

論文内容要旨 (和文)

2020 年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学 専攻 応用生命 分野

氏 名 矢野 瑞菜

印

論 文 題 目 多価不飽和脂肪酸の培地内添加が培養心筋細胞に及ぼす影響

重篤な心疾患に対して患者自身の細胞を利用する再生医療が注目され、本邦ではヒトiPS細胞を利用した心疾患治療の臨床試験が2020年から開始されている。ヒトiPS細胞に関する研究では、98%を超える高い分化率を獲得する方法や成熟向上に関する研究成果が種々報告されているが、体外で作製された心筋組織の拍動機能は生体内のそれと比べて劣っているなど未だ解決されていない課題は多く残されており、これらの課題解決を目指したさらなる基礎研究が必要とされている。本研究ではこれらの課題に対して、培養に用いる培地中の脂質不足に着目した。脂質の主要物質である脂肪酸は心保護作用など種々の生理活性を有しており生体において欠かすことができない。しかしながら、一般的に心筋細胞の培養に用いられている培地には脂肪酸が含まれていない。さらに先行研究によって、ラット新生児心筋細胞 (In vivo) に対してラット胎児由来初代培養心筋細胞 (In vitro) では、多価不飽和脂肪酸の含有量が低く、特にドコサヘキサエン酸 (DHA) 及びアラキドン酸 (AA) の含有量が著しく低値であることが明らかになった。そこで、これらの脂肪酸を培地内に加えると拍動によって生じる収縮率が脂肪酸を加えていない培養細胞 (Control) よりも有意に高くなり、これらの脂肪酸が拍動機能を向上させる可能性が示唆された。

本研究では、DHAまたはAAの培地内添加が培養心筋細胞の拍動機能に及ぼす影響を明らかにするために、ラット胎児由来初代培養心筋細胞の拍動力と遺伝子発現変化に脂肪酸が及ぼす影響を明らかにすることを第一目標とした。さらに、この2つの脂肪酸がヒトiPS細胞由来心筋細胞に及ぼす影響についてほとんど検討されていないことから、ヒトiPS心筋細胞の拍動力、収縮率、遺伝子発現変化及びエネルギー代謝に及ぼす影響について明らかにすることを第二目標とした。

まずこの目標達成には拍動力測定装置の開発が必須であった。そこで先行研究で行われた環状コラーゲンゲル上で心筋細胞を培養し、ディッシュ上の2本の梁にゲルを引っ掛けることで拍動による変位を求め、拍動力を測定する方法を参考に、より簡便かつ細胞への負荷を少なくできる装置の開発を目指した。機械工学の知見を組み合わせることで、梁を可動式にすることで操作を簡便にすることに成功し、ゲルにひずみを与えることができる装置の開発に成功した。この装置を用いて、ラット胎児由来初代培養心筋細胞及びヒトiPS心筋細胞の拍動力測定をおこなった。

ラット胎児由来初代培養心筋細胞は胎生約20日のラット胎児から心筋細胞を採取し、遺伝子発現測定用にディッシュ、拍動力測定用にコラーゲンゲル上に細胞を播種し1週間の培養を行った。培地は脂肪酸無添加群 (Control)、DHA濃度20 μ M添加群 (DHA群)、AA濃度50 μ M添加群 (AA群) の3グループに分けた。脂肪酸はあらかじめアルブミンと結合させた。遺伝子発現の測定は培養1, 2, 7日目にmRNA抽出を行い、Controlに対する相対遺伝子発現量をRT-PCRによって評価した。遺伝子は「分化、成熟」、「細胞接着」、「脂肪酸代謝」に関与する12種類 (Housekeeping遺伝子を含む) を測定した。ゲル上培養心筋細胞は培養4, 7日目に拍動力測定を行った。

一方で、ヒトiPS心筋細胞ではさらに6種類の遺伝子を加え、18種類の遺伝子を用いた。またヒトiPS細胞では、DHAまたはAA添加時の拍動力、収縮率の測定、更にエネルギー代謝への影響を評価するために、グルコースが代謝されることで産生されるグルコース6リン酸 (G6P) および脂肪酸が代謝さ

