

京都大学	博士（医学）	氏 名	魚 崎 英 毅
論文題目	Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression （ヒト胚性・人工多能性幹細胞からの効率的心筋細胞誘導法および純化法の確立）		
（論文内容の要旨）			
多能性幹細胞であるヒト胚性幹細胞(ESC)と人工多能性幹細胞（iPSC）は、ヒトにおける分化発生研究、再生医療や疾患モデルによる病態解明と創薬応用が期待されている。しかし、特定の細胞系譜への分化誘導法の開発は未だ不十分である。本研究においては、ヒト ESC/iPSC からの効率的な心筋分化誘導法と誘導心筋細胞の純化法の確立を目指した。 これまでの研究によりマウス ESC および iPSC は同等の分化能を有すること（参考論文 1）、免疫抑制剤 Cyclosporin A がマウス ESC、マウスおよびヒト iPSC からの心筋細胞分化を強く促進することを示した(Yan, Biochem Biophys Res Commun, 2009; 参考論文 2)。これらの結果は ESC と iPSC が同様の分化特性を有することを示唆している。 そこでまず、既報のヒト ESC 心筋細胞分化誘導法(Laflamme, Nat Biotechnol, 2007)を、当研究室で使用可能なヒト ESC 3 株、iPSC 9 株を用いて検討した。ESC/iPSC をマトリゲル上で未分化維持培養を行った後、ActivinA 100ng/mL を 24 時間、ついで BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) 10ng/mL を 4 日間無血清培養下に添加し中胚葉細胞を誘導する。その後、約 1 週間無血清培養を行うと拍動する細胞が出現する。iPSC (201B6 株)で最も分化効率が高く、約 10%の細胞が Cardiac troponin T (cTnT; 心筋細胞特異的マーカー) 陽性であった。同方法を改変し、中胚葉誘導に働く塩基性線維芽細胞増殖因子を BMP4 と同時に添加し、その後、中胚葉からの心筋細胞分化を促進する Dkk1 を添加することにより、cTnT 陽性率が $48 \pm 12\%$に改善し、高効率の心筋細胞分化誘導が可能となった。 次に同分化誘導系で誘導した細胞を用いて、細胞表面抗原に対する抗体ライブラリーをスクリーニングし、抗 VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule-1)抗体が特異的に心筋細胞を標識することを見出した。分化誘導 7 日目より cTnT 陽性細胞が出現し、約 2 日遅れて VCAM1 が発現し、11 日目には cTnT 陽性細胞の約 80%が VCAM1 陽性となる。VCAM1 陽性細胞は未分化マーカーTRA1-60、中胚葉・周皮細胞マーカーPDGFR8、内皮マーカーVE-cadherin などは発現せず、心筋に高い特異性を示した。分化誘導 11 日目に VCAM1 陽性細胞を Magnetic activated cell sorting により分離すると、$95.6 \pm 2.5\%$が cTnT 陽性であり、種々の心筋特異的遺伝子発現、電気生理学的検討、免疫染色などにより、心筋細胞であることが確認された。本分化誘導法および純化法は複数のヒト ESC/iPSC 細胞株においても適用可能であった。 以上、本研究においてヒト ESC/iPSC からの効率的心筋細胞分化誘導法および純化法を確立した。高効率かつ短時間で心筋細胞を調製することが可能となり、ヒト心筋細胞を用いた再生医療や疾患モデル応用への技術基盤の構築に成功した。			

（論文審査の結果の要旨） ヒト胚性幹細胞（ESC）と人工多能性幹細胞（iPSC）はいずれも体細胞全てに分化することのできる多能性幹細胞であり、再生医療、創薬などへの応用が期待されている。しかしながら、その応用のためには、特定細胞への分化誘導法およびその純化法の確立が急務である。 本研究において、申請者は ActivinA と BMP4 を用いる分化誘導法に bFGF および Dkk1 を組み合わせることにより、ヒト iPSC から高効率に心筋細胞を分化誘導することに成功した。さらに、VCAM1 が心筋細胞特異的表面マーカーであることを同定した。VCAM1 陽性細胞を MACS により純化することで、95%が心筋細胞マーカーcTNT 陽性であり、種々の心筋細胞特異的遺伝子を発現し、電気生理学的実験および免疫染色によりこれらの細胞が心筋細胞としての特徴を有することを示した。さらに、これらの分化誘導法・心筋細胞純化法は多くのヒト ESC/iPSC において用いることができることも示された。 本研究成果により、ヒト ESC/iPSC 由来心筋細胞を効率良く純化することが可能となり、ヒト心筋細胞を用いた再生医療や創薬などへの応用基盤技術となる可能性が示された。			
以上の研究はヒト ESC/iPSC からの誘導心筋細胞を用いる再生医療ならびに病態解明、創薬研究に貢献し、今後の医学・生物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 2 3 年 1 0 月 2 8 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			