

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 伊東 清子
(伊澤)

本研究では、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、小型霊長類コモンマーモセットを利用していくことを最終目的に、そのための基礎研究として本動物の造血前駆細胞を分離することを目的とした研究を行った。この際、CD34 抗原がヒトやマウスでの造血前駆細胞マーカーであり、さらにヒトでは実際の医療現場で CD34 陽性細胞が用いられていることを考慮し、CD34 の発現を指標にコモンマーモセットの造血前駆細胞の分離を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マーモセットの骨髄細胞で発現しているCD34遺伝子のクローニングをおこなった結果、約1158bpのマーモセットCD34 cDNA翻訳領域が得られ、この配列は386アミノ酸で構成されており、推定される分子量は約37kDaであった。予想されるアミノ酸配列を既知の配列と比較した結果、アミノ酸レベルではヒトと81%、マウスと62%の相同性が認められた。また、特にヒトと比較した場合、細胞外領域での糖鎖付加部位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。さらに細胞内領域においては、推定される機能部位（プロテインキナーゼC結合部位およびチロシンキナーゼ結合部位）がほぼ完全に保存されており、未だ未解明であるがCD34分子を介したシグナル伝達における役割も保存されているものと考えられた。
2. クローニングした遺伝子配列をもとにコモンマーモセットCD34を発現させ、蛋白質レベルで解析した結果、分子量は約120kDaであり、多数の糖鎖が付加した膜蛋白質として発現していることが示された。
3. コモンマーモセット CD34 発現細胞を抗原としてマウスの免疫を行い、モノクローナル抗体の作製を行った結果、コモンマーモセットの CD34 抗原に対して特異的に反応を示す 5 クローンモノクローナル抗体が得られた。これらは全て IgM のアイソタ

イプを示した。

4. 作製した 5 クローンのうち、MA24 抗体を用いてさらに解析を行った結果、コモンマーモセット骨髄細胞では約 0.4-1%、末梢血では 0.1%以下の割合で CD34 陽性細胞が認められた。しかしヒトや大型霊長類の造血前駆細胞との交叉性は認められなかった。これより、MA24 抗体はコモンマーモセット CD34 特異的なエピトープを認識していることが示唆された。
5. コモンマーモセット骨髄細胞から免疫磁気ビーズ法を用いて CD34 陽性細胞を分離し、多分化能について検討を行った。In vitro 実験を行った結果、コロニーアッセイでは分離前の単画球分画および CD34 陰性分画の細胞と比較して明らかに高いコロニー形成能を示した。また、マウスストローマ HESS-5 細胞との共培養では CD20 陽性細胞への分化が認められた。さらに NOD/SCID マウスを用いた in vivo 実験を行った結果では、CD34 陽性細胞の移植 1 ヶ月後のマウス体内において、マーモセットの骨髄系およびリンパ球系の分化抗原マーカーを呈する細胞の存在が示された。一方これらの細胞は CD34 陰性細胞を移植したマウスからは検出されなかった。1 ヶ月後のマウス体内に存在するマーモセット細胞については、PCR を用いた高感度な解析によっても CD34 陰性細胞移植マウスからは検出されなかった。これより、移植一ヶ月後のマウスから検出された細胞群は CD34 陽性細胞から分化した細胞であることが示唆された。
6. コモンマーモセットへのヒトサイトカインの投与により、末梢血中に造血前駆細胞が動員されることは、コロニー形成能の比較により示されていたが、本研究では実際に CD34 陽性細胞が動員していることを MA24 抗体を用いて示した。
7. CD34 陽性細胞を移植したマウスでは、移植 1 ヶ月後の臓器においてマーモセット CD2 陽性細胞の浸潤が認められた。この細胞は分離した CD34 陽性細胞分画中に存在する T 前駆細胞 (CD34/CD2 陽性細胞) から由来しているのではないかと推測し、CD34/CD2 陽性細胞の存在について検討を行った。その結果、マーモセットの CD34 陽性細胞の 94-98%が CD2 を共発現していることが判明した。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。このようなコモンマーモセットとヒト

の CD34 陽性細胞の違いについて詳細な検討を行うことは今後の課題であると考えられた。

以上、本研究では、コモンマーマセット CD34 抗原はヒトやマウスと同様に多分化能をもつ造血前駆細胞のマーカ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。さらに本抗体を用いた解析の結果、コモンマーマセットへのヒトサイトカイン投与により末梢血中へ CD34 陽性細胞が動員されていることが示された。本研究の結果により、コモンマーマセットの末梢血造血前駆細胞移植モデルとしての有用性が示され、また今後本動物を用いて血液疾患モデルを作製し、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、学位の授与に値するものと考えられる。