

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松浦 忍

## 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)

リンパ腫に対する第一選択治療法は多剤併用化学療法であるが、近年この治療法での生存期間の中央値は1年で頭打ち状態となっており、治療方針による限界が見えてきている。そこで、自家骨髄移植併用高用量化学療法による治療法が考えられる。自家骨髄移植では、治療初期に採取・保存した骨髄細胞を症例に戻すことによって末梢血血球数を回復させることが可能である。近年は全骨髄細胞に代わり、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞移植が主流となりつつある。CD34<sup>+</sup>造血幹細胞は自己複製能/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できるため、遺伝子治療の開発のためにも用いられる。

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、造血幹細胞の抗癌剤に対する感受性・耐性である。そこで、本研究では、多剤耐性遺伝子である *mdr1* (*multidrug resistance 1*) 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* 遺伝子は薬剤の細胞外排出を選択的に行う P-糖タンパク(P-gp)をコードする。リンパ腫の治療に用いられているドキソルビシン、ビンクリスチンなどの抗癌剤は P-gp によって細胞外に排出される。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: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維持が必要であるため、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である Moloney murine leukemia virusゲノム由来ベクターを用いて、イヌ *mdr1* 遺伝子をコードする RD114 エンベロープシュードタイプのウイルスベクターを作製した (pLNCcMDR1)。このウイルスベクターを MDCK 細胞 (犬腎由来細胞株細胞) に感染させたところ (MDCK/*cmdr1*細胞) イムノプロット法によって P-gp タンパクの発現が確認された。P-g

p 特異的に排出される蛍光色素Rhodamine 123 (Rh123)の排出機能を測定したところ、MDCK/*cmdr1* 細胞ではMDCK細胞に比べ排出量が1.5倍増加していることが明らかになった。さらに、IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) を調べたところ、MDCK/*cmdr1* 細胞は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

犬CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を単離するための最適な条件の検討には、骨髄単核細胞をブロッキング血清（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）と反応させ、得られたCD34<sup>+</sup>細胞の純度を測定した。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抗体を10分間反応させると、90%以上の純度の犬CD34<sup>+</sup>造血幹細胞が単離できることが分かった。次に、単離した細胞を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）添加メチルセルロース培地で培養した結果、14日目には、CFU-GMをはじめ、CFU-G、CFU-M、BFU-Eといった多系統のコロニーが形成され、造血幹細胞特有の多分化能が認められた。

## 第3章：犬のCD34<sup>+</sup>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CD34<sup>+</sup>造血幹細胞のような非分裂細胞に対して遺伝子導入効率が低いため、本章では、レンチウイルスベクターを用いて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CD34<sup>+</sup>細胞に感染させたところ、48時間後には18.32%の細胞がGFP陽性となり、これら細胞のメチルセルロース培地コロニー形成法では、10~20%のコロニーがGFP陽性であった。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、同様に遺伝子導入を行ったところ、感染後48時間後には免疫染色でP-gpの発現が認められ、さらに、Rh123の排出能は非導入CD34<sup>+</sup>細胞に比べ、30%増加していた。次いで、*mdr1* 遺伝子導入した犬CD34<sup>+</sup>細胞をドキソルビシン存在下のメチルセルロースで培養したところ、コントロールベクター (pWPXL-GFP) 導入細胞と比較して、有意にコロニー形成率の増加が認められ、非感染細胞と同様に多様なコロニーの形成が認められた。

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>造血幹細胞に抗癌剤耐性を賦与することに成功した。これらの成果は、犬におい

てCD34<sup>+</sup>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、博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認められた。