

京都大学	博士（医学）	氏 名	鎌倉 令
論文題目	Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture (長期培養におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の超微細構造成熟過程の検討)		
(論文内容の要旨)			
人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は心筋細胞に分化することができ、再生医療、遺伝性心疾患の機序の解析に有用なツールである。iPS 由来心筋細胞は、成熟心筋細胞に類似した電気生理学的・生化学的特徴を有するものの、成熟度が低いことが報告されている。これまで、iPS 由来心筋細胞の超微細構造の成熟過程に関しては、十分検討されていない。ヒト iPS 由来心筋細胞の超微細構造は、心筋分化開始 30 日目には Z 帯を有するサルコメア構造を認めることが報告されているが、成熟心筋細胞のような M 帯を有するサルコメア構造は認めず、十分に成熟したものではない。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を成熟心筋細胞に分化させる方法はこれまで報告されておらず、疾患メカニズムの解析や再生医療への応用にあたり、未熟性が妨げとなる可能性がある。本研究は、1 年間の長期培養によるヒト iPS 由来心筋細胞の成熟過程を、超微細構造、遺伝子発現の変化から検討することとした。 レトロウィルスベクターを用いて Oct3/4、SOX-2、Klf4、c-Myc を導入し作成されたヒト iPS 細胞(201B7 line)を用いた。心筋細胞への分化誘導は、胚様体法を用いて行った。心筋分化開始後、360 日目までの拍動する胚様体から単離して得られたヒト iPS 由来心筋細胞を用いて、電子顕微鏡による超微細構造の検討、リアルタイム定量的 PCR による遺伝子発現の検討を行った。 心筋分化誘導開始 8 日目から、胚様体の拍動が見られるようになり、360 日以上拍動を続けた。360 日目の胚様体拍動数は 30 日目の胚様体と比較して有意に低値で、単離されたヒト iPS 由来心筋細胞のサイズは 360 日間の培養により有意に増大した。 超微細構造の検討では、分化誘導開始 14 日目の心筋細胞内には、Z 帯間に挟まれた筋線維がわずかに存在するのみで、筋線維の配列は錯綜しており、A、H、I、M 帯は認めなかった。30 日目の心筋細胞では、未熟なサルコメア構造は減少し、並列する Z 帯間に筋線維が存在する典型的なサルコメア構造を呈するようになった。A、I 帯、ミトコンドリア、筋小胞体といった細胞内構造物の形成も確認できたが、H、M 帯は認めなかった。60 日目から 180 日目にかけて、徐々に筋線維は密に、かつ整列して配列するようになり、180 日目の心筋細胞において H 帯の形成を認めたが、M 帯は認めなかった。360 日目の心筋細胞において初めて、A、H、I、Z 帯に加え、心筋細胞成熟の最終段階に出現するとされる M 帯を少数のサルコメア構造内に確認できた。 心筋特異的遺伝子発現の検討では、心筋分化誘導開始 360 日目の心筋細胞において、M 帯構成遺伝子発現レベル、心筋特異的遺伝子発現レベルが、30 日目の心筋細胞と比較して増加しており、心筋成熟を支持する所見と考えられた。			

しかしながら、360 日目の心筋細胞においても、サルコメア構造の均一な成熟は見られず、様々な分化段階のサルコメア構造を認めた。心筋特異的遺伝子発現レベルも、成人心筋細胞と比較すると低値であった。心筋細胞の成熟に必要とされる体液因子や力学的・電氣的ストレスなどが、in vitro 培養環境では欠如していることが関係しているのかもしれない。再生医療、疾患メカニズムの解析への応用にあたっては、さらなる心筋細胞の成熟が必要と考えられた。 本研究は、1 年間の長期培養を通じてヒト iPS 由来心筋細胞のサルコメア構造の成熟過程を検討し、M 帯の形成を伴う超微細構造の成熟を認めた。ヒト iPS 由来心筋細胞の成熟過程についての新たな知見と考えられる。
(論文審査の結果の要旨) ヒト人工多能性幹(iPS)細胞は多分化能を有し、再生医療や創薬、遺伝性疾患の機序解明に有用なツールである。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は、成人心筋細胞に比べて成熟度が低いことが報告されており、再生医療への応用や病態解明研究の障害となっているが、その成熟過程については現在まで十分検討されていない。本研究では、長期培養におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化を検討するため、超微細構造と遺伝子発現の変化を解析した。 心筋分化誘導開始後 360 日目までの拍動する胚様体から得られたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の超微細構造の検討では、経時的に A、H、I、Z 帯を有する典型的なサルコメア構造を呈するようになり、360 日目の心筋細胞において初めて、成熟心筋細胞において認められる M 帯を 7%の心筋細胞内に確認することができた。心筋特異的遺伝子発現の解析では、経時的に M 帯構成遺伝子、心筋サルコメア関連遺伝子発現が増加しており、心筋成熟化を示唆する所見と考えられた。 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は、1 年間に及ぶ長期培養により、少数ではあるが M 帯の形成を伴うサルコメア構造の成熟を認めた。ただその成熟化は緩徐であり、今後さらなる成熟化法の開発が必要であると考えられた。
以上の研究は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟過程の解明に貢献し、心疾患分野における再生医療、疾患病態解明へ寄与すると期待される。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は平成 27 年 3 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降