

京都大学	博士（医学）	氏 名	顔 培実
論文題目	Cyclosporine-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells (Cyclosporin A による胚性幹細胞から心筋前駆細胞への特異的かつ効果的な分化促進)		
(論文内容の要旨)			
＜背景＞心筋再生医療において心筋前駆細胞は有望な細胞ソースであり、本研究室は Flk1 と CXCR4 の 2 種の細胞膜マーカーを用いて in vitro で心筋前駆細胞を単離することに成功した。しかし心筋前駆細胞の効率的な誘導法はいまだ確立していない。 ＜目 的＞本研究では免疫抑制剤の cyclosporine A (CSA)に着目し、ES 細胞から心筋細胞分化を誘導する際の CSA の有効性を検討した。 ＜方法と結果＞使用した細胞はマウス ES 細胞で aMHC (プロモーター)—Green fluorescent protein(GFP)を導入してあり、心筋細胞に分化した際には蛍光下で緑に光る細工がしてあり、EMG7 と名付けである。EMG7 を未分化な状態より、血清成分の入った分化誘導培地でコラーゲン IV デイッシュュ上で培養すると心臓血管系の細胞に分化しやすくなることが知られており、培養を 4. 5 日続けると心臓血管系の細胞に分化した場合、vascular endothelial growth factor(VEGF)のレセプターである Flk-1 receptor が細胞膜上に出現する。これを免疫染色、および、フローサイトメトリー (FACS) を利用することで、つまり Flk-1 陽性細胞を純化することで、ES 細胞由来の血管心筋前駆細胞を得る。さらに、それら血管心筋前駆細胞を間質細胞 (フィーダー細胞 : OP9 細胞) 上で培養すると約 2 日目より心筋前駆細胞を得る、約 4 日目より心筋の拍動コロニーを得る。 先ず、Flk-d0 日目に CSA を添加することにより、無添加に比べて約 17 倍心筋細胞が増殖するを発見し、免疫染色、RT-PCR とパッチクランプ法により、CSA 誘導心筋細胞が心筋細胞様の分子生物学の特徴を持つことを示した。CSA の特異段階の作用については CSA の添加で Flk1 陽性細胞に対して約 22 倍心筋前駆細胞増殖作用を認めた。一方未分化 ES 細胞に対して CSA より Flk 1 の発見には影響を及ぼさなかった。以上より、CSA は中胚葉期後、特に中胚葉から心筋前駆細胞に分化する段階において心筋前駆細胞の分化促進作用を持つことが示唆された。 また、FK506 と NFAT 抑制剤 11R-VIVIT の添加で心筋細胞の分化に影響は見られなかったことから CSA の心筋分化へ促進作用は NF-AT シグナルへの抑制活性とは独立であることが示唆された。さらに増殖心筋前駆細胞を免疫不全ラット慢性心筋梗塞に細胞移植を行い、移植 2 週間後心筋内生着と心筋細胞への分化を確認した。 ＜結論＞ CSA が心筋分化に重要な役割を持ってより、将来心筋再生医療に有効である可能性が示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） 心筋再生において心筋前駆細胞は有望な細胞ソースであり、本研究室はFlklとCXCR4の2種の細胞膜マーカーを用いてin vivoで心筋前駆細胞を単離することに成功した。しかし心筋前駆細胞の効率的な誘導法はいまだ確立していない。本研究では免疫抑制剤の cyclosporine A(CSA)に着目し、ES細胞から心筋細胞分化を誘導する際のCSAの有効性を検討した。 まずFlk0日目にCSAを添加することにより、無添加に比して約17倍心筋細胞が増殖することを発見し、免疫染色、RT-PCRとパッチクランプ法によりCSA誘導心筋細胞が心筋細胞様の分子生物学的特徴を持つことを示した。CSAの特異段階の作用については CSA の添加でFlk1陽性細胞に対して約22倍の心筋前駆細胞増殖作用を認めた。一方CSAは未分化ES細胞に対してFlk1の発現には影響を及ぼさなかった。 またFK506とNFAT抑制剤11R-VIVITの添加で心筋細胞の分化に影響は見られなかったことから、CSAの心筋分化への促進作用はNF-ATシグナルへの抑制活性とは独立であることが示唆された。さらに増殖心筋前駆細胞を免疫不全ラット慢性心筋梗塞に細胞移植を行い、移植2週間後心筋内生着と心筋細胞への分化を確認した。すなわちCSAが心筋分化に重要な役割を持っており、将来心筋再生医療に有効である可能性が示唆された。 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みとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成21年3月18日実施の論文内容とそれに関連した試問と受け、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			