



Title	Geometrical Patterning and Constituent Cell Heterogeneity Facilitate Electrical Conduction Disturbances in a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Based Platform: An In vitro Disease Model of Atrial Arrhythmias
Author(s)	中西, 浩之
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76204
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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) 中西 浩之			
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	松村 泰志
	副 査	大阪大学教授	岡村 康司
論文審査の結果の要旨 本論文は、ヒトiPS細胞から分化誘導した心房型心筋細胞を、実際のヒト生体心の肺静脈-左心房境界部における解剖学的特徴の要素を抽出し単純な系に還元したプラットフォーム上で播種・培養することで、<i>in vitro</i>での電気伝導への影響について評価したものであった。ヒト生体由来の心筋細胞の使用には大きな制約を伴うことから、ヒトiPS細胞が有する多分化能を利用して心房型心筋細胞への分化誘導を行い、ヒト由来の心房筋型細胞を材料とした光学的マッピング実験を可能とした。急激な形状変化を伴う幾何学的パターンニングによって、ペーシング刺激頻度依存性にヒト心房筋型細胞シート上における伝導障害が生じることが視覚化されており、本現象の理解に十分寄与するものであった。また、線維芽細胞との共培養の結果、伝導障害に対する効果がさらに増強されることも明示されていた。従って、本研究は今後のヒト心房性不整脈モデルの構築に寄与できる可能性があると思われる。 以上より、本論文は学位の授与に値すると考えられる。			

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中西 浩之
論文題名 Title	Geometrical Patterning and Constituent Cell Heterogeneity Facilitate Electrical Conduction Disturbances in a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Based Platform: An <i>In vitro</i> Disease Model of Atrial Arrhythmias (幾何学的パターンニング及び構成細胞の不均一性は、ヒトiPS細胞由来心房型心筋細胞プラットフォームにおける伝導障害を促進する：インビトロでの心房性不整脈モデル)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
心房細動は、主に肺静脈を起源とするトリガーと、肺静脈内または肺静脈-左心房境界部における解剖学的形状変化及び機能的不均一性に基づく伝導障害の結果生じるマイクロリエントリーの成立がその主因の一つとされている。急激な構造的変化を伴う肺静脈-左心房境界部では、肺静脈起源の反復的な高周期異常興奮がその興奮伝導過程で電気伝導上の供給と需要の不一致 (source-to-sink mismatch) を生じ易く、また線維芽細胞をはじめとした非心筋細胞の存在も興奮伝導の不安定化に寄与し得る。これまでヒト由来の心房筋細胞を対象として、<i>in vitro</i>での幾何学的変化モデルを用いてsource-to-sink mismatchに基づく伝導障害を示した報告はほとんど知られておらず、またそのような機序に基づく伝導障害に対してヒト線維芽細胞との共培養が与える影響についてもほとんど明らかにされていない。本研究では、ヒトiPS細胞由来心房型心筋細胞及びヒト心房線維芽細胞を用いて、<i>in vitro</i>での幾何学的パターンニングモデル上で上記機序に基づく電気伝導への影響について検討を行った。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
monolayer法をベースとして、時期依存的なWnt/β-cateninシグナルの活性化並びに抑制化を介して、健常ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化誘導を行ったところ、免疫蛍光染色にて高比率の心筋トロポニンT陽性細胞が確認された。心房筋型へのサブタイプ誘導を目的に、心筋分化誘導過程でレチノイン酸を加えたところ、レチノイン酸を添加しない場合と同様に高比率の心筋トロポニンT陽性細胞が確認された。また、レチノイン酸添加群ではレチノイン酸非添加群と比べて、免疫蛍光染色にてMLC2a (ミオシン軽鎖心房筋型アイソフォーム) の発現が有意に上昇し、MLC2v (ミオシン軽鎖心室筋型アイソフォーム) の発現が有意に低下した。遺伝子発現解析の結果、レチノイン酸添加群ではレチノイン酸非添加群と比べて、心房筋特異的遺伝子 (<i>NPPA</i>, <i>SLN</i>, <i>PITX2</i>, <i>NR2F1</i>, <i>TBX5</i>, <i>KCNA5</i>, <i>KCNJ3</i>, <i>GJA5</i>) の発現が有意に増加し、心室筋特異的遺伝子 (<i>MYL2</i>, <i>IRX4</i>, <i>GJA1</i>) の発現が有意に低下した。さらに光学的活動電位解析の結果、レチノイン酸添加群ではレチノイン酸非添加群と比べて、活動電位持続時間の有意な短縮が見られた。以上より、レチノイン酸処理を行ったヒトiPS細胞由来心筋細胞は有意に心房筋型のサブタイプ特性を示した。 シリコン上で幾何学的変化を伴うプラットフォームを作成し、上記手法にて作製したヒトiPS細胞由来心房型心筋細胞の播種、培養を行った。膜電位感受性色素を用いた光学的マッピングにより興奮伝導の評価を行った。細胞外フィールド刺激を加えたところ、ペーシング刺激頻度依存的に幾何学的形状変化部位より遠位部における興奮伝導障害の出現頻度が増加し、さらに伝導障害の様相も多様化した。一方、幾何学的変化を伴わないプラットフォーム上では、幾何学的変化を伴う場合と比べてペーシング刺激頻度の増加に対しても興奮伝導において頑強性を示した。さらに、ヒト心房線維芽細胞との共培養を行ったところ、ヒトiPS細胞由来心房型心筋細胞単独培養の際と比較して、より緩やかな刺激レート条件下において幾何学的形状変化部位より遠位部における興奮伝導障害が誘発された。	
〔総 括(Conclusion)〕	
<i>in vitro</i>での急激な形状変化を伴う幾何学的パターンニングは、source-to-sink mismatchを介してヒトiPS細胞由来心房型心筋細胞の伝導障害を促進した。線維芽細胞の存在により、その効果はさらに顕著なものとなった。今回の結果は、将来的により精緻なヒト心房性不整脈モデルの構築につながる可能性が示唆される。	