せることで産生される β ヒドロキシ酪酸 (BHB) の測定を行った。ヒトiPS心筋細胞は約3週間の未分化培養で細胞数を増やした後、Wnt回路の変調を利用した分化方法で心筋細胞への分化誘導を行った。分化誘導開始日を分化0日目として、分化15日目に拍動力と収縮率用に心筋細胞をコラーゲンゲル上に播種し、遺伝子発現とエネルギー代謝用には更に5日間の純化处理を行い心筋細胞以外の細胞を除去し、分化21日目にディッシュ上に細胞を播種した。ディッシュまたはゲル上に播種してから2週間の脂肪酸培地による培養を行った。脂肪酸培地での2週間の培養後、拍動力と拍動収縮率及び遺伝子発現量の測定を行った。エネルギー代謝産物の測定は脂肪酸培地に変えてから4日目及び15日目に行った。

ラット胎児由来初代培養心筋細胞の拍動力では、培養7日目にControlに対してAA群の拍動力が高値となる傾向が見られたが有意差は得られず、DHA群は培養4、7日目ともにControlとほぼ変わらない値となった。遺伝子発現では、DHA群とAA群ともにControlよりも分化マーカーであるNkx2.5や脂肪酸代謝マーカーであるCd36の発現が有意に高値となり、特に細胞接着マーカーであるCdh2やCx43の発現量が有意に高くなった。

ヒトiPS心筋細胞の拍動力もControlに対して有意な変化は見られず、DHA群の拍動力はControlよりやや高く、AA群の拍動力がControlよりも低くなる傾向が見られた。一方で、収縮率はControlよりも高値となり、AA群では有意に高値となった。さらに、脂肪酸を培地内に加えたとき細胞塊 (クラスター) が形成され、AA群でより強く見られた。有限要素によるCAE解析を行うことで、クラスターによって拍動力がゲル表面に集中することが明らかとなった。遺伝子発現変化では、DHA添加群よりAA添加群においてmRNAの発現量がControlよりも高くなる傾向がみられ、分化成熟マーカーであるP300や脂肪酸代謝マーカーであるCd36が有意に高値となった。一方でDHA群では Mlc2vの発現量が有意に低値となり、Cdh2においてはDHA群、AA群ともに有意に低値となった。代謝産物では、DHA群とAA群で培養4、7日目のG6Pの濃度はControlよりも低値となる一方で、BHBはControlよりも高くなる傾向が見られ、代謝産物でもAA群でその傾向は強く見られたが、どちらも有意差は得られなかった。

先行研究によって、DHAまたはAAの培地内添加はラット胎児由来初代培養心筋細胞の拍動収縮率を向上させることが明らかになったが、拍動力ではAA添加時に拍動力が高値となる傾向は見られたものの、有意な変化は見られなかった。一方で、遺伝子発現変化ではDHA、AA群ともに細胞接着因子であるCdh2やCx43の発現量が亢進した。以上の結果から、DHA及びAAの培地内添加はラット胎児由来初代培養心筋細胞の拍動力自体を向上させるのではなく、細胞同士の接着を亢進させることで拍動機能を向上させる可能性が明らかとなった。一方でヒトiPS心筋細胞の場合、拍動による収縮率はControlよりも高くなり、特にAA添加群では有意に高値となったが、拍動力は有意な変化が見られず、更にAA群ではControlよりも低値となった。これに対しCAE解析を行うことで、クラスター形成によって収縮率自体は高値となるものの、ゲル全体の拍動力は非クラスターよりも低値となるとが明らかになり、AA群の収縮率向上と拍動力低下にクラスター形成が関与している可能性が示唆された。遺伝子発現変化ではAA群でP300やCd36などの遺伝子発現が高値となったが、DHA群ともに細胞接着因子であるCdh2の発現量が有意に低値となることから、心筋細胞単体に対してのDHA及びAAの作用は弱く、クラスター形成など非心筋細胞との相互作用などに関与している可能性が考えられる。またエネルギー代謝では、G6P濃度が下がりBHB濃度が高くなり、AA群では有意に低値となった。このことから、特にAA群で一定のエネルギー代謝が行われている可能性が示唆された。以上の結果から、DHA及びAAの培地内添加は培養心筋細胞の拍動力自体を大きく向上させることはないが、ラット胎児由来初代培養心筋細胞では細胞間接着を有意に亢進させ、純化处理を行っていないヒトiPS心筋細胞ではクラスター形成を引き起こすことが明らかになった。更にCAE解析によってクラスター形成はゲル全体ではなくゲル表面部分の収縮を向上させることが明らかになり、DHA及びAAの培地内添加が細胞シートなどの薄膜状の心筋組織などで拍動機能を向上させる可能性が示唆された。

