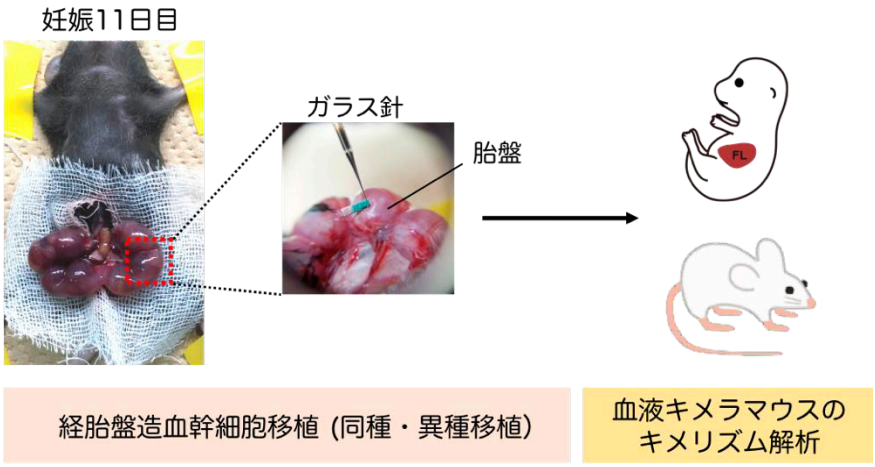
140　経胎盤移植系を用いた血液キメラマウスの作製	全　孝静

【目的】ヒトの造血システムをマウスの体内で再現する造血免疫系ヒト化マウスは、私たちヒトの血液系を理解し、新たな医薬品の創出や疾患の克服にもつながる重要なモデルとして期待される。現在まで、免疫不全マウスにヒトの造血幹細胞を移植する方法で、ヒト化マウスの開発が行われてきた。しかし、免疫不全マウスを用いることや骨髄微小環境の破壊による生着不全の問題などが残っている。本研究では、マウスへのリスクを最小限にし、より有効で安全な造血幹細胞移植法の開発を目指した。またレシピエントとして、造血幹細胞を完全に欠損する遺伝子改変マウスの胎仔を用いることで既存の問題を克服した、血液キメラマウスを作製することを目的とし研究を行った。

【方法】造血幹細胞を欠損する胎仔をもつ母親マウス（妊娠 10〜11 日目：BDF1 系統）の全身麻酔を行い、子宮を体外に露出させた。胎仔胎盤側を標的にドナー細胞（マウス造血幹細胞：B6 系統、ラット造血幹細胞、ヒト臍帯血由来造血幹細胞）を穿刺注入することで移植した。移植後、子宮を体内に戻し、皮膚を縫合し回復させた（経胎盤移植）。移植から一週間後の胎仔を帝王切開により取り出し、胎仔肝臓を用いてフローサイトメトリー解析およびコロニー形成アッセイを行い、レシピエント体内におけるドナー由来の細胞を確認した。

【結果】マウスおよびラット造血幹細胞移植の結果、生後 1 日目において、レシピエント肝臓の 95%以上の血球細胞がドナー由来であり、リンパ球生や顆粒球系、単球系の多種類の血球系列に分化しているなど良好な生着が認められた。ヒト造血幹細胞を移植した結果では、マウスやラット細胞に比べ生着率が低かったものの、レシピエント胎仔肝臓においてヒト CD45 陽性血球細胞（特に CD19 陽性ヒト B 細胞）が確認された。以上の結果より、造血幹細胞を形成できないマウスの胎仔期に造血幹細胞移植を行うことは、有効な異種動物移植のモデルになり得ることが示唆された。

胎仔期造血幹細胞移植による血液キメラマウスの作製



140. 経胎盤移植系を用いた血液キメラマウスの作製

全　孝静

*筑波大学 医学医療系 解剖学発生学研究室

Key words：ヒト化マウス，造血幹細胞，異種間移植，胎仔期移植，血液キメラマウス

緒　言

ヒトそのものや疾患を理解する上で遺伝子改変マウスは優れた実験モデルであり、基礎科学や医学研究の進歩においても大きな役割を果たしている。しかし、ヒトとマウスの種間差を考えると、マウスの実験で得られた結果をヒトに適応することは難しい。そこで、ヒト細胞をマウスに移植することで、マウス体内にヒトの細胞や臓器を構築するヒト化マウスが開発された。代表的なものとして、ヒトの造血系を再現する「造血免疫系ヒト化マウス」があり、超免疫不全マウス（NOG、NSG 等）にヒト造血幹細胞を移植する方法で作製される［1，2］。免疫拒絶が起こらなければ、マウスの造血環境下でもヒト造血幹細胞は維持可能であるが、現在のヒト化マウスは、免疫不全マウスの免疫系が完全に不活化しておらず、低いながら免疫反応が見られる。そのため、ヒト血球の寄与率は細胞分画によって大きく異なり十分な免疫系が再現できない。また、ドナー細胞の生着率を上げるために行う骨髄破壊的前処置（放射線照射、化学療法など）によりレシピエントの骨髄微小環境が破壊されるなど、複数の問題が指摘されている。

