

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02368

研究課題名(和文) 自然免疫系制御による高度免疫不全マウスの開発

研究課題名(英文) Development of highly immunodeficient mice by regulating innate immune systems

研究代表者

高橋 武司 (Takahashi, Takeshi)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物基礎研究部・部長

研究者番号：80335215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：重度免疫不全NOGマウスではヒト細胞の生着が可能であるが、すべての細胞が生着するわけではない。例えばヒトの赤血球などは迅速に排除される。これらの細胞の生着性を阻む要因としてマウス自然免疫系の関与が考えられる。この分子機構を解明するためにマウス補体C3を欠損するマウス、またマウスFcRを欠損するマウスを開発し、ヒト細胞の生着性について検討した。C3KOマウスではヒト赤血球の移入後の生存がNOGマウスと比べて延長し、特にGdCl<sub>3</sub>などを併用すると1か月近くにわたり血液中に検出された。FcRKOマウスではヒト細胞の全般的な生着の改善が認められ、また抗体医薬品の検定に有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマウス内在性の免疫系によるヒト細胞の認識機構を明らかにするため、マウスC3とFcRを欠損するマウスを作製した。NOG-C3KOマウスではヒト赤血球の生着が容易になり、将来のマラリア感染研究に役立つものと考えられる。NOG-FcRKOマウスではヒト細胞の生着が向上するとともに、さまざまな抗体治療薬の生体内での活性検定が容易になり、新薬開発に有用なモデルが樹立できた。

研究成果の概要(英文)：A severe immunodeficient NOG mouse allow the engraftment of human living cells or tissues due to the lack of endogenous immune systems. Nevertheless, all the human cells(e.g. RBC)are not engrafted. A reason is considered rejection by mouse innate immune systems. To elucidate the mechanisms and to increase the degree of immunodeficiency, we established NOG-C3KO and NOG-FcRKO mice. In NOG-C3KO, the extension of the survival of transfused human RBC was detected. Accompanied with GdCl<sub>3</sub>, they persisted for nearly one month. In NOG-FcRKO mice, overall engraftment of human cells was enhanced compared to NOG mice. In addition, they lack the antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by mouse innate cells. This enabled the specific detection of biological activities by therapeutic antibodies.

研究分野：免疫学

キーワード：immunodeficient mice innate immunity RBC FcR antibody ADCC tumor immunology immunochekpoint

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウスにヒトの生きた細胞・組織を生着させたヒト化マウスの利用は技術的進展に伴い拡大しつつある。重度免疫不全 NOG マウスは scid 変異および IL-2R $\beta$  鎖の遺伝的欠損によりマウス獲得免疫系に関わる細胞の分化発生が著しく阻害され、重篤な免疫不全状態にある。そのため異種であるヒト細胞の生着が可能である。例えばヒト造血幹細胞からヒト血球の発生分化は効率が良く、ヒト造血幹細胞を移植すると、移植後 8 - 12 週程度でヒトのリンパ球である B 細胞、T 細胞の発生が確認できる。しかし、全ての細胞が生着するわけではなく、生着が困難な細胞系譜も存在する。これらの細胞の生着性を左右する要素としてマウス自然免疫系が関与すると考えられた。研究開始当初、その一例としてマウスマクロファージによるヒト赤血球(RBC)の排除にマウス補体成分 C3 が関与することを見出していた。またマウス自然免疫受容体のアダプター分子として機能する FcR $\gamma$  を欠損する NOG マウスではヒト細胞の造血効率が NOG マウスに比べて有意に改善することを見出していた。そこで、マウス自然免疫系による異種細胞認識機構を理解することがヒト化マウス作製の効率を上げるために重要であると考え、その分子メカニズムの解明を課題とした。

### 2. 研究の目的

本申請では NOG マウスに残存する自然免疫系の機能を低下させることにより、NOG マウスを上回る重度免疫不全マウスを作出する。従来 NOG マウスをもってしても生着が困難であるような種類のヒト細胞の生着を可能とすることを目指した。特に NOG-C3 欠損(KO)マウスにヒト RBC を移入した際の生存性について解析するとともに、ヒト RBC を認識するマウス自然免疫の分子メカニズムを研究すること、NOG-FcR $\gamma$  におけるヒト細胞の生着性の改善のメカニズムとそのヒト化マウスの応用について研究することを目的とした。