論文内容要旨 (英文)

2020 年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学 専攻 応用生命 分野

氏 名 矢野 瑞菜

印

論 文 題 目

The effects of polyunsaturated fatty acid supplementations on cultured cardiomyocytes

Tissue-engineered myocardial equivalents have inferior contractile function compared to their counterpart in vivo. Our previous studies revealed that the contractile fraction of cultured fetal cardiomyocytes with supplementation of docosahexaenoic acid (DHA) or arachidonic acid (AA) was significantly higher than that without the fatty acids supplementation. In this study, we aimed to clarify the effects of DHA and AA on the cultured cardiomyocytes derived from fetal rats or human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Cardiomyocytes were isolated from rat embryos on about 20 days after fertilization and cultured on gels or dishes for one week, i.e. primary culture of fetal cardiomyocytes. mRNA was extracted on days 1, 2 and 7 and contractile force was measured on days 4 and 7 by a lab-made measurement device. Cardiomyocytes derived from hiPSCs (hiPS-CMs) were cultured on gels or dishes for two weeks. mRNA extraction and measurement of contractile force and contractile fraction were performed on day 14. Furthermore, the concentration of fatty acid and glucose metabolites were measured on days 4 and 15. Cardiomyocytes cultured with medium without fatty acid supplementation was indicated as Control, and cultured with supplementation of 20 μ M DHA or 50 μ M AA was indicated as DHA group or AA group, respectively. In the case of cultured fetal cardiomyocytes, contractile force of the AA group tended to be higher than that of Control on day 7, while DHA group were almost as the same as Control on both measurement days. In terms of gene expression, several genes such as differentiation marker Nkx2.5 and fatty acid metabolism marker Cd36, in particular, cell adhesion markers Cdh2 and Cx43 were at significantly higher levels for both DHA and AA groups than for the Control. In the case of cultured hiPS-CMs, there was no significant change in contractile force compared to the Control. The contractile force of DHA group was slightly higher than that of the Control, and that of AA group tended to be lower. On the other hand, the contractile fraction was higher for the supplementation groups than that for the Control, and AA group presented significantly higher value. Furthermore, cell clusters were formed when fatty acids were supplemented in the media, and they were more obviously observed for the AA group. Finite element analysis (FEA) revealed that the clusters concentrated the contractile force on the gel surface. As for gene expression, differentiation marker P300 and Cd36 were at significantly higher levels for AA group than for the Control, while expression of differentiation marker Mlc2v was significantly lower in DHA group. Cdh2 was significantly lower for both DHA and AA groups. In energy metabolism, the glucose metabolite (G6P) concentration decreased and the fatty acid metabolite (BHB) concentration increased in the cytoplasm under fatty acid supplementations, in particular AA group significantly lower than that of Control. It suggests

that a certain amount of fatty acids are consumed in energy metabolism, and that the AA group in particular may enhance metabolism. These results revealed that DHA or AA supplementation does not directly improve the contractile force of cultured cardiomyocytes; however, it was suggested that the fatty acids could improve contractility by enhancing cell adhesion and cluster formation for the cultured cardiomyocytes.

