心血管 Tissue engineering を目指した 再生心筋細胞の開発

福田恵一^{*1)}, 伯野大彦・小西総子・牧野伸司・富田雄一・小川 聡^{*2)}

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

Development of regenerated cardiomyocyte for the cardiovascular tissue engineering

We have isolated a cardiomyogenic cell line (CMG cell) from murine bone marrow stromal cells. Stromal cells were immortalized, treated with 5-azacytidine, and spontaneous beating cells were repeatedly screened for. The cells showed a fibroblast-like morphology, but the morphology changed after 5-azacytidine treatment in approximately 30% of the cells: they connected with adjoining cells after 1 week, formed myotube-like structures and began spontaneous beating after 2 weeks, and beat synchronously after 3 weeks. They expressed ANP and BNP. Electron microscopy revealed a cardiomyocyte-like ultrastructure including typical sarcomeres and atrial granules. These cells had several types of action potentials: sinus node-like and ventricular cell-like action potentials. All cells had a long action potential duration or plateau, a relatively shallow resting membrane potential, and a pacemaker-like late diastolic slow depolarization. Analysis of the isoform of contractile protein genes, such as myosin heavy chain, myosin light chain and α -actin, indicated that their muscle phenotype was similar to fetal ventricular cardiomyocytes. These cells expressed Nkx 2.5/Csx, GATA 4, TEF-1 and MEF-2 C mRNA before 5-azacytidine treatment, and expressed MEF-2 A and MEF-2 D after treatment. This new cell line provides a powerful model for the study of cardiomyocyte differentiation.

Rec. 11/6/2000, Acc. 10/1/2001, pp 639~644

Keiichi Fukuda^{*1)}, Daihiko Hakuno・Fusako Konishi・Shinji Makino・

Yuichi Tomita・Satoshi Ogawa^{*2)}

key words : mesenchymal stem cell, regeneration, differentiation, cardiomyocyte, bone marrow

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。このため心筋梗塞など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が、この代償が破綻すると心不全に陥る。一方、分子生物学の発達に伴い、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が可能となっ

た。骨格筋細胞ではマスター遺伝子である MyoD 遺伝子群がクローニングされ、この一つの遺伝子を強制発現させることにより、線維芽細胞を骨格筋細胞に転換することが可能となった。多くの研究者が心筋細胞の発生学的研究の手段として、あるいは心不全に対する根本治療の確立を目指して心筋細胞株の樹立や心筋細胞特異的転写因子の研究を行ってきた。

しかし、その目的を満足できる心筋細胞株の開発や、MyoD のように単独の遺伝子でほか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

^{*1)} Institute for Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University School of Medicine 慶應義塾大学医学部 心臓病先進治療学講座

^{*2)} Cardiopulmonary Division, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine 同呼吸循環器内科

図 1 心筋細胞の発生学的由来

図 2 成体における幹細胞の分類

い。筆者らはこの常識を覆し、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に転換させる技術の研究開発してきた。筆者らは多分化能を有する骨髓間葉系幹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¹⁾。本稿では骨髓細胞由来の再生心筋細胞の開発の経緯と展望を解説する。

心筋細胞の発生学的由来

心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞の発生学的な由来を図1に示す。受精卵が原腸陥入のあと、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あとに発生してくる。一方、心筋細胞は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あと、胎生期には細胞分裂を行い、生後間もなく終末分化する。骨格筋細胞においては MyoD 遺伝子をはじめ発生分化に関する研究が進み、転写因子のカスケードが明らかとなってきた。心筋細胞においてもいくつかの心筋細胞特異的転写因子の存在が明らかにされてきたが、単独の転写因子のみで心筋細胞の形質が獲得できるような強力なあるいは上流の転写因子は見つかっていない。

骨髓間質細胞の特徴

筆者ら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材料にしなければならないと考え、骨髓間葉系幹細胞を用いた。成体に残存する幹細胞を分類したものを図 2 に示した。骨髓間葉系幹細胞は骨髓間質細胞中に含まれる比較的にまれな細胞で、発生学的には将来血球、血管に分化する blood island (血島細胞) とよばれる細胞群に由来し、中胚葉系の細胞に分化する幹細胞であると考えられる。骨髓間質細胞は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る。骨髓間葉系幹細胞は多分化能をもち、これまで骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などに分化することが知られている²⁻⁵⁾。

