

マウス骨髄間質細胞は生理機能を有する平滑筋細胞に分化する

橋本 良太¹ 加藤 洋一² 伊藤 誠悟³ 代田 浩之⁴ 中里 祐二² 岡田 隆夫¹

要 旨：骨髄間質細胞は、平滑筋細胞に特異的なタンパク質を発現する平滑筋様細胞に分化することが報告されている。この骨髄由来平滑筋様細胞では、L型およびT型Ca²⁺チャネル電流が認められ、アゴニスト刺激に応じて、細胞内Ca²⁺濃度のCa²⁺トランジェント様上昇並びに収縮応答が認められた。以上より骨髄間質細胞が、電気および細胞生理学的に通常の平滑筋細胞と同様の生理機能を有する平滑筋細胞に分化することが示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 299-306)

Key words: bone marrow stromal cells, smooth muscle cells, differentiation

はじめに

すべての臓器再生に必要とされる血管の再生は、再生医療のうちで最も注目されているテーマのひとつである。しかし平滑筋細胞再生に関する研究は近年盛んになってきたとはいえ、血管内皮細胞再生と比べて遅れをとっている。われわれは平滑筋細胞に特異的に発現するSM22 α 遺伝子のcis-elementとGFPをリポーターとして、骨髄間質細胞より平滑筋前駆細胞を分離し、さらに平滑筋様細胞への分化誘導に成功した¹⁾。骨髄由来平滑筋様細胞は、タンパク質の発現レベルではネイティブの平滑筋細胞に似たphenotypeを示したが²⁻⁵⁾、その生理機能は明らかではなかった。本研究の目的は、骨髄間質細胞から分化し生化学的に同定された平滑筋様細胞が、平滑筋細胞としての最も重要な機能のひとつである収縮応答能、およびその他の生理学的特徴を有しているかどうかを検討することである。

方 法

(1)細胞培養

オスのC57Bl/6マウス的大腿骨から骨髄間質細胞を単

離し、10% fetal bovine serum(FBS, Equitech Bio社)を含むDMEM培地(Invitrogen社)中、5% CO₂, 37℃で4週間培養した。培養1週目または4週目に、SM22 α -GFPコンストラクトを以前報告したようにトランスフェクションした(Fig. 1Aa)¹⁾。

(2)免疫細胞化学染色

カバーガラス上に接着させた細胞を4% paraformaldehyde溶液で固定、0.5% Triton-X100溶液で浸透化、10%FBSでブロッキング後、Cy3結合マウスモノクローナル抗 α -SM actin抗体(Sigma-Aldrich社、希釈率は1:100)で反応させた。マウスモノクローナル抗calponin抗体(Sigma-Aldrich社、希釈率は1:400)、またはマウスモノクローナル抗SM-MHC抗体(Santa Cruz Biotechnology社、希釈率は1:100)で反応させた後、さらにRhodamine 結合ヤギ抗マウスIgG抗体(Santa Cruz Biotechnology社、希釈率は1:200)で処理した。Phosphate buffered saline (PBS)で洗浄、退色防止溶液(Vector社)で処理後、蛍光顕微鏡下で観察した。

(3)膜電流記録

膜電流はホールセルクランプ型のパッチクランプ法を用い、AXOPATCH 200A(Axon社)を使って記録した。pClampソフトウェア(Axon社)を用いて、データを解析し

