

氏名（本籍）	石嶺 久子 （ 東京都 ）		
学位の種類	博 士（ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6899 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	N-Cadherin is a Prospective Cell Surface Marker of Human Mesenchymal Stem Cells that Have High Ability for Cardiomyocyte Differentiation （心筋へと分化する能力を持つヒト間葉系幹細胞の細胞表面マーカーN-cadherin）		
主査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	栗崎 晃
副査	筑波大学教授	理学博士	林 純一
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（工学）	王 碧昭

論 文 の 要 旨

重篤な心疾患の治療は臓器自体の再生能力が低いことから、現在心臓移植が最も有効な治療法として考えられているが、そのドナーは日本のみならず世界的に不足しており、難治性心疾患の治療に対して再生医療に期待が寄せられている。近年、再生医療に使用される細胞ソースとして注目されている人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、目的細胞へと確実に分化させる分化技術の頑強性や未分化なiPS細胞の残存による腫瘍化など、安全性の担保の点で未解決の問題が残っており、現時点では臨床応用に時間を要している。一方、成体の骨髄や脂肪組織から採取できるヒト間葉系幹細胞は、既に臨床研究の実績が多く、ある程度の心機能改善効果が見られるものの、間葉系幹細胞自身が心筋細胞へ分化・生着して組織再生させる効果はほとんど見られない。実際には間葉系幹細胞から分泌された因子による免疫調整作用や血管新生因子による血流再生の促進など、液性因子を介したパラクライン作用によるものと考えられており、効果が限定的である点が課題となっていた。そこで本研究では、心筋へと分化指向性を示す細胞特異的表面マーカーを同定し、心筋への分化効率を高める方法を新たに考案することにより、間葉系幹細胞による心再生技術の向上に貢献することを目的として研究を行った。

そもそも間葉系幹細胞は初代培養細胞であるためロット差が非常に大きく、その上、培養するにつれて刻々と分化能が低下することが知られており、データの再現性の点で問題が指摘されていた。そこで本研究では、*bmi-1*, *TERT*, *E6*, *E7* 等の遺伝子を導入して不死化したヒト間葉系幹細胞株を用いることで、この問題を克服したアッセイ系を活用した。GFP レンチウイルスで標識したヒト間葉系幹細胞不死化株7種類を、各々マウス胎児心筋細胞上で7日間共培養し、自律的に拍動する心筋細胞への分化を顕微鏡下でカウントし、その心筋分化能を定量比較した。その結果、EPC-214細胞、UE7T-13細胞が、他の細胞より自律的かつ規則的に拍動する心筋細胞への分化が高い頻度で観察された。共培養10日後に細胞を固定し、心筋への最終分化マーカーである α -actinin, cardiac troponin T, connexin-43 に対して免疫染色を行ったところ、自律拍動の結果と同様にEPC-214細胞、UE7T-13細胞においては心筋分化マーカーとGFPが共染色

される細胞が他の細胞より多く観察されたことから、高い心筋分化能を有することが確認された。

これら7種の間葉系幹細胞株において、心臓発生過程で必須と考えられている膜表面タンパク質等(N-cadherin、integrin α 4、VCAM-1、PDGFR α 、Flk-1、c-Kitなど)の発現をウェスタンブロッティングで評価したところ、N-cadherin、Flk-1、及びc-Kitの発現において心筋分化能とある程度の相関が確認された。さらに、フローサイトメトリーで生細胞表面における各タンパク質の発現を比較したところ、Flk-1の発現がほぼ全ての間葉系幹細胞で検出不能なほど低いこと、c-Kitは拍動する心筋への分化能との相関がやや悪くマーカーとしての信頼性が低いことが判明した。一方、N-cadherinは、間葉系幹細胞で高い発現量を示し、拍動する心筋への分化能と細胞膜表面での発現の相関係数が $r=0.81$ と強い相関があることから、心筋分化指向性を示すヒト間葉系幹細胞株の細胞膜表面マーカーとして有望であると考えられた。さらに、初代培養のヒト間葉系幹細胞で同様の解析を行ったところ、心筋分化能とN-cadherinの細胞膜表面発現量との相関係数は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞で $r=0.55$ 、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞では $r=0.77$ を示し、ともに正の相関を示した。すなわちN-cadherinは、初代間葉系幹細胞においても心筋分化指向性を示す細胞集団を選別する細胞膜表面マーカーとなりうると考えられた。

次に、初代培養のヒト間葉系幹細胞をN-cadherin抗体を結合した磁気ビーズを用いてN-cadherin陽性細胞を濃縮したところ、N-cadherin陽性細胞は陰性細胞よりも高い心筋分化能を有することが観察された。続いて、磁気ビーズ法で選別した初代培養ヒト間葉系幹細胞を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、外胚葉、内胚葉分化マーカーの発現や、間葉系幹細胞が高い分化能を有する骨、軟骨、脂肪分化マーカーの発現はN-cadherin陽性細胞、陰性細胞間で大きな違いは観察されなかったが、中胚葉系組織の心筋や骨格筋分化に関わる*Nkx2.5*、*Hand1*、*cTnI*、*Myog*や、*Pou5f1(Oct4)*、*Sall4*、*Nanog*といった未分化マーカーの発現がN-cadherin陽性細胞群で高いことが判明した。すなわち、N-cadherin陽性間葉系幹細胞は、未分化マーカーの発現が向上し、心筋前駆細胞特異的転写因子群の発現が高く、心筋分化能が高い間葉系幹細胞集団であり、N-cadherin抗体を用いて心筋分化能の高い有用細胞集団を濃縮することが可能であることを示した。

審 査 の 要 旨

本研究は、ヒトの骨髄や脂肪組織から、接着性の初代培養細胞集団として調製される間葉系幹細胞画分の中に、N-cadherinを発現し、心筋細胞へと分化する能力が高い細胞集団が存在することを明らかにしたものである。実際にN-cadherin特異的抗体で濃縮したN-cadherin発現細胞が、心筋前駆細胞特異的転写因子群を高発現し、高い心筋分化効率を示すことは、間葉系幹細胞と定義される細胞集団がいかなる細胞群から構成されているのかを理解する上で、今後の研究に大いに貢献するものである。また、今回の研究は、マウス胎児の心筋細胞上でヒト間葉系幹細胞を分化させるというシンプルな*in vitro*実験を利用して得られた明快な結果であるが、今後の間葉系幹細胞を利用した再生医療研究の発展に大きな手掛かりを与える重要な発見である。したがって本研究が再生研究分野に与える影響は大きく、本論文の重要性は高いと言える。

平成26年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。