

|          |   |
|----------|---|
| 氏名       | いいだ みどり   |
| 学位(専攻分野) | 博士(医学)  |
| 学位記番号    | 医博第2892号  |
| 学位授与の日付  | 平成17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   | Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31 and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation<br>(胚性幹細胞分化における FLK1, CD31 及び VE-cadherin の発現から同定した心筋前駆細胞) |
| 論文調査委員   | (主査) 教授 中辻憲夫 教授 山中伸弥 教授 篠原隆司  |

### 論文内容の要旨

胚性幹細胞(以下 embryonic stem cells:ES 細胞とする)は様々な組織に分化できる多分化能を有するため移植再生医療の礎となることが期待されている。しかし、心筋細胞には血液細胞などのように特異的な細胞表面抗原が同定されておらず、ES 細胞から心筋細胞を特異的に単離する基盤技術の開発が模索されている。

今回筆者らは心筋細胞が中胚葉由来であることより、早期の中胚葉のマーカーである vascular endothelial growth factor receptor の一つの FLK1 に注目し、FLK1 をマーカーとして ES 細胞由来の心筋前駆/幹細胞の同定、分離を試みるとともに、FLK1 の心筋細胞分化における意義について検討した。

はじめに、ES 細胞を分化誘導後第3日、4日及び5日目の embryoid body (EB) をフローサイトメトリーにて FLK1 陽性細胞、陰性細胞に分取しそれぞれの細胞を OP9 ストロマ細胞と共培養し、心筋細胞への分化を行った。分化誘導後第3日及び4日目の EB 由来の FLK1 陽性細胞は陰性細胞に比し高率に収縮する心筋細胞コロニーを形成した。一方、第5日目由来の細胞は FLK1 陽性細胞陰性細胞ともに収縮する心筋細胞の形成は認めなかった。また、第4日目由来の FLK1 陽性細胞の多くで血管内皮細胞や血液細胞も心筋細胞と伴って認めた。

次に FLK1 陽性細胞における心筋前駆細胞の特性を調べた。血管内皮細胞のマーカーである CD31 および VE-cadherin を用い同様にフローサイトメトリーにて細胞分取分化を行い、検討したところ、FLK1 陽性 CD31 陰性 VE-cadherin 陰性の細胞分画でより高率に心筋細胞分化を認めた。

以上まとめると、今回の筆者らの検討により、FLK1 は血管内皮細胞や血液細胞への分化だけではなく、心筋細胞への分化にも深く関わっていることがわかった。特に分化誘導後第4日目由来の FLK1 陽性細胞は心筋細胞、血管内皮細胞及び血液細胞への分化が同等に認められ、cardiohemangioblast としての役割を担っている、と考えられた。特に FLK1 陽性 CD31 陰性 VE-cadherin 陰性細胞は心筋前駆/幹細胞の一つの有意なマーカーであることが示唆された。ここで述べた ES 細胞を用いた心筋細胞への分化機構は今後の心筋前駆細胞の解明や ES 細胞による細胞治療の開発に役立つものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は胚性幹細胞(ES 細胞)からの分化過程における心筋前駆細胞の特性を調べるために中胚葉早期のマーカー FLK1 に着目し解析した。

ES 細胞を分化誘導後 FACS sorting にて FLK1 陽性細胞、陰性細胞に分取し RT-PCR にて解析したところ、心筋発生の中で早期のマーカーである Nkx2.5 は FLK1 陽性細胞では4日目での発現が強く、陰性細胞では陽性細胞に比し発現も弱く、OP9 細胞との共培養でも陰性細胞は陽性細胞より一日遅れて心筋細胞を認めた。また、FLK1 陽性細胞の特性を調べるために先の実験で血管内皮細胞を多く伴って心筋細胞が認められたことに着目し、血管内皮細胞のマーカーである

CD31, VE-cadherin を用い, 同様に cell sorter にて細胞採取後 OP9細胞と共培養した。分化後4日目の細胞で有意に FLK1+CD31<sup>-</sup>VE-cadherin<sup>-</sup>細胞で多くの心筋細胞を認め, 同様に血液細胞, 血管内皮細胞も認め, この細胞が心筋前駆細胞の性質を持ち, さらに cardiohemangioblast という心筋細胞, 血液細胞, 血管内皮細胞の共通の新たな母細胞の存在が示唆された。また, clone sorting による解析でも一つの細胞から3系統の分化が確認された。

以上の研究は ES 細胞から分化誘導した心筋前駆細胞の性質を明らかにし, さらに cardiohemangioblast の存在を探究しえたという点で大きな意味を持ち, このシステムは今後の心筋分化機構の解明に大いに貢献すると考えられる。

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17年3月29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。