

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 6 月 13 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591027

研究課題名（和文） ヒトサイトカイン導入改良型ヒト化担癌マウスの作成と解析

研究課題名（英文） Generation of tumor-bearing humanized mice that express human cytokine

研究代表者

齋藤 俊樹（SAITO TOSHIKI）

独立行政法人国立病院機構（名古屋医療センター臨床研究センター）室長

研究者番号：50557238

研究成果の概要（和文）：ヒト化サイトカインを導入したヒト化担癌マウスを作成するにあたり、NOD/SCID マウスの受精卵より直接トランスジェニック(Tg)マウスを作出する方法を樹立した。先ず体外受精を用いることにより交配率・採卵率の低い NOD/SCID マウスの受精卵を十分量確保することに成功した。また通常よりも遅いタイミングでのマイクロインジェクションにより高い効率で Tg マウスを作出できることが示された。さらに GFP を同手法にて直接 NOD/SCI バックグラウンドで作成した Tg マウスは交配により次世代に大量の Tg マウスを作成できることを確認した。

研究成果の概要（英文）： First, we obtained fertilized eggs efficiently by means of in vitro fertilization (IVF); then, we attempted to generate CAG-EGFP Tg mice on an NOD/SCID background, finding that delayed timing of the microinjection after the IVF improved the time to development of the two-cell-stage embryos and the obtainment of newborns. We successfully generated Tg mice and confirmed the germ-line transmission in the offspring. In conclusion, we established a novel system for directly generating transgenic mice on an NOD/SCID background.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,500,000	1,050,000	3,550,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：癌、動物、免疫学

1. 研究開始当初の背景

癌治療における細胞性免疫の重要性

近年、癌治療において患者自身の免疫状態が決定的に重要な役割を担っていることが分かってきた。骨髄移植などの免疫療法のみならず、抗癌剤治療においても抗癌剤が直接癌細胞を殺傷しているだけでなく、抗癌剤による腫瘍特異的な細胞性免疫の賦活化が必

要不可欠であることが報告されている。申請者らも同種骨髄移植のモデルマウスにて患者自身の細胞性免疫が抗腫瘍効果に決定的な役割を担っていることを既に明らかにしている (Saito TI et al. *Exp Hematol* 2006;34:1270, Rubio MT et al. *J Immunol* 2005;175:665)。よって癌の病態を解析し、治療法を開発する為のマウスモデルでは腫瘍だけでなく個々の患者の免疫状態を再現す

る必要性がある。ところが、そのようなマウスモデルは国内外で未だ報告されていない。

(1) ヒト化マウスにおけるヒト細胞性免疫の不完全な再構築

ヒト造血幹細胞を免疫不全マウスに移植することによりヒト免疫系をマウス体内に再構築した「ヒト化マウス」は開発されてきた。NOD(non obese diabetic)/SCID(severe combined immunodeficiency)マウスへのヒト造血幹細胞移植にて、顆粒球系や液性免疫を担当する B 細胞は再構築されたが、細胞性免疫を担当する T 細胞、NK 細胞の再構築は不十分であった。更に免疫不全の強い NOG マウス(NOD/SCID/Common γ 鎖欠損)マウスなどにおいても依然として細胞性免疫の再構築は不完全であった。申請者の所属した Dr. Sykes の研究室(MGH, 米国ボストン市)においてヒト胎児の胸腺と肝臓を移植することによりヒト細胞性免疫再構築のサポートが試みられたが解決には至らなかった。

(2) ヒト細胞性免疫におけるサイトカイン(IL-15, IL-7)の重要性

T 細胞と NK 細胞の分化、恒常性維持の鍵分子として近年 IL-15 と IL-7 が浮上してきている。ヒト化マウスにおいてもこれらのサイトカインの投与により細胞性免疫系が回復することが示唆され、その重要性がごく最近認識され始めている。しかし *in vivo* 投与は高額、またヒト IL-15 は特許制限により日本国内では入手不可能でありヒト化マウスでの常用が困難である。以上より IL-15 と IL-7 をトランスジェニック(Tg)マウスとして遺伝子導入することが細胞性免疫再構築には理想的と考えられる。

