

ヒト造血因子遺伝子導入-SCID マウスの作製と応用

学位論文内容の要旨

[はじめに] 様々な血液疾患の治療のために造血制御機構の解明が望まれており、中でもヒト造血を再現した実験動物モデルの重要性が増している。しかし、造血系細胞の維持に必要な増殖因子の多くには種差が存在するため、ヒト造血系細胞は重度免疫不全動物であるSCIDマウスにも生着性が悪い。そこで、ヒト造血系細胞を増殖可能な実験動物の開発を目指して、ヒト造血因子遺伝子導入(Tg)-SCIDマウスの作製とそれらを用いた白血病モデルの開発および治療応用に関する検討を行った。今回の遺伝子導入実験には、ヒト-マウス間で交差性のない多機能増殖因子であるヒト(h)GM-CSFおよびhIL-3と、多種類の造血因子と相乗効果を示すhSCFを選んだ。

[方法および結果]

I ヒト造血因子遺伝子導入(Tg)-SCIDマウスの作製 ヒト造血因子Tg-SCIDマウス作製に用いた導入遺伝子は、多臓器に発現させるためにSR α プロモーターで駆動されるように構築した。今回は、1. SR α hGM-CSF/hIL-3遺伝子、2. SR α hGM-CSFとSR α hIL-3の2種類の遺伝子、3. SR α hSCF遺伝子、を各々BDF1の前核期受精卵に顕微注入した。

I-1 hGM-CSF Tg-SCIDマウスおよびhIL-3 Tg-SCIDマウスの作製 hGM-CSFとhIL-3を同時に産生するTgマウスを得るために、SR α hGM-CSFとSR α hIL-3遺伝子を同時に導入したTgマウスの作製実験を行ない、最終的に血清中に2-10 ng/mlの高濃度hGM-CSFのみを産生するhGM-CSF Tg-SCIDマウス(line I)と、1 ng/mlのhIL-3と0.05-0.2 ng/mlの低濃度hGM-CSFを同時に産生するhIL-3 Tg-SCIDマウス(line G)を確立した。

I-2 hGM-CSF Tg-SCIDマウスおよびhIL-3 Tg-SCIDマウスの解析 得られたTg-SCIDマウスでは、RT-PCRにより肺、脾臓、肝臓、骨髄等、多臓器に導入遺伝子の発現が認められたが、各臓器および血液組成に異常はなかった。hGM-CSF Tg-SCIDマウスにヒトGM-CSFレセプター α 鎖と β 鎖を発現するマウスpro B細胞由来BaF/F3細胞(BaF/GMR)を皮下移入した結果、全例が約2週間で死亡あるいは瀕死状態になり、脾臓をはじめ多臓器に未分化な細胞の浸潤が認められた。これら移入マウスの病状の経過および剖検後の臓器浸潤像は白血病に類似していたが、同腹のnon Tg/SCID controlには生着は認められなかった。

II ヒト造血因子Tg-SCIDマウスの応用 BaF/GMRの移入実験ではTg-SCIDマウスがBaF/GMRの増殖を支持したので、ヒト白血病モデルの作製を試みた。移入実験は、X線照射後のTg-SCIDマウスの皮下や腹腔内にヒト骨髄性白血病細胞株TF-1, UF-1, UT-7/GMを移入して行った。さらに、TF-1やUF-1の白血病モデルに対して分化誘導剤 δ -アミノレブリン酸(δ -ALA)やアポトーシス誘導剤亜ヒ酸(As₂O₃)を投与し、白血病治療モデルとしての可能性も検討した。

