

Title	Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Induction to Cardiomyocytes
Author(s)	橋本, 光人
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55786
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	橋本 光人
論文題名 Title	Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Induction to Cardiomyocytes (Duchenne型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞株の樹立と心筋分化誘導)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕 Duchenne型筋ジストロフィー（以下DMD）は、新生男児3,500人あたり1人の割合で認められる伴性劣性遺伝疾患である。DMDはジストロフィン蛋白をコードするDMD遺伝子の変異により引き起こされる。ジストロフィン蛋白はジストロフィン・グリコプロテイン複合体の主要な構成要素であり、力の伝達や筋鞘の安定性において重要な役割を果たしている。ジストロフィン蛋白の欠損により筋細胞膜は脆弱となり、骨格筋の変性・壊死が生じ、進行性の筋力低下を来す。ジストロフィン蛋白の欠損は骨格筋のみならず心筋においても影響を及ぼし、18歳以上のDMD症例においては100%の割合で心筋症が認められると報告されている。一方、人工呼吸器の発達等により、DMD患者の主な死因は呼吸不全から心不全に移行しつつある。DMD心筋症に対してβ遮断薬やACE阻害薬の投与が行われているものの効果は限定的であり、根治的な治療法は現状では確立されていない。 DMD遺伝子異常のモデル動物としてmdxマウスが広く用いられており、同マウス心筋細胞においては、種々の異常が報告されている。しかし、同マウスは心不全を来さないことも報告されており、DMD心筋症疾患モデルとしては適しているとは言い難い。 以上より、DMD心筋症の病態解明ならびに新規治療法の開発において患者由来iPS細胞を用いることは極めて有用であると考えられ、同細胞株の樹立ならびに心筋分化誘導を行った。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 DMD患者より末梢血の提供を受け、2症例につき、iPS細胞株を樹立した。症例1はエクソン48-54欠損例で採血時年齢は31歳、症例2はエクソン46, 47欠損例で採血時年齢は13歳であった。末梢血よりT細胞を分離培養し、センダイウイルスベクターを用いてOCT3/4, SOX2, KLF4ならびにc-MYCの4因子を導入した。リプログラミングを行ったT細胞をフィーダー細胞上に播種して培養し、約20日後に形成されたコロニーをピックアップしさらに拡大培養を行うことで細胞株を樹立した。樹立細胞株の未分化性は、定量的リアルタイムPCR法による未分化マーカー（OCT3/4, NANOGならびにTERT）の発現に加え、免疫染色（NANOG, OCT3/4, SOX2, SSEA4ならびにTRA-1-60）により確認した。また、樹立細胞株の多分化能は、免疫不全マウスへの移植後、三胚葉を含む奇形腫が形成されたことにより確認した。 続いて、樹立iPS細胞株の心筋分化誘導を行った。胚様体形成法による心筋分化誘導を行った後、グルコース不含乳酸添加培地を用いた心筋純化法を用いることにより拍動細胞が得られ、α-actinin, MLC2v免疫染色により心筋細胞であることを確認した。また、Western blottingならびに免疫染色により、分化心筋においてジストロフィン蛋白が欠損していることを確認した。	
〔総 括(Conclusion)〕 DMD患者2症例より、末梢血T細胞を用いて疾患特異的iPS細胞株の樹立を行った。加えて、樹立iPS細胞株の分化誘導を行い、心筋細胞が得られることを確認した。今後のDMD心筋症の病態解明ならびに新規創薬において、このモデルは高い有用性を持つと考えられる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		橋本 光人	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	望月 秀樹
	副 査	大阪大学教授	竹原 敏也

論文審査の結果の要旨

Duchenne型筋ジストロフィー（以下DMD）においては、進行性の筋力低下が認められるのみならず、心筋症も必発する。DMD心筋症に対しては拡張型心筋症の治療に準じた治療が行われているものの効果は限定的であり、根治的な治療法は確立されていない。また、疾患モデル動物として広く用いられてきた*mdx*マウスは著明な心不全を来たさず、DMD心筋症モデルとしては不完全と言わざるを得ない状況であった。

本研究においては、低侵襲な方法で採取可能な患者末梢血細胞を用いて疾患特異的iPS細胞株の樹立が可能であること、同樹立細胞株から心筋細胞への分化誘導が可能であること、ならびに分化心筋細胞においてジストロフィン蛋白が完全に欠損していることが示された。

上記の研究成果は今後のDMD心筋症の病態解明ならびに新規治療法の開発等において高い有用性を持つものであると考えられ、博士（医学）の学位授与に値するものと認められる。