

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：72611
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21H02396
研究課題名(和文) マウス自然免疫系とヒト細胞の相互作用の分子機構の解明による免疫不全マウスの改良

研究課題名(英文) Improvement of humanized mice through elucidation of interaction between mouse innate immune system and human cells

研究代表者
高橋 武司 (Takahashi, Takeshi)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物基礎研究部・部長

研究者番号：80335215
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本申請により免疫不全NOGマウスを改良しヒト赤血球を長期維持できる新規系統の開発に成功した。このマウスでは移植したヒト赤血球が2週間以上検出できる(従来のマウスでは4日)。また一度キメラ率を80%程度に上昇させると3週間無処置で70%以上のキメラ率を維持できる。NOG-FcRKOの特性解析をシングルセルRNAシーケンスにより行い、NOGマウスと免疫学的特性が異なることを見出した。この免疫学的特性がNOG-FcRKOマウスにおいて一部のヒト腫瘍株が抗PD-1抗体に感受性を示すことと関連するか検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト赤血球がマウスの自然免疫系によって認識される分子メカニズムを解明した。その成果を活かして開発した新しい免疫不全マウスではヒト赤血球のマウス体内での維持期間がNOGマウスと比較して大幅に延長し、マリア研究などへの活用が期待できる結果となった。NOG-FcR KOマウスの免疫学的特徴が明らかにした。この特徴がヒト腫瘍免疫、特に抗PD-1抗体の奏功性の理解につながるのかをさらに検討している。これらの研究により新たな治療戦略の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded establishing a novel immune deficient NOG mice, in which human RBC can be sustained for long term. In this mouse, human RBC can be detected up to 14 days after transfusion, comparing to 3-4 days in normal NOG mice. In addition, once raising the level of human RBC frequency to 80%, the level higher than 70% was maintained for 3 weeks without any additional treatment. We have characterized the immunological feature of NOG-FcRKO mice by single cell RNA sequence, and found that there are significant differences between NGO-FcRKO and NOG mice. We are studying whether these differences accounts for the the susceptibility to anti-PD-1 antibody therapy in tumor bearing humanized NOG-FcRKO.

研究分野：免疫学

キーワード：ヒト化マウス 免疫不全 腫瘍免疫 PD-1 赤血球 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫不全 NOG マウスは B 細胞、T 細胞などのリンパ系免疫細胞を欠損するため著しく免疫機能が低下しており、そのため生きたヒト細胞の生着すら可能である。しかし自然免疫系に属する細胞群の機能は保たれた状態にあり、これらがヒト血球細胞の生着・機能にどのような影響を与えるかは不明である。例えば NOG マウスに 10^9 レベルの膨大なヒトの赤血球を移植しても 72 時間程度でマウス循環血液中からほぼ消失する。このことは通常ヒトの造血幹細胞が 5×10^4 程度で生着し、その後 3 か月程度をかけてマウス体内に疑似的なヒト血液免疫系を再構築することとはきわめて対照的である。マウスマクロファージ(M ϕ)をクロドロン酸リポソームの投与によって事前に除去しておけばヒト赤血球の生着が 2 日程度延長できることからヒト赤血球はマウス M ϕ による貪食により排除される可能性が示唆され、マウス自然免疫にかかわる分子がヒト細胞を認識し、その生着性、機能性に影響を与えていることが推察された。実際申請者は研究開始までにマウス補体 C3 がヒト赤血球に沈着し、その排除を促進していることを NOG-C3 欠損マウスの作製およびヒト赤血球移入実験を通して明らかにしていたが、C3 以外にもヒト赤血球に結合するマウス C タイプレクチン(CLR)分子を見出していたことから本申請ではマウス M ϕ によるヒト赤血球の認識機構を分子レベルで詳細に明らかにすることを主要な目的とした。マウス自然免疫系とヒト細胞の相互作用の解明、マウス自然免疫機能の抑制・欠損はヒト化マウス技術を改善するための重要な課題であることは世界的にも認知されつつあり、新規免疫不全マウスの開発の競争が激化している。

