

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井手 香織

### 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)

犬のリンパ腫に対する治療の第一選択は抗癌剤の多剤併用療法であるが、各種プロトコルを検討してもその生存期間中央値を1年よりも長くすることは困難であり、その治療成績を改善できない状況にある。医学領域では自家骨髄移植を併用した高用量化学療法が開発され、これまで副作用のために不可能であった高用量抗癌剤投与が可能となったことにより、人の非ホジキンリンパ腫における治療成績が向上している。最近になって、犬のリンパ腫においても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、生存期間を延長させ得る可能性が示された。これまで、犬は骨髄移植研究のモデル動物として用いられてきたが、獣医学領域において有効で安全な骨髄移植を臨床で実施するためには多くの検討課題が残されている。そこで、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の一連の研究を行った。

### 第1章: 犬の骨髄単核細胞の凍結保存法に関する検討

骨髄移植を効果的に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することが重要である。従来から凍害保護液のゴールドスタンダードとされてきた 10% dimethylsulfoxide (DMSO)を含む溶液は、融解後の細胞回収率を低下させることや、移植後に副作用を引き起こすことがその欠点とされてきた。その後、Hydroxyethylstarch (HES)、DMSO、およびアルブミン (ALB)を含む凍害保護液は、人の細胞の凍結保存を行う際に上記の欠点を補うことが示された。本研究では、健康犬の骨髄単核細胞を 10% DMSO 添加牛胎子血清(FCS) (A液)と 5% DMSO、6% HES、および 4% ALB を含む生理食塩水 (B液)の凍害保護液としての有用性を比較するとともに、プログラムフリーザー (PF)を用いた冷却法と凍結用コンテナを通常のフリーザー内で冷却する方法の 2 種類を比較し、合計 4 種類の凍結保存法を比較検討した。その結果、B液を用いて凍結保存した骨髄単核細胞において A液を用いて凍結保存したものよりも高い細胞生存率が得られた。骨髄単核細胞の凍結保存における総細胞回収率および CD34<sup>+</sup>細胞回収率は、A液、B液のいずれの場合にも、PFを用いた群において凍結用コンテナを用いた群よりも高かった。Colony forming unit (CFU)回収率に関しても、PFを用いた群において凍結用コンテナを用いた群よりも高い値が得られ、とくに B液を用いて PFで冷却した場合には 6ヶ月後においても 83%と高い CFU 回収率が得られた。以上の結果から、犬の骨髄単核細胞を凍結保存する場合には、5% DMSO/6% HES/4% ALB を含む凍害保護液を用いて PFで冷却する方法が適していることが示された。

## 第2章: 犬の CD34 陽性造血幹細胞の凍結保存法に関する検討

腫瘍性疾患症例の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場合や、遺伝子導入の標的として骨髄細胞を用いる場合、純化した CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を用いる必要がある。そこで本章では、犬の骨髄由来 CD34<sup>+</sup>細胞の凍結保存法を第1章と同様に比較検討した。その結果、細胞生存率は冷却法にかかわらず B 液群において A 液群よりも高い値が得られた。CFU 回収率に関しても B 液群において A 液群よりも高い値が得られ、B 液を用いて PF で冷却した場合に最も高く、6 ヶ月後においても 85% と高い CFU 回収率が得られた。以上の結果から、犬の骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞に関しても、5%DMSO/6%HES/4%ALB から成る凍害保護液を用いて PF で冷却する凍結保存方法が適していることが示された。

## 第3章: 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

移植療法においては造血幹細胞を *ex vivo* で増幅するシステムの開発が望まれている。ヒトやマウスにおいて、*Hox*、*SHH*、および *Wnt* は造血幹細胞の自己複製に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ている。その利用を実際化するための基礎的知見を得るため、*HoxB3*, *HoxB4*, *HoxA10*, *SHH*, *PTCH1*, *Wnt5a*, *Wnt2b*, *Fzd1*, *Fzd6* 遺伝子を選び、犬のこれら遺伝子の部分的な cDNA 塩基配列を決定した。リアルタイム定量 PCR を用い、犬の骨髄単核細胞、骨髄 CD34<sup>+</sup>分画、CD34<sup>+</sup>骨髄単核細胞、および各種 *in vitro* 血球コロニー細胞における上記遺伝子の発現レベルを定量した。*HoxB3*, *HoxA10*, *PTCH1*, および *Wnt5a* 遺伝子の発現量は、骨髄 CD34<sup>+</sup>分画において CD34<sup>+</sup>分画よりも高かった。また、CD34<sup>+</sup>分画における *HoxB3*, *HoxA10*, *PTCH1*, *Wnt5a*, および *Wnt2b* 遺伝子の発現量は、各種 *in vitro* 血球コロニーにおけるこれら遺伝子の発現量よりも高かった。今回の結果から、これら分子が犬の造血幹細胞においてもその維持や自己複製といった機能を有する可能性が示唆された。

本研究は、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を行ったものであり、骨髄単核細胞および骨髄由来 CD34<sup>+</sup>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するものである。本研究によって得られた成果は、犬における骨髄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。

本申請論文を審査した結果、博士（獣医学）の学位を授与するに値すると判断した。