

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 佐々木 京子

本研究はヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES cell) を用いた再生医学研究およびその臨床応用において重要と考えられている, ES 細胞に対する安全で効率の良い遺伝子導入法の確立, および ES 細胞から *in vivo* でさまざまな機能細胞へ分化誘導させる, 大型動物アッセイ系の確立を目指すため, カニクイザル ES 細胞をモデルとして用いて検討を試みたものであり, 下記の結果を得ている.

1. カニクイザル ES 細胞に対し F 欠失型センダイウイルス (SeV) ベクターで GFP 遺伝子の導入を行った. 本研究で用いられた 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. 2, 10, 50 transducing unit (TU)/cells で 24 時間暴露して遺伝子導入し, その発現をフローサイトメーターで解析したところ, 2 日目には最高で 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. さらに, 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ると, 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. 同様に細胞質内で発現するアデノウイルスベクター, アデノ随伴ウイルスベクターを用いた実験では, 遺伝子導入効率はいずれも 20% 以下と低く, 発現も 7 日後には 1% 以下にまで低下した. 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が示された.
2. 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. 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, 嚢状の胚様体, 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 の発現が減弱せず, 導入遺伝子発現の「サイレンシング」は起こらないことが示された.

3. 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) の増幅を行ったところ、SeV ゲノム由来のバンドを検出し、細胞内で SeV ゲノムの自己複製が行われていることが示された。一方、ゲノム DNA を抽出して、DNA-PCR にて SeV ゲノム配列 (580bp) および GFP の cDNA (356bp) 配列の増幅を行ったところ、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示された。
4. 導入遺伝子の発現を抗ウイルス剤投与によって調節可能か検討した。まず、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 日目から各濃度 (0-4 mM) の抗ウイルス剤リバビリンを投与し、培養を継続した。赤血球凝集試験にて細胞内のウイルス粒子量を測定すると、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 細胞に各濃度 (0-4 mM) の抗ウイルス剤リバビリンを投与し、培養を継続した。ES 細胞でもリバビリン投与によって濃度依存性に GFP の発現が減弱した。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、リバビリン投与終了後も細胞の継代は可能だったが、GFP の発現は投与前のレベルまで戻った。
5. 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 (初期中杯葉細胞に相当、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吊り上げて DNA を抽出し、カニクイザルに特異的な $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2$ -MG) 遺伝子に対するコロニー PCR 法で解析した。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。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。免疫寛容状態のヒツジ胎仔体内で、サル ES 細胞が生着して造血系に分化誘導されたことが示された。
6. 出生した 4 頭のうち 2 頭に対して、ヒツジ本来の内因性の造血に対してサルの造血を選択的に刺激する目的で、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。サル由来造血前駆細胞 (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%)、その後ヒト 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。サル由来細胞はヒト SCF 投与後に末梢血中でも検出されたが、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。サル/ヒツジ造血比率はヒト SCF を投与することによって選択的増幅効果が得られることが示された。

以上、本論文はヒト ES 細胞のモデルとしてカニクイザル ES 細胞を用い、F 欠失型 SeV ベクターによって、安全で効率よく長期間安定に発現する遺伝子導入法を確立した。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。ウイルスベクターを用いて遺伝子導入した ES 細胞の遺伝子発現を抗ウイルス剤を用いて調節するという試みは新しいアプローチである。この遺伝子導入方法で霊長類 ES 細胞に任意の遺伝子を導入し、更に、発現調節できるようになると期待され、霊長類 ES 細胞の基礎実験および臨床応用に対する重要な貢献をなすと考えられる。

続いて、In vitro で初期中胚葉細胞に分化誘導したサル ES 細胞をヒツジ胎仔肝臓に移植することによって in vivo の体内微小環境を利用した造血系分化誘導を行い、サル／ヒツジ造血キメラの作成に成功した。サル／ヒツジの造血比率は、ヒト SCF 投与によって移植細胞の選択的増幅効果が得られた。これらの結果は、キメラヒツジ骨髄中におけるサル ES 細胞由来の造血幹細胞の存在を示唆している。この系は幹細胞のアッセイ系として有用であると考えられる。さらに、将来のヒト ES 細胞を用いた細胞移植療法に対する重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。