

氏 名	ば ば し ろう 馬 場 志 郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3183 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	Flk1+ Cardiac Stem/Progenitor Cells Derived from Embryonic Stem Cells Improve Cardiac Function in a Dilated Cardiomyopathy Mouse Model (マウス胚性幹細胞に由来する Flk1 陽性心筋前駆細胞の拡張型心筋症モデルマウスへの細胞移植効果)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 横 出 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

重度心不全患者に対する最終的根治治療は心臓移植であるが、ドナー不足、経済的倫理的問題などが障壁となっている。近年種々の疾患への細胞移植療法が確立され、動物実験レベルであるが、心不全心筋に対しても心筋細胞移植が研究されている。細胞のソースとしては胎児心筋細胞、骨格筋芽細胞、平滑筋細胞、骨髄細胞、心筋内心筋幹細胞などが候補であるが、採取時の倫理的問題、ホスト心筋との電氣的結合能、増殖能、心筋分化効率等の点で十分でない。これら問題点をふまえ、全能性幹細胞 (ES 細胞) の増殖分化能に注目し、新たな細胞ソースとしての有効性を評価した。本研究においては、心臓原基である側板中胚葉に発現する遺伝子 Flk1 に注目し、in vitro、in vivo において心筋幹細胞マーカーとしての意義について検討した。

未分化マウス ES 細胞を Type IV コラーゲン上で分化培養することにより、分化 4 日目に、最大数の Flk1 陽性細胞を得た。この細胞は更に OP-9 ストローマ細胞と共培養することで活動電位を持った収縮するコロニーに分化し、免疫染色によって特異的心筋マーカーの発現が確認された。一方 Flk1 陰性細胞からも同様の方法で収縮する心筋細胞は出現するものの、Flk1 陽性細胞由来の心筋コロニー数と比べて有意に少数であり、RT-PCR による心筋特異的マーカー発現の評価においてもこの 2 群間に明らかな差があった。以上より、Flk1 は心筋幹細胞を選別する有効なマーカーと考えられた。次にドキソルビンで誘導した拡張型心筋症モデルマウスを用い、同 Flk1 陽性細胞の心筋分化能、心機能回復能へ及ぼす役割について検討した。ES 細胞分化 4 日目の Flk1 陽性細胞を拡張型心筋症モデルマウスの左心室前壁に直接注入することで細胞移植をした。エコーと心臓カテテル評価の結果、細胞移植した群は、Medium のみを注入した群または何も注入しなかった群と比べ、左心室拡張末期径拡大と左室駆出率低下の抑制、左室拡張収縮能の保持がみられた。この Flk1 陽性細胞移植群の左心室機能は細胞移植 10 週後も保持されていた。次に免疫染色で移植された Flk1 陽性細胞の心筋分化能を評価した。極一部 CD45 陽性の血球細胞に分化するも、大部分は心室筋マーカー、ギャップ結合マーカーを発現しており、周囲の細胞と電氣的関連をもつ可能性の高い成熟した心室筋に分化していた。これら心室筋分化した細胞の活動電位はパッチクランプ法によりマウス心室筋と同様の活動電位が記録され、この点からも移植 Flk1 陽性細胞が有効に心室筋に分化していると評価された。最後に Flk1 陽性細胞がホスト細胞と Fusion しうる可能性を評価した。FISH 法で評価した細胞の 94% が Fusion でなく Flk1 陽性細胞自身から分化したことが判明し、Flk1 陽性細胞自身の心筋分化が拡張型心筋症モデルマウスの心機能改善に寄与したと考えられた。この Fusion の結果もふまえ、全 Flk1 陽性細胞 3×10^5 細胞中で心筋に生着して分化した全心筋細胞数は平均 4.1×10^4 細胞 (13.6%) であり、その他の細胞ソースの報告と比べて有効に生着した。Flk1 陰性細胞を行った拡張型心筋症モデルマウスの心機能については細胞移植後も改善されず、Flk1 陽性細胞移植時には認められない腫瘍形成を認める個体が存在し、免疫組織学的にも心筋に分化しなかった。以上より、マウス ES 細胞は移植心筋内で有効に心筋分化できうることが証明された。その中でも Flk1 陽性細胞が特に有効に心室筋に分化し、心機能改善に寄与したことから、

Flk1 は心筋幹細胞マーカーとして有効であると考えられた。今後さらに純度高い心筋幹細胞を回収するために、Flk1 以外のマーカーについても検討していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

重症心不全患者に対する細胞移植療法の有用性が報告されるようになったが、細胞移植ソースや細胞選別法は未だ確立されていない。

申請者は、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）から分化させた心筋前駆細胞としての Fetal Liver Kinase 1（Flk1）陽性細胞を心不全モデルマウス心筋内に直接細胞移植し、心機能改善効果と移植細胞の *in vivo* での分化を評価した。

マウス ES 細胞をコラーゲン type IV 皿上で 4 日間培養すると、側板中胚葉に特異的なマーカー、Flk1 を発現した細胞集団が出現する。この Flk1 陽性細胞は Flk1 陰性細胞に比べ有意に心筋分化効率が高かった。また Flk1 陽性細胞は Flk1 陰性細胞に比べ、Nanog や Oct4 などの未分化細胞マーカーの発現が極めて弱く、心筋幹細胞マーカーである Sca-1、c-kit の発現が強かった。以上より Flk1 陽性細胞は心筋前駆細胞として使用可能な細胞と判断された。Flk1 陽性細胞を心不全モデルマウスの心筋内に直接移植したところ、移植後 4 週で心機能の改善が認められた。この移植細胞は免疫染色と電気生理学的評価の結果、心臓の構造の中で有効に心室筋に分化したことが示唆された。これら Flk1 陽性細胞は移植後 10 週の時点でも生着が確認された。Flk1 陽性細胞を移植した個体からは腫瘍形成を認めなかったが、Flk1 陰性細胞移植群の一部で腫瘍形成が認められた。

以上の研究はマウス ES 細胞由来心筋前駆細胞の心不全モデルマウスへの細胞移植効果の解明に貢献し、心不全患者に対する細胞移植療法の発展に寄与することが多い。従って、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 12 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。