

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 サル ES 細胞の遺伝子操作とサル胎仔への同種移植

指導教官 朝戸 裕貴 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 浅野 隆之

はじめに

ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem; ES 細胞) は, 三胚葉性の多分化能と無限増殖能を持つことから, 薬剤開発, 中毒テスト, 様々な疾患・障害への細胞治療などへの応用が期待されている. しかし, ヒト ES 細胞の実験は倫理的な制約が強いため, 別の ES 細胞モデル, なかでもヒト ES 細胞とほぼ同じ特徴を持つ霊長類 ES 細胞が有用となる. 本研究では, カニクイザル ES 細胞への効率良い遺伝子導入を確立し (第 1 章), 続いて遺伝子導入したカニクイザル ES 細胞をサル胎仔へ同種移植を行い, 移植細胞の生着・分化を調べた (第 2 章).

第 1 章 カニクイザル ES 細胞への遺伝子導入

1. 研究の背景

ヒト ES 細胞に対する遺伝子操作は, 電気穿孔法やリポフェクションでは効率が低い
ため, マウス ES 細胞の遺伝子導入で成功したレンチウイルスベクターに関心が寄せられて
いた. そこで, カニクイザル ES 細胞を標的とし, サル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency
virus; SIV) 由来のレンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた.

2. 実験方法・結果

サル ES 細胞への遺伝子導入

カニクイザル ES 細胞 (CMK10) に、マウス幹細胞ウイルス(mouse stem cell virus; MSCV) 由来のレトロウイルスベクターを用い、10 transducing unit (TU) /cell の条件で green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入したところ、GFP 陽性 ES 細胞の割合は遺伝子導入 5,10 日後に約 1%にすぎなかった。すなわち、MSCV ベクターによる遺伝子導入は、マウス ES 細胞ではうまくいってもサル ES 細胞ではうまくいかない。

そこで、レンチウイルスである SIV ベクターによる遺伝子を試みた。用いたベクターは、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus; CMV) プロモーターから GFP 遺伝子を発現する自己不活化型 (self-inactivating; SIN) の SIV ベクターであり、水泡性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus-G; VSV-G) 蛋白質でシュードタイプされている。

マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) のフィーダー上で培養している未分化カニクイザル ES 細胞 (CMK10) に、SIV ベクターを 1, 10,100 TU/cell で 1 回のみ遺伝子導入した。その後、ES 細胞を MEF フィーダー上で未分化培養維持した。遺伝子導入した ES 細胞の GFP 発現をフローサイトメーターで解析した。導入 5 日目に各 58%, 82%, 92%と GFP の高い発現を認め、その後 5 ヶ月間、GFP 発現率・平均蛍光強度はほとんど低下することなく安定していた。

次にベクターの ES 細胞ゲノムへの組込みをサザンブロットィングで解析した。ES 細胞内のプロウイルスのコピー数は、1, 10, 100 TU/cell で各 0.7, 2.0, 3.3 であった。更に、遺伝子導入された ES 細胞は、培養数ヶ月後もベクターの挿入部位が多数存在しポリクローナルであったこともわかった。

胚様体形成後の導入遺伝子の発現

SIV ベクターでサル ES 細胞に遺伝子導入した場合、細胞が未分化な状態では導入遺伝子が長期安定発現することがわかったが、分化状態では発現がどう変化するか興味を持ち、分化状態を示す胚様体を形成して導入遺伝子の発現を解析することにした。培養条件を分化条件に変更し胚様体を形成させたところ、嚢胞状の胚様体となっても GFP の発現を認め、初期分化しても導入遺伝子は転写のサイレンシングを受けにくいことが示された。

ES 細胞の種による遺伝子導入の違い

上記 SIV ベクターがマウス ES 細胞 (D3) 株にも効率良く遺伝子導入できるか調べた。10 TU/cell で遺伝子導入したところ、導入 5,10 日後に GFP 陽性細胞は 5-6%とサル ES 細胞に対する遺伝子導入法と比べて極めて低かった。SIV ベクターによる遺伝子導入は、サルの ES 細胞に対してはうまくいくが、マウスの ES 細胞に対しては期待通りの効果は得られなかった。

