

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 ㊦ 第 号	氏 名	小 平 真 幸
<p>主 論 文 題 名</p> <p>Impaired respiratory function in MELAS-induced pluripotent stem cells with high heteroplasmy levels (MELAS患者由来iPS細胞における変異率と呼吸機能の関係)</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>ミトコンドリア病は、ミトコンドリア機能が低下する病気であり、ミトコンドリアDNA (mtDNA) あるいは核DNAに遺伝子変異を認める。比較的大量のエネルギーを必要とする脳、心臓、筋肉で障害を認めることが多い。MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) は、最も頻度の高いミトコンドリア病の一病型であり、ミトコンドリアDNA配列上の塩基番号3243の塩基置換 (m.3243A&gt;G) が8割を占める。現在有効な治療法がないが、疾患モデルが存在しないことも治療薬開発が進まない要因となっている。人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell:iPS細胞) はin vitroで様々な細胞に分化できることから、新たな疾患メカニズムの解明や治療法の開発などを目的として、これまでに疾患解析が広くおこなわれている。本研究では、MELAS患者からiPS細胞株を作製し、それが疾患モデルとして有効であることを証明することを目的とした。</p> <p>MELAS患者由来の線維芽細胞に対し従来の山中法でレトロウィルスを用いて<i>Oct3/4</i>、<i>Klf4</i>、<i>Sox2</i>、<i>c-Myc</i>の4因子を導入することでiPS細胞を作製することに成功した。免疫染色により未分化マーカーを確認し、奇形腫形成および胚様体形成を確認した。各細胞に数千個のmtDNAが存在するが、MELAS患者では正常mtDNAと異常mtDNAが混在した状態 (ヘテロプラスミー) を認める。細胞における変異率が高くなりある閾値を超えると細胞機能が障害されるという閾値効果が報告されており、変異率はまた呼吸機能と密接に関係している。患者由来の線維芽細胞の変異率は77.7%であったが、樹立したiPS細胞の変異率は3.6%から99.4%と広範囲に分布していた。iPS細胞はミトコンドリアへのエネルギー依存性が低いが、樹立したMELAS由来のiPS細胞での長期培養における変異率の推移を評価した。継代数10と継代数40での変異率について比較検討した。変異率が低い細胞株では変異率の増加を認める一方、変異率が50%以上の細胞株では変異率は維持されていた。また、iPS細胞から線維芽細胞に分化させた際に変異率は維持されていることを確認した。次に、MELASのiPS細胞株由来線維芽細胞における呼吸機能を検討した。変異率が70%を下回る細胞株では呼吸機能が維持されていた一方、70%以上の細胞株では複合体Iの機能低下が生じることを確認した。MELAS患者で報告されている複合体Iの機能低下が患者iPS細胞由来細胞において観察されると同時に閾値効果も再現された。</p> <p>以上の結果より、iPS細胞がMELASの疾患モデルになり得ることが証明された。また、目的に応じて適切な変異率の細胞を選択する必要があることが明らかとなった。</p>			