

令和元年6月24日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07084

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いたヒト生体免疫モデル動物の開発と麻疹ウイルス感染研究

研究課題名(英文) Establishment of humanized mice as a small animal model for measles virus infection

研究代表者

中西 友子 (NAKANISHI, Tomoko)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・博士研究員

研究者番号：10344863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスはヒトを自然宿主とし、その他の動物では霊長類以外に感染性を持たない。我々は、ヒト白血球を体内に持つ免疫ヒト化マウスが感染モデルとして利用可能であることを見出した。実際には、EGFPを発現する組換え麻疹ウイルスを接種すると、ウイルスがヒトリンパ球に感染し、末梢血のヒトリンパ球数が2-4日で約20%にまで減少し、一部のマウスではその後回復した。また、ヒトリンパ球の毛包周囲への集積により、腹部や脇には発疹様の緑色蛍光が観察された。これらの病態は、ヒトおよびサルモデルの病態とよく似ており、我々の小動物感染モデルは麻疹の感染・発症機構の解明に役立つと期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫ヒト化マウスを利用した麻疹ウイルス感染モデルは、これまでのモデルと比較して簡便に利用できる小動物モデルである。また、改良型免疫ヒト化マウスは、移植するヒト臍帯血幹細胞との間のHLAを一致させるものであり、獲得免疫存在下で、麻疹ウイルスのみならずヒト白血病ウイルスやデングウイルスなどのヒト血球系ウイルスの感染機構解明や予防・治療法の開発、がんの治療法開発などに広く応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Natural hosts of measles virus (MV) are only humans and no other animals except nonhuman primates have susceptibility to MV infection. To study the mechanisms of MV pathogenicity, we aimed to establish a small animal model for MV infection by utilizing mice with reconstituted human immune system components (humanized mice). When we challenged the humanized mice with a recombinant wild-type MV expressing EGFP, a strong EGFP fluorescence was found in spleen, lymph nodes, and bone marrow. The fluorescence was confirmed to associate with MV infection of human T and B cells. Number of human lymphocytes were decreased and subsequently recovered. Moreover, Green fluorescent spots similar to skin rashes were observed in the abdominal skin. The spots were found to be due to accumulation of human lymphocytes to the hair follicles. These results indicate that our small animal model would be useful for elucidating the mechanism of MV infection and its pathogenicity.

研究分野：実験動物学

キーワード：麻疹ウイルス ゲノム編集 CRISPR/Cas9システム NSG 免疫ヒト化マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

麻疹は、弱毒生ワクチンの使用により先進国での罹患は劇的に減少し、わが国も 2015 年 3 月に WHO から麻疹排除国の認定を受けた。しかし、未だに発展途上国の小児を中心に毎年数十万人の死者を出している。症状としては、発熱と発疹に加えリンパ球の減少と免疫抑制が知られ、主な死亡原因は免疫低下による日和見感染である。最近、この免疫機能の低下が最大 3 年持続する可能性があり、肺炎や脳炎、寄生虫症などの二次的な感染症に十分に警戒する必要があることが報告された。また約 7 年の潜伏期間を経て、罹患者の数万人に 1 人に予後不良の亜急性硬化性全脳炎(SSPE)と呼ばれる難病を起こすことも知られており、感染・発症メカニズムの解明や治療法の開発が重要な課題となっている。

申請者の研究室では、実験的にカニクイザルに麻疹ウイルスを感染させると、病態をよく再現できることを報告している。この病態モデルから、麻疹ウイルスは鼻や喉で SLAM 受容体を介して免疫細胞に感染し、リンパ節および二次リンパ組織への拡散を経たのち、Nectin-4 受容体を介して気道から体外に放出されることが示唆された。このような複雑な感染経路を理解し制御するためには、動物モデルを用いた研究が不可欠であるが、サルのような大型動物の飼育や実験は容易ではなく費用もかかる。また近年、ヒト SLAM を発現する遺伝子改変マウスが報告されたが、インターフェロンを抑制した状態において初めて麻疹病態が再現されるモデルであり、マウスに由来する細胞がヒトの抗ウイルス活性を忠実に反映できないことが示唆された。

2. 研究の目的

NSG マウスは、免疫担当細胞である T, B 細胞、NK 細胞を欠失した超免疫不全マウスであり、ヒト臍帯血幹細胞を移植することで、体内で B 細胞や T 細胞を始めとしたヒト免疫細胞を分化させることが知られている(免疫ヒト化マウス)。そこで、免疫ヒト化マウスが、ヒト白血球に感染する麻疹ウイルスの感染モデルになり得ると考え、新たな感染モデルの構築を目指し研究を行った。サルモデルより簡便に利用可能な新たな感染モデルができれば、麻疹の感染・発症機構の解明に役立つと期待できる。