¹⁾順天堂大学医学部生理学第二講座

²⁾順天堂大学医学部附属浦安病院循環器内科

³⁾順天堂大学医学部附属静岡病院循環器科

⁴⁾順天堂大学医学部循環器内科学

2008年3月3日受付 2008年8月13日受理

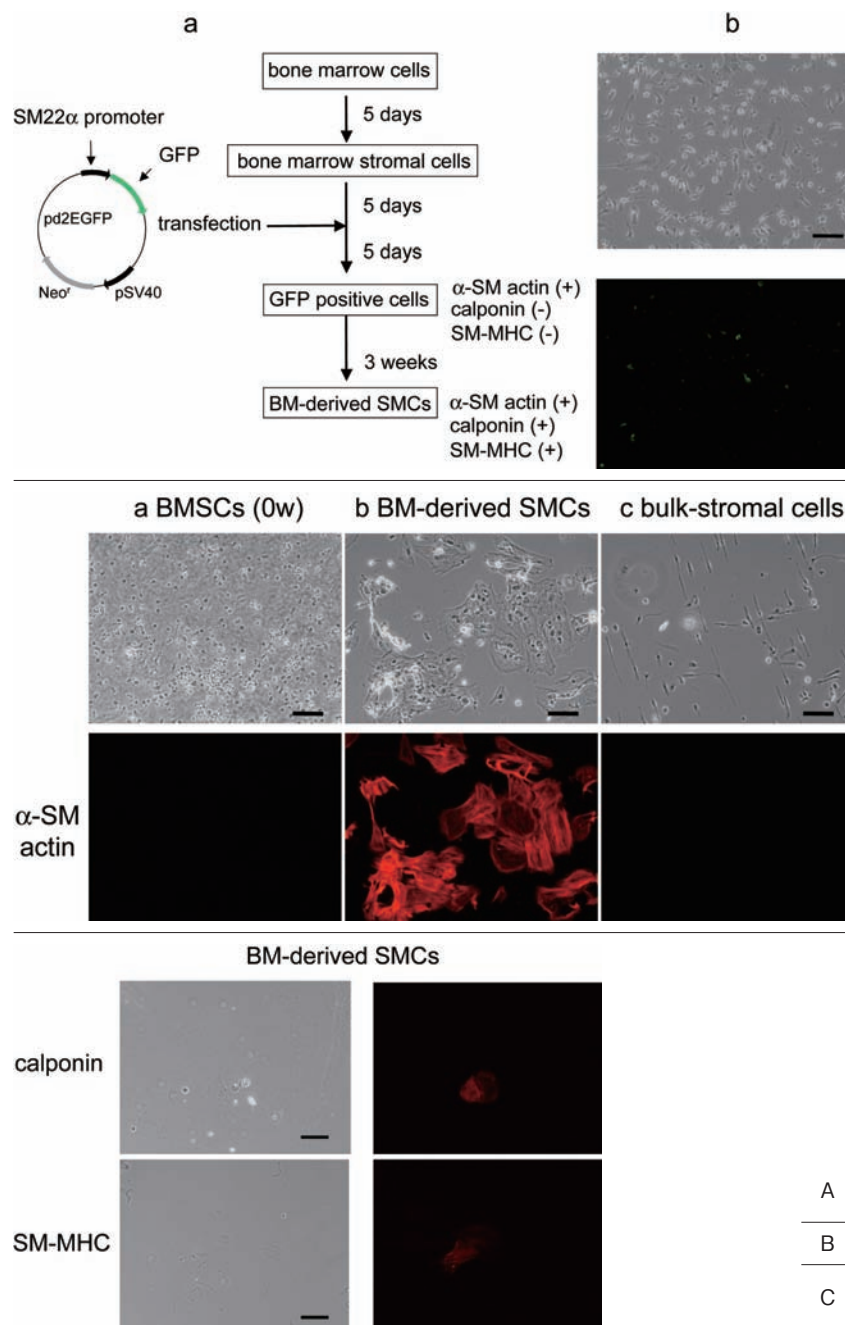


Figure 1

A: Schema of the protocols for acquiring a cell population committed to the SMC lineage among bone marrow stromal cells. Briefly, bone marrow stromal cells that appeared 5 days after the seeding of bone marrow cells were transfected with a human SM22 α promoter/GFP construct. GFP expression was detectable 5 days after the transfection in about 2% of bone marrow stromal cells (panel b). Bar indicates 100 μ m.

B: BM-derived SMCs express α -SM actin. BMSCs (bone marrow stromal cells at 0w, panel a) are not stained by anti- α -SM actin antibody. BM-derived SMCs (4w, panel b) are stained by anti- α -SM actin antibody. Bulk-stromal cells (4w, panel c) are not stained by anti- α -SM actin antibody. Bars are 100 μ m.

C: BM-derived SMCs express calponin and SM-MHC. Bars indicate 100 μ m.

