

平成28年9月

池田信人 学位論文審査要旨

主査 久留一郎

副主査 山本一博

同 難波栄二

主論文

Prion protein and stage specific embryo antigen 1 as selection markers to enrich the fraction of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes

(マウスES細胞由来心筋細胞の分画を濃縮する選別マーカーとしてのプリオン蛋白質とステージ特異的胚抗原1)

(著者：池田信人、中山祐二、中澤菜摘、吉田明雄、二宮治明、白吉安昭)

平成28年 Yonago Acta medica 59巻 127頁～135頁

参考論文

1. Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway

(マウス胚性癌細胞株由来細胞外因子は、新規シグナル経路を介してマウスES細胞の多能性を維持する)

(著者：川添真史郎、池田信人、三木研吾、渋谷昌幸、森川久未、中野星児、押村光雄、久留一郎、白吉安昭)

平成21年 Development Growth & Differentiation 51巻 81頁～93頁

2. Electrophysiological properties of prion-positive cardiac progenitors derived from murine embryonic stem cells

(マウスES細胞由来プリオン陽性心筋前駆細胞の電気生理学的特性)

(著者：藤井裕士、池内悠、倉田康孝、池田信人、Udin Bahrudin、李佩俐、中山祐二、遠藤涼、長谷川輝、森川久未、三明淳一郎、吉田明雄、日高京子、森崎隆幸、二宮治明、白吉安昭、山本一博、久留一郎)

平成24年 Circulation Journal 76巻 2875頁～2883頁

3. Effects of uric acid on the NO production of HUVECs and its restoration by urate lowering agents

(ヒト臍帯静脈内皮細胞のNO産生における尿酸の影響と尿酸降下薬による効果)

(著者：三島睦夫、濱田紀宏、Nani Maharani、池田信人、大野原岳史、野津智美、二宮治明、宮崎聡、水田栄之助、杉原志伸、加藤雅彦、荻野和秀、桑原政成、廣田裕、吉田明雄、大谷直由、安西尚彦、久留一郎)

平成28年 Drug Research 66巻 270頁～274頁

学 位 論 文 要 旨

Prion protein and stage specific embryo antigen 1 as selection markers to enrich the fraction of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes

(マウスES細胞由来心筋細胞の分画を濃縮する選別マーカーとしてのプリオン蛋白質とステージ特異的胚抗原1)

折り畳み異常を呈した変異プリオン蛋白質は、クロイツフェルト=ヤコブ病などの中枢神経の変性疾患の病因として知られている。一方で、正常なプリオン蛋白質は神経、心臓、小腸、リンパ球などで発現している。マウスES細胞を *in vitro* で分化誘導し、プリオン蛋白質陽性細胞を分取することで、選択的に心筋前駆細胞を採取できることが報告された。ただ、プリオン蛋白質を指標にして、心筋細胞を分取できる分化誘導時期の詳細な検証はない。そこで、分化誘導後7日、14日、21日の3点においてプリオン蛋白質陽性細胞を分取し、その増殖能と分化マーカーについて検証した。加えて、プリオン蛋白質陽性分画に残存する未分化細胞の程度を明らかにし、未分化細胞を除去するために、多能性マーカーの stage specific embryo antigen 1 (SSEA1) を指標にすることの有用性を検証した。

方 法

実験にはAB1細胞、Ht7細胞、Hcgp7細胞の3つのマウスES細胞を使用した。プリオン蛋白質陽性細胞における心筋細胞の陽性率を解析するために、Ht7細胞とHcgp7細胞を用いた。その他の実験は全て、AB1細胞を用いた。それぞれのES細胞を胚様体形成法により、7日、14日、21日まで分化誘導した。その後、胚様体を解離して抗プリオン蛋白質抗体で標識し、フローサイトメトリー解析、またはセルソーティングによる分取を行った。また、分取した細胞の遺伝子発現解析をRT-PCR法により行った。分取した細胞を培養皿に播種して7日間培養して、RT-PCR法による遺伝子発現解析と、ギムザ染色によるクロノジェニック解析を行った。さらに、分化誘導した胚様体を、抗プリオン蛋白質抗体と抗SSEA1抗体により標識し、フローサイトメトリー解析を行った。セルソーターにより、プリオン蛋白質陽性のSSEA1陰性分画を採取し、遺伝子発現解析とクロノジェニック解析を行った。

結 果

プリオン蛋白質陽性細胞は、分化誘導7日から21日の間、一定の割合で存在するが、心筋

マーカー陽性率は分化誘導に伴い低下した。分化誘導7日のプリオン蛋白質陽性細胞は中胚葉マーカーのみを発現するが、14日と21日では外胚葉と内胚葉のマーカーを発現した。プリオン蛋白質陽性細胞を採取して培養皿上で平面培養すると、分化誘導7日と21日では外胚葉と中胚葉マーカーの発現が亢進した。一方、14日では心筋マーカーのみに発現が限定された。プリオン蛋白質陽性細胞は、分化誘導7日と14日では増殖能が低いのに対して、21日では増殖能が亢進した。以上の結果から、プリオン蛋白質陽性細胞の分化能と増殖能の維持は、未分化細胞の残存を示唆した。そこで、多能性マーカーであるSSEA1に着目し、プリオン蛋白質陽性細胞がSSEA1を発現しているか、それぞれの抗体を用いて解析した。フローサイトメトリー解析の結果、分化誘導21日において、プリオン蛋白質陽性細胞集団のSSEA1陽性細胞の割合が上昇していた。そこで、プリオン蛋白質陽性細胞からSSEA1陽性細胞を除去すると、増殖能を示さない、心筋マーカーを発現する分画を採取できた。

考 察

本研究は細胞表面に存在するプリオン蛋白質とSSEA1を指標にすることで、未分化細胞を含まない多能性幹細胞由来心筋細胞を分取できる可能性を示した。多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心臓再生医療の臨床応用には、安全性の観点から未分化細胞の除去が必須である。抗プリオン蛋白質抗体と抗SSEA1抗体の併用により、心臓再生の安全性を担保することが期待される。

結 論

プリオン蛋白質は、心筋前駆細胞マーカーとして報告されているが、分取時期により遺伝子発現様式と増殖能が変化することが判明した。また、増殖能を持つプリオン蛋白質陽性細胞はSSEA1を発現している。従って、抗プリオン蛋白質抗体と抗SSEA1抗体を組み合わせることで、心筋細胞を含む分画から未分化細胞を除去した、安全性の高い分画を得ることが出来る。