



Retrovirus-mediated gene transfer of granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSFR) cDNA into MDS cells and induction of their differentiation by G-CSF

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 悟己 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1166

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 313号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏名	中村悟己		
論文題目	<p>Retrovirus – mediated gene transfer of granulocyte – colony stimulating factor receptor (G-CSFR) cDNA into MDS cells and induction of their differentiation by G-CSF (レトロウイルスベクターを用いた G-CSF receptor 遺伝子導入による MDS 細胞株の分化誘導効果)</p>		

博士(医学) 中村 悟 己

論文題目

Retrovirus-mediated gene transfer of granulocyte-colony stimulating factor receptor (G-CSFR)cDNA into MDS cells and induction of their differentiation by G-CSF

(レトロウイルスベクターを用いたG-CSF receptor遺伝子導入によるMDS細胞株の分化誘導効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

骨髄異形成症候群(MDS; myelodysplastic syndromes)は造血幹細胞のクローン性異常に基づく慢性進行性の造血障害で、血球減少が主体のものから白血病に近接する増殖性のもので、幅広いスペクトルを形成する症候群である。人口の高齢化と共に症例数は増加しているが、抗癌剤による治療に対して難反応性であり、有効な治療法がなく、より確実で安全な治療法の開発が望まれている。

MDSの病因については動物モデルや細胞株がなく研究が困難であったが、京都大学の通山らがMDS患者から細胞株を樹立し細胞の分化障害についての研究が可能となり、また、新庄らはMDS患者と健常人の末梢血顆粒球の顆粒球コロニー刺激因子受容体(G-CSFR)数を検討し、MDS患者でG-CSFR数の有意な減少を報告した。これらのことからMDS細胞ではG-CSFRの減少が分化能の障害に関与している可能性が考えられた。そこで、我々はMDS細胞株にレトロウイルスベクターを用いG-CSFR cDNAを導入し、分化誘導の可能性を検討した。

[材料ならびに方法]

レトロウイルスベクター(pMX)、パッケージング細胞(GP+E86細胞、PA317細胞)を用い、G-CSFR遺伝子を含むウイルスを産生する高効率レトロウイルスプロデューサー細胞を作製した。レトロウイルスベクターにはgreen fluorescent protein(GFP)遺伝子とネオマイシン耐性(NeoR)遺伝子を同時に組み込み、前者は早期感染効率の評価と遺伝子導入細胞の追跡のため、後者はウイルス力価の評価と感染細胞選択のために用いた。このプロデューサー細胞の産生するウイルス上清中にて通山らの樹立したMDS-L細胞を培養し、G-CSFR遺伝子を導入した。コントロールとしてG-CSFR遺伝子を含まないレトロウイルスベクターを感染させたMDS-L細胞を用いた。G-CSFR遺伝子が導入されたMDS-L細胞株の細胞増殖効果と分化誘導効果をトリチウムサイミジン取り込み能($[^3\text{H}]-\text{TdR}$)とNBT還元活性、表面抗原CD11b測定、形態学的変化についてコントロールと比較検討した。

[結果]

作製したレトロウイルスベクターはGFPによる早期感染効率の評価では標的細胞の約70%に感染し、薬剤選択(G418)により90%以上の遺伝子導入細胞の純化ができた。G-CSFR cDNAを導入したMDS-L細胞はG-CSF刺激により $[^3\text{H}]-\text{TdR}$ でみた増殖が40%抑制され、NBT還元活性と細胞表面抗原CD11bはそれぞれ4倍、2.5倍の増強効果が認められた。形態学的にも約70%に分葉核を持つ顆粒球細胞が認められた。MDS-L細胞株において、G-CSFRの強制発現によりG-CSF刺激により分化誘導が可能であった。

〔結論〕

本研究において、初めてMDS-L細胞株にG-CSFR遺伝子が導入され、骨髓芽球性MDS-L細胞がG-CSF刺激に反応し、好中球への十分な分化傾向が認められた。このことはG-CSFRの発現がMDS細胞の分化誘導を可能にすることを示している。レトロウイルスベクターを用いることで細胞内で安定してG-CSFRの発現が認められ、G-CSFRの強制発現が分化傾向に乏しい細胞の分化誘導に有効であったと考えられ、今後のMDSの新たな治療の可能性が示された。また、G-CSFRには増殖シグナルと分化シグナルを伝える細胞質内ドメインがあるが、現在のところどのような細胞でどちらのシグナルが有意に作用するかは明らかではない。我々のシステムを用いることで骨髓芽球における分化シグナルの解明に役立つだけでなく、MDSにおける病態解明に役立つと考えられた。また、本研究で用いたシステムにより、造血幹細胞の分化・増殖の機構を解明することや造血幹細胞を標的とした遺伝子治療に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

骨髓異形成症候群(MDS)はクローン性異常に基づく疾患群であり、骨髓中の造血幹細胞が成熟した血球になることができない。現在のところ有効な治療法がないため予後不良であり、新たな治療法の開発が望まれている。本論文では同グループの研究によりすでに示されている「MDS患者では末梢血顆粒球の顆粒球コロニー刺激因子受容体(G-CSFR)が減少している」という事実に基づき、MDS患者から樹立された細胞株(MDS-L)にG-CSFR遺伝子を導入することによる分化誘導の可能性を検討している。

レトロウイルスベクターを用いG-CSFR遺伝子を導入した細胞と導入していない細胞のG-CSF刺激に対する反応を比較した。³H-thymidineの取り込みによるDNA合成能(細胞増殖能)は導入細胞では非導入細胞に比し50%以下に抑制された。成熟顆粒球への分化を示す指標の一つであるNBT還元能は導入細胞では4倍増加した。顆粒球やマクロファージへ分化するに従い増加することが知られている細胞表面抗原CD11bは導入細胞において2.5倍に増加した。また、形態学的にも導入細胞では約70%に分葉核を持つ成熟した顆粒球細胞が認められた。

これらの結果よりG-CSFRの強制発現とG-CSF刺激によりMDS細胞株を成熟顆粒球へと分化させることが可能であると考えられた。MDS患者骨髓より造血幹細胞を取り出し、G-CSFR遺伝子導入後再び患者に戻す、という ex vivo gene therapyの可能性が示唆された。また本実験システムは骨髓芽球における分化シグナルの解明に役立つものと思われ、MDSの病態の解明や治療の開発を考える上で有意義な仕事であると評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) MDS-L cell lineはどのような特徴をもった細胞か
顆粒球への分化は、染色体異常は、p53のstatusは、
- 2) MDS-Lを用いた研究でどこまでMDSの一般論が語れるのか
- 3) Neomycin selection前の感染効率は何のくらいか
- 4) 発現したG-CSFRにmaturation domainがあるという証拠はあるか

- 5) 顆粒球機能の評価として他にはどのようなものがあるか
- 6) 細胞増殖能は他の方法でも測っているか
- 7) IL-3存在下でもG-CSFR導入により分化が誘導できるか
- 8) 他の白血病 cell lineでG-CSFRにより分化が誘導されたという研究はあるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 難波 宏 樹
副査 三浦 直行 副査 本郷 輝 明