

氏名	金 国良
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第4641号
学位授与の日付	平成24年 9月27日
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Study on Cardiomyocyte Differentiation Induced by ECP (好酸球塩基性タンパク質による心筋芽細胞の分化誘導に関する研究)
論文審査委員	教授 妹尾昌治 教授 尾坂明義 教授 大槻高史 准教授 村上 宏

学位論文内容の要旨

This thesis consists of 3 chapters in addition to “General Introduction” and “Concluding Remarks”.

In chapter I, The functional role of ECP in the cardiomyogenesis was investigated by mouse P19CL6 embryonic carcinoma cells, which are well known as a model of cardiomyocyte differentiation in the presence of DMSO. ECP was confirmed to accelerate the cardiomyocyte differentiation of P19CL6 cells by the rate and area size of beating and the expression of cardiomyocyte specific genes, such as GATA-4 and α -MHC. P19CL6 cells at 12 days of treatment were immunologically stained with antibodies against actinin, actin, ANF and cardiac troponin I. The wider size of immunoreactive area was observed in the presence of ECP than that without ECP. This is the first to report the function of ECP on cardiomyocyte differentiation from stem cells in vitro.

In chapter II, I detected the molecular mechanism of ECP on the cardiomyocyte differentiation of P19CL6 cells. Since cardiomyocyte differentiation in vivo is considered to follow mesoderm induction, the induction of *Brachyury*, a marker of mesoderm, was assessed. *Brachyury* expression was found to be enhanced after the addition of ECP. This enhancement was due to the stimulation of ERK1/2 phosphorylation by ECP. In this context, treatment with SU5402, an inhibitor of FGFR1, suppressed *Brachyury* expression, phosphorylation of ERK1/2 and cardiomyocyte differentiation induced by ECP. I concluded that ECP might induce mesoderm differentiation through FGF signaling pathway and enhance subsequent cardiomyocyte differentiation in concert with DMSO in P19CL6 cells.

In chapter III, I checked effects of ECP on other signaling pathways. DMSO up-regulated Wnt3a expression and Wnt3a activated Wnt/ β -catenin signaling pathway in autocrine manner. This is required for the cardiomyocyte differentiation in P19CL6 cells. ECP alone can not induce Wnt3a expression. However, in the presence of DMSO, ECP accelerated Wnt3a expression. It suggested that ECP stimulation have some positive effects on the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the presence of DMSO. ECP activated PI3K/Akt signaling pathway. It was well known that PI3K/Akt signaling pathway is pivotal for β -catenin (a down-stream molecule of Wnt) stabilization. DMSO and ECP alone activated this signaling respectively, and ECP increased effects of DMSO on this signaling pathway. Through TOP/FOP FLASH luciferase assay, even if ECP did not induced wnt3a expression, but it increased luciferase activity. Additionally, I confirmed that ECP enhanced EPHA1 and ET-1 expression, both of signaling pathway correlated with cardiomyocyte differentiation.

論文審査結果の要旨

最近、幹細胞を分化させて心筋細胞のシートを作成して心臓へ移植する再生医療の試みは飛躍的に進んでいるが、この幹細胞の心筋分化を促進するメカニズムについては不明な点が多い。申請者は、好酸球が産生する塩基性タンパク質（ECP）が心筋前駆細胞の分化を誘導して心筋細胞へ成熟するのを促進することから、マウス P19CL6 胚性癌腫細胞の心筋分化モデルを用いてその分化促進メカニズムを解析した。P19CL6 細胞はジメチルスルフォキシド（DMSO）存在化で培養すると2週間程度で拍動する心筋細胞へと分化するが、ECP はこの過程を約1週間に短縮する事ができる。生体内では心筋前駆細胞の分化が中胚葉の誘導に続くと考えられるので、まず中胚葉のマーカである Brachyury 遺伝子の発現を精査し、ECP 刺激がこの発現が増強することを明らかにした。このとき ECP 刺激は同時に ERK1/2 のリン酸化も誘導していた。中胚葉分化は線維芽細胞成長因子受容体 FGFR1 のシグナル伝達経路を介しているため、FGFR1 に特異的な阻害剤を用いて解析する事により ECP が FGFR1 のシグナル伝達経路を通して P19CL6 細胞の心筋分化促進を行っていることを明らかにした。さらに、P19CL6 細胞の心筋分化に必要な Wnt3a 遺伝子の発現および Frizzled を介して活性化される Wnt/ β catenin シグナルを ECP 刺激が増強し PI3K/Akt シグナル経路を活性化する事を見出した。また、心筋分化の過程で EPHA1 遺伝子やエンドセリン1 遺伝子の発現が ECP 刺激により増強されることも見出した。これらの時間的な過程を追って考えると ECP はこれらの一連の遺伝子発現やシグナル伝達を DMSO 存在化で秩序立てて増強していると考えられた。これらは心筋細胞の分化に必要な遺伝子発現やシグナル伝達を ECP が制御している可能性を示す全く新しい発見である。心筋梗塞により酸素が欠乏して失われた心臓組織周辺の細胞を刺激して心筋細胞を再生することや、幹細胞を効率よく分化誘導して移植用心筋シートを作成することにより、心筋梗塞後にもっとも必要な治療をより確実に実現する可能性を示したことは有望であると認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。