慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice |
| Sub Title | 骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞の純化とマウス心臓への移植 |
| Author | 川口, 治子 |
| Publisher | 慶應医学会 |
| Publication year | 2006 |
| Jtitle | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.7- |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 号外 |
| Genre | Journal Article |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0007 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice

（骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞の純化とマウス心臓への移植）

川　口　　治　子

## 内容の要旨

近年、胚性幹細胞や骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の再生が可能となりつつあり、再生心筋細胞は細胞移植の手段として重要な役割を果たすと考えられる。しかし、現在細胞移植に用いられている細胞は、幹細胞を含む分化した様々な細胞の集団であり、目的以外の細胞が多数含まれている。より安全に心臓に細胞を移植するためには、心筋細胞に分化した細胞を選択的に回収し、移植をせねばならない。

当研究室ではこれまで骨髄中に存在する間葉系幹細胞から心筋細胞に分化誘導し得るCMG（cardiomyogenesis）細胞を樹立した。本研究では、このCMG細胞より心筋細胞を分化誘導し、分化した心筋細胞を効率よく分離し、移植する方法を確立するとともに、分離した細胞が如何なる性状を有するかを解析し、マウス心臓への移植後の組織学的解析を行うことを目的とした。

心室筋細胞特異的な発現をするmyosin light chain-2v（MLC-2v）遺伝子のプロモーターの下流に蛍光色素EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein）遺伝子を繋いだ組み換えプラスミドをCMG細胞に遺伝子導入し、マーキングしたCMG-EGFP細胞を作製した。このCMG-EGFP細胞を分化誘導すると、心筋細胞に分化した細胞のみ緑色の蛍光を発し、細胞特異的標識が可能となった。さらにFACS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。回収したCMG-EGFP細胞を３週間継続培養したところ、自律拍動を呈した。FACSにより回収したCMG-EGFP細胞はα-skeletal actin、β-myosin heavy chain、MLC-2v、CaV1.2などの心筋特異的遺伝子を発現することがわかった。活動電位を記録すると、心室筋様であった。また回収したCMG-EGFP細胞へのBrdUの取り込みを調べると、培養７日目で取り込みが停止し、その後全くBrdUは取り込まれなかった。このことから移植後、cardiosarcomaに変異する危険性はなく、移植に適した細胞であることがわかった。そこで、このCMG-EGFP細胞を成獣マウスの左室自由壁に注射針を用いて細胞移植したところ、レシピエントの心筋細胞の細胞間隙に移植され、周囲の細胞とGAP結合を介して結合していることが明らかになった。また、これらの細胞は長期間レシピエントの心臓に生着することも示された。

本研究は、成獣および成人の骨髄から単離、かつ分化させた再生心筋細胞が、胎児心筋細胞の代替細胞として、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たものである。今後の心臓疾患の治療ための有効なモデルであると考えられる。

## 論文審査の要旨

近年、再生医療の発展により骨髄幹細胞や胚性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が可能となり、虚血性疾患の細胞移植治療への臨床応用が行われ始めている。しかし、移植に用いる細胞は心臓以外の様々な組織へと分化する細胞が混在したものが多い。本研究では、骨髄中に存在する間葉系幹細胞から分化誘導した再生心筋細胞であるCMG（cardiomyogenesis）細胞を純化する方法を開発し、心臓への移植を行った。心筋細胞特異的蛋白質であるMLC-2vのプロモーター領域に蛍光蛋白であるEGFP遺伝子をつないだpMLC-2v-EGFPを作製し、CMG細胞のマーキングを行った。ソーティングにより心筋細胞にのみ分化するCMG-EGFP細胞を純化することに成功した。回収したCMG-EGFP細胞は心室筋特異的遺伝子の発現、心室筋特異的転写因子の発現、connexin 43の発現、活動電位等から胎児心室筋様の性質を持つことが明らかとなった。さらにCMG-EGFP細胞を成獣マウスの心臓へ移植し、４週間後に心臓を摘出し、組織学的解析を行ったところ、レシピエントの心筋細胞とgap junctionを介して結合し、長期間生着することが示された。

論文審査においては、pMLC-2v-EGFPシステムにより純化して得られたCMG-EGFP細胞を分化のどの段階で移植に用いるのが適切か、移植後に起こりうる不整脈の危険性に関しての考察が論点となった。本研究では純化して得られたCMG-EGFP細胞を５日間培養したものを用いたが、分化早期の細胞を移植すると不整脈を起こしうる危険性があるとの指摘を受けた。また、CMG-EGFP細胞の分化に伴う各種イオンチャネルの発現についての検討が不十分であれば不整脈の発症頻度が増加するという問題提起もなされた。分化早期のCMG-EGFP細胞ではL-type $Ca^{2+}$チャネルが発現していると回答された。$K^{+}$チャネルの発現が不十分であると不整脈が発症しやすくなるので、移植に用いるCMG-EGFP細胞がどの分化段階に達したときに移植すべきか、詳細な検討が必要であると指摘された。また、gap junctionの指標であるconnexin 43の発現パターンを移植後、時間経過に応じて調べておく必要があることも指摘された。本研究では、移植後４週目に関して、レシピエントの細胞とCMG-EGFP細胞がgap junctionを介して結合することを示した。しかし、細胞の分化に伴い、gap junctionの発現部位が細胞周囲全体から細胞の両端へと移動をすることから、移植後早期からconnexin 43の発現パターンを検討する必要があると指摘された。また、シート工学との比較についても質問されたが、治療法としてはどちらの方法も有効であると考えられるが、細胞移植の方がカテーテルなどを利用でき手技的に簡便であると回答された。さらに、将来的に、純化して得られたCMG細胞を臨床応用するためにはどのようなプロセスが必要か質問されたが、移植後、年単位での経過観察を行うこと、また移植に用いる細胞のin vitroでの大量培養システムの確立、ブタなどの中型動物を用いた移植実験の実施等が必要であると回答された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞を純化する方法の開発と成体への移植適応を示したという点で有意義であり、今後の発展が期待されると評価された。

論文審査担当者　主査　医化学　末松　誠
内科学　小川　聡　　外科学　四津　良平
発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：
審査委員長：小川　聡

試問日：平成17年12月 5日