

京都大学	博士（医学）	氏名	才田 聡
論文題目	Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome (一過性骨髄異常増殖症の異種移植モデルにおけるクローン選択は、ダウン症候群の骨髄性白血病進展の過程を再現する)		
(論文内容の要旨)			
<p>Down 症候群(DS)の新生児は、約 10%で一過性骨髄異常増殖症 (TAM ; transient abnormal myelopoiesis) を発症する。TAM は転写因子である GATA-1 の異常が一因で起こり、多くは生後 3 ヶ月以内に自然消退するが、TAM 患者の約 20%がのちに真の白血病である ML-DS (myeloid leukemia of DS) を発症する。これまで白血病発症機序の解明を目的として、TAM の患者検体を用いた解析が試みられてきたが、TAM 細胞は in vitro、in vivo とともに長期の維持が困難で、実験系による病態解明には限界があった。</p> <p>本研究は TAM 芽球を含む患者末梢血単核球と、高度免疫不全マウスである NOG マウスを用いて①TAM の異種移植モデルを確立し、②ヒトにおける前白血病から白血病への進展機序を解明することを目的とした。</p> <p>まず TAM 患者末梢血単核球を、NOG マウスに尾静脈から移植した。レシピエントマウスから骨髄液を採取し、形態、表面抗原、染色体、GATA-1 遺伝子異常について解析を行った。TAM 11 例中 3 例 (#1, #2, #9) において、患者芽球と同様の形態的・遺伝的特徴を有する細胞が生着しており、TAM の異種移植モデルを確立した。</p> <p>次に生着した 3 例について、白血病細胞の特徴である「自己複製能」の獲得について調べるために、1 代目から 2 代目マウスへの継代移植を行った。3 例中 1 例 (#1) で継代が可能であり、さらに 8 代目まで継代可能であった。これら自己複製能を有する細胞には、何らかの付加的なゲノムの構造異常が起きているのではないかと考え、多数のマウスで継代移植を行い、生着した TAM 由来細胞について DNA コピー数解析を行った。症例#1 の患者検体では、21 トリソミー以外の染色体異常や DNA コピー数異常は認めず、単一の GATA-1 遺伝子異常 (c.38_39delAG) が検出された。一方、本症例 (#1) の多数のレシピエントマウスにおける解析では、患者検体には見られなかった GATA-1 変異 (c.1A>G) と、多様な DNA コピー数異常(16q 部分欠失, 1q 増幅, 3q 部分欠失) が観察され、それぞれ多様な自己複製能を示した。TAM は通常 21 トリソミー以外の染色体異常を伴わず、ML-DS では高頻度に付加的染色体異常を伴うことが報告されており、マウス内で観察されたコピー数異常は ML-DS に特徴的なものであった。また本症例 (#1) は後に ML-DS を発症した。</p> <p>これらの異常クローンは、複数の 1 代目マウスで再現性をもって観察され、</p>			

①もともと TAM 患者検体に潜在していた可能性と、②マウス内で新たに獲得された変化である可能性が挙げられた。そこで、全ゲノム解析により切断点の同定が可能であった異常クローン(16q 部分欠失)について、切断点特異的 PCR を施行し、このクローンが患者検体中にマイナークローンとして既に存在していたことを証明した。また、新たにマウス内で観察された GATA-1 異常クローン (c.1A>G) についても、制限酵素による配列特異的な PCR 産物の切断と DNA シークエンシングにより、患者検体中に存在していたことを証明した。

本実験系は前白血病から白血病への進展過程を生体内で再現し得るモデルであり、本研究により TAM の遺伝的多様性と、初期段階に不規則に起こるクローン選択が白血病発症に重要である可能性が示唆された。また、のちに ML-DS へ進展した TAM 患者でのみ、継代移植が可能であった点からは、本実験系が白血病発症の予測因子となり得る可能性も示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ダウン症候群(DS)の新生児は、転写因子である GATA1 の異常により TAM と呼ばれる一過性の骨髄増殖症を発症し、その 20%程度がその後 ML-DS と呼ばれる白血病を発症するが、その機序は明らかになっていない。TAM から ML-DS への進展機序を解明すべく、異種移植モデルによる解析を行った。TAM 患者 11 例の末梢血を免疫不全マウスである NOG マウスへ移植し、3 例で TAM 由来細胞の生着を確認した、その 3 例中 1 例は継代移植可能であり、かつその患者はその後 ML-DS を発症した。継代後の生着細胞を遺伝子解析したところ、患者検体中に直接検出されない GATA1 変異や複数のゲノム構造異常が検出され、これらは ML-DS に特徴的な異常であった。またさらなる解析の結果、生着細胞で出現した遺伝子異常は、元々の患者検体にマイナークローンとして存在していることが確認された。以上の結果から、前白血病である TAM の遺伝的多様性が明らかとなり、初期段階に起こるクローン選択の過程が、白血病発症の背景にある可能性が示された。また本実験系が TAM から ML-DS への移行過程の再現モデルとなり、本実験系における自己複製能の有無が、TAM における白血病発症の予測因子となる可能性が示唆された。

以上の研究は、前白血病である TAM の異種移植モデルの確立とその病態解析に貢献し、ヒト白血病発症機序の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）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、平成 25 年 7 月 17 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