

血管内皮前駆細胞は主として細胞融合することなく ニッチ依存性に心筋細胞へ分化する

村澤 聡 川本 篤彦 浅原 孝之

要 旨：われわれは、微小環境下(ニッチ)における血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)の分化様式を調べるため、ヒトEPCとラット心筋芽細胞株(H9C2)の共培養の系、および免疫不全ラット心筋梗塞モデルにヒトEPCを移植した系を確立した。ヒト特異的心筋マーカーを用いてEPCの発現様式を評価した結果、EPCが内皮細胞のみならず心筋細胞へ分化することが証明された。さらに共培養の系において、EPCの心筋への分化がcell fusion(細胞融合)ではなく大部分がtransdifferentiation(分化転換)によるものであることが確認された。

(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 371-375)

Key words: transdifferentiation, regeneration, endothelial progenitor cell, cardiomyogenesis, cell fusion

序 言

ヒト末梢血中に血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)の存在が示されて以来¹⁾、成体内で虚血や創傷が生じた際、骨髓からEPCが末梢血中に動員され、病変部位に集積し血管内皮に分化することにより血管修復に貢献することが明らかになってきた²⁾。この機序(vasculogenesis)を利用したEPCによる血管再生療法が注目を浴びている。さらにこのEPCが内皮細胞のみならず、心筋虚血等の微小環境下(ニッチ)において心筋細胞や平滑筋細胞にも分化し得る可能性が示唆され、この細胞を用いた移植療法に新たな展開が期待されている。本稿では、EPCの微小環境下における心筋細胞への分化様式について基礎検討を行った内容を報告する。

対象と方法

微小環境下におけるEPCの分化様式を調べるため、*in vitro*の系としてヒト末梢血由来EPCとラット心筋芽細胞株(H9C2)の共培養を確立し、*in vivo*の系として免疫不全ヌードラット心筋梗塞モデルにヒト末梢血由来

EPCを移植し、それぞれヒト特異的心筋マーカーを用いてEPCの発現様式を評価した。また、EPCの心筋細胞への分化にcell fusion(細胞融合)が関与するかどうかについて、*in vitro*の共培養の系を用いて検討を行った。

(1) ヒト末梢血由来EPCの抽出および培養

健康人の末梢血を200ml採取し、HISTOPAQUE(SIGMA社)による遠心濃度勾配法を用いて、単核球分画を抽出した。この分画をヒトフィブロネクチンで表面処理した培養シャーレ上に播種し1週間後、接着増殖した紡錘状細胞をEPCとして以下の実験を行った。

(2) ヒト末梢血由来EPCとラット心筋芽細胞株(H9C2)の共培養

上記にて得られた培養1週間後のEPCと、ラット心筋芽細胞株を1:3の割合で共培養し、共培養してから1週間後にcell fusion、および心筋細胞へのEPCの分化効率について検討を行った。

(3) 免疫不全ヌードラット心筋梗塞モデルへのヒト末梢血由来EPC移植実験

免疫不全ヌードラット心筋梗塞モデルを作成後、培

先端医療センター血管再生研究グループ

独立行政法人 理化学研究所 幹細胞医療応用研究チーム

2004年12月22日受付 2005年5月24日受理

養 1 週間後のEPCをラット尾静脈から 10^6 個移植し、1カ月後に心臓を取り出し、凍結切片を作成後、免疫組織染色にてEPCの心筋への分化について検討した。

結 果

(1) ヒト末梢血由来EPCとラット心筋芽細胞株 (H9C2) の共培養 *in vitro*]

1. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

われわれは、ヒト特異的心筋マーカーとして、cTn-T, MLC-2V, および α -MHCを作成し、共培養のサンプルから調整したRNAを用いてRT-PCRを行った。ヒト心筋由来のサンプルでは、いずれのマーカーも強陽性を示したが、共培養前のヒト由来EPC単独のサンプルおよびラット由来H9C2単独のサンプルでは、いずれのマーカーの発現も認められなかった。共培養後のサンプルで検討したところ、すべてのヒト特異的心筋マーカーの発現を認めた (Fig. 1)。

