

## 論文審査の結果の要旨

氏名 本多 賢彦

本論文は二章からなる。心筋は医療の面で高い需要があるだけでなく、その発生過程にも注目を集めている組織である。胚性幹 (ES) 細胞は、その全能とも言われる多分化能により、心筋の再生や発生にとって有用な研究材料として多くの期待を集めている。しかしながら、高効率に分化させるための分化条件はいまだ確立されておらず、ES 細胞を用いた心筋発生の研究はわずかな進歩しか見せていない。本多君は本論文において、マウス ES 細胞を用いて心筋を大量かつ選択的に取り出す方法の検討を行い、いくつもの優れた結果を得た。

第一章は RXR リガンドがマウス ES 細胞を用いた分化誘導系において心筋分化に影響を与えることについて述べている。RXR はレチノイン酸をリガンドとする核内受容体のうちの一つである。レチノイン酸の受容体にはほかにも RAR が知られている。これまでノックアウトマウスの表現型より RXR が心臓の形成に重要な働きをしていることは知られていたが、心筋の発生への関与は明らかで無かった。また、天然レチノイン酸を用いた実験では、受容体を個別に制御することは困難であった。本多君の研究の新規性は、RAR 又は RXR を選択的に調節できる合成レチノイドを用いて受容体個別の心筋発生に及ぼす影響について検討したことにある。特に合成レチノイドの効果を明確にするためにレチノイン酸を含まない無血清の培地を使用する工夫を行っている。本研究では本多君は ES 細胞のコロニーを利用して ES 細胞由来の細胞塊 (EBS) を形成させ、これに合成レチノイドを投与してその効果の検討を行った。その結果、RXR 特異的なアゴニストである PA024 に心筋分化を促進させる効果があることを見出した。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。また RXR アゴニストには心筋の分化を早めるという結果も得た。PA024 処理群の EBS では、対照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する結果と言える。さらに RXR アンタゴニストである PA452 を EBS に作用させた実験において、濃度依存的に心筋分化を抑制する傾向も観察した。本多君の実験により RXR を介したシグナルが心筋分化自体にも影響を及ぼしうることが初めて明らかになった。

第二章では、心筋を選択的に分化させることが可能な ES 細胞を用いた分化誘導系において、心筋前駆細胞を選択する際に利用できる表面マーカーとして N-cadherin が利用可能であることについて明らかにしている。本多君は、まず EBS 作製法の修正に取り組んだ。そして ES 細胞を完全に分散させて血清成分を完全に洗い落とした後に、BMP4 を添加した無血清培地中で再び凝集させるという方法を採用した。この方法において BMP4 を添加しなかった場合には心筋分化がほとんど起こらなかったため、前章で採用した分化誘導系よりも精密に心筋の分化を制御することが可能になったと考えられる。さらに心筋の分化に適した培地の組成の検討を行って二種類の培地を見出した。どちらの培地を用いた場合

にも 90% 以上の EBS に心筋が分化したが、それぞれの分化条件において各 EBS 中に占める心筋の割合が大きく異なることが観察された。心筋の増加はウェスタンブロットによる cTnT の発現量の比較でも確認された。さらに心筋が拍動する以前の時期の EBS に占める N-cadherin 陽性細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いて二つの条件間で比較すると、心筋分化効率の上昇に伴って N-cadherin 陽性細胞の割合が上昇していることを見出した。ソーティングの結果、N-cadherin 陽性細胞は陰性細胞よりも心筋に分化しやすいという結果も得られ、よって N-cadherin が心筋前駆細胞を濃縮するための表面マーカーとして利用できることが示された。これまで利用可能な表面マーカーがわずかしかなかったため、心筋前駆細胞の濃縮は非常に困難だとされていた。新たに利用可能なマーカーを提示した本多君の研究結果は、心筋前駆細胞の同定に発展をもたらすと期待できる。

このように本多君の行った研究は、これまで不足していた ES 細胞から心筋を大量かつ選択的に取り出すための方法やツールを提示したものであり、ES 細胞を用いた心臓病治療や、未だ謎の多い心筋の発生過程の解明に大きく寄与し得るという点で学問上大きな価値のある研究である。

なお、本論文第一章は、浜崎辰夫・駒崎伸二・影近弘之・首藤絢一・浅島誠との共同研究であり、第二章は栗崎晃・大沼清・浜崎辰夫・大河内仁志・浅島誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。