### 3. 研究の方法

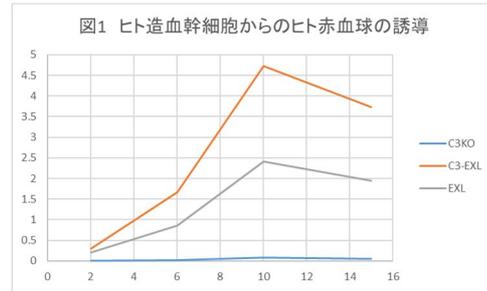
- i) NOG-C3 KO マウスに正常ヒト赤血球を移植し、経時的にマウス血液内のヒト RBC の存在をフローサイトメータによって検討した。
  - ii) マウスマクロファージを除去する、あるいはその活性を抑制するためにクロドロン酸もしくは塩化ガドリニウムを投与した NOG-C3 KO マウスにヒト RBC を移植した。
  - iii) 塩化ガドリニウムを投与した NOG-C3 KO マウスにヒト RBC を 1 週間に 1 度、3 週間にわたって投与し、ヒト RBC の蓄積について検討した。
  - iv) ヒト造血幹細胞由来のヒト RBC の発生について検討した。
  - v) 各種マウス自然免疫受容体と抗体定常領域 (Fc) の融合タンパク質を作製し、ヒト RBC に結合するマウス受容体のスクリーニングを行った。
- 
- i) NOG-FcR KO マウスにヒト末梢血単核球 (PBMC) を移植し、その生着性を検討した。
  - ii) NOG-FcR KO マウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒト細胞の発生分化について検討した。
  - iii) NOG-FcR KO マウスにヒト腫瘍株を移植し抗 Her-2(Trastuzumab)や抗 CD20 抗体 (Rituximab) を投与し、腫瘍の増殖に与える影響を NOG マウスと比較した。
  - iv) NOG-FcR KO /hIL-15Tg マウスにヒト NK 細胞を移植し、ヒト腫瘍株を移植後抗体治療薬を投与し抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) を検討した。
  - v) NOG-FcR KO マウスにヒト造血幹細胞を移植し、ヒト細胞の発生を確認後、ヒト腫瘍株を移植し抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) を投与し、腫瘍の成長への影響を検討した。

### 4. 研究成果

- i) NOG-C3 KO および NOG マウスに  $5 \times 10^9$  の正常人ヒト RBC を移植し、経時的に血中でのヒト RBC の割合をフローサイトメータにより解析した結果、NOG マウスではヒト RBC は 4 日以内に速やかに消失する (半減期 1.5 日) のに対して、NOG-C3KO マウスではヒト RBC は移植後 7 日でも検出可能 (半減期 4 日) で、有意にヒト RBC の生存が延長した。
- ii) マウスマクロファージを除去するために NOG-C3 KO および NOG マウスに 4 日おきに 4 回クロドロン酸を投与し、最終投与の翌日にヒト RBC を移植した。NOG マウスでは半減期が 1.5 日から 2.5 日に延長した。NOG-C3KO マウスでは半減期が 4 日から 12 日に大幅に延長し、移植 20 日においても末梢血にヒト細胞の存在が検出可能であった。
- iii) クロドロン酸投与はマウスに対して毒性が強く、実験中のマウス個体の死亡が頻発することからより毒性の低い薬剤として塩化ガドリニウムを使用した。塩化ガドリニウムはクロドロン酸と異なり、マウスマクロファージを除去することはなかった。塩化ガドリニウム (30mg/kg) を 4 日おきに 4 回、前投与後にヒト RBC を移植した。NOG マウスでは半減期が

1.5日から4日に延長した。NOG-C3KO マウスでは半減期が4日から8日に延長し、移植15日においても末梢血にヒト細胞の存在が検出可能であった。

iv) NOG, NOG-C3KO マウスにヒト造血幹細胞移植し、8週間後に末梢血中でのヒト赤血球の存在を調べたが検出できなかった。クロドロン酸を投与してマウスマクロファージを除去したところ、4日おきに3回クロドロン酸を投与した時点でNOG-C3KO マウスで0.01%程度のヒト RBC が検出可能となった。ヒト造血機能を亢進させるためにヒト GM-CSF と IL-3 を発現する NOG-GM-CSF/IL-3 (EXL)Tg マウスと交配した NOG-C3 KO/EXL マウスで同様の実験を行った結果、3回のクロドロン酸投与後、末梢血中に4.7%のヒト RBC が検出され、一方 NOG-EXL では2.4%であった(図1)。



v) NOG-C3 KO マウスの実験結果からヒト RBC 排除にはマウス C3 の関与することを明らかにした。他方クロドロン酸の実験からマクロファージが C3 とは独立した分子機構でヒト RBC を認識排除できることが強く示唆された。鉄染色と免疫組織化学染色による検討で、ヒト RBC を大量に貪食しているマクロファージは肝臓に存在するクッパー細胞であることを確認したので、クッパー細胞に高発現している自然免疫受容体を Fc 融合タンパク質として20種類作製した。これらの融合タンパク質とヒト RBC の結合をフローサイトメーターで検討したところ、分子(X)がヒト RBC に特異的に結合できることを見出した(図2)。

