

## 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18日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659239

研究課題名（和文）高い移植片生着効率を示す SIRPA 変異型遺伝子導入新規ヒト化免疫不全マウスの開発

研究課題名（英文）A new immunodeficient mouse harboring NOD-type *Sirpa* with highly-efficient human cell engraftment

## 研究代表者

赤司 浩一（AKASHI KOICHI）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80380385

## 研究成果の概要（和文）：

がん幹細胞研究を進めるためには、がん幹細胞同定のためのアッセイ系の確立が必須である。これまで、ヒト造血幹細胞のアッセイ系として T、B 細胞を欠損した NOD-*scid* マウスを基本として、さらに免疫不全のための修飾を加えた NOD-*scid* *Il2rg*<sup>null</sup>(NSG)が開発され、がん幹細胞研究にも応用されてきた。しかし、これまでのマウスラインは NOD バックグラウンドに依存し、造血系腫瘍の一部や固形癌では生着効率が低く、がん幹細胞研究のためには、さらなる改良が必要であった。我々は、免疫不全マウスへのヒト細胞の生着には、リンパ球欠損に加えて、マクロファージ寛容が必要であることを見出しており、より強化されたマクロファージ寛容導入により、NOD バックグラウンドに依存しない、さらにはがん幹細胞の生着効率の高いラインの樹立を試みた。我々は、C57/BL6 バックグラウンドで *Rag2* および *Il2rg* を欠損したマウスに、NOD 型 *Sirpa* 変異を導入した B6.*Rag2*<sup>null</sup>*Il2rg*<sup>null</sup>NOD-*Sirpa* (BRGS)を樹立した。この BRGS マウスは、B6 バックグラウンドでありながら、NOG マウスと同等のヒト細胞の生着効率を有していた。BRGS ラインは今後のがん細胞研究に有用であるだけでなく、この結果は、CD47-SIRPA の結合強化により、さらにヒト細胞の生着効率の改善が期待できることを示している。

## 研究成果の概要（英文）：

To evaluate stem cell potential of human cells in xenotransplant models, a variety of immunodeficient mouse lines have been developed. Depletion of lymphoid cells including T, B and NK cells by introducing with *Il2rg*<sup>null</sup>, and SCID or RAG<sup>null</sup> mutations is necessary to avoid rejection of human cells in these models. Interestingly, in mice having these immunodeficiencies, the NOD strain shows even better engraftment of human cells as compared to B6 or Balb/c strains. Recently, we found that in xenograft rejection, the innate phagocytic reaction of mouse macrophages could occur because murine signal regulatory protein alpha (mSIRPA) on macrophages cannot bind to human CD47 (hCD47). However, NOD-specific polymorphism of mSIRPA allows NOD-type SIRPA to bind hCD47, resulting in inhibition of phagocytic reaction against human cells in this strain at least in vitro. Here, we have established a new immunodeficient BRGS mouse line, B6.*Rag2*<sup>null</sup>*Il2rg*<sup>null</sup> mice with NOD-type *Sirpa*. The BRGS strain showed efficient engraftment of human hematopoietic stem cells comparable to NOD-*Rag1*<sup>null</sup>*Il2rg*<sup>null</sup> strain. BRGS strain should be very useful in future xenotransplant experiments of human stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ヒト化免疫不全マウス、生着効率、マクロファージ寛容、SIRPA

