

京都大学	博士 (医学)	氏名	王 茂治
論文題目	iPS cells from Chediak-Higashi syndrome patients recapitulate the giant granules in myeloid cells. (患者由来 iPS 細胞を用いたチェディアック・東症候群のミエロイド細胞における病態再現)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>チェディアック・東症候群 (Chediak-Higashi syndrome: CHS) は <i>LYST</i> (<i>lysosomal trafficking regulator</i>) 遺伝子の常染色体潜性遺伝 (劣性遺伝) により生じるとされる原発性免疫不全症である。LYST はリソソームの融合・出芽に関わっており、CHS 患者由来細胞では白血球、メラノサイト、神経細胞に巨大顆粒が観察される。CHS 患者では易感染性、易出血性、血球貪食症候群、眼皮瘡型白皮症、神経症状がみられる。造血幹細胞移植が易感染性や血球貪食症候群に対して行われるが、生存率は低く、皮膚症状や神経症状には無効であり、更なる治療法が必要とされている。</p> <p>CHS 患者由来 iPS 細胞の樹立と、メラノサイト分化後の巨大顆粒確認は報告されているが、血球系では報告がない。よって今回 <i>LYST</i> 遺伝子のヘテロで異なるフレームシフト変異を持つ 2 名の CHS 患者(CIRA00150, CIRA00153)から 2 クローンずつ iPS 細胞を樹立し、ミエロイド細胞への分化を試みた。</p> <p>各 iPS 細胞は正常核型を有し、樹立時に使用したエピソーマルベクターはほとんど残存しておらず、免疫不全マウスに移植を行い 3 胚葉に分化することを確認した。</p> <p>次に既報(Niwa A, PLoS One.2011.Yanagimachi MD, PLoS One.2013.)に基づき、より好中球分化を促進するために、GM-CSF や M-CSF の代わりに G-CSF を用いた方法で分化を行った。分化開始後 6 日目(Day6)で KDR⁺CD34⁺細胞(hemoangiogenic progenitors)の、Day10 で CD43⁺細胞(hematopoietic progenitors)、Day15・20・25 では CD33⁺CD45⁺細胞(ミエロイド細胞)が出現していた。また Day20 でミエロイド細胞関連遺伝子(<i>SPI1</i>, <i>MPO</i>, <i>CEBPA</i>)の発現を RT-qPCR にて確認した。<i>LYST</i> 遺伝子の発現量は対照と CHS との間で大きな差はなかった。正常アレルによる代償的な発現増加が推察された。さらに Day15・20・25 に回収した細胞に対し、メイグリュンワルド・ギムザ染色とミエロペルオキシダーゼ染色を行って、形態学的にミエロイド細胞への分化を確認した。</p> <p>最後にミエロペルオキシダーゼ陽性顆粒の各細胞における最大の顆粒の大きさを比較したところ、CIRA00150, CIRA00153, 正常対照由来ミエロイド細胞の順で有意に顆粒が大きかった。<i>LYST</i> 遺伝子の発現量は同程度であり、クローン間の差はないことから、LYST 機能や顆粒の大きさに影響を及ぼす別アレルにある未発見の <i>LYST</i> 遺伝子変異や新規疾患修飾遺伝子が関与している可能性が示唆された。</p> <p>本研究により、CHS 患者由来 iPS 細胞の樹立とミエロイド細胞における表現型を確認することができた。今後 T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、メラノサイト、神経系細胞への分化系やゲノム編集技術を利用し病態解明や治療薬開発が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

チェディアック・東症候群 (Chediak-Higashi syndrome: CHS) は *LYST* (*lysosomal trafficking regulator*) 遺伝子の常染色体潜性遺伝により生じるとされる極めて稀な原発性免疫不全症で、日本における患者数は 15 名と報告されている。*LYST* 変異が同定できない症例も報告されており、*LYST* 遺伝子の変異が CHS の表現型とどのように関連するか解明が待たれている。LYST はリソソームの輸送・融合・出芽に関わっており、CHS 患者由来細胞では白血球、メラノサイト、神経細胞等に巨大顆粒が観察される。CHS は約 85% の患者で血球貪食症候群を発症し、それに対して造血幹細胞移植が行われている。本研究では CHS の白血球、特に骨髓球系細胞病変の in vitro 病態モデル系を構築するため、異なる *LYST* 遺伝子のヘテロ変異を有する臨床的に CHS と診断された 2 名の患者から iPS 細胞を各々 2 クローン樹立し、骨髓球系細胞へ分化させた。

骨髓球関連遺伝子 (*SPI1*, *MPO*, *CEBPA*)、*LAMP1*, *LYST* 遺伝子の mRNA 発現量は対照 iPS 細胞由来骨髓球系細胞と CHS 患者 iPS 細胞由来骨髓球系細胞との間で有意差を認めなかった。蛍光位相差顕微鏡下で骨髓球系細胞におけるミエロペルオキシダーゼ顆粒の最大径を比較したところ、CHS 患者 iPS 細胞由来骨髓球系細胞で対照群と比較して有意に大きかった。また、2 名の CHS 患者間にも顆粒の大きさに有意差が認められた。このように、CHS 患者由来 iPS 細胞では CHS でみられる骨髓球系細胞の特徴的な表現型である巨大顆粒の産生を再現できることが確認された。

以上の研究は CHS の骨髓球系細胞における病態の解明に貢献し、*LYST* の CHS における機能の解析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、令和 5 年 4 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、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