

氏名	森田 麻衣子		
学位の種類	博 士 ( 理 学 )		
学位記番号	博 甲 第 10836 号		
学位授与年月日	令和5年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査学術院	理工情報生命学術院		
学位論文題目	A Novel Method for Generating Non-myeloablative Bone Marrow Chimeric Mice (骨髄非破壊的条件下における新たな骨髄キメラマウスの作製法の開発)		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	澤村 京一
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	原田 隆平

## 論 文 の 要 旨

造血幹細胞は、骨髄において自己複製能と多分化能を兼ね備えた血液細胞の源であり、生物の生涯にわたって血液細胞を供給し続ける。白血病の治療において、造血幹細胞移植は古くより行われており、また造血幹細胞をターゲットとした遺伝子治療が実施されている。マウスにおける造血幹細胞の機能解析には、ドナーマウスの造血幹/前駆細胞を、致死量の放射線を照射したレシピエントマウスに移植することで、その骨髄キメラマウスにおける骨髄再建能を評価する方法がとられている。また、ドナーマウス由来細胞を遺伝子改変することで、幅広い造血幹細胞研究が可能となっている。造血幹細胞を生体外で培養する方法はこれまでに多数行われているが、造血幹細胞を再現性よく幹細胞性を維持したまま増殖させることが困難である問題が存在する。また骨髄移植をする際にレシピエントマウスに致死量の放射線を照射する必要があるため、放射線照射による炎症反応によって健常状態の造血が観察できない問題がある。

そこで著者は、第1章において、造血幹細胞を生体外で培養する条件の最適化を図り、再現性高く造血幹細胞を培養できる培地の開発を目的とした。従来の培養液では、ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin:BSA) が使用されていたが、そのロット差のために再現性が低いことが問題となっていた。そこで、著者はBSAの代わりに組換えヒト血清アルブミン (recombinant Human Serum Albumin:rHSA) を使用することとした。次に、rHSAを用いて、従来のSF-03培地をコントロールとし、様々な基礎培地を比較検討した。実験に使用した造血幹細胞は、マウス骨髄より分取したCD34<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lineage<sup>-</sup> (CD34-KSL)細胞である。CD34-KSL細胞を各培地で7日間培養し、放射線照射したレシピエントマウスに移植して、骨髄再建能を評価した。結果、SF-03培地よりもHam's F-12培地が最適であった。次いで、基礎培地に添加する増殖因子等を検討した。市販のSF-03培地に付随している添加物は組成が未知であるため、組成が既知であるITS-Xが代用できるか検討した。結果、ITS-Xで培養した細胞はSF-03サプリメントで培養した細胞と比較して、同等の骨髄再建能を示した。以上、Ham's F-12/rHSA/ITS-X培地は、従来のSF-03培地と比較して、造血幹細胞の生細胞率及び未分化性の維持において有意に優れた結果を示した。さらに著者は合成樹脂であるポリビニルアルコール(PVA)がrHSAを代用できることを発見し、結果として培地組成が明確で従来よりも安価な造血幹細胞培地が開発された。

第2章において、著者はレシピエントマウスに放射線照射することなく、骨髄キメラマウスを作製できるのか検討した。放射線を照射していない骨髄キメラマウスの利点は、健常なマウスにおけるドナー細胞のふるまいを解析できる点である。先行研究により、放射線照射していないレシピエントマウスを用いる場合には、数百匹分の骨髄細胞を数回に分けて移植すれば可能であることが報告されていた。しかし、それは1回の実験に多数のドナーマウスを必要とすること、そしてドナーマウスの骨髄細胞に遺

伝子改変を加えたい場合には非現実的な実験であった。そこで、著者は第1章で開発した培地を用いて、多能性を維持した造血幹細胞を効率的に増幅させることが可能か検討した。骨髄細胞を Ham's F-12/PVA/ITS-X 培地で 28 日間培養したところ、造血前駆細胞が高度に濃縮・増幅できた。その骨髄再建能を解析した結果、短期骨髄再建能には問題がなかったものの、2 次移植における骨髄再建能は低かった。そこで、骨髄細胞より c-Kit<sup>+</sup>細胞のみを磁気ビーズを用いて分離し、長期培養に供した。結果、2 次移植における長期骨髄再建能が改善された。骨髄培養細胞と c-Kit<sup>+</sup>骨髄培養細胞の長期培養による違いをアポトーシスアッセイと老化遺伝子の遺伝子発現で解析したところ、c-Kit<sup>+</sup>骨髄培養細胞は長期に培養してもアポトーシスが有意に低く、また老化遺伝子の発現も低いことが判明した。これらの細胞を移植されたレシピエントマウスは、放射線照射された場合は体毛の白色化や皮膚障害が認められるのに対し、放射線非照射のマウスは健康的な外見を呈しており、1 年以上にわたる長期間の飼育・観察が可能であった。以上の結果により、磁気ビーズを用いた培養操作のみで、骨髄に生着可能な造血幹/前駆細胞を効率的に濃縮でき、健常な骨髄キメラマウスにおける定常造血を解析可能となった。最後に、培養で純化した造血幹/前駆細胞においてレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験を行なった。遺伝子導入に使用したベクターは Doxycycline(Dox)という薬剤によって目的遺伝子を発現誘導する仕組みとなっている。目的遺伝子として EGFP を挿入したウイルスベクターを骨髄培養細胞に導入したところ、ほぼ全ての細胞が Dox 投与で EGFP 陽性となった。さらに放射線なしでの骨髄キメラマウスを作製した結果、Dox をマウスに経口投与した時のみ末梢血中に EGFP の発現が確認された。そこで著者は目的遺伝子として急性骨髄性白血病の原因遺伝子である AE9a や慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である BCR/ABL を用いて同様の実験を行い、末梢血中での目的遺伝子の発現を確認した。以上、健常な骨髄キメラマウスを用いた造血幹細胞研究に様々な遺伝子改変が可能となり、遺伝性血液疾患の病態解析も可能となった。

## 審 査 の 要 旨

本論文において著者は、造血幹細胞研究における2つの問題点、すなわち造血幹細胞を培養する実験の再現性が低いこと、また健常な骨髄キメラマウスでの解析が困難であることについて、それぞれ解決することに成功した。まず再現性の低さは培地のロット差によるものであるとし、組成が明確な合成培地を開発した。その結果、従来と比較して再現性よく効率的に幹細胞を増幅することに成功した。また前処置を行わない健常な骨髄キメラマウスを作製するには多数のドナーマウスを必要とするが、著者の開発した手法により、骨髄非破壊条件下における骨髄キメラマウスを作製することに成功している。このような骨髄キメラマウスは過去に報告がなく、さらに遺伝子改変実験も可能であることを示すなど、本研究成果は今後の造血幹細胞研究の応用範囲を広げるものとして、その学術的価値は高い。

令和5年1月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。