

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25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500391

研究課題名（和文） マーモセット造血幹細胞の同定と BLT マウスの作製

研究課題名（英文） Identification of hematopoietic stem cell and establishment of BLT mouse of common marmoset

研究代表者

亀谷 美恵 (KAMETANI YOSHIE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50338787

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ヒト免疫系モデル動物としての、非ヒト霊長類であるコモンマーモセットの有用性を評価するため、造血幹細胞の同定と重度免疫不全マウスへの免疫再構築を行った。その結果、マーモセットCD117陽性CD34陽性細胞からの顆粒球系、赤芽球系、リンパ球系それぞれへの分化をコロニーアッセイ及び重度免疫不全マウスであるNOGマウスへの異種移植により確認し、マーモセットCD117陽性CD34陽性細胞は、造血幹細胞を含むことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The development of human hematopoietic system is well documented by using xeno-transplantation system. However, as the reconstitution of human hematopoietic system in xeno-environment is incomplete, the repopulation ability may be low-estimated. A new system using non-human primate may be a better choice to clarify the development pathway of primate hematopoiesis. *Calithrix jacchus*, is a candidate of an experimental animal that bears 2-3 animals in one pregnancy and twice per year. We purified CD117+ cell and CD34+ cell fractions and transplanted into immuno-deficient NOG mice. After 8 weeks, CD117+ cells engrafted more efficiently than CD117- cells in bone marrow and spleen of NOG mice and CD34 expression was not enough to keep repopulation activity in xeno-transplantation. CD34+CD117+ cells had similar repopulation ability compared to CD117 single-positive cells as evaluated by marmoset CD45 expressing cell ratio. The cells derived from both CD117+CD34+ and CD117+CD34- fractions developed into myeloid lineage cells and lymphoid cells 12 weeks after the transplantation. The differentiation ability was higher in CD117+CD34+ cells than in CD117 single positive cells. NOG bone marrow cells included CD34+CD117+ cells 4 weeks after the transplantation. These results suggest that multipotential hematopoietic stem cells are involved in CD117+ cell fraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：マーモセット、造血幹細胞、免疫不全マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫系モデルとしては、マウス、ラット、ブタ、リスザルやアカゲザルなどの霊長類など様々な動物種が用いられてきた。特にマウスは数種類の遺伝的背景の一均一な系統があり、多産で飼育がしやすい小動物であることから汎用されている。しかし齧歯類と霊長類は種間の差が大きいため、そのままヒトに適用できないケースが多い。3年前に起こったCD28 スーパーアゴニスト抗体に関連した TGN1412 治験事故はそれを如実に語るものである。この事故では TGN1412 を投与された全てのボランティアに有害事象が現れた。しかしマウスのみならず霊長類を用いた臨床前研究においてもこの分子標的薬の危険性を予測することができなかった。このことは、真に抗体などの分子標的薬を開発するためにはより優れたヒト免疫系モデル動物の作出が必要であることを示している。

これを踏まえ、近年、重度の免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫系を再構築する試みが成されてきた。申請者等も、重度の免疫不全マウスである NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植し、再構築された免疫系の評価を行ってきた。そしてこのマウスではヒトリンパ球や顆粒球などほとんどの血液細胞が分化する事、しかし、Xeno 環境でのヒト免疫応答は不十分であり、臨床前研究に耐えうるものには至っていない、ということを示してきた (Kametani et al. 2006, Ito et al. 2008 など)。一方、ヒト胎児肝臓及び胸腺組織と造血幹細胞を免疫不全マウスに移植して作製した BLT マウスにおいては、より正常に近いヒト免疫系が長期にわたり維持されることが報告された。しかし、これはヒト胎児組織を使用するものであり、倫理的に問題があるため、日本においてこの研究を進めることはできない。