た。ソーダライムガラス(Chase社)を2度引きし、パッチピペットとして用いた。電気抵抗はピペット内液で満たされたとき、2~4 M Ω であった。電流は、1kHzでフィルタリングし 5kHzでサンプリングした。-80mVを保持電位として、+10mVずつ脱分極ステップパルス500ミリ秒、+80mVまで与えた。Ca²⁺電流は、Cs tyrode(CsT)溶液または高Ca²⁺溶液存在下で記録した。CsT溶液の組成は(mM) : 135 NaCl, 5.4 CsCl, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 5 HEPESおよび10 glucoseであり、pHはNaOHで7.4に調整した。高Ca²⁺溶液の組成は(mM) : 135 NaCl, 5.4 CsCl, 3.6 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 5 HEPESおよび10 glucoseであり、pHはNaOHで7.4に調整した。Ca²⁺電流記録用のピペット内液の組成は(mM) : 125 CsCl, 1.0 MgCl₂, 5 HEPES, 3 Mg-ATPおよび5 Cs-BAPTAであり、pHはCsOHで7.3に調整した。K⁺電流は、normal tyrode(NT)溶液または無Ca²⁺溶液存在下で記録した。NT溶液の組成は(mM) : 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 5 HEPESおよび10 glucoseであり、pHはNaOHで7.4に調整した。無Ca²⁺溶液の組成は(mM) : 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.0 MgCl₂, 5 HEPESおよび10 glucoseであり、pHはNaOHで7.4に調整した。またK⁺電流記録用のピペット内液の組成は(mM) : 140 KCl, 1.0 MgCl₂, 10 HEPES, 5 Mg-ATPおよび10 EGTAであり、pHはKOHで7.3に調整した。

(4)細胞内Ca²⁺濃度の測定

ガラス底培養皿に接着させた細胞を3 μ M fura-2 acetoxymetylester(AM)で30分間、暗室で処理した。Fura-2 AMを取り込ませた細胞をNT溶液で3回洗浄した後、NT溶液で30分間、5% CO₂, 37°C, 暗室で処理した。AquaCosmos 2.0(浜松ホトニクス株式会社)を用いて、データを取得および解析した。200 μ LのNT溶液を含む培養皿に33 μ L/secで溶液を灌流した。データ取得開始後30~60秒の間は平滑筋細胞アゴニストを含む溶液を、それ以外はNT溶液を灌流した。アゴニストとして100 nM angiotensin II(Ang II), 1 μ M bradykininまたは60 mM KClを用いた。

(5)収縮応答の測定

ガラス底培養皿に接着させた細胞をPBSで洗浄後、NT溶液で30分間処理した。平滑筋細胞アゴニスト処理後45分間、5分間隔で細胞の形態を撮影した。アゴニストとして100 nM Ang II, 1 μ M bradykininまたは60 mM

KClを用いた。

結 果

(1)平滑筋細胞マーカーの発現

マウス大腿骨より単離し1週間培養した骨髄間質細胞に対してSM22 α -GFPコンストラクトをトランスフェクションしたところ(Fig. 1Aa), 約2%の細胞がGFP陽性を示した(Fig. 1Ab)。次に4週間培養した骨髄間質細胞について、平滑筋細胞マーカー α -SM actinの発現を免疫細胞化学染色法で調べた。培養初期の骨髄間質細胞(Fig. 1Ba)は α -SM actin陰性であったが、4週間培養した骨髄間質細胞のうち約2%は、形態学的に平滑筋細胞に似ており、そのほとんど(95%以上)が α -SM actin陽性であった(Fig. 1Bb)。この形態学的に平滑筋細胞に似た細胞は、他の平滑筋細胞マーカーであるcalponin, SM-MHCも発現していた(Fig. 1C)。4週間培養した骨髄間質細胞のうち、形態学的に平滑筋細胞に似た細胞を骨髄由来平滑筋様細胞(BM-derived SMCs, Fig. 1Bb), その他の細胞をバルク骨髄間質細胞(bulk-stromal cells, Fig. 1Bc)と定義して生理機能を検討した。

(2)イオンチャネル電流

骨髄由来平滑筋様細胞で認められるイオンチャネル電流をホールセルパッチクランプ法で測定した。電流記録をFig. 2Aに、電流・電圧関係をFig. 2Bに示す。骨髄由来平滑筋様細胞(n = 12)では、約60%の細胞において高電位活性化内向きイオンチャネル電流が認められ(Fig. 2Aa, 2Ba), 残りの約40%において低電位活性化内向きイオンチャネル電流が認められた(Fig. 2Ab, 2Bb)。高電位および低電位活性化内向きイオンチャネル電流は、CsT溶液から高Ca²⁺溶液への灌流溶液の変更により電流値が増加したことから、それぞれL型Ca²⁺チャネル電流(Fig. 2Aa, 2Ba), T型Ca²⁺チャネル電流(Fig. 2Ab, 2Bb)であることが示された。さらにマウス線維芽細胞株3T3-L1細胞においてL型Ca²⁺チャネル電流はほとんど認められなかったが(Fig. 2Ca), 単離後3世代以内のラット大動脈由来平滑筋細胞においてL型Ca²⁺チャネル電流が認められた(Fig. 2Cb)。骨髄由来平滑筋様細胞の電流値は大動脈由来平滑筋細胞と同程度であり(Fig. 2Ba, 2Cb), 骨髄由来平滑筋様細胞の約60%で認められるL型Ca²⁺チャネル電流コンダクタンスの特徴は、線維芽細胞ではなく平滑筋細胞の性質に似ていることが示唆された。一