そこで本研究では、現存の造血幹細胞移植法を改良することで、移植時のリスクを最小限にし、より有効で安全な造血幹細胞移植法の開発を目指した。それからレシピエントとして造血幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスを使用し、免疫拒絶を回避するために免疫系が未発達な胎仔へドナー由来の造血幹細胞を移植することで、現在の造血幹細胞移植やヒト化マウスの問題を克服した、新たな血液キメラマウスの開発を目的とし研究を行った（図 1）。ヒトの血液細胞を高率に保有するヒト化マウスは、ヒト造血システムの解析だけでなく薬剤の前臨床試験における評価系として有望であり、医学の発展において欠かせない実験モデルである。しかしながら、ヒトの造血免疫系を完全に構築できないという大きな課題が残されたままである。我々の新しいアプローチによりヒト血液キメラマウスが完成した場合、モデルマウス作製の技術的な進歩のみならず、ヒト造血系研究による新しい治療法の開発にもつながる可能性がある。

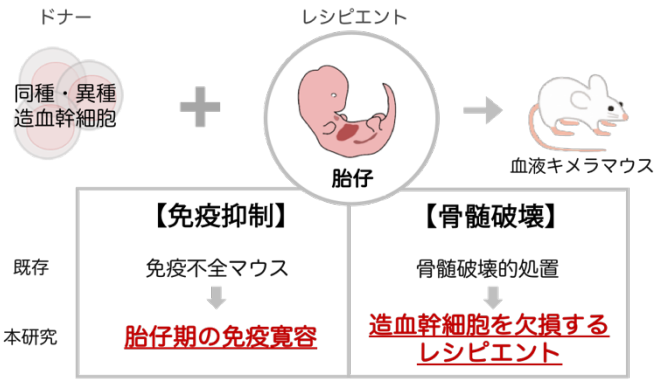


図 1. 胎仔期の移植により、骨髄破壊的処置を行うことなく造血幹細胞移植が可能になる

*現在の所属：筑波大学 医学医療系 幹細胞治療研究室

方法および結果

1. 経胎盤移植法

従来の造血幹細胞移植は、骨髄破壊的処置を行った新生仔または成体マウスをレシピエントにすることが一般的である。胎仔期の造血幹細胞移植法としては妊娠 14 日胚の卵黄嚢静脈内への移植が行われているが［3］、本研究ではより早い時期の移植を実現するため、「経胎盤造血幹細胞移植法」を使用した［4］。胎盤を経由して移植を行う経胎盤移植は、胎仔への物理的ダメージを大きく減らし、発生の早い段階で移植することができるが、再現性が低いことや、技術面の制約があることからこの方法を用いた報告は少ない。

本研究では、独自に改良した方法を用いたことで、移植後の生存率を 70%近くに維持することができ、有効な移植法であることを実証した。

2. 造血幹細胞欠損マウス胎仔への移植

転写因子 *Runx1* は、造血幹細胞の発生に必須な転写因子であり、*Runx1* を欠損する胎仔は造血幹細胞が産生されないため、胎生 12.5 日頃死亡する。我々の研究グループでは、胎仔期の造血のみを回復するトランスジーン（Tg）の発現により、造血幹細胞が欠如したまま出生直前まで生存する遺伝子改変マウス（*Runx1* $^{-/-}$::Tg、以下 *Runx1* KO::Tg）を作製した［5］。このマウスをレシピエントとし、マウスおよびラット造血幹細胞を移植した結果、レシピエント体内の 95%以上の血球細胞がドナー由来であり、リンパ球系や顆粒球系、単球系に分化するなど良好な生着が認められた（図 2a）。また、ヒトサイトカイン存在下で 1 週間以上培養したヒト臍帯血由来造血幹細胞および造血前駆細胞を、胎生 11.5 日マウス胎仔へ移植し、胎生 18.5 日胎仔肝臓を用いてキメリズム解析を行った。その結果、*Runx1* KO::Tg 胎仔肝臓においてヒト CD45 陽性血球細胞が検出され、マウス胎仔体内にヒト由来の細胞が生着することを確認した（図 2b）。

