

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規モノクローナル抗体を用いたコモンマーモセット (common marmoset)  
CD34 陽性細胞の分離および造血能についての検討

東京大学大学院 医学系研究科

平成 8 年 4 月 入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 伊東 清子  
(伊澤)

### 要旨本文

新規遺伝子治療法の開発を行っていく上で、ベクターおよび遺伝子導入細胞などの安全性を確認するための体内 (in vivo) 実験系は不可欠なものである。従来、モデル実験動物としては、主にマウスが用いられているが、マウスで得られた結果がヒトでの臨床結果に反映されない事も多い。これはヒトとマウスの生物学的な種差、すなわち遺伝学的背景の違いによるためだと考えられる。さらにヒトに近縁な実験用動物としては、ヒヒ (英名 : baboon、学名 : *Papio cynocephalus*) やマカク属であるアカゲザル (英名 : Rhesus monkey、学名 : *Macaca mulatta*) やカニクイザル (英名 : Crab-eating、学名 : *Macaca fascicularis*) などが主に古くから研究に利用されてきた。しかしこれらの霊長類は大型 (マカク属の場合で 3~10kg) であり、また施設の確保や専門的な取り扱い技術の取得が必要である等、通常の研究施設内で使用するためには困難な点が多く、一般的な前臨床試験動物として普及するには至っていない。そこでこれら大型霊長類に代わる動物として近年注目されているのが、コモンマーモセット (英名 : Common marmoset、学名 : *Callithrix jacchus*) である。コモンマーモセットは既に国内に繁殖集団があるため安定した供給が可能であり、大型動物と比べて比較的小型 (200-400g) で取り扱い易い。当研究部でも、最終的には造血前駆細胞を利用した血液疾患のための前臨床試験モデルとして利用していくことを目的に、本動物の血液学的・免疫学的な基礎実験を行ってきた。コモンマーモセットに関する血液学的な研究としては、これまでに末梢血球細胞の抗原が一部の抗ヒト白血球抗体に対して反応することは報告されていた。当研究部ではさらに、ヒト IL-3, GM-CSF, EPO, TPO などのサイトカインに反応して、ヒトの細胞と同様に in vitro でコロニーを形成する造血

前駆細胞が存在すること、ヒトサイトカインの *in vivo* 投与により末梢血中に造血前駆細胞を動員することが可能であり、末梢血造血前駆細胞移植への可能性を示した。またコモンマーモセットの主要組織適合複合体遺伝子の解析法を確立し、自家移植だけではなく、ドナーとレシピエントを選択した同種造血幹細胞移植モデルとしての可能性も示した。

このようにコモンマーモセットの前臨床移植モデルとしての有用性を示してきたが、血液学的疾患モデルを作出する場合、あるいは血球系の細胞を治療の標的とする場合には造血再構築能をもつ細胞の分離が必要となる。ヒトでは造血幹～前駆細胞に CD34 抗原が発現していると考えられており、純化 CD34 陽性細胞による造血再構築は臨床的にも確認されている。しかしコモンマーモセットに関しては前述のように、ヒトのサイトカインとの反応性を利用して *in vitro* でのコロニーアッセイは可能なものの、造血前駆細胞の性状あるいは分離法は報告されていない。大型霊長類ではヒトの CD34 に対する抗体を用いた造血前駆細胞の分離が行なわれているが、コモンマーモセット造血前駆細胞を物理的に認識する抗体はこれまで報告されていない。このような背景のもと、本研究では、CD34 分子がコモンマーモセットでも造血前駆細胞マーカーになると考え、新たに抗コモンマーモセット CD34 モノクローナル (MoAb) 抗体を作製してコモンマーモセットの CD34 陽性細胞を分離し、造血前駆細胞としての能力を有するかどうかの検討を行った。

まず、MoAb を作製するための抗原蛋白質を得るために、コモンマーモセット CD34 をコードする cDNA のクローニングを行った。既に報告されているヒトおよびマウスの CD34 cDNA 間で高い相同性をもつ領域よりプライマーを設定し RT-PCR を行い、得られた断片のシーケンス情報より新たに設定したプライマーを用いて 5'RACE および 3'RACE を行い、コモンマーモセット CD34 cDNA の翻訳領域のクローニングに成功した。遺伝子配列を既知の CD34 遺伝子と比較した結果、ヒトと 89%、マウスと 74%の相同性が認められ、特に膜貫通領域および細胞内領域では 3 者間で高く保存されていた。また推測されるアミノ酸配列をヒト CD34 抗原と比較した場合、細胞外領域での糖鎖付加部位数やシステイン残基の位置が強く保存されており、2 者間での高次構造の類似性が示唆された。