2. 蛍光免疫細胞染色

共培養後 1 週間で、細胞を固定しヒト特異的心筋抗体 α/β -MHCで染色したところ、共培養細胞中に陽性細胞を検出した (Fig. 2)。ヒト心筋抗体陽性細胞の割合はヒト特異的心筋抗体 (α/β -MHC) による蛍光免疫細胞染色より計測し、その割合は播種したEPCの数に対して約0.5%であった。

3. 細胞融合の検討

Qtracker™ (Quantum Dot社) による細胞染色システムを用いてEPCを赤色、H9C2を緑色に染色後、共培養を行い cell fusionの有無を検討した (Fig. 3)。本研究に用いた染色試薬は、細胞毒性が少なく長時間の染色が可能なおうえ、従来の染色システムにみられた周辺細胞への色素のもれ込みを最小限に抑える特徴を持つ。蛍光顕微鏡で観察した結果、cell fusionの割合は全体の約0.03%であった。

(2) ノードラット心筋梗塞モデルへのEPC移植 *in vivo*]

1. RT-PCR

ノードラット心筋梗塞モデルへのEPC移植後、1カ月経過した時点で心臓を取り出し、RNAを抽出後、*in vitro* で用いたヒト特異的心筋プライマーを用いて検討した。心筋梗塞モデルにPBS (phosphate buffered saline: リン酸緩衝食塩水) を投与した心臓から抽出したRNAによるRT-PCRではヒト心筋関連遺伝子発現は認められ

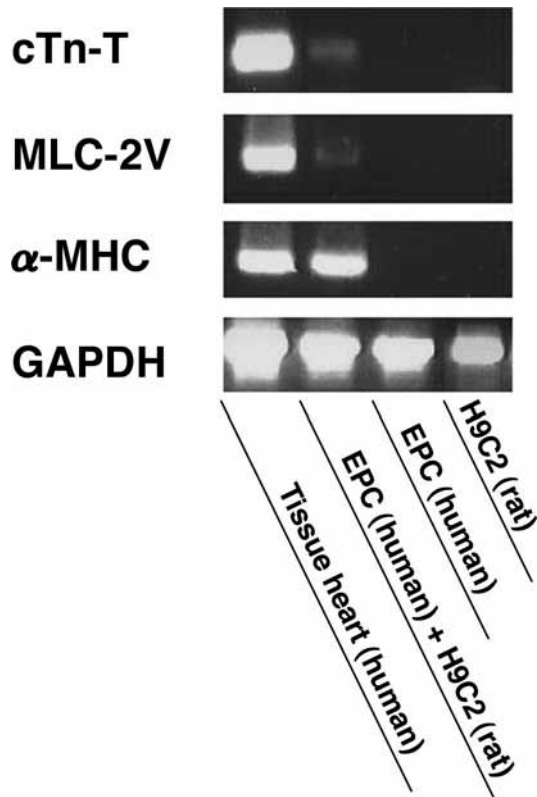


Figure 1 Expression of human specific cardiac markers in co-culture system by RT-PCR.

RNA samples from various culture conditions were analyzed by RT-PCR. cTn-T, MLC-2V, α -MHC are specific markers for cardiomyocyte. Left lane shows positive control, and right lane shows negative control (only rat derived H9C2). Human EPC didn't express cardiac markers. After co-culture with human EPC and rat H9C2, human specific cardiac markers were observed. GAPDH served as internal standard. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

なかったが、EPC投与群では、ヒト心筋関連遺伝子発現を認めた (Fig. 4)。

2. 免疫組織染色

ノードラット心筋梗塞モデルへのEPC移植後、1カ月経過した時点で心臓を取り出し、凍結組織を用いて免疫組織切片を作成した。心筋抗体はBNP (B-type natriuretic peptide) を用いた。心筋梗塞部位と正常組織の境界部位に心筋抗体に陽性の細胞を認めた (Fig. 5)。