3. 研究の方法

(1) 免疫ヒト化マウスの作製

NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスはジャクソン研究所より購入し繁殖を行った。免疫ヒト化マウスは、新生仔 1 日目の NSG マウスに 1 Gy の X 線を照射したのち、顔面静脈より 4×10^4 個のヒト臍帯血幹細胞(理研バイオリソースセンター)を移植して作製した。またマウス体内におけるヒト白血球の生着は、1 か月毎に尾静脈より採取した末梢血 5 μ l をフローサイトメトリー-FACSVerse で解析することで行った。使用した抗体は以下のとおりである。PE-Cy7 抗ヒト CD45 マウス mAb、AF700 抗ヒト CD3 マウス mAb、PerCP/Cy5.5 抗ヒト CD19 マウス mAb、APC 抗ヒト CD4 マウス mAb、FITC ヒト CD8 マウス mAb、PE 抗 SLAM マウス mAb、BV510 (or PE) 抗マウス CD45 ラット mAb。

(2) 組換え麻疹ウイルスの作製およびマウスへの接種

EGFP を発現する組換え麻疹ウイルス MV-HL-GFP と MV-SLAMbind-GFP は、293-SLAM および MCF7 細胞を用いて増殖させた。ウイルス感染価(TCID₅₀/mL)は Reed-Muench 法を用いて算出した。作製した免疫ヒト化マウスには、 4×10^5 の組換え麻疹ウイルスを尾静脈より感染させた。

(3) 免疫組織化学染色

脾臓および脱灰後の大腿骨はパラフィン包埋し、切片を賦活化後、抗ヒト CD3 マウス抗体および抗ヒト CD19 ウサギ抗体で免疫組織染色を行った。細胞核はヘマトキシリンで染色を行った。皮膚は凍結包埋し薄切後、一次抗体として抗ヒト CD45mAb と抗ヒト CD3 ウサギ mAb を反応させて、その後二次抗体として AF568 抗マウス/ウサギ IgG を反応させることで染色した。オリンパス IX81 共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫ヒト化マウスの構築と解析

まず NSG マウスの新生仔の顔面静脈からヒト臍帯血幹細胞を移植して免疫ヒト化マウスを作製する系の構築を試みた。ヒト臍帯血幹細胞の移植後、経時的に末梢血のフローサイトメトリー解析をしたところ、1 か月ごろからマウス白血球に混ざってヒト白血球 (CD45 陽性細胞) が認められ、2 か月後にはヒトの白血球数がマウスの白血球数とほぼ同数になった。この時期はヒト白血球のほとんどが CD19 陽性 B 細胞であったが、その後 CD3 陽性 T 細胞も出現し、5 か月後にはヒト白血球の 40% を占めるようになった。また、T 細胞は CD4 もしくは CD8 陽性であったことから、T 細胞が正常に分化していることが示唆された。

移植 3 か月後の解剖による組織学的解析では、脾臓の白脾髄において T 細胞が B 細胞に囲まれるように位置していた。また、脾臓と骨髄中の細胞のフローサイトメトリー解析では、80% 以上の細胞がヒト白血球であり、T、B 細胞の両方が存在していることが明らかとなった。

これらのことからヒト臍帯血幹細胞を移植した NSG マウスの体内では、ヒトの免疫系が再構築されており、分化したヒト白血球表面に麻疹ウイルスの受容体である SLAM が局在していたことから、免疫ヒト化マウスは麻疹ウイルス (MV) 感染モデルになり得ることが示唆された。

(2) 免疫ヒト化マウスへの組換え麻疹ウイルスの感染

サル MV 感染モデルでは、MV はリンパ球に感染し、リンパ球の減少や発疹、発熱などの症状が見られる。免疫ヒト化マウスに MV が感染するかを検討するために、EGFP を発現する組換え麻疹ウイルス MV-HL-GFP を尾静脈から接種し 1 週間後に解析を行った。その結果、脾臓やリンパ節、骨髄に緑色蛍光が認められ、ヒトリンパ球が存在しない組織では緑色蛍光が認められなかったことから、ヒトリンパ球に MV-HL-GFP が感染していることが示唆された。凍結切片ではシンシチウムが観察されたことから、MV-HL-GFP 感染によりヒト白血球が細胞融合能も獲得していることが示された。

次に、MV-HL-GFP がヒトリンパ球に感染していることを確認するために、各臓器から細胞を回収してフローサイトメトリー解析を行ったところ、ヒト CD19 陽性 B 細胞およびヒト CD3 陽性 T 細胞の数%から 20% が EGFP 陽性細胞であることが明らかとなった。このことから、免疫ヒト化マウスではサルと同様に MV が SLAM を介してリンパ球に感染していると考えられた。

(3) 免疫ヒト化マウス感染モデルにおけるヒトリンパ球減少

麻疹の病態の一つであるリンパ球減少についても解析を行った。MV-HL-GFP 接種後一日おきにフローサイトメトリーにより末梢血の解析を行ったところ、マウス白血球の数はほとんど変化しないのに対して、ヒト白血球は数日で急激に減少した。その後一部のマウスではヒト白血

球の数が元に戻った。また、末梢血の血球における麻疹ウイルスゲノムを RT-PCR で検出したところ、ヒト白血球が減少する数日間で急激に麻疹ウイルスゲノムが増加しその後減少した。さらに、SLAM 受容体を介して感染することができない組換え麻疹ウイルス MV-SLAMblind-GFP を用いた際には、血中におけるリンパ球の減少は観察されなかったことから、免疫ヒト化マウスでは、サル感染モデルと同様に、リンパ球に SLAM を介して MV-HL-GFP が感染することでリンパ球減少が引き起こされていることが示唆された。