次にコモンマーモセット CD34 cDNA の翻訳領域を発現させ、蛋白質レベルでの解析を行った結果、ヒトなどで報告されている CD34 とほぼ同様の分子量約 120kDa の膜蛋白質として存在し、N-glycosidase と反応性をしめす多数の糖鎖が付加していることが確認された。この蛋白質を一過的に発現させた細胞を抗原としてマウスを免疫し、抗コモンマーモセット CD34 MoAb (MA24) を得ることに成功した。本抗体が認識して

いるコモンマーマセツト CD34 のエピトープは未確認であるが、ヒトや大形霊長類であるアカゲザルやカニクザルとの造血前駆細胞とは反応性を示さず、種特異的部位を認識している可能性が示唆された。

本抗体と反応するコモンマーマセツト骨髓細胞中の CD34 陽性細胞が実際に多分化能をもつ造血前駆細胞としての性質を有するかを調べるため、*in vitro* および *in vivo* での検討を行った。コロニーアッセイの結果から、赤芽球コロニー (BFU-E)、顆粒球・マクローファージコロニー (CFU-GM)、混合コロニー (CFU-Mix、CFU-GEMM) の形成が認められ、CD34 陰性細胞と比較して高いコロニー形成能をもつことが示された。またマウスストローマ HESS-5 細胞との共培養では、CD20 陽性のリンパ球系細胞への分化が認められた。NOD/SCID マウスを用いた *in vivo* アッセイでは、ヒト CD 抗体を用いた解析の結果、コモンマーマセツト CD34 陽性細胞を移植したマウスの末梢血および骨髓細胞において、コモンマーマセツトの分化抗原マーカーを呈する細胞 (CD2, CD4 陽性のリンパ球系細胞、CD11b および CD14 陽性の骨髓球系細胞) の存在が示された。一方、コントロールとして CD34 陰性細胞を移植したマウスではこれらの細胞は検出されなかった。移植後のマウス体内におけるコモンマーマセツト細胞の存在については、PCR を用いてさらに高感度な解析を行ったが、やはり CD34 陽性細胞を移植したマウスにのみマーマセツトの細胞が存在することが示された。この結果より、移植マウスの末梢血中や骨髓細胞中で検出された分化抗原を呈するマーマセツト細胞は、CD34 陰性細胞ではなく CD34 陽性細胞から由来していることが示唆された。さらに我々は MA24 抗体を用いて、コモンマーマセツトへのヒトサイトカインの投与によって末梢血中へ CD34 陽性細胞が動員されていることを明らかにした。

一方で、CD34 陽性細胞を移植したマウスは GVHD の症状の発症によって早期に死亡し、その脾臓や肝臓組織においてコモンマーマセツト CD2 陽性細胞の浸潤が認められた。上述したように、マウス体内で認められたマーマセツト細胞は CD34 陽性細胞から分化した細胞であると考えている。しかし、多分化能を有する CD34 陽性細胞から分化した CD2 陽性 (T) 細胞がマウスにおいて GVHD を発症させるということは、免疫学的に矛盾が生じる。そこで我々はコモンマーマセツトの CD34 陽性細胞分画中に既に分化した T 細胞が存在するのではないかと考え、ヒトでは T 細胞関連抗原として幅広く発現している CD2 に対する抗体を用いて、CD34 陽性細胞中における CD2 陽性細胞の割合について検討を行った。その結果、コモンマーマセツトの CD34 陽性分画の 94-98%が CD2 を共発現していることが確認された。ヒトの場合、CD34 陽性細胞は NK/T 前駆細胞であることが報告されているが、本研究の結果よりコモンマーマセツトの CD34 (/CD2) 陽性細胞は多分化能をもつことが示されている。これにより、浸潤細胞の

由来については、マーモセット細胞へ使用可能なヒト CD 抗体が限定されているという問題により実証できなかったが、マーモセットでは CD2 抗原がヒトの場合と異なる発現パターンをもつという新たな知見が得られた。現時点でのこれ以上の詳細な検討は困難であったが、今後コモンマーモセットを前臨床モデルとして用いていくためにはヒトの CD34 陽性細胞との違いについて詳細な検討を行う必要があり、そのためにはヒト CD 抗体が認識しているマーモセット細胞の性質を明確にすることや、新たなマーモセット CD 抗体の作製が急務であると考えられた。

以上のように、本研究では、コモンマーモセット CD34 陽性細胞はヒトやマウスと同様に多分化能をもつ造血前駆細胞であることを明らかにし、新たに作製した抗体を用いて本動物の造血前駆細胞を分離することに初めて成功した。さらに検討を必要とする課題点はいくつか残されているが、今後コモンマーモセットを前臨床試験動物として利用していくための重要な基礎的条件が付与されたものと考えられる。