

## 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4月17日現在

機関番号： 7 2 6 1 1

研究種目： 若手研究（B）

研究期間： 2 0 1 0 ～ 2 0 1 2

課題番号： 2 2 7 0 0 4 5 8

研究課題名（和文）

ヒト免疫系を有するヒト抗体産生マウスの開発

研究課題名（英文）

Development of human antibody producing mice with human immune systems

研究代表者

伊藤 亮治（ITO RYOJI）

公益財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室 研究員

研究者番号： 6 0 4 2 5 4 3 6

研究成果の概要（和文）：

本研究ではヒト免疫系再構築マウスの作製を目的とし、重度免疫不全NOGマウスへヒト遺伝子を導入したTgマウスを樹立した。得られた2系統のTgマウス（HLA-DR4 Tg, IL-3/GM-CSF Tg）へヒト造血幹細胞を移植し、ヒト免疫系の解析を行ったところ、HLA-DR4 TgマウスはヒトT細胞機能が亢進し、抗原特異的ヒトIgG抗体の産生が認められた。またIL-3/GM-CSF Tgでは、マスト細胞や好塩基球などのアレルギー関連細胞の分化亢進が見られ、生体内受動アレルギー反応の誘導に成功した。これらTgマウスは、創薬のための前臨床試験へ適用できる可能性があり、医学への貢献が十分に期待される実験動物である。

研究成果の概要（英文）：

The purpose in this research is producing humanized mice reconstituted with human immune system. We obtained 2 strains of human gene transgenic (Tg) mice (HLA-DR4 Tg, IL-3/GM-CSF Tg), and human HSCs were transferred into them to analyze human immune responses in vivo. HLA-DR4 Tg mice showed the production of an antigen specific human IgG antibody and promotion of T cell activity. Meanwhile, differentiation of human mast cells and basophils were increased in hIL-3/GM Tg mice, and they could induce passive allergic response in vivo. Therefore, these humanized Tg mice may contribute to medical research such as the pre-clinical study on the development of new drug.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 実験動物学

キーワード： ヒト化マウス、疾患モデル、ヒト抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞、組織が効率良く生着する重度免疫不全NOGマウスは、様々な血液疾患、免疫疾患をin vivoで再現できる「ヒト化マウスモデル」として、医薬品開発など臨床応用ツールとしての期待が高まっている。申請者は生体内でヒト免疫反応を惹起できる動物モデルの作出を目指し、NOGマウスにヒト造血幹細胞を移入してヒト免疫系を再構築させた「免疫系ヒト化マウス」の開発を行ってきた。しかしながら免疫系ヒト化マウスは、T細胞、B細胞などのリンパ球系細胞が高率に分化するのに反し、ヒト顆粒球やマスト細胞はほとんど検出されず、またT、B細胞共に機能的な欠陥を持ち、特に抗原特異的IgG抗体の産生が全く認められないことは免疫系ヒト化マウスの重大な欠点であると言える。当該の研究領域は、国内、国外における様々な分野の研究者がより有用なヒト免疫系モデルを開発すべく競争の最中にあるが、上記の問題は未だ解決されておらず、本研究成果は新規性に富んだ重要な知見となり得る。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト免疫系を再構築させたヒト化マウスを作製し、細菌、ウイルス、寄生虫等の感染症抗原および癌抗原等、多種多様な抗原に対する完全ヒト型抗体を産生するモデルマウスの開発およびヒト免疫疾患を模倣する実験動物モデルの開発を目的としている。具体的には、HLA遺伝子導入NOGマウス (HLADR4-Tg) を樹立し、移植する造血幹細胞とのHLAハプロタイプを適合させることで、ヒトT細胞とB細胞との相互作用を促し、抗原特異的なヒトIgG抗体を産生するマウスの樹立を目指す。また、従来のヒト化マウスでほとんど分化が認められなかった顆粒球、マスト細胞の分化を誘導すべく、IL-3/GM-CSF Tg NOGマウスを作製する。これらミエロイド系細胞は、アレルギー反応の惹起に必須であるため、本Tgマウスを用いてヒトアレルギーモデルマウスの確立を目指す。本研究にてこれらTgマウスの有用性を明らかにした上で、外部の研究者に広範に使用されるような体制をとりたいと考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) Tgマウスの作製

①HLA-DR4 Tg : マウスMHC-classIIプロモーター下流にヒトDRAおよびDRB0405遺伝子を配置し、Tgベクターとした。本TgベクターをNODマウス前核期卵へマイクロインジェクションを行い、Tgファウンダーを得た。得られたファウンダーをNOGマウスと交配し、NOG背景に置換した後に実験に使用した。

②hIL-3/GM-CSF Tg : 当研究所で以前に作製したC57BL/6背景のIL-3/GM-CSF Tgマウス (Fukuchi et al. Leukemia Research 1998) をNOGマウスと交配し、スピードコンジェニック法にてNOG背景に置換後、実験に使用した。

