

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15003

研究課題名（和文）子宮内胎仔への造血幹細胞移植による新規異種間血液キメラマウスの作製

研究課題名（英文）Development of new xenogeneic hematopoietic stem cell chimeras by in utero hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

全 孝静（Jeon, Hyojung）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20837091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、異種由来造血幹細胞を用いた異種間造血幹細胞キメラマウスの作製を目的とし、研究を行った。方法として、経胎盤造血幹細胞移植を用いることで、移植後の胎仔生存率に影響が少ない方法を確立することができた。レシピエントとして造血欠損マウスRunx1 cK0::Tie-2-creを用いた。同種および異種造血幹細胞を経胎盤移植を行った結果、移植前処置を行うことなく、ドナー由来の造血幹細胞が高い割合で生着することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、従来の造血幹細胞移植研究で問題となっている骨髄破壊的前処置を必要とせず、ドナー細胞の生着率を高めることができる新しい造血幹細胞移植法として学術的に重要である。さらに、新たな実験動物モデルの作成につながる可能性があるため社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to create xenogeneic hematopoietic stem cell chimeras using xenogeneic hematopoietic stem cells. We established a method that had little effect on the survival rate of the fetus after transplantation using intra-placental transplantation. We used hematopoietic deficient mice Runx1 cK0::Tie-2-cre as recipients. We found that the transplanted cells engrafted successfully in the fetuses without needing pre-transplant conditioning and that the transplanted fetuses survived to term and were healthy.

研究分野：発生学

キーワード：造血幹細胞 経胎盤移植

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子改変マウスは、ヒトや病気、さらには基礎科学や医学研究の進歩に対する理解を深めるための貴重な実験モデルになる。しかし、ヒトとマウスの中の種の違いを考えると、マウスで得られた結果をヒトに適用するのは困難である。それを解決するために、ヒトの細胞をマウスに移植し、マウスの体内でヒトの細胞や臓器を形成するヒト化マウスが開発された。主な例として、ヒトの血液免疫系を再現する「血液ヒト化マウス」があげられる。このマウスは、超免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植する方法で作製される。免疫反応が起きなければ、マウスの血液環境下でもヒト造血幹細胞は維持されるが、現在のヒト化マウスは、ヒト血球の寄与率が細胞分画により大きく変わり、適切なヒト免疫系を再現することが困難である。さらに、ドナー細胞の生着率を高めるため行う骨髄破壊の前処理(放射線照射、化学療法など)により、レシピエント側の骨髄微小環境を壊すため現れるさまざまな副作用等の問題が残っている。

## 2. 研究の目的

ヒトを含む異種由来の血液細胞を有する「異種間血液キメラマウス」は、基礎医学研究において欠かせない優れた実験モデルであり、世界中の研究室で作られ、着実に改良されている。しかしながら、未だヒトの血液・免疫系を完全に構築できないという問題が残されたままである。本研究では、現在の造血幹細胞移植や免疫不全マウスの問題を克服した、新たな移植法および造血免疫系ヒト化マウスの開発を目的とし行われた。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1)マウス胎仔への経胎盤造血幹細胞移植法の開発、(2)高キメリズムを実現するため造血幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスの作製および利用、(3)異種由来造血幹細胞を用いた異種間造血幹細胞キメラマウスの作製、の3項目を目的とし、研究が行われた。

### (1) マウス胎仔への経胎盤造血幹細胞移植法の開発

異種細胞を移植する場合は、レシピエントマウスの免疫細胞による拒絶反応を回避するため免疫不全マウスを使用する必要がある。一方で、胎仔期は免疫系が未熟であり、異種細胞に対しても免疫拒絶反応は起こりにくいと考えられる。

Fleischmanらは、c-kit 遺伝子座(W)に変異を持ち重度の貧血を呈するマウスに対し、正常な造血幹細胞を経胎盤的に移植することで、病状の回復に成功したと報告した(Fleischman et al., PNAS, 1979)。そこで、本研究では、早い段階での移植を行うため、胎盤を通じて細胞を導入する「経胎盤血液幹細胞移植法」を使用した。

### (2) 高キメリズムを実現するため造血幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスの作製および利用

転写因子 *Runx1* は、造血幹細胞の産生に必須で、*Runx1* を欠損するマウスは造血幹細胞が産生されないため胎生 12.5 日で死亡する。われわれは、胎仔期の血液生成だけを回復するトランスジーン (Tg) の発現により、造血幹細胞が欠けたまま出産直前まで生き続ける遺伝子改変マウス (*Runx1*<sup>-/-</sup>::Tg、以下 *Runx1* KO::Tg) を作製した。このマウスが造血幹細胞移植のレシピエントとして使えるか再評価した結果、Tg の発現により胎生 18.5 日まで生き伸びることを確認したため、このマウス胎仔をレシピエントとし、同種および異種造血幹細胞を経胎盤移植を行った。