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

令和 5 年 2 月 6 日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 馮 忠剛

副査 湯浅 哲也

副査 井上 健司

副査 山本 修



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	バイオ工学専攻・応用生命分野		氏名	矢野 瑞菜	
論文題目	多価不飽和脂肪酸の培地内添加が培養心筋細胞に及ぼす影響				
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	令和 5 年 1 月 27 日～ 令和 5 年 2 月 6 日		
論文公聴会	令和 5 年 2 月 6 日	場 所	工学部 4 号館ゼミ室-1		
最終試験結果	合格	最終試験年月日	令和 5 年 2 月 6 日		
学位論文の審査結果の要旨（1,000 字程度）					
重篤な心疾患に対して再生医療が注目され、特にヒト iPS 細胞を利用した心疾患治療は高い期待が寄せられている。しかしながら、分化・培養された心筋細胞において拍動機能の達成など未だ解決されていない課題が多く残されている。本研究では、培地中の脂質不足に着目し、先行研究の成果を踏まえて多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) 及びアラキドン酸 (AA) の培地内添加が培養心筋細胞の機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。 本博士論文は以下の 7 章で構成されている。第 1 章では、国内外の心疾患に対する再生医療の現状と課題および脂肪酸の生体機能について精査を行い、その調査結果について述べるとともに本研究テーマの重要性と新規性を明示している。第 2 章では、培地内脂肪酸添加の方法やラット胎児由来心筋細胞の初代培養方法およびヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化・培養方法を説明している。第 3 章では、新たに開発した心筋細胞の拍動力測定システムと、コラーゲンゲル上の培養心筋細胞クラスター形成が拍動力に及ぼす影響について Fusion360 [Autodesk] を利用した有限要素分析法の説明を行っている。第 4 章では、脂肪酸培地内添加が培養心筋細胞に及ぼす影響についての分子生物学的評価とエネルギー代謝への評価方法を述べている。第 5 章では、ラット胎児由来初代心筋細胞の拍動機能に DHA と AA が及ぼす影響について実験結果を纏めた。拍動力の測定と心筋分化、脂肪酸代謝および細胞間接着に関する遺伝子発現の測定から、DHA 及び AA の培地内添加は、ラット胎児由来初代培養心筋細胞の拍動力自体を向上させるのではなく、細胞同士の接着を亢進させることで心筋細胞の拍動収縮率向上に寄与していると結論付けた。第 6 章では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において脂肪酸添加が心筋細胞の凝集を刺激し細胞クラスターが形成されることによって拍動収縮率の向上が生じると結論付けた。また、脂肪酸の心筋細胞への複数経路での取り込みおよび AA 添加が心筋細胞の成熟に有益な影響を及ぼすことが示唆されている。第 7 章では、研究成果の総括と研究目標の達成評価および今後の課題を述べている。本博士論文の研究成果の一部は、第一著者として査読付き英文学術誌に 2 編、国際会議発表 3 件と国内会議発表 3 件、および国際会議受賞 1 件の研究活動実績がある。 以上により、本博士論文の研究テーマには新規性があり、自ら研究を計画・遂行するための専門的知識に基づいて研究背景・目的が詳細に述べられており、学位論文の構成は適切かつ体裁も整っており、記述が論理的で、設定した研究テーマに沿った明確な結論が述べられていた。審査員 4 名がその成果の新規性を認め、本専攻における学位審査基準を満たしていることを確認し、合格と判定した。 本論文は、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ない。					
最終試験の結果の要旨					
最終試験では、申請者から本学位論文の内容に基づき 40 分間の口頭発表と 20 分間の質疑応答および 30 分間の口頭試問を行った。申請者は自分の研究分野に対する十分な専門知識を有し、研究内容や関連他分野について深く理解している。研究テーマの重要性・新規性や得られた研究結果を適切に説明した。質疑応答および口頭試問では不飽和脂肪酸単独添加の意義や心筋細胞における脂肪酸代謝経路などに関する質問を学術的観点に基づいて具体的および論理的に回答された。その結果、博士（工学）としての専門知識と研究能力を備えているものと判断し、合格と判定した。					