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞(iPS細胞)の発見は、自らの細胞を用いて自らの疾病部位を修復するという再生医療の可能性の幅を飛躍的に広げること成功した。現在、iPS細胞の臨床応用に向けて、特定の組織、組織幹細胞への分化を決定する誘導システムの確立が試みられている。このため、前臨床段階では、得られた幹細胞の機能評価のための、幹細胞アッセイ系が必要である。造血系では、造血幹細胞の機能評価、解析の手法として免疫不全マウスを用いた異種移植アッセイが標準的であり、これらの手法が、他の組織幹細胞やがん幹細胞などの評価法として応用されている。ヒト造血幹細胞の*in vivo*アッセイには免疫不全マウス、とくにNOD-*scid*マウスへの異種移植実験が標準的手法であった。我々は、免疫不全マウスの改良を行い、現在世界最高効率を誇る免疫不全マウス(NOD-*scid* *Il2rg*<sup>tm1.1</sup>:NSG)を開発し、その有用性を報告してきた。しかし、NSGマウスにおいても、ヒト造血幹細胞の移植効率は同種骨髄と比較し著しく劣り、一部の白血病の再構築が難しく、さらに固形がん幹細胞の生着効率はきわめて低い。そこで、我々は更なる改良を行い、繁殖能力が高く、異種移植実験系においてさらに高効率にヒト幹細胞の生着が得られる新規ヒト化免疫不全マウスの開発を行うこととした。

我々は、免疫不全マウスの改良を試みている中で、ヒト造血細胞の生着には、NODというマウスバックグラウンドが重要であることを見出した。そこでNODマウスの特殊性を明らかにするために、positional cloningを行い、異種移植片の生着効率は、マウス第2番染色体上にある*Sirpa*遺伝子の多型が決定していることをつきとめた。*Sirpa*遺伝子は細胞膜貫通型レセプター構造をしており、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。また、そのリガンドとしてはCD47が知られて

いる。*Sirpa*遺伝子の細胞外ドメインIgV領域には遺伝子多型が認められ、とくにNODマウスにユニークなアミノ酸配列部位にCD47との結合部位が多く含まれている。SIRPAは骨髄球系細胞に発現しているが、とくにマクロファージ上のSIRPAは、ほぼすべての細胞に発現しているCD47を認識することで、マクロファージの無秩序な貪食を抑制していることが知られている。通常マウスSIRPAはヒトCD47と結合がみられないが、NODマウスマクロファージのSIRPAはヒトCD47と強い結合がみられる。すなわち、NODの遺伝子多型により、移植片であるヒト造血幹細胞のCD47が、NOD骨髄マクロファージのSIRPAと結合可能となった結果、マウスマクロファージの貪食・抑制性サイトカイン産生が抑制され、NOD/SCIDマウスにおいてヒト造血幹細胞の生着が上昇すると考えられた(Nature Immunology 8, 1313, 2007)。

移植免疫において、獲得免疫であるT細胞系、自然免疫系であるNK細胞活性が移植片の生着に大きく関与していることが知られているが、今回、我々の見出した知見は、もう一つの自然免疫系であるマクロファージ系も移植片の生着に重要であることを示唆しており、マクロファージ寛容の導入によって、既存のマウスと比較して、良好な異種細胞生着能力をもつ新規免疫不全マウスの開発が期待できる。

2. 研究の目的

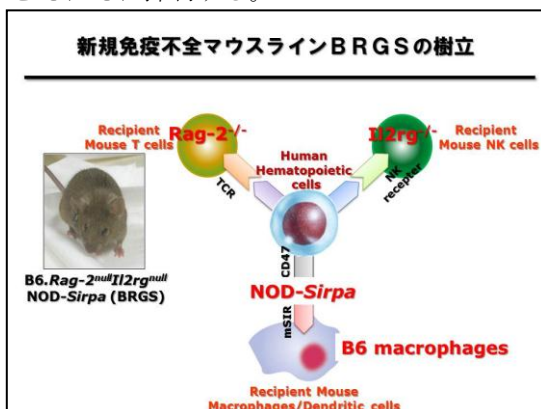
我々は、ヒト造血幹細胞の*in vivo*アッセイ系として現在世界最高効率を誇る免疫不全マウス(NSGマウス)を開発し、その有用性を報告してきた。NSGマウスは、NODバックグラウンドに、SCID変異によるT細胞、B細胞の欠損に加えて、IL2受容体γ鎖のノックアウトによりNK細胞活性が消失しているため、ヒト造血細胞の高い生着効率が得られる。しかし、NSGマウスにおいても、ヒト造血幹細胞

