

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	植 木 絢 子
論文題目	Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability (筋強直性ジストロフィー1型疾患特異的 iPSC 細胞を用いた CTG リピート不安定性の研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>筋強直性ジストロフィー1型(DM1)は常染色体優性遺伝であり、DMPK 遺伝子の CTG 繰り返し配列(CTG リピート)が異常伸長することにより引き起こされる疾患です。DM1 の症状は多彩で、ミオトニア、糖尿病、心筋伝導異常、白内障など、全身諸臓器に及びます。諸症状の原因は、伸長した CTG リピートから転写された mRNA が、核内でスプライシング異常を引き起こすためと言われています。CTG リピート数は健常だと 50 程度までですが、DM1 患者だ時には 5000 まで伸長します。リピート数と症状の重症度とは相関し、世代を経る毎に重症度が増します。伸長した CTG リピートは不安定であり、患者の中で臓器毎に、また一生の中でも長さが変化します。さらには同一組織内であっても細胞間でリピート数が異なります。なぜ、いかにして CTG リピートが伸長するのか、未だわかっていません。CTG リピートの不安定性を研究するため、DM1 患者由来 iPSC 細胞の活用を考え、継代培養時のリピート数変化と神経・心筋・骨格筋といった罹患組織への分化誘導時のリピート数変化の解析を進めました。まず用いた DM1 患者由来 iPSC 細胞が、患者の病態を反映しているかどうかを検証するためスプライシング異常について解析し、分化誘導した神経・心筋・骨格筋細胞において DM1 で特有にみられるスプライシング異常を検出したため、この細胞は確かにモデルになる事が示されました。次に各継代数、各分化細胞におけるリピート数解析を行いました。その際、通常の PCR によるゲノム DNA 増幅では、最も存在確率の高いリピート数のみが増幅され、細胞群での分布までは解析できないため、長さだけではなくその存在確率も解析可能な small pool PCR 法を選択しました。その結果、維持継代前後では有意に平均リピート数の伸長を認めましたが、未分化 iPSC 細胞と、その未分化 iPSC 細胞から分化させた各組織との比較では、有意差を認めませんでした。このことは、細胞分裂の過程がリピート伸長を引き起こしている可能性を示唆しています。倍化時間を調べる実験から、未分化細胞は筋細胞に比べ 6 倍以上の細胞分裂回数であり、この細胞分裂数の多さが、リピート伸長している原因である可能性が示唆されました。リピート数のバラつきについては、平均付近のリピート数にピークを持つなだらかな山型の分布を示し、この分布型は、継代しても誘導を行っても細胞株樹立早期の段階から一定に保たれていました。iPSC 細胞株が 1 個の細胞に由来することを考えると、樹立早期からリピートは不安定であり、その不安定性は継代でも誘導でも一定して不安定であったと言えます。さらに、リピート数の不安定性の原因として、昨今エピゲノム異常が示唆されているため、ATAC-seq という手法を用いて、クロマチン構造を調べました。その結果、患者 iPSC 心筋では健常 iPSC 心筋と比較してクロマチン構造が閉じている部位が多く、これまでにゲノム DNA のメチル化異常が報告されている領域である、CTCF 結合領域を含む DMPK 領域と SIX5 のプロモーター領域において有意に</p>			

クロマチン構造が閉じていることがわかりました。

以上の結果から、DM1 患者由来 iPSC 細胞では継代培養時にリピートが伸長し、その分布型には変化がないこと、また伸長した CTG リピート近傍においてクロマチン構造が閉じていることが明らかとなりました。今後この細胞モデルを用いることで、エピゲノム異常を含めたリピート伸長のメカニズム解析を進めることが、新規の治療ターゲット創出につながると期待されます。

(論文審査の結果の要旨)

筋強直性ジストロフィー1型(DM1)は、DMPK 遺伝子中の異常伸長した CTG 繰り返し配列(CTG リピート)から転写された mRNA が病因と考えられている。CTG リピートの不安定性を研究するため、DM1 患者由来 iPSC 細胞の活用を考え、継代培養時及び神経・心筋・骨格筋といった罹患組織への分化誘導時のリピート数変化の解析を進めた。まず用いた DM1 患者由来 iPSC 細胞が、患者の病態を反映しているかどうかを検証するため、分化誘導した神経・心筋・骨格筋細胞において DM1 で特有にみられるスプライシング異常を検出した。次に各継代数、各分化細胞におけるリピート数解析を small pool PCR 法を用いて行った結果、継代培養時にリピートが伸長し、心筋・神経・骨格筋への誘導では有意に伸長しなかったこと、リピート数の分布型はクローン樹立初期から継代や誘導にかかわらず変化がないことが判明した。さらに、リピート数の不安定性の原因として、昨今エピゲノム異常が示唆されているため、ATAC-seq を用いてクロマチン構造を調べた。その結果、患者 iPSC 心筋では健常 iPSC 心筋と比較してクロマチン構造が閉じている部位が多く、CTCF 結合領域を含む DMPK 領域と SIX5 及び SIX5 のプロモーター領域において有意にクロマチン構造が閉じていることが明らかとなった。以上の研究は DM1 患者由来 iPSC 細胞が細胞モデルとして有用であることを示しており、エピゲノム異常を含めたリピート伸長のメカニズムの解明に貢献し、新規の治療ターゲット創出に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 11 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降