

令和元年6月15日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18404

研究課題名(和文)次世代ヒト化NOGマウスによるヒト腫瘍微小環境の再構築-がん免疫療法評価系の開発

研究課題名(英文) Reconstitution of human tumor microenvironment in second generation humanized NOG mice - Development of evaluation systems for cancer immunotherapy

研究代表者

花澤 麻美 (Hanazawa, Asami)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

研究者番号：40633334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年ではがん患者に存在するTAM等の免疫抑制性骨髄系細胞が標的として注目を集めているが、これらの細胞に対する薬効を評価可能な実験動物は未だ確立されていない。本研究では、ヒト単球・マクロファージの分化を促すNOG hIL-6 Tgマウスを用いたヒト腫瘍モデル動物においてヒトTAMを誘導し、その形質や能力が患者体内に存在するTAMに類似していることを示した。また、NOG hM-CSF Tgマウスをはじめとするヒト腫瘍モデル動物の作製に有用な新たなマウスを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法は近年目覚ましく発展しているが、その評価に適した実験動物は未だ確立されていない。本研究において樹立されたNOG hIL-6 Tgマウスをはじめとする新規ヒト腫瘍モデル動物は、TAM等のがん患者に特有な細胞を含む様々なヒト免疫細胞を体内に保持し、がん細胞と免疫細胞の相互作用を再現しており、がん免疫療法における新規治療法や新規薬剤の免疫機構への影響を評価することができる。よって、本研究はがん免疫療法の発展に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：TAMs (Tumor-associated macrophages) are one of the immunosuppressive myeloid cells which are induced in cancer patients. Although these cells are considered as a key of cancer immune therapy, animal models which allow the evaluation of medicinal effect against these human immunosuppressive cells have not been established. In this study, we induced human TAMs in the animal models based on NOG hIL-6 Tg mice which promote the differentiation of human monocytes and macrophages. Moreover, we indicated that the character and the function of the TAMs in this mice are relating for the cells in cancer patients. In addition, we established the new 2nd generation NOG mice including NOG hM-CSF Tg mice which are usefully for the establishment of human cancer animal models have been established.

研究分野：実験動物学

キーワード：腫瘍モデル動物 ヒト化マウス 次世代NOGマウス 腫瘍微小環境 TAM MDSC

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

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R null) マウス等の重度免疫不全マウスにヒトの細胞や組織を移植したヒト化マウスは、生体内におけるヒトの細胞あるいは組織の解析を可能とする技術としてその需要が高まっている。また、近年ではNOGマウスに様々なヒト遺伝子を導入した次世代NOGマウスの開発が進み、よりヒトの体内環境を再現することができるモデルとして医療研究や創薬研究に応用されている。本研究では特に、ヒト造血幹細胞を移植することでヒト免疫系をマウス体内に再構築したヒト化マウスを用いており、これを免疫系ヒト化マウスと呼ぶ。
- (2) がん免疫療法は抗がん治療の第4の選択肢とも呼ばれ、免疫細胞を標的とした創薬が活発に行われている。中でも、がん患者に存在する腫瘍関連マクロファージ (TAM) やミエロイド抑制性細胞 (MDSC) と呼ばれる骨髄系細胞は、宿主の免疫機構を抑制し、腫瘍細胞の増殖に有利な環境を作る特異な細胞群であり、がん治療の創薬標的として近年注目されている。
- (3) 新たな創薬評価系として、創薬標的であるTAMやMDSCを内包する生体モデルの開発が望まれているが、これらのヒト細胞の解析を可能とする実験動物は未だ確立されていない。

