

Title	Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes
Author(s)	Inoue, Hiroyuki
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89540
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

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	井上 裕之
論文題名 Title	Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes (同一遺伝背景iPS由来心筋細胞を用いた、PKP2欠損による収縮不全とデスモゾーム形成障害の再現)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>心筋細胞同士を接着する細胞間機構の一つをデスモゾームと呼び、その構成分子のプラコフィリン2をコードする遺伝子がPKP2である。不整脈原性心筋症は、心不全や致死性不整脈を発症する遺伝性心疾患であり、PKP2が原因遺伝子のなかでは最も頻度が高い。また、特発性拡張型心筋症のコホートでも、PKP2変異が多数同定されている。これらの知見から、PKP2変異は心筋収縮力の低下に関与することが示唆され、遺伝性心筋症による重症心不全に対する治療法開発のためには、その機序を解明することが重要である。PKP2に対する遺伝子治療は、疾患原因の上流を標的とした治療として高い効果が期待されるが、その実証のためには疾患病態を再現し、明確なリードアウトを呈するヒト細胞モデルが必要である。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>ヘテロ接合型PKP2変異により若年で発症した不整脈原性心筋症患者よりiPS細胞を樹立した（ヘテロ接合型変異株）。CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集により、PKP2変異のアレル数のみが相違して他の遺伝子は同一であるiPS細胞（変異修復株、ホモ接合型変異株）を作成した。これら3株のアイソジェニックiPS細胞を平面法による心筋分化誘導を行った後に、様々な疾患表現型の評価を行った。</p> <p>心筋分化誘導後、14日、28日で収縮運動のモーションベクトル解析を行った。その結果、分化14日目の早期の段階から、心筋収縮力に関連したパラメータでアイソジェニック株間の差異を認め、分化28日目も同様の傾向を認めた。また、心筋分化28日目に、電子顕微鏡を用いて微細構造を観察した。その結果、PKP2変異アレル数に関わらずサルコメア構造は正常であったが、PKP2変異アレル数の増加に応じてデスモゾームの細胞間ギャップが開大した。さらに、細胞固定後の免疫抗体染色で、デスモゾーム細胞外ドメインであるデスモグレイン2の面積に差異を見出した。このことから、デスモグレイン2に対してCRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集により蛍光タンパク質を付加し、内在性デスモグレイン2を可視化することにより生細胞でデスモゾームの観察を可能としたアイソジェニックiPS細胞を作成した。このデスモゾーム生細胞イメージング細胞により、心筋分化誘導中のデスモゾームの形成過程が可視化され、心筋分化後には免疫抗体染色を要せずにデスモゾームの差異の観察が可能となった。</p> <p>上記表現型に関して、心筋分化誘導10日目に正常PKP2を搭載したアデノ随伴ウイルスにより遺伝子治療を行った。その結果、治療14日後には収縮力低下が改善し、生細胞イメージングで観察されるデスモゾームの面積異常はいずれも改善した。このことから、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療は、有望な治療選択肢になり得ると考えられた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究で作成したPKP2変異不整脈原性心筋症モデルiPS細胞は、同疾患の病態を再現することが示され、将来の治療開発のプラットフォームを提供するものと期待された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 井上 裕之				
		(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史	署名
	副 査	大阪大学教授	石井 優	署名
	副 査	大阪大学教授	妻木 乾行	署名
論文審査の結果の要旨				
<p>本研究は、PKP2変異による不整脈原性心筋症の患者由来iPS細胞に、CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集を組み合わせ、同一遺伝背景のiPS細胞を作成し、PKP2変異による疾患表現型を再現するヒト細胞モデルの作成を行ったものである。</p> <p>研究の結果、PKP2の変異アレル数の増加に応じて、収縮不全、デスモゾーム形成異常が顕在化した。さらに遺伝子編集を加えて、生細胞でデスモゾームの形成障害が評価可能なデスモゾーム生細胞イメージングiPS細胞を作成した。アデノ随伴ウイルスを用いたPKP2補充療法により、PKP2変異iPS細胞由来心筋細胞で収縮不全とデスモゾーム形成異常は改善した。</p> <p>上記の研究結果から、本ヒト細胞モデルは、疾患表現型の再現に成功したと考えられ、今後の疾患メカニズム、治療法開発の有用なツールとなると期待される。</p> <p>以上の理由から、本論文は学位授与に値すると考えられる。</p>				