2. 研究の目的

ヒト細胞を認識するマウスの自然免疫系の分子を同定し、その遺伝子欠損マウスを作製することによりヒト細胞の生着性を向上させる、また機能改善を図ることが目的である。主要な課題として ヒト赤血球に結合する C タイプレクチンである Clec4f の遺伝子欠損マウスを作製し、C3/Clec4f 両欠損マウスでのヒト赤血球生着性について検討すること、さらにヒト赤血球排除に関わる未知のマウス受容体遺伝子の同定、およびその欠損マウスの作製を目的とした。また、マウス自然免疫受容体のアダプター分子として機能する FcR を欠損する NOG マウスではヒト細胞の造血効率が NOG マウスに比べて有意に改善することを見出していたことから NOG-FcR 欠損マウスと NOG マウスの自然免疫細胞の性質の違いを遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト赤血球を認識する自然免疫分子のスクリーニング

i) マウス M ϕ に発現する C タイプレクチン受容体を RNA シークエンスにより同定し、その融合タンパク質を作製し、ヒト赤血球への結合をフローサイトメーターにより検討する。

ii) i) で得られたヒト赤血球に結合する分子の遺伝子の欠損マウスを CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で樹立し、ヒト赤血球を移植する。マウス末梢血中のヒト赤血球の割合を経時的に調べて欠損させた遺伝子の役割を明らかにする。

iii) ii) で樹立したマウスに M ϕ の活性を抑制できるような分子標的阻害剤を投与し、ヒト赤血球生存に対する効果を検討する。

iv) 上記阻害剤がヒト赤血球生存を延長した場合、阻害剤の標的となる分子遺伝子について欠損マウスを作製し、ii), iii) を繰り返す。

NOG-FcR 欠損マウスと NOG マウスの自然免疫細胞の性質の違いを遺伝子レベルで明らかにする

i) 各マウスの脾臓細胞から単核球を調製し、10xGenomics 社のシングルセル RNA シークエンス(scRNAseq)により細胞のクラスタリングを行い、各細胞群の性質を RNA 発現を元に比較した。

4. 研究成果

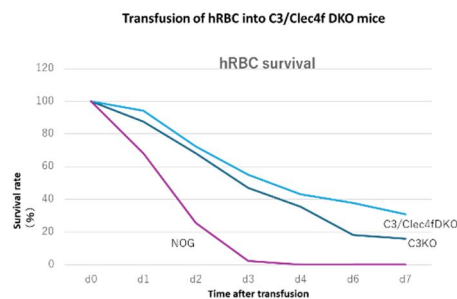
ヒト赤血球を認識する自然免疫分子の同定

i) Clec4f の同定

NOG マウスのいくつかの組織から M ϕ を調製し、これらの細胞から RNA を単離し RNA シークエンス解析を行った。シークエンスデータから各組織 M ϕ に高発現する受容体遺伝子として肝臓 M ϕ から 8 遺伝子、脾臓 M ϕ から 4 遺伝子、肺 M ϕ から 3 遺伝子、骨髄 M ϕ から 5 遺伝子抽出し、これらの Fc 融合遺伝子を作成した。タンパク質として産生が確認できた 15 遺伝子(肝臓 M ϕ 由来 6 遺伝子、脾臓由来 3 遺伝子、肺由来 3 遺伝子、骨髄由来 3 遺伝子)および代表的な C タイプレクチン受容体を加えた計 26 遺伝子についてヒト赤血球との結合を解析した。その結果 1 遺伝子 clec4f がヒト赤血球に結合することを確認した。

ii) Clec4f 欠損マウスの作製

Clec4f がヒト赤血球の排除に及ぼす影響を検討するために NOG-C3 欠損マウスの胚を用いて CRISPR/Cas9 により Clec4f 遺伝子をゲノム編集した。それによって樹立した NOG-C3/Clec4f 両欠損マウスにヒト赤血球を移入したところ NOG-C3 欠損マウスに比べて有意にヒト赤血球の生着期間が延長することを見出した。しかしヒト赤血球の排除を完全に抑制できないために Clec4f 以外の受容体の関与が示唆された。

