



| | |
|--------------|---|
| Title | Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated from Female Becker Muscular Dystrophy Carrier |
| Author(s) | 亀田, 聡士 |
| Citation | 大阪大学, 2023, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/92034 |
| 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 | 亀田 聡士 |
| 論文題名 Title | Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated from Female Becker Muscular Dystrophy Carrier (iPS細胞由来分化心筋細胞を用いたBecker型筋ジストロフィー女性キャリアの心筋収縮力・剛性低下の再現と病態解明) |
| 論文内容の要旨 | |
| 〔目 的(Purpose)〕 | |
| Becker型筋ジストロフィー (BMD) はジストロフィン遺伝子 (<i>DMD</i>) のインフレーム変異により発症するX連鎖劣性遺伝疾患である。BMDにおける症状はDuchenne型筋ジストロフィーに比し、軽度であることが知られており、特にBMD女性キャリアでは不顕性のまま経過することも多い。拡張型心筋症は、BMDにおける合併症のひとつだが、BMD女性キャリアが重症心不全に至ることは極めて稀であり、その病態メカニズムは依然解明されていない。 | |
| 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 | |
| ジストロフィン遺伝子 (<i>DMD</i>) のエクソン45-48欠損 ($\Delta 45-48$) を有する女性BMDキャリアで、早期に重症心不全を発症した症例を経験した。droplet digital PCR (ddPCR) 解析、エクソン特異的抗体を用いた免疫染色を行ったところ、X染色体不活化 (X-chromosome inactivation: XCI) により、発端者の心筋の約40%に $\Delta 45-48$ ジストロフィンが発現していることが明らかとなった。同じ $\Delta 45-48$ <i>DMD</i> 変異を有しているにも関わらず、同胞キャリアである発端者の姉の心収縮能は保たれていた。発端者のみが重症心不全に至ったメカニズムを解明するため、心血管パネル遺伝子解析を施行したところ、発端者においてのみ <i>PLOD3</i> 遺伝子にヘテロ接合型のstop gain変異を同定した。 <i>DMD</i> , <i>PLOD3</i> 遺伝子変異による心機能への影響を解明するため、発端者の末梢血単核球からiPS細胞を樹立し、XCI機構とゲノム編集を組み合わせ、アイソジェニックiPS細胞樹立を試みた。樹立したiPS細胞由来分化心筋細胞を対象にddPCRを用いたスクリーニングを行い、XCI機構によりWT- <i>DMD</i> 、 $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> をそれぞれ有意に発現するiPS細胞を選別した (WT- <i>DMD</i> -iPSC、 $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -iPSC)。さらに $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -iPSCに対して相同組み換え (Homology-directed repair: HDR) を介したゲノム編集を行い、ヘテロ接合型 <i>PLOD3</i> 変異を修復した $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -HDR-iPSCを樹立した。これらアイソジェニックiPS細胞由来分化心筋細胞 (iPSC-CM) から作成した三次元組織化リング (Self-organized tissue ring: SOTR) を用いて微小収縮力解析を行ったところ、WT- <i>DMD</i> -SOTRに比し $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -SOTRでは収縮力と剛性の低下を認め、 <i>PLOD3</i> 変異を修復した $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -HDR-SOTRで収縮力、剛性の改善を認めた。 <i>PLOD3</i> はリシルヒドロキシラーゼ3をコードする遺伝子であり、コラーゲン合成・架橋構造の形成に必要とされている。ウェスタンブロットにより解析したところ、 $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -iPSC-CMに比し、 $\Delta 45-48$ - <i>DMD</i> -HDR-iPSC-CMでは、I型、III型コラーゲンタンパク質発現が改善することが明らかとなった。 | |
| 〔総 括(Conclusion)〕 | |
| <i>DMD</i> , <i>PLOD3</i> 変異の各アイソジェニックiPS細胞由来分化心筋細胞は、BMD女性キャリアにおける心筋収縮力と剛性の低下を再現し、重症心不全に至ったBMD女性キャリア症例の病態解明、新たな治療ターゲット探索のための有用なツールとなる。 | |

論文審査の結果の要旨及び担当者

| | | | | |
|---|-----|--------|-------|------------------|
| (申請者氏名) 亀田 聡士 | | | | |
| 論文審査担当者 | (職) | 氏 名 | | |
| | 主 査 | 大阪大学教授 | 坂田 泰史 | 〒565-0871 大阪府吹田市 |
| | 副 査 | 大阪大学教授 | 吉本 範行 | 〒565-0871 大阪府吹田市 |
| | 副 査 | 大阪大学教授 | 望月 香樹 | 〒565-0871 大阪府吹田市 |
| <p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、重症心不全を発症したBecker型筋ジストロフィー女性キャリア症例から<i>DMD</i>変異($\Delta 45-48$)とセカンドヒット遺伝子として<i>PLOD3</i>変異を見出し、XCI機構とCRISPRCas9を用いたゲノム編集を組み合わせアイソジェニックiPS細胞を作成することで、各遺伝子変異が及ぼす心機能への影響を解明することを目的とした。</p> <p>研究の結果、iPSC由来分化心筋細胞(iPSC-CM)から作成した組織化リング(SOTR)を用いて微小収縮力解析を行ったところ、WT-<i>DMD</i>-SOTRに比し$\Delta 45-48$-<i>DMD</i>-SOTRでは収縮力と剛性の低下を認め、HDRでは剛性の改善を認めた。また<i>PLOD3</i>はコラーゲン合成に関連しており、$\Delta 45-48$-<i>DMD</i>-iPSC-CMに比し、HDRではI型、III型コラーゲタンパク質発現が改善し、コラーゲン合成が心機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。</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> | | | | |