導入遺伝子の発現を高めるための SIV ベクターの改良

カニクイザル ES 細胞株 CMK6 を用いて、SIV ベクターによる GFP 発現のプロモーター間の比較検討を行った。elongation factor-1 alpha (EF-1 α) プロモーターが、CMV および phosphoglycerate kinase (PGK) の各プロモーターに比べて高い GFP 発現が得られた。

CMV プロモーターに加えて、核内移行配列である central polypurine tract (cPPT)、および発現増強配列である woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) の配列を加えたベクターでは、GFP 発現がいっそう増強した。

3. 考察

カニクイザル ES 細胞に対して、SIV 由来のレンチウイルスベクターによって効率よく長期安定した GFP 遺伝子の発現を得た。一方、MSCV 由来のレトロウイルスベクターを用いてサル ES 細胞に遺伝子導入を試みたところ、遺伝子導入効率は極めて低かった。ES 細胞への遺伝子導入は、レンチウイルスベクターがすぐれているといえる。

SIV ベクターによってサル ES 細胞に効率良く遺伝子導入可能であったが、マウス ES 細胞に対しては必ずしもうまくいかなかった。ヒト造血幹細胞へヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) ベクターで遺伝子導入した場合、ネコ由来レンチウイルスベクターよりも遺伝子導入効率が高かったという報告もあり、レンチウイルスベクターの遺伝子導入効率は、種に依存して大きく変化するのかもしれない。

SIV ベクターで遺伝子導入した場合は、未分化状態だけでなく、初期分化を示す嚢胞状の胚様体形成中も導入遺伝子の発現を認めた。HIV 由来のレンチウイルスベクターでマウス ES 細胞に遺伝子導入したところ、トランスジェニックマウスの作成に成功したという報告があることから、レンチウイルスベクターで遺伝子導入した場合、導入遺伝子はサイレンシングを受けにくいと考えられた。

レンチウイルスベクターには HIV-1 由来のベクターが一般的に使用されている。しかし、野生型 HIV-1 は病原性を持ち、そこから開発された HIV-1 ベクターは安全性の問題が残る。一方、この実験で使用した SIV ベクターは、SIV アフリカミドリザル由来のベクターであり、ベースとなる野生型ですら自然宿主に対する病原性が報告されていない。しかも HIV-1 との塩基配列相同性は低いため、HIV-1 との相同組換えを生じる危険性が低い。よって、SIV ベクターは HIV-1 由来のベクターよりも安全性において優位であるといえる。

第 2 章 カニクイザル ES 細胞のサル胎仔への同種移植

1. 研究の背景

ヒト ES 細胞に基づく移植療法で様々な疾患・疾病に対する治療が期待されている。治療法の安全性・有効性を評価するためにサル同種移植モデルは有用であるが、これまで報

告はなかった。その理由の1つは、効率良く安定したサル ES 細胞のマーキングが困難であり、移植細胞を周囲の宿主細胞の区別が困難であったことである。もう1つの理由は、移植した ES 細胞に対する免疫学的拒絶を回避する方法が困難なためであるが、免疫システムが未熟な妊娠初期の胎仔をレシピエントに用いれば、拒絶を回避できる可能性がある。この実験で、GFP を恒常的に発現するカニクイザル ES 細胞を同種の子宮内胎仔に移植し、移植細胞の *in vivo* における運命を GFP を標識として解析した。

2. 実験方法・結果

サル ES 細胞の遺伝子標識

移植に用いるカニクイザル ES 細胞は、あらかじめ SIV ベクターによって GFP 遺伝子を導入した (GFP 発現率は約 50%)。または、電気穿孔法で GFP 遺伝子を導入し、GFP を恒常的に発現するようになった ES 細胞亜株 (CMK6G) を用いた (GFP 発現率は 90%以上)。両 ES 細胞とも MEF フィーダー上で未分化維持した。

これら GFP を発現する未分化サル ES 細胞 ($3.6\text{-}4.8 \times 10^6$ 個/胎仔, 約 2.0×10^8 個/kg) を、妊娠前半 1/3 期 (満期 165 日) の同種サルの子宮内胎仔 (計 4 頭) にエコーガイド下で移植した。CMK10 は 2 頭を腹腔内、1 頭を肝臓内に、CMK6G は 1 頭を肝臓内に移植した。いずれも妊娠中に合併症を認めなかった。CMK10 を移植した 3 頭の胎仔は移植 1 ヶ月後に、CMK6G を移植した 1 頭は移植 3 ヶ月後に帝王切開で取り出した。

