

令和元年6月12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：16K18405

研究課題名(和文) ヒト成熟NK細胞を長期間維持できるヒト化マウスを用いた生体内細胞傷害検証系の開発

研究課題名(英文) Development of in vivo cytotoxicity assay system using humanized mice maintaining human mature NK cells for long-term

研究代表者

片野 いくみ (Katano, Ikumi)

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：90442558

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)：ヒト血液由来成熟NK細胞を長期間生体内で維持できるNOG-IL-15 Tgマウスにヒト成熟NK細胞・ヒト腫瘍細胞・分子標的抗体薬を用いることで、生体内抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性モデルを作製した。ヒト成熟NK細胞の細胞傷害活性を向上させるためにNOG-IL-2/IL-15 Tgマウスを樹立した結果、抗腫瘍効果が向上した。

残存するマウス抗体依存性細胞貪食活性を抑制するために抗体受容体欠損型NOGマウスを樹立した。さらにNOG-FcRg KO, IL-15 Tgマウスを樹立した結果、ヒトNK細胞を介するADCC活性の検出感度の高いin vivo ADCCモデルの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する分子標的抗体の創薬研究において、抗体の機能解析は試験管内での検証系が主流である。しかし、この結果は生体での反応を必ずしも反映するものではなく、臨床研究で予期しない副作用が観察されることが多い。従って、ヒトの細胞に対する反応性を生体内で検証し得る動物モデルが求められてきた。従来のモデルでは抗体の細胞傷害機能-ADCC活性-の検証はほぼ不可能であったが、ヒトNK細胞を生着させたNOG-IL-15 Tgマウスで検証が可能となった。さらにNOG-FcRg KO, IL-15 TgマウスではADCC活性の検出感度を飛躍的に高めることができた。この動物モデルは創薬の発展に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated that a NOG-human IL-15 Tg mouse strain was useful for evaluating in vivo antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by human peripheral blood-derived NK cells in the presence of therapeutic antibody. And, We generated immunoglobulin gamma Fc region receptor (FcRg)-deficient NOG-IL-15 Tg (NOG-FcRg KO IL-15 Tg) mice and investigated whether human NK cell-derived ADCC activity could be distinguished from mouse cell-mediated antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP). The Daudi-transplanted NOG-FcRg KO IL-15 Tg mice were intravenously transferred with in vitro expanded human NK cells and treated with rituximab. Only the group with human NK cells and rituximab treatment showed significant suppression of tumor growth in the kidney, while treatment with rituximab alone had minimum influence. These data suggest that NOG-FcRg KO, IL-15 mice are more suitable for specifically detecting human NK cell mediated in vivo ADCC activity than NOG-IL-15 Tg mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：ヒト化マウス NK細胞 ヒト免疫 ADCC

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

1. 研究開始当初の背景

超免疫不全 NOD-scid, IL-2Rg KO (NOG)マウスは異種細胞の生着性が高く、ヒト免疫細胞を移植することで容易にヒト疑似免疫系の再構築が可能であることから、ヒト免疫を生体内で研究できるツール(免疫系ヒト化マウス)として有用性が認められている。しかし、ヒト T 細胞・B 細胞の分化や生着性に富んでいる一方、ヒト NK 細胞の分化・生着性は低く、NK 細胞をエフェクターとする創薬研究には不十分であった。申請者は、NOG マウスでヒト成熟 NK 細胞を効率よく分化・増幅させるために、ヒトインターロイキン(IL)-2 および IL-15 の遺伝子を NOG マウスへ導入した NOG-IL-2 トランスジェニック(Tg)および NOG-IL-15 Tg マウスを樹立した。NOG-IL-15 Tg マウスは、ヒト血液より単離した成熟 NK 細胞を移植すると、移植前のヒト NK 細胞の表現型を保持したまま増幅し、数か月間維持できることが明らかとなった。さらにこの増幅したヒト成熟 NK 細胞はNK 高感受性ミエローマ腫瘍株 K562 に対して細胞傷害活性を有することが示された。しかしながら、in vitro の検証で、ヒト血液から単離直後の成熟 NK 細胞と比較し、NOG-IL-15 Tg マウスで増幅したヒト成熟 NK 細胞では細胞傷害活性の低下が認められた。