考 察

これまでにわれわれのグループあるいは他の研究室は、体外培養したEPC移植の心筋虚血への有用性を報

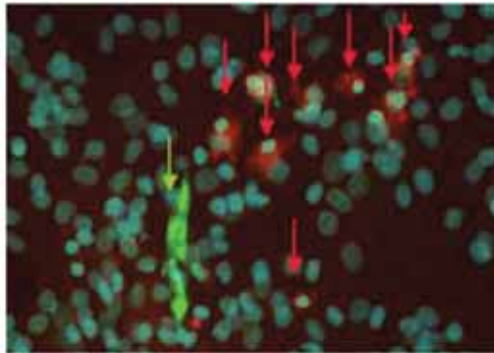


Figure 2 Expression of cardiac, endothelial lineage markers in co-culture system by cytoimmunochemistry. After fixation of co-culture cells (human EPC and rat H9C2), these cells were stained with human specific cardiac antibody (α/β -ventricular MHC) and endothelial antibody (CD31). This photo represents the staining with human specific cardiac antibody (α/β -ventricular MHC) (Green arrow) and human specific endothelial lineage antibody (CD31) (Red arrows). Blue shows DAPI. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

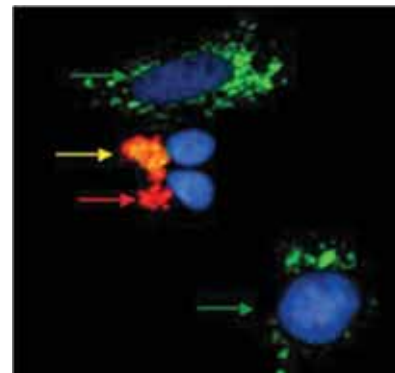


Figure 3 Frequency evaluation of cell fusion in co-culture system. We performed co-culture using Qtracker (Quantum Dot Corp., Hayward, CA, USA) which is nanocrystals labeling markers incorporated in the vesicles of the cytoplasm. EPCs were labeled with the Qtracker™ 565 (Red arrow) and H9C2 cells were labeled with Qtracker™ 655 (Green arrows). Cell fusion was observed in the EPC attached to H9C2 (Yellow arrow).

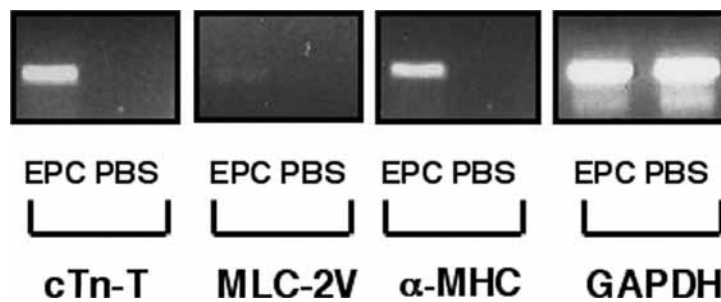


Figure 4 Expression of human specific cardiac markers in EPC injected rat heart by RT-PCR. RNA samples were obtained from ischemic nude rat heart injected with human EPC or PBS. RT-PCR was performed to determine the expression of cardiac (cTn-T, MLC-2V, α -MHC) markers in these tissue samples. Left lane shows the data from EPC injected heart sample. Right lane shows the data from PBS injected heart sample. GAPDH served as internal standard.

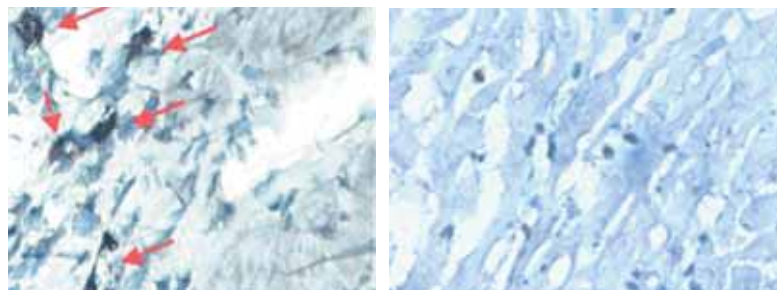


Figure 5 Expression of human specific cardiac marker in EPC injected rat heart by immunohistochemistry. After fixation of ischemic nude rat heart injected with human EPCs or PBS, samples were stained with human specific cardiac antibody (BNP: B-type natriuretic peptide). Left photo shows rat heart with human EPCs, and right shows rat heart with PBS. The right photo shows negative control for BNP. Nuclei were stained by Hematoxylin staining.

