

京都大学	博士（医学）	氏名	檜 崎 元 太
論文題目	Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells and their application to chemical screening (人工多能性幹細胞からの系統的心血管細胞分化誘導法の確立及び化合物探索応用へ向けた基礎研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>人工多能性幹細胞(iPSC)は、胚性幹細胞(ESC)様の新たな幹細胞であり、再生医療や病態解明の新たなツールとして期待されている。しかし、特定の細胞系譜への分化能が不明であり、応用のためには特定の細胞へ分化誘導法の確立が必要であった。そこで ESC における分化誘導方法を応用し、iPSC の 1) 心血管系細胞への分化誘導法の確立、2) ESC との分化誘導効率の比較、また応用のための基礎研究として、3) 化合物スクリーニング系への応用を試みた。</p> <p>分化誘導には、ESC の分化誘導系(Yamashita, Nature, 2000; FASEB J, 2005)を応用した。未分化 iPSC を IV 型コラーゲン上にて LIF (leukemia inhibitory factor)非存在下に分化培地を用いて培養し、中胚葉レベルの前駆細胞(Flk1 陽性細胞)を誘導した。分化誘導 4.5 日目に Flk1 陽性細胞を FACS により純化した。Flk1+細胞を VEGF (血管内皮増殖因子) 存在下に再培養し動脈内皮細胞を誘導した。心筋・リンパ管内皮細胞は、マウス骨髄ストローマ細胞 OP9 と共培養により誘導した。各分化段階の細胞の遺伝子発現は FACS、免疫染色及び RT-PCR により検討した。</p> <p>その結果、ESC 及び iPSC は、ほぼ同様の分化動態を示した。すなわち、両細胞とも分化誘導 3-4 日後より Flk1 陽性細胞が出現し、4.5 日目に最も高い陽性率を示した。Flk1 陽性細胞を血清及び VEGF 存在下に培養すると静脈内皮細胞及び血管壁細胞が選択的に誘導された。cAMP シグナルを VEGF と同時に活性化することにより動脈内皮細胞が分化した。OP9 細胞上で培養するとリンパ管内皮細胞及び拍動心筋細胞が誘導された。分化誘導による遺伝子発現変化及び Flk1 陽性率や心血管細胞の分化効率は ESC とほぼ同等であった。誘導された血管細胞は 3 次元培養下に内皮細胞による管腔形成と壁細胞の支持を伴う血管様構造を形成した。誘導自己拍動心筋細胞は ES 細胞由来心筋細胞と同様の遺伝子発現と活動電位を示した。分化誘導後の長期培養 (2 ヶ月) において iPSC 樹立時に導入した c-myc 遺伝子発現が再上昇する例が認められた。</p> <p>また、iPSC 分化系の創薬研究応用の可能性を検討するため、3 次元培養による血管形成過程モデルを用いて血管新生抑制物質の作用を検討した。血管新生抑制作用が報告されている海洋生物由来新規ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) Azumamide に関して、その種々の誘導体を添加したところ、誘導体により異なる濃度依存的血管形成阻害作用が確認された。</p> <p>以上、マウス iPSC からの心血管系細胞の系統的分化誘導法の確立に成功した。iPSC は <i>in vitro</i> での中胚葉及び心血管系細胞分化に関し、ESC と同等の分化能及び分化動態を示した。iPSC はこれらの細胞系列の分化に関して、ESC と同等のレベルまで十分に再プログラミングされており、ESC において開発・確立された分化誘導法は、iPSC にも応用可能と考えられる。また、確立した分化</p>			

誘導系を応用することにより、新規作用の化合物探索も可能であることを示した。創薬応用を始めとする iPSC 研究の基礎的技術基盤の形成に成功したと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

人工多能性幹細胞 (iPSC) は、分化細胞から誘導された多能性幹細胞であり、基礎医学をはじめ細胞治療や創薬などを通し広範な臨床応用が期待されている。しかし、応用に必要な特定の細胞への分化誘導技術や分化効率等は不明であった。

本研究において申請者は、マウス胚性幹細胞(ESC)にて確立した分化誘導方法を応用し、マウス iPSC からの系統的心血管系細胞の誘導を行った。iPSC から誘導した Flk 陽性の中胚葉レベルの細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞 (動脈リンパ管内皮細胞の 3 種類)、血管壁細胞、拍動心筋細胞、血球細胞の誘導に成功した。Flk1 陽性細胞の 3 次元培養により、内皮細胞と壁細胞からなる 3 次元的血管構造を形成することにも成功した。分化誘導に要する時間や効率、遺伝子発現動態は ESC とほぼ同様であった。これらの結果より、iPSC は ESC と同等の未分化性を有しており、iPSC の分化研究には既存の ESC の方法が応用可能であることが示された。

さらに、創薬研究応用の可能性を明らかにするため、iPSC の 3 次元的血管構築モデルを用いて低分子化合物の血管形成阻害効果の検討を行った。血管構造誘導過程において、HDAC 阻害剤を作用させることにより濃度依存的血管形成阻害が認められ、iPSC を用いた培養系が種々の化合物探索・評価に有用であることが示された。

以上の研究は iPSC の心血管系細胞分化研究やその応用における基盤作りに貢献し、幹細胞を用いた医学・生物学の発展に寄与するところが多い。

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 23 年 1 月 5 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