

京都大学	博士（医学）	氏名	羽 溪 健
論文題目	Nano-structural Analysis of Engrafted Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes in Mouse Hearts Using a Genetic-probe APEX2 (遺伝子プローブ APEX2 を用いたマウス心臓における生着ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のナノ構造解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>多くの動物実験でヒト iPS 細胞由来心筋細胞の心臓移植の有用性が示されている。しかしながら、移植後生着したヒト iPS 細胞由来心筋細胞のナノ構造を電子顕微鏡で解析した報告はない。この理由の 1 つに、電子顕微鏡画像は倍率が非常に高く、どの細胞が移植細胞であるかを証明するのが困難であることが挙げられる。電子顕微鏡画像で、細胞の特定の構造を識別できるアスコルビン酸改変遺伝子プローブ (APEX2) が近年開発された。APEX2 はペルオキシダーゼ活性があり、DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 染色で APEX2 が発現している部位に DAB が沈着し、肉眼では茶褐色になる。さらに、電子顕微鏡画像のコントラストを出す電子染色で用いる四酸化オスミウムは沈着した DAB に結合するため、電子顕微鏡画像で黒く表示される。一方、心筋細胞には活動電位の変化やカルシウム濃度の変化を効率よく筋収縮に転換する興奮収縮連関があり、T 管や 2 つ組み (dyad) が重要な役割を果たしている。これらを構造学的に解析することは重要であるが、非常に小さく、電子顕微鏡による観察が必要である。そこで、APEX2 を用いて移植後に生着したヒト iPS 細胞由来心筋細胞のナノ構造を解析した。</p> <p>心筋特異的に発現する MYH6 (myosin heavy chain 6) のプロモーター下に GFP 遺伝子を導入し、さらに恒常的に luciferase 2 (Luc2) を発現する健常人由来ヒト iPS 細胞のレポーターライン (201B7-MYH6-GFP-CAG-Luc2) を用いた。これにより、セルソーターで GFP 陽性細胞を回収することで心筋細胞を純化し、移植後に luciferin を投与することで移植心筋細胞の生着量を測定できる。このレポーターラインに、CAG プロモーター下に APEX2 と FLAG タグ、核移行シグナルであるヒストン 2B (H2B) を結合させたタンパク質を恒常発現させたプラスミド (CAG-FLAG-APEX2-H2B) を遺伝子導入した。この樹立した iPS 細胞が多分化能を維持していることを確認した。また、この iPS 細胞が心筋細胞に分化する過程で、APEX2 によるペルオキシダーゼ活性の影響を受けないことを確かめた。次に、この iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導し、分化誘導を開始して 20 日目に心筋細胞だけをセルソーターで回収し、左冠動脈前下行枝結紮による心筋梗塞モデル免疫不全マウスの心筋梗塞領域に移植した。移植 6 ヶ月後、移植細胞は心筋細胞として生着し、移植細胞の核が DAB 染色され、APEX2 の発現が持続していることを確認した。X 線顕微鏡では、ペルオキシダーゼ活性部位に結合した四酸化オスミウムは X 線透過性が低く、宿主細胞と移植心筋細胞が APEX2 により識別でき、移植心筋細胞の 3 次元配置の描出に成功した。電子顕微鏡では、移植心筋細胞と宿主細胞が鮮明に識別でき、宿主細胞と比して未熟ではあるものの、移植心筋細胞には M 帯や I 帯といった比較的成熟したサルコメア構造を認めた。さらに、3 次元再構成電子顕微鏡画像では、移植心筋細胞に T 管や dyad が形成され始めていた。</p>			

<p>このように、APEX2 は移植長期経過後にも発現しており、生着したヒト iPS 細胞由来心筋細胞に T 管や dyad が形成されていることを初めて証明した。また、この APEX2 を用いる手法は、心筋細胞移植だけではなく、他の iPS 細胞由来分化細胞の移植に応用することができ、移植長期経過後の電子顕微鏡を用いた移植細胞のナノ構造解析に有用であると考えられる。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>心臓への細胞移植後に生着したヒト iPS 細胞由来心筋細胞のナノ構造を電子顕微鏡で解析するため、細胞の特定の構造を電子顕微鏡で識別できるアスコルビン酸改変遺伝子プローブ (APEX2) に着目した。健常ヒト iPS 細胞を APEX2 が核に発現するように遺伝子改変した。APEX2 にはペルオキシダーゼ活性があるが、細胞増殖能、心筋分化効率、マイクロアレイ解析によって、ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導過程で影響がないことが確認された。次に、このヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導及び純化した後、左冠動脈結紮心筋梗塞モデル免疫不全マウスに移植した。移植 6 ヶ月後、移植細胞は心筋細胞として生着し、APEX2 の発現が持続していることが確認された。X 線顕微鏡では、移植心筋細胞の核が APEX2 により識別でき、宿主心臓における移植心筋細胞の 3 次元配置が描出された。電子顕微鏡では、移植心筋細胞と宿主細胞が鮮明に識別でき、宿主細胞と比して未熟ではあるものの、移植心筋細胞には Z 帯や M 帯といった比較的成熟したサルコメア構造を認めた。さらに、3 次元再構成電子顕微鏡画像では、生着した移植心筋細胞に T 管や dyad 様の構造が形成され始めていることが明確に示された。</p> <p>以上の研究は、心臓への細胞移植後に生着したヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟度の解明に貢献し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞による心臓再生治療に寄与するところが多い。</p> <p>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。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 12 月 18 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。</p>
--

要旨公開可能日： 年 月 日以降