

特集

細胞移植と再生医療—血管新生から心筋再生へ—

心筋再生と細胞移植の現状*

福田 恵一**

Key Words : mesenchymal stem cell, embryonic stem cell, regeneration therapy, cardiomyocyte, heart failure

要 旨

これまでの研究により胚性幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞などから心筋細胞が分化誘導できることが示された。再生心筋細胞を純化し移植する技術も開発され, 移植再生心筋細胞はレシピエント心臓に長期間生着できることが証明された。新たな移植法として組織工学を応用した細胞シート¹の作成が可能となり, ドナーの不要な細胞移植による心不全治療が臨床の前段階にまで来ている。また, サイトカインを利用した幹細胞の動員による心不全治療法も模索されている。

はじめに

心筋細胞は出生直後までは細胞分裂するが, その後は細胞分裂をせず肥大により心負荷に適應すると長らく考えられてきた。最近の研究で心筋梗塞直後にごくわずかな心筋細胞が細胞分裂することがわかったが, 心不全を改善するほどの効果には至らないものである。拡張型・肥大型心筋症による難治性重症心不全に対してはこれまで心臓移植が行われてきたが, ドナー不足は将来的にも解消される見通しはない。これらの疾患あるいは重症心筋梗塞による新たな治

療として, 多能性幹細胞を用いた心筋再生とこれを用いた心不全治療が提唱されている。研究段階では非常に期待をもたせる成果が出ており, これをいかに臨床に応用すべきかが今後の課題となっている。本稿では, これらの現状と展望を述べることにする。

心筋細胞再生と幹細胞

多能性幹細胞といっても, 胚性幹細胞のように全身のすべての臓器になるものから, 造血幹細胞のように特定の細胞群にしか分化できないものまで多段階の幹細胞が存在する。われわれは, 1999年に骨髄間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することを報告したが²⁾, それ以後身体の中にあるさまざまな幹細胞が心筋分化能力を有することが報告された。表1にこれらのなかの代表的なものの特徴を示した。

1. 胚性幹細胞(ES細胞)

胚性幹細胞は受精直後の胚盤胞と呼ばれる時期に, 将来胎児になる内部細胞塊の部分を取り出してきたもので, マウス, ヒツジ, ウシ, サルなどだけでなく, ヒトでもすでに樹立されている。米国, オーストラリアなどでヒトの胚性幹細胞が先行して樹立されたが, 本邦でも京都大学中辻教授らのグループにより3株ほど樹立されている。心筋細胞は胎生早期より分化してくる細胞であることもあり, 胚性幹細胞からはとくに分化誘導を行わなくとも少量の心筋細胞

* The present state of cardiac regeneration and cell transplantation.

** Keiichi FUKUDA, M.D.: 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35); Cardiopulmonary Division, Department of Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, JAPAN

表1 心筋幹細胞の分類と特徴

	報告者	特徴	存在頻度・単離の難度	分化できる細胞
胚性幹細胞	多数	大量培養可能. 同種移植となるため 免疫抑制剤が必要.	比較的容易に単離. ヒト胚性幹細胞がすでに 樹立.	あらゆる細胞が分化可能だが, <i>in vitro</i> では胎生早期に分化でき る細胞が得られやすい.
骨髄間葉系 幹細胞	慶大福田ら	培養法が比較的容易	骨髄中の数千万～ 数百万分の1	骨芽細胞・軟骨芽細胞・脂肪細胞 ・心筋細胞など
MAPC細胞	米国 ミネソタ大学 Verfeilleら	培養法がきわめて 難しい. 大量培養不可.	10億分の1(きわめて稀). 単離は難しいが, ヒトの 細胞でも単離されている.	あらゆる細胞が可能だが, 神経 細胞, 肝臓細胞, 骨格筋細胞な どで確立.
心筋組織 幹細胞 (c-kit細胞)	ニューヨーク 州立大学 Anversaら	単離が難しい. 大量培養不可.	心臓組織を材料とするため 難しい. バイオプシーで できるか不明.	心筋, 平滑筋, 血管内皮細胞
心筋組織 幹細胞 (Sca-1細胞)	ペイラー大学 Schneiderら	単離が難しい. 大量培養不可.	ヒトではSca-1抗原がない ため不可.	心筋

は得られることが知られている。胚性幹細胞を一定の大きさの細胞塊を作成し浮遊状態で培養すると、中空状の疑似胚(これを胚様体という)を形成する。一部の胚様体は部分的に心筋細胞に分化する。現在、胚様体から心筋細胞により効率的に分化誘導させる方法として、BMP2, FGF, IGF-1, H₂O₂, アスコルビン酸, レチノイン酸などさまざまな方法が知られているが、これらの方法もそれほど効率的なものではない。しかし、心筋分化にかかわる因子の研究が急速に進んでおり、近い将来胚性幹細胞から特異的に心筋細胞を分化誘導できる方法が開発されるものと考えられる。

2. 骨髄間葉系幹細胞

骨髄は造血幹細胞を頂点として血球系の細胞が99%以上を占めるが、間葉系幹細胞は骨髄中に稀な頻度で存在する。この細胞は骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞などに分化することが従来から知られ、このほかにも骨格筋細胞、心筋細胞、神経細胞にも分化すると報告されている。骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導はこれまでDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを用いて行われており、特異的な分化誘導法は胚性幹細胞以上に知られていない。しかし、後述のように生体内でこの細胞は心筋細胞に分化誘導されること、心筋細胞との共培養で心筋細胞に分化するという報告があることなどより、今後、解明されてゆくものと思われる。骨髄間

葉系幹細胞の最大の利点は患者本人の細胞を使用することが可能である点であり、拒絶反応やドナーの問題は解決できる。問題点としては、生体内では一生を通じて自己複製しているものと考えられるが、*in vitro*では継代数に限度があり、大量に培養できない点が問題であろう。間葉系幹細胞から心筋細胞に分化した細胞は当初胎児期心室筋の表現型をとるが、次第に成熟し成人型の遺伝子発現をみるようになる¹⁾。また、交感神経・副交感神経の受容体も生体の心筋細胞と同様な発現、機能を有する²⁾。

3. 心臓内に存在する組織幹細胞

近年、心臓組織中よりc-kit陽性あるいはSca-1 (stem cell antigen-1)陽性の細胞をセルソーターを用いて回収すると、これらのなかに心筋に分化可能な細胞が存在することが報告された。これらの細胞は心臓特異的な組織幹細胞と考えられ、その存在頻度は低いものの心筋細胞や平滑筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有するとされている。c-kit陽性細胞とSca-1陽性細胞はその特徴も異なり、分化能力なども異なっている。これらの細胞は*in vitro*でもある程度の増殖は可能であり、心筋細胞の再生に有用なツールと考えられる。c-kit抗原はサイトカインstem cell factorの受容体であり、ヒトでも応用可能である。これに対し、Sca-1はマウス特異的な抗原であり、ヒトでの対応する抗原はないためヒトでの応用は難しい。いずれにしてもこれらの組織幹細胞

は存在頻度が低く、バイオブシー程度
の心筋から分離することは難しい
ため、大量に心臓を採取しなければ
ならない点が問題で臨床応用は今後
の課題であろう。

心筋細胞移植

心筋細胞移植の概念はすでに1990
年代後半から提唱されてきた。動物
実験では、胎児あるいは新生児ラッ
ト心筋細胞などを成体の心臓に移植
できること、移植した細胞は比較的
長期間生着できること、周囲の細胞
とGAP結合することなどが報告され
ている。

多能性幹細胞由来の心筋細胞を心
臓に移植する際には、未分化細胞や
ほかの細胞に分化した細胞を除去し
なければならない。これまでの研究
では胚性幹細胞から分化させた心筋
細胞をセルソーターで回収する方法
が有効と報告されている。心筋細胞
特異的蛋白の遺伝子プロモーターに
蛍光色素GFP (green fluorescent pro-
tein) などの遺伝子を組み替えた遺伝
子を胚性幹細胞などに遺伝子導入し、
心筋細胞をマーキングする方法が取
られている。われわれはミオシン軽
鎖遺伝子プロモーターとGFP遺伝子
の組替え遺伝子を作成し、骨髄間葉
系幹細胞に導入した³⁾。この細胞を分
化誘導すると、図1のように心筋細胞
に分化した細胞のみを緑色に標識
でき、さらにFACSセルソーターによ
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。これを同種
マウスの心臓に注射針を用いて移植
すると、図2に示すように再生心筋
細胞はレシピエントの心筋細胞の隙間に移植され、周囲の細胞とGAP結合を介して結合していた³⁾。また、これらの細胞は長期間レシピエントの心臓に生着していた。これらの現象は、再生心筋細胞が胎児・新生児心筋細胞の代替細胞と