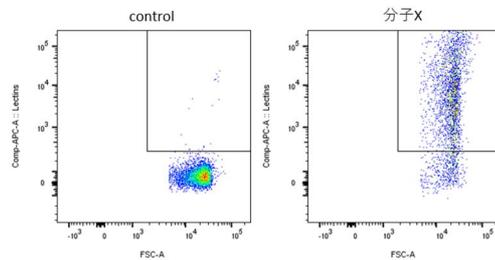


図2 分子XのヒトRBCへの結合

以上の結果から、マウス自然免疫系はヒト RBC を C3 とマクロファージにより認識している(現在、論文リバイス中)。またマクロファージは分子(X)などを通してヒト RBC を認識している可能性が示唆され、現在解析中である。

i) NOG-FcR KO マウスにヒト PBMC を移植したところヒト T 細胞の生着が有意に亢進した。

ii) NOG-FcR KO マウスにヒト造血幹細胞を移植したところ、ヒト細胞の生着性の向上を確認した。

iii) NOG マウスにヒト腫瘍株(Her2 陽性の胃がん株 4-1<sup>ST</sup>, CD20 陽性のホジキンリンパ腫由来株 Daudi)を移植し、Trastuzumab あるいは Rituximab を投与すると、これらの腫瘍の生着性、成長が著しく阻害された。一方 NOG-FcR KO マウスにおいてはこれらの抗体投与は腫瘍成長に影響を与えなかった。マウス自然免疫細胞による抗体依存性細胞傷害活性が強く抑制された。また上述の C3 KO マウスとの交配で得られた NOG-FcR/C3 DKO マウスではマウス細胞による抗体依存性細胞傷害活性はほぼ完全に消失することを確認した。

iv) ヒト NK 細胞による抗体依存性細胞傷害活性を検出するために NOG-FcR KO/hIL-15Tg マウスを交配により作出した。このマウスではヒト IL-15 の効果によりヒト NK 細胞の生着性が NOG マウスに比べて有意に高い。このマウスに Daudi 細胞を移植し、更にヒト NK 細胞を移植し、Rituximab を投与した。NOG-hIL-15Tg マウスではマウス自然免疫系細胞の影響でヒト NK 細胞の有無にかかわらず抗体投与により腫瘍の成長は阻害された。一方 NOG-FcR KO/IL-15Tg マウスを用いた実験ではヒト NK 細胞と抗体を投与した実験群でのみ腫瘍の成長阻害が確認された (Katano, Frontier Immunol, 2020) (図3)。

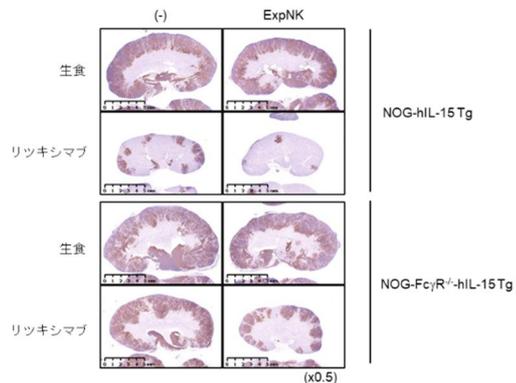


図3 NOG-FcRKO/IL-15Tgにおける特異的ADCCの誘導と検出

v) 抗体医薬品として免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体(Nivolumab)の効果 NOG マウスと NOG-FcR KO マウスで検討した。ヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫系を再構築したヒト化マウスに、4種類の固形がん細胞株(頭頸部がん x1、肺腺がん x2、大腸がん x1)を移植し、Nivolumab を投与した。NOG マウスでは Nivolumab 投与に関わらず、腫瘍の成長は影響を受けず、また腫瘍内へのヒト T 細胞の浸潤も限定的であった。一方、NOG-FcR KO マウスでは大腸がん株を除く3腫瘍株で Nivolumab による腫瘍の退縮、拒絶効果が確認され、これらの腫瘍内にはヒ

ト T 細胞の浸潤も限定的であった。

ト T 細胞の強い浸潤が誘導された ( 図 4 )。大腸がん株では脾臓内で T 細胞の活性化は誘導されていたが、腫瘍内への浸潤は誘導されなかった。

以上の結果から、NOG-FcR KO マウスでは NOG マウスと比較してヒト血球細胞の生着性が向上していることが明らかになった。また、マウス内因性の自然免疫細胞による抗体傷害活性が消失することから、抗体医薬品の能力検定に適したモデル動物であることを明らかにした。更に免疫チェックポイント阻害剤の効果検定、抗 PD-1 抗体との併用剤の開発・活性検定などへの応用が可能であることが示唆された ( 論文投稿中 )。

