

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03147

研究課題名(和文) マウス個体を利用したヒト免疫系の再構築

研究課題名(英文) Reconstruction of human immune system in mice

研究代表者

竹田 潤二 (Takeda, Junji)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教授

研究者番号：50163407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫系を深く理解し、個体実験を遂行するためにヒト化マウスの構築を試みた。実際には、ヒト組織適合抗原をマウス組織適合抗原と取り替えてマウス個体でヒト主要組織適合抗原を発現するマウスの樹立を目指した。主要組織適合抗原はゲノム上、約3メガベースに渡って存在しているので通常の方法では取り替えることができないので、組織適合抗原の境界に組み替えの標識(LoxP配列)をマウスES細胞とヒト細胞に挿入した後に細胞融合した。細胞融合後、ほとんどのヒト染色体は失われるのでヒト組織適合抗原遺伝子がマウスゲノムに挿入された細胞が選抜されるはずである。現在も期待通りの細胞が取得されているかどうかの確認中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が目指している目標が正しく達成できていれば、ヒト免疫系の評価が個体レベルでできることが期待される。例えば、ヒト腫瘍の維持(PDX patient-derived xenograft)は免疫系が欠損したマウスに行われる。本研究が目指しているヒト化マウスを用いれば、免疫系が機能した状態でヒト腫瘍を維持できる可能性がある。ただし、ヒト腫瘍とマウスで発現するMHCを合致させる必要がある。このシステムを用いれば、どのがん抗原が細胞障害性T細胞の標的になりうるかを容易に選択できる。

研究成果の概要(英文)：To understand human immune-system and perform in vivo experiment, we planned to generate humanized mice. It will be accomplished by exchange between human and mouse major histocompatibility complex (MHC) antigens genes. Since MHC genes encompass more than 3 Mb, the exchange is not feasible with standard methods. This study inserted LoxPs into the boundaries of MHC genes and then human and mouse ES cells were fused. Theoretically human genome will be disappeared except clones bearing human MHC genes inserted into mouse genome. We are checking these clones.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：細胞融合 ヒト化マウス マウスES細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト化マウス作製の報告は多数見られていたが、ヒト HLA 遺伝子領域は 3 Mb に渡っているため全体を機能ある状態で組み込んだマウスは存在していなかったし、現在でも存在していない。

2. 研究の目的

ヒト免疫機構をマウス個体で解析するために、ヒト免疫機構に関わる HLA 遺伝子をヒト細胞-マウス ES 細胞間の細胞融合によりマウス当該遺伝子と置き換え、その後 HLA 遺伝子を発現するマウスを作製する。現在のところヒトがん細胞に対する薬剤を選抜する優れたシステムは PDX(Patient-derived Xenografts)を利用する手法である。それは患者由来がん組織を免疫系が存在しないマウスに移植し、その個体を利用して行うものである。本研究が達成されたなら、ヒト化マウスと患者由来がん組織の HLA がマッチすれば、免疫系が存在した状態で患者由来がん組織の移植が可能になる。

3. 研究の方法

(1)ヒト細胞あるいはマウス ES 細胞において当該遺伝子を組み換えるためのベクター作製

薬剤選択遺伝子(Neomycin(Neo)あるいは Puromycin(Puro))をそれぞれ 5' と 3' 部分に分割する。ヒト HLA 遺伝子 (約 3 Mb) の境界領域に 5'Neo 遺伝子ならびに 3'Puro 遺伝子を挿入し、マウス当該遺伝子である MHC 遺伝子の境界領域には 3'Neo 遺伝子ならびに 5'Puro 遺伝子を挿入する手法を利用する。そのために以下のベクターを構築する。まず、5'Neo あるいは 3'Neo 遺伝子と共に Lox2272 (LoxP 類似体)、Pgk プロモーターの下流に Blasticidin 遺伝子と HLA あるいはマウス当該遺伝子の相同領域を組み込んだターゲティングベクターを構築し、大腸菌株(K12 由来)に形質転換する。

次に 5'Puro あるいは 3'Puro 遺伝子と共に LoxP、Pgk プロモーターの下流に Hygromycin 遺伝子と HLA あるいはマウス当該遺伝子の相同領域を組み込んだターゲティングベクターを構築し、大腸菌株 DH5α(K12 由来)に形質転換する。