II-1 ヒト白血病モデルの作製

II-1-1 ヒト赤白血病細胞由来TF-1細胞の移入 ヒト赤白血病細胞由来TF-1はhGM-CSF, hIL-3, hEPOに厳密な依存性を示し、ポルフィリン・ヘム生合成中間体 δ -ALAによって赤芽球系細胞に分化する。今回、hGM-CSF Tg-SCIDマウスやhIL-3 Tg-SCIDマウスの皮下や腹腔内にTF-1を移入した結果、移入経路に依らず、両Tg-SCIDマウスで移入細胞の増殖を認めた。一方、同腹のnon Tg/SCID controlにはほとんど生着は見られなかった。TF-1の増殖は、皮下移入では皮下に限局した固形腫瘍の形成だったが、腹腔内移入では固形腫瘍の形成に加えて腹水中への腫瘍細胞の浸潤と肺、肝臓、生殖器および脾臓への浸潤だった。これらの固形腫瘍や浸潤細胞はTF-1由来の細胞であることが組織化学的解析やRT-PCRにより確認された。

II-1-2 ヒト前骨髄球性白血病細胞由来UF-1細胞の移入 ヒト前骨髄球性白血病(APL)細胞由来UF-1は、PML-RAR α 融合遺伝子を持ちhGM-CSF, hIL-3等に反応するが、分化誘導剤レチノイン酸(RA)に対しては耐性を獲得している。今回、hGM-CSF Tg-SCIDマウスの皮下や腹腔内にUF-1を移入した結果、いずれの移入経路でも固形腫瘍の形成および腹腔内移入では微量ながらも腹水の貯留が認められた。これら腫瘍細胞の細胞表面マーカー、染色体の核型、PML-RAR α 融合遺伝子の存在、RAに対する反応性はいずれもUF-1と同様であった。

II-2 ヒト白血病治療モデルとしての検討

II-2-1 TF-1腹腔内移入hIL-3 Tg-SCIDマウスへの δ -アミノレブリン酸(δ -ALA)投与の効果 TF-1腹腔内移入後18日目のhIL-3 Tg-SCIDマウスに7日間、5 mM δ -ALA (対照群にはPBS)0.5 mlの連続皮下投与を行った。その結果、 δ -ALA群では対照群と比べて固形腫瘍の大きさが5-6倍に、腹水中への浸潤細胞数も2-24倍に増加していた。しかし、組織学的には赤芽球系細胞への分化傾向は認められなかった。従って、 δ -ALAのTF-1に対する作用は*in vivo*では増殖促進であることが明らかになった。

II-2-2 UF-1皮下移入hGM-CSF Tg-SCIDマウスへの亜ヒ酸(As₂O₃)投与の効果 RA耐性のAPL症例にAs₂O₃を投与するとAPL細胞がアポトーシスを起こすことが報告されている。そこで、UF-1の皮下腫瘍が $>1\text{ cm}^3$ を越えたhGM-CSF Tg-SCIDマウスに21日間、9.43 mg/kg B.W. (ICRマウスにおけるLD₅₀値)のAs₂O₃(対照群にはPBS)の連続皮下投与を行った。また、all-trans RA (ATRA)徐放剤(25 mg/21 day release/pellet)の皮下埋め込みも実施した。その結果、皮下腫瘍の大きさはATRA群、対照群とも経時的に増大し剖検時には約4.5倍になっていたが、As₂O₃群では約0.5倍に縮小していた。さらに、As₂O₃群ではアポトーシスを誘導した個体と顆粒球へ終末分化した個体が認められ、後者の成熟顆粒球系細胞がヒト由来であることがヒト特異的な抗体による解析から明らかになった。従って、UF-1へのAs₂O₃およびATRAの作用が*in vitro*を追試するとともに、GM-CSFとAs₂O₃の組み合わせで分化誘導が起こる新しい治療法としての可能性も示唆された。

[考察] 今回、ヒト骨髄系細胞の維持に優れた実験動物の開発を目指してヒト造血因子Tg-SCIDマウスの作製を行った。得られたhGM-CSF Tg-SCIDマウスやhIL-3 Tg-SCIDマウスは、従来のSCIDマウスには生着が困難なヒト骨髄性白血病細胞を増殖可能であり、また、白血病細胞を移入したTg-SCIDマウスへの薬剤投与実験からは、本Tg-SCIDマウスの実験動物としての有用性も示された。しかし、ヒト正常造血系細胞や白血病の臨床検体を用いての検討が遅れていること、移入白血病細胞のマウス骨髄や脾臓への浸潤/末梢血中の循環など、白血病特有の病型を再現できなかったことから、得られたTg-SCIDマウスにはさらなる改良が必要であることも明かに

