を示した(詳細は、方法に記載)。
** 脂肪細胞の出現頻度は、0.5mM dbc-AMP及び1mMカフェイン処理後3日で判定した。
ND:施行せず。

2. ギャップ結合を介する連絡

コンフルエント直後、H-1/A 細胞に対し、注入するLucifer Yellow CHの微量注入法により、ギャップ結合を介する連絡の有無を判定した。色素の移動は、隣接する細胞に速やかに認められ、数分以内に蛍光顕微鏡下で最大に達した。色素の漏れに伴ったH-1/A細胞の色素の貪食と色素のギャップ結合を介する移動とは、その色素の取り込みの様子、移動の時間より顕微鏡下で容易に判別可能であった。即ち、ギャップ結合を介する色素の移動は数分以内に生じ、色素は細胞質に均等に分布し、核膜をも通過する。一方、色素の貪食は、細胞質中に顆粒状に取り込まれるのみで色素注入実験を行う1時間余ではその蛍光強度は、注入されギャップ結合を介して移動した色素に比べ極めて軽微である。また、貪食を生じないような10℃以下の条件下でもギャップ結合を介した連絡は室温と同様に認められた。脂肪細胞へ分化する以前の繊維芽細胞様の形態を有するH-1/A細胞、及び、

第2表 脂肪細胞分化前後での H-1/A 細胞の細胞間連絡能の変化

	dish数	注入した細胞数	(%) 隣接細胞への色素移動の割合	移動した細胞の総数の平均
前脂肪細胞	4	71	68.0 ± 4.7 ^a	17.6
脂肪細胞	4	69	5.6 ± 2.3 ^b	0.4

a: 平均±標準
b: 統計的に有意差あり(P<0.01)
微小注入は、H-1/A細胞がコンフルエント直後の状態で行った。
隣接細胞が脂肪細胞の場合は、隣接細胞の総数には、いれなかった。
脂肪細胞の同定は、その細胞質中の脂肪滴の存在で行った。

脂肪細胞に分化した後のH-1/A細胞に色素の注入実験を行った。分化する以前のH-1/A細胞(H-1/A前脂肪細胞)は、隣接する細胞との間にギャップ結合を介する連絡を有していた(68.0%)のに対し、脂肪細胞へ分化したH-1/A細胞(H-1/A脂肪細胞)では、その連絡の明らかな消失を見た(5.6%)(第1図、第2表)。逆にH-1/A前脂肪細胞に注入した色素は前脂肪細胞同士に認められるが脂肪細胞への移動はみられなかった(第1図)。

3. 骨髓間質細胞間ギャップ結合に対する放射線照射の影響

ギャップ結合を介する連絡に対する放射線照射の影響をみるために、コンフルエント直前のH-1/A細胞を200, 500, 1000, 2000 rad照射した。照射後、1日、7日、14日後に色素の移動実験を行ったところ、全ての線量においてまたすべての照射後時間において連絡に影響はなかった(第2図、第3表)。照射線量の上昇にしたが

第3表 H-1/A 細胞に対する 0 rad から 2000 rad 放射線照射に伴ったギャップ結合を介する連絡の変化

放射線量	照射後 1日	照射後 7日	照射後 14日
	%	%	%
0 rad	49.6 (133, 22, 8.8)	27.6 (163, 28, 3.6)	56.3 (151, 25, 10.0)
200 rad	39.3 (122, 20, 4.3)	34.9 (172, 27, 4.1)	44.9 (147, 24, 8.8)
500 rad	35.1 (111, 20, 3.1)	37.2 (145, 23, 4.1)	43.1 (132, 25, 5.7)
1000 rad	51.0 (135, 21, 6.0)	38.3 (162, 32, 3.5)	40.9 (132, 25, 5.7)
2000 rad	38.1 (118, 20, 4.3)	38.3 (111, 20, 3.5)	36.8 (106, 22, 3.1)