2. 研究の目的

本研究では、NOG-IL-15 Tg マウスで得られた知見を基盤とし、ヒト成熟 NK 細胞・ヒト腫瘍細胞・分子標的抗体薬を用いることで、生体内抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性モデルの作製を試みた後、ヒト成熟 NK 細胞の維持および活性化能などを改善させた生体内細胞傷害検証系の開発を目的とする。そのために、NOG-IL-15 Tg マウスに NK 細胞の活性化に必要とされるヒト遺伝子の導入やマウス遺伝子の欠損を組み込み新しい複合型遺伝子改変マウスを樹立し、特性解析を行う、動物モデルに用いる NK 細胞・がん細胞および分子標的抗体薬の組み合わせなどについて検証を行う、で有用と考えられた各試料を で樹立した新しい遺伝子改変マウスに用い、細胞傷害機構の一つである抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を生体内で検証し得る動物モデルを作製する。

3. 研究の方法

(1) NOG-IL-15 Tg マウスを用いた ADCC モデルの作製

磁気細胞分離システム(MACS)を用いて健常人の血液より単離した CD56⁺成熟 NK 細胞 1-2x10⁶ 個を NOG-IL-15 Tg マウスに尾静脈経由で移植した。さらに、ヒト腫瘍株 L428(CCR4⁺)を皮下移植した後、抗 CCR4⁺抗体ポテリジオを®を腹腔内へ投与した。継時的に L426 の腫瘍サイズを測定することで腫瘍抑制能を評価した。

(2) NOG-IL-2/IL-15 Tg マウスの樹立:

既存の NOG-IL-15 Tg マウスと NOG-IL-2 Tg マウスを自然交配し、NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウス を作製した。交配して得られた産子のゲノムを用いて遺伝子解析を行った後、マウス血漿中のヒト IL-2 および IL-15 タンパク質濃度を ELISA 法で測定し、NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウスを同定した。

(3) ヒト成熟 NK 細胞移植実験

MACS システムを用い、健常人の血液より CD56⁺成熟 NK 細胞を単離した。単離したヒト NK 細胞 1-2x10⁶ 個を遺伝子改変マウスに尾静脈経由で移植した後、マウス血液および組織中のヒト NK 細胞の生着率をフローサイトメトリーで測定した。さらに、マウスで増幅したヒト NK 細胞の性質を検証するために、細胞表面抗原の発現強度や細胞傷害顆粒やサイトカインの産生能などをフローサイトメトリーおよび ELISA 法を用いて解析した。

(4) ヒト腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性の検証

ヒト成熟 NK 細胞を移植した NOG-IL-2/IL-15 Tg マウスの脾臓よりヒト NK 細胞を単離した。ヒトサイトカイン存在下で 2 日間培養した後、NK 高感受性ヒトミエローマ細胞株 K562 と 4 時間共培養した。培養上清と市販の細胞傷害活性測定試薬を用い、細胞傷害活性強度を測定した。また、ヒト成熟 NK 細胞を移植した NOG-IL-2/IL-15 Tg マウスの皮下に K562 を移植し、継時的に腫瘍サイズを測定することで生体内での腫瘍抑制能を評価した。

(5) 新規遺伝子改変 NOG - FcRg KO, IL-15 Tg マウスの作製

FcRg 遺伝子を部分欠損させた NOG-FcRg KO マウスを作製した。既存の NOD-FcRg KO マウスと NOG を交配して NOG-FcRg KO マウスを樹立した。さらに NOG-IL-15 Tg マウスと

交配することで、NOG-FcRg KO, IL-15 Tg マウスを樹立した。これらの新規系統に関して、FcRg 分子の発現、抗体(IgG)結合能、抗体依存性細胞貪食(ADCP)活性、ヒト IL-15 産生量などの特性検査を行った。

(6) ヒト成熟 NK 細胞の拡大培養

細胞分離試薬 Lymphoprep®を用いヒト血液から末梢血単核球分画(PBMC)を単離した。PBMC にヒト NK 細胞拡大培養試薬 BIN-KIT®を用い、約 2 週間拡大培養した。MACS を用い、拡大培養した細胞からヒト CD3⁺T 細胞を除去することで、増幅ヒト NK 細胞を精製した。

(7) NOG - FcRg KO, IL-15 Tg マウスを用いた ADCC モデルの作製

NOG - FcRg KO, IL-15 Tg マウスに、ヒト腫瘍株 Daudi (CD20⁺)を尾静脈より移植し、1-3 日後に増幅ヒト NK 細胞を尾静脈経由で移植した後に抗 CD20 抗体リツキサン®を腹腔内へ継時的に投与した。Daudi 移植後約 4 週目に、マウス腎臓の重量を測定することで、ADCC 活性を評価した。

