

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590484

研究課題名（和文） ヒト型免疫 NOG マウスによるヒト免疫反応の解析

研究課題名（英文） The analysis of immune responses in humanized NOG mice

研究代表者 高橋 武司 (TAKAHASHI TAKESHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80335215

研究成果の概要（和文）：

超免疫不全 NOG マウスに再構築された疑似ヒト免疫系の B,T リンパ球の免疫学的特性を解析した。成熟した B 細胞は試験管内で抗原+サイトカイン刺激に対して抗体産生、クラススイッチ反応を示した。末梢 T 細胞は試験管内での抗原刺激に対して増殖反応を示さず、IL-2 の産生も認められなかった。この T 細胞の異常はナイーブ T 細胞の減少とメモリー様 T 細胞の増加と関連し、ヒト HLA-DR の発現によっては回復しなかった。

研究成果の概要（英文）：

The immunological features of the human B and T lymphocytes were analyzed, which are reconstituted in super-immunodeficient NOG mice. The mature IgD+ B cells produced IgG in response to antigen and cytokine stimulation in vitro. The T cells in the periphery in the humanized NOG mice could neither proliferate nor produce IL-2 in response to antigenic stimulation. The problem is associated with the reduction of the frequency of naïve T cells and the increase of that of effector/memory T cells. The transgenic expression of HLA-DR in NOG mice did not rescue the T cell function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球

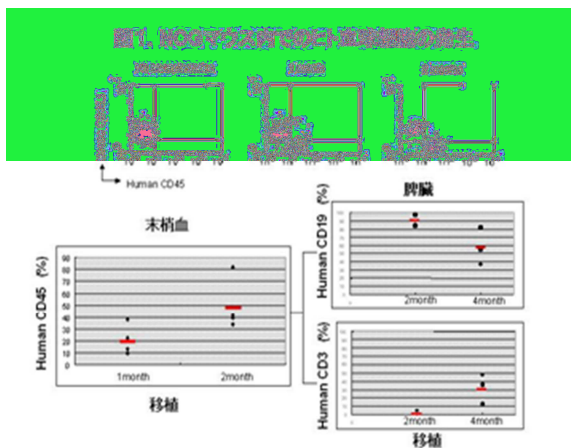
## 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的にヒト免疫系の研究を推進しようとする機運が高まりつつある。ヒト免疫研究の倫理的制約を回避し、特に機能的な解析を可能化する手段が求められている。そのためヒト免疫系をマウス内で再構築したヒト化マウスは今後のヒト免疫研究の進展

を促す中核技術となると考えられている。このため世界的にもさまざまな試みがなされ一流雑誌への掲載数も増加しつつある。当研究室では世界に先駆けて IL-2R $\gamma$ 鎖( $\gamma$ c)をクローニングし、またその遺伝子欠損マウス(KO マウス)を作製した。IL-2R $\gamma$ 鎖は各種サイトカイン受容体に共通のコンポーネント

であるため、この $\gamma$ c KO マウスでは骨髄由来の細胞の発生に必要なサイトカインシグナルが伝達されず、血球系の発生分化が著しく低下しており、機能的なNK細胞、DCの発生も障害されている。興味深いことにこのマウスの遺伝的背景を自己免疫性糖尿病自然発症マウスであるNODマウスに置き換え、更にB、T細胞を欠くScid変異を導入したマウス系統NOD/Scid/ $\gamma$ c-KOマウス(NOGマウス)では、マウスの免疫系細胞がほぼ完全に欠損した超免疫不全状態にあることが明らかになった。実際、NOGマウスにヒト由来の細胞を移植すると異種間免疫反応が起こらず移植された細胞が拒絶されることなく長期間生着が可能であり、また更にNOGマウスにヒトの血液幹細胞を移植すると長期にわたりヒトの疑似免疫系がマウス内で発生する(図1)。このためNOGマウスは現時点で最も優れたヒト化マウス作製のための技術的基盤であるといえる。

特に獲得免疫系の主役となるB、T細胞の分化が認められることは従来のマウスでは不可能であった点で画期的である。しかしながら、その免疫学的な特性は十分に研究されておらず、また、外来抗原による免疫応答は抗原特異的IgMは産生されるもののIgGが産生されず、T細胞依存性の免疫反応に異常があることが示唆されていた。本研究ではヒト化NOGマウスの免疫学的解析と抗原特異的免疫応答の惹起を目的とした。