この問題を解決するために、ヒト胎児の組織ではなく、他の霊長類の組織を用いることが有用であると考えられた。なぜなら同じ霊長類であるサルはヒトと進化的に距離が近く、マウスよりヒトに近い免疫系を持つと予想されたからである。しかし、カニ

クイザルやリスザルを含む霊長類は、実験動物コロニーとして維持されておらず、大きさや飼育環境などからもヒトモデル動物として実験に供するためには多くの問題を内包している。一方、コモンマーモセットはヒトと同じ真猿目に属する小型の新世界ザルであり、実験動物として日本国内に目的繁殖コロニーを持つ唯一の霊長類である。また、マーモセットは他の霊長類に比べて多産であること等のメリットから実験動物として注目されてきた (Comparative Medicine 2003 53:383-392)。そして2004年の段階で既に多くの系のモデルが確立され、有用な知見が集積しつつあった (White paper for complete sequencing of the Common Marmoset genome, 2004)。これを受けて、マーモセットの遺伝子解析が米国及び日本で進められ、全ゲノム配列が明らかとなった。さらに、最近、連携研究者である実験動物中央研究所の佐々木等は、マーモセットのは位相差に成功し、世界で初めて、世代間で継承可能な遺伝子改変動物の作出に成功した (Sasaki et al. 2009)。これらの事実はマーモセットに関してはヒトモデル実験動物としての準備が整いつつあることを示していた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の通り、国内で唯一実験動物としてのコロニーを有し、遺伝子改変動物の作出が可能となった霊長類のコモンマーモセットの造血幹細胞を同定し、マーモセット胎仔胸腺及び肝臓と共に免疫不全マウスに移植し、マーモセット免疫系を再構築したマウス (BLT マウス) 作製の技術を開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マーモセット造血幹細胞の検索：申請者等は、既に報告したとおりマーモセット c-kit 抗体及び CD34 抗体を作成済みである。また、CD3 に関しては市販の CD3 抗体が交差することを確認済みである。マーモセット骨髄より単核球画分をリンフォセパールを用いた比重遠心分離により単離し、これらの抗体で染色を行う。セルソーターにより CD3 陰性画分、および c-kit 陽性画分、CD34 陽性画分を単離し、それぞれの画分について 2.5Gy の放射線照射をした 8 週齢の NOG マウスに系静脈で移植する。細胞数は 1×10^6 及びそれ以下の数とし、下記に示す生着能解析を行い最小限の数を決定する。CD38 など

他のヒト抗体でもマーモセットとの交差性を検討する。

抗体ラベルを指標に単離した細胞画分について、メチルセルロースにより培養を行う。経時的に観察し、分化する細胞系列について確認する。

(2)マーモセット造血幹細胞の多分化能解析

解析: 移植後のNOGマウスについて、経時的に眼窩より採血し、単核球を比重遠心分離により採取した後、マーモセットCD45抗体、あるいはヒト抗体中でマーモセットと交差することが既に明らかになっているCD4, CD8, CD20, Va24 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーによりマーモセット血液細胞 (Th細胞、Tc細胞、iNKT細胞、B細胞) が存在するか否かについて明らかにする。また、これらの細胞の一部よりtotal RNAを抽出し、RT-PCRによりマーモセットT細胞、B細胞、樹状細胞、単球に特異的な遺伝子発現の有無を解析する。これらの遺伝子のプライマー(CD11c, CD13, CD14, CD19, CD36, CD56, BlycoholinA)についてはすでにマーモセットゲノム配列とヒト配列のホモロジーからcDNAを予測し、デザインが完了している。

(3)NOG移植後のマーモセット免疫担当細胞の局在解析

解析: 末梢血中にマーモセット血液細胞が検出されたならば、6~12 週間にこのNOGマウスより胸腺、脾臓、リンパ節、肝臓、骨髄の5種類のリンパ臓器を摘出する。また、末梢の血液を採取する。各臓器中のマーモセット血液細胞の存在をCD45、CD4, CD8, CD20, Va24 に対する抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析する。また、CD34/c-kit抗体でも染色し、造血幹細胞がまだ検出されるのか否かについて確認する。

