



Title	Pivotal Role of Non-cardiomyocytes in Electromechanical and Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Cardiac Tissue
Author(s)	伊勢岡, 弘子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67121
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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 伊勢岡 弘子		
論文審査担当者	主 査	(職) 氏 名 大阪大学教授 濑 芳子
	副 査	大阪大学教授 坂田 春史
	副 査	大阪大学教授 中谷 鮎
論文審査の結果の要旨		
<p>iPS細胞由来心筋細胞シートの移植による再生治療は心不全に対する新たな治療法として期待されている。本論文では非心筋細胞が細胞シートの構造や機能に与える影響を解析し、再生治療において適切な心筋細胞純度が存在するかを検証した。</p> <p>心筋細胞シートを構成する細胞中、非心筋細胞としては線維芽細胞、平滑筋、内皮細胞のマーカーを発現する細胞が含まれており、非心筋細胞の割合が低い場合にはこれらの細胞から產生されるコラーゲン等の細胞外マトリックスが乏しいために細胞シートの構造が不安定であることが示された。また、適切な割合で心筋細胞と非心筋細胞が共存することにより、液性因子の発現、心筋細胞の成熟性、収縮・弛緩能などの機能も向上し、心筋梗塞モデルラットへの移植によって高い治療効果を持つことも明らかとなった。</p> <p>本論文の内容は、iPS胞由来心筋細胞シートを用いた再生医療の実用化にむけて、構造、機能的に優れた細胞シートを作製するために重要な知見であり、学位の授与に値すると考えられる。</p>		

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	伊勢岡 弘子
論文題名 Title	Pivotal Role of Non-cardiomyocytes in Electromechanical and Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Cardiac Tissue (iPS細胞由来心筋細胞組織の電導収縮能及び治療効果における非心筋細胞の重要な役割)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>iPS細胞由来心筋細胞シートの移植による再生治療は新たな治療法として期待されており、高純度の心筋細胞を得る手法の研究が進んでいる。一方、心臓組織では心筋細胞の割合は半分以下であり、心筋細胞シートの形態形成や機能においても非心筋細胞が必要であり、適切な心筋細胞純度が存在する事が推測される。本研究では、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>において、心筋細胞シートの細胞構成がその構造や機能に影響するかを検証した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>iPS細胞から心筋細胞を分化誘導して得られた細胞集団の構成を解析したところ、非心筋細胞としては線維芽細胞のマーカーであるTE-7、vimentin、平滑筋のマーカーであるα-SMA、caldesmon、calponin、内皮細胞マーカーであるCD31、CD144を発現している細胞が含まれていた。これらの細胞集団から心筋細胞と非心筋細胞とを分離した後に再度混合し、心筋細胞純度25, 50, 70, 90%の細胞シートを作製しその構造や機能を解析した。</p> <p>その結果、純度25~70%の場合には安定して細胞シートを形成することが可能であったが、純度90%以上の場合には細胞シートの形成が不安定であった。免疫染色、定量PCRの評価より、純度90%以上の場合には、コラーゲン、ラミニンなどの発現が低下しており、70%以下は同発現が有意に高値であった。また、細胞シートにおける非心筋細胞の構成、分布を免疫染色により評価したところ、非心筋細胞は心筋細胞の周囲を取り囲むように存在しており、特にα-SMA、vimentinを共発現しているmyofibroblast様の細胞が多く含まれていた。</p> <p>次に、細胞シートの機能的解析として細胞外電位の測定を行ったところ、純度50%以上ではシート全体が同期していたのに対して、25%の場合には同期がみられなかった。電位の伝播速度、拍動の規則性については純度に依存して高値を示した。また、Ca^{2+} transient、膜電位を評価したところ、ピークの立ち上がり、減衰の傾き、ペーシングへの追従性、いずれも純度70%の場合に最大となった。</p> <p>さらに、動画解析により細胞の動きを数値化して収縮・弛緩能を評価したところ、収縮・弛緩速度、収縮力・弛緩力に相当するパラメーター、いずれも純度70%の場合に最も高い値を示した。免疫染色により収縮タンパクであるMyosin light chain (MLC) のサブタイプの評価を行ったところ、心筋細胞純度に応じてMLC2v single positiveの心室タイプの心筋細胞の割合が増加し、MLC2a/2v double positiveの未成熟型の心筋細胞の割合が低下していた。また、細胞シートから産生されるサイトカインの発現を評価したところ、純度25~70%は90%に比べてVEGF、SCF、SDFの発現が高値を示した。</p> <p>次に、安定して細胞シートを形成することが可能であった純度25, 50, 70%の細胞シートをラット心筋梗塞モデルに移植したところ、コントロール群と比較して、50, 70%の場合に純度依存的に心機能改善効果が認められた。また、移植4週後においていずれの細胞シートも生着が確認できたが、純度70%の細胞シートは他と比べてよりサルコメア構造が発達しており、connexin43の発現も高かった。純度50、70%の細胞シート群では、コントロール群、25%の細胞シート群と比較して、線維化の抑制、血管密度の増加が認められた。心臓における液性因子の遺伝子発現を評価したところ、コントロール群と比較して純度50%の群でHGF、SDFの発現が、70%の群でSDFの発現が有意に高値を示した。最後に、生着した細胞シートとホストの心臓との電気的結合を評価するためにCa^{2+}感受性傾向色素であるGCaMP2を導入した細胞シートを移植し、ランゲンドルフ灌流心を用いたoptical mappingを行ったところ、純度50、70%の細胞シート群において移植細胞のCa^{2+} transientとホスト心の膜電位の同期が確認できた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
iPS細胞由来心筋細胞純度70%の細胞シートは、収縮・弛緩能、細胞シート構造に優れており、細胞移植による再生治療においてより優れた再生効果をもつ可能性が示唆された。	