

## 【課程一2】

### 審査の結果の要旨

氏名 チャンダ ビディシャ  
Chanda Bidisha

本研究は、新たに構築したレンチウイルスベクター・システムを用いて樹立した外来初期化因子フリーの iPS 細胞と骨髄造血幹細胞をそれぞれ T 細胞に分化誘導する過程で、BCR-ABL がん遺伝子を発現させたときに分化が阻害されるかどうか、される場合にどの分化段階で起こるかの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 3つの初期化因子(Oct4, Klf4, Sox2)を豚テシオウイルス由来 2A ペプチドでつないだポリシストロンをドキシサイクリン(Dox)応答性のプロモーター/エンハンサーの下流に挿入した自己不活化型レンチウイルス発現ベクターを構築した。なお、予め一部配列を欠損させた 3'LTR 内に Cre リコンビナーゼが認識する loxP 配列を挿入した。
2. 上記ベクターと rtTA 発現レンチウイルスベクターをマウス胎仔線維芽細胞(MEF)に同時感染させて iPS 細胞株 iPS-C6 を樹立した。さらに、この細胞株に Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスベクターを感染させ、iPS 細胞ゲノムに挿入されたプロウイルスのうち loxP に挟まれたポリシストロンを含む外来配列の大部分を除去することに成功した。ゲノムにはエンハンサー機能を喪失した 3'LTR のみが残った。
3. 上記 iPS-C6 細胞に 4-HT 応答性にキナーゼ活性が誘導される p190Bcr-Abl 誘導體(p190ΔccER)を導入した。この iPS 細胞を OP9 細胞との共培養で血球系へ分化誘導後、Flt3L と IL7 を含む培地中で OP9-DL1 細胞と共培養することにより CD3 陽性 T 細胞へ分化誘導させた。この過程で 4-HT 添加により Bcr-Abl を活性化させると、添加群では非添加群と比較して CD3 陽性細胞の出現が約 1/3 に低下した。
4. C57BL/6 マウス骨髄より幹細胞を含む c-Kit 陽性 Sca1 陽性 Lineage マーカー陰性(KSL)細胞を純化して、Dox 誘導性野生型 p190 を導入した。OP9-DL1 との共培養による T 細胞分化誘導系において Dox 添加により p190 を誘導すると、添加群では非添加群と比較して CD3/TCR β 陽性 T 細胞の出現が 1/10 に低下した。
5. 同じく KSL 細胞に p190ΔccER を導入し、OP9-DL1 との共培養による T 細胞分化誘導系において 4-HT 添加により p190 を活性化すると、添加群では非添加群と比較して CD3/TCR β 陽性 T 細胞の出現が 1/3 に低下した。さらに、表面抗原の発現で識別可能な T 細胞分化段階を解析すると、非添加群は 90%以上が CD25 陽性 CD44 陽性の DN2 まで分化していたが、添加群では約半分が CD25 陰性の DN1 にとどまっていた。
6. p190ΔccER 導入時の標識マーカーである GFP の発現レベルは Bcr-Abl の発現と逆相関しており、GFP 高 (Bcr-Abl 低) 発現細胞は DN2 へ分化する一方、GFP 低 (Bcr-Abl 高)

発現細胞は DN1 にとどまることから、Bcr-Abl は DN1 から DN2 への分化を阻害すると考えられた。

以上、本論文はマウス iPS 細胞および骨髄造血幹細胞を用いて、Ph 陽性白血病の病因遺伝子産物である Bcr-Abl が T 細胞への分化を阻害している証拠を提供した。幹細胞レベルで発症する Ph 陽性白血病がなぜ T 細胞系譜は回避するのか数十年にわたって合理的な説明がされていないが、本研究はこの疑問を解決し、Ph 陽性白血病の病態解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。