

論文の内容の要旨

論文題目 免疫不全ブタ開発に関する研究

氏名 鈴木 俊一

実験動物は、ヒト疾患の基礎的研究及び医薬品・医療機器などの有効性や安全性を確認するためのモデルとして、欠かせないものである。特に、げっ歯類のマウスは小型で扱いやすい上、多産で世代間隔が短いという繁殖特性から最も広く利用されている実験動物である。また、遺伝的背景が明確であり、遺伝子操作が比較的容易であることから、ヒトの種々の病態を模した疾患モデル動物が作出され、病態解明や治療法の開発など、医学の発展にも多大な貢献をしてきた。しかしながら、げっ歯類で得られた実験結果が必ずしもヒトの症例を反映しないという例も少なくなく、その橋渡しとして考えられたのが、ヒト化マウスである。ヒト化マウスとは、免疫不全マウスにヒト細胞を移植し、生着させて得られるヒト細胞・組織を持つマウスであり、いわば、ヒトの *in vivo* 研究をマウスで行うためのモデル動物である。

一方で、ブタは臓器のサイズや生理学的・解剖学的特徴がヒトに類似しているのに加え、寿命が 15 年程度と比較的長く、臨床的に意義の大きい数年という長期間にわたる経過観察が可能であることから、ヒトのモデル動物として有用とされている。さらに、2000 年の体細胞クローン作出以降、遺伝子ターゲティングを含む任意の遺伝子改変が可能となったことから、実験動物としての汎用性は今後増していくことが予想される。そこで筆者は、実験動物として上記のような利点を持つブタに、ヒト化マウスの概念を適用したヒト化モデルブタ開発を目指し、その基盤となる免疫不全ブタの開発に着手した。まず、リンパ球の分化・増殖に不可欠であるインターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (Interleukin-2 receptor gamma chain; IL2RG) 遺伝子をノックアウトしたブタを作製し、その表現型を解析した。さらに、このノックアウトブタに同種骨髄細胞移植を施し、免疫系再構築の可能性について検討した。加えて、胎仔期ブタへのヒト造血系細胞移植により、ヒト T 細胞分化が促進される可能性に着目し、その検討に向けた基盤整備として、胎仔期のブタにおける胸腺発達過程について解析した。

1. *IL2RG* 遺伝子ノックアウトブタの作製および表現型解析

メス胎仔由来の線維芽細胞にブタ *IL2RG* ターゲティングベクターを導入し得られた組換え細胞を用いて 2 段階の核移植を行った結果、計 31 頭 (死産 14 頭を含む) のクローンの個体を得ることができた。ここで生まれた個体はヘテロノックアウトのメスであり、*IL2RG*

ノックアウトの表現型を示さないことが予測されたにもかかわらず、70日を超えて生存できた個体は4頭のみであった。この4頭では、末梢血中に正常レベルのT細胞が検出されたのに対し、他の個体では、末梢血中のT細胞の著減や胸腺の著しい低形成といった免疫不全の症状を示していた。このような予想外の表現型の原因としては、同一胎仔由来の細胞によるクローン個体間で異なった表現型が現れること、また後代においてはこうした表現型は現れないこと（後述）から、体細胞クローンにおけるエピジェネティックな異常が想定される。中でも、*IL2RG* 遺伝子座がX染色体上に存在することから、クローン作出過程において、X染色体の再活性化とその後のランダムな不活化の過程が正常に進行せず、野生型アリルが不活化された状態が維持されたことが原因となっている可能性が高いと思われる。

生存した4頭のうちの1頭を基にして、40頭の後代（F1: 19頭、F2: 21頭）を作製し、詳細な表現型の解析を行った。ヘミノックアウトのオス（-Y）（以下、KO）は、通常の飼育環境下においては、感染によると思われる全身衰弱を発生し、生後9週目までにすべて死亡した。一方、ヘテロノックアウトのメス（+/-）は問題なく生存し、以下に述べる形質すべてが野生型と同等であった。このことから、クローンで見られた免疫不全症状はエピジェネティックな異常によることが示唆された。KO個体では、胸腺は著しく萎縮しており、肉眼では観察できなかった。また、末梢血と脾臓において、T細胞（CD3⁺）、B細胞（CD3⁻、CD45RA⁺）、NK細胞（non-myeloid、CD3⁻、CD16⁺）の存在様態をFACSによって解析した結果、KOではTおよびNK細胞はほぼ欠失しているのに対し、B細胞は相当数残存していることが分かった。さらに、KOでは、出生当初は初乳由来と考えられるIgG、IgAが検出されるが、その後起こる新規の免疫グロブリン合成は確認できなかったことから、残存しているB細胞は機能的に不全であることが示唆された。

