

氏名（本籍）	上杉 麻依（北海道）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 7031 号			
学位授与年月	平成26年 3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	Characterization of hypertrophic human iPS cell (hiPSC)-derived cardiomyocytes; Low-density plating is sufficient to induce hypertrophy and electrical remodeling in highly purified human iPS cell-derived cardiomyocytes （肥大化ヒト人工多能性幹（iPS）細胞由来心筋細胞の性状解析；高度に精製されたヒト iPS 細胞由来心筋細胞において低密度培養は肥大化および電気的リモデリングを誘導する）			
主査	筑波大学教授	医学博士	青沼 和隆	
副査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田 修	
副査	筑波大学教授	博士（薬学）	本間 真人	
副査	筑波大学准教授	博士（獣医学）	杉山 文博	

論文の内容の要旨

（目的）

近年、iPS 細胞（induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞）における研究の進展が目覚しく、創薬研究にも応用が可能になってきた。特に安全性試験への利用において、副作用およびオフターゲット作用発生の予測精度を向上させ、新薬創出の高速化と効率化の促進が期待されている。しかし、iPS 細胞の再構築系は生体と同様の薬剤応答が期待される一方で、人工的な分化やリプログラミング、ターゲット細胞の純化方法にまだ不十分な要因が考えられ、薬剤応答性や応用範囲に関してまだ不明な点が多くある。本研究では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の特性が、培養条件や環境によってどの程度変化するかを明らかにするとともに、これまでヒト心筋細胞では限界があった心疾患モデルとしての可能性を検討する。

（対象と方法）

本系で用いた 98%以上が分化した心筋細胞で構成されるヒト iPS 細胞由来心筋細胞は、通常の初代培養

心筋細胞のように線維芽細胞などの混入がなく、二次元培養により近隣の細胞と接してシート構造を形成し、自発的に同期した拍動を示す特徴がある。我々は、この細胞を低密度培養すると、細胞面積が著しく増加することを発見した。この現象と既存心肥大モデルの特徴を比較するため、形態、遺伝子、電気生理、薬理学的手法を用いて検証した。細胞外電位測定は、多電極アレイシステムを利用し、心電図の QT 間隔に相当する活動電位持続時間の延長を指標として、カリウムイオンチャネル阻害剤による作用を確認した。

(結果)

細胞を通常の 1/4~1/5 程度 (500-1200 cells/mm²) の低密度状態で培養すると、1 週間後には個々の細胞面積が最大でおよそ 10 倍に肥大化する現象が観察された。この細胞を通常の肥大化していない心筋と比較すると、肥大化状態においても自発的拍動を維持し、心筋を構成する骨格タンパク質のひとつである α -actinin の細胞内染色像に違いは見られなかった。しかし、網羅的な遺伝子発現解析結果を用いたパスウェイ解析において、心肥大に関連する遺伝子リストと有意に関連性が示され、病態心肥大時に特徴的である *ANP*、*SERCA2*、*CARP*、*MLC-2* の有意な遺伝子発現変動が見られた。また、培養密度を段階的に低下させ、心筋細胞の細胞外電位を測定すると、遅延整流性カリウム電流を形成する I_{Ks} チャネル阻害剤による活動電位持続時間延長作用が細胞密度依存的に低下した。一方、同じく遅延整流性カリウム電流を形成する I_{Kr} チャネル阻害剤では、細胞密度依存的な感受性の低下は見られなかったが、低密度で培養した細胞では早期後脱分極様の波形が容易に出現するようになった。このとき、肥大化した心筋において、 I_{Ks} チャネルを構成する *KCNQ1* が遺伝子およびタンパク質レベルで有意に発現低下していた。また、内向き整流性カリウム電流を形成する I_{K1} チャネルを構成する *KCNJ2* 遺伝子の有意な発現低下も見られた。

(考察)

これまでに報告された *in vitro* 実験における心筋肥大現象の多くは、機械的ストレスあるいはホルモンなどの刺激によって引き起こされている。本研究では、このような処置とは別に、iPS 細胞由来心筋細胞を低密度培養することにより肥大化する現象を見出した。この細胞は、細胞サイズ以外の特性において通常の機能を維持しており、遺伝子レベルにおいて病態心肥大との共通性が見られた。また I_{Ks} チャネル阻害剤への細胞濃度依存的な低感受性や I_{Kr} チャネル阻害剤により容易に早期後脱分極様波形が導出されるなど、これまで心肥大動物モデルにおいて報告されている I_{Ks} 電流に関するリモデリングが示唆された。さらに、 I_{Ks} チャネルおよび I_{K1} チャネル遺伝子の発現低下が見られたことから、この肥大化した iPS 細胞由来心筋細胞は、リモデリングを伴った病態心肥大時の心筋細胞の特徴を有する可能性があると考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

ヒト iPS 細胞由来分化細胞を再生医療や創薬に利用するための応用研究が盛んに進められている。しかし、リプログラミングや分化、さらに分化した目的細胞の純化や分化した細胞を安定的に培養を維持する方法にまだ不十分な要因が考えられ、いまだその応用範囲に関して検討を必要とする点が多くある。本研究では、特定のヒト iPS 細胞由来心筋細胞の培養密度を低下させることで、細胞が容易に肥大化することを見出したことに意義がある。また、その肥大化した心筋細胞が 4 種の病態心肥大マーカー遺伝子の発現と、 I_{Ks} 電流のリモデリングについて、既存の病態心肥大モデルと共通の特徴を有することを明らかにし、病態肥大心のモデル細胞となる可能性を示した。

しかしながら最終的に本モデルが肥大心筋研究のスタンダードモデルとして汎用可能か否かには上杉氏の研究員としての今後の研究の継続に待つところが大きい。

審査様式 2 - 1

平成 26 年 1 月 9 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。