

## マウス胎仔の血液を他種のものに置き換えることに成功

実験動物を用いた造血幹細胞移植は、さまざまな疾患に対する有効な治療法の開発や血液系の研究において重要な研究手法であると同時に、造血幹細胞の機能を確かめる強力な検証法の一つです。従来の造血幹細胞移植モデルは、レシピエント（移植される側）の免疫細胞を抑制し、移植するドナー造血幹細胞の拒絶反応を避けるため、あらかじめ放射線照射などの処置によって骨髄中の造血幹細胞を死滅させたマウスの静脈に、ドナー由来の造血幹細胞を注入させて作製しています。しかし、この処置は、レシピエントの寿命を短縮し、ドナー細胞の生着率を低下させる恐れがありました。また胎仔をレシピエントにして、造血幹細胞の高い生着率を得る方法は未だ報告されていません。

本研究では、生まれつき造血幹細胞が産生できない遺伝子改変マウスを作成し、移植前の処置を行わずに、ドナー由来の造血幹細胞を高い割合で生着させることに成功しました。この造血幹細胞は、自己複製能や増殖能も有しています。また、同様の方法により、種の異なるラットの造血幹細胞を、マウス胎仔に生着させることも可能です。

本研究で提案する移植法は、有効な異種細胞移植モデルになり得るものであり、今後、ヒト造血幹細胞を用いたヒト化マウスの作製に貢献できる可能性が示唆され、ヒト抗体の作製や先天性疾患の治療法の研究に役立つことが期待されます。

### 研究代表者

筑波大学医学医療系

濱田 理人 助教

高橋 智 教授

## 研究の背景

造血幹細胞移植の際には、レシピエント（移植される側）の免疫細胞を抑制し、移植するドナー造血幹細胞の拒絶反応を避けるため、放射線照射や化学療法などの移植前処置<sup>注1)</sup>が行われます。しかし、この処置により、レシピエントの寿命が短縮し、骨髄微小環境が破壊されドナー細胞の生着不全が起きるなどの問題が生じます。

本研究グループは、これまでに、生まれつき造血幹細胞が産生できない遺伝子改変マウス（*Runx1* KO::Tg）を作製し、造血メカニズムの解析を行ってきました。このマウスは、造血幹細胞の発生に必須な遺伝子 *Runx1* を欠損した *Runx1* ノックアウトマウス<sup>注2)</sup> に、胎仔期造血のみを回復する特異的な遺伝子を発現させることにより、出生直前まで生存できるものです。理論的には、造血幹細胞を持たない胎仔に、造血幹細胞を移植すれば、ドナー由来の造血が再構築するモデルが作製できます。

胎仔期は免疫系が未熟であるため、ドナー細胞に対する免疫応答が抑えられていると考えられます。その性質を用いて、移植前処置を行わなくても、ドナー細胞の生着および免疫拒絶の回避を試みる移植研究法として、子宮内の胎仔へ移植を行う「胎仔期移植<sup>注3)</sup>」や、胎盤を標的にする「経胎盤移植<sup>注4)</sup>」などがあります。本研究では、経胎盤移植を応用し、造血幹細胞が産生されない *Runx1* KO::Tg マウスの胎仔に、胎盤を介してドナーの造血幹細胞を移植する、というアプローチにより、移植前処置を必要せず、ドナーの造血システムを再現する、造血幹細胞移植モデルの開発に取り組みました。

## 研究内容と成果

本研究では、経胎盤移植を独自に改良した方法により（図1）、移植後胎仔の生存率を 66.6%に、移植の再現率（成功率）を 63.9%に維持することに成功しました。これは、既存の報告より大幅に改善されており、この方法が有効な移植法であることを実証しました。

具体的には、マウス体内で造血幹細胞が現れるとされる胎生 10~11 日目の胎仔に、経胎盤的にマウス造血幹細胞を移植し、造血再構築モデルを作りました（図2）。その結果、移植を行わなかった *Runx1* KO::Tg 胎仔は、造血幹細胞欠損により重度の貧血を呈して死亡しますが、移植を行った *Runx1* KO::Tg 胎仔は出生時の貧血は見られず、不十分だった血液細胞がドナーのものに補われていると考えられました。実際に、移植を行った生後 1 日目 *Runx1* KO::Tg 胎仔の末梢血および胎仔肝臓を取り出し、フローサイトメトリー解析<sup>注5)</sup>を行ったところ、体内の 95%以上の血球細胞がドナー由来のものであり、リンパ球や顆粒球系、単球系など多種類の血球系列に分化し、良好な生着が認められました。

