

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 16 年度博士課程 入学
氏名 井手 香織
指導教員 辻本 元

論文題目

Basic Studies for the Clinical Application of Bone Marrow Transplantation in Dogs

(犬における骨髄移植療法の臨床応用に向けた基盤的研究)

小動物臨床においてリンパ腫は発生頻度の高い悪性腫瘍の一つである。その治療の第一選択は抗癌剤の多剤併用療法であり、現在の標準的化学療法プロトコルを用いた場合には多中心型リンパ腫症例の約 80%で寛解導入が可能である。これまでに数多くの化学療法プロトコルが検討されてきたが、いずれの場合にも生存期間の中央値には約 1 年という壁があり、現在の方法ではこれ以上の治療成績の向上は望めない状況にある。

医学領域ではリンパ腫の治療に骨髄移植を組み合わせた強化化学療法が標準的手法として取り入れられている。骨髄移植を併用した複数の臨床試験において、以前には副作用のために不可能であった高用量の抗癌剤の投与が可能となり、治療成績が有意に向上したことが報告されている。

このような背景から、犬における骨髄移植療法の導入はリンパ腫をはじめとする悪性腫瘍の治療成績を著しく向上させる可能性があると考えられた。最近になって、リンパ腫の犬に対して自家骨髄移植を組み合わせた高用量化学療法を行った結果が報告され、実際に、生存期間を延長させ得る可能性が示された。犬は以前より骨髄移植研究のモデル動物として用いられてきたが、より確実に骨髄移植の臨床応用をめざすためには多くの検討課題が残されている。そこで本研究においては、犬の骨髄移植療法の臨床応用に向けた基盤的研究として、犬の骨髄単核細胞および骨髄 CD34 陽性造血幹細胞の凍結保存方法を検討するとともに、造血幹細胞の増幅に関与すると考えられている *Hox*, *Wnt*, *SHH* およびその関連遺伝子の発現を犬の CD34 陽性造血幹

細胞およびそれに由来する *in vitro* 血球コロニーにおいて解析した。

I: 犬の骨髄単核細胞の凍結保存法に関する検討

骨髄移植を効率よく行うためには、骨髄細胞をクオリティーの高い状態で長期間保存できることが重要である。動物種にかかわらず、従来から 10% dimethylsulfoxide (DMSO)を含む培養液または牛胎子血清 (FCS)が凍害保護剤として用いる凍結保存法がゴールドスタンダードとされてきた。しかし、DMSO は、顆粒球の溶解・凝集形成を誘発し、融解後の細胞回収率を低下させるとともに、移植後の副作用と関連することが欠点とされてきた。そこで新たに hydroxyethylstarch (HES)、DMSO、およびアルブミン (ALB)から成る凍害保護液が開発され、人の細胞において、その臨床的有用性が検討されている。これまで、犬の移植関連報告では 10% DMSO による凍結保存法しか用いられておらず、犬の骨髄細胞の凍結保存法について詳細に研究した報告はない。

本研究では、健常犬 5 頭から採取した骨髄単核細胞を、従来から用いられてきた 10% DMSO 添加 FCS (A 液)の他に、5% DMSO, 6% HES, および 4% ALB を添加した生理食塩水 (B 液)を用い、さらにプログラムフリーザー (PF)を用いた凍結法と通常の凍結保存用コンテナを用いた凍結法の 2 種類の凍結法を組み合わせ、計 4 通りの方法で凍結保存を行った。これら凍結細胞を、1 週間後、4 週間後、3 ヶ月後、および 6 ヶ月後に融解して細胞生存率、細胞回収率、CD34⁺細胞回収率、colony forming unit (CFU)回収率を測定し、その結果を凍結前の細胞におけるものと比較した。

その結果、凍結 1 週間後における細胞生存率は、B 液を用いて通常の凍結コンテナで凍結させた細胞(B 群 : 90%)、B 液を用いて PF で凍結させた細胞(B+PF 群 : 86%)、A 液を用いて PF で凍結させた細胞(A+PF 群 : 83%)、A 液を用いて通常の凍結コンテナで凍結させた細胞(A 群:73%)の順に高く、6 ヶ月後まではほぼ同じ値が保たれた。細胞回収率は、6 ヶ月後の時点において、PF を用いた群 (A+PF 群: 84%, B+PF 群: 86%) で PF を用いていない群 (A 群: 48%, B 群: 57%) よりも高い傾向が認められた。CD34⁺細胞回収率に関しても、PF を用いた群で高い傾向が認められた。一方、最も重要な指標と考えられる CFU 回収率は 4 群の間に大きな差が認められた。CFU 回収率は全体を通して PF を用いた群の方が用いていない群よりも有意に高かったが、6 ヶ月後においては、B+PF 群が 83%を示し、その他 3 群よりも有意に高い値を示した。

以上の結果より、犬の骨髄単核細胞の凍結保存には 5% DMSO/6% HES/4% ALB から成る凍害保護液および PF を用いて凍結する方法が、検討した 4 つの方法の中で最適であることが示された。