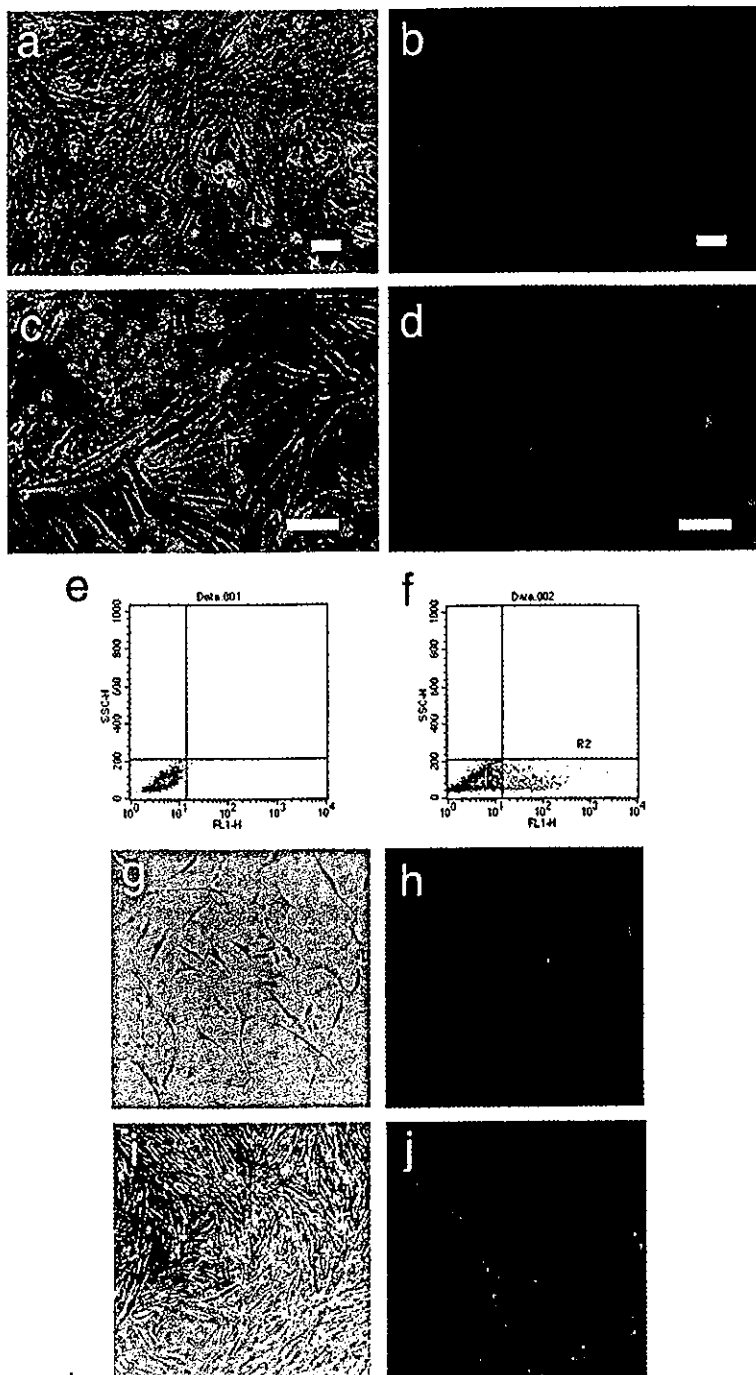


図1 再生心筋細胞の単離

心室筋特異的蛋白であるミオシン軽鎖-2vの遺伝子のプロモーター
に蛍光色素GFPを組み替えたプラスミドを骨髄間葉系幹細胞に遺伝
子導入し、分化誘導を行ったもの。一部の細胞がGFP陽性になり(a,
b)、拍動を開始する(c, d)。GFP陽性になった時期にFACSセルソー
ターにより細胞を分取する(e, f)と心筋細胞のみが得られる(g~j)。
(文献³⁾より一部改変引用)

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ており、今後の発展が期待される。

注射針による細胞移植は簡便であるが、大量の細胞を移植できないこと、細胞の生着率が低いことより移植法としては完成されたものでは

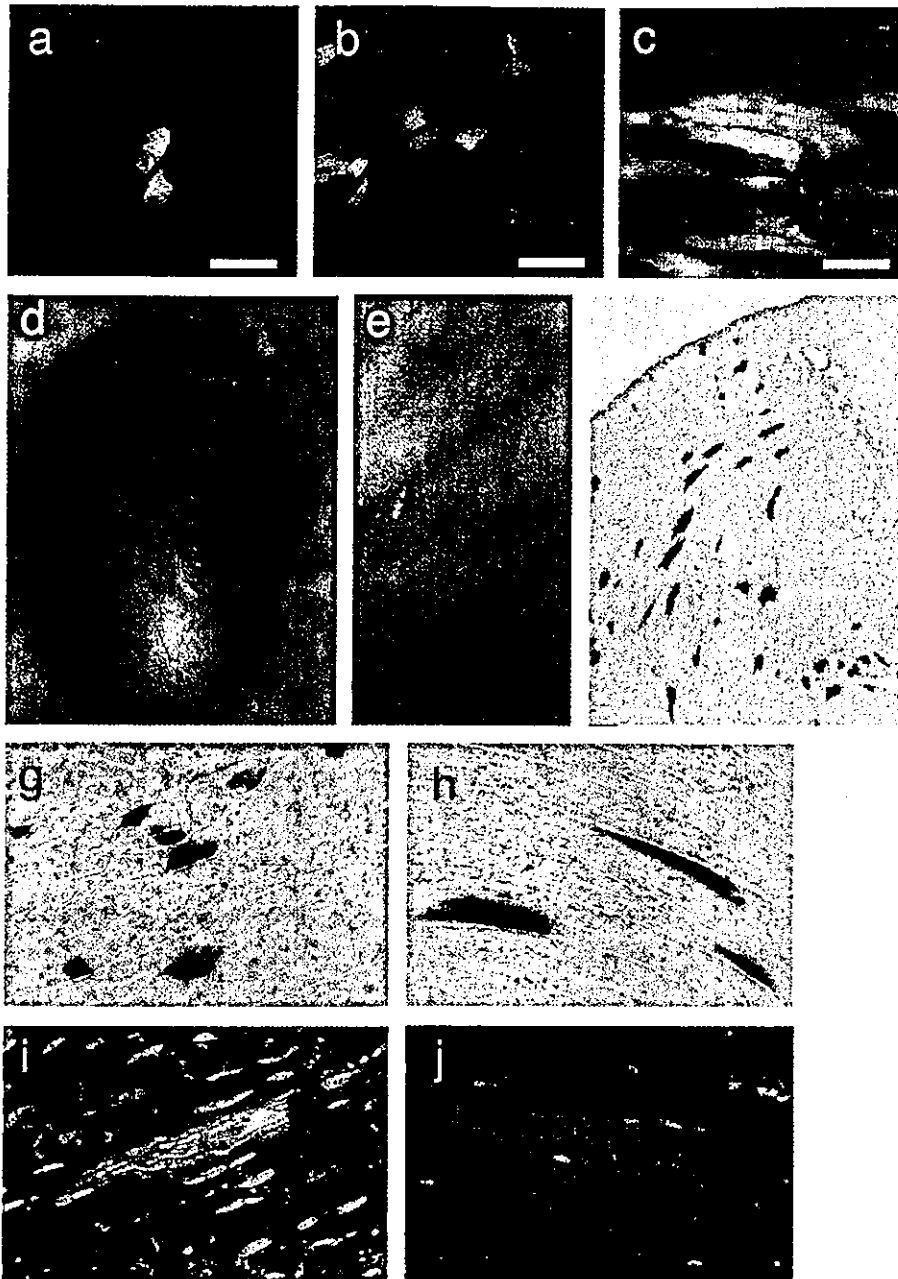


図2 再生心筋細胞の移植

図1で得られた細胞を注射針で成体のマウス心臓に移植したもの、移植された心筋は心臓に生着し、長期間生存することが確認できる。これらの細胞は心臓に島嶼状に分散し、周囲の心筋細胞に密着して短冊状の成熟心筋細胞の形態を取っていた。a~cはGFPの蛍光を観察したもの、d~hはLacZ遺伝子を導入染色したものである。これらはconnexin43と共免疫染色をすると周囲の心筋細胞とGAP結合をしている様子が観察された(i, j)。緑はGFP, 青はTOTO-3による核染色, 赤はconnexin43を示す。
(文献³⁾より一部改変引用)

ない。東京女子医科大学の岡野らは、培養皿表面を特殊な樹脂でコーティングすることにより、温度感受性培養皿を作成した。この皿の表面は低温にすると親水性になり、培養細胞がシート状に剥離できることを利用して心筋細胞シートを作成した。われわれもこの方法にヒントを得