(3) 免疫不全マウスへの遺伝子導入の現状

ヒト細胞の移植の受け皿として使用するには Tg マウス作成後、免疫不全マウスとの交配が 9 世代、即ち最短で約 1 年半の期間が必要となり時間がかかる。さらに免疫不全マウスとして最も汎用されている NOD/SCID マウスは交配率が悪く、飼育も困難であるため、実際には数年かかることがある。これらのヒト化マウスを用いた研究を抜本的に改善するには免疫不全マウス受精卵を用いて直接 Tg マウスを作成することが必要である。免疫不全マウスへの遺伝子導入に関してはエイズウイルスと同類のレンチウイルスを NOD/SCID 受精卵に感染させて Tg マウスを作成した論文が唯一報告されている。しかし、この報告では次世代への導入遺伝子の遺伝は記載されておらず、また用いるレンチウイルスはヒトへの感染がありうるため厳しい規制下でしか作成できず、ヒト化マウスを効率よく作成する手法としては不適切である。

2. 研究の目的

近年、癌治療において患者の免疫状態が決定的に重要な役割を担っていることが分かってきた。本研究では癌患者の免疫状態と癌の両者をマウス体内で再現し、治療法選択に役立てることを目的とする。この目的を達成するため、以下の研究項目を実施する：

I. 免疫不全マウスを用いたトランスジェニック(Tg)マウス作成法の確立。

II. ヒト細胞性免疫再構築をサポートするヒトサイトカイン遺伝子の免疫不全マウスへの導入。

III. ヒトサイトカイン導入免疫不全マウスに患者由来の造血幹細胞と癌細胞を移植することによる病態の再現。患者での臨床的治療効果と病態を再現したマウスでの治療効果の関連の検証。

3. 研究の方法

(1) NOD/SCID ベースでの Tg マウス作成法の確立

NOD/SCID マウスの受精卵を用いて直接 Tg マウスを作成する系を確立する。自然交配と体外受精にて NOD/SCID 受精卵を取得し、交配効率、交配適正年齢を確定する。*in vitro* 培養にて受精卵の卵割の性状と進展度を目安に発生に最適な培養条件を見だしつつ、前核が明瞭化しマイクロインジェクション (DNA 断片を受精卵の前核にガラス針を用いて注入する手技) に適切な時間帯を同定する。

(2). ヒト IL-15, IL-7, IL-15/7 NOD/SCID Tg マウスの作成と解析

ヒトサイトカイン Tg マウスを作成し、そのサイトカインの機能解析を *in vivo* で行う。ヒト IL-15, IL-7 は共に広範な臓器に発現しているため、ユビキタスプロモーターが含まれており、当科にて Tg マウス作成実績のある pUC-CAGGS と、マウス IL-15 Tg マウス作成で実績のある pLd の 2 種類の発現ベクターを使用する。発現ベクターに PCR クローニングしたヒト IL-15 あるいはヒト IL-7 を組み込み、(1)に示した手法でヒト IL-15 とヒト IL-7 の Tg マウスを独立して作成する。複数の Tg マウスラインについて ELISA、定量的 RT-PCR にて測定したサイトカイン発現レベルとヒト T 細胞、NK 細胞維持機能の関連を検証する。3Gy の放射線照射後、ヒト末梢血単

核球を尾静脈注射あるいは腹腔内投与し、1ヶ月後にレシピエントの臓器または血中のヒト CD45 陽性 CD3 陽性分画とヒト CD45 陽性 CD56 陽性分画の頻度にてヒト T 細胞、NK 細胞維持機能を検証する。同時に毎週血中のヒト由来 T 細胞と NK 細胞の頻度を経時的に計測する。(1)の NOD/SCID 受精卵による Tg マウス作成系が確立しない場合には定法通り C57BL/6 受精卵にて Tg マウスを作成し、NOD/SCID マウスへの交配を9世代行う。ヒトサイトカインの強制発現により胎生致死となった際にはテトラサイクリン誘導型の発現ベクターなどを用いて発現コントロールが可能なコンストラクト作成を試みる。

4. 研究成果

動物モデルにおける遺伝子改変技術として最も普及している方法の一つであるマイクロインジェクション法により、免疫不全マウス (NOD/scid) 由来胚を用いたトランスジェニックマウス作成法の樹立を試みた。文献上は今まで同等の報告はなされていなかった。コントロールのコンストラクトとして GFP 発現ベクターを使用し、マウス ES 細胞にトランスフェクションを行い、EGFP の発現を確認した。

