

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成14年度博士課程入学

氏名 松浦 忍

指導教員 辻本 元

論文題目

Studies on induction of chemoresistance by transfer of *mdr1* gene in canine hematopoietic stem cells

(犬の造血幹細胞への *mdr1* 遺伝子導入による薬剤耐性誘導に関する研究)

リンパ腫は犬において最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、その症例のほとんどが致死的な経過をたどることから、小動物臨床において大きな問題となっている。本疾患に対する治療法の第一選択は多剤併用化学療法である。獣医学領域においては、1970年代から1990年代にかけて化学療法プロトコルの改良によってその治療成績が向上し、1991年に導入されたシクロフォスファミド、ドキソルビシン(ヒドロキシダウノルビシン)、ビンクリスチン(商品名:オンコビン)およびプレドニゾロンを組み合わせたCHOPプロトコルではその生存期間の中央値が約1年となったが、その後に関与されたプロトコルではこれ以上の成績が得られず、現在の治療方針による限界が見えてきている。そこで、高用量化学療法の導入が考えられるが、抗癌剤の投与量の増大に伴い、骨髄抑制を中心とした副作用の増強が問題となる。そこで、高用量化学療法を用いた場合の骨髄抑制回避の手段として自家骨髄移植に着目した。

自家骨髄移植では、治療初期に採取・保存した自家骨髄細胞を高用量化学療法時に症例に戻すことによって末梢血液中の血球数を回復させることを目的とする。従来の自家骨髄移植は全骨髄細胞の移植を基本に行われてきたが、近年、造血幹細胞に発現しているCD34に対する抗体を利用して単離した幹細胞による移植が主流となりつつある。造血幹細胞は自己複製能および多分化能を有する細胞であり、少数の細胞の移植でその個体の造血機能を維持することが可能となる。

高用量化学療法において考慮すべきもう一つの問題点は、造血幹細胞自身の抗癌剤に対する感受性・耐性の程度である。移植した造血幹細胞およびそれに由来する血球が抗癌剤によって容易に死滅してしまう場合には、自家骨髄移植の効率が大きく損なわれる。そこで、本研究では、多剤耐性遺伝子である *mdr1*(*multidrug resistance1*)遺伝子を移植する造血幹

細胞に導入することによって、造血幹細胞に薬剤耐性を賦与したいと考えた。*mdr1* 遺伝子は ABCB1 ファミリーの細胞膜タンパクである P-糖タンパク(P-gp)をコードする。P-gp は、ATP 依存的に薬剤の細胞外排出を選択的に行い、代表的な薬剤耐性関連タンパクとして注目されている。また、リンパ腫に対して主として用いられている抗癌剤であるドキソルビシン、ビンクリスチン、ミトキサントロン、ビンブラスチンなどは P-gp によって細胞外に排出されることが知られている。

本論文における一連の研究は、*mdr1* 遺伝子導入による犬の造血幹細胞の薬剤耐性誘導システムを構築することを目的として行ったものである。第 1 章においては、犬の *mdr1* 遺伝子をコードするレトロウイルスベクターを作製し、これを感染させることによって犬の腎臓由来培養細胞株に P-gp を発現させた。第 2 章では、自家骨髄移植および遺伝子治療に用いる犬の CD34⁺造血幹細胞を骨髄から単離する方法を検討し、それら細胞の多分化能を解析した。第 3 章では、単離した犬の CD34⁺造血幹細胞にレンチウイルスベクターを用いて *mdr1* 遺伝子を導入し、薬剤耐性誘導効果を検討した。

第 1 章：犬の培養細胞株におけるレトロウイルスベクターを用いた *mdr1* 遺伝子導入による薬剤耐性誘導

造血幹細胞を用いた遺伝子治療では、細胞の増殖分化後も導入遺伝子の発現が維持されるシステムが必要であるため、宿主ゲノムに組み込まれるレトロウイルス系の遺伝子導入ベクターを用いた。ここでは、Moloney murine leukemia virus ゲノムをもとにして作製されたレトロウイルスベクターにイヌ *mdr1* 遺伝子を組み込み (pLNCcMDR1)、RD114 ウイルスのエンベロープタンパクを発現するパッケージング細胞を用いて犬細胞に対して高い感染効率を有する組み換えベクターウイルスを作製した。この pLNCcMDR1 レトロウイルスベクターを犬腎由来細胞株である MDCK 細胞に感染させ (MDCK/*cmdr1* 細胞)、イムノブロット法によって解析したところ、P-gp の発現が確認された。P-gp の機能の評価には、P-gp によって排出される蛍光色素である Rhodamine 123 (Rh123) の排出能機能をフローサイトメトリーで解析した。その結果、MDCK/*cmdr1* 細胞の細胞内蛍光強度は遺伝子を導入していない MDCK 細胞の蛍光強度の 1/5 分に低下していた。このことから、MDCK/*cmdr1* 細胞においては P-gp によって薬剤が能動的に排出されることが示された。さらに、リンパ腫の治療に実際に用いられる抗癌剤に対する薬剤耐性を IC₅₀ (50% inhibitory concentration) によって評価したところ、MDCK/*cmdr1* 細胞は親株の MDCK 細胞に比べ、ドキソルビシンに対して 25 倍、またビンクリスチンに対して 59 倍の薬剤耐性を示すことが明らかとなった。

