

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	(甲) 乙 第	号	氏 名	森 脇 大 順
論文審査担当者 主 査 内科学 家 田 真 樹				
外科学 志 水 秀 行 整形外科学 中 村 雅 也				
薬理学 安 井 正 人				
学力確認担当者：				
審査委員長：志水 秀行				
試問日：2024年12月27日				
(論 文 審 査 の 要 旨)				
論文題名：Scalable production of homogeneous cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells (高均質性を有したヒト多能性幹細胞由来心臓オルガノイドの大量作製法の開発)				
再生医療や創薬研究において三次元組織の活用に期待が高まっているものの、高均質な三次元組織を簡便かつ大量に作製することのできる手法は非常に限られているのが現状である。そこで本研究では、三次元組織の高均質性、手法の簡便性、大量作製の実現を満たす手法として”吸引法”を開発した。 審査では、吸引法における吸引力の検討でより細胞へのダメージが少ないと考えられる-0.025 MPaではなく、-0.050 MPaを選択した理由について問われた。これに対し、-0.050 MPaで吸引したスフェロイドと自然沈降法で作製したスフェロイドの死細胞染色をした結果、両者の間に差が無かったことがこれまでの実験で分かっており、-0.025 MPaと-0.050 MPaの間においても細胞へのダメージの差は無いと考えられるため、より吸引時間が短くて済む-0.050 MPaを選択したと回答された。次に、自然沈降法や-0.075 MPaの条件において、形成されるスフェロイドの均質性が損なわれた理由について問われた。これに対し、自然沈降法の均質性が損なわれた理由は、走査型電子顕微鏡 (SEM) の画像から一つのウェルの数か所に凝集塊が点在していたことが確認されたことから、自然沈降では担体へ播種した細胞をウェル底の一か所に凝集させることができなかったためであると回答された。また-0.075 MPaの吸引力において均質性が損なわれた理由は、強い吸引力による細胞へのダメージによるものと回答された。次に、担体の中央に位置するウェルと周辺のウェルで形成されるスフェロイドやオルガノイドの均質性について問われた。これに対し、中央のウェルと周辺のウェルで若干スフェロイドやオルガノイドのサイズが異なる傾向にあると回答された。次に、吸引法において播種した細胞がどの程度スフェロイドを形成できずにロスしているのかを問われた。これに対し、ロスした細胞の割合は評価したことはないが、SEMの画像から自然沈降法は一つのウェルに凝集できなかった多数の細胞や小さな凝集塊が存在していたのに対し、吸引法ではそのような細胞や凝集塊が軽減されていたため、少なくとも自然沈降法よりロスした細胞の割合が少ないと考えられると回答された。次に心筋スフェロイドの機能的な評価において、吸引法で作製された心筋スフェロイドの方が拍動率のばらつきが小さい理由について問われた。これに対し、過去の文献より心筋スフェロイドの大きさによって拍動率が異なることが知られており、スフェロイドの大きさが拍動率を決定する重要な因子であるためと回答された。次に、スフェロイドの移植実験において、心筋スフェロイドではなくヒトiPSスフェロイドを用いた理由について問われた。これに対し、心筋スフェロイドの生着率の評価にはより多くの手間と時間がかかるのに対し、ヒトiPSスフェロイドを用いれば形成された奇形腫の大きさを計測することで比較的容易に生着率を評価することができるためであると回答された。次に、吸引法においてMitoTrackerを用いて赤色と緑色に染めた心筋細胞を異なるタイミングで吸引することによって、赤色の細胞集団と緑色の細胞集団が別々の部位に局在化した心筋スフェロイドを作製できることに関して、吸引法以外の手法で作製することはできないのかと問われた。これに対し、U底の96 well plateを用いて遠心することで同様の色分けされた心筋スフェロイドを作製することができるが、大量に作製できることにおいて吸引法に優位性があると回答された。次に、心房筋組織と心室筋組織が別の部位に局在化した心臓オルガノイドについて、心房筋細胞から心室筋細胞へ刺激が伝わっていく機序について問われた。これに対し、心房筋細胞の方が拍動率が高く、心房筋において活動電位の初めに細胞内に流れ込んでくるNa⁺がギャップ結合を形成するCx40やCx43を介して心室筋に伝わっていくことで心房筋から心室筋へ電気刺激が伝わっているのだと考えられると回答された。 以上、本研究で開発された吸引法は他の手法と比較して細胞のロスについての評価の課題は残すものの、”吸引法”は従来の課題を克服した独創的な手法であり、同手法を開発したことは今後再生医療の具現化や創薬研究の発展にとって有意義な研究であると評価された。				