造血幹細胞移植を行なった *Runx1* KO::Tg 胎仔由来造血幹細胞の、自己複製能および増殖能を検討したところ、この造血幹細胞は造血再構築能<sup>注6)</sup>を有し、*Runx1* KO::Tg 胎仔は、造血幹細胞の維持や調節に関わる造血微小環境にも異常がないことが確認されました。

さらに、*Runx1* KO::Tg マウス胎仔に対して、異種であるラットの造血幹細胞を移植したところ、マウスの結果と同じく、生後 1 日目において、ラット由来の血球細胞および赤血球が、マウス体内に置き換わっていました（図3）。つまり、造血幹細胞が形成されないマウス胎仔に、経胎盤的に造血幹細胞を移植すると、移植前処置を行わずに、ドナー由来造血幹細胞が高い割合で生着させることが可能であり、本研究で提案する移植法は、有効な異種細胞移植モデルになり得ることが示唆されました。

## 今後の展開

本研究成果を応用することにより、ヒト造血幹細胞を用いたヒト化マウスの作製に貢献できる可能性があります。また、造血幹細胞ではなく、組織幹細胞を欠損する遺伝子改変マウスを用いて、さまざまな臓器再生マウスを作製し、臓器が作られるメカニズムの解明に繋がることも考えられます。

この移植法は、移植前処置が不要であるだけでなく、胎仔はとて小さいため、少量の造血幹細胞でも十分な移植効果が得られる利点があります。さらに、移植後に生まれたマウスは、ドナー細胞に対して特異的な免疫反応が抑制されるため（免疫寛容）、成体になってからも同じドナー細胞を拒絶反応なく移植することができ、免疫寛容の誘導による先天性疾患の治療法開発にも役に立つと期待されます。

参考図

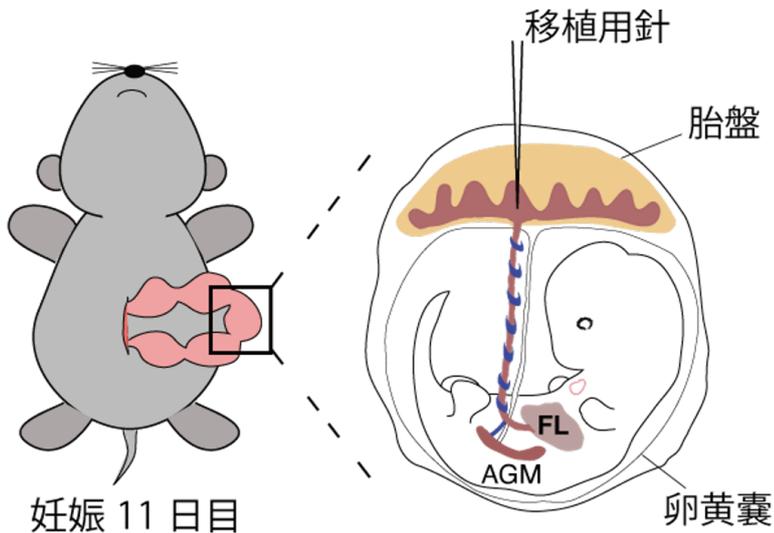


図1. 経胎盤移植の模式図

妊娠 11 日目のレシピエント母親マウスの子宮を露出し、胎仔側胎盤を標的にし、移植を行う。FL; Fetal Liver (胎仔肝臓), AGM; aorta-gonad- mesonephros region (大動脈・性腺・中腎領域)。