第 2 章：犬の骨髄由来 CD34 陽性造血幹細胞の単離およびその多分化能の解析

本章では、自家骨髄移植およびそれを用いた遺伝子治療の開発のため、犬における骨髄由来造血幹細胞の単離とその多分化能の解析を行った。吸入麻酔下で実験犬の上腕骨および

大腿骨から骨髓を吸引し、得られた骨髓細胞から比重遠心法によって骨髓単核細胞を得た。この骨髓単核細胞から犬CD34⁺造血幹細胞を単離するため、ブロッキング血清（イヌ、ヤギ、マウス、ウシ）、一次抗体（1H6 および 2E9、PE標識、ビオチン標識、未標識）および磁気ビーズ標識二次抗体（抗PE抗体、抗ビオチン抗体、抗マウスIgG抗体）の種類および反応時間を検討した。その結果、イヌ血清をブロッキングに用い、未標識 1H6 抗体を 15 分間反応させ、二次抗体として抗マウスIgG抗体のを 10 分間反応させた場合、90%以上の純度の犬CD34⁺造血幹細胞を単離することができた。

培養液としてIMDMおよびRPMI1640 の 2 種類の培養液を検討したが、いずれにおいてもCD34 分子の発現低下が認められ、幹細胞としての性状が維持されないことが示された。そこで、無血清培地にイヌSCF (stem cell factor)を添加した培地を用いて培養を行ったところ、3 日間の培養でもCD34 の消失は認められなかった。次に、メチルセルロース混合コロニー形成法を用い、単離した犬CD34⁺造血幹細胞の多分化能を評価した。培地に、rhSCF、rhGM-CSF、rhIL-3、rhIL-6、rhG-CSF、rhEPO、およびイヌのPHA-LCM（PHA刺激白血球培養上清）を添加したメチルセルロース培地で犬の骨髓由来CD34⁺細胞を培養した結果、14 日目には、CFU-GEMMをはじめ、CFU-GM、CFU-G、CFU-M、BFU-E といった多系統のコロニーが形成され、単離した犬の骨髓由来CD34⁺細胞が造血幹細胞特有の多分化能を有することが明らかとなった。

第3章: 犬のCD34⁺造血幹細胞におけるレンチウイルスベクターを用いた*mdr1* 遺伝子導入による薬剤耐性誘導

第1章で用いたレトロウイルスベクターは、細胞分裂の盛んな細胞株に対しては高い遺伝子導入効率を示したが、細胞分裂をあまり行わないCD34⁺造血幹細胞に対しては低い遺伝子導入効率しか示さないことがわかった。そこで、本章では、非分裂細胞にも感染が可能なレンチウイルスベクターを用い、犬のCD34⁺造血幹細胞への*mdr1* 遺伝子導入を試みた。はじめに、その遺伝子導入効率を検討するため、GFP (green fluorescent protein) を発現するレンチウイルスベクター (pWPXL-GFP)を犬の骨髓由来CD34⁺細胞に感染させたところ、感染 48 時間後には 10~20%の細胞がGFP陽性となり、そのほとんどの細胞がCD34 マーカーを維持していた。これら細胞のメチルセルロース培地コロニー形成能を調べたところ、非感染細胞と同様に多様なコロニーの形成が認められ、10~20%のコロニーがGFP陽性であったことから、本システムは犬CD34⁺細胞への遺伝子導入に有用であると判断された。次に、イヌ*mdr1* 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクター (pWPXL-cMDR1) を作製し、同様にして犬の骨髓由来CD34⁺細胞への遺伝子導入を行った。その結果、感染後 48 時間後には免疫染色でP-gpの発現が認められるようになった。さらに、Rh123 の排出能を調べたところ、pWPXL-cMDR1 を導入した犬の骨髓由来CD34⁺細胞ではRh123 を排出する細胞が約30%増加していることが明らかとなった。次いで、pWPXL-cMDR1 ベクターを導入した犬CD34⁺細胞のドキシソルピシン存在下におけるメチルセルロースコロ

ニー形成を検討した。その結果、ドキソルビシン治療時における血中濃度に相当する範囲では、*mdr1* 遺伝子導入犬CD34⁺細胞を用いた場合には、非導入犬CD34⁺細胞と比較して、有意にコロニー形成率の増加が認められ、また通常のコロニー形成法において認められた多様な系統のコロニーが形成されることがわかった。

本研究においては、はじめに犬の*mdr1* 遺伝子導入系を立ち上げ、次いで犬の骨髄由来CD34⁺造血幹細胞を単離する方法を確立し、最後に*mdr1* 遺伝子の導入によって犬の骨髄由来CD34⁺造血幹細胞に抗癌剤耐性を賦与することに成功した。こられの成果は、犬においてCD34⁺造血幹細胞を用いた自家骨髄移植および遺伝子治療を臨床応用するための基盤をかたち作るものであり、臨床的に大きな問題となっているリンパ造血系腫瘍性疾患に対する治療に新たな展開をもたらすものと考えられた。