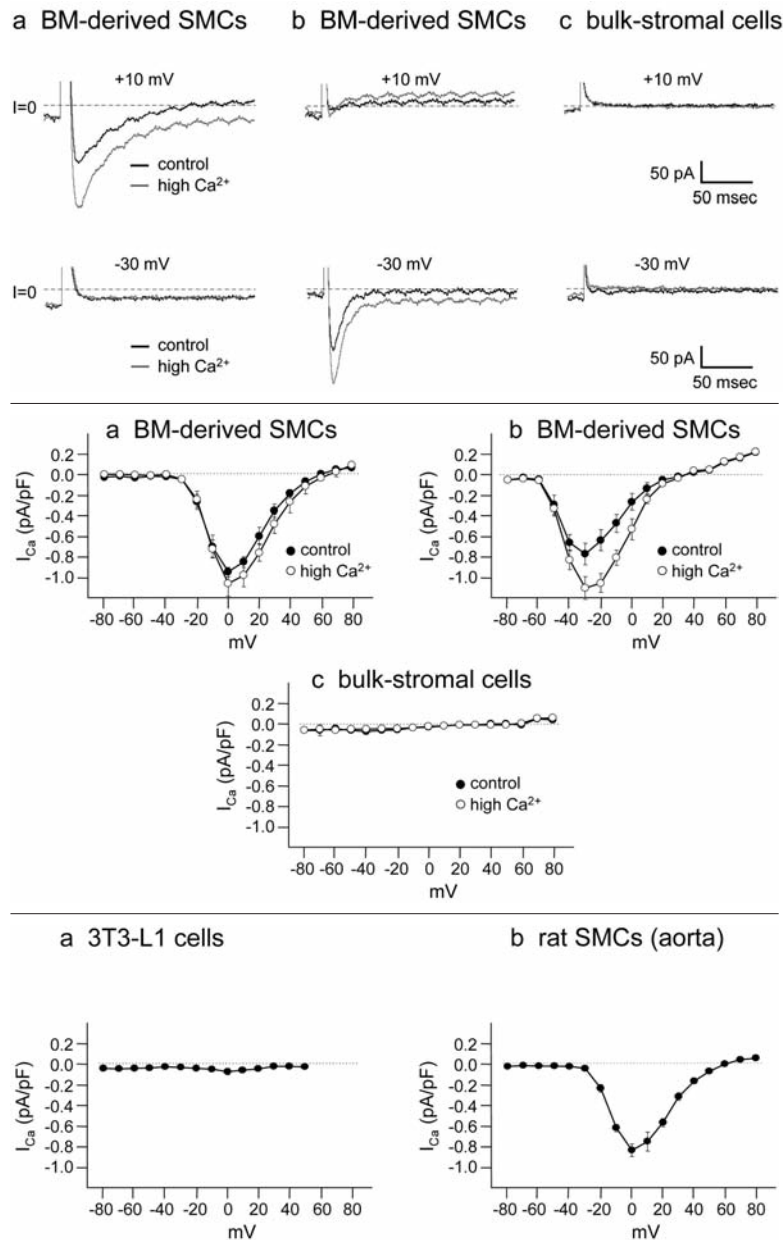


Figure 2 BM-derived SMCs show two types of Ca^{2+} channel currents.

A: Typical traces show I_{Ca} elicited by depolarization to +10 mV or -30 mV from -80 mV. Extracellular solution was superfused by CsT solution (1.8 mM Ca^{2+} , black line) or high Ca^{2+} solution (3.6 mM Ca^{2+} , gray line).