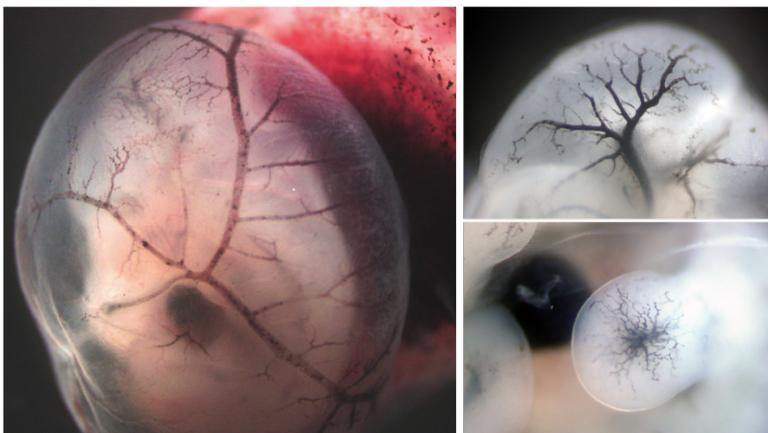


図2. 経胎盤移植後の血流の様子

India ink を経胎盤的に注入して血流を可視化すると、血液が胎仔の卵黄囊（左側）および頭部（右上）前肢（右下）など全身に流れていることが確認できる。

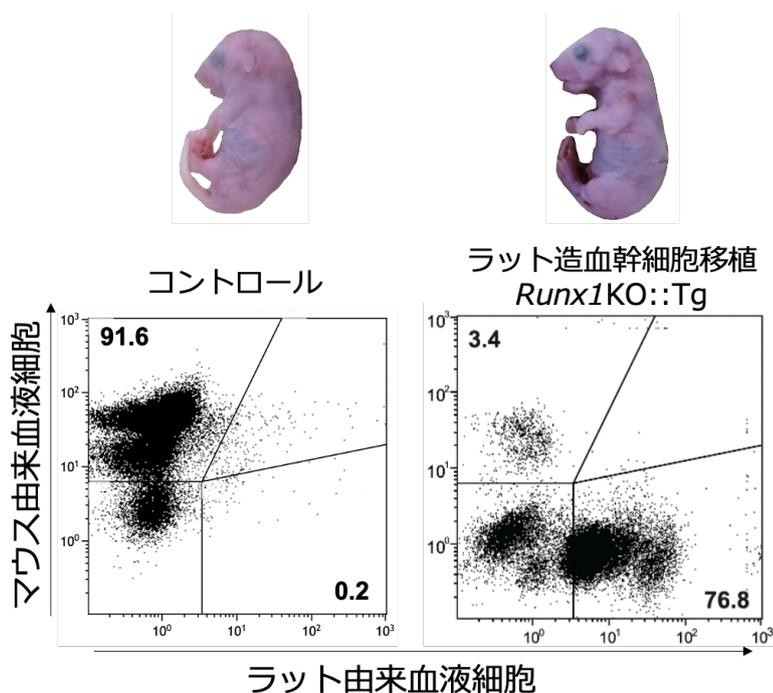


図 3. マウス胎仔内の血液細胞の由来

ラットの造血幹細胞を移植したマウスでは、ラット由来の血液細胞に置き換わっていることが確認された。

#### 用語解説

##### 注 1) 移植前処置

ドナー細胞の生着率を高めるため、また、レシピエントの免疫細胞等を除去するために行う骨髄破壊的前処置。全身放射線照射や超大量の抗がん剤などが使用される。

##### 注 2) ノックアウトマウス

遺伝子の機能を推定するため特定の遺伝子の機能を人為的に破壊したマウスモデル。

##### 注 3) 胎仔期移植

免疫系が確立する前の胎仔へ移植を行う方法。

##### 注 4) 経胎盤移植

1979 年アメリカの研究グループが初めて報告した方法で、胎盤を介して胎仔に移植を行う。胎仔に直接針を刺さないため物理的なダメージを大きく減らすことができるが、再現性が低いことや技術の制約があることから、この方法を用いた例は少ない。

##### 注 5) フローサイトメトリー解析

蛍光標識された特異性の高い抗体に反応した細胞にレーザー光線を照射することで、細胞を解析するシステム。

##### 注 6) 造血再構築能

移植した造血幹細胞が、長期にわたりレシピエント体内に生着し、自ら増殖しながら様々な血液細胞を作り出すことで新たな造血系を構築する能力。

#### 研究資金

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業(26221004, 25860205, 23118504, 16K18398, 19K07499, 19H00966、20K21513)、特別研究員奨励費(17J01243)、武田科学振興財団、上原記念生命科

学財団、世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI)、筑波大学研究基盤支援プログラム A タイプの研究プロジェクトの一環として実施されました。

#### 掲載論文

【題名】 Generation of reconstituted hemato-lymphoid murine embryos by placental transplantation into embryos lacking HSCs.

(経胎盤移植による血液免疫系再構築マウス胎仔の作製)

【著者名】 全 孝静, 浅野 圭吾, 脇本 新, Kaushalya Kulathunga, Mai Thi Nhu Tran, 中村 恵弥, 横溝 智雅, 濱田 理人, 高橋 智

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2021 年 2 月 23 日

【DOI】 10.1038/s41598-021-83652-9

#### 問い合わせ先

【研究に関すること】

濱田 理人 (はまだ みちと)

筑波大学医学医療系 / トランスボーダー医学研究センター 助教

URL: <http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: [kohositu@un.tsukuba.ac.jp](mailto:kohositu@un.tsukuba.ac.jp)