胞の移植効率は同種骨髄と比較し著しく劣り、一部の白血病の再構築が難しく、さらなる改良の余地がある。そこで、我々は、“SIRPAを介したマクロファージ寛容”を導入した新規ヒト化免疫不全マウスの開発を行うこととした。繁殖能力の高い common healthy strain である B6 マウスをベースに、*Rag2* 欠損、*Il2rg* 欠損に加えて、NOD 型 SIRPA を導入し、レシピエントの T 細胞、NK 細胞、マクロファージをそれぞれ抑制することによって、既存の NOD-*scid* マウスと比較して、さらに良好な異種細胞生着能力、長い life span および高い繁殖能力が期待できる。得られた新規免疫不全マウスによる異種移植実験系は、ヒト幹細胞のアッセイにきわめて有用であると考えられる。さらに、マウス SIRPA とヒト CD47 の結合が、マクロファージによる生着抑制効果を抑制することから、ヒト CD47 と強い結合を示す *Sirpa* 遺伝子多型のスクリーニングを行い、得られた *Sirpa* 変異を持つノックインマウスを作成し、さらに生着効率が高いヒト化免疫不全マウスの開発を目指す。本課題の成果により、ヒト造血幹細胞学に貢献するのみならず、非造血系臓器の正常・悪性幹細胞アッセイに有益なモデルとなり、多能性幹細胞を起点とする幹細胞学の発展と、その臨床応用への検討に大きく貢献することができる。

### 3. 研究の方法

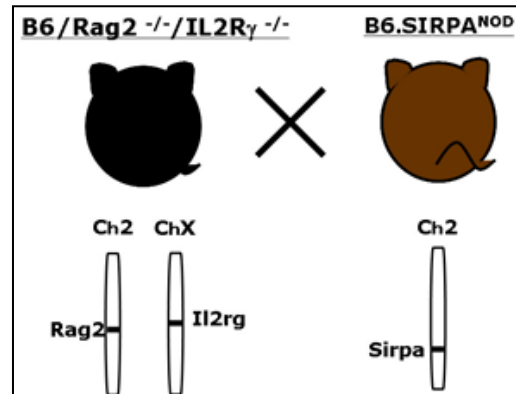
#### (1) マクロファージ寛容導入新規免疫不全マウスの開発

我々は、“SIRPA を介したマクロファージ寛容”を導入した新規免疫不全マウスの開発を行うため、繁殖能力の高い common healthy strain である B6 マウスをベースに、*Rag2* 欠損、*Il2rg* 欠損に加えて、NOD 型 *Sirpa* を導入し、レシピエントの T 細胞、NK 細胞、マクロファージをそれぞれ抑制する。



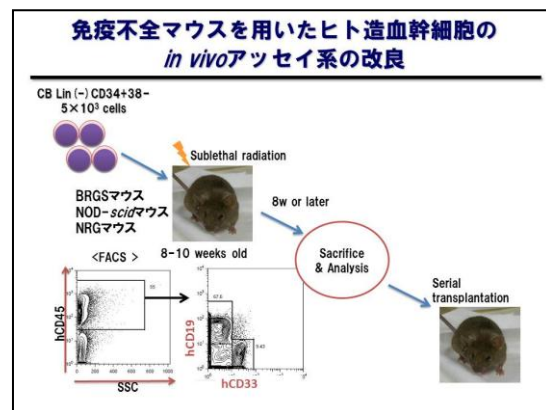
B6. *Rag2* 欠損、*Il2rg* 欠損マウス (BRG) はすでに入手済みである。また、B6. NOD-*Sirpa* マウスも入手している。この 2 つのラインを交配し、B6. *Rag2* 欠損、*Il2rg* 欠損、NOD-*Sirpa* をもつマウス (BRGS ライン) を作製する。交配ごとに、3 遺伝子の遺伝

