

博士論文（要約）

選択的細胞死誘導を用いた造血幹細胞移植前処置法の開発

水野 直彬

選択的細胞死誘導を用いた造血幹細胞移植前処置法の開発

水野 直彬

現在臨床で使用されている赤血球や血小板等の血液製剤は、ヒト血液を原料としており、これらは無償献血ないし有償採血により賄われている。しかし、一部の先進国では新規献血者の減少傾向が見られ、また発展途上国では感染症や社会的インフラストラクチャー不足などの問題があるため、恒常的な安定供給は保証されていない。そのため、ヒト供血に代わる、安全かつ安定的なヒト血液供給法の確立が求められている。

この問題を解決するため、近年、ヒト臍帯血由来造血幹細胞、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) などの幹細胞から、*in vitro* での分化誘導を用いて輸血可能な血液製剤を作成する試みが進められており、有効な解決策となりうることが期待されている。しかし、これら *in vitro* で分化誘導された血球は、ヒト血液中の成熟血球と比較して分化・成熟が不十分であり、さらに大規模培養が困難であることから、現在も実用化に至っていない。

造血幹細胞移植は、重篤な血液疾患の患者に対し、前処置として患者造血が廃絶される強度の放射線照射や化学療法を施し、その後、他者の骨髄または末梢血中の造血幹細胞を移植することで、造血再構築を行う治療法である。この手法を応用し、大動物にヒト造血幹細胞移植を行い、異種動物生体内でヒト造血を行う事が出来れば、有望なヒト血液供給源となりうる。ヒト造血幹細胞移植によるヒト造血再構築自体は、NOG マウス、NSG マウスなどの高度免疫不全マウスを用いた系で実現しており、同様の戦略が供血源として十分に大型なブタなどの動物で実現できれば、供血動物の寿命の範囲で、反復して大量のヒト血液を採取することが理論上可能である。

レシピエントの免疫不全化に関しては、*Rag1*、*Rag2*、*IL-2R γ* 遺伝子をノックアウトした遺伝子改変ブタが作出されており、これらに補体系、CD47-SIRP α 系の改変などを追加していく事で、将来的にはより高度な免疫不全個体が誕生すると予期される。

一方で、造血幹細胞移植前処置に関して言えば、マウス・ラットなどの小動物では全身放射線照射や大量化学療法などの高侵襲処置で骨髄破壊的に行う事が可能であるが、大動物に対してこれらを安定して施行する手法は、設備面も含めて検討されていない。これらの処置は、造血器以外の全身臓器に高度の毒性を発揮するため、安全域も狭く、移植関連死を防ぐために厳格な管理が要求される。したがって、放射線照射や大量化学療法に代わる、より簡便で安全な移植前処置法の開発が、大動物におけるヒト造血系再構築の実現において重要と考える。

これらを踏まえ、私はレシピエント動物の遺伝子改変することで、薬剤投与によりレシピエント個体の血球のみ選択的に細胞死を誘導する、新規の造血幹細胞移植前処置法を考案した。具体的には、哺乳類において発現様式が高度に保存されている汎血球マーカーCD45に着目し、これをコードする *Ptprc* 遺伝子のプロモーターの下流に、細胞死を誘導可能な遺伝子を導入すれば、レシピエントの他臓器への毒性を最小化しつつ、骨髄造血を一過性に破壊し、同時に末梢血中の白血球を除去することで免疫不全を高度化する事が可能であると考えた。

この手法の妥当性を検討するため、モデル実験として、新規ノックインマウスを作成し、定常状態での表現型、血球細胞死誘導時の表現型、同種造血幹細胞移植の可否を評価した。

(1) CD45-DTR マウスの作成

有核血液細胞特異的に細胞死を誘導できるマウスとして、C57BL/6N マウス *Ptprc* 遺伝子の改変を行い、ジフテリア毒素受容体(DTR)を *Ptprc* プロモーター下流に導入した新規ノックインマウス系統 C57BL/6N-*Ptprc*^{tml(HBEGF)} を樹立した。

DTR は、*HBEGF* 遺伝子によりコードされる膜結合型タンパク質で、細胞膜上でプロテアーゼにより切断され、細胞外ドメインは EGF ファミリーに属する分泌型増殖因子として機能する。多くの哺乳類の膜型 HBEGF はジフテリア毒素に対する受容体として機能するが、マウス、ラットにおいては、HBEGF のアミノ酸変異により、ジフテリア毒素への結合活性が著明に低下している。このため、サル HBEGF をマウスの標的組織のみで強制発現する事で、毒素感受性を付与し、ジフテリア毒素投与により選択的細胞死を誘導する事が出来る[4]。HBEGF そのものには細胞障害性がないため、*in vivo* で時期特異的に細胞死誘導を行う系では頻用されており、本研究に適していると判断した。

なお、本文では以後この系統を CD45-DTR マウスと呼称し、ヘテロ接合体 (*Ptprc*^{HBEGF/+}) を CD45^{DTR/WT}、ホモ接合体 (*Ptprc*^{HBEGF/HBEGF}) を CD45^{DTR/DTR} と記載する。