### 2. 研究の目的

- (1) ヒト単球・マクロファージの分化を促す次世代 NOG マウスである NOG hIL-6 Tg マウスを用いて、TAM や MDSC を含むヒト免疫細胞とヒト腫瘍細胞の相互作用の評価を可能とするモデル動物を樹立する。本モデル動物では TAM や MDSC に類似した形質のヒト細胞が誘導されることが既に示されているが、さらにその機能や免疫特性についてがん患者体内の同細胞との類似性を評価し、TAM や MDSC を内包する新規ヒト腫瘍モデルの樹立とする。
- (2) ヒト腫瘍モデルの開発に有用な新規次世代 NOG マウスを樹立する。ヒト M-CSF 等の TAM や MDSC の誘導を促すと考えられるサイトカインを導入した新たな次世代 NOG マウスを作製し、これらのマウスについても NOG hIL-6 Tg マウスと同様にヒト腫瘍微小環境が再構築可能か解析を行う。また、現在のモデルではマウスの TAM や MDSC も誘導されてしまうため、これらの細胞の影響の除去を目的として、単球・マクロファージや顆粒球といったマウス内在性の骨髄系細胞を欠損したマウスの作製を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) NOG hIL-6 Tg マウスにおいて誘導される TAM や MDSC の免疫特性の解析  
TAM や MDSC の産生する免疫抑制因子である Arginase-1 (ARG1) や IL-10、腫瘍の増大や転移を促すサイトカインである VEGF 等の発現をフローサイトメトリー法あるいは定量 RT-PCR 法を用いて評価した。TAM は腫瘍内のみ存在するとされるため、本項目は免疫系ヒト化マウスに移植した腫瘍内のヒトマクロファージと脾臓内のヒトマクロファージの比較として行った。  
直接的に抗腫瘍に働く代表的な細胞である CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制するか否かについて、*ex vivo* で検討した。NOG hIL-6 Tg マウスあるいは NOG マウスを用いた免疫系ヒト化マウス由来の TAM や MDSC を、CFSE 色素にて標識したヒト化マウスの脾臓由来の T 細胞と共培養し、T 細胞の分裂回数を測定することで評価した。この時、腫瘍由来のヒトマクロファージを TAM 様細胞とし、脾臓由来の同細胞を通常のマクロファージとして、由来する臓器の異なる二種の細胞を比較することで TAM 様細胞の機能について検討を行った。  
TAM や MDSC を内包する NOG hIL-6 Tg マウスとこれらの細胞を保持しない NOG マウスでは腫瘍の増殖の程度に差があるかを比較することで、免疫系ヒト化マウスにおいて誘導される TAM や MDSC に腫瘍の増大を促進する能力があるか否かを検討した。ヒト造血幹細胞移植によりヒト化した NOG hIL-6 Tg マウスと NOG マウスの皮下にヒト腫瘍株を移植し、腫瘍体積を経時的に計測することで評価した。
- (2) ヒト腫瘍モデル動物の開発に有用な新規次世代 NOG マウスの作製と評価  
IL-6 と同様に単球・マクロファージの分化を促し、且つ TAM や MDSC の誘導因子のひとつとされるサイトカイン M-CSF、ならびに骨髄系細胞への分化を促進し、造血幹細胞の維持に作用するサイトカイン TPO のヒト遺伝子を発現した NOG マウスを作製した。プロモーターには組織非特異的に発現させる CAG あるいは CMV を用いた。また、発現の組織特異性を高めるために BAC Tg マウスを作製した。  
作製したマウスの評価は、はじめに、ヒト造血幹細胞を移植した後に末梢血中のヒト血液細胞がどのような細胞に分化しているか、フローサイトメトリー法を用いて経時的に解析することでヒト化マウスとしての特性を解析する。次に、免疫系ヒト化マウスにヒト腫瘍細胞株を移植し、腫瘍内あるいは脾臓や末梢血に存在するヒト細胞、特に単球やマクロファージの形質をフローサイトメトリー法や免疫染色を用いて詳細に解析する。  
マウスの顆粒球を除去する為に G-CSF レセプター (G-CSFR) や CXCR2 を欠損したマウスを、単球・マクロファージを除去するために CCR2 を欠損した NOG マウスを作製した。欠損マウスは CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を用いて作製した。

### 4. 研究成果

- (1) NOG hIL-6 Tg マウスにおいて誘導される TAM や MDSC の免疫特性の解析

フローサイトメトリー法にて免疫抑制因子である Arginase-1 を、定量 RT-PCR 法にて同じく免疫抑制因子である IL-10 ならびに腫瘍の増大や転移を促す VEGF を、免疫系ヒト化マウスに移植したヒト腫瘍内に存在する TAM 様ヒトマクロファージが発現していることを確認した(図1)。これらはがん患者に存在する TAM が産生する代表的な機能的サイトカインであり、NOG hIL-6 Tg マウスにおいて誘導される TAM 様細胞ががん患者体内の TAM に類似した機能を獲得していることが示された。

