



Title	Study on Angiogenic Cytokine Production in Human Skeletal Muscle Cell Sheet
Author(s)	Thummarati, Parichut
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/87706">https://doi.org/10.18910/87706</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name (PARICHUT THUMMARATI)	
Title	Study on Angiogenic Cytokine Production in Human Skeletal Muscle Cell Sheet (骨格筋細胞シートにおける血管新生系サイトカイン生成にかかる研究)
<p><b>Abstract of Thesis</b></p> <p><b>Chapter 1 General Introduction</b> Skeletal muscle mainly consists of a heterogeneous population of myoblasts and fibroblasts. The skeletal muscle cells have been studied for regeneration to apply for autologous transplantation in the patient's heart with ischemia. Plenty of angiogenic cytokines secreted from the skeletal muscle cells have been shown to recover the damaged tissue, possibly through angiogenesis induction. While research on cell sheet has expanded, the impacts of human skeletal muscle fibroblast (HSMF) co-cultured with skeletal muscle myoblast (HSM) on angiogenic cytokine balance and its implication have not been yet clarified. In this study, mono-culture and co-culture of HSM and HSMF as monolayers (two-dimensional structure) and multilayers (three-dimensional structure) in various conditions and their respective outcomes were investigated to understand the angiogenic cytokine balance and endothelial network formation regulation.</p> <p><b>Chapter 2 Angiogenic cytokine productivity in human skeletal muscle cells :</b> The effect of HSMF co-culture in skeletal muscle cell sheets on the productivity of angiogenic cytokines and angiogenesis was elucidated. The skeletal muscle cells from the original source were isolated into HSM and HSMF populations. These cells were then prepared by mono-culture and co-culture as monolayers. The culture media were collected and measured the angiogenic cytokine productivity. Time-lapse observation and cell tracking system were applied to understand physiological interactions implicating cytokine production from monolayers with different HSMF ratio. Moreover, the effect of heterogeneous populations of skeletal muscle cells on angiogenesis was evaluated using 3D <i>in vitro</i> culture system imitating <i>in vivo</i> angiogenesis, in which green fluorescent protein-expressing human umbilical vein endothelial cells (GFP-HUVECs) were cultured under the fabricated multilayered human skeletal muscle cells with various proportions of HSMF. This study showed that co-culturing HSMFs in the HSM sheet at a suitable ratio (HSMF: HSM ratios were 6:14 or 8:12) enhances angiogenic cytokine secretion and endothelial network formation.</p> <p><b>Chapter 3 Effect of exogenous FGF-2 on endothelial function in the 5-layered skeletal muscle cell sheets :</b> The roles of FGF-2 in endothelial behaviors to promote endothelial network formation in the human skeletal muscle cell sheets were studied. A culture system comprising five-layered sheets of human skeletal muscle cells co-incubated on GFP-HUVECs mimicking <i>in vivo</i> angiogenesis was prepared, and exogenous FGF-2 was added in culture media of a treated group of the cell sheet. The endothelial network images from the local and whole area inside the cell sheet were captured and analyzed the network length, tip number, and connectivity to understand the extension of the endothelial network. The quantitative analysis method of endothelial network formation was modified from the previous study to measure the network from the whole sheet area. The numbers of medium and long endothelial networks in the cell sheet were measured, and time-lapse observation of endothelial cells during network formation was applied to elucidate the precise role of FGF-2 on endothelial functions during network extension. This study showed the precise role of FGF-2 in maintaining endothelial connection and the extent of the endothelial network in skeletal muscle cell sheets.</p> <p><b>Chapter 4 Concluding remarks :</b> This study provides the impact of HSMF co-cultured in skeletal muscle cell sheets on the production of angiogenic cytokines (VEGF, HGF, and FGF-2) and its implication on angiogenesis. This study also creates cultural conditions to enhance endothelial network formation, which are regarded as necessary in skeletal muscle cell sheets and other tissue engineering approaches.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( PARICHUT THUMMARATI )			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	大政 健史

## 論文審査の結果の要旨

本博士論文は、骨格筋由来の線維芽細胞と筋芽細胞からなるシート構造を有する細胞シート内における細胞挙動、サイトカイン生成について検討し、特に、内在性のサイトカイン（シート内の細胞から生成されるサイトカイン）、外在性のサイトカイン（培地中に添加されるサイトカイン）の血管新生に及ぼす影響を示している。

第 1 章においては、全体の緒言として、ヒト筋芽細胞シートが、骨格筋由来線維芽細胞と筋芽細胞の不均一なポピュレーションからなることを示し、拡張型心筋症などの自家細胞移植に使われてきた経緯を示している。その際、筋芽細胞シートから血管新生に有効なサイトカインの生成が見られ、患部回復の重要な作用機序であることを示している。

第 2 章においては、骨格筋細胞における線維芽細胞と筋芽細胞の単離法を確立し、その両者から生成される内在性サイトカインについて、細胞群の構造として、単細胞状態よりシート状、さらには重層化で、サイトカイン生成能力が上昇することを示している。さらに、線維芽細胞と筋芽細胞のポピュレーション効果について示し、主として、HGF は線維芽細胞により、VEGF は筋芽細胞により生成されていることを明らかにしている。その際、混在している線維芽細胞の遊走により、筋芽細胞の整列が崩壊することで、VEGF がより生成されることを明らかにしている。これらの知見に基づき、2 種の細胞が混在する 5 層細胞シートに、血管内皮細胞をさらに混在させ共培養することで内皮細胞ネットワークを評価する系を構築し、血管新生能の評価を行っている。本系において、サイトカイン生成が多いポピュレーションバランスで血管新生能が高いことを明らかにしている。

第 3 章においては、本血管新生の評価系にて、外在性の FGF を添加することによる内皮細胞ネットワークを評価している。特に、FGF の添加により、内皮細胞間の接着能には変化がないが、一度、連結した内皮細胞が再び脱着することが顕著に抑えられ、結果として、内皮細胞ネットワークが長期に維持できることを明らかにしている。以上より、外在性の添加 FGF の血管新生能力を定量的に評価したのみならず、細胞レベルでの挙動を明らかにして、ネットワーク形成維持の解明を行っている。

第 4 章では、総括として、筋芽細胞シート内の血管新生のメカニズムについて、内在性及び外在性のサイトカインの役割について明らかとなったことをまとめ、さらに、本評価系の将来展望を示している。

以上のように、本論文は、内在性・外在性のサイトカインの役割を示し、結果として、血管新生能の評価系の構築することに至っている実践的な報告である。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。