

Title	Generation of Fabry cardiomyopathy model for drug screening using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a female Fabry patient
Author(s)	藏本, 勇希
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72180
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 藏本 勇希	
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 湖井 理夫
	副 査 大阪大学教授 大園 恵一
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>ファブリー病はライソソーム酵素であるαガラクトシダーゼA (GLA) の遺伝子変異によりGLA活性が欠損することで、基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) などが蓄積することで起こるX連鎖性先天性代謝疾患である。</p> <p>本論文ではファブリー病の心病変であるファブリー心筋症の患者2名からiPS細胞株を樹立し、ヘテロ接合体女性患者のiPS細胞株に関して、クローンを適切に選択することで同一ゲノムを有する疾患モデルと健常対照が使用可能なことを初めて見出した。これらのiPS細胞株を心筋分化誘導してファブリーモデルiPS細胞由来心筋の表現型としてGb3蓄積、細胞面積縮小、心肥大のマーカー遺伝子である<i>NPPA</i>の発現上昇を見出した。また、Gb3の免疫染色画像から非特異的染色を除外するアルゴリズムを用いて薬剤スクリーニング系を作成した。</p> <p>本論文はファブリー心筋症の病態解明、新規治療薬開発に大きく貢献するものであり、学位の授与に値すると思われる。</p>	

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	藏本 勇希
論文題名 Title	Generation of Fabry cardiomyopathy model for drug screening using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a female Fabry patient (ファブリー病女性患者からのiPS細胞由来心筋を用いたファブリー心筋症モデル及び薬剤スクリーニング系の作成)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>ファブリー病はライソソーム酵素であるαガラクトシダーゼA (GLA) の遺伝子変異によりGLA活性が欠損ないし低下し、基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) 等のスフィンゴ糖脂質が様々な組織の細胞内に蓄積することで起こるX連鎖性先天性代謝疾患の一つである。ファブリー心筋症はファブリー病の心病変であり、心筋細胞内へのGb3蓄積、左室肥大などを特徴とする。ファブリー心筋症は致死性不整脈や心不全、心筋梗塞といった致命的な心疾患の原因となるため、ファブリー病患者の主な死因となっている。GLAを体外から補充する酵素補充療法はGb3の蓄積を減少させるものの、既に病態の進行したファブリー心筋症を改善させることは困難であると報告されており、ファブリー心筋症の病態解明と新規治療薬開発は重要な課題である。本論文の目的は、ファブリー病患者からiPS細胞株を樹立し、分化誘導した心筋細胞を用いてファブリー心筋症の病態を解明するとともに、新規治療薬を開発するための薬剤スクリーニング系を構築することである。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>ファブリー病患者2名(ヘテロ接合体女性患者及びその息子であるヘミ接合体男性患者)から、それぞれ複数のiPS細胞株を樹立した。女性患者由来のiPS細胞は、GLA活性が正常のクローンと欠損したクローンに2分され、体細胞のX染色体不活化がリプログラミングされずに残存しているものと考えられた。また、iPS細胞樹立直後は一方のアリル由来のGLAのみが発現していたが、一部のiPS細胞クローンでは長期培養を行うことで両方のアリル由来のGLAが発現が認められるようになっており、iPS細胞を未分化状態で維持培養する際のX染色体不活化は不安定であることが考えられた。長期培養後もGLA活性とGLA発現パターンが一方のアリル由来のまま保たれているGLA活性欠損クローンと活性正常クローンを選択し、それぞれ疾患モデルと健常対照として心筋細胞に分化させた後に表現型の解析を行った。蛍光免疫染色及び質量分析法を用いて、疾患モデルのiPS細胞由来心筋細胞(iPS心筋)ではより多くのGb3が蓄積していることを確認した。Gb3蓄積以外の表現型として、疾患モデルのiPS心筋では細胞面積が縮小している一方で、心肥大のマーカー遺伝子である<i>NPPA</i>の発現が上昇していることを同定した。細胞面積はファブリー病患者に対する酵素補充療法で用いられるアガルシダーゼで拡大し、培養液にGb3を添加することでさらに縮小したことから、細胞面積の縮小とGb3蓄積の因果関係が想定された。一方、<i>NPPA</i>発現はアガルシダーゼやGb3の投与で変化を認めず、酵素補充療法がGb3蓄積は改善できてもファブリー心筋症の進行した病態を治療できないことを反映していると考えられた。さらに、ハイコンテンツ解析装置を用いて、Gb3の免疫染色画像から非特異的なシグナルを排除し、Gb3蓄積を自動的に定量することができるアルゴリズムを作成した。作成したアルゴリズムを用いることで陽性対照薬としてのアガルシダーゼ、陰性対照薬としてのGb3が正当に評価できることが確認されたことから、新規治療薬を開発するためのスクリーニング系として有用であることが確認できた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>ファブリー患者由来iPS細胞から分化誘導した心筋細胞はGb3の蓄積が認められ、患者で認められる表現型を再現するモデルとしての有用性が示された。また、ヘテロ接合体女性ファブリー病患者から樹立したiPS細胞及び独自のGb3検出アルゴリズムを利用することで、新規治療薬開発のための化合物スクリーニング系を確立した。既存薬ではファブリー病患者由来iPS心筋で認められる<i>NPPA</i>遺伝子の発現上昇を改善できないことから、Gb3蓄積と<i>NPPA</i>発現を指標にした化合物スクリーニングを組み合わせることで、従来の治療薬より有効なファブリー心筋症の新規治療薬が開発できると考えられた。</p>	