

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 揚山直英

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有することから、遺伝子治療の理想的な標的細胞として期待されている。近年、X連鎖重症複合免疫不全症を対象とした造血幹細胞による遺伝子治療で、極めて優れた治療効果が公表され脚光を浴びた。しかし、後にこの患者らが白血病を発症した事が報告され深刻な問題となった。このことより、造血幹細胞を用いた遺伝子治療の安全性・有効性評価を行うためにはヒトに近縁なサル類において造血幹細胞自家移植システムを用いた前臨床評価系が全世界的に必須となった。本研究はその評価系のための基盤技術の開発を目指したものである。

造血幹細胞は骨髓、末梢血、臍帯血のいずれからも採取できるが、臨床応用のソースとしてはサイトカイン動員末梢血幹細胞が最も理想的である。このためサル類での採取方法の開発が求められる。サイトカイン動員末梢血幹細胞を採取する際の体外循環、移植時の輸血や採血などの指標として、サル類の正確な循環血液量を算出する必要がある。カニクイザルのオス34頭、メス30頭を対象として、エバンスブルーを静脈内投与し、その希釈率から循環全血量を求めた。その結果、体重6キロ以上のオスを除き、全血量と体重との間に正の相関が認められ、循環全血量算出式を樹立する事ができ、サイトカイン動員末梢血幹細胞採取時の体外循環も効率良く行う事を可能とした(第1章1節)。

サイトカイン動員末梢血幹細胞は体重の小さい動物において安全かつ有効に行うことは困難であるため、サル類に適応可能な採取法の新規開発を試みる必要があった。既存の方法より体外循環量を縮小し、さらにポンプスピードをコントロールし、より安全な改善法を開発し、アカゲザル9頭において施行を行った。その結果、貧血などの副作用が無く、移植に必要な十分な量の単核球、骨髓幹細胞(CD34陽性細胞)を採取することができた。続いて、改善前と改善後の方法を、それぞれ6頭ずつのカニクイザルを用いて施行し、細胞数や血液データの比較を行い、有効性・安全性を評価した。その結果、改善前に比べ改善後の方法で各種細胞の採取効率上昇が有意に認められ、貧血などの副作用は有意に減少した(第1章2節)。

造血幹細胞による遺伝子治療の評価のためには人と最も近縁なサル類において、実際に遺伝子導入した造血幹細胞を移植し評価する必要があることから、カニクイザルを用いて造血幹細胞移植法の樹立を試みた。骨髓もしくはサイトカイン動員末梢血幹細胞からCD34陽性細胞を分離し、全身放射線照射を行い骨髓抑制したサルに自家移植を行った。移植後サルを無菌室に収容し、必要に応じ中心静脈栄養、輸血、抗生剤投与等の管理を行ったところ、サルの造血はいずれも約3週間以内に再構築された。このように様々な集中管理を行い、より安全に造血幹細胞の定着を促すことができる造血幹細胞移植モデルとそのプロトコルを樹立した(第2章1節)。

第2章2節ではサル類を用いた造血幹細胞移植に際して解決すべき主要な問題点の克服を試みた。サル類を用いた遺伝子治療の前臨床評価を行う場合は、ヒト由来遺伝子や組換えタンパク質をサル類に投与する必要があるが、このタンパク質に対する抗体が産生され実験に支障を

きたすことがある。本研究ではカニクイザル2頭を用いてヒトエリスロポエチン (hEPO) を単独で皮下および静脈内投与し、続いて2頭のカニクイザルを用いてシクロスポリン (CyA) の筋肉内投与を行い、血中の hEPO 濃度、抗 EPO 抗体濃度を ELISA により測定した。hEPO 単独投与を行ったサルでは、hEPO に対する中和抗体が速やかに産生され、血中からの hEPO 濃度減少が確認された。一方 CyA の筋肉内投与により、同時投与した hEPO に対する中和抗体の産生が抑制され、hEPO の血中濃度もほとんど変化せず安定に維持できた。CyA を併用投与する事により、カニクイザルにおいてヒト組換え EPO に対する抗体産生を抑制する方法を樹立することが出来た (第2章2節)。

以上の結果より、ヒトに近縁なサル類を用いた造血幹細胞による遺伝子治療法の安全性・有効性評価系を確立するための基盤技術を樹立する事ができた。この系を用いて一部の遺伝子治療の前臨床レベルにおける評価が進み、さらに、本評価系は将来における再生医療、移植医療の進展に大きく寄与することが予想される。本研究はヒトへのトランスレーショナル研究として、その基盤技術は国際的にも広く利用されるものである。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。