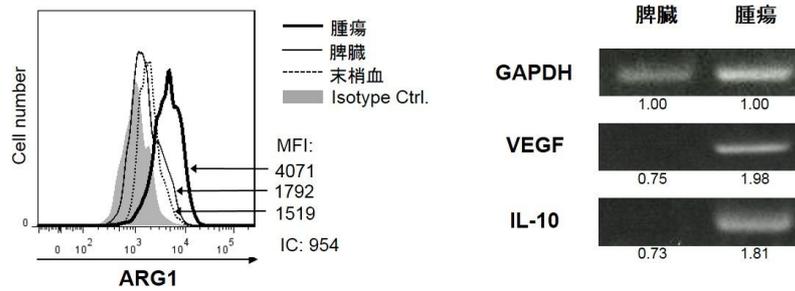


図1 腫瘍内ヒトマクロファージにおける免疫抑制因子の発現

脾臓内より採取したヒトマクロファージをヒト T 細胞と共培養した場合には CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖が亢進したが、腫瘍内より採取したヒトマクロファージと共培養した場合にはヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖が抑制された(図2)。よって、腫瘍内に存在する TAM 様ヒトマクロファージは、TAM の持つ主要な免疫抑制能である CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖抑制を行う機能を持つことが示された。

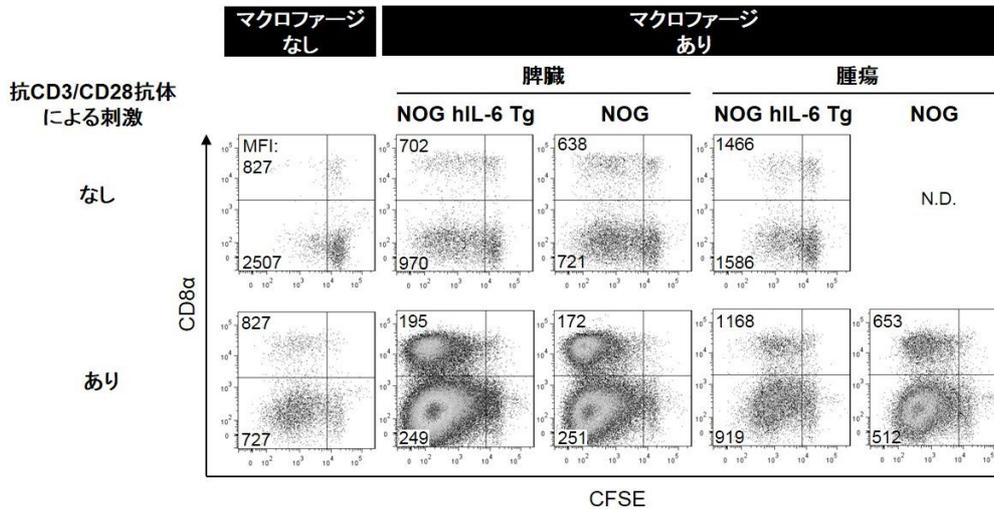


図2 腫瘍内ヒトマクロファージによるヒトT細胞の増殖抑制

NOG マウスと比較して NOG hIL-6 Tg マウスに移植した腫瘍はより増大する傾向にあった(図3)。これは NOG hIL-6 Tg マウスに存在する TAM 様マクロファージの作用とも考えられるが、しかしながら、IL-6 自体にも腫瘍細胞の増殖を促進する作用があるため、TAM 様細胞の機能のみを証明したものであるとは言い切れない。本検討については、IL-6 レセプターや gp130 を欠損した腫瘍株を作製し、再度検討を行う必要がある。