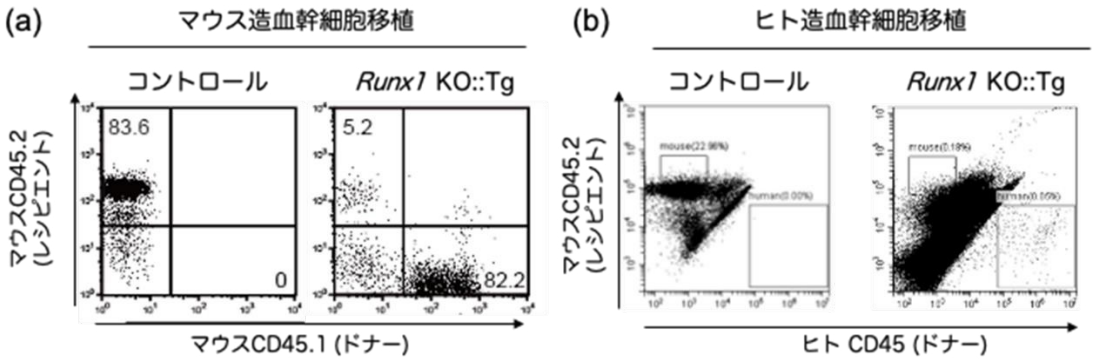


図 2. 経胎盤造血幹細胞移植後、ドナー細胞は胎仔期造血組織である肝臓に生着・分化する

(a) 同種移植後、胎生 18.5 日レシピエント胎仔肝臓におけるキメリズム解析。

(b) 異種（ヒト造血幹細胞）移植後、胎生 18.5 日レシピエント胎仔肝臓におけるキメリズム解析。

X 軸：ドナー（B6 系統由来マウス血球細胞、ヒト血球細胞）。

Y 軸：レシピエント（BDF1 系統由来マウス血球細胞）。

3. 造血系特異的に *Runx1* を欠損する胎仔への移植

現在のところ、造血幹細胞移植を行った *Runx1* KO::Tg は、移植が成功した（判断基準：帝王切開の際、①貧血・出血の表現系を示さない、②ドナー・キメリズム率が 20%以上）場合でも出生後全個体が死亡し、成体マウスでの解析が不可能であった。*Runx1* は、造血系だけでなく骨格系や神経系の発生にも関与しており *Runx1* KO::Tg 胎仔は、造血幹細胞移植を行った場合でも造血系以外の原因で死亡する可能性がある［6］。この問題を解決するため、我々は造血幹細胞特異的に *Runx1* の発現を欠損するコンディショナル欠損 Tg 胎仔（*Runx1* f/f::Tie2-cre::Tg、以下 *Runx1*cKO::Tg）を作製した。*Runx1*cKO::Tg 胎仔は、造血幹細胞が形成されないまま胎生 19.5 日まで生存することを確認し、本研究のレシピエントとして使用した。マウス造血幹細胞移植では、胎仔期の解析ではドナー細胞が問題なく生着し、95%以上の高いキメリズムを示した（図 3a）。

Runx1 cKO::Tg 胎仔内に造血幹細胞が生着していれば、理論上この個体は生き延びることが可能であるため、次に出生後マウスを用いて解析を行った。同じく胎生 11.5 日 *Runx1* cKO::Tg 胎仔をレシピエントとしマウス造血幹細胞移植を行い、成体マウスの末梢血、骨髄および造血系組織におけるキメリズムを調べた。その結果、ドナー造血幹細胞由来の多種類の血球系列に分化し、そのキメリズムが 1 年以上維持されることが確認された（図 3b）。

ヒト造血幹細胞を移植した場合、成体マウスの末梢血解析で、ヒト血球が検出（主に CD19 陽性ヒト B 細胞）され、マウス血球との混合キメリズムは 1 年半経った後も維持されていた。一部の個体において、Tie2-Cre Recombinase の発現低下によりレシピエント由来のリンパ球が残存しているが、GVHD のような免疫拒絶反応は起こっておらず、また、T 細胞の活性化、増殖など一連の免疫反応を *in vitro* で観察するリンパ球混合反応（Mixed lymphocyte reaction）においても、レシピエント由来 T 細胞はヒト血球細胞に対する免疫反応を示さなかったことから、これらモデルにおいてドナー細胞に対する免疫寛容が成立していると考えられる。