CMG 細胞の作成

C3H/He マウス大腿骨より骨髓を摘出し、Dexter 法により初代培養を行った。骨髓間質細胞は付着系の細胞であり浮遊系の骨髓芽細胞、血球系の細胞を除去したあと、3 カ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成し、この多クローンの細胞株に対し、limiting dilution による単一あるいは数クローンによる細胞株を作成し、おのおのクローンに対し DNA 脱メチル化剤 5-azacytidine により分化誘導を行った。分化誘導後およそ 4 週間培養し、数百以上のクローンのな

図 3 CMG 細胞の位相差顕微鏡写真
W は分化誘導後の週数をあらわす。スケールは 100 μ m を示す。

かから自己拍動を行う細胞を含むクローンをスクリーニングした。自己拍動を開始した細胞の周辺をクロ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なかから自己拍動する割合の高いクローンを最終的にCMG細胞株として樹立した。

CMG細胞は凍結融解を繰り返しても表現形は変わらず、分化誘導後自己拍動を開始する比率はおおよそ30%であった。心筋細胞に分化しなかった細胞のうち、多くは主として脂肪細胞に分化したが、それ以外の細胞にも分化可能であった。また、CMG細胞の表面抗原はCD 14⁻、CD 31⁻、CD 34⁻、CD 45⁻、CD 29⁺、CD 44⁺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。

CMG細胞の位相差顕微鏡写真を図3に示した。分化誘導1週目ころより一部の細胞の細胞質が大きくなり円形を呈してくる。一部は棒状を呈し、細長くなった。これらの細胞がのち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この自己拍動を開始した細胞が互いに連結し合い、縦に連結し筋管細胞状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。

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、筋管を形成していく様子が観察された。3週ではこれが完全に連結した細胞が同一のリズムで収縮した。

CMG筋管細胞は分枝によりほかの筋管細胞と接合し、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。電顕的には典型的な

図4 CMG細胞の活動電位
分化誘導後2週から3週にかけては(A)洞結節細胞型の活動電位を呈するが、その後は(B)心室筋型の活動電位の比率がしだいに増加してくる。

横紋構造に加えて、細胞中央部に存在する核、豊富なグリコーゲン顆粒、大型のミトコンドリアが観察された。核周囲には膜に包まれた直径70~130nmのhigh densityの分泌顆粒様の構造物が多数認められた。成獣マウスの心房で観察されるANPの分泌顆粒である心房顆粒は直径が150~200nmであり、CMG細胞で観察される分泌顆粒はそれよりもやや小さい傾向があるが、その電顕的特徴より心房顆粒であると判断した。

CMG細胞の活動電位

ガラス微小電極により記録したCMG細胞の活動電位を図4に示した。活動電位は洞結節細胞型と心室筋細胞型の2種類に大別された。両者に共通した活動電位の特徴は、①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅い静止期電位をもつこと、③ペースメーカー細胞にみられるような静止期電位の緩やかな脱分極が認められることである。また、心室筋細胞型では活動電位はPeak & Dome型を呈した。その後の研究でこれ以外の活動電位も見受けられ、分化誘導初期には洞結節型が多く、時間とともに心室筋細胞型が多くなるこ

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

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

とも明らかとなった。

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るため、心筋細胞特異的蛋白質の発現を観察した。CMG 細胞では ANP, BNP の発現が観察された。転写因子に関しては心筋細胞、CMG 細胞では Csx/Nkx 2.5, GATA-4, TEF-1 遺伝子の発現を認めたが、骨格筋では TEF-1 のみの発現が観察された。CMG 細胞は MEF 2 family のうち MEF 2 A, MEF 2 C, MEF 2 D 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、MEF 2 C は分化誘導前で発現が認められたが、MEF 2 A, MEF 2 D は分化誘導後に発現されることが示された。

