

Title	Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells) Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors.
Sub Title	骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞 (CMG細胞) におけるアドレナリン・ムスカリン受容体の発現および機能解析
Author	伯野, 大彦(Hakuno, Daihiko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.1 (2003. 3) ,p.11-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030304-0011

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.

Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells)

Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors.

(骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞 (CMG細胞) における
アドレナリン・ムスカリン受容体の発現および機能解析)

伯 野 大 彦

内容の要旨

近年、多能性幹細胞の心筋細胞への分化能が明らかとなり、再生心筋細胞移植が心不全の新たな治療法として模索されている。当教室の牧野らはDNAの脱メチル化剤5-azacytidineを用いて、マウス骨髄間葉系幹細胞 (CMG細胞) を胎仔心室筋型の表現形を有する心筋細胞に分化誘導しうることが報告した。生体心では、細胞肥大、心拍数、心収縮力の調節に際してアドレナリン α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})、 β_1 、 β_2 受容体、ムスカリン M_1 、 M_2 受容体が重要な役割を果たしている。本研究では分化誘導後のCMG細胞におけるこれらの受容体の経時的発現、シグナル伝達機能、各薬剤に対する細胞応答につき検討した。[方法] (1) 5-azacytidineによる分化誘導前後の各受容体の発現をRT-PCR法にて解析した。(2) 分化後2週におけるphenylephrine (Phe) 刺激およびprazosin前投与によるERK1/2のリン酸化をWestern blot法で観察した。Phe刺激後の細胞面積、周囲長を測定した。(3) isoproterenol (Iso) 刺激およびpropranolol (Pro) 前投与による細胞内cAMP含量をradioimmunoassayにて測定した。Iso刺激時、およびPro、CGP20712A (β_1 選択的遮断薬)、ICI118551 (β_2 選択的遮断薬) 前投与時の自律拍動数、収縮距離、収縮率、収縮速度を解析した。(4) Phe、Iso刺激によるANP、BNPのmRNA発現を観察した。(5) carbachol刺激時、およびatropine、AFDX116 (M_2 選択的遮断薬) 前投与時の細胞内IP₃生成量を測定した。

[結果と考察] (1) CMG細胞は α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} mRNAを分化前より発現したのに対し、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 mRNAを分化後1週より発現した。(2) Phe刺激後に濃度依存的なERKのリン酸化を認めprazosin前投与で抑制された。Phe刺激によりCMG細胞は有意に肥大した。(3) Iso刺激後のcAMP含量は著明に増加しPro前投与で抑制された。Iso刺激による拍動数の増加は、Pro、CGP20712A前投与で著明に抑制されたが、ICI118551による抑制は軽度であった。収縮能はIso刺激により有意に増強した。(4) Phe、Iso刺激後ANP、BNPのmRNA発現は有意に亢進した。(5) carbachol刺激後のIP₃生成量は著明に増加し、atropine、AFDX116の前投与で同程度抑制された。

以上より、分化後のCMG細胞はシグナル伝達機能を有する α_1 、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 受容体を発現し、それらは細胞肥大、陽性変時・変力作用に一部関与するものと考えられた。CMG細胞は受容体発現の観点から、心筋細胞移植のドナー細胞として有力な候補となる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

当教室はこれまでマウス骨髄間葉系幹細胞を5-azacytidine処理により胎仔心室筋型的心筋細胞 (CMG細胞) に分化誘導しうることが明らかにした。本研究では、CMG細胞におけるアドレナリンおよびムスカリン受容体の発現、シグナル伝達機能、刺激時の細胞機能について解析を行った。CMG細胞は α_1 受容体を分化誘導前より発現し、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 受容体を分化後1週より発現した。Phenylephrine刺激により濃度依存的なERK1/2のリン酸化、有意な細胞肥大を認めた。Isoproterenol刺激後にcAMP量、自律拍動数、収縮能は有意に増加した。拍動数の増加は主に非特異的あるいは β_1 選択的遮断薬で抑制された。Carbachol刺激後にIP₃量は著明に増加し、非特異的あるいは M_2 選択的遮断薬で抑制された。以上より、分化誘導後のCMG細胞は、成熟心筋細胞と同様にシグナル伝達機能を有する α_1 、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 受容体を発現し、 α_1 刺激薬による細胞肥大や β 刺激薬による陽性変時・変力作用に関与するものと考えられた。

審査では、まず5-azacytidineによる分化誘導効率を20~30%とした根拠が不明瞭であるとの指摘がなされた。次に、個々のCMG細胞における各受容体発現の有無に関して質問がなされた。CMG細胞を含む集団全体として解析しており個々の細胞での発現は検討していないと回答された。これに対し各細胞について免疫染色などで発現を検討すべきであったと指摘された。ついで、PhenylephrineによるERK活性化の経路について質問がなされた。新生仔心筋細胞と同様にRas/Raf-1を介した経路が考えられると回答され、これに対しそれらの経路も解析すべきであったと助言された。IsoproterenolによるcAMP増加の機序は心筋細胞数の増加か、あるいは心筋細胞の成熟度の昇降かとの質問がなされた。その区別は困難であると回答され、これに対し心筋前駆細胞を純化する必要性を指摘された。さらに、Isoproterenol刺激時の細胞機能解析は細胞移植を考慮する場合に重要であるとした上で、ムスカリン受容体の徐脈作用に関して質問がなされた。低濃度のCarbachol刺激では徐脈傾向を認めたが高濃度では頻脈となり、 M_1 、 M_2 サブタイプの比率がその原因として考えられると回答された。最後に再生心筋細胞移植の今後の展望に関して議論がなされ、再生心筋細胞の純化および移植方法の確立、催不整脈性の検討などが重要であると討議された。

以上、本研究は研究方法などに今後検討されるべき課題があるものの、マウス骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞におけるアドレナリン、ムスカリン受容体の機能的発現および細胞応答につき明らかにし、心筋細胞移植のドナー細胞としての可能性を示した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡

外科学 四津 良平 生理学 岡野 栄之

発生・分化生物学 須田 年生 薬理学 西本 征央

学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成14年11月22日