て、独自に心筋細胞シートの作成方法を開発した⁴⁾(図3)。この方法は外科手術の際に使用されるフィブリン糊を応用した方法で、フィブリンノーゲン溶液とトロンビン溶液を一定濃度で反応させ、培養皿上にフィブリンポリマーを薄くコーティングする。この培養皿上で心筋細胞を培養

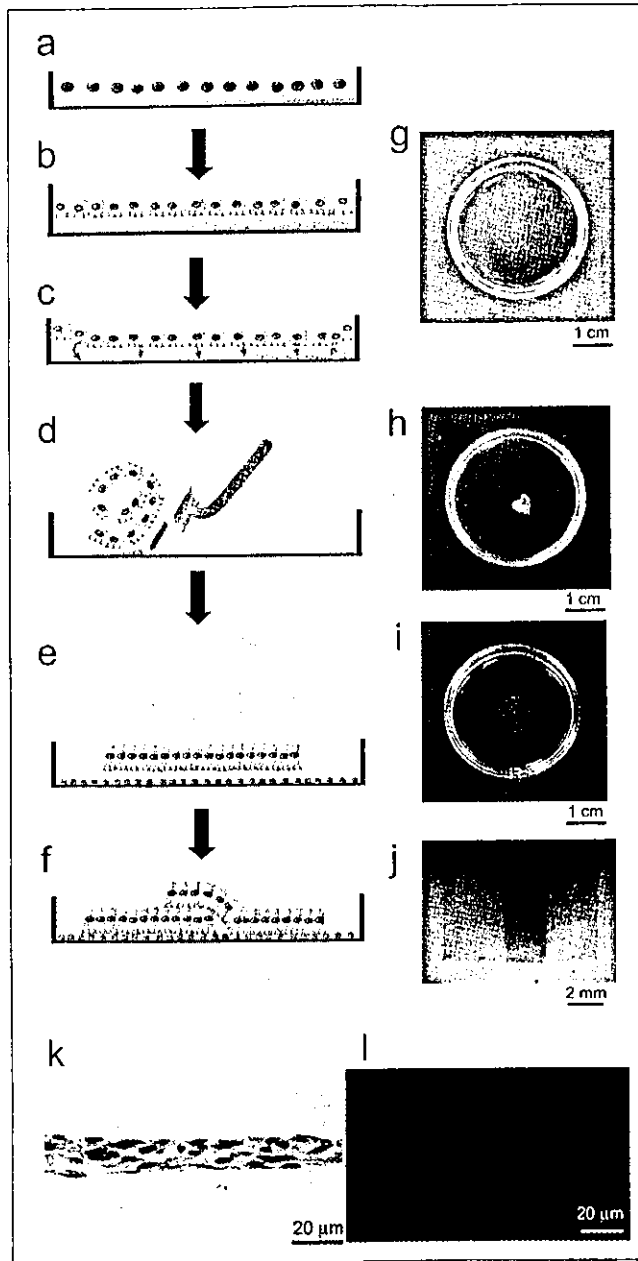


図3 心筋細胞シートの作成

フィブリンポリマー膜でコートした培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法。フィブリンポリマーは心筋細胞より分泌される種々の内因性プロテアーゼにより次第に分解され、容易に培養皿表面から剥離できる。これを利用すると簡単に心筋細胞シートが作成できる。a~fは概念図、g~jは実際の様子、k,lは心筋細胞シートをHE染色あるいは免疫蛍光染色したもの。

(文献⁴⁾より一部改変引用)

すると、心筋細胞より種々の内因性プロテアーゼが分泌され、このプロテアーゼにより3日目くらいにはフィブリンポリマー膜が分解され、シート状の心筋細胞を得ることができる。培養開始7日目までは完全にフィブリンが除去される。心筋細胞シートの特徴は注射針による移植

と異なり、細胞の生存率、生着率が良いことである(図4)。注射針による移植の場合、細胞の生着率は多くの報告で10%未満の細胞しか生着しない。これに対し、心筋シートを皮下に移植した場合には細胞が移植後に失われることは少なく、今後の細胞移植法の重要な手法のひとつとなるであろう。心筋細胞シートは重層することによりある程度厚みのある組織を作ることができる。移植後は小血管網が形成されるが、太い血管の構築は現状ではできておらず、今後の研究の進展が望まれる。

成体における幹細胞からの心筋再生

これまでの研究で、骨髄幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化することが明らかとなったが、生体内でこれらの幹細胞が心臓に移動し、心筋細胞に分化するか否かは知られていなかった。また、最近2年間の議論で造血幹細胞の多能性や多能性幹細胞の細胞融合も報告され、骨髄細胞の生体修復機転が混沌としていた。そこでわれわれは骨髄中のいずれの細胞(造血幹細胞あるいは間葉系幹細胞)が生体内で心筋細胞に分化するかを検証するため、マウスの骨髄移植モデルを用いた解析を行った⁵⁾。すなわち、GFPでマーキングした造血幹細胞と間葉系幹細胞の双方を別々に致死量の放射線を照射した同種マウスに移植した。造血幹細胞はGFPトランスジェニックマウスからFACSを用いてKSL-SP法という手法により、単一の造血幹細胞を採取し当座の造血を担うGFP非標識のradioprotective cellとともに骨髄移植を行った。また、間葉系幹細胞は以前われわれが単離したCMG細胞を上述のように心筋細胞に分化した際にGFPを発現するように標識し、骨髄内骨髄移植という特殊な方法で骨髄移植を行った。間葉系幹細胞は造血幹細胞に比して細胞径が大きく、肺やその他の組織にトラップされる可能性が大きく、この方法を選択した。このように造血幹細胞、間葉系幹細胞を移植したマウスで心筋梗塞を作成し、2か月後に心臓を解析したところ、興味深い結果が示された。造血幹細胞を移植した群ではGFP陽性に心筋細胞はほとんど観察されず、これまで報告されている細胞融合の頻度程度のものだけであった。これ

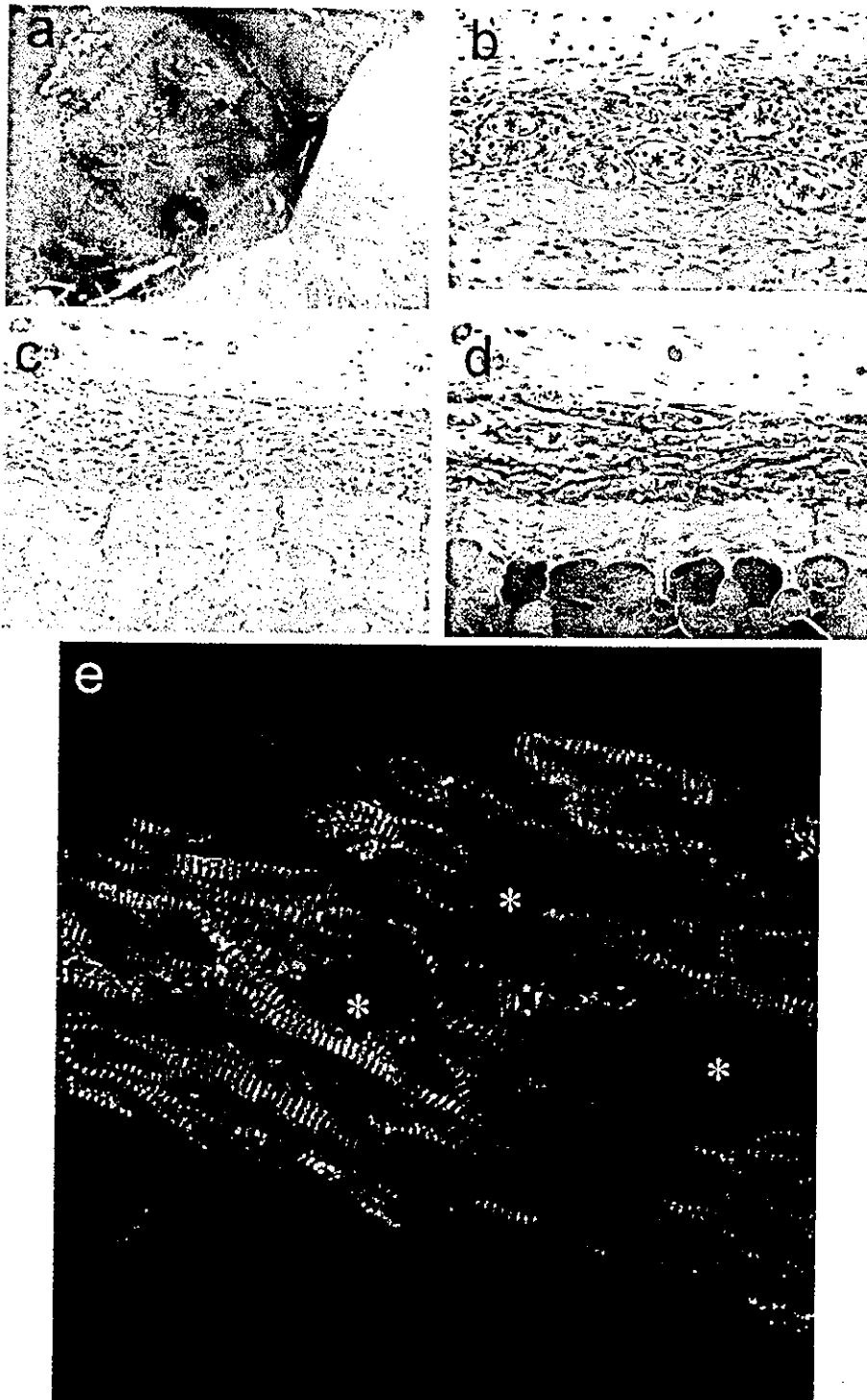


図4 心筋細胞シートの皮下移植

aは皮下に移植したシートの外観を示し、b～eはその組織像を示した。b, cはHE染色、dはAzan染色、eは免疫蛍光染色を示す。緑はアクチニン、赤はconnexin43、青はTOTO-3で核を示す。
(文献より引用)