子型を PCR 法、シーケンスによって確認する。



#### (2) BRGS ラインの異種移植片効率の評価

新規に開発した BRGS マウスについて、life span、繁殖能力、マウス造血系、免疫系について解析する。また、同時に、ヒト骨髄・末梢血・臍帯血造血幹細胞を移植し、ヒト造血細胞の生着、多系統への分化能について解析する。また、造血器腫瘍幹細胞のアッセイ系としての評価のため、急性骨髄性白血病検体から分離した白血病幹細胞を移植し、その生着について解析を行う。同時に、NOD-*scid* マウス、NOD. *Rag1*<sup>null</sup> *Il2rg*<sup>null</sup> (NRG) マウスへも同じ検体を移植し、比較を行う。



#### (3) SIRPA 遺伝子多型の解析

健康人より末梢血単核球を分離し、DNA を抽出、*SIRPA* 遺伝子多型の解析を行う。ヒトにおいても *SIRPA* 遺伝子 IgV 領域は多型に富んでおり、IgV 領域を含むエクソン 3 のシーケンスを行い、日本人における遺伝子多型の種類、頻度について解析を行う。これまでの解析では、ヒトにおいても NOD 型バリエント、NOR 型バリエントのほかに数種類のバリエントを見出している。次にそれぞれの *SIRPA* バリエントと、ヒト CD47 との結合の差をバイディングアッセイを行い、よりヒト CD47 と結合の強い *SIRPA* バリエントのスクリーニングを行う。

### 4. 研究成果

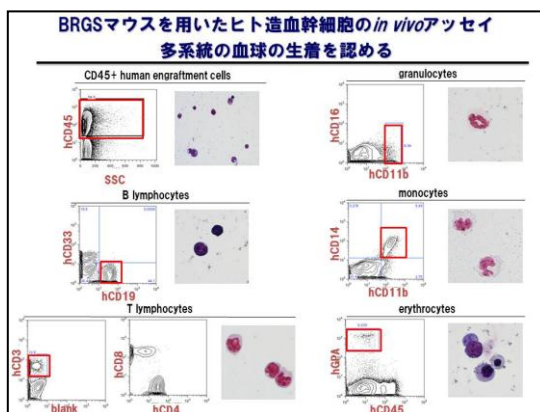
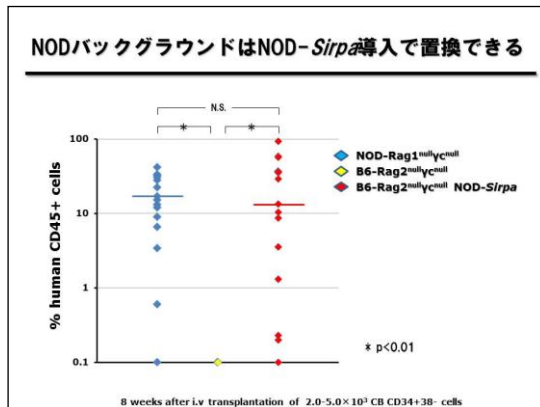
#### (1) BRGS ラインの樹立

BRG マウスと、B6. NOD-*Sirpa* を交配し、BRGS ラ

インを樹立した。*Sirpa* 遺伝子はシークエンスにより、NOD 型であることを確認した。このマウスは、健康で妊孕性も良好であった。胸腺腫の発症はなく、life span は、平均 65 週であった。末梢血では、赤血球数、血小板数は正常で、T, B, NK 細胞を完全に欠損していた。BRGS マウスのマクロファージ上のマウス SIRPA はヒト CD47 と結合可能であった。