以上のように、今回開発した*IL2RG* ノックアウトブタは、T、NK細胞を欠損し、B細胞は存在するものの機能不全であることから、他の動物種におけるX-SCIDと同様、重篤な免疫不全症状を呈することが明らかになった。

2. *IL2RG* 遺伝子ノックアウトブタへの同種骨髄移植による免疫系再構築の可能性の検討

免疫系ヒト化ブタの作出に向けた準備段階として、*IL2RG* ヘミノックアウトブタに別のブタの骨髄由来細胞を移植し、免疫系の再構築を試みた。生後2週目の計5頭のノックアウトブタに同腹の野生型子ブタまたはEGFP発現ブタより採取した骨髄細胞を、T細胞除去を行った後に経静脈的に移植した。そのうちの3頭は2年以上経過した現在も生存中であり、移植を行わなかった同腹のノックアウトブタが54日以内にすべて死亡したとと比較すると、十分な生存期間の延長が認められた。また、リンパ球の動態をFACSにより解析したところ、T細胞は移植後4週以降に急激な増加が認められ、野生型と同等なレベルまで回復した。B細胞は野生型よりは少ない傾向は認められたが、安定して存在しており、ほとんどの個体で抗体産生も確認することができた。また、NK細胞の出現も認められ、リン

パ球系細胞がノックアウトブタ体内で増殖・分化していることが示された。さらに、これらのリンパ球系細胞の由来を明らかにするため、EGFP による蛍光検出あるいはマイクロサテライトマーカーを用いた個体識別を行った。その結果、ほぼすべての T、B、NK 細胞がドナー由来であり、移植したドナー骨髄細胞が生着し、リンパ球系細胞を再構築できることが明らかとなった。

3. ブタ胎仔胸腺発達過程の解析

胎仔期においては、宿主となるブタの免疫系が未発達であり、ヒト細胞移植後の生着率の向上が期待できる。また、IL2RG ノックアウトブタでは、出生時には胸腺の顕著な萎縮が認められるが、マウスでの知見から胎生中期までは正常に発達していることが予想される。この時期にヒト造血系細胞を移植することにより、胸腺構造の維持・発達が促され、効率的なヒト T 細胞分化を誘導できる可能性がある。以上の観点から、胎仔期のブタへのヒト細胞移植へ向けた基盤整備の一環として、胎仔期におけるブタ胸腺の発達過程について、経時的な解析を行った。

胎齢 35、40、45、50、55、65、85 日および新生子ブタの胸腺における、胸腺上皮細胞の機能や胸腺細胞の動態に関わる遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。胸腺上皮細胞の発生に関与する *FOXP1*、皮質上皮細胞に発現する *PSMB11* は胎齢 35 日の時点で高い発現が認められ、皮質上皮細胞の分化は既に進行していることが示唆された。一方、髄質上皮細胞に発現する *AIRE* は胎齢 45 日以降で発現が上昇し始めることから、髄質の発達は胎齢 45 日以降に進行することが示唆された。胸腺細胞の移動に関わる遺伝子 (*CCL25*、*CCL19*、*CCR7*、*CCR9*) や胸腺細胞で発現する遺伝子 (*RAG1/2*、*IL2RG*、*CD3E*、*PTPRC*) の発現の変動から、胸腺内への前駆細胞の流入は胎齢 40 日前後から急速に進むことや、皮質から髄質への移動は髄質の発達に伴い、胎齢 50 日以降で活発になることが推測された。さらに、胎齢 35 から 55 日にかけての、胸腺髄質マーカーとされる *CK5* の免疫組織化学的解析により、皮質と髄質の明瞭化が胎齢 45 から 50 日前後に起こることが確認された。以上のように、胎仔期のブタ胸腺の発達段階と胎齢の関係についての概略を明らかにすることができた。これは、今後 IL2RG ノックアウトブタの胎仔期胸腺発達過程についての解析やその後の胎仔期におけるヒト造血幹細胞の移植を目指す上で、基盤となる重要な知見である。