(4)マーモセット造血幹細胞の自己複製能解析

解析: マーモセット造血幹細胞移植NOGの骨髄より、造血幹細胞マーカーで染色される細胞画分が存在したならば、それらの細胞をセルソーターにより精製する。あるいは、CD3 陽性細胞をセルソーターにより除いた細胞画分を調製する。8週齢のNOGマウスに放射線照射した後この細胞を再移植し、再度マーモセット血液細胞が増加してくる

か否かについて経時的に採血して上記の項目(3)の方法で確認を行う。

4. 研究成果

(1) マーモセット造血幹細胞の検索: マーモセット骨髄より CD34, CD117 を指標に単核球を分画し、それぞれについてひと歳と下院環境におけるコロニーアッセイと NOG への移植による多分化能を確認した。その結果、CD117 陽性細胞において赤芽球系、顆粒球系、単球系等で高いコロニー形成能が確認された。

(2) 造血幹細胞の多分化能解析: CD117 陽性細胞を NOG マウスに移植し、経時的に変化を解析したところ、移植後 12 週で末梢血及びリンパ組織においてマーモセット顆粒球系細胞、特にマスト細胞の分化および T 細胞、B 細胞への分化が確認された。

以上の結果、CD117 はマーモセット造血幹細胞マーカーである事が明らかとなった。

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 11 件)

1. Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. Fujii Y., Kitaura K., Matsutani T., Shirai K., Suzuki S., Takasaki T., Kumagai K., Kametani Y., Shiina T., Takabayashi S., Katoh H., Hamada Y., Kurane I., Suzuki R. 2013 *PLoS ONE* 8(2) e56296 (査読有)

2. A human B cell receptor epitope-based erbB-2 peptide (N:163-182) with pan-reactivity to the T cells of Japanese breast cancer patients. Tsuda B, Kametani Y*, Goto Y, Saito Y, Suzuki Y, Habu S, Inoko H, Tokuda Y 2012 *Vaccines and Vaccination*, 3:7. [Doi.org/10.4172/2157-7560.100015](https://doi.org/10.4172/2157-7560.100015) 9 (査読有)

3. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate

hybridization assay. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. J Immunol Methods 2012 384:81-91 (査読有)

4. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Calithrix Jucchus* (common marmoset). Nunomura S, Shimada S, Kametani Y*, Yamada Y, Yoshioka M, Suemizu H, Ozawa M, Itoh T, Kono A, Suzuki R, Tani K, Ando K, Yagita H, Ra C, Habu S, Satake M, Sasaki E. Int. Immunol 2012 24:593-603 (査読有)

5. Porcine MHC classical class I genes are coordinately expressed in superantigen-activated mononuclear cells. Kametani Y, Ohshima S, Kita YF, Shimada S, Kamiguchi H, Shiina T, Inoko H, Kulski JK and Ando A* Veterinary Immunology and Immunopathology 2012 148:252-259 (査読有)

6. Anti-tumor Effect of New HER2 Peptide Vaccination Based on B Cell Epitope. H. Miyako H, Kametani Y*, Katano I, Ito R, Tsuda B, Furukawa A, Saito Y, Ishikawa D, Ogino K, Sasaki S, Imai K, Habu S, Makuuchi H and Tokuda Y Anticancer Res 2011 31:3361-3368 (査読有).