### (2) ヒト造血幹細胞の移植

8~10週齢の各Tg NOGおよびnon-Tg NOGマウスへ2.5 GyのX線を照射し、翌日にヒト臍帯血由来CD34陽性細胞 (Lonza社より購入)  $5 \times 10^4$ 個を尾静脈経路で移植した。

### (3) ヒトリンパ球の解析 : ヒト造血幹細胞移植後4週

から18週までの間、眼底静脈叢から経時的に採血を行い、蛍光標識された各種抗ヒト抗体を用いてヒト免疫細胞の分化能および生着効率等についてフローサイトメーターにて解析を行った。

### (4) ヒト抗体産生およびT細胞の解析

HLA-DR4 TgマウスへOVA-alumを1週おきに4回腹内投与した。免疫後の脾臓からT細胞を分離し、*in vitro*でCD3およびCD28抗体による刺激を与えた。細胞の増殖性についてはCFSEにて解析した。また免疫後のマウスから血清を採取し、OVA特異的ヒトIgG抗体をELISAにて測定した。

### (5) 生体内アレルギー応答の解析

移植後20週のIL-3/GM-CSF TgおよびnonTgマウス皮内へ抗NP-IgE抗体を投与し、翌日にNPハプテンBSAおよびエバンスブルーを静脈内投与した。20分後、TgおよびnonTgマウス皮膚を採取し、皮内へのエバンスブルー漏出を観察した。

## 4. 研究成果

(1) HLA-DR4 Tgマウス : HLA-DR4 TgマウスにHLA合または不適合の造血幹細胞を移入し、OVA-alumで免疫した後にOVA特異的ヒト抗体を測定した。その結果、HLA適合造血幹細胞移入群で、半数以上の個体がOVA特異的IgGの産生を認めた (図1 A)。またこのときのT細胞を抗CD3および抗CD28抗体で刺激したところ、正常ヒト末梢血と遜色無い増殖性が認められた (図1 B)。このことから、HLA-DR4 Tgマウスにて分化したヒトT細胞は、マウス胸腺に発現するHLA-DR4に拘束され、ヒトB細胞との相互作用経て抗原特異的IgG抗体産生を誘導することが示唆され、本Tgマウスがヒト抗体医薬の評価系または製系として利用できる可能性が示された。

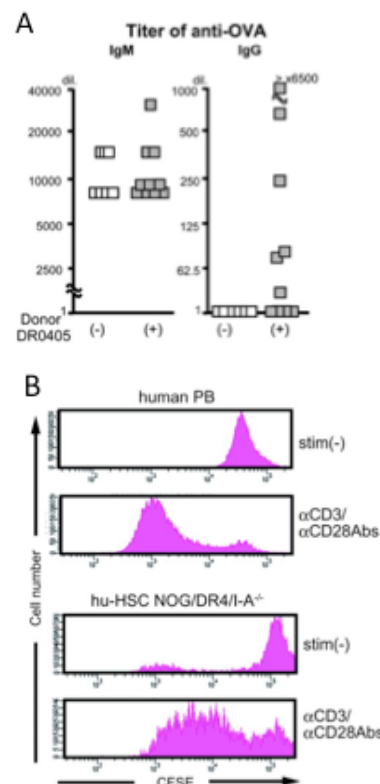


図1 HLA-DR4 Tgマウスの抗体産生能およびT細胞の反応性

(2) IL-3/GM-CSF Tgマウス

IL-3/GM-CSF TgマウスへヒトHSCを移入後、末梢血中を経時的に採取し、フローサイトメーターを用いてヒト免疫細胞の表面抗原解析を行った。TgマウスではCD33陽性ミエロイド系細胞の分化亢進が認められ、特にCD66b陽性顆粒球の分化がnonTgに比べて顕著であった(図2)。また、これら顆粒球を分離し、メイギムザ染色により細胞種の同定を試みたところ、これまでのヒト化マウスではほとんど観察されなかった好塩基球、好酸球の分化が認められた(図3)。さらに従来のヒト化マウスではわずかし分化が見られなかったヒトマスト細胞について、Mast cell Chymase抗体による免疫染色にて解析した。その結果、Tgマウス脾臓において多数のマスト細胞が認められ(図4)、また肺、皮膚、胃においてもnonTgに比べて多くのマスト細胞の局在が見られた。これらマスト細胞が生体内においてIgEに反応し、脱顆粒を引き起こすかについて、受動皮膚アナフィラキシー反応(PCA反応)により検討した。IL-3/GM-CSF Tgマウス皮内への抗NP-IgE投与およびNP+エバンスブルーの静脈内投与により、皮内に大量の色素漏出すなわちマスト細胞による顆粒放出が観察された。一方nonTgマウスおよびヒト化していないNOGマウスでは顕著な色素漏出は認められなかった(図5)。以上の結果から、IL-3/GM-CSF Tgマウスはヒトアレルギーモデルマウスとして利用できる可能性が示唆された。また本研究は、ヒトアレルギー反応の生体モデル実現に大きく寄与したと同時に、医薬品開発などの臨床試験における霊長類の使用が厳しく制限されている昨今において、本モデルがその打開策として有効な実験動物となり得る。したがって、倫理的観点からも利用価値の高いヒト疾患モデルとして期待される。