## 2. 研究の目的

ヒト化NOGマウス内に発生するヒト免疫細胞が機能的免疫反応を惹起できない理由を明らかにし、その改善策を検討し、ヒト化マウス内で機能的ヒト免疫反応を惹起することが本研究の主たる課題である。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト化NOGマウス内に発生分化したヒトB、T細胞の細胞表面抗原の発現様式を詳細に解析し、その分化について解析した。

(2)ヒト化NOGマウス内に発生分化したヒトB、T細胞を試験管内で様々な抗原、あるいはサイトカインにより刺激し、その免疫応答を解析した。

(3)マウスとヒトのMHC間のミスマッチを解消するためにI-A欠損NOGマウスを作製し、ヒト化しその免疫応答を解析した。また、ヒトHLA-DRを発現するNOGマウスあるいはNOG I-AKOマウスを作製した。

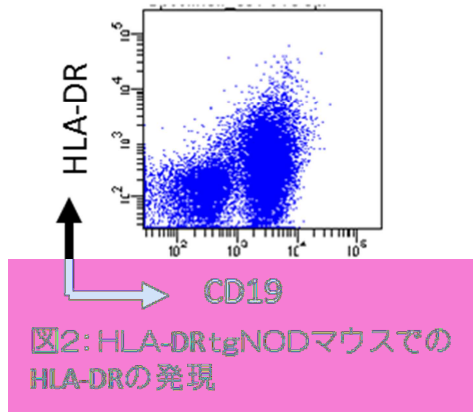
## 4. 研究成果

ヒト化マウス末梢に存在するヒトB細胞の約40%は表面抗原の解析から本来骨髄に存在するべき未熟B細胞(pro-B, pre-B細胞)であることを明らかにした。マウス骨髄はヒトB細胞を分化の最終段階まで保持することができないと考えられる。残りの約60%はIgM+IgD<sup>-</sup>, IgM+IgD<sup>+</sup>のいわゆる成熟B細胞に分化していることを明らかにした。しかしIgM+成熟B細胞のほとんどがCD21<sup>lo</sup>の状態にとどまっており、トランジショナルB細胞(T1-B cell)と呼ばれる成熟B細胞の手前の状態で分化が停滞していることを明らかにした。一方、IgM+IgD<sup>+</sup>ヒトB細胞の抗体産生能を試験管内で検討したところ、疑似抗原(SAC)+CD40に対するアゴニスティック抗体による刺激+IL-21によるサイトカイン刺激によりヒト化マウス内のヒトB細胞はIgMのみならず、IgGを産生することが明らかになった。この際にはクラススイッチを誘導するために必要なAID遺伝子の発現も誘導されており、ヒト化マウス内のヒトB細胞は機能的であることが示された。

ヒト化マウス内のヒトT細胞の機能を試験管内で解析した。マグネティックソーティングにより純化したCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞を抗CD3/CD28抗体でコートしたプラスチックディッシュで刺激を加えたところ健康人由来のヒトT細胞が増殖反応を示したのに対してヒト化マウス由来のT細胞は全く増殖反応を示さずまた、IL-2の産生もみられなかった。T細胞の刺激にPMA/ionomycinを用いても、あるいは抗原刺激時に外来からIL-2を添加しても同様の結果が得られた。このことからヒト化マウス内のヒトT細胞は抗原に刺激に対して応答できない状態にあることが示唆された。このようなT細胞の増殖不応答性が胸腺内で既に誘導されているのかどうかを胸腺細胞を用いて解析したところ、胸腺由来CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>T細胞は抗原刺激に対して正常に増殖反応を示しIL-2も産生した。この結果からヒト化マウス胸腺内ではヒトT細胞は正常にポジティブセレクションを受けて成熟するものの末梢においてその機能を失うことが示唆された(以上、Int.Immunol. 21: 843-858, 2009 報告)。

このヒトT細胞の末梢においてその抗原応

答機能を失う機能不全がマウス MHC クラス II とヒト MHC クラス II のミスマッチに起因する可能性を考え、ヒト HLA-DRB1\*0405 を発現するトランスジェニックマウスを作製し 1 ラインを樹立した(図 2)。