7. Effect of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Antigen-Presenting Cells in Mice. Kawaguchi AT, Aokawa, J, Yamada Y, Yoshida F, Kato S, Kametani Y, Artif Organs 2011 36:194-201 (査読有)

8. A novel ENU-induced mutation in Phospholipase C gamma 2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects,

and in vitro male infertility in the mouse. Abe K, Fuchs H, Boersma A, Hans W, Yu P, Kalaydjiev S, Klaften M, Adler T, Calzada-Wack J, Mossbrugger I, Rathkolb B, Rozman J, Prehn C, Maraslioglu M, Kametani Y, Shimada S, Adamski J, Busch DH, Esposito I, Klingenspor M, Wolf E, Wurst W, Gailus-Durner V, Katan M, Marschall S, Soewarto D, Wagner S, de Angelis MH. Arthritis Rheum. 2011 63:1301-11 (査読有)

9. IL-10 産生CD4+ T 細胞について-コモンマーモセット免疫系の解析から: 亀谷美恵 臨床免疫・アレルギー科 54(4) 477-483 2010

10. ウイルス特異的メモリーT細胞の維持におけるプロバイオティクスの役割 石川裕樹、畑明宏、小林清志、相場勇志、清水恵子、亀谷美恵、田中和生、野田敏司 生物機能研究 14:16-23 2010 (査読無)

11. Protective potential of Bacillus coagulans, a spore-forming lactic acid bacterium, against cytomegalovirus infection. K. Shimizu, Y. Koga, Yuji Aiba, Kiyoshi Kobayashi, Akihiro Hata, Hiroki Ishikawa, Y. Kametani, Kazuo Tanaka, Shiro Ono S. Noda Report Jpn. Assoc. Biol. Func. Rec. 13:34-46 2010 (査読有)

[学会発表] (計 28 件)

1. 免疫不全マウスを用いた非ヒト霊長類コモンマーモセットの造血幹細胞同定 第 46 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会 2013 年 1 月 26 日 亀谷美恵他 フォーラム 246

2. 卵巣、癌化における脳由来神経栄養因子 (BDNF) 受容体 TrkB のシグナル変容 2012 年 12 月 8 日 後藤優美子、高橋千果、布田孝代、石本人士、和泉俊一郎、亀谷美恵、三上幹男 東京ステーション

コンファレンス

2. Human transitional B cells secrete antigen specific IgM in humanized NOG mouse. 第41回日本免疫学会 2012年12月6日 亀谷美恵他 神戸国際会議場

3. Induction of antigen specific unresponsive T cells de novo from naïve T cells for generations in an IL-10 dependent manner. 第41回日本免疫学会 2012年12月5日根岸尚子他 神戸国際会議場

4. 日本人HLA汎親和性のHer-2ペプチドによる乳癌患者末梢血単核球反応性の解析 津田万里、亀谷美恵他 2012年9月15-17日 日本組織適合性学会 東京

5. Human IL-4 transgenic NOG mouseにおける乳癌患者 HLA 型に依存する抗Her-2/neu 抗体エピトープペプチド CH401の抗腫瘍効果の解析

津田万里、亀谷美恵他 2012年7月26-28日 第10回日本臨床腫瘍学会 大阪

6. Her2 部分配列を持つCH401MAP ペプチドの乳癌患者血液細胞に対する反応性の解析 津田万里、亀谷美恵他 2012年6月28-30日 第20回日本乳癌学会 熊本

7. Identification of hematopoietic stem cell marker of common marmoset *Frontiers in Biomedical Researches on Marmosets as a Primate Model* 2012年2月21日 Shimada S et al. Tokyo Medical and Dental University

8. 造血幹細胞の NOG マウスへの移植は transitional B細胞分化を誘導する 第40回日本免疫学会 2011年11月27日 亀谷美恵他 幕張メッセ

9. コモンマーモセット骨髄細胞の多分化能解析 第40回日本免疫学会 2011年11月28日 嶋田新他 幕張メッセ

10. 新たなマスト細胞リソース：コモンマーモセットマスト細胞 第40回日本免疫学会 2011年11月29日 布村聡他 幕張メッセ

11. Immature phenotype of human B cells developed in humanized NOG mouse 3rd International Workshop on Humanized Mice 2011年10月29日 Kametani-Y, Pittsburg, Pennsylvania

