

We also performed phylogenetic tree analysis of CD8A from various primates (Fig. 1C). The CD8A from the common marmoset (a new world monkey) was distinct from the *Catarrhini* and mouse.

#### *Non-uniform evolution of immunity-related genes*

In Table 2, the average percentage of amino acid conservation between the common marmoset and human was measured. We found that the standard deviation between the 30 genes was relatively low ( $\pm 5.5$ ). This suggests that the degree of evolutionary divergence between these two species does not heavily depend on the identity of the gene. In contrast, the standard deviation values between the common marmoset and mouse or between the human and mouse were as large as  $\pm 13$ . Therefore, the extent of evolutionary divergence from mouse to primates varies.

We crudely categorized the 30 genes into two groups (see the inserted line in Table 1) based on their conservation between species. The proteins above the inserted line were less than 60% identical between primates and mouse. The less conserved genes include *CD80*, *IL4*, *IGHE*, *CD8A*, *IL6*, *CD86*, *IL6R* (*IL-6R alpha*), *FCER1A* (*Fc IgE receptor, alpha polypeptide*), *CD2*, *IL4R* (*IL-4R alpha*) and *IL17F*. As seen in Table 2, the average number of amino acids that were identical between the common marmoset and mouse in this group were  $45\% \pm 4.8$  and whereas the percent

identity between the human and mouse was  $46\% \pm 5.5$ . These less conserved genes have diverged rather quickly from mouse to primates. The remaining 19 genes (below the inserted line in Table 1) were more highly conserved. The average amino acid identity in these proteins was  $68\% \pm 7.1$  between the common marmoset and mouse and  $69\% \pm 7.5$  between the human and mouse. These 19 genes appear to have diverged relatively slowly from mouse to primates. These findings suggest that these immunity-related genes evolve at non-uniform but unique rates.

The extent of conservation and/or divergence does not appear to be related to whether the protein is a membrane or soluble protein. For example, both CD44, a membrane protein, and TNF (TNF alpha), a soluble factor, were highly conserved. On the contrary, CD80, a membrane protein, and IL4, a soluble protein, were highly divergent. Furthermore, the conservation and/or divergence of a protein between species is not likely attributable to a particular domain in the protein. For example, immunoglobulin-like domains were detected in both the diverged (CD80, CD8A) and conserved (CD28, CD19) proteins.

Both *IL4* and *IL5* are Th2-type genes located in the same gene cluster. However, *IL4* was highly divergent, whereas *IL5* was conserved. *IL4* has been previously shown to be highly divergent between the rat and the mouse, whereas *IL5* was found to be conserved between these two species.

Fig. 1. Comparison of CD8A in the human, common marmoset and mouse. A: Sequence alignments from human, common marmoset and mouse CD8A proteins. Identical amino acid residues are indicated by white letters in a black background. The characteristic features in human CD8A are indicated by bars and include a signal peptide, 9 beta strands (A to G in black), 3 CDR domains (CDR1 to CDR3 in red), a hinge region, a transmembrane (TM) domain and a cytoplasmic p56<sup>lck</sup>-binding motif. B: Comparison of the three dimensional structures of the CDR2 region. The structure of CDR2 was predicted for the common marmoset (Y51 to G62) and mouse (Y61 to D72) using the known structure of human CD8A (Y51 to G62) as a template. The amino acids numbers in B represent those in the mature protein (a signal peptide has been cleaved off from the open reading frame). C: Phylogenetic tree analysis of CD8A from various primate species. The tree was constructed by Clustal X-aligning the multiple amino acids sequences and then joining the nearest neighbors. CD8A from the common marmoset (*C. jacchus*) is encircled by a broken oval line. The numbers represent the probability of neighbor-joining, where a high number is more likely to join. The sequence sources were XP\_001138871 (*P. troglodytes*), NM\_001768 (*H. sapiens*), P30433 (*P. pygmaeus*), XP\_001092778 (*M. mulatta*), CAB41462 (*S. sciureus*), DQ189217 (*C. jacchus*) and XM\_132621 (*M. musculus*).

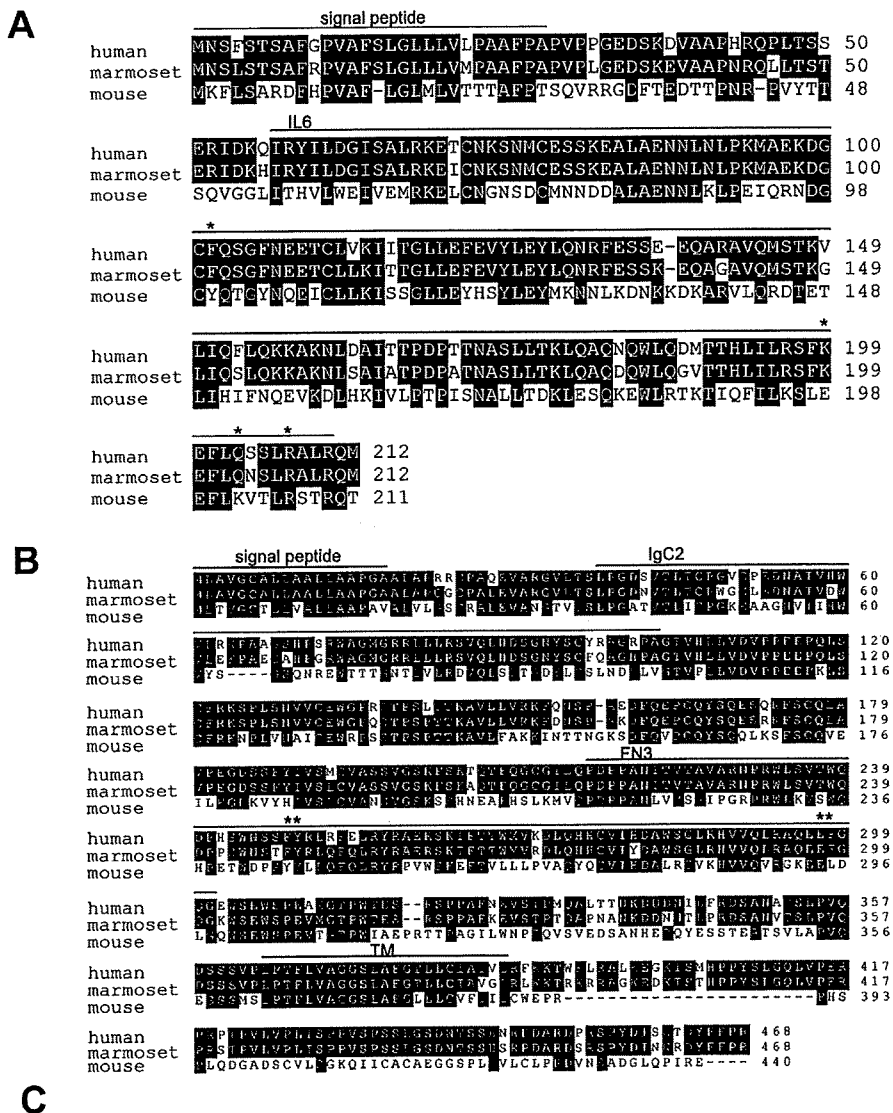


Fig. 2. Multiple alignments of IL6 (A) and IL6R (B) derived from the common marmoset, human and mouse. Identical residues are indicated by white letters in a black background. The domain structures identified by the SMART tool are indicated by bars. Ig, immunoglobulin-like; FN3, fibronectin 3, TM, transmembrane. C: The residues important for IL6-IL6R interaction (indicated by the asterisks in A and B) are aligned (note that their amino acid numbers in C are based on the signal peptide-cleaved, mature protein).