胎仔組織における移植細胞の検出

各胎仔の組織サンプルを脳、肺、心筋、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、骨格筋、軟骨から採取した。各胎仔組織中の移植細胞の割合を評価するため、GFP 配列に対する定量的 DNA PCR を行った。移植細胞は広範の胎仔組織に 0.01~1% で分布していた。腹腔内に移植した胎仔では、移植細胞は大網や小腸など腹腔内に多く検出された。肝臓に移植した胎仔では、多くの細胞が移植部位から離れた部位で検出され、より全身に分布する傾向を認めた。

組織切片を GFP 配列に対する *in situ* DNA PCR 法で解析したところ、検出された移植細胞は全て孤立して存在しており、周囲の宿主細胞と形態的に区別がつかなかった。

腫瘍形成

移植 1 ヶ月に取出した胎仔では腫瘍を全く認めなかったが、移植 3 ヶ月後の胎仔では $4 \times 3 \times 2.5\text{cm}$ 大の嚢胞状の腫瘍を胸腔内に認めた。腫瘍は GFP 蛍光を発しており、*in situ* DNA PCR 法の結果 GFP 配列を含んでいたため、移植した ES 細胞由来と判明した。腫瘍は様々な上皮系の細胞で構成されていたが、他の系の分化細胞は殆ど認めなかった。なお、移植部位である肝臓を含め広範の組織で移植細胞を検出したものの、他の部位には腫瘍を認めなかった。

3. 考察

サル ES 細胞をサル胎仔に同種移植し、広範の胎仔組織において 0.01~1%で検出した。検出された細胞は一個ずつ孤立して存在しており、形態的に周囲の宿主細胞と区別がつかなかった。このような形態変化は、一部は既に存在していた宿主細胞と移植した ES 細胞との細胞融合による可能性があるが、通常の細胞融合は $10^4 \sim 10^6$ 個に 1 個の頻度であるため、この実験で検出された細胞全てが細胞融合によるとは考えにくい。

移植 3 ヶ月後に胸腔内に移植 ES 細胞由来の腫瘍を認めた。このことから、ES 細胞移植治療では、移植細胞に含まれる未分化な ES 細胞が含まれると腫瘍を形成する危険があることが明らかである。興味深いことに、胎仔各組織では腫瘍は全く認めなかったが、胸腔内など“不適切な”可能性が示唆されるスペースに移植細胞が漏出した場合、適切なシグナルを得られず腫瘍を形成する可能性があると考えられた。

移植細胞が胎仔に長期間生着したことは、胎仔が移植 ES 細胞に対して免疫寛容であったことを示す。もし移植した ES 細胞が腫瘍形成することなく、宿主の体の一部を形成できた場合、宿主が成長後も同じ ES 細胞由来の組織に対して免疫寛容を示す可能性がある。もし実現すれば、ES 細胞移植研究の理想的な霊長類のレシピエントになると予想される。

おわりに

第 1 章でカニクイザル ES 細胞に対する SIV ベクターを用いた効率よい遺伝子導入法を報告した。この論文内容発表と前後して、HIV-1 ベクターを用い、ヒト ES 細胞に対して効率よい長期安定した遺伝子導入が可能であると私の論文内容を支持する報告が続いた。いまやヒト、サル ES 細胞に対する効率よく安定した遺伝子導入はレンチウイルスベクターによって可能であるというのは共通の認識となっている。

遺伝子導入技術の応用として、第 2 章において、GFP 遺伝子で標識したカニクイザル ES 細胞をカニクイザルの子宮内胎仔に同種移植した結果を報告した。成長を続ける胎仔組織には、移植した ES 細胞がホーミングして生着する“スペース”が存在し、ES 細胞がそのような適切なスペースにうまくはまった場合は、適切な増殖・制御シグナルを受け生着し周囲に適応出来ると考えられた。一方、移植細胞が胸腔内など“不適切な”可能性が示唆されるスペースに漏出した場合には、適切なシグナルを得られず、移植細胞が腫瘍を形成する可能性があることも示した。