

小篠 史郎 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

ES細胞を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの再生医療の開発
(Development of an embryonic stem cell based therapy to treat Duchenne muscular dystrophy)

【背景・目的】 Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) のモデル動物である mdx マウスに骨髄や骨格筋より分離した幹細胞 (side population cell ; SP 細胞) を経静脈的にマウスに投与したところ、全身の骨格筋へ移行し筋線維になることが示され、こうした幹細胞移植により筋ジストロフィーの治療が可能であることが示唆された。一方、胚性幹細胞 (embryonic stem cell ; ES 細胞) は SP 細胞と異なり多分化能を保ったまま長期大量培養が可能であり、細胞治療の細胞源として期待されている。ES 細胞を筋細胞に分化させ、その細胞を用いて Duchenne 型筋ジストロフィー治療に応用することを目的とした。

【方法】 遺伝子相同組み換え技術によって ES 細胞の遺伝子を改変し、*MyoD* 遺伝子の発現を Tet-Off System にて、調節可能な ES 細胞 (ZHTc6-MyoD) を作成した。この ES 細胞は doxycycline 存在下では未分化状態を保持するが doxycycline を除去すると筋分化特異的転写因子である *MyoD* が発現し筋細胞へ分化する。この細胞の性質を Western blotting、免疫染色、mdx マウス移植系を用いて *in vitro* および *in vivo* で解析した。

【結果】 ZHTc6-MyoD 細胞は *in vitro* で doxycycline 除去後 5 日目には細長い形態を示し、時間経過とともに細長い細胞が増えていった。7 日目には癒合を開始し、10 日目で自発的に収縮する細胞が観察された。Western blotting では、doxycycline 除去後 2 日目から *MyoD* の発現が認められた。4 日目以降には desmin と myogenin が発現し、8 日目以降に dystrophin の発現が確認された。免疫染色では分化誘導後 3-5 日目に一過性に Pax7 の発現が認められた。*MyoD* は 3 日目以降に核に局限した発現が認められた。desmin は 5 日目以降、fast myosin heavy chain および dystrophin は 10 日目以降に発現が認められた。Flowcytometry による解析では、未分化な ZHTc6-MyoD 細胞では CD34 陰性、Sca-1 陽性、c-Kit 陽性であったが、doxycycline を除去することにより Sca-1 および c-Kit も陰性となった。ZHTc6-MyoD を mdx マウスの腓腹筋に筋注したところ、14 日目に dystrophin 陽性の筋線維のクラスターを認め、RT-PCR 解析にて ES 細胞由来の dystrophin が発現していることが確認された。mdx-nude マウスに筋注したところ腫瘍を形成した。

【考察】 doxycycline の有無によって制御可能なプロモーターで *MyoD* の発現を調節することで、未分化状態を保ったまま ES 細胞を増殖させ、任意に骨格筋分化を促すことが可能になったと考えられる。

【結論】 doxycycline の有無によって筋分化を制御できる ES 細胞を確立した。*in vitro* では高率に分化するが *in vivo* では高い分化効率は得られず腫瘍を形成するなど臨床応用には未だ問題点が多い。

【発表・審査】 公開発表では、上記の研究について口頭発表による紹介・説明があり、その後各委員より質問がなされた。1) *MyoD* を発現遺伝子として選んだ理由、2) *MyoD* の ES 細胞分化での発現時期と発現強度について 3) 作製した ES 細胞の分化能力のクローナルバリエーションについて、4) 得られた細胞のマウスへの移植方法について、5) 筋ジストロフィーのエクソンスキップ治療方法について、6) 移植したマウスでの dystrophin 発現のメカニズムについて、7) 臨床応用に向けての展望、8) 作製した ES 細胞分化での Pax7 陽性細胞について質問され、おおむね適切な説明がなされた。本研究は、ES 細胞を用いて、*MyoD* 発現が骨格筋分化を促進し、作製された筋芽細胞による将来の Duchenne 型筋ジストロフィー治療の可能性に言及した重要な研究であり、学位に値すると判断する。

審査委員長 幹細胞誘導学担当教授

江良根実

審査結果

学位申請者名： 小篠 史郎

分野名またはコース名： 小児発達学

学位論文題名：

ES細胞を用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの再生医療の開発
(Development of an embryonic stem cell based therapy to treat Duchenne muscular dystrophy)

指導： 三池 輝久 前教授、遠藤 文夫 教授

判定結果：

可 不可

不可の場合：本学位論文名での再審査

可 不可

平成23年12月12日

審査委員長 幹細胞誘導学担当教授

江良 拓実

審査委員 多能性幹細胞学担当教授

桑 昭範

審査委員 組織幹細胞学担当教授

小川 峰太郎

審査委員 神経内科学担当講師

平野 照之