

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：81303

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19059001

研究課題名（和文）：ヒト型免疫マウスモデルの作出と応用

研究課題名（英文）：Establishment of humanized immune mice and its application for study of human immune system

研究代表者

菅村和夫（SUGAMURA KAZUO）

地方独立行政法人宮城県立病院機構 宮城県立がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・特任部長

研究者番号：20117360

研究成果の概要（和文）：

本研究において、免疫不全 NOG マウスを用いて、免疫系ヒト化マウスの樹立に成功した。免疫不全 NOG マウスにヒト HLA-DRB1*0405 を遺伝子導入したトランスジェニック NOG マウス (HLAtg) と MHC class II 欠損 NOG マウスを掛け合わせて、HLAtg MHCII (-/-) NOG マウスを作製した。この HLAtg MHCII (-/-) NOG マウスに HLA-DRB1*0405 のハプロタイプを有するヒト臍帯血由来血液幹細胞を移植して、HLA-DRB1*0405 のハプロタイプを有する免疫系ヒト化 NOG マウスを作出した。これら NOG マウスの HLA-DR と移植した血液幹細胞の HLA-DR のハプロタイプがマッチしたマウスとミスマッチしたマウスを比較解析したところ、ナイーブ T 細胞数が HLA-DR ハプロタイプ・マッチマウスで優位に増加していた。また、血清中 IgG 値も増加していた。さらに TNP-OVA ペプチド抗原で免疫したところ、HLA-DR ハプロタイプがマッチしたマウスで、特異的な T 細胞増殖反応が認められると共に、IFN-g や IL-2 の産生増強も見られた。同時に、抗原特異的な血清中 IgG 抗体価の上昇が認められた。以上の結果から、上記免疫系ヒト化 NOG マウスにおいて、抗原特異的なヒト免疫応答系が成立していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we established humanized immune mice by using immunodeficient NOG mice. We first established HLAtgMHCII(-/-) NOG mice by crossing of NOG mice which were transfected with HLA-DRB1*0405 gene onto NOG mice which were deficient of MHC class II gene. Subsequently, the HLAtgMHCII(-/-) NOG mice were transfused with human cord blood stem cells expressing HLA-DRB1*0405 haplotype gene to establish humanized immune NOG mice. We compared T cell functions and immune responses between HLAtgMHCII(-/-) NOG mice carrying haplotype-matched human leukocytes and haplotype-mismatched human leukocytes. We detected significant increases of the naïve T cell population and cytokine production of T cells and antigen-specific IgG production in sera after TNP-OVA peptide antigen stimulation. These results indicate that the humanized HLAtgMHCII(-/-) NOG mice gain the function of human immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	26,200,000	0	26,200,000
2008年度	26,200,000	0	26,200,000
2009年度	26,200,000	0	26,200,000
2010年度	26,200,000	0	26,200,000
2011年度	26,200,000	0	26,200,000
総計	131,000,000	0	131,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：ヒト免疫系、ヒト化マウス、免疫不全症

1. 研究開始当初の背景

免疫能を完全に消失した免疫不全 NOG マウスが樹立できたことから、この NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植することによって、ヒトの免疫系を有する免疫系ヒト化 NOG マウスの樹立が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

上記背景を基に免疫系ヒト化 NOG マウスを樹立することによって、マウスを用いたヒト型単クローン抗体の調整やヒト免疫疾患の解析系を構築することを目指した。

3. 研究の方法

ヒト MHC-II である HLA-DRB1*0405 遺伝子を発現するトランスジェニック NOG マウスとマウス MHC-II を欠損する NOG マウスを交配させて、HLA^{tg} MHCII(-/-) NOG マウスを樹立した。この HLA^{tg} MHCII(-/-) NOG マウスに HLA-DRB1*0405 ハプロタイプ遺伝子を発現するヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植して免疫系ヒト化 NOG マウスを樹立した。この NOG マウスの T 細胞数、T 細胞のサイトカイン産生能、血清中 IgG 抗体価等を検索した。また、HLA class I 遺伝子を導入した NOD/SCID/I12rgKO (NOG マウスと同類) に HLA 適合のヒト造血幹細胞を移植し、HLA 拘束性ヒト CD8⁺ T 細胞の分化を調べた。

4. 研究成果

(1) 免疫系ヒト化 NOG マウスの中で、HLA-DRB1*0405 ハプロタイプが一致するヒト白血球細胞を有するマウスと一致しないヒト白血球細胞を有するマウスとを比較解析した。その結果、ハプロタイプ一致マウスでナイーブ T 細胞数が優位に増加し、試験管内での刺激後の IL-2 や IFN γ 産生も増強していた。また、TNP-OVA ペプチド抗原刺激後の血清中の抗原特異的 IgG 産生もハプロタイプ一致マウスで優位に増強していた。以上の結果から、上記免疫系ヒト化 NOG マウスにおいて、抗原特異的なヒト免疫応答系が成立していることが明らかになった。