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、成長期によって、および心房筋と心室筋の相違によって心筋収縮蛋白のアイソフォームに違いが存在する⁶⁾。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 α -アクチンの場合 Skeletal 型 > Cardiac 型、ミオシン重鎖の場合 β 型 > α 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(表 1)。心筋収縮蛋白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児型心室筋細胞の形質をもつと考えられた。

心臓への細胞移植の現状と課題

心筋梗塞症などにより局所的に心筋が壊死に陥った場合、壊死領域では線維芽細胞の増生により瘢痕領域が形成され、心全体としていわゆるリ

モデリングがなされる。瘢痕領域は収縮に寄与しないばかりかときに心室瘤を形成し心臓の収縮拡張機能を著しく損なう。これに対し壊死領域に細胞移植を行うことにより左室のリモデリングや収縮能の改善を行うのが心筋細胞移植の考えかたである。

これまで動物実験レベルでは心臓に対する細胞移植はさまざまな形で行われてきた。研究の初期の段階ではラットあるいはウサギに心筋梗塞を作製し平滑筋細胞や骨格筋細胞^{7,8)}を移植するというものであった。平滑筋、骨格筋細胞の場合にはもちろん心筋細胞と同期して収縮することはないが、心筋梗塞後の心室リモデリングの改善に有用であった⁹⁾。

心筋細胞移植についてはこれまでに多数の報告がなされているが、心筋細胞の場合初代培養を行ってある程度の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る。これまでに行われた心筋細胞移植では胎仔細胞が用いられてきた¹⁰⁾。胎児心筋細胞の心臓への移植の結果、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、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て電氣的に連結した結合を取りうることで報告された¹¹⁾。さらに胎児心筋細胞の移植により心収縮、拡張能が改善することが報告され、心筋細胞移植の将来的な臨床応用への期待が集まることとなった。

心筋細胞移植の最大の問題点はドナー細胞の確保である。ヒトを対象とした場合には胎児の細胞を用いることは倫理的に不可能である。心筋細胞の再生は現在 ES 細胞および骨髄間葉系幹細胞を材料として分化誘導する方法が試みられている。自己骨髄より骨髄間葉系幹細胞を単離し、*in vivo* で増幅したあとに心筋細胞に誘導できれば移植の

拒絶反応の問題も解決できる。

現在筆者らは、骨髓細胞から心筋細胞に分化した細胞の単離法の開発や細胞移植に関する研究を行っている。CMG細胞は移植後少なくとも3カ月以上レシピエントの心臓に生着し心室筋と接合することを確認している(投稿中)。今後のプラクティカルな問題として移植細胞がホストに長期間安定して生着するか否か、不整脈源とならないか、ヒト骨髓細胞より心筋細胞が作成できるか否かなどがあり、今後解決しなければならない課題と考えている。

おわりに

心筋細胞の再生・新生に関する研究はキーとなる転写因子の解明や分化誘導法の確立などまだまだ新しい分野の研究であり、明らかとなっていない点も多い。ヒトを対象とした移植ということ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髓だけであり、骨髓細胞を用いて心筋細胞が分化誘導でき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) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 103: 697-705, 1999.
- 2) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 276: 71-74, 1997.
- 3) Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J: The monoclonal antibody SH-2 raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin(CD 105). The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD 105). Biochem Biophys Res Commun 265: 134-139, 1999.
- 4) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147, 1999.
- 5) Van den Bos C, Mosca JD, Winkles J, Kerrigan L, Burgess WH, Marshak DR: Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. Hum Cell 10: 45-50, 1997.
- 6) Barton PRJ et al.: Molecular Biology of Cardiovascular Development (Springer) : 79-116, 1995.
- 7) Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD: Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. J Clin Invest 98: 2512-2523 1996.
- 8) Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA: Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? Circulation 94(Suppl) : II 332-II 336, 1996.
- 9) Jia ZQ, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Merante F, Rao V, Li G, Li RK: Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. Transplant Proceed 29: 2093-2095, 1997.
- 10) Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Zhang J, Rao V, Li G, Merante F, Jia ZQ: Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. Circulation 96(Suppl) : II 179-II 186, 1997.
- 11) Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, Sun J, Smart FW, Van Meter CH Jr, Claycomb WC: Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. Cell Transplant 7: 239-246, 1998.