

氏名	ひら まつ ひで ふみ 平 松 英 文
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2640 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34 <sup>+</sup> cell using the NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> mice model (NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスモデルを用いた、臍帯血由来 CD34 陽性細胞からのヒトリンパ球の再構築に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 前川 平 教授 内山 卓 教授 中畑 龍 俊

### 論文内容の要旨

ヒトにおいて、T細胞を含むすべての系列のリンパ球造血を同時に観察できる解析系の確立はヒトリンパ球研究に新たな視点をもたらすと考えられる。近年我々はヒト造血細胞が極めてよく生着する NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスを開発し、このマウスに臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植した後に再構築されるヒトリンパ球について、組織的、機能的解析を行った。放射線照射後の NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植するとヒト CD3 陽性 T 細胞、CD56 陽性 NK 細胞、CD19 陽性 B 細胞とすべての系列のリンパ球の生着が確認された。従来よりヒト造血幹細胞の生着モデルである NOD/SCID マウスや NOD/SCID- $\beta 2m$ <sup>null</sup> マウスではヒト T 細胞の生着は全く認められなかった。NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスに見られるヒト T 細胞は骨髄や脾臓では CD3<sup>+</sup> かつ CD4<sup>+</sup> または CD8<sup>+</sup> の single positive (SP) T cell が主体で多様な V $\beta$  領域のレパトリーを形成していた。胸腺においては CD4<sup>+</sup> かつ CD8<sup>+</sup> の double positive (DP) T cell を多数認めた。また CD45RA<sup>+</sup> のナイーブ T 細胞も特に棟腺において多数認めた。移植時の T 細胞の混入を避けるため、分化抗原陰性 CD34<sup>+</sup> 細胞を移植して経時的に胸腺、脾臓、骨髄、肝臓を解析したところ移植 6 週目で胸腺においてのみヒト CD3<sup>+</sup> 細胞を認め、そのほとんどが DP T cell であった。9 週目で胸腺にはさらに多くの T 細胞がみられ、多くを占める DP T cell 以外に SP T cell も出現し、また脾臓にのみ少数のヒト CD3<sup>+</sup> 細胞を認めた。このことから NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスでは胸腺においてヒト T 細胞分化が起こり、末梢へ分布すると考えられた。一方、移植後のヒトの B 細胞分化については、骨髄においては CD19 陽性で CD34、CD10 あるいは細胞内 TdT<sup>+</sup> の B 前駆細胞を中心とした生着を認める一方、脾臓では表面 IgM<sup>+</sup> や表面 IgD<sup>+</sup> の成熟 B 細胞が主であった。さらに移植後の NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウス血漿中にはヒト IgM のみならずヒト IgG、ヒト IgA が検出された。また、T 細胞および NK 細胞の機能を評価するため移植後の NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスの脾臓より単核球を分離し、phytohemagglutinin で刺激したところ正常リンパ球と同様に芽球化が観察された。培養上清中には、interferon  $\gamma$ 、tumor necrosis factor  $\alpha$ 、など様々なヒトサイトカインの産生がみられた。さらにこれら活性化されたリンパ球は NK 細胞感受性細胞株である K562 に対し細胞傷害性を示し、また、抗 CD3 抗体の存在下に P815 細胞を傷害した。これらのことからマウス体内で分化してきたヒトリンパ球の機能的成熟が示された。移植後のマウスの組織学的検討では脾臓において periarteriolar lymphoid sheath (PALS) 様の構造を認め正常に近い T、B 細胞空間的分布を示した。胸腺では未熟 T 細胞に特徴的な CD1a 陽性 DT T cell を多数認め、マウス胸腺中のヒト T 細胞細胞分化を強く示唆した。

以上のことから NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウスはヒト造血幹細胞からリンパ球造血を in vivo で再現できるユニークなモデルでありヒトリンパ球分化および免疫系の研究に有用であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、ヒト造血幹細胞の in vivo 解析系として世界的に広く用いられている NOD/SCID マウスを改変した NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> マウス (以下 NOG マウス) を開発し、これを用いて臍帯血由来 CD34 陽性細胞移植後のヒト血球系の再構

築を解析した。

NOGモデルでは従来のNOD/SCIDモデルに比べて圧倒的に多くのヒト細胞の生着を認め multi-lineage な分化がみられた。わずか100個のCD34陽性細胞でも生着し、極めて敏感なヒト造血幹細胞のアッセイ系となった。また従来モデルにはみられないヒト造血幹細胞からのT細胞への分化も観察された。移植後2ヶ月頃よりNOGマウスの抹消血中ヒトT細胞が増加し始め、脾臓、骨髄ではCD4,8 single positive T細胞を主とし、胸腺でCD4,8 double positive T細胞を主とする生着を認めた。CD45RA陽性のナイーブT細胞も相当数存在した。移植後6週では胸腺のみに、9週で胸腺以外に脾臓でわずかにT細胞を認めることからNOGマウスの胸腺内でヒトT細胞分化が起こっていることが示唆された。また、これらのT細胞は多様なレパトアを有し、PHAに対して増殖しサイトカイン産生や細胞株に対する障害性を示した。成熟NK細胞の分化もみられ、また、血漿中にはヒト型IgG, A, Mも認めた。組織学的検討では脾臓においてヒト類似のリンパ球の構築をみとめNOGマウスモデルはヒト免疫系の解析にも有用であると考えられた。

以上の研究はヒト造血幹細胞の *in vivo* における分化増殖機構、特にT細胞分化の解明に貢献するところが大きい。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年6月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。