(2) NOG マウスにヒト免疫不全症患者由来の造血幹細胞を新生仔 NOD/SCID/I12rgKO マウスに移植した結果、好中球欠損が再現できた。また、HLA class I 遺伝子を発現させた同免疫不全マウスに HLA 適合のヒト造血幹細胞を移植することで、疾患に由来する HLA 拘束性ヒト CD8⁺ T 細胞が分化することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, Sugamura K. : Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ γ cnull mouse. *Int. Immunol.*, 24, 243-252, 2012.
2. Moriya, K., Suzuki, M., Watanabe, Y., Takahashi, T., Aoki, Y., Uchiyama, T., Kumaki, S., Sasahara, Y., Minegishi, M., Kure, S., Tsuchiya, S., Sugamura, K. and Ishii, N. : Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS ONE*, in press.
3. Shiokawa, M., Takahashi, T., Murakami, A., Kita, S., Ito, M., Sugamura, K. and Ishii, N. : In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/ γ c^{null} (NOG) mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 399, 733-737, 2010.
4. Shima, T., Sasaki, Y., Itoh, M., Nakashima, A., Ishii, N., Sugamura, K. and Saito, S. : Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J. Rep. Immunol.* 85, 121-129, 2010.
5. Kimura, O., Takahashi, T., Ishii, N., Inoue, Y., Ueno, Y., Kogure, T., Fukushima, K., Shiina, M., Yamagiwa, Y., Kondo, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Iwasaki, T., Kawagishi, N., Shimosegawa, T., and Sugamura, K.: Characterization of the EpCAM⁺ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines, *Cancer Sci.*, 101, 2145-2155, 2010.
6. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, Eto T, and Ito M. : Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* 87:1654-1658,

- 2009.
7. Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I, Ito R, Ito M, Minegishi M, Minegishi N, Tsuchiya S and Sugamura K. : The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/{gamma}cnull (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int. Immunol.* 21: 843-858, 2009.
 8. Ishikawa F, Saito Y, Yoshida S, Harada M, Shultz LD. The differentiative and regenerative properties of human hematopoietic stem/progenitor cells in the NOD-SCID/IL2rg^{null} mice. *Curr Top Microbiol Immunol*, 324: 87-94, 2008.
 9. Ito M, Kobayashi K, Nakahata T: NOD/Shi IL2rg<null> (NOG) mice appropriate for humanized mouse models. "Humanized mice", Nomura T et al. (eds.), *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 2008; 324, 53-76, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
 10. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y: Interleukin-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: A model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J. Infect. Dis.* 2008; 197:134-141.
 11. Saito Y and Ishikawa F. : The origins of blood: induction of hematopoietic stem cells from different sources. *Cell Stem Cell.* 3, 8-10, 2008.
 12. Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, Niuro H, Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Ishikawa F, Akashi K. : Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol.*, 180, 7358-67, 2008.
 13. Yahata, T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, and Ando K. : Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells* 26: 3228-3236, 2008.
 14. Ito M, Kobayashi K and Nakahata T. : NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 324:53-76, 2008.
 15. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 2007;109:212-218.
 16. Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N: Humanized NOD/SCID/IL2R{gamma}null mice transplanted with hematopoietic stem cells under non-myeloablative condition show prolonged lifespans and allow detailed analysis of HIV-1 pathogenesis. *J. Virol.* 2007.
 17. Suemizu H, Monnai M, Ohnishi Y, Ito M, Tamaoki N, Nakamura M: Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/SCID/gammacnull (NOG) mice. *Int. J. Oncol.* 2007;31:741-751.
 18. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, Xu J, Ito M, Arai F, Suda T, Ito M, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T: Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia* 2007;21:136-142.
 19. Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Miyoshi H, Okano HJ, Ito M, Tamaoki N, Nomura T, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y: Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/{gamma}formula immunodeficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104:1925-1930.
 20. Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, Umeda K, Yoshimoto M, Ito M, Heike T, Nakahata T: Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of

- NOD/SCID/gamma(c) null mice through cell fusion. *Faseb J.* 2007;21:3499-3510.
21. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature Reviews Immunol* 7:118-130, 2007.
22. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, Nakamura R, Tanaka T, Tomiyama H, Saito N, Fukata M, Miyamoto T, Lyons B, Ohshima K, Uchida N, Taniguchi S, Ohara O, Akashi K, Harada M, Shultz L D. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone marrow endosteal region. *Nature Biotechnol* 25:1315-1321, 2007.
23. Ishikawa F, Niino H, Iino T, Yoshida S, Saito N, Onohara S, Miyamoto T, Minagawa H, Fujii SI, Shultz LD, Harada M, Akashi K. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 119:3591-3660, 2007.

[学会発表] (計5件)

- ① 高橋武司、他 : The analysis of the functions of human T cells in humanized NOD/shi-scid/ γc^{null} (NOG)-HLA transgenic mice. 国際免疫学会 2010. 8. 23
- ② 石川文彦 : Understanding normal and diseased human immunity using humanized mouse. 国際免疫学会 2010. 8. 23
- ③ 高橋武司、他 : The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi/ γc^{null} (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). 2nd Int. Workshop on Humanized Mice (Sind Olofskapel/Amsterdam/The Netherlands). 2009. 4. 4
- ④ 岡嶋亮良、他 : Analysis of the functional human T cells in reconstituted humanized NOG mice. 日本免疫学会 2008. 1 .
- ⑤ 渡辺庸平、他 : Characterization of human lymphocytes in humanized NOG mice. 日本免疫学会 2007. 11. 21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅村 和夫 (SUGAMURA KAZUO)
地方独立行政法人宮城県立病院機構 宮城県立がんセンター (研究所) ・特任部長
研究者番号 : 20117360

(2) 研究分担者

石川 文彦 (ISHIKAWA FUMIHIKO) 2007-2010
独立行政法人理化学研究所・ヒト疾患モデル研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号 : 30403918

伊藤 守 (ITO MAMORU) 2007-2009
(財) 実験動物中央研究所・免疫研究室長
研究者番号 : 00176364