

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	門田 真
論文題目	Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets （ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞シートにおけるリエントリー性不整脈モデルの作成）		
（論文内容の要旨） 心室性不整脈（心室細動、心室頻拍）は生命にかかわる重篤な疾患であり、その出現には心筋細胞の異常興奮が関わっており、持続する不整脈の形態が旋回波：スパイラルリエントリーとなることが知られています。こういった不整脈のモデルとしては動物由来の細胞や組織が多く使用されていますが、心拍数や発現する遺伝子などがヒトと動物では異なることから、動物モデルではヒトの心臓における正確な病状の再現や薬剤効果の評価が困難と考えられます。そこで、本論文ではヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）由来の心筋細胞から細胞シートを作成することで、リエントリー性不整脈と薬剤による治療効果を再現することを目的としました。 方法は、ヒト ES/iPS 細胞から高効率に心筋細胞を分化誘導し、大量に作成した成熟心筋細胞から直径 12mm の細胞シートを作成しました。シートを作成して 2 日から 1 カ月間培養した後に、カルシウムイオン感受性色素 Fluo-4 を投与することにより、蛍光顕微鏡を用いて興奮伝播が波となってシート上を伝わる様子を観察しました。さらに、高頻拍刺激を行うことで不整脈を誘発し、誘発されやすい条件を検討しました。また、誘発された不整脈に対して、抗不整脈薬を投与し、治療効果を再現できるかを検討しました。また、作成した心筋細胞シートの性質を知るために、免疫抗体染色、遺伝子発現の解析、さらに細胞内・細胞間構造解析などを行いました。 結果は、ヒト ES/iPS 細胞由来心筋シートをカルシウムイオン感受性色素 Fluo-4 で標識したところ、その興奮伝播が一様な波形として認められました。また、刺激頻度を上げた場合や、Na チャネル阻害剤（リドカイン・テトロドトキシン）を投与した時に、伝播速度の低下がみられ、生理学的に正常な応答を示しました。また、シート作成後の 1 カ月間は、培養日数に応じて伝播速度が上昇したことから、心筋細胞シートを長期培養することで組織的な成熟化が進んでいることが示唆されました。さらに免疫抗体染色の解析で約 90%が心筋細胞であること、細胞間構造解析でギャップ結合が多く認められることなどから、この心筋細胞シートが実際の心臓の組織に比較的近いものであることが裏付けられました。 シート作成時に播く細胞数を調整すると、より低い密度（$1.3\times10^3/\text{mm}^2$）の細胞シートにおいて旋回する波形（リエントリー性不整脈モデル）が誘発されやすい傾向を示しました。これは、心筋細胞の密度が特に低い部分において、部分的に興奮性が低下することで一様な興奮伝播が困難になり、結果として興奮が旋回すると考えられました。このような興奮性の低下と旋回は実際の心臓においても心筋梗塞後などで見られる現象であり、この心筋細胞シートが病態を再現する不整脈モデルとして適切であることを示しました。			

そして、誘発された旋回波（リエントリー性不整脈モデル）に対して抗不整脈薬を投与したところ、K チャネル阻害剤（E-4031・ニフェカラント・ソタロール・キニジン）により、興奮波の消失が認められました。特に、ニフェカラントを投与した場合には、濃度依存的に旋回波の内側の非興奮領域が増大し、その後旋回波が消失することが分りました。これらの反応は、一般的によく利用される新生児ラット由来心筋細胞シートでは確認することができなかったため、ヒト由来の心筋細胞に特徴的な現象であると考えられました。このようにヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞シートが、ヒトにおける薬効評価手段として利用価値の高いものであることが示されました。
（論文審査の結果の要旨） ヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）から誘導した心筋細胞を再播種してシート状培養を行い、電気的刺激を加えることによりリエントリー（興奮の旋回）を誘発する不整脈モデルを構築した。心筋細胞の播種密度を調整することにより、播種密度が高い時（$2.6 \times 10^3 \text{細胞}/\text{mm}^3$）よりも低い時（$1.3 \times 10^3 \text{細胞}/\text{mm}^3$）に有意に旋回波が誘発されることを示した。さらに、リエントリー性不整脈が起こっている心筋細胞シートに抗不整脈薬を投与することにより旋回波を止めることができることを示し、病状の再現に加え臨床で使用されている薬剤の治療効果の再現にも成功した。従来頻用されている新生仔ラット由来心筋細胞ではこれらの反応は確認されなかった。誘導・使用された心筋細胞の成体心筋としての成熟度がまだ不十分であること、旋回波の伝播速度が成体心臓で観察されるものより遅いことなど改善点は認められるが、本研究の成果によって、これまで限られていたヒト心臓における細胞モデル構築とヒトの不整脈における病態解明に新しい可能性をもたらしうると考えられた。ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞シートが、リエントリー性不整脈の病態再現・薬効評価手段として利用価値の高いものであることが示された。
以上の研究は、ヒト多能性幹細胞を用いた新しい細胞モデル構築の基盤となり得るものであり、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞の薬剤安全性評価や不整脈の治療薬開発に寄与するところが多い。
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 25 年 2 月 26 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。

