

# 論文内容要旨 (和文)

平成27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 藤田 恭平



論文題目 力学特性の異なる心室細胞外基質ハイドロゲルにおけるヒトiPS細胞の心筋細胞への分化

心臓疾患における再生医療では細胞移植および再生組織移植においてヒトiPS細胞から分化させた心筋細胞の利用が多いに期待されている。現在では高効率でヒトES/iPS細胞から心筋細胞へ分化誘導できる一方で、分化心筋細胞は心室筋細胞、心房筋細胞、ペースメーカー細胞といったサブタイプ心筋細胞が混在した状態である。近年では生体組織を脱細胞化した細胞外基質(ECM)材料が生体組織元来の生化学因子を保持している利点を活用し、脱細胞化ECM材料が幹細胞の分化培養の足場として用いられ、組織特異的なECMの生化学因子が幹細胞の組織特異的な分化に効果がある。さらに足場素材の力学特性は細胞挙動や幹細胞の分化運命に影響を及ぼすことが知られており、とりわけ足場の弾性率を変化させることで間葉系幹細胞の分化運命を制御できることが示されている。上述の幹細胞の組織特異的な分化と成熟を促進できるECMに含まれる生化学因子と足場となるECMゲルの力学特性の調整を組み合わせ幹細胞がサブタイプ心筋細胞ごとに分化が促進される培養環境を整えることが、サブタイプ心筋細胞の分化および成熟に関する課題を解決する一つの手段となることが本論文独自の提案である。これらを実現するため心室組織細胞外基質ハイドロゲル(vECMゲル)の力学特性の解明および調整、さらに力学特性が異なるvECMゲルにおけるヒトiPS細胞の心筋細胞への分化実験・研究を行った。本論文ではこれらの研究成果を纏め、以下のような内容で記述している。

第1章では、代表的なiPS細胞の心筋細胞への分化誘導法とサブタイプ心筋細胞への分化や分化細胞の成熟法の現状、各組織に特異的なECMと足場素材の力学特性が幹細胞の組織特異的な分化に対する効果について詳細に解説し、本論文で取り組む研究の着想に至った背景を論述した。そして心室ECMを用いた幹細胞の心筋細胞への分化に関する研究・総説を挙げながら、vECMの生化学的な作用とvECMゲルの力学特性の変化を組み合わせることでヒトiPS細胞のサブタイプ心筋細胞への分化に対する課題を解決することの意義と本研究の目的を記述した。

第2章では、ヤギの心室組織からのvECMゲルの作成方法、vECMに含まれるタンパク組成、カルボジイミド系架橋剤EDACによって架橋処理したvECMゲルの細胞培養特性を詳述した。vECMに含まれるタンパクと糖タンパクを同定するため、質量分析LC-MS/MSを行ったところvECMは多型Collagenと接着性タンパクから構成されていることを明らかにした。emPAI法により各タンパクの質量パーセントを算出したところ、I型、III型、IV型、V型Collagenが91.8%を占めその他に10種類のCollagenが同定された。さらにFibrillin-1、-2、Laminin、Fibronectinといった接着性タンパクも含まれることが分かった。Picro-sirius red染色によってvECMゲル内部のCollagen線維のネットワーク構造を明らかにした。EDACにより架橋処理したvECMゲルの細胞毒性について無処理およびEDAC処理vECMゲル上で培養したラット胎児線維芽細胞(REF)の乳酸脱水酵素(LDH)放出率を検討したところ、

EDAC 処理した vECM ゲル上で培養された REF の LDH 放出量は無処理 vECM ゲル上のものよりも低値を示したことから、EDAC による vECM ゲルの架橋処理は REF に対して障害を起こさず細胞培養に適していると結論付けた。

第 3 章では非線形 Kelvin モデルを用いた vECM ゲルの力学特性の解明と架橋剤 EDAC 処理の vECM ゲルの力学特性の調整に対する効果、さらに vECM ゲルの力学特性と培養細胞挙動との関連性について述べた。vECM ゲルの力学特性について非線形 Kelvin モデルを用いて弾性係数、応力弛緩係数、非線形性の結果と架橋剤 EDAC 処理濃度の変化によるこれら力学特性の変化について述べた。さらに本論文では平衡弾性率  $E$  と平均瞬時弾性率  $\Sigma$  を定義し vECM ゲルの生体高分子ネットワークの有効弾性を評価した。平衡弾性率  $E$  は vECM 濃度と EDAC 濃度との間に単調依存な指数関係が存在することを発見した。vECM ゲルの力学特性と培養細胞挙動との関連性では、低い平衡弾性率を示し応力弛緩が遅い vECM ゲル上の REF は高い平衡弾性係数を示す vECM ゲルと類似した高い増殖能を示した。さらに低い平衡弾性率を示すが応力弛緩が脱細胞化心室組織と同程度の vECM ゲル上のラット胎児心筋細胞の拍動数は培養 4 日間にわたって維持されることを示し、vECM ゲルの力学特性を調整することで培養細胞の機能発現に差異が生じることが示唆された。