先ず免疫不全マウスにおいて自然交配による採卵を試みたが、交配率も低い上に受精卵数も低く十分に獲得することが困難であった。そのため、体外受精により安定して受精卵を獲得することを試み、マイクロインジェクションに適した受精卵数を確保することが可能となった。

定法に従って体外受精8時間後胚へマイクロインジェクションを行なったところ、2細胞期胚は異常な形態を示した。受精後のマイクロインジェクションまでの時間調整が必要と考え、至適時間を計測した。至適時間は受精15時間後であることを見出し、この際2細胞期胚は正常な形態を示した。体外受精と至適タイミングの活用により従来より使用されている免疫が正常のマウスの胚を用いた際とほぼ同様の確率で EGFP 発現トランスジェニックマウスを作成することに成功した。さらに Tg. マウスを交配することにより、この導入遺伝子は次世代まで継続され効率よくヒト化マウスの元となる Tg. マウスが作成できることが示唆された。

これにより NOD/SCID マウスの人工授精とその発生のタイミングを従来技術であるマイクロインジェクション法による免疫不全マウス (NOD/scid) 由来胚を用いたトランスジェニックマウス作成法の樹立が確立された。

この手法は既報告は存在しないため、下記のように Biol Reprod 2011:682 として誌上発表することが出来た。

次にまたヒト IL-15 を pUC-CAGGS という他の Tg マウス作成で経験のあるバックボーンへのクローニングを行った。ヒト IL-15 のシグナルペプチドを IL-2 に置換し、発現量の増強が確認された cDNA を用い、シークエンスにてベクターの組み込みを確認した。その後、確立したマイクロインジェクション法にて NOD/SCID マウス受精卵より直接 Tg マウスの作出を繰り返したが、サザンブロット法にて陽性のものは1ラインも取ることができず、ゲノム PCR にて陽性と考えられたものが1ラインのみ取得できた。しかし、そのラインにて hIL-15 の mRNA の発現は RT-PCR でも検出が出来なかった。GFP コントロールベクターにて Tg マウスの作成のコントロールを取るも、Tg. マウス作成手法自体に問題はなかった。ヒト IL-15 ベクター自体が障害になっている可能性を考え、pUC-CAGGS に加え、pLd の発現ベクターにも同様にヒト IL-15 cDNA を組み込み同様に Tg. マウスの作成を試みるも、サザンブロット法、PCR 法両者にて1ラインも得ることが出来なかった。hIL-15 が発生期に発現することにより致死的になる可能性が示唆された。今後は Tg. ベクター導入されるゲノム上の位置により、致死的な発現量を回避出来る可能性があるため、引き続き作成を試みると同時に、Tet-on/off、ドキシサイクリン誘導の系など、胎生期を過ぎてからヒト IL-15 の発現誘導が可能になる特殊な Tg. マウス作成を試みる予定である。

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3件)

1. Sakurai N, Maeda M, Lee SU, Ishikawa Y, Li M, Williams JC, Wang L, Su L, Suzuki M, Saito TI, Chiba S, Casola S, Yagita H, Teruya-Feldstein J, Tsuzuki S, Bhatia R, Maeda T. The LRF transcription factor regulates mature B cell development and the germinal center response in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2583-98. doi: 10.1172/JCI45682. [査読有]

2. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, Gao W, Saito TI, Lo Celso C, Tsuyuzaki H, Sato T, Cote D, Sykes M, Strom TB, Scadden DT, Lin CP. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the

haematopoietic stem-cell niche. Nature
2011; 474:216-219. doi:
10.1038/nature10160. [査読有]

3. Saito TI, Kumagai K, Kubota N, Sasako
T, Takizawa R, Sudo K, Kurokawa M, Kadowaki
T. Generation of Transgenic Mice on an
NOD/SCID Background Using the
Conventional Microinjection Technique.
Biol Reprod 2011;84(4):682-8. doi:
10.1095/biolreprod.110.087106. [査読有]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 俊樹 (SAITO TOSHIKI)

独立行政法人国立病院機構 (名古屋医療セ
ンター臨床研究センター) 室長

研究者番号 : 50557238

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

熊谷 勝義 (KUMAGAI KATSUYOSHI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20567911

平野 直人 (HIRANO NAOTO)

トロント大学・免疫学・准教授

研究者番号 :