に対し間葉系幹細胞であるCMG細胞を移植した群では、梗塞巣にGFP陽性アクチニン染色陽性の心筋細胞が確認された。これらの解析の結果の示すところは、心筋梗塞などの心筋組織の壊死を伴うような障害の際には骨髄より間葉系幹細胞が動員されること、そしてこの間葉系幹細胞

は梗塞巣において心筋細胞に分化し得るものであるということである。われわれは、骨髄から幹細胞が動員される際にサイトカインであるG-CSFを投与しているが、非投与群とG-CSF投与群の間で再生心筋細胞の数は大きく異なることより、G-CSFは従来知られているように造血幹細胞

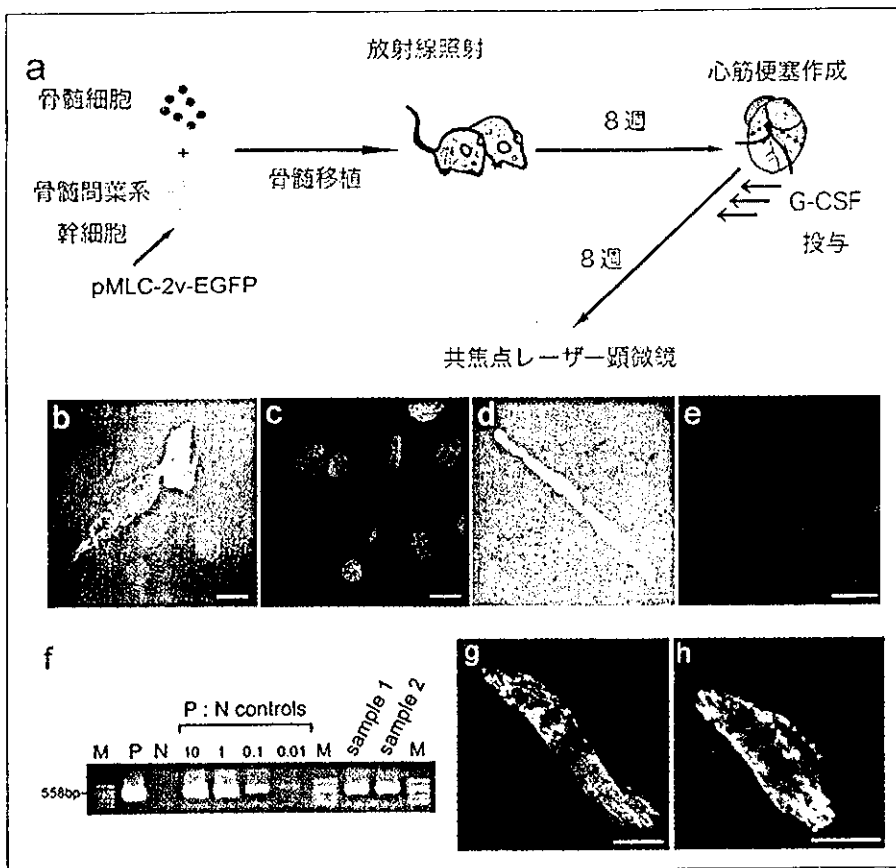


図5 骨髄間葉系幹細胞の生体内における心筋分化
 骨髄間葉系幹細胞に図2で紹介したプラスミドを遺伝子導入し、致死量の放射線照射したマウスの脛骨内に骨髄内骨髄移植を行った。骨髄が再構築した3か月後にマウスに心筋梗塞を作成し、梗塞巣を観察した。梗塞部にはGFP陽性の心筋細胞が観察された。これより、心筋細胞を再生するのは間葉系幹細胞であることが証明された。(文献より引用)

胞を流血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞も動員できるものであることが明らかとなった(図5)。

G-CSFはすでに一部の臨床でも使用されているが、その評価はいまだ定まっていない。ヒトでもマウスと同様に間葉系幹細胞を動員し、梗塞巣の再生に有用であるか否かは明らかとなっていない。われわれは、心筋梗塞症例にむやみにかようなサイトカインを使用するのではなく、その分子メカニズムを同時に明らかにするような研究も平行して進めなければならないと考えている。

おわりに

心不全の心筋再生療法というものは言葉としては美しい。しかし、その根底には大地に根を張ったしっかりとした基礎研究が裏打ちしたも

のでなくてはならないし、その効果の評価も主観的なものであってはならない。幹細胞研究は日進月歩で進んでおり、胚性幹細胞、間葉系幹細胞のいずれかあるいは両者から心筋細胞を大量に生産できる日もそう遠い先ではないであろう。また、サイトカインを用いた治療はより近い将来臨床で行われるものと推測される。かかる現状をみた時、より深い理解が必要な時代になってきたと痛感する毎日である。

文 献

- 1) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999 ; 103 : 697-705.
- 2) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic re-

- ceptors. *Circulation* 2002 ; 105 : 380-6.
- 3) Hattan N, Kawaguchi H, Fukuda K, et al. Cardiovascular tissue engineering : purification and transplantation of bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes into *in vivo* heart. *Cardiovasc Res*. In press 2005.
- 4) Itabashi Y, Miyoshi S, Fukuda K, et al. A novel method for manufacturing cardiac cell-sheets using fibrin-polymer-coated dishes and its application for electrophysiological studies by optical mapping. *Artifi Org*. In press 2005.
- 5) Kawada H, Fujita J, Fukuda K, et al. Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. In press 2004.

* * *

G-CSFによる 骨髄筋前駆細胞の動員

Mobilization of the Cardiomyocyte Precursor Cells
From Bone Marrow by G-CSF

福田 恵一

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

Key Words

G-CSF, cardiomyocyte,
mesenchymal stem cell,
bone marrow,
hematopoietic stem cell

■ Abstract ■

我々はこれまで骨髄中の間葉系幹細胞が*in vitro*で心筋細胞に分化できることを報告してきた。骨髄細胞の多分化能に関して最近さまざまな議論が為されてきた。造血幹細胞の多分化能には否定的な見解が示され、細胞融合が問題をさらに複雑にしている。我々は*in vitro*において骨髄の心筋分化能のある細胞を同定するため、GFPで標識した細胞を用いて3種の骨髄移植（全骨髄細胞、単一造血幹細胞、間葉系幹細胞移植）と行った。その結果、間葉系幹細胞が*in vivo*においても心筋分化能を有することを明らかにした。その過程の中で、サイトカインであるG-CSFがこれまで知られているように骨髄より顆粒球や造血幹細胞を末梢血中に動員するだけでなく、間葉系幹細胞の動員にも深く関わっていることが明らかとなった。心筋梗塞や創傷など治療などG-CSFの新たな臨床への応用が視野に入ってきたといえるであろう。

■ はじめに

よく知られているように骨髄には造血幹細胞を頂点とした血液系の細胞が多数存在する。その比率は99%以上であるが、血液細胞以外にも造血を助ける働きを持つ間質細胞（ストローマ）と呼ばれる細胞があり、造血の微小環境を保っている。1990年代初頭より、この間質細胞の一部の細胞に骨や軟骨、脂肪細胞に分化するものが存在することが知られ、間質細胞とは分けて間葉系幹細胞と呼ばれるようになった。

Keiichi Fukuda

Cardiopulmonary Division, Department of Internal
Medicine, Keio University School of Medicine

■ 1. 骨髄において心筋に分化可能な幹細胞

我々は1990年代中頃よりこの間葉系幹細胞が多様な分化能を有することに着目し、心筋細胞に分化するのではないかと考え、研究を行った。その結果、分化誘導剤を用いることによって自律拍動能を有する心筋細胞が分化誘導できることを明らかにした。同時期に浅原らが血管内皮前駆細胞も骨髄から得られることを証明し、骨髄細胞を用いた再生医学が注目され、大きな研究の流れができた。その後の研究で血管内皮細胞が心筋細胞に分化したとする報告や造血幹細胞がいろいろな細胞に分化できるとの報告、細胞融合の報告などがなされ、混沌とした状況が続いたが、*in vitro*で心筋細胞との共培養によることなく完全に心筋に分化可能であることが証明されているのは間葉系幹細胞だけであろう。