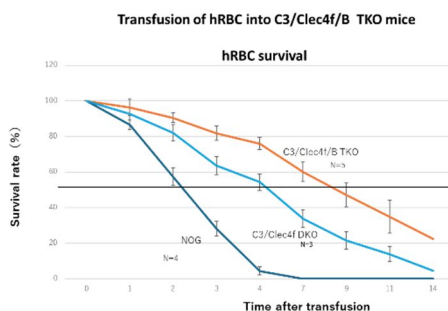


iii) 分子標的薬投与によるヒト赤血球排除阻害

NOG-C3/Clec4f 両欠損マウスに Mφ の貪食機能を阻害すると考えられる分子標的阻害剤 (X) を投与したところ、赤血球の排除が強く抑制された。標的となる分子は細胞内のシグナルを伝える分子 (X1, X2, X3, X4) であった。またマクロファージに発現する膜タンパク質で X1-X4 分子と共役すると考えられる分子候補 (A, B, C) に対する分子標的阻害剤 (Y1, Y2) を用いてヒト赤血球の排除阻害実験を行ったところ、その阻害剤もヒト赤血球の排除を抑制することを見出した。

iv) 標的遺伝子のゲノム編集とその効果の解析

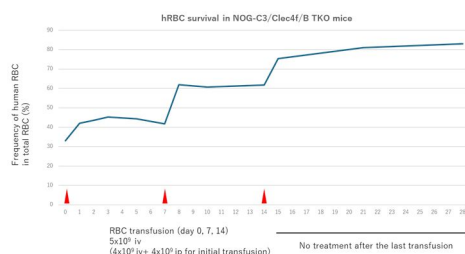
上記で得られた結果を元に NOG-C3/Clec4f 両欠損マウスの胚を用いて CRISPR/Cas9 により X3, X4, A, B, C 遺伝子をゲノム編集した。X1, X2 については遺伝子欠損が胚性致死になることが知られているためゲノム編集は行わなかった。得られた各 3 重遺伝子欠損マウスにヒト赤血球を移植したところその 1 系統 NOG-C3/Clec4f/B 三重欠損マウスでヒト赤血球の生着が NOG-C3/Clec4f 両欠損マウスに比べて有意に延長することを見出した。



NOG マウス、NOG-C3 欠損マウス、NOG-C3/Clec4f 両欠損マウス、NOG-C3/Clec4f/B 三重欠損マウスを比較すると、ヒト赤血球を 4×10^9 移植した際の循環血液中の半減期は各、1.5 日、3 日、4 日、10 日となり大幅に延長することに成功した。

本三重欠損マウスではヒト赤血球の移入を繰り返し、血球の割合を 80% まで上昇させると、その後 3 週間無処置でもキメラ率が保たれており、毎日のようにヒト赤血球を移入する必要のある NOG マウスとは次元の異なる高生着性を示した。このような特性はマラリア原虫の持続感染、試験管内で誘導される人工ヒト赤血球の性質を検討するために有用であると考えられる。

キメラ率(ヒト赤血球/ヒト・マウス総赤)

