

京都大学	博士 ( 医 学 )	氏 名	鶏内 伸二
論文題目	<b>Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice.</b> (ゼラチンコート平面培養法を用いたマウス人工多能性幹細胞における細胞株依存性心筋分化の検討)		
(論文内容の要旨) <b>目的：</b> マウス、ヒト線維芽細胞に3つもしくは4つの転写因子 Oct3/4, Sox2, Klf4, (及び c-Myc)を導入し、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)を作成することが可能となった。重症心不全患者の iPS 細胞から患者特異的心筋細胞を誘導し、細胞治療に用いる事が期待されており、その際に高い心筋分化効率を得ることは肝要である。本研究の目的は多種の iPS 細胞株から心筋細胞を分化誘導し、心筋分化効率の違い、心筋分化効率に関わる因子を検討することである。 <b>方法、結果：</b> iPS 細胞株として4つの遺伝子を導入した細胞株 (38C2, 20D17) と c-Myc を除く3つの遺伝子を導入した細胞株 (256H18)、コントロールとして ES 細胞株 ht7 を用いた。iPS 細胞と ES 細胞の未分化維持、分化培養にはゼラチンコートした dish、6 well-plate を用いた。分化誘導は、胚葉体を形成せず single cell を直接 well 上に播種した。この培養法は簡便で再現性が高く初期の心筋分化の検討に適すると考えられた。iPS 細胞、ES 細胞から心筋分化を誘導すると iPS 細胞株 38C2, 256H18、ES 細胞からはほぼ同様なパターンで心筋特異的遺伝子の発現と収縮コロニーの出現が認められた。しかし iPS 細胞株 20D17 は心筋特異的遺伝子の発現が極めて低く、収縮コロニーの出現効率も極めて低かった。分化誘導後7日目にヒストン脱アセチル酵素 (HDAC) 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を加えると、すべての細胞株で心筋特異的遺伝子の発現亢進を認めた。細胞株 20D17 は Nkx2.5 の発現レベルは最も低値だったが、TSA による反応は最大で、TSA 付加後の Nkx2.5 発現レベルは他の細胞株と変わらなかった。TSA はまた心筋収縮蛋白 myosin heavy chain(c-MHC)、myosin light chain 2v の蛋白、mRNA レベルの発現を上昇させ、c-MHC 陽性細胞数を増加させた。しかし TSA による血管特異的マーカーPecam の発現亢進は認めなかった。これら TSA の効果は別の HDAC 阻害剤でも確認された。次に心筋分化効率の違いを生じるメカニズムを検討するため、Oct3/4 の mRNA 発現レベルを検討した。その結果、心筋分化効率の高い 38C2 では分化誘導後8日目以降に Oct3/4 発現はほぼ認められなくなるのに対して、心筋分化効率の低い 20D17 では分化誘導後5日目以降も高い発現が持続することが明らかとなった。さらに核内において心筋特異的転写因子に結合し、心筋分化を抑制するとされる HDAC4 の核蛋白レベルを検討した。分化誘導後7日目において心筋分化効率の低い 20D17 では他の細胞株 38C2, 256H18 に比べ有意に HDAC4 レベルは高値であった。さらに TSA 刺激により HDAC4 の核蛋白レベルは低下した。最後に DNA マイクロアレイで心筋分化効率の高い細胞株 38C2 と心筋分化効率の低い細胞株 20D17 の分化誘導前の遺伝子発現を網羅的に検討した。心筋分化に関与する遺伝子で、20D17 細胞株で特異的に上昇もしくは低下している遺伝子を同定した。未分化 iPS 細胞において心筋分化効率の良い細胞株を分化誘導前に選択出来る可能性があり、今後さらに検討する予定である。 <b>結論：</b> マウス iPS 細胞は細胞株特異的に心筋に分化する。心筋分化効率に違いを生じる原因として Oct3/4, HDAC4 の関与が示唆された。TSA は心筋分化を促進し、細胞株間の分化効率の差を縮小させる可能性がある。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、ゼラチンコート平面培養法において、多種のマウス iPS 細胞株の心筋分化効率の違いから、心筋分化に関与する因子を同定し、さらに HDAC 阻害剤トリコスタチン A (TSA) の心筋分化に与える影響を検討したものである。

iPS 細胞株 3 株と ES 細胞株 1 株の心筋分化パターンを比較したところ、一つの iPS 細胞株において、他の細胞株に比べて心筋特異的遺伝子の発現や収縮細胞の出現率が極めて低いことが明らかとなった。この細胞株においては分化誘導後の Oct3/4 の発現や心筋分化を抑制する HDAC4 の核蛋白レベルが高値だった。次に iPS、ES 細胞株に TSA を投与したところすべての細胞株で心筋特異的遺伝子の発現上昇を認め、心筋分化を促進させた。この効果は心筋分化効率の低い細胞株で最も顕著だった。

以上の結果より、心筋分化初期において Oct3/4 の発現レベルや核内 HDAC4 の発現レベルが心筋分化を制御している可能性が示唆された。また TSA はすべての細胞株で心筋分化を促進させ、そのメカニズムの一つとして HDAC4 を核外へ輸送することで HDAC4 による心筋特異的転写因子の抑制を解除した可能性がある。今後これらの因子が生体の心筋発生においても関与しているかどうかを自然発生に近い系を用いて解析する必要がある。

以上の研究は初期心筋分化のメカニズムの解明に貢献し心筋細胞を用いた細胞移植治療の確立に寄与する。

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 22 年 10 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降