

Title	Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Soluble Factors from Human Mesenchymal Stem Cells
Author(s)	吉田, 昇平
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72163
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		吉田 昇平	
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	中 谷 能
	副査	大阪大学教授	坂 田 泰 史
論文審査の結果の要旨			
<p>iPS細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) は成人心筋細胞と比較して構造的・機能的に未成熟である点や細胞によってその成熟度が異なることが指摘されている。今回の研究では複数の液性因子を分泌する間葉系幹細胞 (MSC) との共培養により成熟化が促進されるかについて調査した。ヒトiPS細胞を心筋分化誘導後に間葉系幹細胞と3日間共培養することで心筋構造蛋白が増加し、MHC-β/MHC-α比が上昇した。形態は扁平になり、細胞の大きさは上昇し、サルコメアにH帯の出現を認めた。また機能的には細胞の収縮速度・拡張速度が上昇した。電気生理学的には活動電位持続時間が延長し、ペーシングへの追従性が上昇した。代謝面ではATP産生量およびATP産生予備量が増加した。成熟化のメカニズムとして間葉系幹細胞が分泌するサイトカインやエクソソームが関与している可能性が示唆された。さらに間葉系幹細胞が分泌するエクソソームには心筋細胞を成熟化させるmicroRNAが多く含まれおり、それらのmicroRNAはイオンチャネル形成や細胞結合などを強化させることが示唆された。この研究は学位に値するものと認める。</p>			

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	吉田 昇平
論文題名 Title	Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Soluble Factors from Human Mesenchymal Stem Cells (間葉系幹細胞の液性因子はiPS細胞由来心筋細胞の成熟化を促進させる)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>iPS細胞 (iPSC) から心筋細胞が分化誘導できるようになり、iPSC由来心筋細胞 (iPS-CM) は心筋再生治療をはじめ、薬剤スクリーニング、疾患モデル、心毒性試験など様々な応用へのcell sourceとして期待されている。一方でiPS-CMは成人心筋細胞と比較して構造的・機能的に未成熟である点や細胞によってその成熟度が異なることが指摘されている。過去にiPS-CMの成熟化を促進させるために様々な方法が試みられてきたが、煩雑な手技や長時間の培養が必要であったり、十分な成熟が得られなかったりといずれも満足できるものではなく、また単一の因子では十分な成熟化は困難であると考察されている。この問題点を解決する方法として複数の液性因子を分泌する間葉系幹細胞 (MSC) との共培養が考えられた。過去の報告によるとMSCから分泌される液性因子によって希突起膠前駆細胞は機能的に成熟する。そこで今回MSCの液性因子によりiPS-CMの成熟化が促進されるかについて調査した。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>ヒトiPSCを心筋細胞へと分化誘導した後に、iPS-CM単独で維持培養を行う単独培養群と、MSCと共培養を行う共培養群に分けて3日間培養し、iPS-CMの構造的・機能的な成熟度を調査した。単独培養群に比べ共培養群では、心筋の構造蛋白であるMYH7のmRNAの発現が上昇しており、成熟度のマーカーとされているMHC-a/MHC-bの比が上昇していた。また細胞形態については共培養群では単独培養群に比べ扁平になり、単独培養では認められなかったH帯が共培養群では認められるなどサルコメア構造が成熟していた。位相差顕微鏡に使用した高速連続撮影では拍動エリアの拡大および収縮速度・拡張速度の上昇を認め、Caトランジェントを使用した電気生理学的検討では、共培養群は単独培養群に比べ活動電位持続時間と相関するPeak Width Duration、活動電位や収縮力と相関するPeak Ratioの上昇が認められた。また単独培養群では追従できなかった速いペーシングに共培養群では追従することが可能であった。またミトコンドリアにおける酸素消費速度を様々な薬剤を使用しながら測定することにより、共培養群では単独培養群に比べてATP産生量やATP産生予備量が上昇していることが明らかになった。さらに共培養群では酸化ストレス負荷時のROS生産量が単独培養群よりも減少していた。以上よりMSCとの共培養はiPS-CMを構造的・機能的に成熟させた。</p> <p>MSCの液性因子を調査したところ、iPS-CMの液性因子よりもVEGF、bFGF、SDF-1、GM-CSFが有意に多く含まれること、またエクソソームが豊富に含まれていることが明らかとなった。そこでVEGF、bFGF、SDF-1、GM-CSFの組み換え蛋白質およびMSCの分泌したエクソソームを単独培養群に添加したところ、いずれも部分的な成熟化が認められた。またVEGF、bFGF、SDF-1、GM-CSFの中和抗体およびエクソソーム生成阻害剤を共培養群に添加したところ、いずれも成熟化は部分的に阻害された。このことよりMSCの液性因子によるiPS-CMの成熟化にはサイトカインやエクソソームなど複数の因子が関与していることが示唆された。</p> <p>最後にiPS-CMを単独培養した細胞シートとiPS-CMとMSCを3日間共培養した細胞シートをヌードラット心筋梗塞モデルに移植することによりiPS-CMの成熟化が心機能および移植後の細胞生着に与える効果を調査した。MSCと共培養した細胞シートを移植したところ単独培養した細胞シートに比べ移植後四週目における細胞生着が増加しており、心機能改善効果が上昇していた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>MSCの液性因子はiPS-CMの成熟化を促進し、そのメカニズムとしては液性因子に含まれる様々なサイトカインやエクソソームと考えられた。今後この成熟化したiPS-CMを用いた様々な応用が期待される。</p>	