

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 日比野 仁

本研究は、サイトカイン療法、遺伝子治療などの新規療法の研究開発において、ヒトに近縁な霊長類を用いた前臨床研究の重要性が高いものの、大型霊長類を用いた研究には多くの制約があることを背景に、大型霊長類より簡便に扱える小型霊長類のコモンマーモセットに注目し、本動物の血液学的特性をヒトあるいは大型霊長類との比較を通して明らかにし、末梢血造血前駆細胞遺伝子治療の *in vivo* 霊長類モデル作成を目指したものであり、以下の結果を得ている。

1. コモンマーモセットの造血前駆細胞の特性を解明するために、本動物の骨髓造血前駆細胞のヒトサイトカインに対する反応性を検討した結果、ヒト G-CSF、GM-CSF、Epo、IL-3、IL-6、IL-11、SCF、Tpo に対して、コモンマーモセットの造血前駆細胞は反応し、その反応性はヒト細胞に類似していた。また、フローサイトメトリー法によるヒト血液細胞に対する単クローン抗体とコモンマーモセットの末梢血細胞、骨髓細胞の交差反応性の検討では、CD2、4、8、20、56 に対するリンパ球特異的な単クローン抗体のいくつかが交差反応性を示した。骨髓系細胞に対する抗体では、CD11b を除き、交差反応性を示さなかった。CD34 に対する抗体ではひとつの抗体を除き、いずれの抗体も交差反応性を示さなかった。さらに、本動物の CD4、8、20、56 陽性細胞の純化を immunobeads 法により試みたところ、分離した CD4 及び CD8 陽性細胞は形態学的にはリンパ球であり、ともにマイトジェン刺激に反応して増殖したことから、本動物の CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の同定と純化が可能なが示された。CD20 及び CD56 陽性細胞に関しては、純化法や機能の検討がさらに必要であった。コモンマーモセット骨髓単核球中の約 1.5% が CD34 陽性細胞であったが、そのコロニー形成能は低いものであった。
2. レトロウイルスベクターを用いたコモンマーモセット造血前駆細胞への遺伝子導入の検討をウイルス上清液法、ウイルス産生細胞との共培養法、ウイルス産生細胞と同種骨髓間質細胞を混合した共培養法を用いて行った。その結果、

ウイルス上清液法及びウイルス産生細胞との共培養法での導入効率は低かったが、ウイルス産生細胞と骨髄間質細胞との混合共培養系では、ウイルス産生細胞のみの時に比べ、有意に高い遺伝子導入効率が得られた。また、遺伝子導入効率は、ヒトサイトカインが存在する条件の方が有意に高いものであった。他のウイルスベクターとしてアデノウイルスベクターを用いた造血前駆細胞への遺伝子導入も試みた。遺伝子導入は multiplicity of infection 20 及び 200 の条件で行った。培養初期の遺伝子発現クラスター/コロニー数の比率は高かったが、培養時間の経過とともに遺伝子発現コロニーの比率は減少し、コロニー中の遺伝子発現細胞の比率も、コロニーの成長に伴い減少した。

3. ヒト G-CSF 投与による末梢血への造血前駆細胞動員効果の検討では、コモンマーモセットにおいても、ヒト G-CSF は末梢血への造血前駆細胞の十分な動員作用を発揮することが判明した。また、末梢血造血前駆細胞に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入が可能であることが示された。さらに、致死線量の検討では、本動物の致死線量は 7.5Gy であることが示された。
4. ヒト G-CSF で動員されたコモンマーモセットの末梢血造血前駆細胞へレトロウイルスベクターを用いて MDR1 遺伝子を導入し、その遺伝子導入細胞を移植することにより、導入遺伝子の消長を追跡できる *in vivo* モデルを構築した。導入遺伝子は、provirus 特異的なプライマーを用いて PCR 法にて増幅して確認し、導入遺伝子のコピー数はサザン法を用いて求めた。遺伝子導入個体全てより、末梢血全血あるいは好中球、リンパ球から、長期間にわたり provirus が検出され、遺伝子導入細胞の割合は 0.2%~1.0%であった。また、骨髄単核球及び形成コロニーからも provirus が検出された。さらに、導入遺伝子の機能検討のために、移植後に provirus が確認された個体に、抗癌剤である docetaxel を投与し、好中球数の推移を検討した。遺伝子導入個体では、好中球数の減少がコントロールに比べ、やや抑制される傾向がみられた。しかし、docetaxel 投与後の MDR1 遺伝子導入好中球の濃縮には至らなかった。

以上、本研究から、これまで知見の乏しかったコモンマーモセットの血液学的特性がヒトあるいは大型霊長類との比較から明らかとなり、造血前駆細胞を標的とするレトロウイルスベクターを用いた小型霊長類の遺伝子治療モデルの作成を通して、新規治療法の *in vivo* での有効性、安全性の評価に利用可能な小型霊長類・コモンマーモセットモデルの構築が図れたと考えられた。ヒトへの応用を考えた遺伝子治療モデルとして大型霊長類と同様に利用できるモデル作成の基礎となるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。