ギャップ結合を介する連絡は、隣接する細胞への色素の移動の比率で示した(詳細は、図1の説明を参照)。
()内は、左より注入細胞に隣接する細胞数、注入した細胞数、色素の移動がみられた全細胞数の平均の順で示した。

第4表 H-1/A 細胞の増殖に対する放射線照射の影響

照射量 (rad)	dish 当りの細胞数 (照射後 7日)
	×10 ⁶
0 rad	3.4
200 rad	2.8
500 rad	3.1
1000 rad	2.3
2000 rad	1.4

色素移動法によりギャップ結合を介する連絡の検討を行った(表3)後、各dishよりトリプシン処理により細胞をdishより剥離し、細胞数を数えた。

って細胞数の減少もみている(第4表)。つまり、細胞の増殖に阻害はみられるがギャップ結合を介する連絡には変化がみられないことになる。高線量(5000 rad 及び10000 rad)の照射においては、照射後1日ないし、8日にて蛍光色素の移動を検討したところ、照射に伴った変化はみられなかった(第3図、第5表)。

放射線照射により、H-1/A 細胞は、その形態に大きな変化をみせた。増殖期において H-1/A 細胞は、線維芽細胞様の形態をとるが、1000 rad 照射により、細胞は、扁平化し、豊富な細胞質を持つようになる。脂肪細胞への分化に関しては、照射(0-2000 rad)は大きな影響を与えていなかった。また、Naparstek¹⁷⁾らはin vitroで骨髄間質細胞に対する放射線照射によって増殖因子産生の増加を報告していることから、H-1/A 細胞に対して2000 radを照射し、12時間後に M-CSF 発現の変化

をみたが明らかな増加はなかった。

4. 長期骨髄培養におけるギャップ結合を介する細胞間連絡

C57/B1 並びに C3H/He マウスより、設立した長期骨髄培養にて間質細胞(壁付着細胞)に蛍光色素の注入を行った。以前に報告¹⁶⁾した通り、長期骨髄培養の間質細胞間には、高度に色素の移動が見られた。また、興味深いことに極めて低頻度ではあるが間質細胞と円形の細胞との間にギャップ結合を介した連絡を認めた(第4図)。位相差顕微鏡下での、その大きさならびに細胞形態より、その円形細胞は、血液細胞であり、間質細胞の分裂像とは、考えにくい。このように線維芽細胞様間質細胞と血液細胞との間のギャップ結合は低頻度であるが明らかに認められたが脂肪細胞と血液細胞との間には全く観察されなかった。

5. RNA プロット解析

ギャップ結合を介する連絡の出現消失に伴って、その細胞より産生される液性因子の産生に変化が見られることが知られており¹⁹⁾、H-1/A 細胞も脂肪細胞に分化する過程でコロニー刺激活性が低下することが知られている²⁰⁾。このコロニー刺激活性の低下が発現レベルによるものか分泌レベルによるものかを検索するために、RNA プロット解析を行った(第3図)。H-1/A 細胞より mRNA を分離し、M-CSF cDNA をプローブとして RNA プロット解析を行うと 4.5kb と 2.5 kb に明らかなバンドを認めた(第5a 図)。GM-CSF(第5b 図)、G-CSF、IL-3 に関して RNA プロット解析を行ったが

第5表 H-1/A 細胞に対する 5000 rad から 10000 rad 放射線照射に伴ったギャップ結合を介する連絡の変化

放射線量	照射後 1日	照射後 8日
	%	%
0 rad	59.2 (125, 20, 15.2)	40.6 (212, 33, 6.8)
5000 rad	59.0 (100, 17, 10.4)	40.6 (106, 21, 3.9)
10000 rad	36.0 (125, 21, 5.0)	31.9 (141, 24, 4.4)

照射後1日、8日のH-1/A細胞に対し、色素移動法を施行した。色素の移動の割合は、注入細胞に隣接する細胞への色素の移動の比率(%)で表わした(図1参照)。

()内の数字は、左より注入細胞に隣接する細胞の総数、注入した細胞総数、1回の注入当りの色素の移動がみられた細胞数の平均である。