Mouse and rat IL5 are 93% identical, whereas IL4 is only 57% identical (Richter et al. 1990; Uberla et al. 1991). This suggests that a physical link in the genome does not likely influence genetic diversity between related species. The factor(s) responsible for the non-uniform evolution of genes is not clear. Mice and primates live in very different ecological niches and encounter widely different pathogens. These environmental pressures may explain why immunity-related genes have evolved so heterogeneously.

#### *Co-evolution of ligand-receptor pairs*

Among the 30 genes examined, five ligand-receptor pairs were worth mentioning (see the genes indicated by asterisks in Table 1). For each pair, the degree of amino acid conservation between primates and mouse was quite similar. For example, IL6 and IL6R were both categorized as less conserved genes and were 41-43% and 46-47% identical, respectively. In contrast, IL5 and IL5RA were both categorized as highly conserved genes and were 65-69% and 68% identical, respectively. This data supports the hypothesis that the ligand and receptor genes have co-evolved.

One of these ligand-receptor pairs, IL6 and IL6R, were investigated in more detail in Fig. 2A and B. The primates' IL6 was divergent from murine IL6 over the entire length of the protein. Likewise, the divergence in IL6R was not limited to the extracellular domain but extended throughout its cytoplasmic region (note that only the transmembranous region is highly conserved among the three species).

IL6, IL6R and IL6ST (gp130) together form a complex that is composed of 2 molecules each of IL6, IL6R and IL6ST. A crystal structure of this hexamer has been solved using human-derived proteins, and all three proteins interact directly with each other (Boulanger et al. 2003). The IL6-IL6R interaction is mediated by a site I interface and is an initial step for hexamer formation. The amino acid residues that are required for the site I interface are indicated by asterisks in Fig. 2A and B. Many of these residues are known to be vital for this interaction based on a mutation

study (Kalai et al. 1997). The amino acids required for the interaction are aligned in Fig. 2C. R179 in IL6 and Y230 and E278 in IL6R were conserved among the three species, whereas F74, K171 and Q175 in IL6 and F279 in IL6R were the same in the two primates but different in the mouse. Therefore, if IL6 and IL6R co-evolved from rodents to primates, the amino acid residues responsible for the protein-protein interaction would have also co-evolved.

#### *Conclusion*

In summary, each immunity-related gene appears to evolve with its own rate from rodents to primates, and yet those that specifically belong to a ligand-receptor pair are likely to co-evolve.

#### **Acknowledgments**

We thank M. Kuji for her secretarial assistance. This work was supported in part by a research grant from the Japan Science and Technology Agency. M.S. is a participant in the 21st Century COE Program in the "Center for Innovative Therapeutic Development towards the Conquest of Signal Transduction Diseases" at Tohoku University.

#### **References**

- Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E. & Garcia, K.C. (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, **300**, 2101-2104.
- Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W. & Smith, K.A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**, 2027-2032.
- Kalai, M., Montero-Julian, F.A., Grotzinger, J., Fontaine, V., Vandenbussche, P., Deschuyteneer, R., Wollmer, A., Brailly, H. & Content, J. (1997) Analysis of the human interleukin-6/human interleukin-6 receptor binding interface at the amino acid level: proposed mechanism of interaction. *Blood*, **89**, 1319-1333.
- Leahy, D.J., Axel, R. & Hendrickson, W.A. (1992) Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell*, **68**, 1145-1162.
- Letunic, I., Copley, R.R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. & Bork, P. (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D257-D260.
- Mansfield, K. (2003) Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp. Med.*, **53**, 383-392.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Cherukuri, P.F., DeWeese-Scott, C., Geer, L.Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, P.A., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D. & Bryant, S.H. (2005) CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic*

- Acids Res.*, **33**, D192-D196.
- Mestas, J. & Hughes, C.C.W. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.*, **172**, 2731-2738.
- Ogata, K. & Umeyama, H. (2000) An automatic homology modeling method consisting of database searches and simulated annealing. *J. Mol. Graph. Model.*, **18**, 258-272.
- Richter, G., Blankenstein, T. & Diamantstein, T. (1990) Evolutionary aspects, structure, and expression of the rat interleukin 4 gene. *Cytokine*, **2**, 221-228.
- Uberla, K., Li, W.Q., Qin, Z.H., Richter, G., Raabe, T., Diamantstein, T. & Blankenstein, T. (1991) The rat interleukin-5 gene: characterization and expression by retroviral gene transfer and polymerase chain reaction. *Cytokine*, **3**, 72-81.

Supplementary TABLE 1. The sequences of primers used to amplify transcripts.