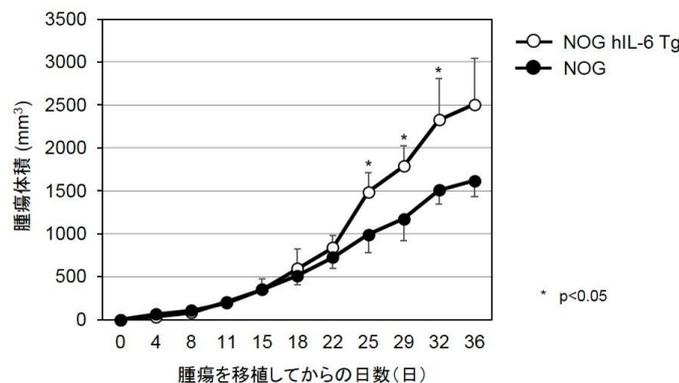


図3 ヒト化NOG-IL-6マウスまたはヒト化NOGマウスに移植したヒト腫瘍の大きさの推移

(2) ヒト腫瘍モデル動物の作製に有用な新規次世代 NOG マウスの作製と評価

M-CSFならびにTPOのヒト遺伝子を導入したNOG Tgマウスの樹立に成功した。このうちNOG hM-CSF Tgマウスについては、ヒト造血幹細胞移植時のヒト免疫細胞の分化における特性、ならびに腫瘍移植時の単球・マクロファージの形質について解析を行った。なお、本マウスについては抗マウスM-CSFレセプター抗体を投与したときのみその特性を示した。抗体投与時のみ末梢血中にヒトM-CSFタンパクが検出されることから、これはマウス内在性の骨髄系細胞がヒトM-CSFを消費し、ヒト細胞がヒトM-CSFを受け取れないものと思われる(図4)。特性解析について、本マウスはNOG hIL-6 Tgマウスよりも優れたヒト単球・マクロファージへの分化亢進を示し、脾臓や末梢血のみならず肝臓や肺等の組織においても多数のヒトマクロファージが確認された(図5)。ヒト腫瘍株移植時には、腫瘍内へのヒトマクロファージの浸潤、ならびにTAMやMDSCのマーカの一つであるCD163を発現した細胞が腫瘍内に多数存在することが確認された。しかしながら、IL-4レセプターの発現やHLAの低発現等のその他のTAMやMDSCに特徴的な形質は確認できなかった。よって、今後は本マウスにおいて誘導される腫瘍内ヒトマクロファージについて、免疫抑制能を含む機能的特性について解析を行う必要がある。

また、NOG hTPO Tgマウスについてもヒト造血幹細胞移植時のヒト血液細胞の分化における特性解析を行ったが、特徴的な所見は見られなかった。

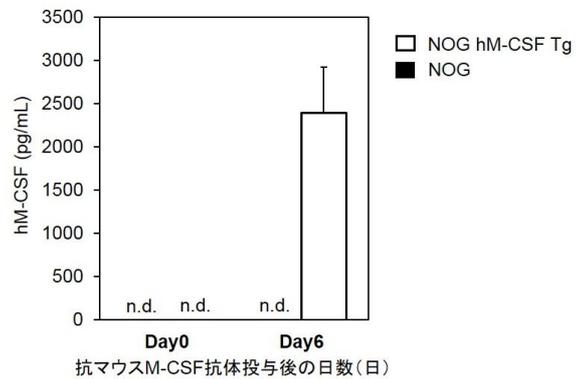
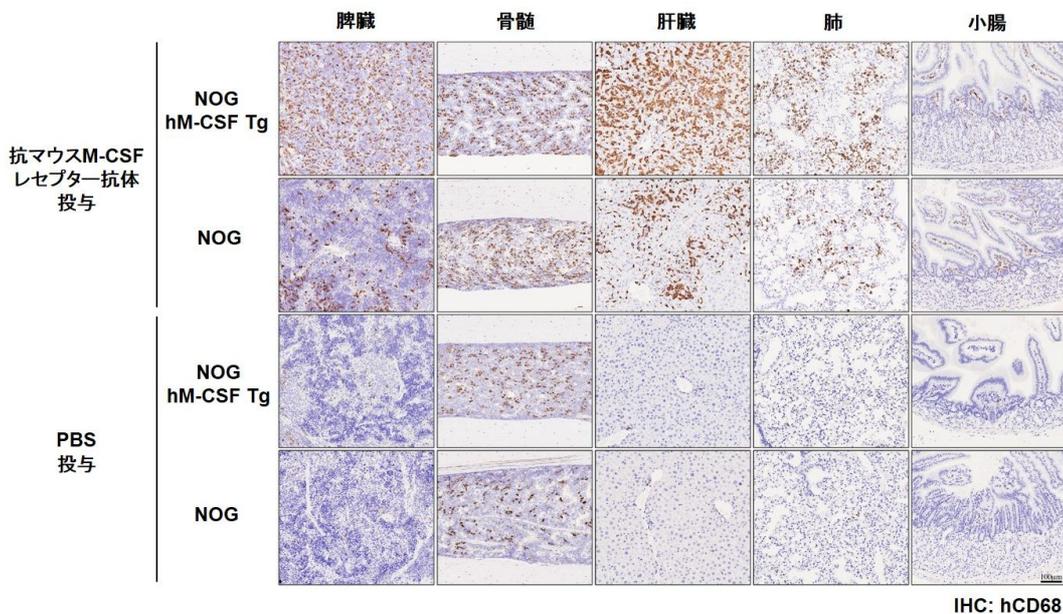


