

本研究は、常染色体優性遺伝形式をとる希少疾患である家族性血小板異常症(FPD/AML)の病態を解明するため、同疾患の患者の皮膚線維芽細胞から作製した人工多能性幹細胞(iPSC)を用いて FPD/AML の病態の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *RUNX1* の片アレルに R174X のナンセンス変異を有する FPD/AML 患者の皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスにより *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* の 4 因子を導入し、FPD-iPSC を樹立した。形態や幹細胞遺伝子の発現、未分化マーカーの表面抗原(SSEA4, TRA1-60)の発現、NOD/scid マウスでの奇形腫形成能を確認し、さらに *RUNX1* の R174X のヘテロ変異を有していることを確認した。以上から、FPD/AML 患者から、未分化性と多分化能を有する iPSC を作製することに成功したことが示された。
2. FPD-iPSC を血球に分化誘導し、CD34 陽性 CD43 陽性の造血前駆細胞(HPC)を分離した。FPD-iPSC からは、正常コントロール iPSC とほぼ同等に HPC を分化させることができた。FPD-iPSC 由来の HPC では、正常 iPSC 由来の HPC と比較して、赤芽球系および顆粒球単球系のコロニー数には有意な差を認めなかったものの、巨核球コロニーは有意に少なかった。また、HPC を巨核球に分化誘導させ、その表面マーカーの発現を解析したところ、正常 iPSC 由来と比較して、FPD-iPSC 由来では CD41a 陽性の巨核球の分化効率の有意な減少を認めた。さらに CD41a 陽性の巨核球において、成熟巨核球のマーカーである CD42b の平均蛍光強度の有意な低下を認めた。以上のことから、FPD-iPSC では巨核球の分化および成熟が障害されていると考えられ、FPD/AML の疾患の特徴を反映しているものと考えられた。
3. *RUNX1* の遺伝子変異を修復するため、*RUNX1* の変異部位を切断する transcription activator-like effector nuclease (TALEN)と、正常 *RUNX1* 配列を含むドナー配列を作製した。まず、これらを細胞株に導入し、*RUNX1* の変異を修復するよう機能することを確認した。次に TALEN とドナー配列を FPD-iPSC に導入し、*RUNX1* の変異が修復された FPD-iPSC の作製に成功した。遺伝子修復された FPD-iPSC 由来の HPC では、巨核球コロニー数の回復を認めた。また CD41a 陽性の巨核球の分化効率の改善を認め、さらに CD41a 陽性の巨核球における CD42b の平均蛍光強度の回復を認め、遺伝子修復による生理的なレベルの正常 *RUNX1* の発現によって、FPD-iPSC の巨核球の分化および成熟の障害が改善されたものと考えられた。

以上、本論文は希少疾患である FPD/AML 患者より iPSC を作製し、血球へ分化させることにより、FPD/AML の疾患モデルとして病態の解析を行い、さらに遺伝子治療の可能性を示した。FPD/AML の病態の解明や治療法の開発に貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。