Gene	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')
<i>CD80</i>	ttgcacctgggaagtgccctggcttact gctgacttccctacacctagtatactgac	cctccagaggtgagcaaatatcctct agggcaaggtgggtaactctgtccatctg
<i>IL4</i>	gtcagcattgcattgtagctctc	aataaagctatcaaaaactcataaalttaa
<i>IGHE</i>	cctccacacagagcccatccgtctt	gtcattaccgggatttacagacac
<i>CD8A</i>	RaRaacSaRggctactatttctgctc	tgaagtMatgtagtRgYtgtNgc
<i>CD8A</i>	tccYgSgcScctcccctMgMgcccKagctt	ttcRctKKcWgRaRgacYggcacga
<i>IL6</i>	aaaagatggatgcttcaactggat	acataaattaactcagcttcacatat
<i>IL6</i>	ctcgagcccaccgggaacgaagagaa	actccaaagaccagtgatgatttca
<i>IL6R</i>	ggacagaatccaggagctctccagctgaga	cgtttggtttatcatccacagggtccaggc
<i>IL6R</i>	gaagacttccaggagccgtgccagtatcc	ctgggaggctgtcgcattgcagaatct
<i>IL6R</i>	ctctgcgggacctggagtggtagccgagg	tgtctccctccggactgtaactggcag
<i>IL4R</i>	ccgcttgggcgcccggacggcgaatggagc	gaccatgtcctcatgaacagggtggcacac
<i>IL4R</i>	agcagtggggaaggggtataagccttt	ccaggcatgataagccctagtctcatct
<i>IL4R</i>	gctccatgccctgggatgagtcccaagt	ggtggctccctgtccagtcctcaagggtga
<i>IL4R</i>	gaattgttaccagctcttgcctgttt	gtgcaagtcaagggtgtctggactctgggtc
<i>IL4R</i>	gcagtcaacattggagtgaacacgaccg	gatcctcactgggcacctgctgatttcc
<i>IL4R</i>	ctcccaatggggtggcttctctgggctc	gaggagggagggttctaggtaggcacgtt
<i>IL17F</i>	gaacacaggcatacacaggaatacattc	ggcatttctacagcttctcagctgagtg
<i>IL2RA</i>	accaagYgagccttccaggctcactgca	cttctgttctgttcYcggcttcttacc
<i>IL2RA</i>	ctgcagagaaagacctccgcttactgcc	agcaggacctctgttagaccctgtat
<i>CD40</i>	gctacagggRittctgataccatctgca	cagcagcWccaggctctcYRgcca
<i>CD40</i>	agtggctctgccctgtctcaact	ctttgtYtcagcttgcacagggtgac
<i>IL2</i>	taatcactactcacagtaacctcaactcctg	gaaggctgatattttaagtgggaagcac
<i>IL7R</i>	ttcatttcatacacactggctcacac acctgaggctcctttgacctgagtgctg gtgagttcaatcctgaaagtctctggac	atgtaccacaaagtcattggctcctccc ctagcttgaatgcatccacctatgaatc cttcccttttaaatcatcttctgctcacg
<i>IL17A</i>	gcaggcacaactcatccatcccagttga	atagttaactgctttggggagtggtggc
<i>IGHM</i>	accacacagacctgccctgccactgaag	ggttagttgcatgcacacagagcggc
<i>IGHM</i>	gtgggtctggctcaccacggaccaggtg	ggttcagctgctcccggctggtggcagca
<i>IGHM</i>	gccaaaggaccacggtcaccgtctctca	gatggtcagtgctggtcaccctgtagg
<i>IL5</i>	gccaaaggcaaacgcagaacctttagagc	aatcttggctgcaacaaccagtttagtc
<i>CD19</i>	aagaRgaaggggaggSctatgaRgaRccWga	aSgaRRtccaggctRgYcacYtgRgRRtca
<i>CD19</i>	tattatgtcWccRWggMRRcctgacat	cctgcYcaaggttgagtcRttctcatagaa
<i>CD19</i>	agYggggagMgttccgggtggaatgYtt	aaagtcacMRctgRgacYWtccaKccaccagt
<i>CD19</i>	atgccayctctcKccYYSTctYcYtctctctt	tctKiRgcccacacatacagctKgg
<i>CD19</i>	tgccccggagagtctgacca	cctctgaggacctgttctcaggc
<i>CD3E</i>	gccatcttagtagtaacctccc	cgatttcccctgggtccaagactag
<i>IL5RA</i>	gggagaaccagtgctgcttccaatcc	ggatgaagcatccatacttitaagaga
<i>IL5RA</i>	gaatttaactgcaccacaact	acatggagctcactgctctcacttgaa
<i>IL5RA</i>	atcttctgtgagtactgctggaacaaga	aggggcatctgtgccaacaagccaggtgca

Supplementary TABLE 1. Continue.

Gene	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')
<i>ITGAX</i>	agtacgttggctagctctcctgaaacag caagacaggagcaggacattgtgtcctga taaataacattgcatcgaagccctcccagg atgaaggccgaagtacggggactcagat agctctcctcaggctgacgtatlttg tgacccccattacctgctctgaactt ttctggctaccttgacgtctccccc acattcagaagaatcccgtgctggactgct	ggcaaagtgtgtataagatgctgccccg aatactttcagagcatcaaaagtcctcc tcgctgtctacgtccacggagcagagggga accagtcacatcctgggtgaggtcttgac tagggaggccgtgaagatctctgagcacc tctcactgctcacattggctgtcagaagca caaagctgaggtgcccctcagggtgaaat gtgcagtggtctcccctcaggcctgac acagagaagctcagtaataataagaaatggg acctgctccacggcctgctctgttttca gcgttgggaaggtggatgtcgtcctcc tcagctccacgccattggccaggaggggat gaaagtcagcatgtctcttggagg ctggaagaaggcaRagatcagcacc tacataatgcccccaSagagggtacca cagcagcWccaggctctcYRgcca cttgggtYtcacagctgtccaagggtgac ctgctgaagtgtagcaggaactactagtc gatcttgagaagactggactgacggaac cacgactatggcttaatttctcctgagc ctgttatcaaatagcatttgcctctgctc ccagaaactggctttagatggct aatcaggaactgtgtgtgccattcag
<i>IL10</i>	tgggttccaagcctgtgtgagatgac	
<i>IL10</i>	ggcttgccttgcaaaaccaaccacaa	
<i>TNF</i>	aagcctgtagccatgttagcaaacct	
<i>TNF</i>	gcaaggacagcagaggaccagctaagagg	
<i>MS4A1</i>	cctcWgagaaaaactccccatctacMcaR	
<i>MS4A1</i>	cttgggggctgtccaRatYatgaatgg	
<i>MS4A1</i>	gagagaagcattcagatgcatgacacaagg	
<i>MS4A1</i>	gctacagggRtttctgataccatctgca	
<i>MS4A1</i>	agtggctcctgccgcctggtctcact	
<i>IL6ST</i>	cttcgagcactgtccagtattctaccgtgg	
<i>IL6ST</i>	agcatacacagatgaagggtggaagatgg	
<i>IL6ST</i>	caccctgtatcacagactggcaacaagaaga	
<i>IL6ST</i>	gatactggagtgactggagtgaagaagc	
<i>IL6ST</i>	tgagggtgagtgaggatggtggaaggga	
<i>IL6ST</i>	gaagtagaagacttagcttcaaatccct	

Supplementary TABLE 2. Structural features of 30 immunity-related human and mouse genes.