(2)ヒト細胞あるいはマウス ES 細胞において当該遺伝子を組み換えるための細胞クローンの選抜

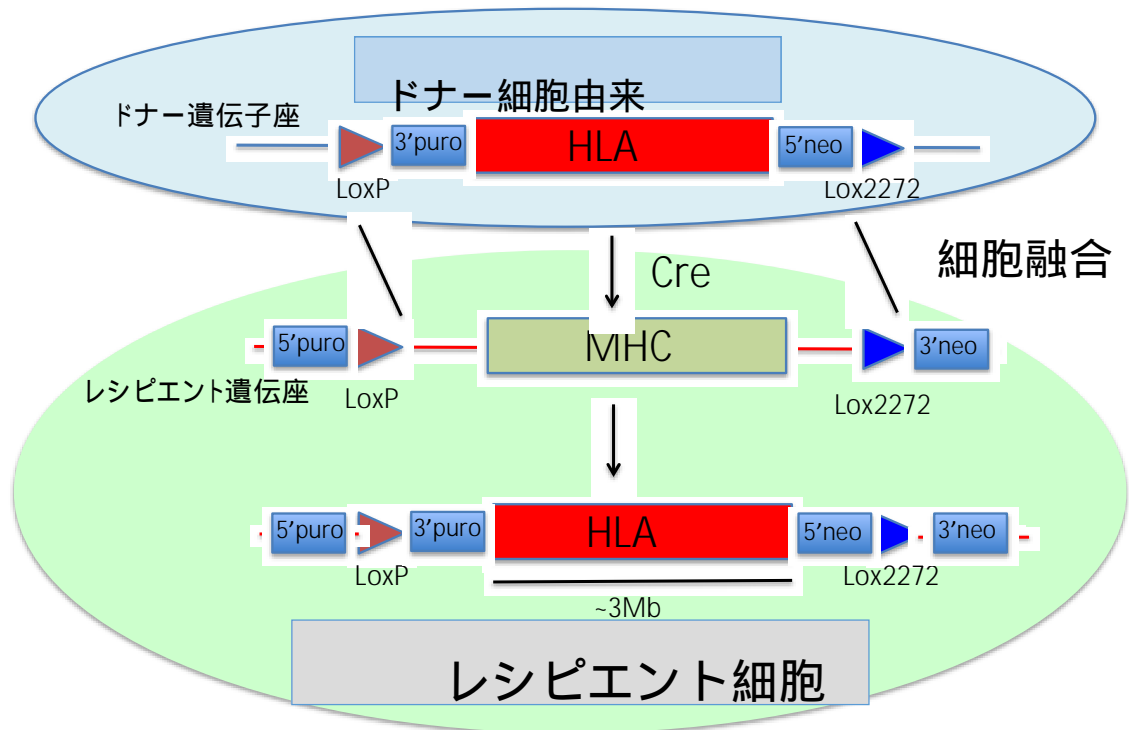
ターゲティングベクターを当該領域に挿入させるため、CRISPR/Cas9 システムを利用する。ターゲティングベクターと Cas9, gRNA をヒト細胞あるいはマウス ES 細胞に導入し、PCR 法により組み換え体を確認し、これを単離する。

効率が低い場合、gRNA をレンチウイルスで導入する。

(3)細胞融合法によりヒト当該遺伝子が組み込まれたマウス ES 細胞クローンの獲得

2 で得られたヒト細胞とマウス ES 細胞を、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合させる。Cre 遺伝子を発現させ、それぞれ loxP 領域間、lox2272 領域間の組み換え反応を促進させる。さらに目的通り遺伝子の組み換えが起きると 5'Neo と 3'Neo 遺伝子が融合し G418 耐性となるので G418 で選択する。同様に 5'Puro と 3'Puro 遺伝子も融合するので Puromycin で選択する (詳細図参照)。ヒト細胞とマウス細胞の細胞融合後は選択的にヒトゲノムが脱落することが知られているので、得られたクローンの染色体数 (カリオタイプ) を測定し、マウス細胞の染色体数 (40 本) に近いクローンを一次選択する。その後、得られたクローンの全ゲノムシーケンスを行い当該領域のみがヒト配列で置き換わっているものをさらに二次選抜する。全ゲノムシーケンスを行うときヒトミトコンドリアゲノムの有無も同時に検討する。

gRNA をレンチウイルスで導入した細胞をもちいる場合。その際、封じ込めは P2 施設利用で行う。



組み換え部位の詳細図

Syntenic 領域は MHC(HLA)として示してある

(4)マウス組み換え ES 細胞由来からマウス作製

マウス組み換え ES 細胞クローンを胚盤胞に移入することによりキメラマウス作製し、その後交配により、ヒト遺伝子が当該遺伝子に挿入されているマウスを樹立する。

gRNA をレンチウイルスで導入したマウス組み換え ES 細胞を胚盤胞に移入することによりキメラマウス作製し、その後交配により、ヒト遺伝子が当該遺伝子に挿入されているマウスを樹立する。

4. 研究成果

組み替えヒト細胞とマウス ES 細胞を取得し、細胞融合を行なった。現在目的のクローンが得られているか確認中である。目的のクローンが得られていれば、速やかにマウス作製を行う。そのマウスは様々なヒト免疫系を観察できる有用なマウスであることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 玄 (Kondoh Gen) (40243258)	京都大学・医生物学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	渡邊 仁美 (Watanabe Hitomi) (80624056)	京都大学・医生物学研究所・助教 (14301)	

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