［課程-2］

# 審査の結果の要旨

氏名　山崎　翔

本研究は、予後不良な造血器腫瘍である慢性骨髄単球性白血病（chronic myelomonocytic leukemia: CMMoL）を対象とし、CMMoL 腫瘍細胞由来人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS 細胞）（CMMoL-iPS 細胞）と再分化させた造血幹・前駆細胞（HPC）の性質を解析したものである。また、網羅的遺伝子解析を利用して、CMMoL の病態に関わる遺伝子を明らかにすることを目指しており、下記の結果を得ている。

1. CMMoL-iPS 細胞を C3H10T1/2 細胞と共培養することで、sac 様構造物の中に分化した CD34 陽性 CD43 陽性 HPC の存在を確認した。CMMoL-HPC は、健常ヒト骨髄から樹立した iPS 細胞（Normal-iPS 細胞）由来 HPC と比較して得られた細胞数が有意に多かった。
2. CMMoL-HPC から半固形培地での分化を通して得られた血球は、Normal-HPC 由来分化血球と比較して CD34 陽性造血前駆細胞や CD14 陽性単球系細胞の割合が増えていた。また、CMMoL-HPC 由来分化血球のみで、元の検体において見られた異常抗原である CD56 陽性細胞の存在が確認できた。
3. 半固形培地での replating assay では、Normal-HPC が 2 継代でコロニーが形成できなくなるのに対して、CMMoL-HPC は 4 継代以上持続し不死化することが確認された。さらに、CMMoL-HPC はサイトカインなしの環境下でもやや大きめのコロニーを形成できた。
4. CMMoL 患者と健常者の元の検体、CMMoL-HPC と Normal-HPC に関して、遺伝子発現とメチル化プロファイルのそれぞれの相関解析を行ったところ、元の検体のプロファイルの差が iPS 細胞の樹立というリプログラミングと造血幹・前駆細胞への再分化の過程を経ることによって縮まっていた。そして、CMMoL-HPC において Normal-HPC よりも 2 倍以上発現が高く、プロモーター領域が低メチル化状態となっている遺伝子 *X*、*Y*、*Z* を抽出した。

5. 他の CMMoL の患者検体の CD34 陽性細胞について発現量を調べたところ、遺伝子 *X*、*Y* の 2 遺伝子が健常ヒト骨髄検体と比べて上昇していた。
6. 白血病細胞株である OCI-AML3 について候補となった 3 つの遺伝子をノックダウンし細胞増殖を比較したところ、遺伝子 *Y* のノックダウンにおいてのみ細胞増殖が有意に低下した。
7. CMMoL-iPS 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子 *Y* をノックアウトした。ホモで 1 塩基が欠失したクローン、ホモで 3 塩基が欠失したクローン（ただし、フレームシフトが起こらなかったため 1 アミノ酸欠失）、ヘテロで 14 塩基が欠失したクローンを得ることができ、それぞれについて血球へ分化させたところ、1 アミノ酸欠失のクローンでは得られた造血幹・前駆細胞の数に変化がなかったが、ヘテロ欠失ではやや減少し、ホモ欠失ではほぼ消失していた。

以上、本論文は、CMMoL-iPS 細胞と再分化させた HPC が病態解明のための疾患モデルとなりうることを見出した。また、様々な遺伝子背景を持つ CMMoL 腫瘍細胞において、健常者の造血幹・前駆細胞と比較して遺伝子 *Y* の発現量が上昇しているという共通の特徴を発見し、治療法探索に重要な貢献をなすと考えられる。よって学位の授与に値するものと判定した。