Human gene	Accession No.	No. of amino acid residues	Domain composition
<i>CD80</i>	NM_005191	288	Ig/Pfam:C2-set_2/TM
<i>IL4</i>	NM_000589	153	IL4_13
<i>IGHE</i>	J00222	427	Ig-like/ Ig-like/ Ig-like/ Ig-like
<i>CD8A</i>	NM_001768	235	Ig/TM
<i>IL6</i>	NM_000600	212	IL6
<i>CD86</i>	NM_175862	329	IgV/TM
<i>IL6R</i>	NM_000565	468	IgC2/ FN3/ TM
<i>FCER1A</i>	NM_002001	257	IgC2/Ig-like/TM
<i>CD2</i>	NM_001767	351	Pfam:V-set/Pfam:C2-set/TM
<i>IL4R</i>	NM_000418	825	SCOP:dliarb1/FN3
<i>IL17F</i>	NM_052872	163	Pfam:IL17
<i>IL2RA</i>	NM_000417	272	CCP/CCP/TM
<i>CD40</i>	NM_001250	277	TNFR/TNFR/TNFR/TNFR/TM
<i>IL2</i>	NM_000586	153	IL2
<i>IL7R</i>	NM_002185	459	Pfam:FN3/TM
<i>IL17A</i>	NM_002190	155	Pfam:IL17
<i>CD28</i>	NM_006139	220	TM
<i>IGHM</i>	BC073767	454	IgC1/IgC1/Ig-like/IgC1
<i>IL5</i>	NM_000879	134	PFAM:IL5
<i>CD19</i>	NM_001770	556	Ig/Ig/TM
<i>CD3E</i>	NM_000733	207	IgC2/ TM/ITAM
<i>IL5RA</i>	NM_175726	420	BLAST: FN3/ SCOP:dlegja/ TM
<i>IL2RG</i>	NM_000206	369	FN3/TM
<i>ITGAX</i>	NM_000887	1163	int-alpha/VWA/int-alpha/int-alpha/int-alpha/int-alpha/ Pfam:integrin-alpha
<i>IL10</i>	NM_000572	178	IL10
<i>TNF</i>	NM_000594	233	TM/TNF
<i>MS4A1</i>	NM_152866	297	PFAM: CD20
<i>IL6ST</i>	NM_002184	918	Pfam: Lep_receptor_Ig/ FN3/ FN3/ FN3/ FN3/ TM
<i>CD44</i>	NM_001001391	361	LINK/TM
<i>FCER1G</i>	NM_004106	86	TM/ITAM

Supplementary TABLE 2. Continue.

Mouse gene	Accession No.	No. of amino acid residues	Domain composition
<i>CD80</i>	NM_009855	306	Ig/Pfam:Ig/TM Ig/Pfam:C2-set_2/TM
<i>IL4</i>	NM_021283	140	IL4_13
<i>IGHE</i>	Z27397	427	Ig-like/ Ig-like/ Ig-like/ Ig-like
<i>CD8A</i>	XM_132621	247	Ig/TM
<i>IL6</i>	NM_031168	211	IL6
<i>CD86</i>	NM_019388	309	IgV/TM
<i>IL6R</i>	NM_010559	440	IgC2/ FN3/ TM
<i>FCER1A</i>	NM_010184	250	Ig/Ig/TM
<i>CD2</i>	NM_013486	344	Pfam:V-set/Pfam:C2-set/TM
<i>IL4R</i>	NM_001008700	810	SCOP:d1iarb1/FN3
<i>IL17F</i>	NM_145856	153	BLAST:Pfam:IL17
<i>IL2RA</i>	NM_008367	268	CCP/CCP/TM
<i>CD40</i>	NM_011611	289	TNFR/TNFR/TNFR/TNFR/TM
<i>IL2</i>	NM_008366	169	IL2
<i>IL7R</i>	NM_008372	459	FN3/TM/TM
<i>IL17A</i>	NM_010552	158	Pfam:IL17
<i>CD28</i>	NM_007642	218	Ig/TM
<i>IGHM</i>	AJ294737	455	Ig-like/ Ig-like/ Ig-like/ Ig-like
<i>IL5</i>	NM_010558	133	PFAM:IL5
<i>CD19</i>	NM_009844	547	Ig/Ig/TM
<i>CD3E</i>	NM_007648	189	IgC2/TM/ITAM
<i>IL5RA</i>	NM_008370	415	FN3/FN3/ TM
<i>IL2RG</i>	NM_013563	369	FN3/TM
<i>ITGAX</i>	NM_021334	1169	int-alpha/VWA/int-alpha/int-alpha/int-alpha/intalpha/ Pfam:integrin-alpha
<i>IL10</i>	NM_010548	178	IL10
<i>TNF</i>	NM_013693	235	TM/TNF
<i>MS4A1</i>	NM_007641	291	PFAM: CD20
<i>IL6ST</i>	NM_010560	915	Pfam: Lep_receptor_Ig/FN3/ FN3/ FN3/ FN3/ FN3/ TM
<i>CD44</i>	NM_001039151	365	LINK/TM
<i>FCER1G</i>	NM_010185	86	TM/ITAM

Domain composition was examined by SMART and BLAST (PHAM) tools. As for the abbreviations, see the footnote of Table 1.



最新医学・2009年・3月増刊号（別刷）

## 幹細胞研究の最近の進歩

幹細胞研究の優れたツール，ソース

コモンマーモセット

谷 憲 三 朗

最新医学社

## ● 幹細胞研究の優れたツール, ソース

## コモンマーモセット

\*1 九州大学生体防御医学研究所 ゲノム病態学 \*2 九州大学病院先端分子細胞治療科

谷 憲三朗<sup>\*1\*2</sup>

## 要 旨

小型霊長類コモンマーモセットはその幾つかの優れた特性からこれまでも医薬品開発における前臨床研究動物としてさまざまな方面で利用されてきた。現在の医薬品開発においては、安全性と有効性の観点からより疾患特異性が重んじられてきており、薬剤の性質上、前臨床研究段階からより人に近い動物での検討が必要になってきている。本稿では再生医療の臨床展開をゴールとした幹細胞研究におけるコモンマーモセットの利用の可能性について、これまでの我々の造血幹（前駆）細胞ならびに胚性幹細胞研究結果を中心に紹介させていただく。

## はじめに

近年の医薬品開発においてはより病巣に特異性の高い治療法の開発が求められてきており、そのような薬剤が開発されることで副作用がより少なく、少量投与でより効果的な治療の展開が可能になってくるものと期待される。特に、免疫関連の薬剤、悪性腫瘍に対する分子標的薬剤ならびに遺伝子治療用ベクター製剤などの開発過程においては、その前臨床研究段階から、マウスのみならずヒトに DNA 配列や

---

キーワード：造血幹（前駆）細胞，胚性幹細胞，小型霊長類，前臨床研究，  
遺伝子治療

図1 コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*)

免疫担当細胞の性質が類似しているサル類での前臨床研究を行っていくことが極めて重要であると考えられる。この観点から、我々はこれまで小型霊長類コモンマーモセットに着目し、その血液学的特性を検討するとともに、遺伝子治療用ベクターの評価系としての特性を検討してきた。本稿では、コモンマーモセットの特徴ならびにその前臨床研究動物としての有用性についても紹介させていただく。

#### コモンマーモセットの特徴

コモンマーモセット（図1）は霊長類-真猿類亜目-広鼻類下目-オマキザル上科-マーモセット科に属するサルの1種である。学名は *Callithrix jacchus jacchus*、英名は common marmoset である。マーモセットという言葉は古いフランス語で“小さい子供”という意味である。原産地は南米のブラジル（東北部海岸の熱帯降雨林に生息）であり、リスザルと共に新世界ザルの代表的なものと言える。成熟個体で体重 200～500 グラム、体長 25～30 cm くらいの小型サルである。全身毛で覆われ、毛色は灰黒色で、頭は黒く、背中から尾先まで灰色と黒の縞模様になっている。左右の耳の脇に白い“毛ブサ”がある。乳房は腋下付近に1対あり、手足の指はかぎ爪と平爪（第1指）が混

