

氏 名 (国 籍)	きむ 金	とん 東	く 具 (韓 国)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 2,172 号		
学位授与年月日	平成11年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学 位 論 文 題 目	Engraftment of human myelodysplastic syndrome derived cell line in transgenic severe combined immunodeficient(TG-SCID)mice expressing human GM-CSF and IL-3. (ヒトGM-CSFとIL-3を発現するトランスジェニックSCIDマウス(TG-SCID)でのヒトMDS由来細胞株の生着)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	林 英 生
副 査	筑波大学教授	医学博士	渡 邊 照 男
副 査	筑波大学教授	医学博士	大 川 治 夫
副 査	筑波大学助教授	医学博士	長 澤 俊 郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

ヒト造血細胞を増殖させる系を確立するために、マウス内でヒト由来細胞の安定増殖系を作製することを目的とした。そのために、ヒトの血球増殖因子を定常的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、その中でヒト由来の血液細胞が安定して生着し増殖するか否かについて実験系を確立することを本研究の目的とした。

(材料および方法)

ヒトサイトカイン、GM-CSFおよびIL-3を発現するトランスジェニックマウスは、マウス組織で発現することが期待されるchickin- β actinのプロモーターをもつプラスミドpCS-hIL-3およびpCS-hGM-CSFを卵に挿入し作製した。マウス個体としてはGM-CSFおよびIL-3の転写発現が確認されたマウスを、重症複合型免疫不全マウス(SCID)と交配し、ヒトGM-CSFおよびIL-3を発現するSCIDマウス(TG-SCID)を作製した。GM-CSFおよびIL-3の発現はそれぞれに特異的なプライマーを用いたPCR法により確認し、TG-SCIDにおける発現はGM-CSFおよびIL-3のELISA測定法により定量した。

マウスへのヒト細胞移植実験には、ヒト骨髓異形成症候群(MDS)由来の培養細胞(F-36P)を用いた。この細胞株をGM-CSFおよびIL-3を添加した培養液で増殖し、PBSで洗浄後、マウス当たり 10^7 個細胞を尾静脈より注入した。レシピエントのマウスには6-8週齢のものをを用い、あらかじめ2.5Gyの放射線を照射し、マウスIL-2受容体(TM-b1)に対するモノクローン抗体を1mg/匹、腹腔内投与し、その1時間後に細胞を注入した。4-6週後に移植マウスの骨髓、脾臓、肝臓、末梢血から遊離細胞を採取し、ヒト骨髓細胞の表面マーカーであるCD45およびCD13で染色し、FACSにて解析した。移植ヒト骨髓細胞のマウス組織への浸潤およびその病理像についてはマウス骨髓および脊髄の組織染色により解析した。

(結果)

作製したTG-SCIDマウスにおけるGM-CSFおよびIL-3の発現をPCR法にて確認し、さらにELISA法にて確認した。TG-SCIDの血清中にはGM-CSFは約32ng/ml(対照としたヒト血清中およびC57BL/6マウス血清では検出限界以下の濃度)およびIL-335ng/ml(ヒト血清中およびC57BL/6マウス血清では検出限界以下の濃度1)と高濃度のサイトカインが発現していた。この個体の造血機能はコントロールマウスに比較して、血液像などに異なる所見は見られず、またT,B細胞の分布もSCIDマウスと同じであった。作製したTG-SCIDマウスは安定してGM-CSF

及びIL-3を産生する免疫不全を背景に持つトランスジェニックマウスであることが確かめられた。

ヒトGM-CSFおよびIL-3依存性の培養細胞系、F-36P細胞をこのTG-SCIDマウスに移植しその増殖を観察した。TG-SCIDマウスはNK細胞が活性を維持しているため無処置のTG-SCIDマウスにF-36P細胞を移植しても生着し難かったが、あらかじめNK細胞のIL-2受容体の特異抗体で不活性化した場合には、ヒト由来細胞が骨髓細胞の約70%，脾臓から採取した細胞の0.3%，肝臓細胞の5%および末梢血の5%を占めていた。移植後6週間後には後肢の麻痺，萎縮が起こり，組織像では骨髓にF-36P細胞の過剰増殖が観察された。

（考察）

ヒトGM-CSFおよびIL-3を定常的に産生するSCIDを背景に持つトランスジェニックマウスTG-SCIDの作製に成功した。このマウスの自己の造血系は正常に保たれており，今後ヒト血球細胞の分化に関する研究解析や移植実験のモデル動物として利用できるものである。この系を用いてヒト血球細胞を移植したところ，NK細胞が活性を保っている個体では移植血球細胞が定着しないことから，NK細胞が移植細胞の排除に関与していることが明らかになった。移植したF-36P細胞が骨髓に定着することは，GM-CSFおよびIL-3の発現をアクチンプロモターによって過剰発現していることが関係するかもしれないが，これまで報告されているSCIDマウスへの白血病由来細胞移植例では全身組織への播種例が多いので，この系を用いて細胞の組織定着因子の解析なども可能となるであろう。今後はこのTG-SCIDマウス系を用いて，ヒト造血幹細胞の増殖機構の解明が可能となり，本研究の所期の目的は達成した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

安全な骨髓移植法の開発には，ヒトの造血機構を解明することが必須である。本研究では免疫不全を背景に持つSCIDマウスに，自己の造血系は正常に保ちながら，ヒトのサイトカインを発現するトランスジェニックマウス（TG-SCIDマウス）の作製に成功した。この系を用いて，マウスNK細胞のIL-2受容体の特異抗体で不活化した後，ヒト造血細胞を移植すると，ヒト由来細胞がマウス骨髓などに生着することを発見している。これによりマウスが異種細胞を排除するにはNK細胞のIL-2受容体に関与していることをも証明している。これらのことは，今後，ヒトの造血機構のin vivo研究に利用できる新しい実験動物モデルを提供したとともに，骨髓移植法についても重要な知見を提示したことになる。この業績は国際的にも高い評価を受けており，質の高い有意義な研究論文である。

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。