図4 末梢血におけるヒトM-CSFタンパクの濃度



IHC: hCD68

図5 各組織におけるヒトマクロファージの分布

NOG G-CSFR KOマウス、NOG CXCR2 KOマウス、NOG CCR2 KOマウスの3種類の遺伝子欠損NOGマウスを樹立した。非担がん時および担がん時のマウス骨髄系細胞数を従来のNOGマウスと比較したところ、NOG G-CSFR KOマウスにおいて全身のマウス顆粒球数が減少していること、NOG CXCR2 KOマウスにおいて腫瘍内に流入するマウス顆粒球数が減少していることを確認した。そのため、現在NOG G-CSFR KOマウスとNOG CXCR2 KOマウスの交配を進め、より腫瘍内に流入する顆粒球数が少ない動物の作製を試みている。また、NOG CCR2 KOマウスについては期待したマウス単球・マクロファージ数の減少は見られず、NOGマウスと比較した時に特徴的な特性は見られなかった。

本研究により、ヒトのTAMやMDSCの解析、あるいはこれらの細胞を標的とした新たながん治療法の前臨床試験等に有用な新規ヒト腫瘍モデル動物であるNOG hIL-6 Tgマウスが樹立された。これまで形質と機能を兼ね備えたヒトTAMを内包したモデル動物は存在せず、本モデル動物はがん免疫療法のさらなる発展に貢献するものである。弊所では既に本マウスの頒布を行っており、創薬研究を中心に国内外の多くの研究者に使用されている。

また、本研究ではがん研究に有用と考えられる複数種の新規次世代NOGマウスを作製したが、これらはNOG hIL-6 Tgマウスの持つ問題を解決し、より優れたヒト腫瘍モデルの開発に繋がるも

のである。NOG hM-CSF Tgマウス等の単球・マクロファージの誘導を促進するマウスは、NOG hIL-6 Tgマウスでは類似の形質を持つ細胞の存在は確認されたもののその免疫抑制能の確認できなかったMDSCの誘導を期待するものである。また、NOG hG-CSFR KOマウスをはじめとするマウス骨髄系細胞欠損マウスは、その影響を否定することのできないマウス内在性のTAMやMDSCを除去する為のものである。これら複数の異なる次世代NOGマウスを交配することで、より多様なヒト免疫細胞が豊富に存在し、且つマウス細胞の影響を受けずにヒト細胞の解析のみを行うことのできる腫瘍モデルの開発を目指す。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Hanazawa A, Ito R, Katano I, Kawai K, Goto M, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M, Takahashi T. Generation of human immunosuppressive myeloid Cell populations in human interleukin-6 transgenic NOG mice. *Front. Immunol.* 査読有、9巻152、2018  
DOI: 10.3389/fimmu.2018.00152.

### 〔学会発表〕(計1件)

Asami Hanazawa. NOG-human M-CSF transgenic mice enhance differentiation and maturation of human monocytes and macrophages. 第46回日本免疫学会学術集会、2017

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

[https://www.ciea.or.jp/laboratory\\_animal/next-generation/next-generation-list.html#n\\_hsk](https://www.ciea.or.jp/laboratory_animal/next-generation/next-generation-list.html#n_hsk)

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。