II: 犬の CD34 陽性造血幹細胞の凍結保存法に関する検討

自家骨髄移植において移植細胞に混入した腫瘍細胞を除去するため、および遺伝子導入の標的細胞として骨髄細胞を用いるためには、骨髄から CD34⁺細胞(造血幹細胞)を単離する必要がある。また CD34⁺細胞は各種臓器における再生医療にも利用されようとしている。したがって、純化した CD34⁺細胞のクオリティーを維持したまま凍結保存する方法の開発はその応用範囲が広いものと考えられる。これまで、CD34⁺細胞に限定した凍結保存法を検討した報告は人においても少なく、犬においては全く見あたらない。第 1 章の結果から、犬の骨髄細胞の凍結保存における 5%DMSO/ 6%HES/ 4%ALB 混合液の有用性が示された。そこで本章では犬の骨髄由来 CD34⁺細胞について同様に凍結保存法に関する比較検討を行った。

健康犬 5 頭の骨髄単核細胞から抗犬 CD34 モノクローナル抗体を用いた Magnetic activated cell separation (MACS)によって CD34⁺細胞分画を採取した。凍結から 1 週間後、4 週間後、3 ヶ月後、6 ヶ月後に細胞生存率、細胞回収率、および CFU 回収率を測定し、それらを凍結前の結果と比較した。

その結果、細胞生存率は、凍結 1 週間後から PF の有無にかかわらず B 群の方が A 群よりも高かった。6 ヶ月後における生存率は、B 群および B+PF 群では 70%以上であったのに対し、A 群および A+PF 群では 20%未満であった。CFU 回収率に関しても、B 液を用いた群は A 液を用いた群よりも有意に高く、4 週間後以降は B+PF 群で最も高い値が得られ、6 ヶ月後においても 85%と高値を示した。

以上の結果より、犬の骨髄 CD34⁺細胞の凍結保存においても、5% DMSO/6% HES/4%ALB 混合液を用いて PF による凍結を行った場合に、最も良好な細胞のクオリティーが保たれることが示された。

III: 犬の CD34 陽性造血幹細胞および *in vitro* 血球コロニーにおける *Hox*, *SHH*, *Wnt* 遺伝子の発現解析

人およびマウスにおいて、Homeobox (*Hox*)、Sonic hedgehog (*SHH*)、および Wingless-type (*Wnt*) は造血幹細胞の自己複製に関与する重要な転写因子およびシグナル伝達因子として注目されるようになった。造血幹細胞を大量に採取することは困難であるため、これら細胞を *ex vivo* で増幅するシステムの開発が望まれている。従来から数種類のサイトカインの組み合わせを添加する手法が試みられてきたが、犬では人やマウスと異なり入手可能なリコンビナントサイトカインに限られるため、種間でよく保存されているこれら因子の利用が期待される。

造血幹細胞の自己複製に重要と考えられている遺伝子とその関連遺伝子として、*HoxB3*, *HoxB4*, *HoxA10*, *SHH*, *PTCH1* (*SHH* レセプター), *Wnt5a*, *Wnt2b*, *Fzd* (*Wnt* レセプター)1, *Fzd6* 遺伝子を選び、はじめに犬におけるこれら遺伝子の転写産物の部分クローニングを行い、その塩基配列を決定した。その配列に基づき、リアルタイム定量 PCR 用のプライマーを設計した。犬の骨

髓単核細胞、骨髓由来 CD34⁺分画、CD34⁻骨髓単核細胞、骨髓ストローマ細胞、および各系統の *in vitro* 血球コロニーについて、これら遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR によって定量した。

骨髓由来 CD34⁺分画における *HoxB3*, *HoxA10*, *PTCH1*, および *Wnt5a* 遺伝子の発現量は CD34⁻分画におけるこれら遺伝子の発現量よりも有意に高かった。また、顆粒球系、単球系、赤芽球系およびこれらの混合コロニーといった各種 *in vitro* 血球コロニーにおける *HoxB3*, *HoxA10*, *PTCH1*, *Wnt5a*, および *Wnt2b* 遺伝子の発現量は、CD34⁺分画におけるこれら遺伝子の発現量よりも有意に低かった。

人の造血幹細胞においては、とくに *HoxB3*, *HoxB4*, *HoxA10* といった遺伝子の発現が高く、これらの分子が造血幹細胞の自己複製、幹細胞としての性状の保持、およびそのアポトーシスの抑制に関与している証拠が徐々に明らかになりつつある。今回の結果は、これら分子が犬の造血幹細胞においても同様の機能を有する可能性を示唆するものと考えられた。

骨髓移植療法は、リンパ腫など各種腫瘍性疾患における高用量化学療法や放射線療法における血球回復への利用のみならず、遺伝子治療における *ex vivo* 遺伝子導入、および各種臓器の再生医療といった新しい治療法の開発において重要な位置を占める。本研究は、犬における骨髓移植療法の臨床応用に向けた基盤的研究を行い、骨髓単核細胞および骨髓由来 CD34⁺造血幹細胞の優れた凍結保存法を明らかにするとともに、造血幹細胞の自己複製に関与する重要な分子について基礎的知見を提示した。本研究によって得られた成果は、犬における骨髓移植療法の一般化に向けて有用な知見を提供するものと考えられる。