



Title	Decreased YAP activity reduces proliferative ability in human induced pluripotent stem cell of duchenne muscular dystrophy derived cardiomyocytes
Author(s)	安武, 秀記
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85338
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	安武 秀記
論文題名 Title	Decreased YAP activity reduces proliferative ability in human induced pluripotent stem cell of duchenne muscular dystrophy derived cardiomyocytes (デュシェンヌ型筋ジストロフィーiPS細胞の分化誘導心筋においてYAP活性の低下が増殖能を減少させる)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は骨格筋と心筋が障害されるX染色体連鎖疾患である。細胞骨格蛋白ジストロフィンの欠損に伴う酸化ストレスの亢進、ミトコンドリアの障害などが報告されているが詳細な病態メカニズムは不明である。一方でDMDの骨格筋において組織再生に関わるYAP活性の異常が報告された。本研究ではDMD心筋症の病態メカニズムを調べるためDMD患者から樹立した疾患特異的iPS細胞(DMD-iPSC)を用いてDMD-iPS心筋のYAP活性および細胞の増殖能、アクチン機能について調べた。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 本研究ではDMD遺伝子のExon48-54の欠失と診断されたDMD患者から樹立したDMD-iPSCを使用した。isogenic controlを作成するため、CRISPR/Cas9を用いてDMD-iPSCのDMD遺伝子をout of frameからin frameに修正し、ジストロフィンの発現が回復したゲノム編集株(ED-iPSC)を作成した。健常人由来iPSC(Con-iPSC)、DMD-iPSCおよびED-iPSCから心筋細胞に分化誘導し、免疫染色にてYAPの局在を確認したところ、DMD-iPS心筋はCon-iPS心筋およびED-iPS心筋と比較し有意にYAPの核内移行は低下した。また細胞の増殖能およびKi67の発現を確認したところDMD-iPS心筋において有意に低下を認め、DMD-iPS心筋においてYAP活性の低下と増殖能の低下が示唆された。次にこれらのiPS心筋のアクチンの評価を行った。DMD-iPS心筋ではストレスファイバーとしてのFアクチンの構造が崩壊しており、またFアクチンとGアクチンの蛍光強度比を確認すると、DMD-iPS心筋でF/Gアクチン比は有意に低下を認め、DMD-iPS心筋ではストレスファイバーとしての機能が低下していることが示唆された。次にGPCRのリガンドであり、Rho-Rockを介してアクチン重合を促進する作用が知られているLysophosphatidic acid (LPA) の投与実験を行った。免疫染色にてYAPの局在を確認したところ、DMD-iPS心筋においてLPAによりYAPの核内移行は上昇を認め、さらに細胞の増殖能およびKi67の発現は増加した。このことからLPAはDMD-iPS心筋のYAP活性を改善させることが示唆された。次にiPS心筋のアクチンダイナミクスをライブイメージングにより評価した。アクチンをLifeActにて標識し、アクチンのretrograde flowの速度を定量評価した。その結果、DMD-iPS心筋においてCon-iPS心筋およびED-iPS心筋と比較しretrograde flowの速度は有意に低下を認めた。さらにLPAによるアクチンダイナミクスの変化をDMD-iPS心筋においてLPA投与前とLPA投与後で計測した所、LPA投与後で有意にretrograde flowの速度の増加を認めた。つまりLPAがDMD-iPS心筋においてアクチン重合を活性化させストレスファイバーの形成に関与することが示唆された。 〔総 括(Conclusion)〕 DMD-iPS心筋においてYAP活性の低下、細胞の増殖能の低下、アクチンの機能障害を認め、アクチンダイナミクスの介入によりYAP活性および細胞の増殖能の改善を認めた。これらの結果よりDMD心筋症の病態にアクチンの機能障害に伴うYAP活性が関与し、YAPがDMD心筋症の治療ターゲットになる可能性が示された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)				安武 希記		
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	高島 茂二			
	副査	大阪大学教授	原田 彰宏			
論文審査の結果の要旨						
デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は心筋障害を伴う骨格筋疾患である。本研究ではDMD患者から樹立した疾患特異的iPS細胞を用いてDMD心筋症と組織再生に関わるYAP活性について調べた。DMD-iPS細胞からCRISPR/Cas9を用いてジストロフィンを修復したゲノム編集株 (ED-iPS細胞) を作成し、iPS細胞の分化誘導心筋においてYAPの局在を確認したところ、DMD-iPS心筋は健常人由来iPS心筋およびED-iPS心筋と比較し有意にYAPの活性は低下した。さらに、DMD-iPS心筋において増殖能の低下およびアクチンの機能障害を明らかにした。本研究によりアクチンの機能障害およびYAP活性の低下がDMD心筋症の発症に関与している可能性が示唆された。これらの結果はDMD心筋症の病態に新たな知見を与え、学位の授与に値すると考えられる。						