

氏名	みずた えいのすけ 水田 栄之助
学位の種類	博士(再生医科学)
学位記番号	甲第1号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Subtype switching of T-type Ca ²⁺ channels from Cav3.2 to Cav3.1 during differentiation of embryonic stem cells to cardiac cell lineage (ES細胞由来心筋細胞の分化過程における T 型 Ca ²⁺ チャンネル Cav3.2 から cav3.1 へのサブタイプ変化)
学位論文審査委員	(主査) 河合康明 (副査) 重政千秋 久留一郎

学位論文の内容の要旨

心臓の再生医療のソースとして利用されている胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来心筋細胞の電気生理学的特性を検討することは、これらを臨床応用する上で非常に重要なことである。そのうち、心臓の自律拍動に深く関与するといわれている T 型 Ca²⁺ チャンネルの発現様式は現在のところ不明な点が多い。そこで我々はマウス ES 細胞由来心筋細胞を用いて、分化段階の異なる ES 細胞由来心筋細胞の T 型 Ca²⁺ チャンネルについて電気生理学および分子生物学的検討を行った。

方法

まずマウス ES 細胞に心筋特異的転写因子である Nkx2.5 の片方の遺伝子座に緑色蛍光蛋白遺伝子(GFP)をノックインした細胞株(HCGP7)を作成し、ES 細胞由来心筋細胞を選択的に単離採取できるシステムを確立した。次に HCGP7 を浮遊培養し胚様体(Embryoid body: EB)を形成し、EB 形成後に GFP 発現をレポーターとしてフローサイトメトリーを用いて ES 細胞由来心筋を選択採取した。選別採取後、分化段階の異なった ES 細胞由来心筋細胞の T 型 Ca²⁺ チャンネル電流およびその mRNA についてパッチクランプ法ならびに real time RT-PCR 法を用いて解析を行った。

結果

心筋 T 型 Ca²⁺ チャンネルは 40 μM Ni²⁺ の感受性により 2 種類のサブタイプに分類される。Ni²⁺ 非感受性サブタイプを Cav3.1、Ni²⁺ 感受性サブタイプを Cav3.2 と分類すると、ES 細胞由来心筋 T 型 Ca²⁺ チャンネル電流は発生早期(分化誘導後 8~10 日)では Cav3.2 優位であり、発生後期(分化誘導後 15~18 日)では Cav3.1 が優位であった。また real time RT-PCR 法を用いた ES

細胞由来心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルの mRNA の定量的解析でも同様の結果を得た。以上よりマウス ES 細胞由来心筋では T 型 Ca^{2+} チャネルサブタイプが発達段階において Cav3.2 から Cav3.1 へサブタイプ変化することがわかった。

考 察

心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルの発現様式に関して、心室特異的マーカーである Mlc2v 陽性 ES 細胞由来心筋細胞において発生段階では Cav3.1 が優位であるという報告が存在する。これは本実験結果と異なるものであるが、一方でマウス胚においては Cav3.2 から Cav3.1 へ subtype switching しているとの報告がある。本実験結果はこれを支持するものであり、その理由として、我々は心房・心室に分化する前段階から発現する心筋特異的マーカー Nkx2.5 陽性細胞について検討を行ったため、発生早期段階における心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルの発現様式をより正確に捉えることができたと考えられた。

T 型 Ca^{2+} チャネルは発生段階の比較的早期から発現することが知られており、細胞の proliferation と differentiation 両方に関与すると言われているが、その機序については現在不明な点が多い。Cav3.2 から Cav3.1 への subtype switching とこれらの関係についても不明であり、今後の検討が必要であると考えられた。

心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルは心臓発生段階のみ発現が認められ、健常成人心筋にはほとんど認められないことが報告されている。しかし病的な心筋では新たに T 型 Ca^{2+} チャネルが発現してくるとの報告が存在し、このことは病的な心筋の致死性不整脈発症に関与するといわれている。本実験結果は病的な心筋の致死性不整脈発症機序の解明にも寄与するものと考えられた。

結 語

我々は心臓が心房・心室へ分化する前段階から発現する心筋特異的転写因子 Nkx2.5 陽性 ES 細胞由来心筋細胞の異なる発生段階における心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルについて、電気生理学および分子生物学的解析を行った。その結果発生段階において心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルは、Cav3.2 から Cav3.1 への subtype switching を起こすことが判明した。この結果は心筋再生医療、特に心臓 biological pacemaker の開発にあたり非常に有益な情報であり、また病的な心筋の致死性不整脈発生機序の解明にも寄与するものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はマウス ES 細胞を用いて、心筋特異的マーカーである Nkx2.5 陽性心筋前駆細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル電流およびサブタイプ遺伝子の経時的変化を検討したものである。その結果、発生段階において心筋 T 型 Ca^{2+} チャネルは Cav3.2 から Cav3.1 への subtype switching を起こすことが判明した。この結果は心筋再生医療、特に心臓 biological pacemaker の開発にあたり非常に有益な情報であり、また病的な心筋の T 型 Ca^{2+} チャネル電流による致死性不整脈発生機序の解

明にも寄与するものと考えられ、明らかに学術水準を高めたものと認める。

C

C