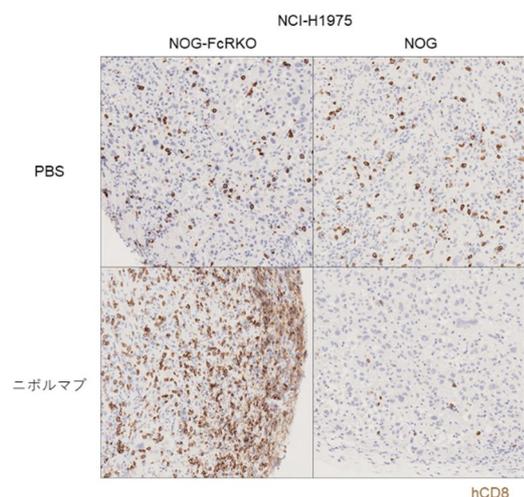


図4 NOG-FcRにおける抗PD-1抗体による腫瘍内へのT細胞浸潤

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito R, Maruoka S, Gon Y, Katano I, Takahashi T, Ito M, Izuhara K, Nunomura S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Recent Advances in Allergy Research Using Humanized Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112740.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito R, Katano I, Otsuka I, Hanazawa A, Takahashi T, Kawai K, Yagoto M, Goto M, Ogura T, Takahashi R, Ito M	4. 巻 516
2. 論文標題 Exacerbation of pathogenic Th17-cell-mediated cutaneous graft-versus-host-disease in human IL-1 and IL-23 transgenic humanized mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 480-485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katano I, Ito R, Kawai K, Takahashi T	4. 巻 11
2. 論文標題 Improved Detection of in vivo Human NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Using a Novel NOG-Fc R-Deficient Human IL-15 Transgenic Mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol .	6. 最初と最後の頁 532684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.532684	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murai K, Hikita H, Kai Y, Kondo Y, Fukuoka M, Fukutomi K, Doi A, Yamai T, Nakabori T, Fukuda R, Takahashi T, Miyakawa K, Suemizu H, Ryo A, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T.	4. 巻 941
2. 論文標題 Hepatitis C virus infection suppresses hepatitis B virus replication via the RIG-I-like helicase pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57603-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, Suemizu H, Ito M, Simons PJ	4. 巻 33
2. 論文標題 Bovine $\gamma$ -lactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM-CSF transgenic mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori A, Murata S, Tashiro N, Tadokoro T, Okamoto S, Otsuka R, Wada H, Murata T, Takahashi T, Seino KI, Taniguchi H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Establishment of Human Leukocyte Antigen-Mismatched Immune Responses after Transplantation of Human Liver Bud in Humanized Mouse Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020476.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ito R, Katano I, Takahashi T, Goto M, Takahashi R, Ito M
2. 発表標題 Development of human neutrophils in hG-CSF knockin NOG mouse transferred with human HSC
3. 学会等名 103rd American Association of Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片野いくみ 花澤麻美 大塚伊代 伊藤亮治 位高美香 川井健司 高橋武司
2. 発表標題 抗体受容体欠損型NOG-FcR $\gamma$ マウスを用いた抗PD-1抗体の機能評価モデル
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, Ito M, and Simons PJ
2. 発表標題 Beta-lactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/GM-CSF Tg mice
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片野いくみ、花澤麻美、伊藤亮治、伊藤守、高橋武司
2. 発表標題 Specific detection of human NK cell mediated in vivo ADCC in FcgR-deficient NOG-human IL-15 transgenic mice
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋武司
2. 発表標題 Modification of human hematopoiesis in novel NOG strain
3. 学会等名 International Symposium of Humanized mouse models (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikumi Katano*, Asami Hanazawa, Ryoji Ito, Mamoru Ito, Takeshi Takahashi
2. 発表標題 Specific detection of human NK cell mediated in vivo ADCC in FcgR-deficient NOG-human IL-15 transgenic mice
3. 学会等名 AACR
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋武司
2. 発表標題 免疫系ヒト化マウスを用いた抗体医薬品評価
3. 学会等名 第27回HAB研究機構学術年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 免疫不全マウス	発明者 高橋武司	権利者 公益財団法人実 験動物中央研究 所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-181930	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 免疫不全マウス	発明者 高橋武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/037675	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 免疫不全マウス	発明者 高橋武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、17/251, 272	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 免疫不全マウス	発明者 高橋武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、19866903.8	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 免疫不全マウス	発明者 高橋武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、201980005541.4	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 免疫不全マウス	発明者 高橋武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、10-2021-7010969	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	玉井 恵一  (Tamai Keiichi)  (40509262)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長    (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関