告してきた^{3,4)}。これらの報告では、EPCが血管内皮細胞に分化することにより、虚血部位における微小循環が改善され心機能を改善することが示された。しかし、最近体性幹細胞あるいは前駆細胞の多分化能力が示唆されるようになり^{5,6)}、EPCについても、心機能改善が従来の血管発生(vasculogenesis)のメカニズムのみならず、心筋再生(cardiomyogenesis)のメカニズムによっても制御されている可能性を考慮し、心筋再生への微小環境の関与を明らかにするため、共培養の確立、あるいは心筋梗塞モデルへのEPC移植の系を用いて、EPCの心筋への分化様式について検討を行った。心筋関連遺伝子発現や、免疫染色による蛋白レベルでの心筋マーカーの発現を*in vitro*、*in vivo*両方の系で確認したところ、いずれもEPCが心筋再生に関与する結果が得られた。しかし、いずれの系においても、心筋細胞への分化の割合は約0.5%であり、今後、心筋再生の機序を応用した臨床治療のためには、この割合を増やすための検討が必要であると考えられた。

また、科学的探求として、今回の心筋細胞への分化にcell fusionがどの程度関わっているかを明らかにするため、共培養の系を用いて検討を行った。ここ数年、細胞の異なった系統間での分化様式(trans-lineage differentiation)について、種々の報告がなされているが、依然そのメカニズムについては解明されていない。最近になって複数のグループがES細胞(embryonic stem cell: 胚幹細胞)と骨髄由来細胞のcell fusion⁷⁾、あるいはES細胞と脳由来細胞のcell fusionの現象⁸⁾を相次いで報告した。このcell fusionの割合は、非常に少ないと報告するグループもあれば、Lagasseらのように、30~50%のような高率で認めるとするグループもあり⁹⁾、一定した見解が得られていないのが現状である。われわれの共培養の系においても、QtrackerTMにてこれまでより優れた細胞染色システムを用いて検討を行ったが、cell fusionの割合は約0.03%と、非常に少ないものであった。このデータは、Badorffらの検討に比較的近いものであった⁶⁾。ただし、今回の系においてcell fusionしていない細胞が心筋に分化したことを組織学的に直接証明することは困難であり、cell fusionの検討の結果から間接的に導き出された結果であったため今後より正確な心筋分化に関する*in vitro*の系が必要となると同時に、*in vivo*

の系においてもcell fusionに関する検討が必要と思われる。

結 論

今回の検討より、心筋虚血において、EPCが血管系への分化のみならず心筋細胞へ分化する可能性が示された。このメカニズムには、おもにcell fusionではなくtransdifferentiationが関与していた。心筋再生のメカニズムを臨床に応用するためには、今後EPCの心筋への分化の割合をいかに高めていくかの検討を行う必要がある。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964–967.
- 2) Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 3422–3427.
- 3) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, 103: 634–637.
- 4) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, 7: 430–436.
- 5) Galli R, Borello U, Gritti A et al: Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 986–991.
- 6) Badorff C, Brandes RP, Popp R et al: Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 2003, 107: 1024–1032.
- 7) Terada N, Hamazaki T, Oka M et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002, 416: 542–545.
- 8) Ying QL, Nichols J, Evans EP et al: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, 416: 545–548.
- 9) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med*, 2000, 6: 1229–1234.

Transdifferentiation, not Cell Fusion, Contributes to Niche-dependent Endothelial Progenitor Cells Commitment into Myocardial Lineage Cells

Satoshi Murasawa, Atsuhiko Kawamoto, and Takayuki Asahara

Group of Vascular Regeneration Research, Institute of Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan
Stem Cell Translational Research, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan

Key words: transdifferentiation, regeneration, endothelial progenitor cell, cardiomyogenesis, cell fusion

Ex vivo expanded EPCs transplantation has shown therapeutic potential for myocardial ischemia. To evaluate niche-dependent expression profiles of EPCs *in vitro*, we performed co-culture using cultured EPCs derived from human peripheral blood and rat cardiac myoblast cell line. To prove this trans-lineage differentiation *in vivo*, human cultured EPCs were injected into the heart muscle of nude rat myocardial infarction model. Both co-cultured samples *in vitro* and myocardial samples *in vivo* disclosed the expression of human specific cardiac markers. Transdifferentiation, not cell fusion, mainly occurred in our co-culture system. These data indicated that EPCs might contribute to not only vasculogenesis but also myogenesis in the ischemic myocardium. (J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 371–375)