慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart
Sub Title	心臓神経堤細胞は哺乳動物心臓内の多分化能を有する幹細胞の発生起源である
Author	冨田, 雄一
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.3 (2007. 9) ,p.18-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070901-0018

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart

（心臓神経堤細胞は哺乳動物心臓内の多分化能を有する幹細胞の発生起源である）

冨田　雄一

内容の要旨

哺乳類において心筋細胞増殖は主に発生初期に生じているが、近年病態モデル動物の解析により、成獣心においても心不全、心筋梗塞といった病的状態では心筋細胞が増殖することが報告されている。いくつかのグループより心筋幹細胞の存在を示す報告はあるものの、多分化能を有する幹細胞や心筋前駆細胞の発生学的起源は不明であったため、本研究では心臓幹細胞の分化能の検討およびその発生学的起源の検討を行った。

最初に、血球由来幹細胞を濃縮するため、フローサイトメトリーを用いたside populatioin（SP）分画法によって心臓SP細胞を同定した。この解析により心臓にSP分画が存在すること、心臓SP細胞は未分化幹細胞マーカーであるc-kit、Sca-1の発現を認めることを明らかにした。また未分化マーカーの発現により、心臓SP分画が心臓幹細胞を濃縮していることが証明された。しかしSP分画法によって得られる細胞は数が限定されるため、何らかの培養法にて増殖させる必要があった。我々は神経幹細胞の増殖に用いられるneurosphere培養法により心臓SP細胞未分化状態を維持したまま増殖させることに成功した。心臓SP細胞より得られた心臓細胞塊は神経前駆細胞マーカーであるnestin、Musashi-1を発現しており、心筋の他、末梢神経系の神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞を含む神経堤由来細胞に分化させることが可能であった。この未分化マーカーの発現パターンと多分化能は発生学的には胎児心臓形成時に遊走される神経堤細胞のものと酷似していた。心臓細胞塊の初期発生における位置付けを検討するため単離した細胞塊をニワトリ胚に移植したところ、移植した細胞は心臓領域に遊走し、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞に分化しながら神経堤由来の臓側ガングリア、脊髄神経、大動脈の構築に寄与することが判明した。さらに神経堤由来細胞のマーカーである蛋白ゼロ（P0）-CreとFlox-EGFPを発現する遺伝子操作マウスの解析により神経堤由来細胞が心臓に遊走することが明確となった。一部の神経堤由来細胞は心臓内でnestin、GATA4を発現した状態で増殖を停止し未分化状態を維持していることが確認された。また神経堤由来細胞より分化した心筋も観察された。ダブルトランスジェニックマウスの心臓のin vitroでの解析で神経堤由来細胞が心臓細胞塊を形成することも確認された。これらのことより心臓初期発生時に遊走した神経堤由来細胞が、組織幹細胞として心臓内に存在し、心筋のみでなく神経・グリア・平滑筋にも分化しうることが明らかとなった。

本研究により心臓幹細胞の少なくとも一部が発生学的に神経堤細胞由来であることが明らかとなった。神経堤細胞由来幹細胞の心筋再生への利用が可能であることを示唆し、今後の心筋再生治療に応用できると考えられる。

論文審査の要旨

哺乳類において心筋細胞増殖は主に発生初期に生じているが、成獣心においても心不全、心筋梗塞といった病的状態では心筋細胞が増殖することが報告されている。多分化能を有する幹細胞や心筋前駆細胞の発生学的起源は不明であったため、本研究では心臓幹細胞の分化能の検討およびその発生学的起源の検討を目的とした。フローサイトメトリーを用いた解析により心臓にSP分画が存在すること、心臓SP細胞は未分化幹細胞マーカーであるc-kit、Sca-1の発現を認めることが明らかとなった。また未分化マーカーの発現により心臓SP分画が心臓幹細胞を濃縮していることが証明されるとともに、神経幹細胞の増殖に用いられるneurosphere培養法により心臓SP細胞を未分化状態を維持したまま増殖させることに成功した。心臓SP細胞より得られた心臓幹細胞塊は神経前駆細胞マーカーであるnestin、Musashi-1を発現しており、心筋の他、末梢神経系の神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞を含む神経堤由来細胞に分化させることが可能であった。この心臓細胞塊の初期発生における位置付けを検討するためニワトリ胚に移植したところ、移植した細胞は心臓領域に遊走し、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞に分化しながら神経堤由来の臓側ガングリア、脊髄神経、大動脈の構築に寄与することが判明した。さらに神経堤由来細胞のマーカーであるP0蛋白-CreとFlox-EGFPを発現する遺伝子操作マウスの解析により神経堤由来細胞が心臓に遊走することが明確となった。一部の神経堤由来細胞は心臓内でnestin、GATA4を発現した状態で増殖を停止し未分化状態を維持していることが確認され、神経堤由来細胞より分化した心筋も観察された。また神経堤由来細胞が心臓細胞塊を形成することも確認された。これらのことより心臓幹細胞の少なくとも一部が発生学的に神経堤細胞由来であることが明らかとなった。

審査では、まず心臓SP細胞が生後７日目までに急速に減少する機序について質問がなされた。明確な根拠は乏しいものの、生後１週間は成長も急速であり、成長曲線を考慮するとこの結果は妥当であろうと回答された。また神経堤由来細胞の心臓内での分布頻度に比較してSP細胞が有意に多いのではないかとの質問がなされ、神経堤由来細胞がすべてのSP細胞の起源であるとは考えにくいと回答された。更に心臓幹細胞として複数のグループより異なったマーカーが提唱されているが、現在どのマーカーが最も妥当性が高いかとの質問がなされ、心臓の発生過程で起源の異なる細胞が関与することより、どのマーカーが妥当であるかは判別困難であると回答された。最後に臨床的に有用性が高い幹細胞といえるかとの質問に対し、現段階では臨床応用には複数の解決すべき点が含まれていると回答された。

以上のように、本研究には更なる検討課題を残しているものの、神経堤由来幹細胞の心筋再生への利用が可能であることを示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　小川　聡
外科学　四津　良平　　発生・分化生物学　須田　年生
解剖学　仲嶋　一範
学力確認担当者：池田　康夫
審査委員長：四津　良平

試問日：平成19年4月17日