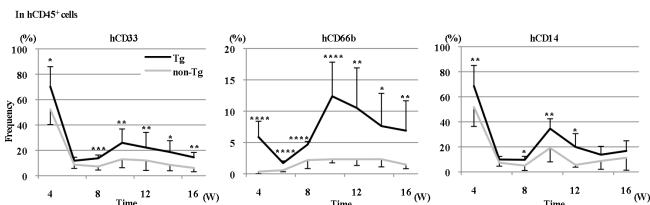


図2 IL-3/GM-CSF Tgマウスにおけるミエロイド系細胞の分化亢進

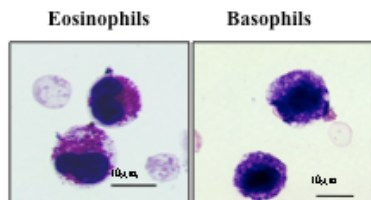


図3 IL-3/GM-CSF Tgマウスにおける好酸球および好塩基球分化

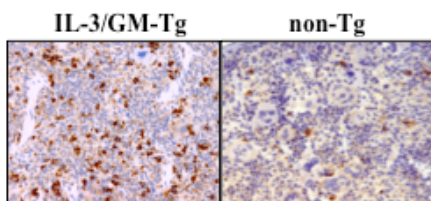


図4 IL-3/GM-CSF Tgマウスにおけるマスト細胞の分化亢進

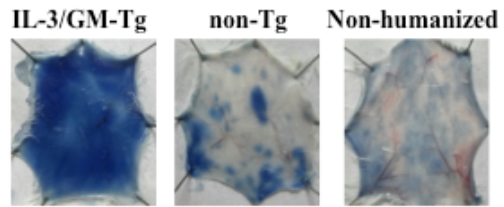


図5 IL-3/GM-CSF Tgマウスにおける受動皮膚アナフィラキシー反

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6件)

1. Efficient Xenoengraftment in Severe Immunodeficient NOD/Shi-scid IL2r $\gamma$  null Mice Is Attributed to a Lack of CD11c+B220+CD122+ cells  
Journal of Immunology 2012;189:4313-4320.  
Ito R, Katano I, Ida-Tanaka M, Kamisako T, Kawai K, Suemizu H, Aiso S, Ito M. 査読有り  
doi: 10.4049/jimmunol.1200820

2. Osteosclerosis and inhibition of human hematopoiesis in NOG mice expressing human Delta-like 1 in osteoblasts  
Experimental Hematology 2012;40:953-963.  
Ito R, Negishi N, Irie N, Matsuo K, Suzuki D, Katano I, Hayakawa E, Kawai K, Kamisako T, E T, Ogura T, Hozumi K, Ando K, Aiso S, Tamaok N, Habu S, Ito M. 査読有り  
doi: 10.1016/j.exphem.2012.07.002

3. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ $\gamma$  null mouse  
International Immunology 2012;24:243-252.  
Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito Harigae H, Ishii N, Sugamura K. 査読有り  
doi: 10.1093/intimm/dxs045

4. Current advances in humanized mouse model  
Cell Mol Immunol. 2012;9:208-214.  
Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. 査読有り  
doi: 10.1038/cmi.2012.2

5. Immunodeficient NOD-scid IL-2R $\gamma$  (null) mice do not display T and B cell leakiness  
Exp Anim. 2011;60(2):181-186.  
Katano I, Ito R, Eto T, Aiso S, Ito M. 査読有り  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512274>

[学会発表] (計8件)

1. Development of a human allergy model animal using novel NOG transgenic humanized mouse strain expressing human IL-3 and GM-CSF. 第41回日本免疫学会 神戸 2012. 12. 1 伊藤亮治

2. ヒトIL-3/GM-CSFトランスジェニックNOGマウスを用いたヒトアレルギーモデルの確立 第62回日本アレルギー学会 大阪 2012. 11. 29 伊藤亮治

3. Establishment of efficient humanized mice improved myelopoiesis by using human IL-3/GM-CSF transgenic NOG mouse 第59回日本実験動物学会 別府 2012. 5. 25 伊藤亮治

4. NOG IL-3/GM-CSF Tgマウスにおける機能的ヒトミエロイド系細胞分化 第40回日本免疫学会 千葉 2011. 11. 28 伊藤亮治

5. Interferon-gamma produced by IKDC has a crucial role in suppression of xeno-GVHD in NOG mice. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Lugano (Swiss) 2010 Sep 26 伊藤亮治

6. Pathological state in Xeno-GVHD induced by human CD4 or CD8 T cells. 14th International Congress of Immunology in Kobe (Japan) 2010 Aug 22 伊藤亮治

[その他]

ホームページ等

<http://www.ciea.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 亮治 (ITO RYOJI)

公益財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室 研究員

研究者番号 : 60425436

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :