

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1199 号	氏 名	佐 藤 充 人
論文審査担当者	主 査 関 島 良 樹 副 査 桑 原 宏 一 郎・古 庄 知 己		

(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) はジストロフィン (*DMD*) 遺伝子の変異によりジストロフィンが欠損し、進行性に骨格筋や心筋が侵される X 連鎖性疾患である。以前は呼吸筋障害による呼吸不全が最大の予後因子であったが、近年の人工呼吸管理技術の向上により、最大の死因は心不全や致死性不整脈となっている。現時点において、DMD に対する最も有望な治療方法はアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を用いたエクソン・スキップ治療であり、臨床応用が始まっている。本研究では DMD 患者から作成した iPS 細胞を心筋細胞へと分化誘導し、AO 薬によりイン・フレーム化することでジストロフィンの発現回復および細胞内 Ca^{2+} 動態の改善が得られるかについて検討した。

DMD 遺伝子エクソン 46-55 欠失を有する 24 歳日本人男性の T リンパ球から iPS 細胞株を樹立した。分化誘導因子 (CHIR99021、Activin A、BMP-4、XAV939) を用い心筋細胞へ分化誘導を行い、エクソン 45 をスキップする AO 薬 (PMO) を用いてエクソン 45-55 欠失のイン・フレーム変異型に変換した。RT-PCR 法によりエクソン・スキップ効率を検討し、ウェスタンブロットリングおよび免疫細胞染色によりジストロフィンの発現回復を評価した。また Fluo-4 を用いた細胞内 Ca^{2+} イメージングにより細胞内 Ca^{2+} 動態の改善が得られるかを検討した。

その結果、佐藤充人は次の結論を得た。

1. DMD 患者 iPS 細胞由来心筋細胞への PMO 投与によるエクソン 45 スキップによりジストロフィンの発現回復が得られ、用量依存性にエクソン・スキップが起こる傾向を認めた。
2. エクソン・スキップ前後で不規則な自発性細胞内 Ca^{2+} 上昇の頻度低下 (不整な収縮を呈する心筋細胞の減少) が認められた。
3. エクソン・スキップ後の心筋細胞では、リアノジン受容体 2、SERCA2 による筋小胞体からの Ca^{2+} 放出・再取り込み機構に由来する細胞内 Ca^{2+} トランジェントの改善が認められた。

これらの結果よりエクソン・スキップ治療は心筋細胞に対しても有効と考えられ、心室性不整脈の予防、心機能改善に寄与する可能性があることが示唆された。また本研究結果はエクソン 45 スキップ治療の有効性を支持し、得られた DMD 患者 iPS 細胞由来心筋はエクソン・スキップ治療の細胞モデルとして有用であると考えられた。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。