

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 霊長類 ES 細胞を用いた再生医学研究
—センダイウイルスベクターによる遺伝子導入と
ヒツジ体内微小環境を利用した分化誘導—

指導教官 光嶋 勲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 佐々木 京子

1998 年にヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES cell) が樹立されて以来, この細胞が三胚葉性の多分化能と無制限増殖能 (自己複製能) を併せ持つため, 再生医療への応用が期待されている。しかし, ヒト ES 細胞はヒト初期胚から樹立されるため倫理的な制約が強い。筆者は, ヒト ES 細胞とほぼ同じ特徴を持つ霊長類 ES 細胞をモデル細胞として使用した。本研究では, 第 1 章で, わが国で開発された組み換えウイルスベクターであるセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いてカニクイザル ES 細胞への遺伝子導入を試みた。第 2 章では, カニクイザル ES 細胞をヒツジ胎仔に移植し, *in vivo* の体内微小環境を利用して造血系へ分化誘導し, サル/ヒツジ造血キメラを作製することを試みた。

第 1 章 センダイウイルスベクターによるサル ES 細胞への遺伝子導入

1. 研究の背景

霊長類 ES 細胞の基礎研究や臨床応用を進める上で, 安全で効率の良い遺伝子導入法の確立が必須であるが, マウス ES 細胞への遺伝子導入に比べて困難であると指摘されている。最近では, 霊長類 ES 細胞に対する遺伝子導入はレンチウイルスベクターが有効であるというのが共通認識となりつつあるが, ゲノムに組み込まれるタイプのウイルスベクターは, 宿主ゲノムの挿入変異, メチル化および相同組み換えによる複製能を持つウイルス生成の危険が

伴う。本研究では、SeV ベクターを用いてカニクイザル ES 細胞への遺伝子導入を試みた。さらに、遺伝子導入後の細胞に抗ウイルス剤リバビリンを投与することによって SeV ベクターの転写・複製を抑制し、導入遺伝子の発現を調節可能かどうか検討した。

2. 実験方法・結果

サル ES 細胞への GFP 遺伝子の導入

本研究で用いた SeV ベクター (SeV18+/ Δ F-GFP) は、SeV が感染する際に標的細胞との膜融合に必要な F(fusion) 蛋白をコードする F 遺伝子を欠失させてあるため、自己複製能を保持したまま非伝播性であるという特性を持つ。

カニクイザル ES 細胞に対し SeV ベクターで GFP 遺伝子の導入を行い、その発現をフローサイトメーターで解析した。遺伝子導入後 2 日目には 60% の細胞が GFP の蛍光を発しており、遺伝子導入効率は濃度依存性であった。また、遺伝子導入後の ES 細胞をそのまま継代培養し続けると、GFP の発現は少なくとも 1 ヶ月間認められた。遺伝子導入後の ES 細胞において GFP 陽性コロニーの選別を 1 回のみ行い、未分化状態を維持しながら継代培養を続けたところ、約 90% の細胞が GFP を発現し、この高い遺伝子発現は一年間以上にわたって維持された。すなわち、感染した SeV ベクターゲノムは細胞質内で自己複製が可能のため、細胞分裂によって希釈されないことを示している。

遺伝子導入後の ES 細胞の多分化能の解析

SeV ベクターで GFP 遺伝子導入後の ES 細胞を免疫不全マウス (NOD/SCOD マウス) の皮下に移植すると緑色の蛍光を発し、三胚葉成分を含むテラトーマ (奇形腫) が形成された。また、蛍光顕微鏡観察すると腫瘍は内部まで均一に蛍光を発していた。また、GFP 遺伝子導入後の ES 細胞を *in vitro* で分化誘導すると、囊状の胚様体、MAP2 陽性の神経細胞、NBT 還元試験陽性 (活性酸素産生による殺菌能を検出) の成熟した好中球を含む造血コロニーの形成が可能であった。分化後の細胞はすべて強い GFP の蛍光を発していた。すなわち、遺伝子導入後も導入前と同様の三胚葉性分化能を維持し、その最終分化後も GFP の発現が減弱しないことから導入遺伝子発現の「サイレンシング」は起こっていないことを示している。

SeV ベクターの安全性—DNA 相を介さない複製・転写—

SeV ベクターのゲノムの自己複製能および DNA 非依存性を確認した。SeV ベクターで GFP 遺伝子導入後の ES 細胞からゲノム RNA を抽出して、RNA-PCR にて SeV ゲノム配列 (580bp) の増幅を行った。SeV ゲノム由来のバンドを検出し、細胞内での SeV ゲノムの自己複製が証明された。一方、ゲノム DNA を抽出して、SeV ゲノム配列 (580bp) および GFP の cDNA (356bp) に対する DNA-PCR ではどちらも検出されず、ウイルスゲノムの複製および GFP の発現は DNA 非依存性であることが確認された。

抗ウイルス剤投与による導入遺伝子発現の調節

はじめに、アカゲザル腎細胞由来株 LLC-MK2 細胞を使用し、SeV ベクターで GFP 遺

伝子導入後 2 日目に、各濃度 (0-4 mM) のリバビリンを投与し、培養を継続した。細胞内のウイルス粒子量を赤血球凝集試験で測定すると、リバビリン投与によって濃度依存性に減少した。細胞の蛍光顕微鏡観察でも GFP の発現は濃度依存性に減弱していた。リバビリンによる LLC-MK2 細胞傷害は認めなかった。