在している。染色体数は 46 であり、寿命は 12～15 年程度である。性成熟には 18 ヶ月で達し、妊娠期間は平均 144 日程度であり、1 年に 2～4 頭の子供（通常は非一卵性双生児）を産む。昼行性であり夜は樹上で寝る。主な食性は昆虫類や果実類である。餌を食べる際には両手ないしは片手で持って口のところまで運んで食べる。独特の匂いを出す臭腺があり、自分の縄張りを示すための匂い付けのマーキング行動がしばしばみられる<sup>1)</sup>。

コモンマーモセットの実験動物としての開発はアカゲザル、カニクイザルなどマカカ属のサルに較べおよそ 10～15 年遅れてスタートした。マーモセット類の研究への利用は、1960～1970 年代に欧米において肝炎の研究を中心に盛んになった。我が国においては 1975 年頃より研究が本格的に始まり、実験動物中央研究所を中心に国内でのコロニー化が進められてきた歴史があるが、現在日本には幾つかのコロニーが存在し、国内での動物供給が可能となっている。したがって、感染個体を利用することで生じる諸問題を回避できるという利点がある<sup>1)2)</sup>。

コモンマーモセットの飼育は専用飼料も市販されていることから、比較的容易に行える状況にある。大型霊長類の半分あるいは 1/3 のケージで飼育でき、大きなスペースを必要としない。また、取扱いが比較的容易であることから、大型霊長類の利用に際して必要な専門の飼育者を必要としない便利さはある。もちろん、小型であることから一度に大量の血液や骨髄採取をすることは難しいという面も有しているが、最近の検査技術の進歩により、少量の検体でも多くの検査が可能になってきており、前臨床研究動物としての有用性は高いものと考えられる<sup>1)</sup>。

### 実験動物としてのコモンマーモセット

催奇性試験や毒性試験においてはコモンマーモセットが多く利用されており、サリドマイド誘導体の催奇性試験などにも用いられてきた<sup>3)4)</sup>。

病態モデルとしての利用は、もちろんマウスに較べると少ないものの最近増加してきており、その代表的なものを表 1 に示す。本稿では

表1 コモンマーモセットの疾患モデルとしての利用

疾患分野	疾患モデル
骨代謝分野	自然発症的くる病 <sup>5)</sup>
生殖内分泌分野	高プロラクチン血症および無排卵モデル <sup>6)</sup>
自己免疫疾患分野	関節リウマチ <sup>5)</sup>
精神、神経系分野	多発性硬化症 <sup>8~10)</sup> 急性ジストニー <sup>11)</sup> 脳卒中 <sup>12)</sup> アルツハイマー病 <sup>13~15)</sup> パーキンソン病 <sup>16~18)</sup> ハンチントン病 <sup>19)20)</sup> 脊髄損傷 <sup>21)22)</sup>
感染症分野	Epstein-Barr ウイルス感染症臓器移植分野 <sup>23,24)</sup> アデノウイルス感染症 <sup>25)</sup> ヘルペスウイルス感染症 <sup>26)27)</sup> 急性肝炎 <sup>28)</sup> 麻疹 <sup>29)</sup> 出血熱 <sup>30)</sup> フィラリア <sup>31)</sup> マラリア <sup>32)</sup> 非淋菌性尿道炎 <sup>1)</sup> レジオネラ症 <sup>1)</sup> 歯周疾患 <sup>1)</sup> 炭疽菌 <sup>33)</sup> 東部馬脳炎 (Eastern Equine Encephalitis : EEE) 狂牛病 / スクレーピー <sup>35)</sup>
臓器移植分野	心臓移植 <sup>36)</sup>

これらの詳細は誌面の都合上省略させていただく。

### 血液疾患モデルとしてのコモンマーモセット の有用性の検討

上記のように感染症ならびに神経疾患などの治療薬開発においてコモンマーモセット前臨床モデル系の有用性は増加してきている。我々はこれまでに実験動物中央研究所霊長類研究室からの多くの支援を得ながら、造血系を中心にコモンマーモセットの疾患モデルとしての有用性の検討を行ってきたので、以下に紹介させていただく。

## 1. 血液学的特性

コモンマーモセットの血液細胞がヒトとどの程度類似しているかを検討することは、医薬品開発過程における前臨床研究動物としての有用性を評価するうえで極めて重要である。すなわち、医薬品の造血細胞への効果のみならず、血液毒性の有無の評価系としても極めて重要になるからである。我々はまずコモンマーモセット造血前駆細胞のヒトサイトカインへの反応性、コモンマーモセット血液細胞とヒトで用いられている単クローン抗体との交差性について検討を行った。

ヒトサイトカインに対するコモンマーモセット骨髄前駆細胞の反応性は、ヒトエリスロポエチン (EPO)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン (IL)-3, IL-6, トロンボポエチン (TPO)、幹細胞因子 (SCF) に対するコロニー形成能をヒト骨髄細胞と比較して、メチルセルロース培地を用いて検討した。その結果、コモンマーモセット骨髄前駆細胞はこれらのヒトサイトカインに対してヒトの細胞と同様に反応することが明らかになった。特に、GM-CSF や SCF は種特異性の高いサイトカインであり、ヒト型のサイトカインはげっ歯類に対しては作用しない。表2に示すように、ヒト GM-CSF はコモンマーモセット骨髄前駆細胞の増殖を促進し、ヒト SCF はヒトの場合と同様に、他のサイトカインと相乗的に働き、そのコロニー数を増大させた。これらのことから、コモンマーモセットではマウスなどでのようにその種固有のサイトカインを用いなくとも、ヒトサイトカインで代替できることが明らかになった<sup>37)</sup>。

次に、フローサイトメトリー法により、市販のヒト血液細胞に対する抗体がコモンマーモセット血液細胞に交差するかについて検討した。表3のようにリンパ球では CD2, 4, 8, 20, 56 との交差性を認め、抗体のクローンを選ぶことでリンパ球の同定、分離が可能であることが示唆された。骨髄系の細胞では CD11b との交差性を示したが、CD13, 14, 33 などとは反応しなかった。また、CD34 については6クローンを検討し、1クローン (Qbend10) が交差したものの、同クローンを用いて分離した CD34 陽性細胞のコロニー形成能が認められなかった<sup>38)</sup>。このため、我々は新たにコモンマーモセット CD34 抗

表2 ヒトサイトカインに対するコモンマーモセット骨髄前駆細胞の反応性<sup>37)</sup>

サイトカイン	CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix
EPO	3.5 ± 1.4	18.6 ± 2.4	0.0 ± 0.0
IL-3	68.0 ± 7.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SCF + EPO	112.5 ± 6.0	51.0 ± 3.1	6.0 ± 1.0
SCF + IL-3	135.5 ± 4.8	1.0 ± 0.6	4.8 ± 0.6
SCF + IL-3 + EPO	105.5 ± 3.3	67.5 ± 4.1	24.0 ± 1.6
GM-CSF	61.5 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SCF + GM-CSF	134.5 ± 2.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix /  $2 \times 10^4$  bone marrow MNCs.