■ 2. G-CSFによる末梢血幹細胞移植の発展

白血病などの血液疾患に対し、従来は骨髄移植が中心に行われてきた。しかし、近年はサイトカインであるG-CSF（顆粒球コロニー形成因子）を用いた末梢血幹細胞移植が行われるようになった。末梢血幹細胞移植は全身麻酔で骨髄を穿刺する必要が無く、侵襲度が低い。このためG-CSFは本来、抗癌剤などの影響で白血球が減少している症例に使用されるサイトカインであるが、同時に骨髄から造血幹細胞を末梢血中に強力に誘導することが

報告され、末梢血幹細胞移植に用いられるようになった。

■ 3. G-CSFによる骨髓細胞の動員

我々は生体内で造血幹細胞と同様に間葉系幹細胞がendosteal nicheと呼ばれる部位に存在することよりG-CSFが間葉系幹細胞を末梢血中に誘導するのではないかと考えた。また、最近様々に報告されている骨髓内の細胞の内、我々が報告したように間葉系幹細胞が心筋分化能を有するのか、それとも造血幹細胞も心筋分化能を有するかという問題に決着を付けるため、マウスを用いて3種類の骨髓移植の実験を行った。骨髓ドナーマウスにはGFPトランスジェニックマウスを使用した。図に示すように致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに(1)全骨髓細胞(造血幹細胞+間葉系幹細胞)を移植した群、(2)KSL-SP法という特殊な方法を用いて、GFPマウスから造血幹細胞のみを1個のみ単離し、当座の造血を助ける非標識の少量の骨髓細胞(放射線保護細胞)と混合して

移植したもの(単一造血幹細胞移植)、(3)我々が骨髓より単離した間葉系幹細胞(CMG細胞)を心筋細胞に分化するとGFPを発現するように遺伝子導入した細胞(CMG-ME細胞)と非標識の少量の骨髓細胞(放射線保護細胞)を脛骨内に骨髓内骨髓移植したもの(間葉系幹細胞移植群)、の3群に分けて骨髓移植を行った。造血能の回復を待ち心筋梗塞を作成し、直後にG-CSFを10日間投与し、2ヶ月後に梗塞巣を観察した。(1)全骨髓細胞移植群ではGCFを使用しない場合には梗塞巣にGFP陽性細胞(白血球あるいは線維芽細胞)は散在するものの、GFP陽性の心筋細胞はごく稀に観察される程度であった。これに対し、GCFを使用した場合には梗塞部および境界部領域に多くのGFP陽性が存在し、またGFP陽性の心筋細胞も多数観察された。(2)単一造血幹細胞移植ではGFP陽性細胞は梗塞巣内に認められるものの、GFP陽性心筋細胞はほとんど観察されなかった。GFP陽性の心筋細胞は全実験を通じて3個だけしか観察されず、最近報告されている細胞融合の頻度と同程度であ

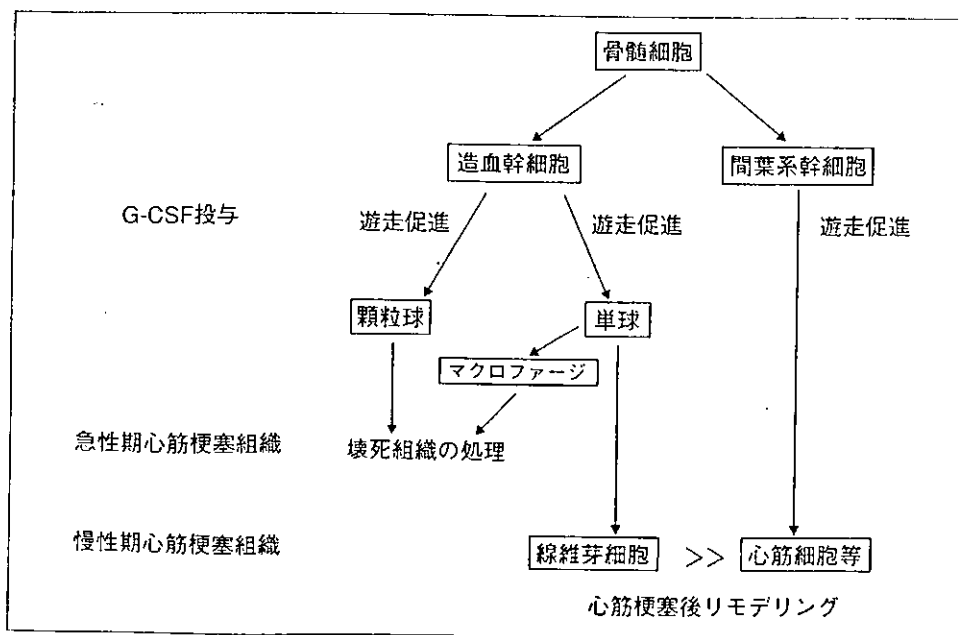


図 GFPを発現する骨髓細胞の移植実験から、骨髓中の造血幹細胞由来の細胞は心筋梗塞巣中の線維芽細胞になり、間葉系幹細胞が心筋細胞に分化することが示された。また、G-CSFは造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞を流血中に動員することが明らかとなった。

った。(3) 間葉系幹細胞移植群では心筋梗塞巣に GFP陽性心筋細胞が散在している様子が観察された。以上を総合して、骨髓内の心筋細胞を再生出来うる細胞は間葉系幹細胞であり、G-CSFは造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞も流血中に誘導する作用を持つことが証明された。臍帯血中には造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞も存在することが知られ、G-CSFの投与は末梢血を臍帯血と同様に組織修復能に富んだ血液に変えているものと推測される。

■ おわりに

我々の実験結果や他の研究者の報告をもとに現在さまざまな臨床応用が為されようとしている。臨床応用の際には効果の有無だけではなく、なぜ

そのような現象が引き起こされるかという観点に立って研究を進めるべきであろう。

文 献

- 1) Makino S, Fukuda K, *et al.*: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest.* 103: 697-705, 1999.
- 2) Hakuno D, Fukuda K, *et al.*: Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* 105: 380-386, 2002.
- 3) Hattan N, Fukuda K, *et al.*: Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* (in press), E-pub on line, Nov 2, 2004.
- 4) Kawada H, Fujita J, Fukuda K, *et al.*: Non-hematopoietic bone marrow cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction: possible contribution of mesenchymal stem cells. *Blood.* 104: 3581-3587, 2004.

☆

☆

☆

心筋の再生

下地顕一郎*, 福田恵一*

SHIMOJI Kenichiro, FUKUDA Keiichi

*慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

KEY WORDS

骨髄間葉系幹細胞, 胚性幹細胞, 再生医学, 心筋細胞, 心不全

POINTS

- 重症難治性心不全に対する根治療法として再生医療が期待される。
- 利用できる細胞の候補として, 胚性幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞, 心筋内組織幹細胞があげられる。
- 工学的手法の発達により個々の細胞を組織として移植する技術も発達してきた。
- 神経再支配, 催不整脈性などの問題は残されている。
- 倫理上の議論が十分になされて初めて臨床応用が可能になる。

はじめに

心臓疾患への治療に関しては, 近年, カテーテル治療や植え込み型除細動機の開発, アンジオテンシンIIレセプター遮断薬の一般臨床への普及, マルチスライスCTによる画像診断の進歩など, そのめざましい発展を遂げてきた。しかし難治性重症心不全に関しては, これらの領域ほどの進歩は残念ながらみられなかった。

難治性重症心不全の根治的治療としてはこれまで心臓移植が唯一とされてきた。しかしドナーの不足の問題から, その恩恵にあずかる例はごく一部にかぎられる。これに対し, 細胞生物学, 遺伝子工学の発達は新たな展開をもたらそうとしている。つまり, 再生医学, すなわち未分化な幹細胞を心筋細胞に分化誘導してこれを移植するという試みが現実味を帯びてきた。本稿ではとくに心筋細胞に分化可能な多能性幹細胞に焦点をあて, 心筋再生の現状を解説する。

① 心筋細胞に分化する多能性幹細胞

近年の精力的な研究により, 心筋細胞に分化すること

が明らかにされている幹細胞のうち, 将来的に臨床応用が可能と思われるものとして胚性幹細胞 (ES 細胞), 骨髄間葉系幹細胞, 心筋内組織幹細胞があげられる。それぞれに利点・欠点を有しており, 現時点ではどの細胞が有望であるかについて結論は出ていない。以下にそれぞれの細胞の特徴について概説する。

