

氏名	松田 祐典
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5707号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	ヒト歯肉線維芽細胞との共培養がiPS細胞の心筋細胞への成熟に与える影響
論文審査委員	窪木 拓男 教授 岡村 裕彦 教授 西田 崇 准教授

学位論文内容の要旨

心不全は罹患率・死亡率が高く、深刻な医学的問題であり、その最終的な治療方法は心臓移植である。しかしながら著しいドナー心臓の不足が問題となっている。そこでiPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を用いた再生医療が代替医療として注目されているが、異種動物由来材料の混入による安全性のリスク等が課題と指摘されている。フィーダー細胞に使用されるマウス胚線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) やコーティング剤のマウス由来材料であるMatrigel®の代わりにヒト由来の材料を用いてiPS細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) を作製し、これを自家移植することで安全性の問題が解消されると考えた。先行研究において線維芽細胞がiPS細胞の分化誘導を促進し、心筋細胞の成熟に影響を及ぼす因子であることが示唆されており、このことから採取の際に容易にアクセス可能であり、口腔粘膜の創傷治癒能力が皮膚よりも優れているため採取時の身体的負担が小さいヒト歯肉線維芽細胞 (Human Gingival Fibroblast: HGF) をフィーダー細胞として使用することとした。本研究は、iPS細胞の心筋細胞への分化誘導に際して、HGFとの共培養が、より高い収縮能を有する心筋細胞への分化を促進することを実証した。

iPS細胞は201B7型を使用し、HGFは岡山大学病院矯正歯科治療中の患者の抜歯を行う際に、約2mm³の歯肉組織を採取し単離された。HGFをフィーダー細胞として共培養し、心筋細胞への分化誘導を行った。分化誘導された組織に免疫染色・qPCRを行い、心筋細胞への成熟を評価した。また、拍動するiPS-CMを撮影した動画を解析し、収縮能を定量化・評価した。

免疫染色はiPS細胞の心筋分化を確認するために、中胚葉マーカーNkx2.5および心筋マーカー心筋トロポニンT (cTnT) について行った。のiPS-CMはNkx2.5およびcTnTの蛍光を発現し、特にcTnT発現は5日目から徐々に検出され、30日目に著しく増加した。オンフィーダー培養では5日目より網状に構造を発達させ、30日目にフィーダーレス培養と比較して多くのサルコメア構造を示した。フィーダーレス培養のiPS細胞の多くは、30日目に巨大な球状の凝集体を発達させた。球状の組織は表面にcTnTの発現が確認されたが、内部では検出されなかった。

遺伝子の発現についてオンフィーダー培養およびフィーダーレス培養両方の条件下で、Nkx2.5およびcTnTのmRNA発現レベルは、経時的に増加する傾向があった。対照的に、多能性マーカー遺伝子であるOct4およびSox2の発現は、経時的に減少する傾向があった。

iPS-CMの収縮能の評価についてはオンフィーダー培養されたiPS-CMは、30日目にフィーダーレス培養されたiPS-CMよりも有意に大きな収縮能を示した。さらに、フィーダーレス培養のiPS-CMの培養皿から剥がれた領域は、オンフィーダー培養で剥がれたiPS-CMの領域よりも大きかった。また、オンフィーダー培養のiPS-CMは主にシート状構造を形成したが、フィーダーレス培養のものは基材上に組織が散在し球状の組織を形成した。iPS-CMは、両方の培養条件下で自発収縮を示したが、オンフィーダー培養のものはより強い収縮を示した。これはiPS-CMの構造的差異を反映している可能性が高く、2次元指向性細胞構造がiPS-CMの収縮に有利であることを示唆している。Masudaらの先行研究では、損傷した心臓への心筋シートの移植が心機能を改善し得ることを示している。したがって、オンフィーダー培養のiPS-CMのシートは、より強い収縮性を有することに加えて、収縮力の低下した心臓組織への移植に適している可能性がある。フィーダーレス培養では組織構造が移植に適していない凝集体を形成した。特に、心臓移植片組織の臨床適用において、移植

組織の収縮方向は、心臓の楕円形の形態の維持を可能にし、血液の効率的な放出および流入を可能にするように宿主心筋細胞の収縮方向に向かわなければならない。したがって、培養された心臓組織は、大きな球状凝集体ではなく、シート状構造において強い収縮力を示すことが望ましい。

本研究はHGFフィーダー細胞と共培養したiPS細胞の心筋分化を評価し、フィーダーレス培養条件下で分化誘導したiPS細胞よりも優れていることを実証した。重要なことは、本研究のプロトコルは、異種動物由来因子汚染のリスクを回避し、収縮力の強い心筋組織を産生することである。現在の心筋組織は頑強な前臨床試験でさらに評価する必要があるが、本研究のプロトコルは、異種動物由来因子の非存在下でのiPS細胞からの心筋細胞の分化につながった。

論文審査結果の要旨

心不全は罹患率・死亡率が高く、深刻な医学的問題であり、その最終的な治療方法は心臓移植である。しかしながら著しいドナー不足が問題となっている。そこでiPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を用いた再生医療が代替医療として注目されているが、異種動物由来材料の混入による安全性のリスク等が課題とされている。

本論文では自家移植を目的とした心筋組織作製の過程における安全性のリスクを解消するために、異種動物由来材料の代わりにヒト歯肉線維芽細胞 (Human Gingival Fibroblast : HGF) をフィーダー細胞として用いて、iPS細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) を作製した。さらに、iPS細胞の心筋細胞への分化誘導に際して、HGFとの共培養が、より高い収縮能を有する心筋細胞への分化を促進することを実証した。

iPS細胞は201B7型 (理化学研究所) を使用し、HGFは岡山大学病院矯正歯科で治療中の患者から抜歯を行う際に約2mm³の歯肉組織を採取し単離した。HGFをフィーダー細胞として共培養し、対照にはiMatrix-511をコーティング剤として使用しiPS細胞を心筋細胞へ分化誘導した。分化誘導された組織に免疫染色・qPCRを行い、心筋細胞への成熟を評価した。また、拍動するiPS-CMを撮影した動画を解析し、収縮能を定量的に評価した。

また、iPS細胞の心筋分化を確認するために、中胚葉マーカーであるNkx2.5および心筋マーカーである心筋トロポニンT (cTnT) の免疫染色を行った。両条件ともに、iPS-CMはNkx2.5およびcTnTの蛍光を発現し、オンフィーダー培養では5日目より網状に構造を発達させ、30日目にフィーダーレス培養と比較して多くのサルコメア構造を示した。フィーダーレス培養のiPS細胞の多くは30日目に球状の凝集体を発達させた。

遺伝子発現については、オンフィーダー培養およびフィーダーレス培養両方の条件下で、Nkx2.5 および cTnT の mRNA 発現レベルは、経時的に増加する傾向があった。対照的に、多能性マーカー遺伝子である Oct4 および Sox2 の発現は、経時的に減少する傾向があった。

iPS-CM の収縮能の評価については、オンフィーダー培養された iPS-CM は、30 日目にフィーダーレス培養された iPS-CM よりも有意に大きな収縮能を示した。今後の検討を待たねばならないが、オンフィーダー培養により得られた iPS-CM シートを収縮力の低下した心臓組織へ移植することにより収縮力回復の一助となる可能性が示唆された。

本論文は iPS 細胞を用いた心筋組織の再生医療において、自己細胞、中でも HGF をフィーダー細胞として用いる可能性を示唆した点で重要な新規知見を提供している。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。