4. 研究成果

(1) NOG-IL-15 Tg マウスを用いた in vivo ADCC モデルの作製

血液由来ヒト NK 細胞を長期間維持できる NOG-IL-15 Tg マウスの特性を生かし、ヒト NK 細胞を介した分子標的抗体の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性をマウス生体内で測定し得る in vivo ADCC モデルの作製を試みた。

NOG-IL-15 Tg マウスに、in vitro で増幅したヒト NK 細胞、CCR4 発現ヒト腫瘍株 L428、および分子標的抗体抗 CCR4 抗体ボテリジオ®を組合せた in vivo ADCC モデルを作製した。結果、NK 細胞移植+抗 CCR4 抗体投与群で、微弱ながら ADCC 活性が認められた (図 1)。

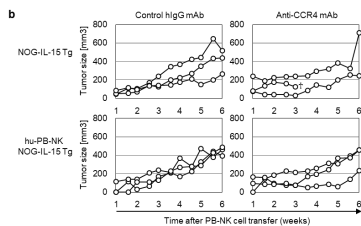


図 1 ヒト NK 細胞移植 NOG-IL-15 Tg マウスを用いた in vivo ADCC モデル

(2) NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウスを用いた生体内ヒト細胞傷害試験系の検証

NOG-IL-15 Tg マウスに IL-2 を添加することで、移植したヒト成熟 NK 細胞の細胞傷害活性が上昇するか検証するために NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウスを樹立した。ヒト成熟 NK 細胞を移植した NOG-IL-2/IL-15 Tg マウスに K562 を皮下移植し、腫瘍の成長度合いにより in vivo での腫瘍抑制効果を評価した。NOG-IL-15 Tg マウスと比較し、NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウスで細胞傷害活性の上昇が認められたが (図 2a)、これはヒト NK 細胞の増加に起因するものと考えられた (図 2b)。また、NOG-IL-15 Tg マウスと NOG-IL-2/IL-15 Tg マウスで増幅したヒト NK 細胞の性質を検証するべく、細胞傷害顆粒やサイトカイン IFN-g 産生能、細胞表面分子の発現を確認したが、2 者間で差は認められなかった。

この検証で、移植 NK 細胞の中に極微量のヒト T 細胞が混入すると、IL-2 存在下で爆発的に増幅し実験結果に著しく影響を及ぼす。従って、ヒト T 細胞増幅防止のため医療用抗体抗 CD52 抗体マブキャンパス®の単回投与を組合せ、NOG-IL-15 Tg マウスと NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウスとの比較実験を行った。この結果、本実験系においては、ヒト IL-2 はヒト NK 細胞の活性化レベルに大きく影響しなかった。

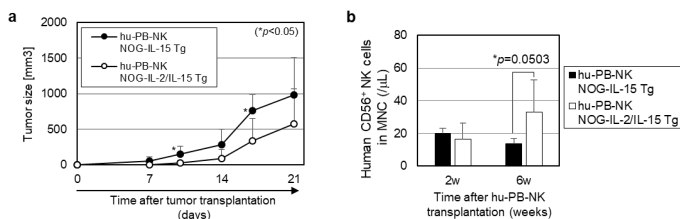


図 2 NOG-IL-2/IL-15 double Tg マウスの細胞傷害活性の検証
a. K562 に対する細胞傷害活性
b. 血液中のヒト NK 細胞数

(3) 新規遺伝子改変マウス作製の予備検討

ヒト NK 細胞の細胞傷害活性化を向上させられるか、ヒト NK 細胞活性化因子の一つである IL-12 および IL-18 の有用性を検討するため、ヒト NK 細胞を移植した NOG-IL-15 Tg マウスに IL-12/IL-18 を継時的に投与したが、ヒト NK 細胞の増幅能にはほぼ影響が認められなかった。さらに、ヒト腫瘍株 K562 を皮下移植して抗腫瘍活性への影響を検討したが、変化は認められなかった。

(4) 新規遺伝子改変 NOG-FcRg KO マウスの樹立

NOG-hIL-15 Tg マウスを用いた検証実験において、NOG マウスに残存する貪食細胞 (単球/マクロファージなど) は抗体依存性細胞貪食 (ADCP) 活性を保持しており、in vivo ADCC モデルのヒト NK 細胞を介した ADCC 反応の検出感度の低下に関与している可能性が示唆された。従って、マウス ADCP 活性を欠失させるために、マウス抗体受容体 FcRg を欠損させた NOG-FcRg KO