② ES 細胞の利用

ES 細胞は, 受精卵が胚盤胞に分化した段階の内部細胞塊から得られた細胞である。内部細胞塊は将来胎児になる部分であり, ここから得た ES 細胞は *in vivo* ではすべての組織の細胞に分化しうる。この意味で万能幹細胞ともよばれるが, *in vitro* で実際に分化が誘導できるのは胎生早期の段階で分化する細胞である。心筋細胞は胎児期の早期に分化する細胞であり, ES 細胞からは比較的得られやすい。マウスの場合には培養液中に白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を入れておくことによって未分化状態が維持されることが知られている。多くの細胞株ではフィーダーレイヤーとしてマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts :

61(313)

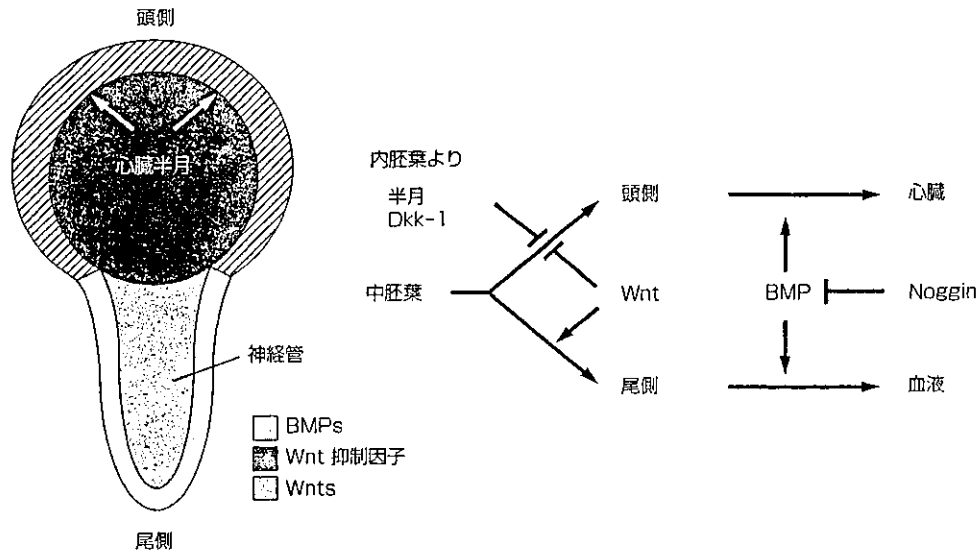


図1 中胚葉から心臓への分化経路

MEF) のうえに ES 細胞を重層して培養することが多いが、近年は技術の向上によりフィーダーレイヤーを必要としない培養も可能になった。ヒトの ES 細胞もすでに多数樹立され、わが国においても京都大学再生医科学研究所の中辻 憲夫教授により 3 株ほど ES 細胞が樹立されている。ヒトの ES 細胞は LIF により未分化機構が維持されることはなく、MEF との共培養が必須であるとされている。また、マウスと同様にヒトの ES 細胞からも心筋細胞に分化することがすでに報告されている。ES 細胞から心筋細胞への分化には BMP 2 や Wnt といったシグナル伝達経路が重要であるとされている (図1)。

ES 細胞の臨床応用上の利点は①大量培養が可能で、②分化を誘導する方法が確立している点である。逆に欠点は、まず手技的には、①ヒトで未分化維持のために MEF との共培養が必要であり、② ES 細胞から心筋細胞への選択的分化誘導法の確立が必要であり、また臨床的には、③未分化細胞が混入して移植後に奇形腫が生じてしまう可能性があり、④同種移植であるため移植後の免疫抑制剤の長期使用が必要となり、さらに、⑤倫理的問題が残されている点、などがあげられる。

近年、韓国よりヒトクローン胚の形成に成功したことが報じられた。しかし、その場合でも 100 個以上の卵を用いて 1 個成功した程度とされている。先進諸国のほとんどでクローン人間の作成は禁止されているが、臓器作

成を目的としたクローン ES 細胞は一部の国でおこなわれる可能性はある。この点に関しては今後国民的な議論がなされるべきである。技術革新により、卵細胞を用いずに ES 細胞レベルでのクローン化ができれば倫理的にはハードルが低くなって臨床応用される可能性もあり、更なる研究が望まれる。

③ 骨髄間葉系幹細胞の利用

骨髄は造血の主たる場であり、骨髄中の細胞のほとんどは造血幹細胞に由来する血液細胞である。しかし骨髄中には造血幹細胞に由来する細胞以外にも、一部間質細胞とよばれる接着系の細胞が存在し、造血幹細胞の機能維持にはたらいっている。これら間葉系の細胞は *in vitro*, *in vivo* で骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に分化するが、近年では一部外胚葉系の神経細胞に分化することが知られるようになり、体性幹細胞とよばれるようになった。なお、一時期造血幹細胞にも多分化能を有することが報告され、造血幹細胞の多分化能が誇張された。これは心臓移植後の剖検心臓を用いた研究よりはじまった。すなわち、女性ドナーから提供された心臓が男性レシピエントに移植され、一定時間後に別の理由で死亡し剖検したところ、心臓内に Y 染色体陽性の心筋細胞が観察されたと報告された。この現象は男性骨髄から多能性幹細胞が心臓に移

動し、心筋に分化したものであろうとされた。しかし、その後細胞融合という現象が報告され、造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因ではないかという否定的な見解が多く示された。

われわれの GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている。すなわち、骨髄移植モデルで心筋細胞に分化する細胞は間葉系幹細胞であると考えられる。

最近のトピックスは骨髄内の成人多能性幹細胞 (multipotent adult progenitor cell : MAPC) であろう。MAPC はミネソタ大学の Verfaillie 教授らのグループ¹¹が報告した多分化能を有する細胞で、あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であると報告されている。MAPC を別のマウスの受精卵の胚盤胞に注射してキメラマウスを形成させると、MAPC は胚性幹細胞と同様にほぼすべての細胞に分化することが報告された。しかし、MAPC の培養法はきわめて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しいことから細胞を *in vitro* で長期間培養することによるアーチファクトではないかとする声もある。MAPC に関しては今後の研究をみたくて慎重に判断されるべきであろう。

4 心筋内の幹細胞の利用

Anversa らのグループ²⁾は心筋細胞中の幹細胞因子 (stem cell factor : SCF) レセプターである c-kit 陽性の小型細胞を単離して培養すると心筋、平滑筋、内皮細胞に分化すると報告した。この c-kit 陽性細胞は心尖部と心房内に存在、心筋梗塞の発症に伴って梗塞巣に移動し心筋細胞に分化することによって梗塞巣の修復に関与しているのではないかとしている。

また、Schneider らのグループ³⁾は心臓に幹細胞抗原-1 (stem cell antigen-1 : Sca-1) 陽性の細胞が存在し、これらの細胞を DNA 脱メチル化剤の 5-アザシチジンを用いて心筋細胞に分化が可能であることを示し、これらが心筋細胞の前駆細胞ではないかとしている。この Sca-1 陽性細胞は尾静脈より注射すると心筋梗塞部にホーミングするという。さらに Goodell らのグループ⁴⁾は心臓内に存在する side population (SP) 細胞を採取し

てくると一部の細胞が心筋細胞に分化すると報告した。SP 細胞は Mulligan らのグループ⁵⁾が骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発したもので、DNA 結合色素の Hoechst 33342 の細胞外へのくみ出し能力を指標として幹細胞を分離する方法である。Hoechst 33342 を細胞外にくみ出すポンプは ABC トランスポーターである MRD1 が関与しているとされ、この蛋白を発現する細胞に幹細胞としての能力が高いとされる。c-kit, Sca-1, MRD1 自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを表 1 に示す。これらの c-kit 陽性細胞、Sca-1 細胞、MRD1 陽性の SP 細胞は一部重複する性質をもつが、基本的には異なる細胞であると思われ、その存在頻度、生体での機能と存在意義は今後の解決すべき問題であろう。

これらの心臓内に存在する幹細胞が心筋細胞として存在するとして、これらを生体外に取り出して大量培養し、*in vitro* で心筋細胞に分化させて、再移植するには *in vitro* での大量培養法の確立と心筋分化誘導法が必要不可欠のものとなる。むしろ、生体内で増殖・分化させるほうが現実的である。今後の更なる研究の発展が期待される。

5 再生心筋の移植方法

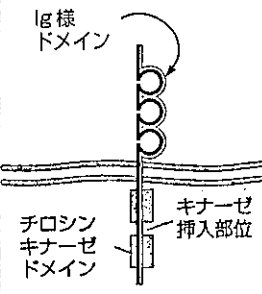
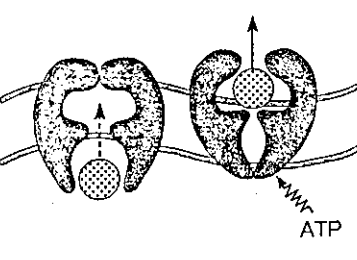
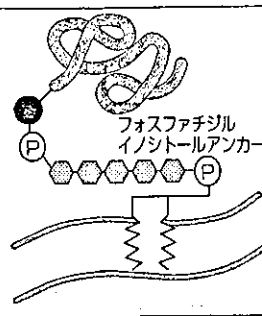
これまでの心臓への再生心筋細胞移植は、*in vivo* で心臓に直接細胞を注射するという方法がとられた。しかし、この方法では生着率が低く、また、移植できる細胞数もかぎられていた。