このトランスジェニック NOG マウスではヒト HLA-DR がマウスクラス II の分布に従って発現し、胸腺上皮細胞でも発現が認められた。このトランスジェニック NOG マウス (HLAtg)、およびマウス MHC クラス II 欠損マウスと掛け合わせた HLAtg MHCII(-/-) NOG マウスを作製し HLA-DRB1\*0405 のハプロタイプを有する臍帯血由来血液幹細胞でヒト化を行った。このような HLAtg マウス内ではヒト化後 5 か月では約 50% 程度のナイーブ T 細胞が存在し、抗原刺激に対して増殖応答を示すが、6 か月後ではナイーブ T 細胞の割合は 10% 未満となり (逆にエフェクター・メモリー T 細胞の割合が著増する) 抗原刺激に対し、増殖応答を示さなくなった。これらのことから、HLA の発現のみではヒト化マウスの T 細胞機能を正常化するには不十分であり、ナイーブ T 細胞が NOG マウスのリンパ球減少状態を解消すべく分裂することがヒト化マウス T 細胞の機能不全の原因であることが示唆された。(現在投稿準備中)

一方、NOG マウスの免疫不全性を利用した試みとして、NOG マウス内でヒト NK 細胞の機能活性を評価する方法を開発した。ヒト NK 細胞の主要な機能はがん細胞を抗体依存的に傷害する (ADCC) ことである。当研究室では NOG マウスに移入した正常ヒト NK 細胞が 1 週間程度は生存し、またその機能が保たれていることを明らかにした。具体的にはヒト NK 細胞に感受性の K562 細胞株を NOG マウスに移植する際にヒト NK 細胞を同時に移植すればその腫瘍形成が抑制されることを示した。また、ヒト B 細胞リンパ腫由来の Daudi 細胞とヒト NK 細胞を NOG マウスに移植し、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) を投与し、ADCC が誘導されるか否かを

検討した。その結果、試験管内での細胞障害性が高い NK 細胞を移入したマウスではリツキシマブと NK 細胞の投与によりマウスの生存率が改善することが明らかになった。これらのことから NOG マウスを用いればモノクローナル抗体の ADCC 惹起能力を生体内で直接評価することが可能であることを明らかにした(以上、BBRC 399: 733-737, 2010 報告)。

## 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 3 件)

1. Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Iwasaki T, Kawagishi N, Shimosegawa T, Sugamura K. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpcAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Science* 101:2045-2155, 2010 (査読有)

2. Shiokawa M, Takahashi T, Murakami A, Kita S, Ito M, Sugamura K, Ishii N. In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 399:733-737, 2010 (査読有)

3. Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I, Ito R, Ito M, Minegishi M, Minegishi N, Tsuchiya S, Sugamura K. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int. Immunol.* 21: 843-858, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 国際免疫学会 (International Congress of Immunology)

2010 年 8 月 27 日、神戸国際会議場

・ The analysis of the functions of human T cells in humanized NOD/shi-scid/gnull (NOG)-HLA transgenic mice

発表者: 高橋武司、鈴木真紀子、森谷邦彦、片野いくみ、伊藤亮治、伊藤守、菅村和夫、石井直人

2. 2<sup>nd</sup> international workshop on humanized mice

2009 年 4 月 4 日、オランダ アムステルダム

・ The analysis of human B and T cells in humanized NOG mice (hu-HSC NOG mice)

発表者：高橋武司、片野いくみ、伊藤亮治、伊藤守、菅村和夫、石井直人

3. 日本免疫学会総会

2008年12月2日、京都国際会議場

・ Analysis of the functional human T cells in reconstituted NOG mice

発表者：岡嶋亮良、高橋武司、渡邊庸平、片野いくみ、伊藤亮治、伊藤守、石井直人、菅村和夫

・ Facilitating the human B cell development in humanized NOG mice

発表者：渡邊庸平、高橋武司、岡嶋亮良、片野いくみ、伊藤亮治、伊藤守、土屋滋、石井直人、菅村和夫

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 武司 (TAKAHASHI TAKESHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80335215

### (2) 研究分担者

村田 和子 (MURATA KAZUKO)

いわき明星大学・薬学部・教授

研究者番号：20137631

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：