

## 論文内容の要旨

論文題目 On the studies of cardiomyogenesis using mouse ES cells  
(マウス胚性幹細胞を用いた心筋発生に関する研究)

氏名 本多 賢彦

心筋は最終分化した細胞で、生後すぐに細胞周期から不可逆的に脱し、それ以降増殖することはないと考えられている。心筋梗塞や虚血などにより負った傷害が自然治癒することはなく、失われた機能の回復は見込めない。そのため心筋の再生は実現が待ち望まれている。また先天性の心疾患も数多く報告されており、それらの原因を探り治療法を開発する上で心筋発生の過程を解明することも重要な研究課題である。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は再生医療の材料として、また哺乳類の発生過程の研究のための重要なモデルとして期待されている。ES 細胞は胚盤胞に含まれる内部細胞塊と呼ばれる将来の胚体になる領域に由来する培養細胞であり、初期胚と同等の全能性を持っていると考えられている。さらに白血病抑制因子 (LIF) 存在下で全能性を維持したままほぼ無限に増殖することが可能であると考えられている。LIF 非存在下で ES 細胞を浮遊培養すると、胚様体と呼ばれる細胞塊を形成する。胚様体の中では三胚葉に由来する種々の組織細胞の分化が正常発生を模倣した形で進むことが知られている。ES 細胞は心筋分化についての研究にも数多く利用されてきた。自律的に拍動する心筋はその視認性の高さから簡単に得ることのできる細胞であると考えられており、ES 細胞を用いた心筋分化誘導系はすでに確立されたとすら考えられている。しかし実際には選択的に心筋を分化させることに成功した例はほとんど無い。このことは、ES 細胞を材料とした再生医療の実現にとっても、また、ES 細胞を心筋発生の研究にとって有用なものとするためにも大きな妨げになっている。

本研究において私は、マウス ES 細胞から大量の心筋を選択的に取り出すことを実現するために二つの方法を模索した。一つは心筋分化を促進する因子の探索である。探索にあたっては血清の影響をできるだけ排除した条件で分化誘導を試みることにした。なぜな

ら血清には既知のものだけでなく、未知の分化に影響を与える因子が数多く含まれており、血清存在下では誘導因子の効果を十分に検討することや、特定の細胞系譜への高効率な分化誘導を行うことは困難であると考えられるためである。もう一つは、心筋前駆細胞を濃縮する方法の開発である。開発された濃縮法は、心筋を選択的に分化させる誘導系と組み合わせることで、純度の高い心筋を大量に作り出すことが可能になると同時に、心筋の発生過程の解明にも有用であると考えられる。

第一章では RXR リガンドが心筋分化に影響を及ぼすことを示した。レチノイン酸 (RA) はビタミン A の代謝産物で、核内受容体に結合して標的遺伝子の制御を行う。RA の受容体にはレチノイン酸受容体 (RAR) とレチノイド X 受容体 (RXR) の二つのサブファミリーが存在し、どちらのサブファミリーも  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の三つのサブタイプに分けられる。各サブタイプの発生過程における機能は詳細な検討がなされており、心臓の発生にも深く関与していることが知られている。しかし心筋発生に対してどのような関与をしているかは未だ明らかでない。

RA には all-trans RA (ATRA) と 9-cis RA (9c-RA) の二つの異性体があり、それぞれに結合できる受容体が異なる。ATRA は RAR と 9c-RA は RXR と結合することが知られている。マウス ES 細胞を用いた分化誘導系において、血清存在下で ATRA、9c-RA は双方とも心筋の分化を促進することが知られている。しかしこれらの異性体は相互に異性化することが知られており、受容体特異的な機能を解析することは困難である。近年、RAR もしくは RXR と特異的に結合し、アゴニストもしくはアンタゴニストとして作用する合成レチノイドの開発が進められている。私はこのような合成レチノイドを無血清条件の下で ES 細胞を用いた分化誘導系に投与することで、RAR と RXR とでは心筋の発生において異なる機能を担っているのではないかという仮説の検証を行った。

無血清の分化培地を用いて培養した ES 細胞由来の細胞塊を EBS (Embryoid Body-like Sphere) と名づけた。この章では EBS を作製するにあたって、ES 細胞のコロニーを、原型をとどめた状態で単離して利用した。この EBS に PA024 という RXR アゴニストを作用させると心筋を含む EBS が高頻度に現れた。PA024 の至適濃度は  $5 \times 10^{-6}$  M (頻度; >90%) で、何も作用させなかったものや ATRA を作用させたコントロール群に比べて心筋を含む EBS の出現頻度に有意な差があった。このような変化は RAR アゴニストを作用させたときには見られなかった。RXR アゴニストには心筋の分化を早める効果もあることがわかった。PA024 処理群の EBS では、コントロール群よりも一日だけ早く心筋の分化が起こった。これは PA024 が心筋分化の比較的後期のステップを促進していることを示唆しているのかもしれない。また RXR アンタゴニストである PA452 を EBS に作用させると、濃度依存的に心筋分化を抑制する傾向が認められた。このことから RXR を介したシグナルが心筋分化に影響を及ぼすことが示唆された。