Human SCF : 10 ng / ml, IL-3 : 10 ng / ml, EPO : 2 u / ml, GM-CSF : 10 ng / ml

サイトカイン	CFU-MK
IL-3	8.6 ± 1.5
TPO	22.9 ± 2.2
SCF + TPO	36.9 ± 2.8
SCF + IL-3 + TPO	47.9 ± 3.2

CFU-MK /  $1 \times 10^4$  bone marrow MNCs.

Human SCF : 10 ng / ml, IL-3 : 10 ng / ml,

TPO : 10 ng / ml

略語 : 巻末の「今号の略語」参照

原を認識する単クローン抗体 (MA24) を作成した。本抗体によりコモンマーモセット骨髄前駆細胞の同定が可能になった<sup>39)</sup>。なお現在、コモンマーモセット造血・免疫系細胞を特異的に同定可能な単クローン抗体が実験動物中央研究所, 順天堂大学・垣生園子教授, 八木田秀雄准教授らにより体系的に作成されてきており, これらの抗体シリーズが整備され本格的に利用可能になれば, コモンマーモセットの前臨床研究動物としての価値は一層高まるものと期待される<sup>40)</sup>。

## 2. 造血幹細胞移植モデル

コモンマーモセットの造血幹・前駆細胞の採取は骨髄から直接安全に行うこともできるが, 末梢血に動員された造血幹・前駆細胞を利用するほうが簡便かつ個体への負担も少ないものと考えられる。そこで, コモンマーモセットにヒト G-CSF を投与して, 末梢血中への造血前駆細胞の動員の可能性を検討した。10 ug / kg / 日の G-CSF を 5 日間投与したところ, 白血球数, 好中球数は投与期間中, 高値を維持し,

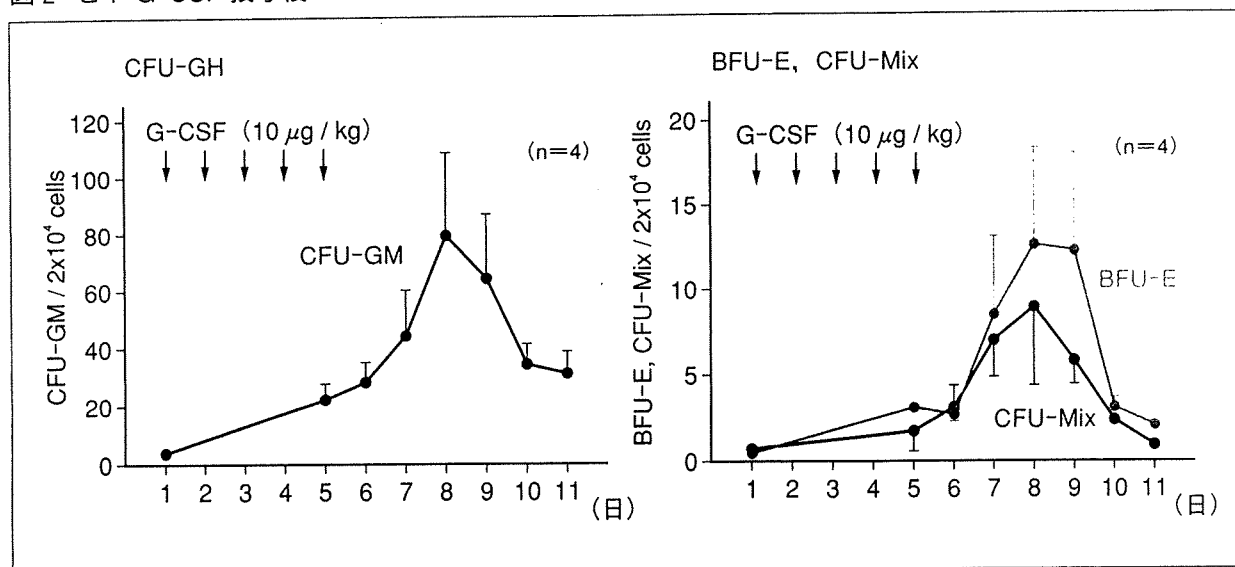
表 3 ヒト血液細胞に対する抗体とコモンマーモセット血液細胞との交差性<sup>38)</sup>

CD	クローン	ラベル	試料	信頼性
2	T11	P	PB	+
	RPA-2.10	F		+
3	HIT3a	F	PB	-
	UCT1	P		-
4	RPA-T4	P	PB	-
	SK3 + SK4	F		+
8	T8	P	PB	+
	RPA-T8	F		-
11b	D12	P	PB, BM	+
13	WM15	P	PB	-
	L138	F		-
14	M $\phi$ P9	F	PB	-
16	NKP15	F	PB	-
	3G8	P		-
19	HIB19	F	PB	-
	4G7	F		-
20	B1	F	PB	+
	L27	P		+
33	P67.6	P	PB, BM	-
34	My10	F	BM	-
	8G12	P		-
	Qbend10	biotin		+
	581	P		-
	BIRMA-K3	P		-
	NU-4A1	F		-
38	HB-7	F	BM	-
45	H130	P	PB	-
56	My31	P	PB	+
117	NU-c-kit	F	BM	-
	YBS. B8	P		-

F : FITC (phycoerythrin), P : PE (fluorescein isothiocyanate), PB : 末梢血, BM : 骨髄

造血前駆細胞 (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix) は投与 8 日目をピークに 11 日目まで増加した (図 2)。さらに, ヒト G-CSF の 5 日間の投与後, その翌日から 5 ~ 7 日間, 連日 500 ul ~ 1 ml を採血し,