第 4 章ではカルボジイミド系架橋剤 EDAC により処理した力学特性が異なる vECM ゲル上で monolayer 法により分化させたヒト iPS 細胞の培養を行い、サブタイプ心筋細胞への分化および心筋細胞の成熟について遺伝子発現と免疫蛍光染色による検討、さらに vECM ゲルの力学特性とサブタイプ心筋細胞への分化および心筋細胞の成熟との関連性について述べた。vECM ゲル上の分化細胞における心室筋細胞マーカー MLC2v は瞬時弾性率が最も低く応力弛緩が最も遅い 10 mM EDAC-7.5 mg/ml vECM ゲル上で培養した細胞において他のゲル上での細胞よりも高い発現量を示す傾向であった。さらに瞬時弾性率が脱細胞組織と同程度であり応力弛緩が速い 100 mM EDAC-12.5 mg/ml vECM ゲル上で培養した細胞の心房筋細胞マーカー MLC2a の発現は Matrigel 上で培養したものよりも高値を示し他の種類のゲル上で培養したものよりも高値を示す傾向であった。vECM ゲルの瞬時弾性率および応力弛緩が異なることにより分化細胞における拍動性心筋細胞マーカーの発現は変化する一方で、洞房結節細胞マーカー HCN4 の発現は変化しないことが示唆された。さらに分化心筋細胞の拍動に起因する vECM ゲルの変形エネルギー貯蔵や散逸の側面とサブタイプ心筋細胞の mRNA 発現との関連性について現象論的かつ巨視的な検討を行った。ゲル変形エネルギー密度が低くエネルギー散逸率が低い vECM ゲルが心筋細胞の拍動能の維持や心室筋細胞および心房筋細胞といった拍動性心筋細胞へのヒト iPS 細胞の分化を促進する効果が示唆された。

第 5 章では、本論文の総括を述べるとともに、今後の研究に対する課題を述べる。

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成30年 2月 7日

理工学研究科長 殿

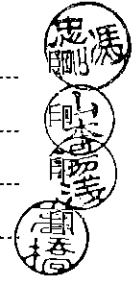
課程博士論文審査委員会

主査 馮 忠剛

副査 山本 修

副査 湯浅 哲也

副査 高橋 辰宏



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 藤田 恭平
論文題目	力学特性の異なる心室細胞外基質ハイドロゲルにおけるヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	平成30年1月29日～ 平成30年2月7日
論文公聴会	平成30年2月7日	場 所	工学部7号館302教室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	平成30年2月7日

学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)

iPS細胞から分化した心筋細胞は重篤な心疾患を治療するため最も有望なセルソースと考えられる。しかしながら、心室筋、心房筋および洞房結節と言ったサブタイプ心筋細胞の特異的な分化・成熟促進法はまだ確立されていない。これらの方法の確立は分化した心筋細胞の臨床応用に極めて重要不可欠である。本研究では、心室筋由来細胞外基質(vECM)の生化学作用とvECMから作成したハイドロゲル(vECMゲル)の力学特性の変化を組み合わせ、上記の課題を解決する新規な手法を提案した。

本博士論文は以下の5章で構成されている。第1章では、国内外の再生医工学における幹細胞分化と細胞培養足場との相互作用に関する研究現状が緻密にレビューされ、本研究の課題を明示し、その重要性和新規性が正しく述べられている。第2章では、vECMゲルの新しい作成工程、さらにカルボジイミド架橋剤EDACを用いてvECMゲル力学特性の調整および架橋処理したvECMゲルの細胞培養適合性について述べている。第3章では、圧縮試験と非線形Kelvinモデルの適用によってvECMゲルの非線形粘弾性力学特性を解明した。さらに、EDAC架橋処理により力学特性を調節したvECMゲル上での培養細胞の挙動とvECMゲルの力学特性との関連性を考察した。第4章では、力学特性の異なるvECMゲル上でのヒトiPS細胞の心筋細胞への分化に関して、サブタイプ心筋細胞の特異的分化促進及び成熟促進効果を遺伝子発現と免疫染色によって検討した。第5章では、研究成果の総括、研究目標の達成評価および今後の課題を述べている。

本博士論文は、近年の再生医工学において広く研究・利用されている生体組織由来細胞外基質ゲルの力学特性に関する詳細な実験研究であり、細胞外基質ゲルの力学特性と調整およびその培養細胞挙動に与える影響について新知見が得られた。また、本論文の中心的な研究課題であるヒトiPS細胞のサブタイプ心筋細胞の分化・成熟促進について、vECMゲルの変形エネルギー密度とエネルギー散逸率により検討する枠組みを新たな方法論として提示した。以上の成果の一部は第一著者として査読付き英文学術誌に1編、査読付き国際会議プロシーディング1編を公表されている。また国際会議発表4件と国内会議発表3件、国際会議受賞1件の研究活動実績がある。

審査員4名による本学位論文の内容を審査し、その成果の新規性・独創性を認め、本専攻における学位審査基準を満たしていることが確認され、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を基づき40分間の口頭発表と40分間の質疑応答を行った。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、研究内容や関連多分野について深く理解している。研究成果の重要性・新規性や結論を適切に説明した。質疑応答ではvECMゲルの有効弾性実験結果についての論理的な考察、ヒトiPS細胞分化結果の解釈、足場変形エネルギーにより心筋細胞分化を検討する方法論の学問的位置付けなどに関する質問を学術的観点に基づいて具体的に回答された。その結果、博士(工学)としての専門知識と研究能力を十分に備えているものと判断し、合格と判定した。