B: The graph represent current-voltage ($I-V$) curves for BM-derived SMCs (4w, panels a and b) and bulk stromal cells (4w, panel c). Cells were voltage clamped at a holding potential of -80 mV, and currents were evoked by +10 mV increment depolarizing steps of 500 ms to +80 mV using whole-cell patch clamp methods. Extracellular solution was superfused by CsT solution (1.8 mM Ca^{2+} , ●) or high Ca^{2+} solution (3.6 mM Ca^{2+} , ○).

C: The traces show $I-V$ curves for 3T3-L1 cells (panel a) and rat SMCs (panel b). Extracellular solution was superfused by CsT solution.

方バルク骨髄間質細胞 ($n=5$) においては、L型およびT型 Ca^{2+} チャンネル電流が認められなかった (Fig. 2Ac, 2Bc)。

次に K^+ チャンネル電流を測定した。骨髄由来平滑筋様細胞 ($n=4$) では、無 Ca^{2+} 溶液の灌流時に K^+ チャンネル電流が認められた (Fig. 3Aa, 3Ba)。また Ca^{2+} を含む NT 溶液の灌流時には、無 Ca^{2+} 溶液の灌流時よりも大きな K^+ チ

ネル電流が認められた (Fig. 3Aa, 3Ba)。したがって骨髄由来平滑筋様細胞において、電位依存性 K^+ チャンネル電流、および Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル電流が認められることが示された。一方バルク骨髄間質細胞 ($n=4$) においても、無 Ca^{2+} 溶液の灌流時に K^+ チャンネル電流が認められた (Fig. 3Ab, 3Bb)。しかし NT 溶液の灌流時には、無 Ca^{2+} 溶

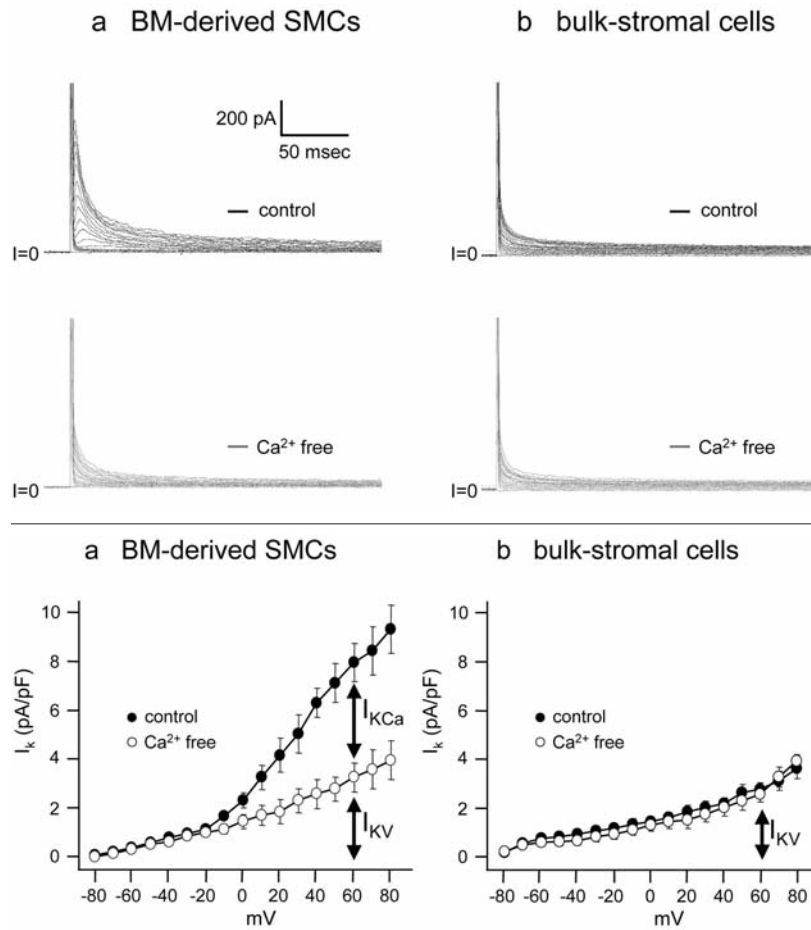


Figure 3 BM-derived SMCs show two types of K^+ channel currents. Cells were voltage clamped at a holding potential of -80 mV, and currents were evoked by $+10$ mV increment depolarizing steps of 500 ms to $+80$ mV using whole-cell patch-clamp methods.

