

京都大学	博士（医学）	氏名	濱端 隆行
論文題目	Pluripotent stem cell model of Shwachman-Diamond syndrome reveals apoptotic predisposition of hemoangiogenic progenitors (シュバツハマン・ダイヤモンド症候群の多能性幹細胞モデルにより血液・血管内皮前駆細胞のアポトーシス指向性を明らかにした)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) は骨髄不全、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病への悪性転化、膵外分泌不全、骨格異常などの臨床的特徴を示す先天性骨髄不全症で、患者の約 90%で <i>SBDS</i> 遺伝子の複合ヘテロ接合体変異が検出される。<i>SBDS</i> タンパクはリボゾーム生合成、抗アポトーシス効果など様々な細胞プロセスに作用するが、<i>SBDS</i> ノックマウスでは胎生致死となるため、そのタンパク機能不全と造血障害との関連は十分解明されていない。本研究では SDS 患者から樹立した iPS 細胞 (SDS-iPS 細胞) から血液・血管内皮細胞を分化誘導し、その造血障害の発症機序解明を試みた。</p> <p>【対象と方法】3 例の SDS 患者及び症例 1 の両親の血液細胞から SDS-iPS 細胞株とコントロール iPS 細胞株を樹立した。SDS-iPS 細胞に <i>SBDS</i> を過剰発現したサブクローンを樹立した。マトリゲルコートした培養皿上に播種した iPS 細胞塊に BMF-4、VEGF、SCF、TPO、IL-3、G-CSF を順次添加し、出現した血液細胞の数・形態の観察と好中球機能及びコロニーアッセイを実施した。培養 6 日目に血液・血管内皮共通の前駆細胞 KDR⁺ CD34⁺細胞を単離して OP9 ストローマ細胞と共培養し、SCF、TPO、IL-3、G-CSF 存在下に血液細胞、VEGF 存在下に血管内皮細胞を分化誘導した。血液・血管内皮の各分化段階の細胞のアポトーシス頻度及び caspase-3 阻害剤や p53 阻害剤投与による KDR⁺ CD34⁺細胞のアポトーシス阻害効果をフローサイトメトリーで評価した。</p> <p>【結果】(1) 培養 20 日後より浮遊血液細胞が出現し、形態上は成熟好中球が大半を占めた。コントロール iPS 細胞と比べて、SDS-iPS 細胞由来血液細胞は各血球の比率はほぼ同様であったが、細胞数、好中球走化能、コロニー形成能は有意に低下した。SDS-iPS 細胞の血液分化異常は <i>SBDS</i> の強制発現により改善された。(2) KDR⁺ CD34⁺細胞から血液細胞を分化誘導した場合も (1) と同様に SDS-iPS 細胞の血液分化異常と <i>SBDS</i> 強制発現による改善を認めた。(3) KDR⁺ CD34⁺細胞から血管内皮細胞へ分化誘導すると、コントロール iPS 細胞と比べて、SDS-iPS 細胞由来血管内皮クラスター数は有意に少なく、クラスターサイズも有意に小さかった。SDS-iPS 細胞の血管内分化異常は <i>SBDS</i> の強制発現により改善された。(4) 各分化段階の細胞のうち KDR⁺ CD34⁺細胞のみコントロールと比べて SDS-iPS 細胞で有意にアポトーシスが亢進していた。<i>SBDS</i> 強制発現や caspase-3 阻害剤投与により SDS-iPS 細胞由来 KDR⁺ CD34⁺細胞のアポトーシス頻度は減少したが、p53 阻害剤は同様の効果を認めなかった。</p> <p>【結語】本研究では SDS における造血障害は造血発生初期に発生する血液・血管内皮前駆細胞の段階で既に生じている可能性が高いことを明らかにした。SDS 患者では血管異常を合併しないが、血管発生に関連した他の転写因子が機能的に補填している可能性や、SDS 患者は微量であるが <i>SBDS</i> タンパクを産生しているため臨床症状としては顕在化しない可能性などが関与していると考えられた。<i>SBDS</i> 欠損細胞のアポトーシスは p53 依存性経路を介することが報告されているが、今回の検討では KDR⁺ CD34⁺細胞のアポトーシスには p53 非依存性経路も関与していることが示唆された。本培養システムは先天性骨髄不全症の発症機序の解明や治療薬開発に有用であると考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

シュバツハマン・ダイヤモンド症候群は造血障害、膵外分泌不全、骨格異常などを特徴とする先天性骨髄不全症である。患者の約90%で*SBDS*遺伝子の複合ヘテロ接合体変異が検出されるが、*SBDS* KOマウスでは着床前に胎生致死となるため、発生初期における造血障害との関連については検討されていない。本研究では、所属教室で開発した培養システムを用いてシュバツハマン・ダイヤモンド症候群由来患者iPS細胞から血液・血管内皮細胞を分化誘導し、その造血障害の発症機序の解明を試みた。

コントロールiPS細胞と比べて、患者由来iPS細胞からの血液細胞の産生、好中球遊走能、コロニー形成能は有意に低下した。また、血液・血管内皮細胞の共通の前駆細胞KDR⁺CD34⁺細胞分画ではアポトーシスが有意に亢進し、その分画から出現する血液・血管内皮細胞も減少していた。*SBDS*の強制発現により、これらの血液・血管内皮細胞の分化障害、血液細胞の機能低下は改善した。また、*SBDS*の強制発現やcaspase 3阻害剤投与によりKDR⁺CD34⁺細胞分画のアポトーシスの頻度は減少した。これらの結果より本症候群では造血発生初期に出現する前駆細胞の段階で造血障害が既に生じている可能性が高いことが明らかとなった。

本研究で得られた知見は、本症候群の発症機序の解明や新規治療法の開発に寄与する所が大きいと考えられた。

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、令和 5 年 3 月 7 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。