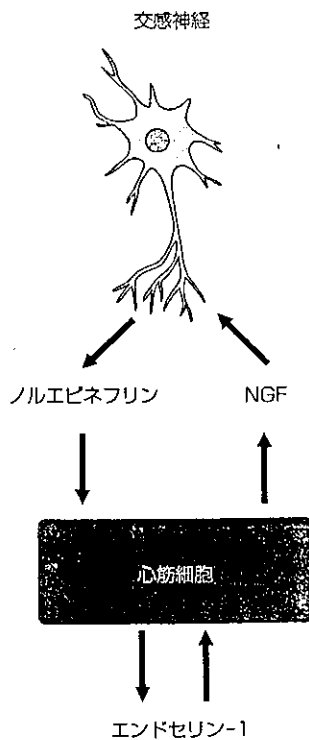
これに対し、東京女子医科大学の岡野 光夫教授らは温度により分子形態が変化し、脂溶性・水溶性が変化する化合物 poly-*N*-isopropylacryl-amide (PIPAAm) という化合物を用いた。この化合物を培養皿の表面にコーティングして温度感受性培養皿を作成し、これを用いて培養細胞をシート状に回収することに成功した。Shimizu ら⁶⁾はこの培養皿を用いて心筋細胞シートを作成し、ラット皮下に長期間生着して拍動をつづける層状の心筋組織の開発に成功した。しかし器官としての心臓を再生するには血管や神経支配、催不整脈性などクリアすべき問題も多く、今後の研究を待つことになる。

6 心臓の交感神経支配の形成

心臓は交感神経の分布密度が高い臓器の 1 つである。

表① c-kit/MRD1/Sca-1の構造・分布および機能

	c-kit	MRD1	Sca-1
構造	 <p>Ig様ドメイン チロシンキナーゼドメイン キナーゼ挿入部位</p>	 <p>ATP</p>	 <p>フォスファチジルイノシールアンカー</p>
分布	メラノサイト 肥満細胞 生殖細胞 幹細胞	肝細胞, 胆管細胞 刷子縁細胞 腎尿管細胞, 癌細胞 脳血管内皮細胞 幹細胞	血管壁 腎皮質細胞 胸腺, 脾臓 Tリンパ球 幹細胞
機能	増殖 遊走 分化 分泌	膜に存在する排出ポンプ アポトーシスの抑制	細胞接着 シグナル伝達 T細胞活性化



図② 心臓と交感神経

交感神経の刺激は心臓に心拍数上昇, 房室伝導の上昇, 陽性変力作用などをもたらす。心臓を支配する交感神経は主として星状神経節の神経細胞の支配を受ける。われわれの近年の解析では, 心臓への交感神経支配は胎性後期に心筋細胞から分泌される神経成長因子 (nerve

growth factor : NGF) を指標にして星状神経節細胞から軸索が伸長してくる。このときに心筋細胞がオートクリンに分泌するエンドセリン-1が心筋細胞自身に作用してET-Aレセプター, $G_{i\beta\gamma}$ を介して経路でNGFを分泌させることが明らかとなった(図②)。このエンドセリン-1/NGF経路が存在しない場合には心筋細胞に交感神経が伸長せず, さらに星状神経節の交感神経細胞体自身がアポトーシスを起こすことも明らかとなった。上述の問題点をクリアするために, 再神経支配についても今後の研究が待たれる。

④わりに

上述のように骨髄間葉系幹細胞やES細胞などを用いた心筋細胞の分化誘導が可能になり, また, シート状にした再生心筋の作成も可能となってきた。しかし器官レベルで機能するためにはさらにクリアすべき問題が山積しており, これらが解決されなければ治療に利用できる心筋は作成できない。

しかし近年の進歩はめざましいものがあり, これらがクリアできたとき, 再生心筋の臨床応用の具現化も可能であると確信している。



文献

- 1) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL *et al* : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418** : 41-49, 2002
- 2) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D *et al* : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114** : 763-776, 2003
- 3) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD *et al* : Cardiac progenitor cells from adult myocardium : homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 12313-12318, 2003
- 4) Jackson KA, Majika SM, Wang H *et al* : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107** : 1395-1402, 2001
- 5) Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H *et al* : Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* **3** : 1337-1345, 1997
- 6) Shimizu T, Yamamoto M, Akutsu T *et al* : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* **60** : 110-117, 2002

6. 間葉系幹細胞を用いた心筋再生

板橋 裕史*・福田 恵一* 1)
Itabashi Yuji Fukuda Keiichi

*慶應義塾大学医学部循環器内科 1) 講師

Summary

各種の心疾患の終末像である重症心不全に対する唯一の治療法は、心臓移植しか存在しないが、ドナー不足や免疫抑制療法の副作用等の問題点は克服されていない。近年の研究により、骨髄細胞より心筋細胞が分化誘導されることが報告されてきており、さらにその由来として、骨髄間質細胞中の多能性幹細胞が注目されている。これらの分化誘導された心筋細胞を心臓へ移植したり、分化を促進するサイトカインを投与したりすることによって、心機能を改善させようとする試みがなされている。

はじめに

心筋梗塞や拡張型心筋症などの広範囲に及ぶ、心筋障害を原因とした各種の心疾患の最終病像は、心筋細胞の喪失や機能低下に伴う収縮力不足による心不全である。種々の薬物療法では十分な心機能の改善が望めない程の重篤な心不全では、現時点では、心臓移植以外に確立された治療法は存在しない。しかし、米国においても数多くの心臓移植対象患者がいるものの、移植の恩恵にあずかれるのはその中の極一部にとどまっており、心臓移植療法においても慢性的なドナー不足が深刻な問題となっている。また、心臓移植には免疫拒絶、感染症、発癌などの解決せねばならない問題

も存在する。移植に変わる治療方法の開発が切望される中で、各種の多能性幹細胞を用いた再生医学に大きな期待が寄せられている。しかし、心筋細胞は生体内で最終分化した細胞であり、それ自体が増殖しない細胞であると考えられ、今日に至るまで心筋細胞の再生は極めて困難であるとされてきた。近年、骨髄細胞や胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) をはじめとした、各種の幹細胞から心筋細胞を分化誘導する報告が相次いでなされるようになり、中でも我々は、骨髄間葉系幹細胞を用いることにより心筋細胞が再生されることを報告している。本稿では、心筋梗塞による心不全への治療として期待される、様々な幹細胞を用いた心筋再生、再生心筋細胞移植の実際

【略語一覧】

ES 細胞 (embryonic stem cell; 胚性幹細胞)

について、今後の展望を踏まえ述べる。

1. 心筋細胞再生のための治療戦略

心筋細胞は生後2週間くらいまで分裂増殖し、その後は細胞分裂を行わず、個々の細胞が増大する事によって心臓全体が大きくなり成人の心臓が形成される。骨格筋細胞の研究において、MyoDという転写因子が発生の段階で発現し、骨格筋細胞の形成に重要な役割を果たしていることが判明している¹⁾。この遺伝子は、他の細胞に導入し強制発現させると、その細胞が骨格筋細胞に形質転換するという性質を持つことから、マスター遺伝子と呼ばれた。MyoDの発見以来、心筋細胞におけるマスター遺伝子を単離する試みがなされたが、その結果、マスター遺伝子こそ単離されはしなかったものの、心筋細胞の発生に重要な遺伝子として *Nkx-2.5*, *GATA4*, *MEF2C*, *eHAND*, *TEF-1* などの心筋組織の形成において重要な役割を果たす遺伝子が次々に発見され²⁻⁶⁾、心筋細胞の発生メカニズムの解明へ大きく貢献した。これらの遺伝子の導入により生理的な心筋細胞発生分化のプログラムを再現できれば、非心筋細胞の心筋細胞への分化誘導が実現できるのではないかと期待されている。

他の心筋再生の方法として、細胞の分裂増殖をつかさどる遺伝子を導入することにより、一度最終分化に至り増殖する能力を失った心筋細胞に、再び細胞分裂能を獲得させるという試みがある。細胞の分裂増殖にはサイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase : CDK) などの細胞周期調節遺伝子、癌抑制遺伝子などの細胞周期にかかわる遺伝子が関与しているが、これまで細胞周期調節遺伝子や発癌ウィルスの腫瘍抗原 (SV40 large T 抗原など) を心筋細胞に遺伝子