A: Representative I_K traces recorded in extracellular solution superfused by NT solution (1.8 mM Ca^{2+} , black line) or Ca^{2+} free solution (gray line). B: The graph represent I-V curves for BM-derived SMCs (4w, panel a) and bulk-stromal cells (4w, panel b). Extracellular solution was superfused by NT solution (1.8 mM Ca^{2+} , ●) or Ca^{2+} free solution (○).

液の灌流時と比べて K^+ 電流の大きさはほとんど変化しなかった (Fig. 3Ab, 3Bb)。

(3) 平滑筋細胞アゴニスト刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

アゴニスト刺激に対する、骨髄由来平滑筋様細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化をfura-2法で記録した。Ang II処理により、骨髄由来平滑筋様細胞 ($n = 12$) の約40%では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したが、バルク骨髄間質細胞 ($n = 30$) ではほとんど変化が認められなかった (Fig. 4)。同様にbradykininまたは高濃度KCl処理に応じて、骨髄由来平滑筋様細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したが、バルク骨髄間質細胞ではほとんど変化は認められなかった。またアゴニスト除去により、骨髄由来平滑筋様細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は消失した。

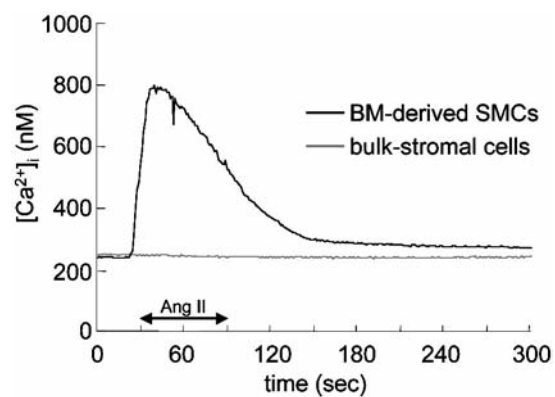


Figure 4 BM-derived SMCs show $[Ca^{2+}]_i$ response to Ang II. The graph represents typical records showing the time course of $[Ca^{2+}]_i$ in BM-derived SMCs (4w, black line) and bulk-stromal cells (4w, gray line). Fura-2-AM-loaded cells were exposed to Ang II between 30 and 90 sec.

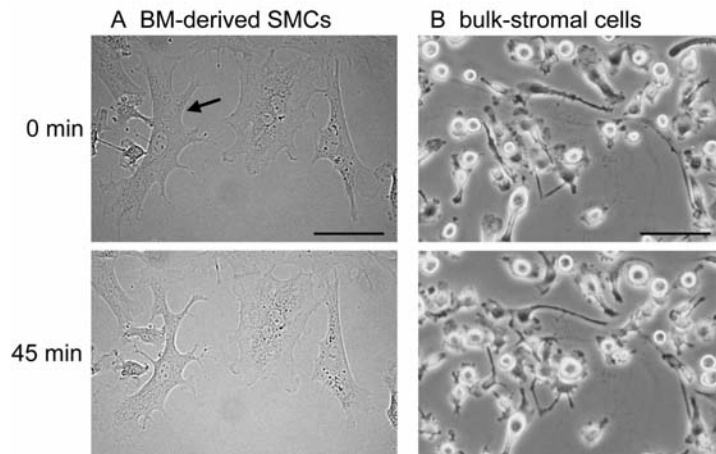


Figure 5 BM-derived SMCs show contraction in response to Ang II. The pictures represent cells before and 45 min after exposure to Ang II. A: BM-derived SMCs (4w) show changes in shape and sequential directional movement. B: Bulk-stromal cells (4w) show only non-directional movement. Bars are 100 μ m.

(4) 平滑筋細胞アゴニスト刺激に対する収縮応答

平滑筋細胞アゴニスト刺激に対する、骨髄由来平滑筋様細胞の収縮応答をビデオカメラで記録した。Ang II処理後45分間、5分間隔で細胞の形態を撮影した。骨髄由来平滑筋様細胞($n = 8$)の約40%では一定方向へ連続的な、収縮に似た動きが認められた(**Fig. 5A**)。一方バルク骨髄間質細胞($n = 30$)では、一定方向への連続的な動きは認められなかった(**Fig. 5B**)。同様にbradykininまたは高濃度KCl処理に応じて、骨髄由来平滑筋様細胞では一定方向へ連続的な、収縮に似た動きが認められたが、バルク骨髄間質細胞では認められなかった。