当該系統での DTR 発現様式を定量 PCR 法にて評価した所、末梢血、骨髄、胸腺、脾臓で高発現を認め、その他の非造血器に関しては、肺でわずかに発現を認めるのみであった。

当該系統の定常状態での造血組織表現型を野生型と比較した所、<1>末梢血の血球数および分画は、血小板の軽度減少を除き同等、<2>骨髄の全細胞数はわずかに少ないが、造血幹細胞分画 (CD34^{-low}c-Kit⁺Sca-1⁺lineage marker⁻分画) は同等、<3>胸腺で成熟分画を主としたリンパ球数が増加、<4>脾臓で B 細胞が増加というものであった。

(2) ジフテリア毒素投与による CD45-DTR マウス血球の選択的細胞死誘導

CD45-DTR マウスにおける細胞死誘導の組織特異性を検証するため、CD45^{DTR/WT} にジフテリア毒素を腹腔内投与し、投与 24 時間後に全身臓器（骨髄、脳、肺、心臓、胸腺、肝臓、胃、腸、脾臓、膵臓、膀胱）の病理学的変化、末梢血細胞数の変化を評価した。HE 染色による組織学的評価の結果、骨髄、胸腺、脾臓において、細胞密度の減少、広範な核濃縮・核崩壊像、正常構造の喪失を認めた。非造血器にはこれらの所見は認めなかった。末梢血細胞数に関しては、CD45^{DTR/WT} マウスでは白血球数が 94%減少し、赤血球数には変化が無く、血小板数は 36%減少した。

次に、致死量放射線照射による前処置を施した野生型マウスに、CD45^{DTR/WT} マウスをドナー、野生型競合ドナーとした競合全骨髄移植を行い、作成した造血キメラを用いて、ジフテリア毒素による有核血液細胞死を定量的に評価した。ジフテリア毒素投与 48 時間後、末梢血および骨髄造血幹細胞分画の寄与率をフローサイトメトリーで再度評価し、投与前と比較した。ジフテリア毒素投与後、CD45^{DTR/WT} マウス型造血は、末梢血において骨髄系細胞、T 細胞、B 細胞いずれの分画においても著明な減少を認めた。骨髄造血幹細胞分画に関しても、CD45^{DTR/WT} マウスの寄与率は著しく低下した。

以上の結果から、CD45^{DTR/WT} マウスは、ジフテリア毒素投与により、重篤な貧血・血小板減少を呈することなく、末梢血・骨髄を含む全身の造血器で、有核血液の細胞死を選択的に誘導する事が可能であることが確認された。

(3) ジフテリア毒素誘導型細胞死を前処置とした造血幹細胞移植

CD45^{DTR/WT} マウスに対して、ジフテリア毒素投与による有核血液細胞死誘導を前処置とし、造血幹細胞移植が可能か、同種骨髄移植にて検討した。まず、高用量のジフテリア毒素投与と少量の移植片による骨髄移植を行ったが、移植後急性期に全例が死亡した。死亡例の病理所見から、前処置による急激な細胞崩壊に伴う播種性血管内凝固症候群、腸管からの感染症を疑い、移植条件の修正を試みた。最終的に、高用量ジフテリア毒素を移植当日単回投与し、移植片を全骨髄細胞 5×10^7 個/body まで増やすことで、生存率と生着率の改善を得た。生着個体のドナー寄与率は、末梢血、骨髄造血幹細胞分画いずれにおいても平均 65%を上回り、4 か月以上の長期造血再構築が確認された。

(4) 移植片生着後の選択的細胞死誘導による *in vivo* ドナー血球純化

大動物でヒト造血を再構築し、そこから臨床的にヒトへの投与が可能な血液製剤を取得するためには、レシピエント血球の混在は許容されない。そこで、レシピエント有核血液細胞の選択的細胞死を移植片生着後に誘導し、*in vivo* でドナー血球純化可能か、CD45^{DTR/WT} マウスを用いて検証した。CD45^{DTR/WT} マウスをレシピエントに、減量前処置による同種骨髄移植を行い、ドナー寄与率の低い造血キメラ個体を作成した。これらに対し、ジフテリア毒素投与を行った所、末梢血白血球、赤血球、血小板いずれに関しても細胞数を維持した状態で、ドナー寄与率を 90%-98%まで上昇させることが出来た。

CD45-DTR マウスを用いた以上のモデル実験から、レシピエント動物の *Ptprc* 遺伝子を改変し、有核血液細胞のみに細胞死誘導可能な外来遺伝子を発現させる事で、全身放射線照

射等の全身障害性前処置に代わる、新規の造血幹細胞移植前処置が成立し得る事が示された。また、同じ手法を用いて、造血幹細胞移植片生着後に、レシピエント造血を廃絶する事で、ドナー型造血の増幅とドナー血球の純化を達成する事も可能であった。この戦略は、特殊な設備を必要とせず、大動物にも適応可能であり、異種ヒト造血個体からの血液製剤作成に向けた基幹技術となりうると期待される。