

氏 名	サイ トウ タカシ 齊 藤 崇
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 496 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学 位 論 文 題 目	PMO antisense, found in dystrophic dog model was effective in cells from an exon-7 deleted DMD patient (イヌ筋ジストロフィーモデルで見出された PMO アンチセンスはエクソン 7 欠失 DMD 患者細胞において有効である)
主 論 文 公 表 誌	
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 大澤真木子 (副査) 教授 小林 槇雄, 齊藤加代子

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィンの欠損により発症する致死性の遺伝性筋疾患である。アンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) を用いたエクソンスキッピングにより, 筋ジストロフィーモデル犬 (CXMD_J) でのジストロフィンの回復と症状の改善が報告されている。これまで DMD モデル動物に用いられた AON を直接ヒト細胞に応用した報告はなく, 我々は同じ構造と配列の AON がヒト細胞でも有効であるか検討した。

〔対象および方法〕

CXMD_J ならびに mRNA 上同様の変異を有する DMD 患者の線維芽細胞を採取した。アッセイに必要なジストロフィン発現を増加させるため, 線維芽細胞に MyoD 遺伝子を導入して筋分化を誘導した。AON としてエクソン 6 および 8 を標的としイヌとヒトで共通な配列の phosphorodiamidate morpholino oligo (PMO) を設計した。筋分化を誘導した細胞に AON を投与し, CXMD_J 細胞と患者由来細胞におけるエクソンスキッピングの結果を解析した。

〔結果〕

DMD 患者由来細胞は CXMD_J と異なり 50.4kb の欠失変異によりエクソン 7 を欠失していた。MyoD を導入した線維芽細胞は, アッセイに必要な充分な量のジストロフィンを発現していた。CXMD_J および DMD 患者細胞に共通の AON を投与した結果, 標的のエクソンがスキップした mRNA, およびジストロフィタンパク質の発現を認めた。スキッピング効率は同様であったが, エクソン 9 のスプライシングは両者で異なり, DMD 患者細胞においてのみ, エクソン 9 が挿入されたインフレーム mRNA が認められた。

〔考察〕

MyoD 遺伝子の導入により, 線維芽細胞にエクソンスキッピングに必要な充分な量のジストロフィンを発現させることが可能であった。イヌ/ヒト間のジストロフィン遺伝子配列の共通性ゆえに, CXMD_J で有効な AON はヒト細胞においても有効で, スキッピング効率も同様であった。インフレーム mRNA 上で患者細胞にのみエクソン 9 の挿入を認めたことは, ゲノム上の欠失によりイントロンが短縮していることが影響していると考えられた。

〔結論〕

DMD のエクソンスキッピングに関しては, イヌモデルで用いられた AON を直接ヒトに応用することで, 同様の効果が期待できることが示唆された。

論文審査の要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィンの欠損により発症する疾患である。アンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) を用いたエクソンスキッピングにより、筋ジストロフィーモデル犬 (CXMD_J) でのジストロフィンの回復と症状改善の報告がある。過去に DMD モデル動物に用いた AON を直接ヒト細胞に応用した報告はなく、本研究では、同じ構造と配列の AON のヒト細胞での有効性を検討した。CXMD_J ならびに mRNA 上同様の変異を有する DMD 患者の線維芽細胞を採取し、アッセイに必要なジストロフィン発現を増加させるため、線維芽細胞に MyoD 遺伝子を導入して筋分化を誘導した。AON としてエクソン 6 および 8 を標的とし、イヌとヒトで共通な配列の phosphorodiamidate morpholino oligo (PMO) を設計した。筋分化を誘導した細胞に AON を投与し、CXMD_J 細胞と患者由来細胞におけるエクソンスキッピングの結果を解析した。イヌモデルで用いられた AON を直接ヒトに応用することで、同様の効果が期待できることが示唆された。以上より価値ある論文である。

60

氏 名	市 原 有 起
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 497 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻、博士課程修了者)
学位論文題目	Tissue-engineered arterial patch with novel biodegradable scaffold (生体吸収性素材を用いた動脈組織の再生に関する研究)
主論文公表誌	
論文審査委員	(主査) 教授 山 崎 健二 (副査) 教授 萩原 誠久、岡野 光夫

論文内容の要旨

〔目的〕

我々は自己骨髄細胞と生体吸収性ポリマーからなる再生血管の作製に成功し 2000 年からは臨床応用するまでに至った。しかし、それらは静脈系グラフトとしての使用に限られており、動脈グラフトとしては十分な耐久性が得られていないのが現状である。今回我々は、高圧環境下において使用可能な生体吸収性材料を新たに開発し、基礎実験としてポリマーの移植によって得られた組織の成熟度を組織学的・生化学的に検討した。

〔対象および方法〕

ポリマーはポリ乳酸 (PLA) と ε-ポリカプロラクトン (PCL) の共重合体 P (CL/LA) をスポンジ状にし、ポリ L 乳酸 (PLLA) で補強したものを使用した。補強材を静脈グラフトの時に使用していたポリグリコール酸 (PGA) からより吸収期間の長い PLLA へ変更することで耐圧を図った。体重約 10kg のビーグル犬の下行大動脈へ約 30×15mm のパッチ型ポリマーを移植し 1, 3, 6 ヶ月経過観察した (n=12)。組織学的検討として内皮細胞および血管平滑筋細胞の免疫組織化学染色を行い、生化学的検討として得られた組織内のコラーゲンおよびエラスチン量の測定を行った。また再生血管組織の内皮化と中膜層を形成する細胞成分の動態を遺伝子レベルで確認するため vascular endothelial growth factor (VEGF), von Willebrand factor (vWF), smooth-muscle myosin heavy chain (smMHC) の mRNA 発現量を RT-PCR にて半定量解析した。

〔結果〕

全症例においてパッチの破裂、瘤化および血栓形成は認められなかった。移植後 1 ヶ月の時点でパッチ内腔側は一層の内皮細胞で覆われていた。中膜は平滑筋細胞が少数散見される程度の未熟な構造であったが、3, 6 ヶ月