12. MHC 固定ブタ末梢血単核球の活性化によるSLAクラスI遺伝子発現の動態解析 第20回日本組織適合性学会大会 2011年8月29日 大島 志乃他 静岡(ツインメッセ静岡・北館)

13. The High Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Truncated Tyrosine Kinase B Receptor (TrkB) in Ovarian Endometriomas 2011年9月5-7日 Le Corum, Montpellier, FRANCE umiko GOTO, Yoshie KAMETANI, Yoshihiro NISHIJIMA, Takeshi HIRASAWA, Toshinari MURAMATSU, Mikio MIKAMI

13. コモンマーモセット免疫系ツールの開発 第23回日本比較免疫学会 2011年8月22日 亀谷美恵他 (独) 海洋研究開発機構、横浜研究所

14. コモンマーモセット骨髄由来CD34+CD117+細胞からヒトに類似したマスト細胞が分化する 第23回日本比較免疫学会 2011年8月22日 嶋田新他 (独) 海洋研究開発機構、横浜研究所

15. 抗Her-2/neu抗体エピトープペプチドの乳がん患者血液細胞に対する反応性の解析 津田万里、亀谷美恵他 2011年7月21-23日 第9回日本臨床腫瘍学会 横浜

16. MHC 固定ブタ末梢血単核球の活性化によるSLA発現動態の解析 第58回日本実験動物学会 2011年5月26日 大島志乃他

京都（京都テルサ）

17. コモンマーモセット骨髄由来 CD34+CD117+細胞からヒトに類似したマスト細胞が分化する 第58回日本実験動物学会総会 2011年05月26日 嶋田 新

亀谷 美恵他 東京（タワーホール船堀）

18. コモンマーモセット骨髄型前駆細胞のマスト細胞への分化解析 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月9日 嶋田新、布村 聡他 神戸（神戸ポートアイランド）

19. コモンマーモセットMHC領域のゲノム構造 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月8日 河野あづみ、亀谷 美恵他 神戸（神戸ポートアイランド）

20. コモンマーモセットMHCクラスI遺伝子(Caja-G)の遺伝的多様性 第19回日本組織適合性学会大会 2010年9月17日 河野あづみ、椎名 隆他 東京（東京大学・本郷校舎）

21. Tumor Suppression in mice immunized with multiple antigen peptide based on an antibody epitope against Her-2/neu 14th international congress of immunology 2010年08月26日 Y. Tokuda, Y. Kametani et al. Kyoto

22. Analysis of T cell characters in common marmoset 14th international congress of immunology 2010年08月25日 Kametani Y, Daisuke Suzuki et al. Kyoto

23. B細胞エピトープに基づく新規HER2ペプチドワクチンの抗腫瘍効果 第14回日本がん免疫学会 2010年07月22日 三朝 博仁、亀谷 美恵他 熊本（KKR熊本）

24. コモンマーモセット末梢血前駆細胞の多分化能解析 第57回日本実験動物学会総会 2010年05月12日 嶋田新、山田

祐子他 京都（京都テルサ）

25. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on antigen presenting activity. American Association for Artificial Internal Organs 2010年05月27-29日 A. Kawaguchi, J. Aokawa et al. Baltimore, USA

シンポジウム

26. Humanized mouse as a model to study B cell differentiation. 1st Samsung Humanized Mice Symposium 2012年4月14日 Yoshie Kametani (Seoul)

27. Transitional B cell development in humanized NOG mice. 3rd International Synthetic Immunology Workshop May18, 2012 Yoshie Kametani (Kyoto)

28. Analysis of Hematopoietic progenitor cells of common marmoset 9th international veterinary immunology symposium 2010年08月18日 Kametani Y. (Tokyo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀谷 美恵 (KAMETANI YOSHIE)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：50338787

(2) 連携研究者

佐々木 えりか (SASAKI ERIKA)
公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット研究部・部長
研究者番号：70390739

鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI)
国立病院機構・相模原病院・臨床研究センター・教授
研究者番号：70373470