なった。しかし、未だに優れた白血病モデルがなく、その一方で治療薬の開発が危急に望まれている現状では、ヒト骨髄性白血病細胞を増殖できる本Tg-SCIDマウスの有用性は非常に高いと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 長澤 滋 治
副査 教授 野村 靖 幸
副査 助教授 高橋 和 彦
副査 助教授 大熊 康 修

学位論文題名

ヒト造血因子遺伝子導入-SCID マウスの作製と応用

造血器腫瘍性疾患を初めとする様々な血液疾患に対する効果的な治療法を確立するために、造血制御機構の解明が強く望まれている。この造血制御機構の解析を進めていく上で、ヒトの造血系を忠実に再現した実験動物は必要不可欠であり、その作製は今日の重要な課題の一つになっている。

種々の血液細胞は、多能性造血幹細胞が自己増殖しつつ、種々の造血前駆細胞を経て、末梢の赤血球、白血球、血小板などに分化して得られる。その際には、造血支持細胞などから分泌される多種類の造血因子や支持細胞上に発現している接着分子や細胞外マトリックス等、いわゆる造血微小環境を構成する因子の多くは種交差性がないために、ヒトの造血系細胞、中でも骨髓系の細胞をSCIDマウス等の免疫不全動物体内で維持し、モデル化する事は困難である。

遺伝子導入マウス (Tgマウス) は、目的とする遺伝子がマウス染色体に挿入されるために、ひとたび目的とするTgマウスが確立されると、導入遺伝子由来のタンパク質の安定した発現が可能となる。

本研究では、ヒトの造血を支持するヒト型の諸因子を補う手段としてSCIDTgマウスの作製に挑戦し、下記のような成果を挙げた。

1：ヒト造血因子遺伝子導入マウスの作製

造血因子としてGM-CSFの遺伝子を導入したTgマウスの作製を試み、生涯を通じて安定した造血支持因子を発現させるマウスの誕生に成功した。これにより、均質なマウスを安価に大量に研究市場へ供給する事が可能になった。

2：ヒト造血遺伝子導入マウスの応用研究

GM-CSFあるいはIL-3を発現したTgマウスを用いてヒト白血病モデ

ルマウスを作製する事を試みた。ヒト白血病細胞として、赤白血病細胞由来のTF-1細胞、前骨髄性白血病細胞由来のUF-1細胞、さらには巨核球系白血病細胞由来のUT-7細胞をSCIDTgマウスへ移入し、白血病モデルマウスを作製することに成功した。

3：ヒト白血病治療モデルの検討

白血病治療法として抗ガン剤を使用する症例もあるが、副作用が大きく治療効果も余り芳しくないなど、一般的な治療法としては多くの問題がある。このため、白血病細胞の特性を踏まえた薬剤の投与により、白血病細胞に分化あるいはアポトーシスを誘導して病的細胞を除去する治療法の開発が待たれている。そこで、ヒト造血因子を安定に発現させたSCIDTgマウスに、各種のヒト白血病細胞を移入することにより白血病モデルTgマウスを作製し、治療薬の効果を調べた。

i; δ -アミノレブリン酸 (δ -ALA)はTF-1細胞に対して試験管内実験では正常化効果のあることが報告されているが、実際に動物レベルで効果があるのか不明であった。今回作製した白血病モデルTgマウスを用いて、 δ -ALAが個体レベルでも優れた治療効果のあることを証明した。

ii; 亜硫酸はUF-1細胞にアポトーシスを誘導する事が報告されている。UF-1移入Tgマウスに亜硫酸を投与すると、UF-1細胞にアポトーシスが誘導され、移入マウスが白血病から回復することが確認された。

これらの研究成果は、基礎的な研究領域のみならず、造血機能障害や白血病などの治療法の開発研究にも極めて有益な情報を提供するものであり、博士（薬学）の学位に値するものと評価した。