

審査の結果の要旨

氏名 夏本 文輝

本研究は、多因子疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者由来人工多能性幹細胞(iPS 細胞) を用いた病態解明、創薬標的の同定を目的とした研究である。SLE 患者末梢血から iPS 細胞を樹立し、病原細胞への分化誘導、SLE risk 遺伝子のシームレスなゲノム編集、編集後細胞の解析を通して、下記の結果を得ている。

1. 家族歴のある SLE 患者 5 人より iPS 細胞を樹立し、未分化性やウイルスベクターの消失など樹立後評価を行った。iPS 細胞の樹立過程及び維持培養期において、SLE 患者由来 iPS 細胞 (SLE-iPS) と健常者由来 iPS 細胞 (H-iPS) に効率、特性及び増殖能などにおいて差を認めなかった。
2. 単球、マクロファージ、myeloid 系樹状細胞への分化誘導を既報より再現し、表面マーカーや遺伝子発現、機能をある程度評価している。新規に plasmacytoid dendritic cell (pDC) 様細胞への分化誘導法を確立し、特徴的な遺伝子発現やサイトカイン分泌能を示した。
3. SLE-iPS 2 例及び H-iPS 1 例を CD14+DC に分化誘導し、その遺伝子発現を RNA sequencing により比較したところ、刺激後 SLE-iPS 由来 CD14+DC の炎症関連遺伝子発現亢進が見られた。原因遺伝子検索において、interleukin-1 receptor-associated kinase-2 (IRAK2) 遺伝子にある variant を SLE-iPS が 2 例揃って保有していることが判明し、炎症関連遺伝子発現亢進の一部に寄与している可能性が想定された。
さらに健常人には rare であり、SLE -iPS 2 例が揃って保有している variants の検索を行ったところ、19 遺伝子上に 34 個の variants を同定した。pathway 解析の結果、これらの variants による主要 signaling pathway はミトコンドリア機能異常と酸化的リン酸化に関与するものであることが判明した。
4. I 型 IFN 反応の明らかな亢進に関連する IFIH1 variant (c.2336G>A, p.R779H) を clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9) システムを用いて SLE-iPS にシームレスに導入した。ゲノム編集において工夫を行い、編集成功率を 70%程度まで上げることに成功した。
5. 健常 (H-G/G) 株、未編集 SLE (SLE-/G/G)株及び編集後 (SLE-G/A、SLE-A/A) 株を pDC 様細胞に分化誘導し比較した結果、編集後 SLE-G/A, A/A 株由来 pDC 様細胞の variant dose dependent な IFN- α 産生上昇及び細胞数減少を認めた。細胞死の原因を精査したところ、編集後細胞の variant dose dependent なアポトーシスの亢進、ミトコンド

リアにおける酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) の亢進及び活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の上昇を認めた。編集後細胞の細胞数減少は IFN- α/β 受容体抗体の添加により部分的に改善した。未編集 SLE-G/G 株由来 pDC 様細胞への IFN- α 添加により、pDC 様細胞のアポトーシスが有意に亢進し、また OCR も有意に上昇した。

以上、本論文は多因子疾患である SLE 患者由来 iPS 細胞の疾患研究における有用性について、H-iPS との比較及び CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いることによってアプローチしえた初めての研究であり、自己免疫疾患における疾患特異的 iPS 細胞の疾患研究への有用性が示された。IFIH1 variant の SLE-iPS 細胞への導入により、従来手法では研究が困難であった pDC におけるミトコンドリア代謝の変化、細胞死の亢進が明らかとなり、SLE 病態の一部を明らかにするとともに、pDC 代謝を標的とした SLE 新規治療戦略の可能性が示唆され、学位の授与に値すると考えられる。