【230】

氏　名（本籍）	藤木　豊（茨城県）（ふじき　ゆたか）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 2670 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	異種動物を用いたヒト造血系評価モデルの開発
主　査	筑波大学教授　医学博士　長澤俊郎
副　査	筑波大学教授　医学博士　中井利昭
副　査	筑波大学講師　医学博士　小島　寛
副　査	筑波大学講師　博士（獣医学）　杉山文博

論文の内容の要旨

（目的）

造血幹細胞（HSCs）は骨髄移植の本質を担う細胞であり，遺伝子治療の標的としても理想的な細胞であることから，その同定および機能解析は臨床的にも非常に重要である。近年，マウスHSCsは同定されたものの，ヒトのHSCsについては表面抗原すら明らかにされていない。これはマウスのような長期骨髄再建能を評価するin vivoのアッセイ系が存在しないことによると考えられる。

本研究では免疫不全マウスを用いてヒト造血系をアッセイすること，およびTリンパ球をアッセイ可能なシステムを開発すること，免疫系の発達途上にあるブタ胎仔を標的として，異種大動物を用いヒト造血系をin vivoで長期再構築できる実験系を開発することを目的とした。

（対象と方法）

実験動物にはNOD/SCIDマウスとブタを用いた。移植ヒト組織はヒト肋骨とこれより分離した骨髄細胞（BM），およびヒト臍帯血細胞（CB）を用いた。

NOD/SCIDマウスへの移植は，(1) BMとCBの有核血球（MNCs）およびCD34陽性（CD34＋）細胞，(2) CBのCD34＋細胞と，c-Kit発現の有無で区別した分化抗原陰性（Lin-）CD34陰性（CD34－）細胞，(3) ヒト肋骨の腹部皮下への移植をそれぞれおこなった。(4) ブタへの移植は，さまざまに画分したCB細胞を，超音波ガイド下にブタ胎仔腹腔内へ注入することでおこなった。レシピエントより末梢血，造血組織を採取し，FACSをもちいて生着ヒト血球のキメリズムと表面抗原を解析した。ヒトT細胞が生着したマウスではその表面抗原をFACSで，組織分布を病理学的検索で，多様性についてはRT-PCRで検討した。さらにHIVウイルスを接種し，感染の有無をELISA法により検討した。ブタにおいてはヒト細胞の存在をFACSとgenomePCRで確認するとともに，生着が確認できた場合はその表面抗原の検討と骨髄中に存在するヒトCD34＋細胞の造血能を解析した。

（結果）

1）BM，CB MNCsのNOD/SCIDマウスへの移植の結果，キメリズム，生着効率ともにCBが高かった。CD34＋細胞についても同様に，CBはBMよりも有意に増殖能が高かったものの，MNCsを移植した場合と比較して，キ

メリズムは1/100に低下した。多分化能の検討では，CB MNCsからはすべての血球系の構築を観察したのに対し，BMではT細胞への分化は認めなかった。

2）CBのCD34＋細胞と，Lin-CD34－細胞について比較すると，CD34＋細胞ではSCIDマウスへの移植が成立するのに対し，CD34－細胞ではc-Kitの発現によらず移植は成立しなかった。

3）ヒト肋骨をNOD/SCIDマウスへ移植すると，ヒト成熟T細胞が数カ月以上にわたり高いキメリズムで維持された。病理学的にGVHの所見は認めず，T細胞のクローナルな増殖ではないことをTCRのV_鎖レパトアから確認した。末梢血に存在するT細胞はCD4もしくはCD8のシングルポジティブであったが，肝臓にはダブルポジティブT細胞も存在した。マウスにHIVを接種すると，CD4陽性細胞の減少とともに血清中にp24gag抗原が同定された。

4）子宮内ブタ胎仔にCBの移植を行った。妊娠52日以前に移植を受けた14匹において最長で315日にわたり末梢血，骨髄にヒト細胞が同定された。ブタにおけるヒト血液細胞の頻度はいずれも1％未満であったものの，T細胞，B細胞，骨髄球系細胞のいずれも確認できた。ブタBM中にはヒトCD34＋細胞も存在し，この細胞を回収し機能アッセイをおこなったところ，造血活性を維持していることを確認した。

（考察）

NOD/SCIDマウスを用いた解析により，CBはBMよりも有意に増殖能が高いことを明らかにした。HSCsから成熟血球への分化には様々なサイトカインの関与が必要であるが，異種の環境であってもこの分化が誘導されることが明らかとなった。CB CD34－画分の移植では移植成立を認めないにもかかわらず，CD34＋細胞の移植はMNCsの移植に比して効率が悪かった。このことからCD34-画分に移植効率を上昇させる細胞が含まれている可能性と，CD34－のSCID-repopulating cells（SRC）に分化抗原が発現している可能性が示唆された。

ヒト骨組織をNOD/SCIDマウスに移植すると，ヒトT細胞が生着した。マウス肝臓にはCD4/CD8ダブルポジティブT細胞も存在することから，ヒトHSCsからT細胞への分化をin vivoでアッセイできるシステムとなる可能性を示した。またHIVの接種によりウイルス血症となり，CD4＋T細胞の減少が生じたことから，HIV感染症の動物モデルとしての利用が期待できる。胎仔期のブタにヒトCB細胞を移植することで，ヒト血液キメラブタが作成できた。このシステムは大動物におけるヒト造血系のアッセイを可能とするばかりでなく，キメラ動物をレシピエントとしたヒト臓器再生など，さまざまな応用が考えられる。

審査の結果の要旨

本論文は異種動物（NOD/SCIDマウス，ブタ胎仔）にヒト造血幹細胞を移植し，ヒト造血系をin vivoで解析する実験系を開発することを目的とした研究である。現在の所，実験に供された実験動物の頭数が少なく，また観察期間も最長315日であり，結論を得るには至っていないが，ヒト造血幹細胞を異種動物内で長期観察できるシステムは現在の所確立されておらず，本研究はヒト造血幹細胞の研究に重要な指針を示す研究と評価した。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。