### (3) 異種由来造血幹細胞を用いた異種間造血幹細胞キメラマウスの作製

本実験系が成立可能かを検証するため、まず Ly5.1/Ly5.2 コンジェニックマウスを用いてマウス間の移

植実験を行った。移植後生まれたマウスの末梢血/骨髄を用いてドナー由来の血液細胞の寄与度を調べた。異種移植としては、ラット胎仔肝細胞およびヒトさい帯血由来造血幹細胞の移植を行い、異種由来の造血細胞を有する血液キメラマウスの作製を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス胎仔への経胎盤造血幹細胞移植法の開発

胎盤を経由して移植する方法は、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手法を用いた報告は少ない。われわれは、独自に改良した方法により、移植後の胎仔生存率を70%、移植の成功率を60%も向上することができ、胎生9.5日から11.5日までの移植が可能であることを実証した(図1)。

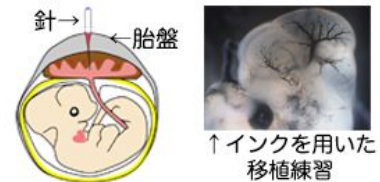


図1. 経胎盤造血幹細胞移植法

さらに、造血幹細胞が生成されないマウスの胎仔に対し、免疫システムが完全に構築される前に造血幹細胞を移植することによって、移植前の処理を行わずに、ドナー由来の造血幹細胞が高い生着率を示すことが確認された。これは経胎盤造血幹細胞移植法が、効果的な異種細胞移植のモデルになり得ることを示している。

##### (2) 高キメリズムを実現するため造血幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスの作製および利用

造血幹細胞移植を行った *Runx1* KO::Tg は、移植が成功しても出生後数時間以内に死亡し、成体マウスでの解析が不可能だった。*Runx1* は骨格系や神経系の発生にも関与するため *Runx1* KO::Tg 胎仔は、移植に成功していても造血系以外の原因で死亡する可能性があると考えられた。この問題を解決するため、造血系特異的に *Runx1* を欠損するコンディショナル欠損 Tg マウス (*Runx1*<sup>fl/fl</sup>:Tie2-cre::Tg、以下 *Runx1* cKO::Tg) を作製し、造血幹細胞が産生されないまま胎生 18.5 日まで生存することを確認したため、経胎盤造血幹細胞移植実験を行った。マウス造血幹細胞移植ではドナー細胞が問題なく生着し、胎生致死に至ることなく出生、成長した。さらに成体期まで生存したレシピエントマウスは 99% の高いキメリズムを示し、1 年以上経過してもドナー由来の免疫細胞による拒絶反応は起きないことを確認した。

##### (3) 異種由来造血幹細胞を用いた異種間造血幹細胞キメラマウスの作製

胎生 11.5 日の *Runx1* KO::Tg 胎仔に、ドナーであるラット胎仔肝細胞を移植したところ、胎生 18.5 日 *Runx1* KO::Tg は貧血の表現型が観察されず、胎仔肝臓の解析では、96% 以上がドナー由来の血球細胞であることを示した。また、ドナー細胞はレシピエントの体内に生着し、ラット由来 B 細胞や T 細胞、マクロファージおよび、赤血球も確認された。つまり、造血幹細胞が形成されないマウス胎仔に経胎盤的に移植することで移植前処置を行うことなく、ドナー由来造血幹細胞が高い生着率を認めたことから、われわれが提案する移植法は、有効な異種細胞移植のモデルになり得ることが示唆された

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。

さらに胎仔期に移植された細胞が、成体まで維持可能かを調べるため、野生型胎生 11.5 日胎仔にヒト造血幹細胞を移植した。自然分娩により生まれた 4 週齢マウスの末梢血を用いた解析で、ヒト血球細胞の生着を確認した。以上の結果より、*Runx1* 欠損胎仔に異種由来造血幹細胞を移植した場合、マウス造血幹細胞に比べ、造血前駆細胞等に分化するまで時間を要するものの、移植条件を工夫することにより、レシピエントに問題なく生着し維持されることが確認された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Jeon Hyojung, Asano Keigo, Wakimoto Arata, Kulathunga Kaushalya, Tran Mai Thi Nhu, Nakamura Megumi, Yokomizo Tomomasa, Hamada Michito, Takahashi Satoru | 4. 巻<br>11        |
| 2. 論文標題<br>Generation of reconstituted hemato-lymphoid murine embryos by placental transplantation into embryos lacking HSCs                                      | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-021-83652-9   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する      |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>全 孝静              |
| 2. 発表標題<br>子宮内胎仔造血幹細胞移植の基礎研究 |
| 3. 学会等名<br>日本分子生物学会（招待講演）    |
| 4. 発表年<br>2021年              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>白井俊明; 森戸直記; 金井真帆; 網川祐貴; 全 孝静; 水野 聖哉; 濱田理人; 高橋 智; 山縣 邦弘 |
| 2. 発表標題<br>MAFB変異部位の違いによる巣状分節性糸球体硬化症の発症メカニズムの相違                   |
| 3. 学会等名<br>日本腎臓学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|