## (2) BRGS マウスにおけるヒト造血細胞の生着効率

BRGS マウスにおけるヒト造血細胞の生着効率を調べるため、7-10 週齢のマウスに 580cGy の放射線照射を行い、ヒト臍帯血より分離した CD34+CD38-細胞を 5000 個、マウス大腿骨髄内に移植した。移植後 8 週間で、マウス骨髄を回収し、ヒト造血細胞の生着をフローサイトメトリーにて解析した。同時に、BRG マウス、NRG マウスにも移植して、生着効率の比較を行った。移植後 8 週間で、BRG マウスではヒト造血細胞の生着は認められなかったが、NRG マウス、BRGS マウスでは、50-60%のヒト CD45 陽性細胞のキメラズムが得られ、骨髄球系、リンパ球系の多系統の細胞の生着を認めた。



BRGS マウス、NRG マウスともに、移植後 16 週時点で、ヒト造血細胞のキメラズムは、50-64%と、長期にわたって、生着が得られた。また、胸腺では、CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球の分化が得られた。この BRGS マウスにおいては、T 細胞のリークがなく、NOD 型 SIRP を持つために、NOD/SCID 比較して良好なヒト造血細胞生着がみられ、B6 ラインであることから、高い生存・繁殖能力もみられている。この結果は、CD47-SIRPA の結合強化によ

り、さらにヒト細胞の生着効率の改善が期待できることを示している。

## (3) *Sirpa* 遺伝子多型と SIRPA-CD47 結合

さらに、マウス SIRPA とヒト CD47 の結合を強化することができれば、マクロファージによる生着抑制効果から逃れ、より高効率の生着が得られるはずである。我々は、ヒト CD47 と強い結合を示す *Sirpa* 遺伝子多型のスクリーニングを行い、*Sirpa* 遺伝子多型の解析を平行して行った。我々は、SIRPA 蛋白立体構造解析により、ヒト CD47 と強く結合するための *Sirpa* 変位部位を計 3 ヶ所見出しており、現在、得られた *Sirpa* 変異を持つノックインマウスを作成し、さらに生着効率が高いヒト免疫不全マウスの開発を目指している。本課題の成果により、ヒト造血幹細胞学に貢献するのみならず、非造血系臓器の正常・悪性幹細胞アッセイに有益なモデルとなり、多能性幹細胞を起点とする幹細胞学の発展と、その臨床応用への検討に大きく貢献することができる。

## 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 50 件)

① Mori Y, 以下 13 名、13 番目. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. J Exp Med. 2009 Jan 16;206(1):183-93.

② Koyama M, 以下 9 名、8 番目. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. Blood. 2009 Feb 26;113(9):2088-95.

③ Tabrizi SJ, 以下 11 名、11 番目 T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. J Immunol. 2009 Feb 1;182(3):1490-9.

④ Takashima S, 以下 7 名、6 番目. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. J Exp Med. 2011 Feb 14;208(2):285-94.

⑤ Shimoda S, 以下 11 名、11 番目. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. Hepatology. 2011 Apr;53(4):1270-81.

⑥ Kikushige Y, 以下 13 名、13 番目. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.

Cancer Cell. 2011 Aug 16;20(2):246-59.

⑦Kikushige Y, 以下10名、10番目. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. Cell Stem Cell. 2010 Dec 3;7(6):708-17.

⑧Yoshimoto G, 以下14名、14番目. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. Blood. 2009 Dec 3;114(24):5034-43.

〔学会発表〕(計 11 件)

①赤司浩一. Stem cells in hematological malignancies. 第68回日本癌学会学術集会. 2009年10月1日、横浜

②赤司浩一. 白血病幹細胞を考える. 第72回日本血液学会総会. 2010年9月24日、横浜

③Koichi Akashi. Leukemia stem cells. ヨーロッパ血液学会. 2011年7月、London、英国

④Koichi Akashi. Origin of leukemia stem cells. ドイツ造血幹細胞学会. 2011年9月、Tubingen、ドイツ

⑤ Koichi Akashi. Transcription factor regulation in normal and malignant hematopoiesis. 米国血液学会. 2011年12月、San Diego、米国

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 80380385

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: