

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 俊一

ヒト疾患の基礎的研究や医薬品開発のためのモデルとして、実験動物は必要不可欠である。中でもマウスは、遺伝子操作が比較的容易であることから、種々の疾患モデルが作出され、医学の発展に貢献してきた。しかし、マウスで得られた実験結果がヒトの症例を反映しない例も少なくなく、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・組織をもつマウスであり、ヒトの *in vivo* 研究をマウスで行うためのモデルである。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、寿命が約 15 年と長く、数年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である。そこで本研究では、こうした利点を持つブタに、ヒト化マウスの概念を適用したヒト化ブタ開発を目指し、その基盤となる免疫不全ブタの開発を試みた。

1. IL2RG 遺伝子ノックアウトブタの作製および表現型解析

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 (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。ターゲティングベクターの導入後、IL2RG 遺伝子がノックアウトされたことが確認された細胞を用いて核移植を行い、31 頭のクローン個体を得た。これらの個体はヘテロノックアウトであり、免疫不全症状を呈さないと考えられたにもかかわらず、長期生存できたのは 4 頭のみであった。その他の個体は、末梢血中の T 細胞の著減や胸腺の萎縮といった免疫不全の症状を示していた。これは、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 染色体の不活化が初期化されず、野生型アリルが不活化された状態が維持されたことによると考えられた。そこで、エピジェネティックな異常が修正される後代において、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、生後 9 週目までにすべて死亡したのに対し、ヘテロノックアウトのメス (+/-) は問題なく生存し、以下に述べる形質も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 は、胸腺の萎縮及び T、NK 細胞の欠損、B 細胞の残存という表現型を示した。また、KO では、新規の免疫グロブリン合成が認められなかった。以上により、今回開発した IL2RG ノックアウトブタは、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として、KO ブタに別のブタの骨髄細胞を移植し、免疫系の再構築を試みた。移植した 5 頭のうちの 3 頭は 2 年以上経過した時点でも生存しており、移植を行わなかった KO ブタと比べ、十分な生存期間の延長が認められた。T 細胞は移植後 4 週以降に急激に増加し、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低レベルであったが、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 KO ブタ体内で増殖・分化していることが示された。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いた個体識別の結果、ほぼすべての T、B、NK 細胞がドナー由来であり、移植した骨髄細胞が生着し、免疫系を再構築できたことが明らかとなった。

3. ブタ胎仔胸腺発達過程の解析

KO 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幹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として、胎仔期におけるブタ胸腺の発達過程を解析した。胎齢 35～85 日および新生子ブタの胸腺を用い、胸腺の発生や機能に関わる遺伝子の発現を定量的 PCR により解析した。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。さらに、胎齢 35～55 日における胸腺の組織学的解析により、皮質と髄質の明瞭化が胎齢 50 日前後におこることが確認された。以上から、胎齢 50 日前後がヒト造血幹細胞移植の適期となる可能性が示された。

以上、本研究は、免疫不全ブタ作出の成功にとどまらず、骨髄移植により免疫系を再構築できることまでも示すとともに、将来的な応用を踏まえヒト造血幹細胞の移植に適した時期を探るためにブタ胸腺の発達過程を詳細に解析したものであり、学術上・応用上寄与するところが極めて大きい。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。