考 察

骨髄由来平滑筋様細胞においてL型 Ca^{2+} チャネル電流、T型 Ca^{2+} チャネル電流、電位依存性 K^{+} チャネル電流、および Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャネル電流が認められた。また骨髄由来平滑筋様細胞は平滑筋細胞アゴニスト刺激に応じて、細胞内 Ca^{2+} 濃度の筋細胞におけるカルシウムトランジェント様上昇、並びに収縮応答を示した。以上より骨髄間質細胞が電気生理学的、および細胞生理学的に通常の平滑筋細胞と変わらぬ生理機能を有する平滑筋細胞に分化することが示唆された。骨髄細胞を培養下で分化誘導し、得られた平滑筋細胞を自家移植することで、平滑筋細胞の収縮・弛緩を介して重要な役割を担う抵抗血管など筋型の動脈再生につながる可能性があると考えられる。

電位依存性 Ca^{2+} チャネルは主に6つに分類され、平滑

筋細胞ではL型 Ca^{2+} チャネルとT型 Ca^{2+} チャネルの発現が認められる。L型 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内への Ca^{2+} 流入が収縮反応に重要であるのに対して、T型 Ca^{2+} チャネルの役割としては細胞増殖、収縮反応に寄与することなどいくつかの機能が示唆されている^{6,7)}、各臓器すべての平滑筋細胞に対して共通する役割はほとんど報告されていない。本研究では約60%の骨髄由来平滑筋様細胞においてL型 Ca^{2+} チャネル電流が認められ、残りの約40%においてT型 Ca^{2+} チャネル電流が認められた。先行研究は増殖期のラット大動脈由来培養平滑筋細胞ではT型 Ca^{2+} チャネル電流が認められること⁸⁻¹⁰⁾、T型 Ca^{2+} チャネル阻害薬処理により細胞増殖が抑制されることを報告している¹¹⁾。またT型 Ca^{2+} チャネルの活性化がヒト肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進することが知られている¹²⁾。したがって、T型 Ca^{2+} チャネル電流が認められる骨髄由来平滑筋様細胞は増殖期にある可能性がある。心筋細胞および骨格筋細胞への分化初期段階においてはT型 Ca^{2+} チャネルの発現が優位であるが、分化が進むにつれて発現が弱まることが報告されている¹³⁻¹⁶⁾。本研究で約60%の骨髄由来平滑筋様細胞が平滑筋細胞アゴニスト刺激に対して、細胞内 Ca^{2+} 濃度のカルシウムトランジェント様上昇、並びに収縮応答を示さなかったことは、未成熟な骨髄由来平滑筋様細胞が含まれていたことを示す所見かもしれない。以上のことを考慮すると、本研究で認められた骨髄由来平滑筋様細胞において、L型 Ca^{2+} チャネル発現は成熟した平滑筋細胞を、T型 Ca^{2+} チャネル発現は未成熟の平滑筋細胞を特徴づけている可能性もある。平

滑筋細胞への分化過程におけるT型Ca²⁺チャネルの役割については、さらなる検討が必要である。

収縮能は平滑筋細胞の重要な機能のひとつである。本研究では、骨髓由来平滑筋様細胞は収縮アゴニスト (bradykinin, Ang IIまたは高濃度KCl)刺激に対して収縮応答を示した。高濃度KCl刺激はL型Ca²⁺チャネルの活性化を介して、一方bradykinin, Ang IIはそれぞれbradykinin受容体, Ang II受容体の活性化を介して、平滑筋細胞の収縮を引き起こす。このことから骨髓由来平滑筋様細胞は、非受容体および受容体どちらの経路の活性化を介しても収縮応答を示すと考えられる。またマウス胚性幹細胞(ES細胞)から分化した平滑筋細胞¹⁷⁾、ラット神経幹細胞から分化した平滑筋細胞¹⁸⁾、およびヒト脂肪細胞から分化した平滑筋細胞¹⁹⁾も収縮能を有することが報告されている。これらの先行研究とわれわれの結果を考慮すると、骨髓由来を含めた幹(前駆)細胞は平滑筋細胞への分化過程において、生化学的特徴と生理学的特徴とを獲得するための共通した分子メカニズムを有している可能性があり、その解明が待たれる。

