

京都大学	博士（医科学）	氏名	川田 竜
論文題目	<b>Establishment of quantitative and consistent in vitro skeletal muscle pathological models of myotonic dystrophy type 1 using patient-derived iPSCs</b> （患者由来iPS細胞を用いた筋強直性ジストロフィー骨格筋病態の再現と薬効評価のための定量的な細胞評価系の確立）		
（論文内容の要旨） 筋強直性ジストロフィー（DM1）は成人において最も頻度の高い筋ジストロフィーとされているが、根本的な治療薬が存在しない。治療薬の探索、開発を行うためには、DM1患者で認められる病態を再現したヒト細胞評価系の開発が求められている。DM1は、常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患であり、DMPK遺伝子のCTG繰り返し配列が異常に伸長することが原因とされる。変異したDMPK遺伝子から産生される異常RNAは、遺伝子スプライシング機能を担うタンパク質MBNL1に結合することで、細胞核内で凝集体を形成する。その結果、MBNL1の正常な機能が阻害され、多くの遺伝子におけるスプライシング異常が生じることがDM1病態発症の主要な機序であるとされている。 本研究ではDM1患者由来iPS細胞から、DM1骨格筋における病態を再現する骨格筋細胞の分化誘導方法を特定し、定量的なヒト細胞薬効評価系を構築することを目的として研究を行った。DM1患者と健常人から作製したiPS細胞に対して、骨格筋特異的転写因子MyoD1を強制発現させることで骨格筋細胞を作製した。その結果、10日間の培養によって分化したDM1患者由来の骨格筋細胞の核内において、MBNL1タンパク質が凝集することを確認した。また、細胞の固定方法を検討し、アセトン-メタノール固定法を用いることで、凝集したMBNL1タンパク質のみを特異的に検出し、画像解析によるMBNL1凝集数の定量評価が可能となった。次に、遺伝子スプライシング異常評価を行ったが、10日間の分化培養では骨格筋細胞の成熟度が低く、その異常を検出できなかった。そこで、既存の培養方法を改良し、新たな分化誘導方法を構築することで分化骨格筋細胞の成熟度が向上した。その結果、17日間の培養により分化したDM1患者由来の骨格筋細胞において、DMDおよびBIN1の遺伝子スプライシング異常が生じることを確認した。続いて、DM1患者由来細胞に対する異常伸長CTGリピート配列除去処置およびアンチセンス核酸CAG25処置により、MBNL1核内凝集数が減少し、遺伝子スプライシング異常が改善することを確認した。したがって、これらのDM1病態評価系を薬効評価に用いることの妥当性を確認することができた。最後に、筋力を発揮するために重要な役割を果たす細胞内カルシウム制御分子SERCA1（遺伝子名：ATP2A1）遺伝子のスプライシング異常評価を行った。しかし、MyoD1発現系では骨格筋細胞の成熟度が低く、病態を再現することができなかった。そこで、ヒトiPS細胞から骨格筋幹細胞（iMuSC）を誘導し、より成熟した骨格筋細胞を作製する検討を行った。iMuSC誘導系は、MyoD1発現系に比較して成熟度が高く、DM1患者由来の骨格筋細胞においてSERCA1遺伝子スプライシング異常を検出することができた。また、CAG25処置により、スプライシング異常が改善したことから、SERCA1遺伝子のスプライシング異常を指標とした薬効評価系を構築することに成功した。 本研究では、iPS細胞を用いることで、DM1病態において特徴的なMBNL1核内凝集およびスプライシング異常を定量評価可能な2種の骨格筋細胞評価系を構築した。短期間で評価可能なMyoD1強制発現細胞はDM1創薬スクリーニング、成熟度が高く、機能分子の評価を可能にしたiMuSCは臨床薬効予測のための応用が期待できる。			

（論文審査の結果の要旨）

筋強直性ジストロフィー1型（DM1）は成人において最も頻度の高い筋ジストロフィーとされ、根本的な治療薬が存在しない。治療薬の探索、開発を行うためには、DM1患者で認められる病態を再現したヒト細胞評価系の開発が求められている。

本研究ではDM1患者由来iPS細胞から、DM1骨格筋における病態を再現する骨格筋細胞の分化誘導方法を特定し、定量的なヒト細胞薬効評価系を構築することを目的として研究を行った。

DM1患者と健常人から作製したiPS細胞に対して、骨格筋特異的転写因子*MyoD1*を強制発現させる方法で骨格筋細胞へ分化誘導した。方法の最適化を行うことで、DM1患者由来筋細胞におけるMBNL1核内凝集およびDMD・BIN1遺伝子スプライシング異常を再現し、定量評価可能な解析系を構築した。DM1患者由来細胞に対する異常伸長CTGリピート配列除去処置およびアンチセンス核酸処置により、MBNL1核内凝集数の減少および各遺伝子スプライシング異常が改善することを確認した。さらに、ヒトiPS細胞から骨格筋幹細胞（iMuSC）を誘導しより成熟した骨格筋細胞を作製することで、*MyoD1*発現系では再現できなかったATP2A1遺伝子スプライシング異常を再現し、薬効評価系を確立した。

以上の研究はDM1病態メカニズムの解明と新規治療薬の探索および開発へ貢献し、今後のDM1創薬応用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）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、令和5年2月7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