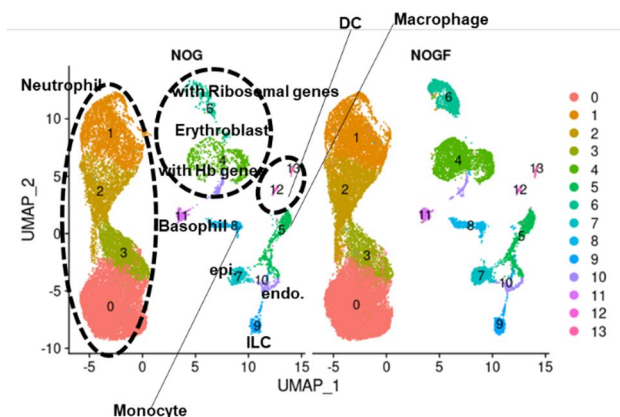


NOG-FcR KO マウスの自然免疫細胞の性質の解明

i) scRNAseq を用いた NOG-FcR KO マウスの特性解析

NOG マウス (左) と NOG-FcR KO (右) から調製した細胞を scRNAseq により解析し、細胞のクラスタリングを行ったところ両者ともに類似の細胞群により構成されていることが明らかになった。

これらの各細胞クラスターの遺伝子発現を NOG マウスと NOG-FcR KO マウスで比較したところ、マクロファージ、単球、好中球、樹状細胞で、免疫反応に関わる特定の生物学的経路 (パスウェイ X) が活性化していることが示唆された。このパスウェイ X に関わるシグナル分子、転写因子の高発現は上述の骨髄系細胞の免疫学的特性に影響を与えると推察され、ヒト化 NOG-FcR KO マウスで見られる抗 PD-1 抗体によるヒト腫瘍に対する抗腫瘍効果の顕在化を説明できる可能性があるとして予測された。現在 NOG-FcR KO マウスの遺伝背景でパスウェイ X に関与する複数の転写因子のゲノム編集を行っている。



ii) ヒト化 NOG-FcR KO マウスでの抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果のメカニズムの解明

ヒト造血幹細胞を移植した NOG-FcR KO および NOG マウスにヒト頭頸部がん由来扁平上皮がん株 HSC4 を移植し、抗 PD-1 抗体を投与した際の腫瘍内の免疫細胞の変化を scRNAseq により解析した。ヒト白血球に属する細胞クラスターについて解析を行ったところ NOG-FcR KO マウスではニボルマブ投与により以下のような特徴が出現した。

- 1 . CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞のクラスターが増大し、活性化指標となるマーカーを発現している細胞集団が出現した。一方 NOG マウスではこのような T 細胞集団は出現しなかった。
- 2 . Foxp3⁺制御性 CD4⁺ T 細胞の集団が減少した。NOG マウスでは逆にこの集団が増加していた。
- 3 . ヒトミエロイド細胞の集団が減少していた。NOG マウスでは逆に増加していた。

現在ヒト T 細胞と相互作用する細胞群についてより詳細な解析を行っており、ヒト化 NOG-FcR KO マウスで見られるヒト腫瘍拒絶反応が、ヒト患者で実際に惹起されている抗腫瘍免疫反応とどの程度の類似性を持つのかを検討している。