マウスを樹立した。特性解析により、NOG-FcRg KO マウスで FcRg 分子の発現消失 (図 3a)、および FcRg 消失に伴う任意の IgG 抗体の結合能の欠失を確認した (図 3b)。また、NOG-FcRg KO マウスにヒトがん細胞と分子標的抗体を用い、ADCP 活性が欠損しているか確認した。NOG-FcRg KO マウスに Her2⁺4-1ST 胃がん株を皮下移植した後、抗 Her2 抗体ハーセプチンを投与し、腫瘍の成長速度を測定した結果、NOG-FcRg KO マウスでは投与抗体による腫瘍の成長阻害は認められなかったことから、ADCP 活性を欠失していることが示された (図 3c)。

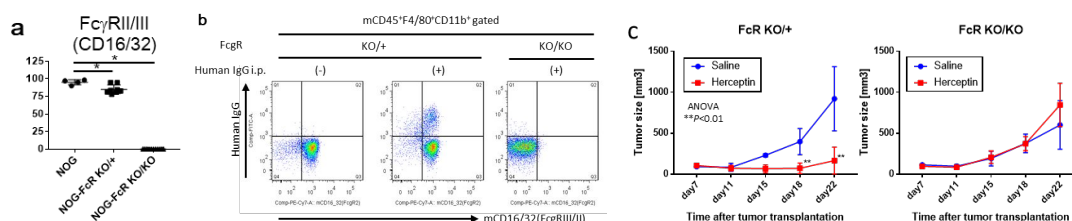


図 3 NOG-FcRg KO マウスの特性解析

- 末梢血単核球中の FcγR 発現細胞の割合
- ヒト IgG 抗体の結合能
- マウス貪食細胞に依る ADCC 活性

(5) 新規遺伝子改変 NOG-FcRg KO-IL-15 Tg マウスを用いた in vivo ADCC モデル

NOG-FcRg KO マウスと NOG-IL-15 Tg マウスを交配し、NOG-FcRg KO, IL-15 Tg マウスを樹立した。これらの系統で、ヒト IL-15 の産生量 (図 4a)、および、増幅ヒト NK 細胞の生着性に違いは認められなかった (図 4b)。さらに、増幅ヒト NK 細胞・ヒトがん細胞・分子標的抗体を用いて in vivo ADCC モデルの作出を試みた。ヒトがん細胞として臓器生着性を特徴とする CD20⁺Daudi 細胞を用い、Daudi 尾を静脈より移植した後、増幅ヒト NK 細胞の単回移植および抗 CD20 抗体リツキサン®の継時的に投与を行い、約 4 週後、腎臓重量を測定することで検証した。結果、新規系統 NOG-FcRg KO, IL-15 Tg マウスにヒト NK 細胞およびリツキサン投与を施した個体で腎臓肥大化の抑制効果が認められ、ヒト NK 細胞を介した分子標的抗体の ADCC 反応の検出感度が向上したことが確認できた (図 4c)。

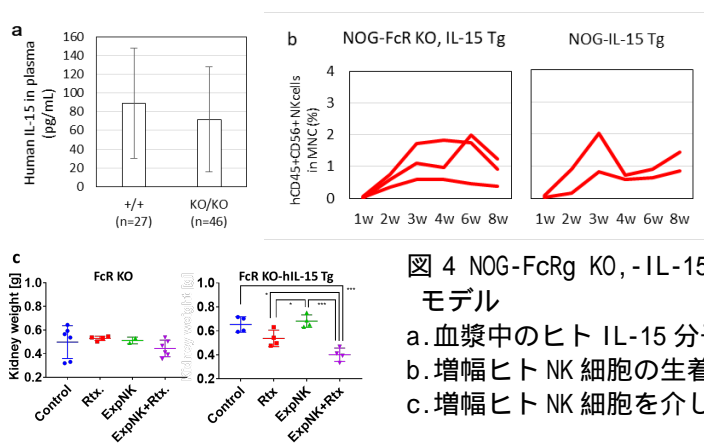


図 4 NOG-FcRg KO, -IL-15 Tg マウスを用いた in vivo ADCC モデル

- 血漿中のヒト IL-15 分子の発現量
- 増幅ヒト NK 細胞の生着性
- 増幅ヒト NK 細胞を介した ADCC 活性

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- Human PBMC-transferred murine MHC class I/II-deficient NOG mice enable long-term evaluation of human immune responses. Yaguchi T, Kobayashi A, Inozume T, Morii K, Nagumo H, Nishio H, Iwata T, Ka Y, Katano I, Ito R, Ito M, Kawakami Y. *Cell Mol Immunol*. 2018 Nov;15(11):953-962. doi: 10.1038/cmi.2017.106. Epub 2017 Nov 20.
- A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Hanazawa A, Takahashi T, Ogura T, Goto M, Takahashi R, Toyoshima S, Okayama Y, Izuhara K, Gon Y, Hashimoto S, Ito M, Nunomura S. *JCI Insight*. 2018 Nov 2;3(21). pii: 121580. doi: 10.1172/jci.insight.121580.