文 献

- 1) Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K et al: Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: In vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation*, 2003, **107**: 2078–2081.
- 2) Charbord P, Lerat H, Newton I et al: The cytoskeleton of stromal cells from human bone marrow cultures resembles that of cultured smooth muscle cells. *Exp Hematol*, 1990, **18**: 276–282.
- 3) Galmiche MC, Koteliensky VE, Brière J et al: Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 1993, **82**: 66–76.
- 4) Arakawa E, Hasegawa K, Yanai N et al: A mouse bone marrow stromal cell line, TBR-B, shows inducible expression of smooth muscle-specific genes. *FEBS Lett*, 2000, **481**: 193–196.
- 5) Kobayashi N, Yasu T, Ueba H et al: Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp Hematol*, 2004, **32**: 1238–1245.
- 6) Yunker AM, McEnery MW: Low-voltage-activated (“T-type”) calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, **35**: 533–575.
- 7) Cribbs LL: T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. *Cell Calcium*, 2006, **40**: 221–230.
- 8) Akaike N, Kanaide H, Kuga T et al: Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol*, 1989, **416**: 141–160.
- 9) Richard S, Neveu D, Carnac G et al: Differential expression of voltage-gated Ca²⁺-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1160**: 95–104.
- 10) Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y et al: Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res*, 1996, **79**: 14–19.
- 11) Schmitt R, Clozel JP, Iberg N et al: Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1161–1165.
- 12) Rodman DM, Reese K, Harral J et al: Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res*, 2005, **96**: 864–872.
- 13) Xu X, Best PM: Postnatal changes in T-type calcium current density in rat atrial myocytes. *J Physiol*, 1992, **454**: 657–672.
- 14) Leuranguer V, Monteil A, Bourinet E et al: T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: Contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **279**: H2540–H2548.
- 15) Chen X, Wilson RM, Kubo H et al: Adolescent feline heart contains a population of small, proliferative ventricular myocytes with immature physiological properties. *Circ Res*, 2007, **100**: 536–544.
- 16) Gono T, Hasegawa S: Post-natal disappearance of transient calcium channels in mouse skeletal muscle: Effects of denervation and culture. *J Physiol*, 1988, **401**: 617–637.
- 17) Drab M, Haller H, Bychkov R et al: From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: A retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J*, 1997, **11**: 905–915.
- 18) Oishi K, Ogawa Y, Gamoh S et al: Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. *J Physiol*, 2002, **540**: 139–152.
- 19) Rodríguez LV, Alfonso Z, Zhang R et al: Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**: 12167–12172.

Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Cells into Functional Smooth Muscle Cells

Ryota Hashimoto,¹ Youichi Katoh,² Seigo Itoh,³ Hiroyuki Daida,⁴ Yuji Nakazato,² and Takao Okada¹

¹Department of Physiology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

²Department of Cardiology, Juntendo University School of Medicine, Urayasu Hospital, Chiba, Japan

³Department of Cardiology, Juntendo University School of Medicine, Shizuoka Hospital, Shizuoka, Japan

⁴Department of Cardiovascular Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: bone marrow stromal cells, smooth muscle cells, differentiation

We and others have reported from morphological examination that smooth muscle-like cells may be differentiated from bone marrow stromal cells (BMSCs). However, few studies have addressed whether the differentiated smooth muscle-like cells (BMSC-derived SMCs) also possess the functional properties of SMCs. We conducted physiological study to characterize BMSC-derived SMCs. To investigate whether BMSC-derived SMCs exhibit functional SMC properties, we measured Ca^{2+} and K^{+} currents in BMSC-derived SMCs using the whole-cell patch-clamp method. The cells showed L-type Ca^{2+} channel currents, T-type Ca^{2+} channel currents, Ca^{2+} -activated K^{+} channel (K_{Ca}) currents and delayed rectifier K^{+} channel (K_{v}) currents. We also examined agonist-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ transients in BMSC-derived SMCs using fura-2 imaging. Formation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ transients was observed in the cells in response to SMC-specific agonists such as bradykinin (1 μM), angiotensin II (100 nM) or 60 mM KCl. Finally, we assessed agonist-evoked contraction in BMSC-derived SMCs using a video camera. In response to SMC-specific agonists, the cells showed contraction-like movement, *i.e.*, change in shape and sequential movement. BMSC-derived SMCs exhibit the functional and physiological properties of SMCs. Since BMSCs have the potential to differentiate into functional SMCs, they can be reliable and expandable SMC sources for the construction of tissue-engineered vascular grafts.

(J Jpn Coll Angiol, 2008, **48**: 299–306)