《略語一覧》

CDK (cyclin-dependent kinase ; サイクリン依存性キナーゼ)

導入する事で、分裂増殖可能な心筋細胞を作成する研究がなされている⁷⁾。

そして第3の方法として、各種の多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導させる方法が挙げられるが、その際に用いられる幹細胞としては、体性幹細胞としての骨髄間葉系幹細胞と ES 細胞に期待が寄せられている。ES 細胞の増殖能は著しく、心筋細胞へ効率的に分化誘導を行う技術が確立されれば、細胞供給源として極めて有用となる可能性を秘めている。しかし、ES 細胞を作成する際に倫理的な問題が生じること、移植後の拒絶を回避するためには、宿主と同一の遺伝子を持った ES 細胞を用いる必要があるが、そうした ES 細胞を作成するのにあたり、表現形に異常をきたさずに核移植を行う手法が確立されるまでには、まだしばらく時間を要するであろうことなどが、現在の障害となっている。こうした背景の中で、宿主由来の間葉系幹細胞を用いて心筋細胞を再生させる手法は倫理的な問題がなく、拒絶の心配もないことから臨床への応用を考えた際に理想的な方法といえる (表1)。

2. 心筋細胞の再生

1) 体性幹細胞を用いた心筋細胞の再生

近年の研究により、成人の組織においても様々な臓器において、未分化幹細胞が残存していることが明らかになった。間葉系の幹細胞としては、骨髄中の幹細胞が注目されている。骨髄の細胞は、将来血球に分化する造血幹細胞とこれに由来する各種の血球系細胞、そしてこの血球系細胞を支持するための骨髄間質細胞より構成される。骨髄間質細胞は多彩なサイトカイン・細胞増殖因子等を分泌し、また造血幹細胞が生存・機能していける微小環境を構築し、血球系細胞の再生・増殖・

表1 心筋細胞再生のための戦略

心筋細胞再生法	方 法	課 題
心筋細胞特異的転写因子の遺伝子導入	<p>マスター遺伝子の導入 非心筋細胞 → 心筋細胞</p>	心筋細胞分化過程の解明 心筋のマスター遺伝子の単離 遺伝子導入のためのベクターの開発
心筋細胞の細胞分裂能獲得	<p>細胞周期調節遺伝子 心筋細胞 → 分裂可能な心筋細胞</p>	心筋細胞の終末分化機序の解明 遺伝子導入のためのベクターの開発
未分化幹細胞から心筋細胞への分化誘導	<p>分化誘導 未分化幹細胞 (骨髄間葉系幹細胞) → 心筋細胞</p>	未分化幹細胞の単離 効率的な分化誘導法の確立 (分化に必要な細胞増殖因子などの同定)

分化を補佐するという機能を持つ。最近の研究によれば、骨髄間質細胞中には間葉系の多能性幹細胞が含まれており、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、靭帯、腱などの中胚葉系の様々な細胞に分化することが報告されている。

我々はマウス骨髄の初代培養を行い、付着系の細胞である骨髄間質細胞を分離した後、これを長期培養することで不死化した細胞株を作成した。この多クローン細胞株にDNAの脱メチル化剤である5-アザシチジンを添加し、さらに2週間程度培養を続けると少ない確率ではあるが、自己拍動する細胞が得られた。こうして得られた細胞株のなかで自己拍動する割合の高いクローンをcardiomyogenesis (CMG) 細胞株として樹立した。CMG細胞は5-アザシチジンにより最終的に分化誘導を行うと約30%の細胞が自己拍動を開始するようになった⁸⁾。

2) 骨髄由来の心筋細胞の特徴

CMG細胞は最終分化誘導を行う前には線維芽細胞様の形態を示している(図1)。5-アザシチジンによる最終分化により形態は著しく変化し、分化誘導1週目頃より一部の細胞の細胞質が大きくなり、円形あるいは棒状を呈するようになる。分化誘導後2週になると、こうした細胞は互いに連結しあい、筋管細胞様となる。3週以後には、多くの細胞が縦に並べられ、同期して収縮する。分化誘導4週以後には、培養皿の上の連結される細胞はすべて同期して収縮し心筋組織様になる。

心筋細胞は横紋筋であるが、CMG細胞も電子顕微鏡で観察すると典型的な横紋構造が観察され、また心房性ナトリウム利尿ペプチドを含有する心房顆粒と思われる高密度顆粒を多数認めた。遺伝子レベルでの解析では、CMG細胞は心筋細胞特異的とされる心房性ナトリウム利尿ペプチド(artial natriuretic polypeptide: ANP) および脳

《略語一覧》

CMG (cardiomyogenesis)

ANP (artial natriuretic polypeptide; 心房性ナトリウム利尿ペプチド)

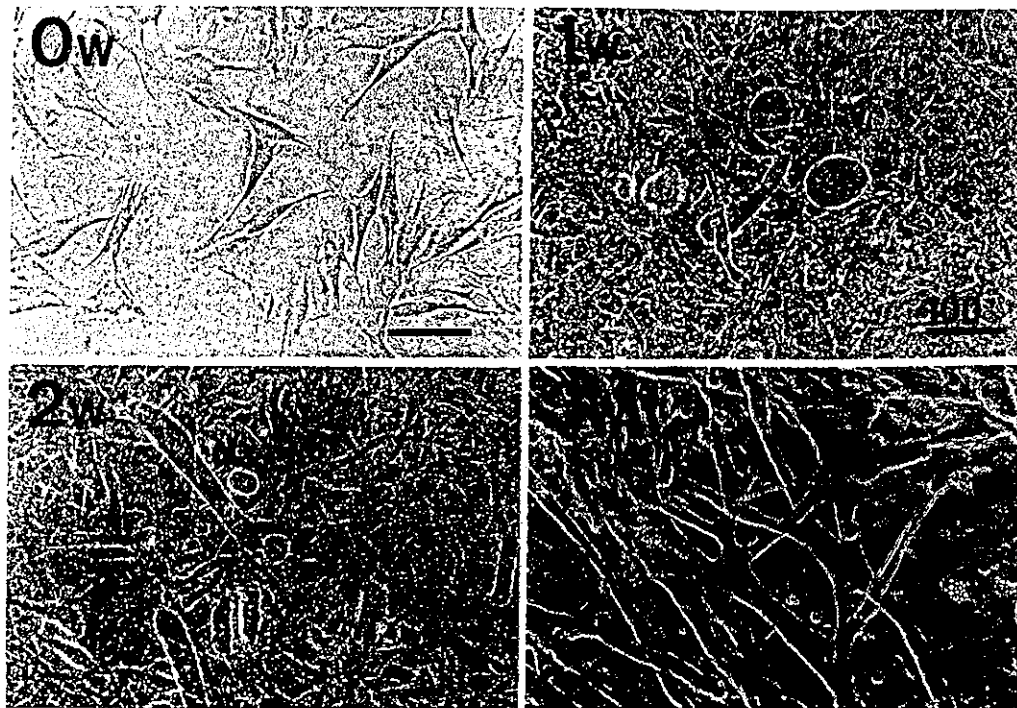


図1 最終分化誘導におけるCMG細胞の位相差顕微鏡写真

5-アザシチジンによる、最終分化誘導後のCMG細胞像。(左上) 5-アザシチジン投与前のCMG細胞。線維芽細胞に似た様相を呈する。(右上) 5-アザシチジン投与後1週間後のCMG細胞。(左下) 5-アザシチジン投与後2週間後のCMG細胞。棒状に形態変化した細胞が認められる。(右下) 5-アザシチジン投与後3週間後のCMG細胞。ネットワークを形成した細胞が同期した自律収縮を示す。(パネル内の線は100 μmを示す。)

性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide : BNP) を発現していた。

心筋細胞は筋肉が収縮するための蛋白として α -アクチン、ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖などを持っているが、これらの収縮蛋白にはいくつかのアイソフォームが存在しているが、それは胎児(胎仔)期と成人(成獣)期、あるいは心房と心室などで筋肉の収縮速度、エネルギー効率などが異なり、それぞれに都合の良い条件を整えるためと考えられている。生体内の心筋細胞とCMG細胞の収縮蛋白のアイソフォームを表2に示した。

心筋細胞に分化したCMG細胞の場合、上記の様に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。また、CMG細胞では分化誘導後にはナトリウム利尿ペプチドである ANP, BNP の発現が観察された。心筋収縮蛋白質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、胎仔型心室筋細胞の形質をもつと考えられた。

心筋細胞は自律神経の作用により、心拍数の変動、心収縮力の調整、興奮伝播速度の調節が行われる。交感神経と副交感神経は神経終末よりノルエピネフリンとアセチルコリンを分泌する。一方、心筋側はノルエピネフリンの $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ 受容体、アセチルコリンのムスカリン型 M1,

《略語一覧》

BNP (brain natriuretic peptide ; 脳性ナトリウム利尿ペプチド)