

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	藤 原 正 隆
論文題目	Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A (サイクロスポリン A によるマウス及びヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導促進作用)		
(論文内容の要旨)			
体細胞をリプログラミングすることで得られる人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は新たに登場した有用な幹細胞ソースである。iPS 細胞は、ヒト ES 細胞樹立における倫理的問題や細胞移植時の拒絶の問題を回避できること及び様々な疾患特異的細胞モデルを作製できることなどから、細胞移植治療及び病態解明や創薬研究の対象として期待されている。分化後は分裂・再生能力に乏しい心筋細胞は、iPS 細胞応用の重要なターゲットであるが、iPS 細胞、特にヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導に関しては、誘導方法や効率は未だ限定的である。 これまで当研究室ではマウス胚性幹細胞（ES 細胞）から Flk1 陽性中胚葉細胞を誘導・純化し、これを OP9 細胞と共培養することで高率に心血管系細胞を得る手法を開発してきた。さらに Flk1 陽性細胞に由来する細胞分画中の Flk1 陽性/CXCR4 陽性/VE（vascular endothelial)-cadherin 陰性細胞（FCV 細胞）が心筋前駆細胞として機能することを示してきた。さらに最近、免疫抑制薬であるサイクロスポリン A がマウス ES 細胞からの FCV 細胞及び心筋細胞分化を強力に促進することを明らかにした。 本研究においては、サイクロスポリン A の効果を iPS 細胞に適用し、マウス及びヒト iPS 細胞からの効率的な心筋分化誘導法の開発を行った。 マウス iPS 細胞においても Flk1 陽性細胞を OP9 細胞と共培養することにより心筋細胞ならびに FCV 細胞が誘導されるが、サイクロスポリン A はこれら細胞の分化を強力に促進した。得られた細胞は形態的・機能的に心筋細胞の特徴を有していた。 ヒト iPS細胞においては、ヒト ES細胞と同様にマウス腹側内胚葉様細胞である END-2 細胞との共培養により心筋細胞が誘導された。サイクロスポリンAの添加により、拍動心筋細胞コロニーの出現が約 4 倍余りに増加し、サイクロスポリン Aが種を越えた異なる分化誘導システムにおいても有効に作用し、心筋分化を促進することが明らかとなった。得られた心筋細胞は心筋トロポニンT陽性で明瞭なサルコメア構造を有している。Fluo-8 色素を用いたCa⁺⁺取り込み実験では拍動に一致した蛍光強度の変化を認め、パッチクランプ法による活動電位の観察においては自動能を有した心筋細胞様のパターンや心室筋に近い波形を示す細胞など種々の機能的な心筋細胞の存在が示唆された。加温灌流下に於ける医薬品を用いた薬剤負荷試験ではⅢ群抗不整脈薬E-4031 によるQT時間の延長やβ刺激/阻害による拍動数の増減が観察された。さらに電子顕微鏡解析により種々の心筋特異的構造も確認された。これらの結果は、サイクロスポリンAを用いて誘導された心筋細胞が機能的・生理的に正常な条件を備えており、ヒト心筋細胞モデルとして創薬研究や病態解明への有力なツールとなりうることを示す。サイクロスポリンAの心筋分化誘導促進の作用機構についてはいまだその詳細は不明であるが、カルシニューリン-NFAT系の抑制剤であるFK506 や 11R-VIVIT			

では心筋分化促進作用を再現出来ないことから免疫抑制作用以外のサイクロスポリン A 特異的な作用であると考えられる。また近年、サイクロスポリン A は心筋再灌流障害に対してアポトーシス抑制作用から保護的に働くことが報じられている。サイクロスポリン A がすでに臨床で広く用いられている薬剤であることとあわせ、サイクロスポリン A の心筋再生治療への応用も期待される。このように本研究は、再生医療ならびに病態解明や創薬研究など幅広く医学研究の発展に貢献できるものと考えられる。
(論文審査の結果の要旨) 本研究では、マウス ES 細胞における心筋細胞分化促進効果が見出されたサイクロスポリン A（CSA）の、マウスおよびヒト iPS 細胞の心筋分化への効果を検討した。 マウス iPS 細胞では、iPS 細胞から分化した Flk1 陽性中胚葉細胞を骨髄間質細胞である OP9 細胞と共培養することで心筋細胞分化が誘導されるが、この分化誘導系において CSA は心筋細胞分化を強力に促進し、なおかつ得られた細胞は形態的・機能的に心筋細胞の特徴を有していた。ヒト iPS 細胞においては、ヒト ES 細胞と同様にマウス臓側内胚葉様細胞である END-2 細胞との共培養にて心筋細胞が誘導されたが、CSA は拍動心筋細胞コロニーの出現を約 4 倍に増加させた。こうして得られたヒト iPS細胞由来心筋細胞は、薬剤反応性の拍動数変化及び QT 延長現象を認め、また電子顕微鏡による観察においても心筋細胞に特徴的な微細構造を有しており、機能的かつ形態的に心筋細胞としての条件を満たしていた。本研究により示された、ヒト iPS 細胞からの CSA を用いた効率的な心筋細胞分化誘導法は、心筋再生医療への応用が期待できることに加え、誘導された心筋細胞は、生理学的条件を備えたヒト心筋細胞モデルとして、創薬研究や病態解明における有力なツールとなる可能性が示唆された。 以上の研究は心筋細胞の分化・再生機構の解明に貢献し再生医療ならびに病態解明や創薬研究など幅広く医学研究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 2 月 21 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。