続いて、SeV ベクターで GFP 遺伝子導入後のカニクイザル ES 細胞におけるリバビリンの効果を検討した。ES 細胞でもリバビリン投与によって濃度依存性に GFP の発現が減少した。しかし、高濃度 (1 mM 以上) のリバビリン投与は ES 細胞の増殖を妨げることが判明した。一方、低濃度 (0.5-0.75 mM) のリバビリン投与では GFP の発現を半減させることができ、リバビリン投与後も細胞の継代は可能だったが、GFP の発現も投与前のレベルまで戻った。

3. 考察

F 欠失型 SeV ベクターによって、カニクイザル ES 細胞の三胚葉分化能を損なわずに、極めて効率よく長期間安定に発現する遺伝子導入が可能であった。SeV ベクターは DNA 相を経ないため宿主 DNA を傷つけない安全な遺伝子導入法であるといえる。導入した GFP 遺伝子の発現は、抗ウイルス剤リバビリンで調節できる可能性が示されたが、カニクイザル ES 細胞では細胞傷害性が観察され、今後更なる検討が必要である。

第 2 章 ヒツジ体内微小環境を利用したサル ES 細胞の分化誘導

1. 研究の背景

近年、様々な細胞、組織そして臓器の移植が行われるようになったが、その大きな障壁のひとつがドナー不足である。ヒト ES 細胞は無限増殖能と多分化能を合わせ持つため、この細胞を様々な機能細胞に分化させることによって移植の供給源とする研究への期待が高まっている。従来の ES 細胞の分化研究はもっぱら *in vitro* で行われてきたが、胎仔 *in vivo* の微小環境を用いれば ES 細胞の分化をいっそう有利に進められることが予想される。本研究では、カニクイザル ES 細胞をヒツジ胎仔に移植し、*in vivo* で胎仔の微小環境を利用して造血系へ分化誘導しサル/ヒツジ造血キメラを作製することを試みた。

2. 実験方法・結果

In vitro で造血系に初期分化させたサル ES 細胞のヒツジ胎仔への移植

カニクイザル ES 細胞を、BMP-4 や VEGF 等のサイトカインの存在下、ストローマ細胞 OP9 上で 6 日間培養した。この細胞 (初期中杯葉に相当、平均 4.8×10^7 個) を妊娠約 60 日 (満期 147 日) のヒツジ胎仔肝臓内に移植した (n=4)。出生後、骨髄を採取し造血コロニーアッセイを行い、形成された造血コロニーをサルに特異的な $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2$ -MG) 遺伝子に対する PCR 法で解析した。このうちキメラヒツジ 2 頭に対して、ヒト SCF を投与した。

サルの造血をもつキメラヒツジの誕生

満期で出生した仔ヒツジの腸骨より骨髓を採取し、造血コロニーアッセイを行った。14日目に、個々の造血コロニーを吊り上げて DNA を抽出し、カニクイザルに特異的な $\beta 2$ -MG 配列に対するコロニー-PCR を行った。出生した4頭のヒツジ全例で1-2%（平均；1.2%）の割合でサル由来造血コロニーを検出した。移植から最長で17ヶ月間が経過してもサル由来造血コロニーを検出できた。また、移植を行った全ヒツジにおいてテラトーマ等の腫瘍形成は認めなかった。

ヒト SCF 投与による移植細胞の選択的増幅効果

ヒツジ本来の内因性の造血に対して、移植細胞由来のサルの造血を選択的に増幅させる目的で、出生した4頭のうち2頭に対して、ヒト SCF を $60\mu\text{g}/\text{Kg}$ 、18日間と5日間の2サイクル連日腹腔内投与した。骨髓由来の造血前駆細胞（CFU）におけるキメラ率、すなわちサル由来 CFU 比率（サル由来 CFU/全 CFU 数）は、2頭とも反応性に上昇し（最高 13.2%）、その後 SCF の投与を停止すると投与前のレベル（1-2%）まで戻った。ヒト SCF を投与したことに伴う明らかな副作用は認めなかった。

サル由来細胞は SCF 投与後に末梢血中에서도検出されたが、PCR サザンブロットィングで評価すると 0.1%未満の低いレベルであった。

ヒト臍帯血移植とのキメラ率の比較

初期分化培養6日目のカニクイザル ES 細胞の対照として、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞をヒツジ胎仔に移植した（平均移植細胞数； 1.8×10^6 cells/胎仔, $n=4$ ）。出生した仔ヒツジの骨髓中で移植細胞由来 CFU 比率 1%のキメラ率を達成するために必要な移植細胞数を算出すると、前者で 4.3×10^7 cells/胎仔に対し、後者で 6.0×10^5 cells/胎仔であった。

3. 考察

In vitro で初期中胚葉細胞に分化させたサル ES 細胞をヒツジ胎仔肝臓に移植することによって、1年間以上の長期にわたりサルの造血を有するキメラヒツジが誕生した。このことは、ヒツジ骨髓中におけるサル ES 細胞由来の造血幹細胞の存在を示唆している。またサル/ヒツジの造血比率は、サルの造血を選択的に刺激するサイトカイン投与によって上げることができた。本研究においては非ヒト霊長類 ES 細胞を用いて実験を行ったが、ヒト ES 細胞を同様の方法で用いた場合、ヒツジの体内でヒトの血液を作ることが可能になるかもしれない。