

論文概要 (Thesis Abstract)

○ 論文題目

経胎盤移植系を用いた血液キメラマウスの作製

○ 指導教員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 高橋智 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

(氏 名) 全 孝静

【目的】

ヒトの造血・免疫系をマウスの体内で再現する「ヒト化マウス」は、私たちヒトの血液免疫システムを理解し、新たな医薬品の創出や疾患の克服などにつながることで期待される。現在に至るまで、免疫不全マウスにヒトの造血幹細胞を移植するという方法で、造血免疫系ヒト化マウスの開発が行われてきた。しかし、免疫不全マウスを用いて誕生した造血系ヒト化マウスは、ヒト由来の赤血球や巨核球の出現率が低いことや、ヒト特異的な抗体が産生されないなどの課題がある。現在の造血幹細胞移植法は、骨髄破壊的前処置（放射線照射、化学療法など）によりレシピエントの造血幹細胞を破壊させ、出生後マウスを用いて経静脈的に移植を行っていた。そのため、骨髄微小環境の破壊による生着不全の問題が残っている。

そこで本研究では、現存の造血幹細胞移植法を改良することでマウスへのリスクを最小限にし、より有効で安全な造血幹細胞移植法の開発を最初の目的とした。それからヒト化マウス作製のためのレシピエントとして、造血幹細胞を完全に欠損する遺伝子改変マウスの胎仔を用いるという新たなアプローチに基づき、既存の免疫不全マウスの問題点を克服した、完全な造血免疫系ヒト化マウスを作製することを最終目的とした。

【対象と方法】

当研究室の先行研究で作製した、造血幹細胞を欠損するマウス胎仔をもつ母親マウスを、イソフルラン吸入によりマウスを導入し、下腹部を切開し、子宮を体外に露出させた。胎仔の胎盤側の中央部にマイクロガラス針を挿入し、ドナー細胞を導入した。移植後、子宮を体内に戻し、皮膚を縫合し開腹させた（経胎盤移植）。移植細胞として同系マウス胎仔肝細胞、異種ラット胎仔肝細胞、異種ヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いた。

移植の一週間後の出生直前のマウスを帝王切開により取り出し、自発呼吸を確認した。移植胎仔数と帝王切開時生存胎仔数から、経胎盤移植法による生存率を検討した。移植を行った胎仔の肝臓を摘出し、フローサイトメトリー解析およびコロニー形成アッセイを行い、レシピエント体内におけるドナー由来の細胞を確認した。

【結果】

マウス胎仔への移植系の確立

マウス子宮内胎仔への造血幹細胞の移植法として、「経胎盤造血幹細胞移植法」を導入した (Fleischman RA et al., PNAS, 1979)。また、移植に用いるマイクロガラス針の改良を独自に行うことで、移植後胎仔生存率が 60%以上で安定した移植法を確立した。

同系造血幹細胞移植

野生型マウスの胎仔肝臓を経胎盤移植により、造血幹細胞を欠損するマウス胎仔へ導入し同系移植を行った。出生直前の胎生 18.5 日の移植を行った胎仔の肝臓を FACS 解析したところ、CD45 陽性細胞の 90%以上がドナー由来であり、ドナー細胞はレシピエントの肝臓においてマクロファージやリンパ球系 (T、B 細胞) に分化していることを確認し。さらに、レシピエント胎仔肝臓を用いたコロニーアッセイによってドナー細胞がコロニー形成能を有していることも確認できた。レシピエントとして用いた胎仔は造血幹細胞を欠損するため、造血幹細胞由来のコロニーが形成されないが、この移植によりレスキューされた個体のコロニー形成能が回復したことがわかった。

異種 (ラット) 造血幹細胞移植

次に、同系移植と同様に、ラット胎仔肝臓細胞を使用した異種移植を行った。その結果、CD45 陽性細胞の 90%以上がラット由来である個体を得ることができた。また、ラット由来の赤芽球はレシピエントマウス胎仔の体内に生着しやすいことが確認された。以上の結果から、経胎盤移植法による異種移植は可能であることが示唆された。

【考察】

従来の超音波ガイド下での経胎盤移植による胎仔の生存率は 20%以下であるのに対し、本研究において新たに導入した方法では、移植後胎仔生存率が 60%以上を示し、胎仔へのダメージを最小限にするシステムを導入することができた。胎仔期は免疫系が未発達であり、外からの抗原に対して拒絶反応が起こらず、免疫システムの発達過程において、胎仔がその抗原さらされると免疫寛容を獲得する。つまり、胎仔期に骨髄破壊

的前処置を行わずドナー細胞を移植しても免疫寛容が成立するため、従来の骨髄移植に伴う危険性を少なくすることが可能であることを証明することができた。

今後は、ドナー由来 B 細胞の抗体産生能の評価や、ヒト造血幹細胞を用いた移植実験の条件検討を予定している。しかしながら、移植に成功したレシピエント胎仔（ドナー由来細胞の高いキメリズム有する個体）が帝王切開後に死に至ることから、完全な造血系ヒト化マウスの作製には適さない。その死因として、本研究で用いたレシピエントマウスは、造血系のみならず神経系や骨格系の発生にも働く遺伝子を全身で欠損するため、造血細胞の移植により造血系の異常がレスキューされた場合でも、造血系以外の原因で死亡すると考えられる。そこで、現在は造血細胞でのみ当該転写因子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を進めている。

【結論】

本研究は造血幹細胞を産生できない遺伝子改変マウスの胎仔に、造血細胞を移植することで、ドナー由来の造血系を再構築するモデルマウスの作製を目的とした。新たなレシピエントモデルの作製や移植する造血幹細胞の分画の検討、移植の時期や移植細胞数の最適化など、依然として解決しなければならない課題は残っているが、当研究室で作製した造血幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスの胎仔をレシピエントとして用いることで、異種造血細胞の生着や分化を初めて確認したことは、ヒト造血幹細胞の移植も可能であると考えられる。今後は、造血幹細胞をレシピエントマウスの改良やマウスに対するヒトサイトカインの投与、抗マウス抗体の投与などによりヒト造血細胞の生着率を上昇させ、生着期間を延長させることが目標である。本研究により、ヒトの造血系を再現できる造血免疫系ヒト化マウスが作製出来れば、抗体医薬や新しいヒト疾患モデルマウスの作製、薬効評価などに適応が可能であり、基礎医学や創薬研究に進歩をもたらすと考えられる。