

論文の内容の要旨

論文題目 組織幹細胞を用いた高脂血症マウスの遺伝子・細胞治療モデルの確立

指導教員 中内啓光教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 太田春彦

第 1 章 序論

現在、臓器の機能が失われ一般的な治療が不可能な症例に対して、臓器移植が行われるようになってきているが、ドナー不足や拒絶反応に代表されるように課題も多い。そのため、代替手段として幹細胞などを用いた再生医療が注目されており、例えば、体外に取り出して選別・活性化・増幅などの処理を行った細胞を投与する「細胞治療」や、組織幹細胞をはじめとした寿命の長い細胞に遺伝子を導入する「遺伝子治療」などがあり、さらにこれらを組み合わせて行うことも考えられている。しかし効果と安全性の面で依然として様々な問題があるため、疾患モデルマウスを用いた基礎研究が必要とされている。

Apolipoprotein E ノックアウト (ApoE^{-/-}) マウスでは高脂血症・動脈硬化が起こることが知られている。このマウスに正常マウスの骨髄を移植すると、移植された造血幹細胞から分化したマクロファージが **ApoE** 蛋白を分泌することによって治療が可能であることから、骨髄中の造血幹細胞に正常遺伝子を導入することによっても治療が可能であると考えられているが、過去の報告では導入効率が低く、十分な効果が得られていなかった。本研究では、蛍光励起細胞分離法 (**fluorescence-activated cell sorting; FACS**) を用いて濃縮した造血幹細胞に遺伝子導入を行うことで、治療成績の向上を目指した (第 3 章)。

正常 **ApoE** 蛋白が肝細胞でも産生されることから、肝幹細胞を用いた細胞治療や遺伝子治療も考えられるが、そもそも健康な成体で肝幹細胞が存在するか否かもまだ明らかになっていない。一方で胎生中期の肝臓には、肝細胞と胆管上皮細胞の二方向の分化能・自己複製能・高い増殖能をもつ肝幹/前駆細胞が存在し、その性質や分化のメカニズムを解明することは、成体肝臓の再生機構を理解する上でも重要と考えられているが、その表現型はまだあまり明らかになっていない。本研究では、**FACS** を用いて表面抗原マーカーのスクリーニングを行い、胎仔肝幹/前駆細胞をより高度に純化することを試みた (第 2 章)。

第2章 肝幹／前駆細胞の表面抗原マーカーの探索

FACS を用いてマウス胎仔肝幹／前駆細胞を純化する試みが行われてきたが、既知の方法で得られた細胞画分のうちで二方向の分化能と高い増殖能を併せ持つ細胞の頻度は数%程度であり、マウス造血幹細胞が高度に純化可能であることと比較すると改善の余地がある。また、胎仔肝幹／前駆細胞がどのマーカー分子を発現しているのかというプロファイルも明らかになっていなかった。そこで、さまざまな表面抗原に対する抗体を用いて胎生中期の肝幹／前駆細胞を純化することが可能か否かを、既知の肝幹／前駆細胞マーカーDlk と比較して検討した。

まず、マウス E13.5 胎仔肝から調製した細胞浮遊液を、Dlk 抗体とさまざまな抗体を組み合わせて染色し、FACS を用いて解析した。Dlk⁺CD45⁻Ter119⁻の肝幹／前駆細胞画分で特に高い CD13 の発現がみられたため、この画分を Dlk と CD13 の発現の程度によりさらに細分してコロニーアッセイを行い、培養 5 日目に 100 個以上の細胞から成るコロニー (H-CFU-C コロニー) を計数すると、CD13 陽性画分からは Dlk の発現の程度に関わらず CD13 陰性画分と比較してより多くのコロニーが形成された。このことから、CD13 は Dlk と比較して肝幹／前駆細胞を濃縮するのにより有用なマーカー分子であることが示された。

そして、CD13⁺CD45⁻Ter119⁻を新たな肝幹／前駆細胞の指標として他の表面抗原の発現の有無を網羅的に検討したところ、肝幹／前駆細胞画分において CD9、CD26、CD29、CD54、CD73、CD98、CD106、CD133、CD147、Liv2 のほぼ均一な発現を認め、また CD81 と CD121a について不均一な発現を認めた。これらのうち、CD9、CD73、CD106、CD133 は非血液細胞について CD13 と同様の発現パターンを示し、肝幹／前駆細胞の純化に使用可能なマーカーであると考えられた。

次いで、CD13⁺CD45⁻Ter119⁻細胞における肝細胞マーカーAlb、未熟肝細胞マーカーAFP、胆管上皮細胞マーカーCK19 の発現を、in-droplet 免疫染色法によって検討したところ、Alb⁺AFP⁺CK19⁻であった。過去の報告とあわせると、CD13⁺CD45⁻Ter119⁻細胞を分取した時点では未熟な肝細胞寄りの性質を持っており、培養すると胆管上皮細胞寄りの性質を持つ細胞が増えてくるものと考えられた。

さらに、レトロルシン投与と 70%部分肝切除により人工的に肝障害を起こしたヌードマウスに、EGFP-Tg マウス胎仔 CD13⁺CD45⁻Ter119⁻細胞画分 1×10^5 個を経脾的に移植し、3 週後に開腹したところ、レシピエント肝臓はドナー由来細胞で高率に置換されていた。このことから、CD13⁺CD45⁻Ter119⁻細胞画分が *in vivo* で肝臓組織の再生に寄与することが示された。

第3章 高脂血症マウスの造血幹細胞を標的とした遺伝子治療モデル

造血幹細胞は表現型の解析が最も進んだ組織幹細胞であり、白血病などの悪性腫瘍や一部の単一遺伝子病の治療において造血幹細胞移植という形で応用されており、また遺伝子治療の分野において理想的な標的細胞のひとつと考えられている。しかし、造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の系では高い導入効率・治療効果と高い安全性を両立させることは困難な場合がある。ApoE(-/-)マウスの過去の遺伝子治療例では、全骨髄細胞や骨髄単核球細胞にマウスまたはヒト ApoE 遺伝子を導入したものの、導入効率が低かったために高コレステロール血症の改善はみられないものが多く、また長期間にわたって治療効果を示したものはなかった。そこで、FACS を用いて造血幹細胞と造血前駆細胞を含む骨髄 KSL 細胞を純化し、これを標的としてレトロウイルスで遺伝子導入を行う治療モデルを確立し、血中総コレステロール値の正常化と動脈硬化の阻止を試みた。

FACS を用いて ApoE(-/-)マウスから KSL 細胞を分取し、SCF と TPO を加えて刺激したのちにヒト ApoE 遺伝子と EGFP 遺伝子を導入し、致死量の X 線を照射した ApoE(-/-)マウスに移植した。8 週後に末梢血を解析すると、EGFP キメリズムは 60~80%程度であり、高い導入効率を達成することができたが、治療群の血漿ヒト ApoE 濃度はコントロールのヒト血漿の 1/100~1/200 程度の低値であり、対照群と比較して高コレステロール血症の改善はみられなかった。その原因として、骨髄移植におけるストレス環境によって移植細胞がヒト ApoE を産生できなくなっている可能性や、強制発現させたヒト ApoE がマウス細胞内で本来とは異なる修飾を受け正常な分泌が行われていない可能性が考えられた。