3. Generation of Human Immunosuppressive Myeloid Cell Populations in Human Interleukin-6 Transgenic NOG Mice. Hanazawa A, Ito R, Katano I, Kawai K, Goto M, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M, Takahashi T. *Front Immunol.* 2018 Feb 2;9:152. doi: 10.3389/fimmu.2018.00152. eCollection 2018.
4. Enhanced Antibody Responses in a Novel NOG Transgenic Mouse with Restored Lymph Node Organogenesis. Takahashi T, Katano I, Ito R, Goto M, Abe H, Mizuno S, Kawai K, Sugiyama F, Ito M. *Front Immunol.* 2018 Jan 17;8:2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.02017. eCollection 2017.
5. Long-term maintenance of peripheral blood derived human NK cells in a novel human IL-15- transgenic NOG mouse. Katano I, Nishime C, Ito R, Kamisako T, Mizusawa T, Ka Y, Ogura T, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M, Takahashi T. *Sci Rep.* 2017 Dec 8;7(1):17230. doi: 10.1038/s41598-017-17442-7.
6. A novel in vivo model for predicting myelotoxicity of chemotherapeutic agents using IL-3/GM-CSF transgenic humanized mice. Ito R, Nagai D, Igo N, Okuda Y, Sekine K, Ichimura E, Katano I, Mizushima T, Goto M, Ohnishi Y, Ito M, Okamoto K. *Toxicol Lett.* 2017 Nov 5;281:152-157. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.09.013. Epub 2017 Sep 22.
7. NOG-hIL-4-Tg, a new humanized mouse model for producing tumor antigen-specific IgG antibody by peptide vaccination. Kametani Y, Katano I, Miyamoto A, Kikuchi Y, Ito R, Muguruma Y, Tsuda B, Habu S, Tokuda Y, Ando K, Ito M. *PLoS One.* 2017 Jun 15;12(6):e0179239. doi: 10.1371/journal.pone.0179239. eCollection 2017.
8. A Novel Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease Model for Investigating the Pathological Role of Human CD4, or CD8, T Cells Using Immunodeficient NOG Mice. Ito R, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Takahashi T, Ka Y, Ogura T, Takahashi R, Ito M. *Am J Transplant.* 2017 May;17(5):1216-1228. doi: 10.1111/ajt.14116. Epub 2016 Dec 21.
9. Antitumor Effect of Programmed Death-1 (PD-1) Blockade in Humanized the NOG-MHC Double Knockout Mouse. Ashizawa T, Iizuka A, Nonomura C, Kondou R, Maeda C, Miyata H, Sugino T, Mitsuya K, Hayashi N, Nakasu Y, Maruyama K, Yamaguchi K, Katano I, Ito M, Akiyama Y. *Clin Cancer Res.* 2017 Jan 1;23(1):149-158. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0122. Epub 2016 Jul 25.
10. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. *Cell Stem Cell.* 2016 Jul 7;19(1):127-38. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.003. Epub 2016 Jun 30.

〔学会発表〕(計2件)

1. Ikumi Katano, Iyo Ootsuka, Ryoji Ito, Kenji Kawai, Mika Yagoto, Hiroshi Suemizu, Mamoru Ito, Taichi Yamamoto, Takeshi Takahashi、NOG-FcγR KO-hIL-15 Tg mice provide a highly sensitive assay system for ADCC activity of human NK cells、AACR Annual Meeting 2019 (国際学会) 2019年3月29日-4月3日、Atlanta (USA)
2. Ikumi Katano, Asami Hanazawa, Ryoji Ito, Mamoru Ito, Takeshi Takahashi、Specific detection of human NK cell mediated in vivo ADCC in FcγR-deficient NOG-human IL-15 transgenic mice、第47回 日本免疫学会学術集会、2018年12月10日-12日、福岡国際会議場(福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：免疫不全マウス

発明者：高橋武司、片野いくみ

権利者：高橋武司、片野いくみ

種類：特許願

番号：特願 2018-217229

出願年：2018年

国内外の別：国内・国外

名称：ヒト IL-15 分泌免疫不全マウス

発明者：伊藤守、片野いくみ
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2016/002112
出願年：2016年
国内外の別：国内・国外

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

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし