The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細胞挙動に基づくヒト幹細胞の心筋分化方向性誘導に関する研究
Author(s)	小川, 祐樹
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61779
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　小川　祐樹　）	
論文題名	細胞挙動に基づくヒト幹細胞の心筋分化方向性誘導に関する研究

論文内容の要旨

生体外での細胞培養において，細胞の分化，遊走，増幅は，隣接する細胞，支持体である培養面，および増殖因子を含む培地によって制御されている．全ての細胞へと分化可能な万能細胞は心筋細胞への分化誘導過程で，間葉系幹細胞を介して心筋分化方向へと誘導される．従って，間葉系幹細胞を用いた心筋分化方向性誘導の過程を理解することが，心筋分化誘導効率の上昇に向けた培養法の開発に重要となる．ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)の心筋分化方向性誘導法として，Transforming growth factor (TGF) β1が用いられているが，分化誘導効率が低いことが問題となっている．近年では，形態変化および遊走を含む細胞挙動の変化によっても分化方向性誘導が生じることが報告されている．従って，時空間的不均一な細胞挙動を考慮した培養法の開発が分化方向性誘導に必要となる．そこで本博士論文では，細胞培養面間相互作用および細胞間相互作用の観点から，時空間的不均一な細胞挙動の理解を試み，細胞挙動に基づくhMSCsの心筋分化方向性誘導に関する研究を行った．

第1章では，異なる培養面上でのhMSCsの細胞集塊挙動および心筋分化方向性誘導に関する培養特性を確認し，hMSCsの心筋分化方向性誘導には面上の遊走挙動(細胞培養面間相互作用)を介した集塊形成(細胞間相互作用)が重要な役割を果たすことが示唆された．

第2章では，G5面上の伸展と急激な退縮を伴う遊走挙動に対する細胞培養面間相互作用の役割について，細胞培養面間での接着に関与しているfibronectinに着目することで理解することを試みたところ，G5面上の細胞は，培養面上のfibronectinを構築化することによって，伸展と退縮を伴う遊走挙動を引き起こしていることが示唆された．

第3章では，培養面上の伸展と退縮を伴う挙動によるhMSCsの集塊内挙動を細胞間相互作用の観点から理解することを試みたところ，G5面上での細胞集塊の伸展と急激な退縮によって集塊内で細胞が混ざることが，細胞間接着の解離を介した心筋分化方向性を誘導することが示唆された．

第4章では，培養面上の細胞遊走時におけるlamellipodiaの発達に着目し，lamellipodiaの形成に関与するRac1発現の活性化および継代による細胞集塊の崩壊を行うことで細胞集塊挙動に基づくhMSCsの培養特性を確認した. Rac1 activatorの添加と継代操作を組み合わせた培養したところ，細胞集塊挙動が継続的に伸展と退縮し，cTnT陽性細胞比率が増加することが確認された．従って，細胞集塊の継続的な挙動を誘導する培養法がcTnT陽性細胞比率を増加させ，hMSCsを心筋分化方向性誘導へ揃えていくことが示唆された．

本研究では，細胞挙動の理解に基づく培養法によって，ヒト幹細胞群を心筋分化方向性へ揃える新たな概念を提案した．総括では，得られた知見を総括し，今後の展望について記した．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　小川　祐樹　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	紀ノ岡　正博
	副 査　教授	永井　健治
	副 査　教授	渡邉　肇
	副 査　教授	大政　健史
	副 査　教授	福崎　英一郎
	副 査　教授	藤山　和仁
	副 査　教授	村中　俊哉

論文審査の結果の要旨

本論文はヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs)を用いて培養面上における時空間的不均一な細胞挙動の理解を細胞培養面間および細胞間相互作用の観点から試み，細胞挙動に基づく心筋分化方向性誘導について報告している．

第1章では，異なる培養面上でのhMSCsの細胞集塊挙動および心筋分化方向性誘導に関する培養特性を確認している．伸展と急激な退縮を伴う遊走挙動を通した細胞集塊形成が生じる世代数5のポリアミドアミンデンドリマー提示培養面 (G5面)上のヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs)では，心筋細胞マーカーであるcardiac Troponin T (cTnT)陽性細胞比率が，PS面上での遊走を経た単層細胞と低接着性培養面上での遊走を経ない細胞集塊と比べて高いことを明らかにしている．これらの結果から，hMSCsの心筋分化方向性誘導には面上の遊走挙動(細胞培養面間相互作用)を介した集塊形成(細胞間相互作用)が重要な役割を果たすことを見出している．

第2章では，G5面上の伸展と急激な退縮を伴う遊走挙動に対する細胞培養面間相互作用の役割について，細胞培養面間での接着に関与しているfibronectinに着目することで理解することを試みている．繊維性のfibronectin fibrilsが形成されるG1面，G3面上の細胞と比較して，G5面上の細胞では，fibronectin分解酵素であるMT-MMPの発現が高く，細胞体で丸いfibronectin aggregatesの形成を明らかにし，MMPによるfibronectinの分解がfibronectin aggregatesを構築化することを示唆している．また，G5面上の細胞では，伸展時におけるlamellipodiaの発達およびfocal adhesionを構成するpaxillinの先端部への局在を明らかにし，focal adhesionの先端部への局在が細胞の伸展と退縮を引き起こすことを示唆している．これらの結果は，G5面上の細胞は，培養面上のfibronectinを構築化することによって，伸展と退縮を伴う遊走挙動を引き起こしていることを示唆している．

第3章では，培養面上の伸展と退縮を伴う挙動によるhMSCsの集塊内挙動を細胞間相互作用の観点から理解することを試みている．タイムラプス共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて，nucleus-GFPを形質導入したhMSCsの観察で，G5面上の伸展と退縮を伴う細胞集塊では，退縮時に集塊内で細胞が混ざる様子を明らかにしている．細胞間接着形成時に細胞質側に発現するβ-cateninと，cTnTの免疫蛍光染色により，G5面上の細胞集塊では集塊全域でβ-cateninの核内への局在およびcTnTの発現を明らかにしている．これらの結果は，G5面上での細胞集塊の伸展と急激な退縮によって集塊内で細胞が混ざることが，細胞間接着の解離を介した心筋分化方向性を誘導することを示唆している．

第4章では，培養面上の細胞遊走時におけるlamellipodiaの発達に着目し，lamellipodiaの形成に関与するRac1発現の活性化および継代による細胞集塊の崩壊を行うことで細胞集塊挙動に基づくhMSCsの培養特性を確認している．G5面上の細胞集塊に対して，Rac1 activatorを添加することによって，継続的な細胞集塊の伸展と退縮を確認し，Rac1 activatorを添加なしの条件と比較してcTnT陽性細胞比率が増加することを明らかにしている．また，G5面上の細胞集塊を新たなG5面へ継代すると，細胞集塊が崩壊し，遊走挙動を介した再形成が生じ，cTnT陽性細胞比率が増加することを明らかにしている．そこで，Rac1 activatorの添加と継代操作を組み合わせた培養したところ，72%までcTnT陽性細胞比率が増加することを明らかにしている．これらの結果は，細胞集塊の継続的な挙動がcTnT陽性細胞比率を増加させ，hMSCsを心筋分化方向性誘導へ揃えていくことを示唆している．

以上のように、本論文は細胞挙動の理解に基づく培養法によって，ヒト幹細胞の分化方向性を特定方向へ揃える新たな概念を提案している．よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。