



Title	N-Glycans : Phenotypic Homology and Structural Differences between Myocardial Cells and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes
Author(s)	河村, 拓史
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51911
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	河村 拓史
論文題名 Title	N-Glycans: Phenotypic Homology and Structural Differences between Myocardial Cells and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (N型糖鎖発現における、iPS細胞由来心筋細胞と心臓組織の類似性と相違点)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis)	
【背景】生体組織を構成する細胞上に発現する糖鎖は、様々な生理機能を担い、細胞分化により変化することが知られている。一方iPS細胞由来心筋細胞は、心不全に対する細胞移植治療の有用な供給源として期待されているが、未分化細胞混入による腫瘍形成、移植細胞に対する免疫反応などの問題が指摘されている。今回我々は、iPS細胞の抗原性を明らかにし、未分化iPS細胞 (iPSC) とiPS細胞由来心筋細胞 (iPSC-CM) の識別、及びiPSC-CMと正常心筋の相違点を検討するため、iPSC、iPSC-CM、心筋組織の糖鎖構造の網羅的解析を行なった。 【方法】マウスiPSC 3株を、それぞれ<i>in vitro</i>で化合物の添加によりWntシグナルを調整し心筋細胞へと分化誘導を行い、心筋細胞の代謝能の違いを利用し無糖培地で培養することで純化を行った。また、正常心筋細胞のコントロールとして、マウス心筋組織を採取した。それぞれから糖タンパク質を抽出し、グリコアミダーゼAで切り出したN型糖鎖に関してDEAEカラムによる酸性度に基づく分離、ODSカラムによる疎水性に基づく分離、Amideカラムによる親水性に基づく分離 (3次元HPLC法) の後、質量分析法による糖組成の決定を行い、データベースと照合することで各糖鎖構造の同定を行った。 【結果】iPSC-CMは3株ともトロポニンT陽性細胞が90%以上を占める細胞集団で、Nkx2.5, αMHC, ANP, Isl1という心筋細胞マーカー遺伝子を発現しており、イソプロテレノール投与により心拍数の増加が認められ、βアドレナリン受容体を発現していることが示唆された。iPSC、iPSC-CM、マウス心筋組織から合計68種類の糖鎖が単離され、その内60種類の構造が同定された。単離した糖鎖の定量的解析から、シアル酸を含まない中性糖の割合はiPSC (97%) からiPSC-CM (83%) に分化することで減少し、心臓組織の割合 (55%) に近づいた。さらに中性糖のうち、構造的に未熟な糖鎖と考えられるハイマンノース型の糖鎖の割合は、iPSC (78%) からiPSC-CM (68%) に分化することで減少し、心筋組織の割合 (47%) に近づいた。一方で、心筋組織ではグリコリル型のシアル酸が全体の33%を占めたのに対し、iPSC (0.4%)、iPSC-CM (0%) は低発現であった。シアル酸に関する糖転移酵素の遺伝子発現を定量PCRで測定したところ、アセチル型のシアル酸をグリコリル型に変換するシアル酸水酸化酵素の発現を心筋組織では認めたのに対し、iPSC、iPSC-CMでは認めなかった。また、iPSC-CMにはGal α 1-6Galという特徴的な構造を認め (3.3%)、iPSCには認めず心筋組織 (0.6%) よりも高発現していた。iPSCからiPSC-CMに分化することで消失すると糖鎖は3種類認め、それらは心臓組織でも発現していなかった。また、iPSCからiPSC-CMに分化することで発現するようになる糖鎖は22種類あり、アセチル型のシアル酸化糖またはGal α 1-6Galをもつ構造で、そのうち20種類は心臓組織では発現していなかった。 【まとめ】N型糖鎖の網羅的構造解析により、iPS細胞由来心筋細胞は未分化iPS細胞に特徴的なハイマンノース型糖鎖が減少し、正常心筋組織に近いシアル化糖が上昇するというパターンを示した。また、未分化iPS細胞に特有の構造が3種類同定されたことから、再生医療における安全性確保の点から未分化iPS細胞除去に糖鎖構造の変化が有用となる可能性が考えられた。それと共に、iPS細胞由来心筋細胞で発現し心臓組織で発現しない糖鎖構造を複数認めたことから、移植に際しては抗原となる可能性があり、さらなる検討が必要であることが示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 河村 拓史			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	澤 芳樹
	副 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	中谷 敏

論文審査の結果の要旨

細胞上の糖鎖は様々な生理機能を担い、分化による構造変化が報告されている。学位申請者の河村拓史らは、マウス未分化iPS細胞（iPSC）、iPS細胞由来心筋細胞（iPSC-CM）、正常心筋の糖鎖構造の網羅的解析を行ない、68種類の糖鎖を検出し、そのうち60種類の構造を同定した。iPSCからiPSC-CMに分化することで構造的に未熟な糖鎖の割合は減少し、成熟したシアル酸化糖の割合が増加し、心筋組織の発現パターンへ近づいた。iPSC、iPSC-CMではグリコリル型シアル酸の生合成に必要なシアル酸水酸化酵素遺伝子が低発現で、心筋組織と比べてグリコリル型シアル酸が低発現であった。またiPSC-CMでは、Gal α 1-6GalというiPSCには無い特徴的な糖鎖構造を認め、心筋組織よりも高発現であった。iPSCは心筋分化により、いくつかの相違点は認めるものの、正常心筋に近い糖鎖発現パターンを示した。

本研究の結果から、今後のiPS細胞を用いた心臓再生医療の実現のため、移植細胞の抗原性や未分化細胞除去のために糖鎖解析が有用であることが示唆され、学位に値するものと認める。