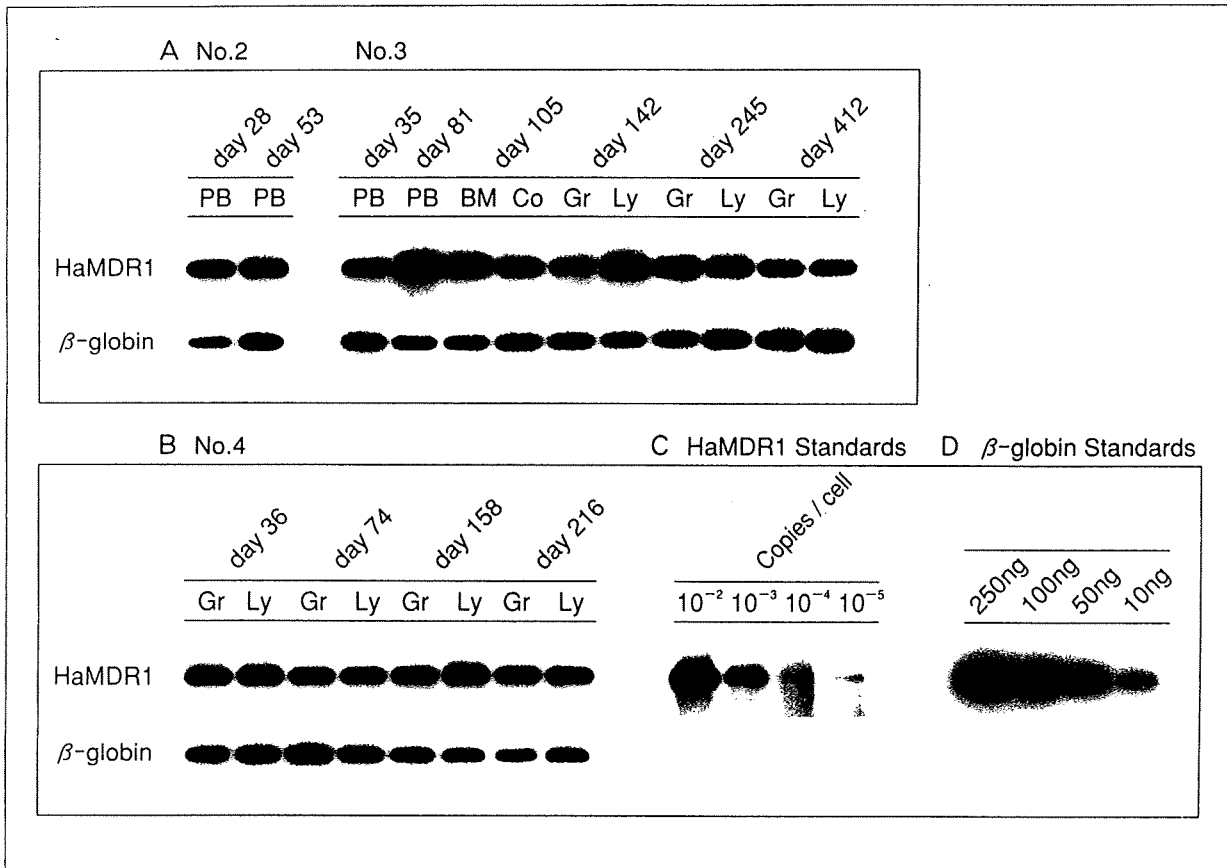
図2 ヒト G-CSF 投与後のコモンマーモセット末梢血造血前駆細胞の推移<sup>37)</sup>

移植に十分な造血幹・前駆細胞を採取することができた。移植前処置法として我々は放射線照射を用いたが、致死線量は 750 Gy であった。以上の基礎的実験結果をもとに、自家末梢血幹細胞移植を行った。移植時には、骨髓ニッチ確保のため亜致死線量として 500 Gy の照射を実施した。その後、ヒト G-CSF 投与により採取し、液体窒素中で保存しておいた末梢血単核球を移植した。移植後 4～5 週間で好中球数、血小板の回復が認められ、自家末梢血幹細胞移植モデルとしてコモンマーモセットが利用可能であることが示された。その後、同種骨髓移植モデルの作出を目指して、コモンマーモセット白血球抗原 (MHC-DRB) 遺伝子配列の決定を行い、国内のコモンマーモセットの DRB アレルを 5 座に分類できた<sup>37)41)</sup>。

### 3. 造血幹細胞遺伝子治療モデル

2. で述べた末梢血幹細胞移植モデルを利用して、造血幹細胞遺伝子治療モデルの作出を行った。MDR1 (多剤耐性遺伝子) 発現 MLV レトロウイルスベクター (HaMDR1) を用いて骨髓間質細胞: ウイルス産生細胞 = 1:1 と末梢血幹細胞を共培養することで遺伝子導入を行った。SCF, IL-3, IL-6 の存在下に 96～144 時間培養し、15～20% のコロニーへの遺伝子導入が確認された。各個体に移植した前駆細胞数は CFU-GM で 4～12.5×10<sup>4</sup>/kg であった。全身照射 (2.5 Gy) 後の 4 頭のコモンマーモセットに大腿静脈より移植した。

図3 遺伝子導入造血前駆細胞自家移植コモンマーモセット末梢血および骨髄細胞におけるMDR1プロウイルスDNAの検出<sup>37)</sup>



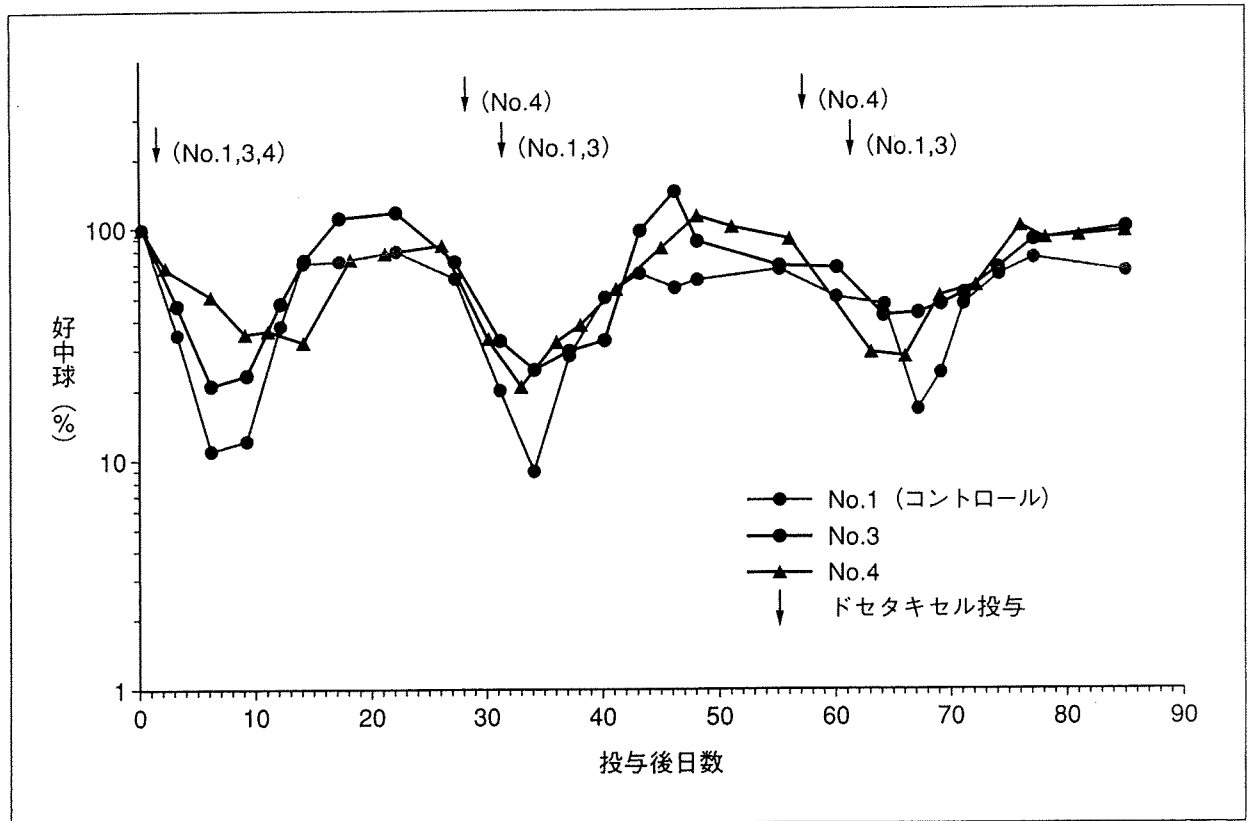
PB: 全血, BM: 骨髄, Co: コロニー, Gr: 好中球, Ly: リンパ球