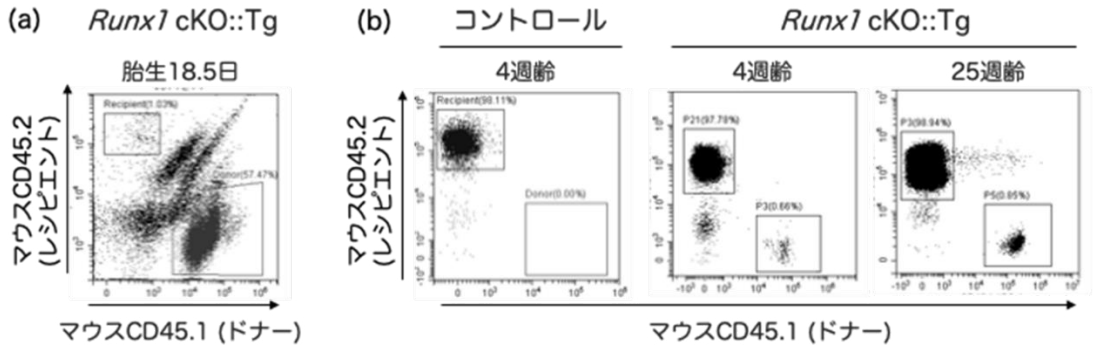


図 3. 胎仔期の造血幹細胞移植により、ドナー由来の血球細胞は長期にわたり維持される

(a) 同種移植後、胎生 18.5 日 *Runx1* cKO::Tg 肝臓におけるキメリズム解析。

(b) 同種移植後、成体マウスの末梢血におけるキメリズム解析。

X 軸：ドナー（B6 系統由来マウス血球細胞）。

Y 軸：レシピエント（BDF1 系統由来マウス血液細胞）。

考　察

本研究では、独自に改良した移植法や造血系遺伝子を改変した実験動物を用いることで、胎仔期の造血幹細胞移植が可能であることを確認した。また、造血幹細胞を形成しない胎仔への経胎盤的な移植により、骨髄破壊的処置を行うことなく同種・異種細胞移植が可能であることが示唆された。しかし、マウス血液中に占めるヒト血球細胞は依然として低い。最近の研究により、ドナー造血幹細胞の数［7］や造血幹細胞の質を維持すること［8］が移植後生着率を大きく左右すると報告された。今後は、これら知見を参考に、造血幹細胞培養法の改善、移植細胞数の最適化などを試み、ヒト細胞の生着率の上昇を目指す。本研究により、ヒトの造血システムを充実に再現できるマウスが作製できれば、既存のヒト化マウスに比べ、より高い血液キメラ率が見込まれるため、今後のヒト造血系の基礎研究や新薬開発への貢献が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、筑波大学医学医療系解剖学発生学研究室の高橋智先生、濱田理人先生、筑波大学医学医療系血液内科の千葉滋先生、横山泰久先生、熊本大学国際先端医学研究機構の横溝智雅先生に大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。

文 献

1) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 2002 Nov 1;100(9):3175-82. PMID: 12384415 DOI: 10.1182/blood-2001-12-0207

2) Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1565-73. Epub 2005 May 26. PMID: 15920010 DOI: 10.1182/blood-2005-02-0516

3) Boelig MM, Kim AG, Stratigis JD, McClain LE, Li H, Flake AW, Peranteau WH. The Intravenous Route of Injection Optimizes Engraftment and Survival in the Murine Model of In Utero Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2016 Jun;22(6):991-999. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26797401 DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.01.017

4) Fleischman RA, Mintz B. Prevention of genetic anemias in mice by microinjection of normal hematopoietic stem cells into the fetal placenta. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Nov;76(11):5736-40. PMID: 42904 DOI: 10.1073/pnas.76.11.5736

5) Yokomizo T, Takahashi S, Mochizuki N, Kuroha T, Ema M, Wakamatsu A, Shimizu R, Ohneda O, Osato M, Okada H, Komori T, Ogawa M, Nishikawa S, Ito Y, Yamamoto M. Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. EMBO J. 2007 Jan 10;26(1):184-96. Epub 2006 Dec 7. PMID: 17159898 DOI: 10.1038/sj.emboj.7601480

6) Liakhovitskaia A, Lana-Elola E, Stamateris E, Rice DP, van 't Hof RJ, Medvinsky A. The essential requirement for Runx1 in the development of the sternum. Dev Biol. 2010 Apr 15;340(2):539-46. Epub 2010 Feb 10. PMID: 20152828 DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.02.005

7) Shimoto M, Sugiyama T, Nagasawa T. Numerous niches for hematopoietic stem cells remain empty during homeostasis. Blood. 2017 Apr 13;129(15):2124-2131. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28130213 DOI: 10.1182/blood-2016-09-740563

8) Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, Sudo K, Morita M, Crisostomo RV, Yamamoto R, Loh KM, Nakamura Y, Watanabe M, Nakauchi H, Yamazaki S. Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. Nature. 2019 Jul;571(7766):E12. PMID: 31289376 DOI: 10.1038/s41586-019-1395-9