

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	山 内 香 織
論文題目	Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by β -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs (ヒト ES 細胞からの心筋細胞への分化は β -catenin の活性化および BMP シグナルの抑制による原条前側領域の形成を経由して誘導される)		
(論文内容の要旨)			
胚性幹細胞（ES 細胞）は、三胚葉由来の様々な組織細胞へと分化しうる多能性を保持する。ES 細胞から機能的な組織細胞を得るには正常発生に沿った分化誘導が効果的であることが最近数多く報告されている。マウスにおいて、心筋細胞は個体発生の初期に形成される原条前側領域に由来する中胚葉から発生することが知られている。したがって、原条前側領域の形成を経由した ES 細胞からの心筋細胞への分化誘導法の確立は、正常発生に沿った心筋細胞の発生、分化過程の培養下での研究を可能にするため非常に重要であるが、ヒトにおいては分化過程の詳細は明らかでない。そこで本研究において、ヒト ES 細胞から原条前側領域の形成を経由した心筋細胞への分化誘導を試みた。 これまでに、Wnt/β-catenin シグナルの活性化によりヒト ES 細胞が原条領域へと分化すること、またβ-catenin の活性化と同時に Noggin により BMP シグナルを抑制すると、誘導された原条細胞は原条の前側領域に特徴的なマーカー遺伝子を発現することが示されている。そこで、タモキシフェン（4OHT）応答性の安定型 β-catenin を発現するヒト ES 細胞を用い、原条の前側領域に分化誘導した後、BMP4 と FGF2 を含む培地で浮遊培養を行った。原条前側領域の形成は、4OHT 処理後 3 日目には認められていたが、心筋細胞の誘導条件を最適化するために、4OHT および Noggin 処理日数を 2～4 日間とし、検討を行った。その結果、2 日処理した細胞からは心筋細胞は認められなかったが、3 および 4 日処理した細胞からは心筋細胞が観察された。細胞塊に含まれる心筋細胞は、3 日処理では約 10%にとどまったが、4 日処理では 20%以上であった。したがって、4OHT と Noggin 処理日数は、心筋細胞誘導効率が最も高かった 4 日が最適であると判断した。4OHT と Noggin で 4 日間処理した細胞は、浮遊培養開始 5 日後にはほぼすべての細胞塊で拍動細胞が観察された。また、心筋細胞の割合は、培養 10 日目で約 10%、26 日目には約 30%にまで増加した。免疫染色により、Nkx2-5、α-actinin、MHC といった心筋細胞マーカーの発現だけでなく、平滑筋マーカーSM-MHC や内皮マーカーCD31 陽性細胞の存在が確認された。パッチクランプ法により、単一心筋細胞での活動電位も観察された。一方、Noggin 非存在下でβ-catenin を活性化した細胞からは、心筋細胞はほとんど出現してこなかった。この結果は、4OHT によるβ-catenin の活性化と BMP シグナルの抑制により誘導された原条前側領域に心筋細胞への分化能を有する細胞が存在することを示唆している。次に、遺伝子操作を行っていないヒト ES 細胞でも同様の方法で心筋細胞へと分化誘導を行った。Noggin 存在下で、GSK3 インヒビターである CHIR99021 を用いてβ-catenin を活性化すると、培養開始 10 日目に全ての細胞塊で拍動細胞が認められた。心筋細胞の出現率は、約 20%であった。それに対して、Noggin を加えない条件では心筋細胞はほとんど観察されなかった。			

以上の結果から、ヒトにおいても心筋細胞は原条前側領域に由来する中胚葉から分化誘導されることができると考えることができる。また、この誘導法はこれまでに報告されている心筋分化誘導法とは異なる正常発生に沿った方法であり、心筋細胞の発生、分化過程を培養下で再現できる興味深いモデルとなり得ると考える。
(論文審査の結果の要旨) 胚性幹（Embryonic stem: ES）細胞を起点とした特定の細胞系譜誘導法の開発は、発生学のみならず再生医学・医療に貢献する。本研究では、初期発生を模倣した培養環境下で、ヒト ES 細胞から機能的な心筋細胞を高い効率で得るための方法論の開発を行った。 ヒト ES 細胞から、薬剤誘導システムを用いたβ-catenin の活性化によって誘導される後側原条様細胞と、Noggin 存在下で誘導される前側原条様細胞のそれぞれについて、BMP 及び FGF シグナルによる心筋形成能を検討した。その結果、β-catenin の活性化と BMP シグナルの抑制により誘導される前側原条様細胞から拍動心筋細胞が形成されること、また、より高い効率で心筋細胞を得るためには、原条様細胞誘導条件とともに、それらから心筋を誘導する際の、BMP 及び FGF 濃度の最適化が重要であることが明らかとなった。さらに、GSK3 阻害剤を用いることで、β-catenin の遺伝子操作を行わない ES 細胞株からも、効率よく心筋細胞が誘導されることが示された。 以上の研究は、ヒトにおける心筋初期発生の解明に貢献するだけでなく、生体に近い心筋細胞の作製と詳細な特性解析を可能とすると期待され、将来の再生医療への応用を目指した基礎医学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 3月 7日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、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