

氏名(本籍)	し みず たける 清水 雄 (神奈川県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 3787 号		
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	導入遺伝子の発現を in vivo において長期間維持するレトロウイルスベクター GCDNsap の開発と、同ベクターを用いて遺伝子導入した造血幹細胞 CD34 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lin 陰性細胞の可塑性の検討		
主 査	筑波大学教授	医学博士	三 輪 正 直
副 査	筑波大学助教授	医学博士	須磨崎 亮
副 査	筑波大学助教授	医学博士	小 島 寛
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	依 馬 正 次

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

現在のレトロウイルスベクターを用いた技術では、その低トランスダクション効率や、導入遺伝子の in vivo における shut off や silencing といった現象のため、幹細胞を用いた効果的な遺伝子細胞治療法確立の妨げとなっている。本研究では、これらのレトロウイルスに関わる問題を解決し、有効な遺伝子細胞治療法を確立するために、マウス造血幹細胞 (CD34 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lin 陰性細胞、以後 CD34⁻KSL 細胞) を用いた骨髓移植実験において、まず外来遺伝子を長期に渡り安定して発現するレトロウイルスベクターとレトロウイルスベクター遺伝子導入法の開発を試みた。次に、この系を用いてクリニカルレトロウイルスベクター GCsap と、その改良型である GCDNsap の長期遺伝子発現能を比較した。また、遺伝子導入 CD34⁻KSL 細胞の経静脈の移植が成立したマウスの種々の組織、および、遺伝子導入 CD34⁻KSL 細胞を脳内に直接移植したときの脳組織内での関与を検討した。

(対象と方法)

実験動物は、ドナーに C57BL/6-Ly5.1 (B6-Ly5.1) マウス、レシピエントに C57BL/6-Ly5.2 (B6-Ly5.2) マウスを用い、CD34⁻KSL または CD34⁺KSL 細胞は、FACS を用いて分離した。

- (1) スプライス型レトロウイルスベクター GCsap に enhanced green fluorescent protein (EGFP) をクローニングし pGCsapEGFP (GC) を作製した。GCsap の molony murine leukemia virus 由来の primer binding site (PBS) を dl587rev 由来の PBS に置換して GCDNsap とした pGCDNsapEGFP (DN) ベクターを作製した。
- (2) 経静脈の移植では、致死量放射線 (850 cGy) 照射後に遺伝子導入 CD34⁻KSL 細胞を尾静脈より移植した。一定時間経過後、レシピエントより末梢血、骨髓、脾臓を採取し、FACS を用いてドナー細胞のキメリズム、EGFP 発現率、表面抗原を解析した。移植の成立したマウスの全骨髓細胞を用いて 2 次および 3 次移植を行った。また、臓器の組織標本を作製し、免疫染色により組織分布を検討した。

- (3) 脳内への直接移植では、マウスを麻酔下にステレオ装置に固定し、遺伝子導入 CD34⁺KSL 細胞または CD34⁺KSL 細胞、または対照としてウイルス上清を黒質線条体に移植した。一定時間経過後に移植部位の組織標本を作製し、免疫染色により注入後の EGFP 陽性細胞の分布及び形質を検討した。

(結果)

- (1) mSCF, hTPO, hFlt3-L を用いて 24 時間前刺激した後に CD34⁺KSL 細胞を 24 時間遺伝子導入を行なった。これらの細胞を半固形培地で培養した結果 70-80% が EGFP 陽性であった。

移植後 24 週の骨髄、脾臓、末梢血での EGFP 発現は、どれもが 96% 以上と高率に維持され、かつリンパ球系および骨髄球系細胞とも検出され、本系を用いた遺伝子導入後にも各種血球細胞への分化能を保持することが示された。DN では、一次移植のみならず累代移植においても導入遺伝子の発現が GC よりも高度に維持された。脳、肺、肝臓、心臓、腸管などの非造血組織で EGFP を発現した細胞が観察できた。しかし、脳室周辺の極く一部の NeuN 陽性細胞を除き、それらが特定の組織の細胞に分化したと考えられる根拠は認められなかった。

- (2) 遺伝子導入した細胞を移植した場合には、EGFP 発現細胞が認められたが、ウイルス上清のみを注入した時には EGFP 発現細胞は、認められなかった。黒質線条体へ直接移植した時には、頻度は経静脈の移植よりも増加した。EGFP 陽性かつ未熟な神経系細胞に特異的な PSA 陽性細胞は解析期間すべてにわたって観察できたが、EGFP 陽性かつ MAP2 や GFAP が陽性の細胞は増加しなかった。

(考察)

レトロウイルスベクター DNsap を用いた本系では、高度に純化したマウス HSCs である CD34⁺KSL 細胞に対し高率に遺伝子が導入でき、一次および累代移植をしたマウス血液細胞と、組織に分布した細胞において導入遺伝子の長期に渡る発現が維持できた。従来の研究では、細胞増殖が静止した CD34⁺KSL 細胞にレトロウイルスを用いた遺伝子導入は困難であったが、本研究により SCF, TPO, Flt3-L の組み合わせと 24 時間の前刺激、その後 24 時間の遺伝子導入で長期骨髄再構築能の低下を回避しつつ、高率に遺伝子導入が可能となった。

骨髄が高度に再構築されたマウスの多くの組織でドナー由来の細胞が観察できたが、それらが各組織特異的な細胞に分化はしていなかった。直接線条体に移植した場合でも、ドナー由来の細胞増殖を増加できたが、それらが神経系細胞を供給はしていないようであり、報告されているように細胞融合を示唆するものであった。しかし、造血幹細胞に可塑性はなくとも、治療遺伝子の有効なキャリアとしてこの系は応用可能であると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、マウスの造血幹細胞が高度に純化されている分画 CD34⁺KSL 細胞に対し、レトロウイルスによる遺伝子導入と導入遺伝子の発現が効率よく長期にわたり維持できることを示し、造血幹細胞を用いた遺伝子細胞治療の確立に有用な知見である。従来、種々の組織における幹細胞の存在が報告され、再生医学、臓器再生の可能性が期待されている。本研究では、一部の組織に分布した細胞で導入遺伝子の発現と組織特異抗原を示す細胞を認めた。しかし、幹細胞の分化と考えられた現象が、実は細胞融合であるとの報告もある。本研究は、この点にも慎重な考察を加え、仮に細胞融合であっても、治療遺伝子導入のための有効なベクターとして利用の可能性を示しており、価値の高い論文である。

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。