移植を行ったコモンマーモセットの末梢血あるいは骨髄細胞から抽出したゲノム DNA よりプロウイルス *HaMDR1* 遺伝子導入の経過観察を行った。図3に示したように各個体の末梢血ならびに骨髄細胞において長期にわたり *MDR1* 遺伝子導入細胞による造血が認められ、これらの個体においては白血病などの発症は認められなかったことより本造血幹細胞遺伝子治療法の安全性が示唆された。また、各個体にドセタキセルを投与したところ、*MDR1* 遺伝子導入個体においては末梢血好中球数の低下の程度は軽度な傾向にあったことから、遺伝子導入された *MDR1* 遺伝子の *in vivo* での機能維持が示唆された (図4)<sup>37)</sup>。

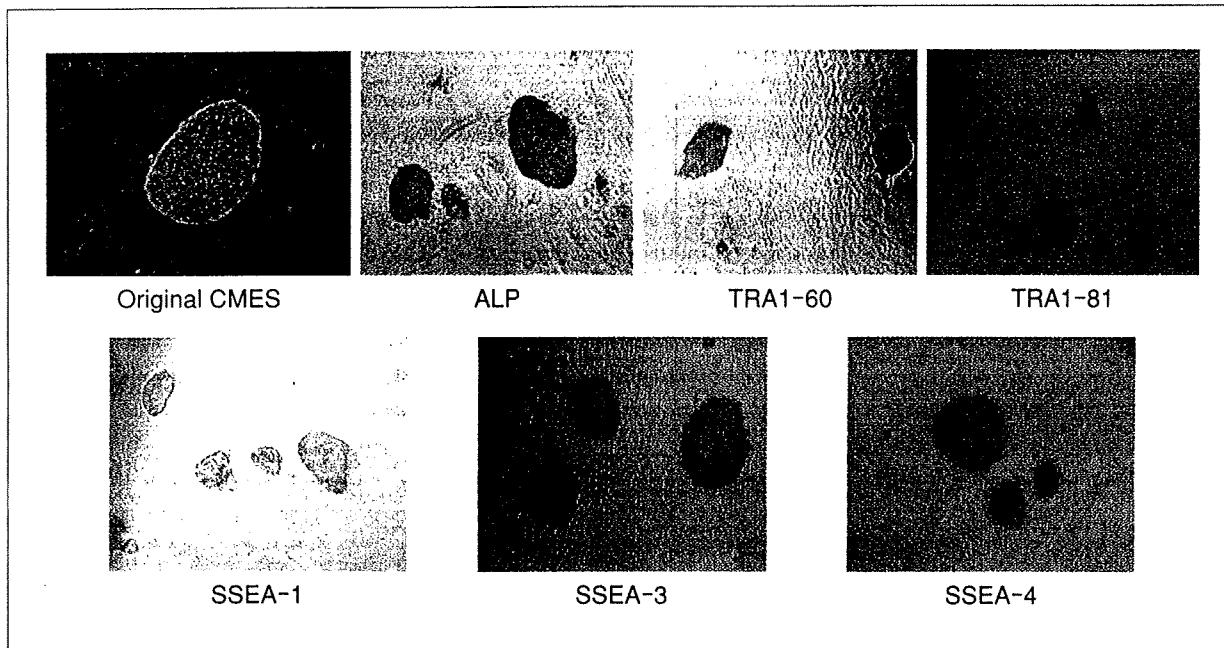
#### 4. コモンマーモセット胚性幹 (ES) 細胞の樹立と血液学領域での応用の可能性

近年の再生医療研究の進歩は著しく、ES 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いて機能細胞のみならず臓器形成を目指した研究が進められ

図4 *MDR1* 遺伝子導入造血前駆細胞自家移植コモンマーマセット末梢好中球数のドセタキセル投与後の経時的変化



てきており、将来的には臨床医学への応用も可能になってくるものと期待されている。しかし、これまでの多くの研究はマウスを用いた研究成果がほとんどであり、ヒトへの応用を考えたときにはやはりサルでの研究を積極的に進める必要があると考えられる。Thomson らはこのような観点から、コモンマーマセットならびにアカゲザルの ES 細胞を樹立した後にヒト ES 細胞の樹立に成功した。我々は Thomson らにより樹立されたコモンマーマセット ES 細胞を入手し、ES 細胞研究に着手したが、入手できた ES 細胞株では免疫不全マウスでの奇形腫形成は明らかではなかった。そこで、独自技術でのコモンマーマセット ES 細胞樹立を行うことを計画し、2000 年に樹立に成功した (図 5)。この細胞株は免疫不全マウスでの奇形腫形成能を有しており、ES 細胞研究への利用に適しているものと考えられる<sup>42)</sup>。我々はその後、コモンマーマセット ES 細胞を用いて血球細胞への分化系を確立すべく研究を進めてきた。我々が樹立したコモンマーマセット ES 細

図5 コモンマーモセット胚性幹 (ES) 細胞の樹立<sup>42)</sup>

胞は各種ストローマ細胞の存在下において血球細胞への分化が *in vitro* において観察されたもののその効率は極めて低く、造血細胞研究への利用を考えた場合、より効率的な血球分化系の作成が必要と考えられ、遺伝子導入技術を用いた研究を行うことにした。初期造血に深く関与していることが当時報告されていた候補遺伝子6種をおのおの発現するレンチウイルスベクターを作製し、コモンマーモセット ES 細胞に遺伝子導入した結果、bHLH タイプの転写因子である *Tal1/Scl* 遺伝子を導入したマーモセット ES 細胞はストローマ細胞の存在なしに血球系細胞へ効率良く分化できることが明らかになった (図6)<sup>43)</sup>。ただし、これらの造血前駆細胞の *in vivo* での造血能はまだ証明できておらず、*in vivo* での長期造血能維持のためには第2の遺伝子が必要である可能性もある。

#### おわりに

コモンマーモセットはアカゲザルやカニクイザルなどの大型サルと共に、非ヒト霊長類実験動物としてこれまでに多くの貴重な生体情報を医療の分野にもたらしてきた。近年の薬剤開発は病因をより標的化していく傾向にあり、ヒトにより近い動物での慎重な検討が必要にな