(4) 免疫ヒト化マウス感染モデルにおける発疹用病態

サルの感染モデルではリンパ球の減少に加えて発熱や発疹が見られる。免疫ヒト化マウスを用いた我々のモデルで MV 接種後の発熱は認められなかったが、緑色蛍光をもつ斑点が認められた。その数はマウスによりばらつきがあり、麻疹ウイルス接種後 5-7 日目に徐々に大きくなり、1-2 日で消失した。これらの斑点は、サルモデルで見られる発疹と同様に、腹部だけでなく目や口の周りにも観察された。

一部のマウスから皮膚のサンプルを採取し、凍結切片を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、ほとんどの斑点は毛包の近くに存在し、ヒト CD45 陽性細胞が数多く毛包の近くに集積しており、これらの細胞の一部が EGFP 陽性であった。また、CD45 陽性細胞は、CD3 陽性、CD19、CD11c 陰性であったことから、ヒト T 細胞が集積したものであることが明らかとなった。

(1)-(3)より、免疫ヒト化マウスを用いた小動物感染モデルは、サルモデルと同様にヒトの病態をよく反映することが示された。

(4) 免疫ヒト化マウスの改良

現在の免疫ヒト化マウスは、マウス内のヒト T 細胞がマウス胸腺内の主要組織適合抗原(MHC)複合体との相互作用により発生・分化が誘導されているため(MHC 拘束性) ヒト B 細胞や抗原提示細胞上のヒト白血球型抗原 HLA を認識して免疫応答を誘起することができない。つまり獲得免疫および細胞性免疫は誘導されない。そこで、マウスの胸腺環境をヒト化するために、CRISPR/Cas9 技術を用いて、免疫ヒト化マウス作製に使用する NSG マウスの MHC の遺伝子改変を進めた。まず、技術確立のために 2-マイクログロブリンおよび H2-A / をノックアウトした NSG マウスを作製し、交配によりダブルノックアウトマウスを作製した。このマウスの白血球では、マウス MHC クラス I と II がダブルで欠失することを確認しマウス系統を樹立した。次に、H2-A に HLA クラス II である DRA をノックインしたマウスも作製した。H2-A に DRB をノックインしたマウスを作製中であり、DRA と DRB をダブルでノックインしたマウスに、同一の HLA を保持するヒト臍帯血幹細胞を移植することで、獲得免疫などの誘導が期待できる。今後、ヒトの免疫系がよりヒトに近い状態で再構築された免疫ヒト化マウスを作製し、麻疹の病態がどのように進行していくのか検討していく。この改良型免疫ヒト化マウスは、感染症やがん等の治療法の確立にも役立つものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

〔学会発表〕(計6件)

1. 超多重ガイド RNA 発現アデノベクターの開発と in vivo ゲノム改変への応用
中西 友子、前川 文、斎藤 泉
第3回 日本ゲノム編集学会 2018年6月18-20日、広島、口頭
2. Utilization of humanized mice as a small animal model for measles virus infection.
Tomoko Nakanishi, Misako Yoneda, Tomoko Fujiyuki, Yousuke Amagai, Izumu Saito,
Chieko Kai
IUMS2017, 17-21 July 2017, Singapore、ポスター
3. 免疫系ヒト化マウスを用いた麻疹ウイルスの小動物感染モデル
中西友子、米田美佐子、藤幸知子、雨貝陽介、斎藤泉、甲斐知恵子
第64回 日本実験動物学会 2017年5月25-27日、福島、ポスター
4. Establishment of measles virus infection model utilizing humanized mouse.
Tomoko Nakanishi, Misako Yoneda, Tomoko Fujiyuki, Yousuke Amagai, Izumu Saito,
Chieko Kai
第64回 日本ウイルス学会 2016年10月23日-25日、札幌、口頭
5. CRISPR/Cas9 システムを利用した MHC class II ノックアウト NSG マウスの作製
Establishment of MHC class II knockout NSG mice utilizing CRISPR/Cas9 system.
中西友子、権賢貞、堀江亮、内田翔太郎、米田美佐子、斎藤泉、甲斐知恵子
第1回 日本ゲノム編集学会 2016年9月6日-7日、広島、ポスター
6. 免疫ヒト化マウスを利用した麻疹ウイルス感染モデルの構築
中西友子、米田美佐子、藤幸知子、雨貝陽介、斎藤泉、甲斐知恵子
第63回 日本実験動物学会 2016年5月18-20日、川崎、口頭

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<https://www.bikaken.or.jp/laboratories/virology/summary.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：斎藤 泉

ローマ字氏名：SAITO, Izumu

所属研究機関名：微生物化学研究所

部局名：第3生物活性研究部

職名：チームリーダー

研究者番号(8桁): 70158913

(2)研究協力者

研究協力者氏名：甲斐 知恵子

ローマ字氏名：KAI, Chieko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。