

審査の結果の要旨

氏名 徳重淳二

本研究は、低リスク骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndromes: MDS)における顆粒球減少の病態解明を目的とした研究である。MDS モデル細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* の解析を通じて、下記の結果を得ている。

1. 正常造血細胞に *Nup98-Hoxd13 (NHD13)* 融合遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、不死化させた低リスク MDS のモデル細胞(NHD 細胞)と正常造血前駆細胞(KSL 細胞)の共培養を行ったところ、正常造血前駆細胞同士で共培養を行ったコントロール群と比較し NHD 細胞と共培養した正常 KSL 細胞では表面抗原において Gr-1 陽性 CD11b 陽性の成熟顆粒球への分化が抑制されることを示した。
2. *NHD13* トランスジェニックマウスの造血細胞と正常造血細胞を致死量の放射線照射後の正常マウスに競合移植してキメラマウスを作成し、生着後のキメリズムおよび正常造血細胞の顆粒球分化を比較した。*NHD13* トランスジェニックマウスとのキメラマウスでは NHD 細胞のキメリズムは低値であった一方、末梢血において *in vitro* の共培養実験と同様に Gr-1 陽性 CD11 b 陽性の成熟顆粒球数の低下を認めた。骨髄では造血幹細胞から顆粒球系前駆細胞までの未分化な段階では正常造血細胞同士を移植したコントロールと比較し高い割合を示したが、成熟顆粒球への分化が抑制されていた。以上から、NHD 細胞との共存により正常細胞の GMP 分画から成熟顆粒球への分化が抑制されることを示した。
3. 骨髄中での NHD 細胞との共存により正常 GMP 分画において成熟顆粒球のマーカーである *Myeloperoxidase (MPO)* 発現が低下していることを明らかにした。また発現変動遺伝子の抽出のため、網羅的遺伝子発現解析を行った。NHD 細胞と競合移植後の正常 GMP 分画ではまた NHD 細胞との競合移植後に発現が上昇した遺伝子のエンリッチメント解析では VEGF および TNF シグナルパスウェイが抽出された。発現低下遺伝子からは Zinc finger 型転写因子および転写関連遺伝子が抽出された。
4. VEGF および TNF の成熟顆粒球への分化抑制効果を検証するため、各リコンビナント

サイトカインを培地に添加して正常 KSL 細胞を培養し、顆粒球分化を比較したところ Gr-1 陽性 CD11b 陽性細胞の割合に有意差は認めず、これらのサイトカインが積極的に分化抑制に関与していることは示唆されなかった。

5. NHD 細胞による正常造血細胞の顆粒球分化抑制に何らかの液性因子が関与しているか検証するため、トランスウェルを用いて NHD 細胞との直接接触を防いだ状態で共培養を行ったところ、NHD 細胞による正常造血細胞の顆粒球分化抑制は観察されなかった。また NHD 細胞と正常造血細胞の共培養後の培養上清を回収し、培地に添加して正常細胞を培養した際の顆粒球分化にも添加しない群との間に有意差は見られなかった。これらの結果より、NHD 細胞は細胞間の直接接触により正常造血細胞の顆粒球分化を抑制する作用を持つことが示唆された。
6. 次に、公開されている網羅的遺伝子発現解析データから分化抑制に関与する原因遺伝子の抽出を行った。*NHD13* トランスジェニックマウスで発現が上昇していること、細胞膜状に発現していること、MDS 患者の顆粒球系前駆細胞で発現が上昇していることを全て満たす 5 種類の遺伝子を抽出し、shRNA を用いて NHD 細胞から発現抑制することで、共培養時の正常造血細胞の分化抑制が緩和されるか検討したところ、今回の解析では正常造血細胞の分化抑制への関与は観察されず、更なる候補遺伝子の解析が必要と考えられた。

以上、本論文は MDS における正常細胞側の発現変動遺伝子や分化抑制機構を解析した初めての報告であり、MDS 細胞が直接接触により正常造血細胞の顆粒球分化を抑制する機構を持つ可能性を示した。MDS における造血分化抑制の機序を明らかにすることは新たな治療戦略を考える上で非常に重要であり、更に前白血病状態でもある MDS における正常造血幹細胞の解析は、造血器腫瘍全般の病態解明に寄与することが期待され、学位の授与に値すると考えられる。