

氏 名 モーセン ホセイんカニ Mohsen Hosseinkhani  
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)  
 学位記番号 医 博 第 3136 号  
 学位授与の日付 平 成 19 年 5 月 23 日  
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当  
 研究科・専攻 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻  
 学位論文題目 Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells  
 (トリコスタチンAはサル胚性幹細胞の心筋への分化を促進する)

論文調査委員 (主 査)  
 教 授 篠 原 隆 司 教 授 野 間 昭 典 教 授 山 中 伸 弥

### 論 文 内 容 の 要 旨

ヒト胚性幹 (ES) 細胞は、心臓疾患の治療のための心筋細胞の供給源になると考えられている。しかし、ヒト ES 細胞を心臓治療に応用する前に、霊長類などの大型動物で臨床使用の妥当性を評価することが不可欠である。カニクイザル ES 細胞は、ヒト ES 細胞と同様の性質を持ち霊長類研究に使用可能であることから、ヒト ES 細胞の妥当性評価のための有用なモデルである。

本研究において、サル ES 細胞の心筋細胞への分化を分析し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) 刺激によってゼラチンコーティングディッシュに播種した細胞の心筋分化が促進されることが実証された。

凝集 ES 細胞クランプによって得られた胚様体 (EB) を 10 日間培養し、ゼラチン処理ディッシュと非ゼラチン処理ディッシュに移した。7 日後、細胞の心筋分化に対する TSA の 24 時間刺激の作用を、EB の自然収縮ならびに心筋収縮タンパク質の発現 (免疫細胞化学、イムノブロットングおよび RT-PCR で分析) によって確認した。

ゼラチン処理ディッシュに播種した ES 細胞の TSA 刺激によって、心筋  $\beta$  ミオシン重鎖 ( $\beta$ -MHC) 陽性細胞の割合が増加していた。 $\beta$ -MHC および別の心筋収縮タンパク質  $\alpha$ -sarcomeric アクチンに対するウェスタンブロットングからも、ゼラチン処理ディッシュ内で TSA 刺激によって心臓タンパク質の発現が上昇したことが確認された。これらの結果は、TSA とゼラチンコーティングが相乗的に働いてカニクイザル ES 細胞の心筋分化を誘導することを示唆している。TSA がカニクイザル ES 細胞の心筋への分化を誘導するメカニズムを解明するために、重要な心筋転写因子である GATA-4 とヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を有するそのコアクチベーター p300 の発現をウェスタンブロットングによって評価した。本研究において、サル ES 細胞への TSA 刺激は p300 の発現を上昇させたが、ゼラチン処理ディッシュ単独での培養は p300 の発現レベルを変化させなかった。一方、GATA-4 の発現レベルは TSA またはゼラチンによる影響を受けなかった。ES 細胞の TSA 処理は、アセチル化されたヒストン-3 およびヒストン-4 のレベルを上昇させたが、全ヒストン-3/4 のレベルには影響を与えなかった。しかし、TSA 刺激とは対照的にゼラチン処理ディッシュの使用のみではヒストンのアセチル化を誘導しなかった。サル ES 細胞の TSA 誘導心筋分化の心筋特異性を確認するために RT-PCR 分析を実施した。その結果、TSA が心臓特異的遺伝子の発現のレベルを有意に上昇させることが明らかになった (Nkx2.5 :  $2.3 \pm 0.4$  倍、 $\alpha$ -MHC :  $3.7 \pm 0.5$  倍)。一方、TSA は血管内皮特異的遺伝子の発現は誘導しなかった。

このように、TSA ヒストン脱アセチル化酵素阻害と p300 発現誘導によりアセチル化を引き起こし、これがカニクイザル ES 細胞の心筋細胞への分化に関与していると考えられる。また、TSA 処理とゼラチンコーティング担体は独立したメカニズムによって心筋分化を誘導すると思われた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではカニクイザル胚性幹細胞 (ES 細胞) の心筋細胞への分化における、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコ

スタチン A の作用が明らかにされた。

カニクイザル ES 細胞は胚様体形成を介した分化誘導を行うことで拍動する典型的な心筋細胞分化することが明らかとなった。さらにゼラチンコーティングディッシュに播種されたサル ES 細胞の胚様体をトリコスタチン A で 24 時間処理することにより心筋への分化が亢進した。また、トリコスタチン A はヒストンのアセチル化と、細胞に存在する内因性ヒストンアセチル転移酵素のひとつである p300 の発現を誘導することが分かった。これらのことからトリコスタチン A はヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用に加えて、p300 の誘導作用によりサル ES 細胞のヒストンアセチル化を促進し、心筋への分化誘導作用を示すことが示唆された。

末期心臓疾患の根本的治療には心筋細胞の再生療法が必須であり、ヒト ES 細胞は細胞移植による心臓疾患治療のための将来の心筋細胞供給源として期待されている。ヒト ES 細胞と極めて類似した性質を示すカニクイザル ES 細胞を用いた本研究は、ヒト ES 細胞の心筋分化研究に寄与するものであると考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 5 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。