

平成29年2月13日

崇城大学大学院
薬学研究科委員会

研究科長 小田切 優樹 殿

論文審査委員

主査 松倉 誠



論文審査結果の報告（甲）

論文提出者 堀 尾 福 子 （1331D05）

論文題名 ダイレクト・リプログラミング法による皮膚線維芽細胞の骨格筋細胞
への分化誘導

審査委員 主査教授 松倉 誠



副査教授 國安明彦



副査准教授 内田友二



論文審査結果の要旨

本研究では、遺伝性筋疾患の代表的疾患であるデュシャンヌ型筋ジストロフィー（DM D）の治療法開発として、再生細胞治療法研究を行った。皮膚から得られた皮膚線維芽細胞が、アデノウイルスベクターを利用して、筋分化能力を持つ MyoD 遺伝子を皮膚線維芽細胞へ導入後、筋へと分化誘導した細胞について、以下の知見を得ている。

- 1) 細胞を使用した再生医療研究にはダイレクト・リプログラミング法（元になる細胞から直接形質転換をして目的の細胞を得る）とインダイレクト・リプログラミング法（間に未熟で高い細胞増殖能を持つ細胞を経由する間接法）に大別される。インダイレクト・リプログラミング法で代表的なものは iPS 細胞を用いた方法があるが、安全性やコスト面での懸念が存在するので、ダイレクト・リプログラミング（皮膚線維芽細胞をアデノウイルス MyoD ベクターによる骨格筋への分化誘導）法の検討により、同治療法が有効である可能性を持つことを明らかにした。
- 2) 皮膚線維芽細胞のダイレクト・リプログラミング法による筋への分化誘導された細胞を用い、筋分化調節因子である内因性 MyoD、Myogenin、Myomaker、と筋の骨格を形成する MHC、Dystrophin、CK-M 遺伝子の発現を確認した。
- 3) 電気刺激（150V、1Hz）による同細胞の収縮能を確認するために、筋管様の細胞上

の2点間の距離を経時的に測定したところ、収縮能が存在する事を確認した。

- 4) 筋肉では、筋小胞体による Ca^{2+} 放出が筋収縮に必要であるため、4-CEP および 4-CmC のリアノジン受容体刺激試薬、ATP の IP_3 受容体刺激試薬を使用し、細胞内 Ca^{2+} の変動を記録しところ対照群の非分化誘導細胞に比し有意な Ca^{2+} 放出が認められた。
- 5) MyoD 導入細胞の遊走能を、初期培養マウス筋芽細胞や非分化細胞（皮膚線維芽細胞）と Time-lapse 法を用い比較した所、4 倍および 10 倍の遊走能を示し、宿主内で移植細胞群が広く分布して、宿主標的筋細胞部位へより早く到達する可能性を示唆した。
- 6) 目標部位に遊走し到達した移植細胞が宿主細胞と融合し合胞体形成する能力があるかを検討するため、MyoD 導入細胞（抗ヒトジスフェルリン抗体による免疫染色（Alexa-594 の赤色））と EGFP 導入マウス筋芽細胞（緑色）を共培養し、赤色および緑色蛍光共発現細胞を融合細胞として評価したところ、融合能を確認した。

最終試験結果の要旨

本論文は、研究の目的・背景が明確であり、得られた結果も新規性があり、博士の学位論文としての内容を満たし、加えて審査委員会および公聴会における質問に対しても適切に答え、実りある討論がなされた。以上の結果に基づき、本論文提出者は、博士（薬学）の学位を得る資格があると判定した。