iii) NOG-FcRKO マウスを用いたヒト肺がん細胞株のスクリーニング

ヒト化 NOG-FcR KO マウスを用いた抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果は奏功する細胞株と奏功しない株があり、ヒト臨床の経験と類似している。効果が見られる H1975 と HCC827 が肺腺がんであることから、複数の肺腺がん株を用いて抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を検討した。ATCC から入手した 18 株のうち可移植性の 11 株についてヒト化 NOG-FcR KO マウスに移植し抗 PD-1 抗体を投与した。その結果、腫瘍径で腫瘍の成長を評価した際には三株で抗腫瘍効果が認められたが、これらは病理検査では必ずしも T 細胞の浸潤、腫瘍細胞の細胞死は認められず、抗腫瘍効果が誘導されているとは言い難い結果であった。逆に腫瘍径に差の認められない一株に病理検査で広汎なリンパ球浸潤、細胞死を伴う抗腫瘍効果が認められた。また、腫瘍内への T リンパ球浸潤が強く認められるにもかかわらず腫瘍径、病理像共に抗腫瘍効果が認められない株が一株、T リンパ球による腫瘍細胞の細胞死誘導が認められるにもかかわらず、腫瘍の増殖が速く腫瘍を抑制できないような悪性の腫瘍株を一株見出した。その他の株は抗 PD-1 抗体に投与によってもリンパ球の浸潤は誘導されず、腫瘍の細胞死も誘導されなかった。現在これらの抗 PD-1 抗体感受性・非感受性株を用いて腫瘍内免疫細胞の特性について検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Ryoji, Katano Ikumi, Kwok Immanuel W.H., Ng Lai Guan, Ida-Tanaka Miyuki, Ohno Yusuke, Mu Yunmei, Celhar Teja, Yen Chan Jerry Kok, Takahashi Takeshi, Goto Motohito, Ogura Tomoyuki, Takahashi Riichi, Ito Mamoru	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficient differentiation of human neutrophils with recapitulation of emergency granulopoiesis in human G-CSF knockin humanized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111841 ~ 111841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Quah Hong Sheng, Cao Elaine Yiqun, Suteja Lisda, Li Constance H., Leong Hui Sun, Chong Fui Teen, Gupta Shilpi, Arcinas Camille, Ouyang John F., Ang Vivian, Celhar Teja, Zhao Yunqian, Tay Hui Chen, Chan Jerry, Takahashi Takeshi, Tan Daniel S. W., Biswas Subhra K., Rackham Owen J. L., Iyer N. Gopalakrishna	4. 巻 14
2. 論文標題 Single cell analysis in head and neck cancer reveals potential immune evasion mechanisms during early metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37379-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Katano I, Hanazawa A, Otsuka I, Yamaguchi T, Mochizuki M, Kawai K, Ito R, Goto M, Kagawa T, Takahashi T	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a novel humanized mouse model for improved evaluation of in vivo anti-cancer effects of anti-PD-1 antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 21087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00641-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi T, Katano I, Otsuka I, Ito R, Mochizuki M, Goto M, Takahashi T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of Novel Human Red Blood Cell-Bearing Humanized Mouse Models Based on C3-Deficient NOG Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 671648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.671648.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ikumi Katano, Asami Hanazawa, Iyo Otsuka, Takuya Yamaguchi, Misa Mochizuki, Kenji Kawai, Ryoji Ito, Motohito Goto, Takahiro Kagawa & Takeshi Takahashi
2. 発表標題 A novel humanized mouse model based on NOG-Fc R-/- mice recapitulates anti-tumor immune reactions by human immune systems in response to anti-PD-1 antibody (Nivolumab).
3. 学会等名 AACR (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Takahashi
2. 発表標題 Development of NOG mice with modifications of innate receptors
3. 学会等名 International workshop on humanized mice 6 (IWHM6) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Yamaguchi, Iyo Otsuka, Takeshi Takahashi
2. 発表標題 Prolonged survival of hRBC in NOG-C3-Clec4f double deficient mice
3. 学会等名 International workshop on humanized mice 6 (IWHM6) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikumi Katano, Asami Hanazawa, Iyo Otsuka, Misa Mochizuki, Kenji Kawai, Takeshi Takahashi
2. 発表標題 Functional evaluation model for anti human PD 1 antibody using humanized NOG-FcγR KO mouse
3. 学会等名 International workshop on humanized mice 6 (IWHM6) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikumi Katano, Takeshi Takahashi, Mamoru Ito
2. 発表標題 A novel ischemic infarction model using humanized NOG-IL-34 Tg mouse
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katano Ikumi, Hanazawa Asami, Ito Ruoji, Takahashi Takeshi
2. 発表標題 A novel in vivo model for functional evaluation of immune checkpoint inhibitors (ICI) using humanized NOG-FcgR KO mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

〔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	玉井 恵一 (Tamai Keiichi) (40509262)	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)・がん幹細胞研究部・部長 (81303)	

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
---------	---------