第二章では血清の影響を完全に除いた条件の下では BMP4 を投与することで心筋が選択的に分化することを示した。またこの分化誘導系において N-cadherin が心筋前駆細胞

を濃縮するためのマーカーとして利用可能であることを示した。

前章で採用した EBS の作製法では血清の影響を完全に除くことは難しいと考えられる。そのため、この章では EBS の作製法に修正を加えることとした。まず完全に解離させた ES 細胞を、数回に亘り洗浄することで血清成分を除いた。さらこの細胞を無血清培地に懸濁してマルチウェルプレートのウェルのなかで凝集させ EBS とした。無血清条件の下で ES 細胞に凝集塊を形成させ、培養を続けると中胚葉への分化が阻害され、心筋の分化も起こらないことが既に知られているが、この方法により作製した EBS も同様の分化の傾向を示した。BMP4 はツメガエルを使った実験系においても、ES 細胞を用いた実験系においても、腹側中胚葉を誘導する活性がある因子として既に知られている。また心臓原基の決定や心筋の成熟などのステップに深く関与していることも知られているので、私は新たな方法で作製した EBS に BMP4 を投与して効果の検討を行った。すると心筋の分化が起こることが確認された。さらに心筋の分化に適した培地の組成の検討を行ったところ、二種類の培地が見出された。一つは DMEM 培地に終濃度 15% の KSR と 10 ng/ml の BMP4 を加えた培地 (15 % KSR DMEM with BMP4) でもう一つは GMEM 培地に終濃度 5% の KSR と 1ng/ml の BMP4 を加えた培地 (5 % KSR GMEM with BMP4) である。これらの培地で EBS を培養したところ、90 % 以上の EBS に心筋が分化した。それぞれの方法で分化させた心筋の様子を観察すると、15 % KSR DMEM with BMP4 を使って分化させたときよりも 5 % KSR GMEM with BMP4 を使って分化させたときの方が、EBS のなかに占める心筋マーカー (cTnT) 陽性細胞の割合が大きくなっていることが示唆された。さらにウェスタン解析により cTnT の発現量を比較したところ、5 % KSR GMEM with BMP4 中で分化させた EBS の方が cTnT を多く発現していることが示された。また 5 % KSR GMEM with BMP4 を用いて培養を行うと、正常発生と同様の中胚葉形成の過程が観察されることが示唆された。よってこの分化誘導系を利用した初期中胚葉から心筋までの過程の解析が見込まれた。

さらに私は、5 % KSR GMEM with BMP4 を用いた分化誘導系からより純度の高い心筋を取り出すための方法として、心筋前駆細胞の濃縮を試みた。現在のところ、心筋前駆細胞を同定する際に利用可能なマーカーはほとんど知られていない。そのなかで Flk1 は最も有用であるとされているマーカーである。しかしながら、Flk1 の発現は一過性であり、その機能も心筋の発生にとって不要であることが知られている。私は、Flk1 以外にも利用可能なマーカーが必要であると考え、上述の二つの方法で作成した EBS を比較することで心筋前駆細胞の表面抗原の探索を行った。その結果、候補として N-cadherin を見出した。N-cadherin の発現は心筋の発生過程を通じて持続し、心筋発生にとって重要な機能を果たしていることが知られている膜タンパク質である。セルソーターを用いて細胞を分画した結果、この系において Flk1 の発現の有無は心筋への分化に明確な影響を及ぼさなかったが、N-cadherin 陽性の細胞は陰性細胞に比べて *Nkx2.5*、*Tbx5*、*Isl1* といった初期心筋マーカーの発現量が多かった。また、分画後の細胞をストローマ細胞と共培養した結果、N-cadherin

陽性の細胞の方が心筋への分化効率も高かった。この結果はマウス ES 細胞を用いた無血清分化誘導系において N-cadherin が心筋前駆細胞の表面抗原として有用であることを示している。

本研究において心筋の分化を促進する因子として RXR アゴニストと BMP4 が確かめられた。さらに選択的に心筋が分化する分化誘導系において、心筋前駆細胞を濃縮して心筋の純度を高める際の Flk1 に変わるマーカーとして N-cadherin が有用であることが示された。これらの知見により ES 細胞から純度の高い心筋を大量に作り出すことが可能になり、心筋を対象とした再生医療の実現や ES 細胞を用いた分化系による心筋発生の解明に一步近づけたと考えている。