様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　6 年　6 月　6 日現在

機関番号：３２６６５
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ１５７０４

研究課題名（和文）マウスクッパー細胞によるヒト血液細胞の排除に関わる分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism for rejecting human blood cells by Kupffer cells in immunodeficient mouse

研究代表者
山口　卓哉（YAMAGUCHI, Takuya）

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：６０８６５１１１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：免疫不全NOGマウスにヒト赤血球を移入しても、肝臓に存在するクッパー細胞によって速やかに貪食されてしまうため、ヒト赤血球を長期間維持するモデルマウスの開発には至っていない。そこで本研究では、マウスクッパー細胞によるヒト赤血球の認識・排除機構の分子レベルでの解明と、ヒト赤血球をその血液中に長期間維持することができるモデルマウスの開発を試みた。その結果、マウスクッパー細胞はClec4FとC3分子の働きによりヒト赤血球と結合していることが示唆された。また、C3分子の欠損と塩化ガドリニウムの投与によるクッパー細胞の抑制により、ヒト赤血球を30日以上に亘ってマウス血液中で維持することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
免疫反応は生体の外来異物に対する反応である。異種の赤血球が血液中に流入することは通常考えられないが、マウスクッパー細胞はヒト赤血球を異物と認識し急速かつ劇的に排除している。このような自然免疫機構の分子機構として、C3の関与を明らかにするとともにClec4Fを見出した。Clec4Fが異物認識にかかわることは報告されているが、クッパー細胞やヒト赤血球との関連は本研究で見出された。本研究で開発されたヒト赤血球モデルマウスはマラリア研究に有用なモデルとなるだけでなく、今後開発されるであろうiPS細胞由来の赤血球の安全性を試験するモデルとしても有用であり再生医療の実現に向けて貢献可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：When human red blood cells are transfused into immunodeficient NOG mice, they are rapidly removed by Kupffer cells, thus a model mouse that can sustain human red blood cells for an extended period has not yet been developed. Therefore, this study aimed to elucidate, at the molecular level, the recognition and elimination mechanism of human red blood cells by mouse Kupffer cells and to develop a model mouse that can maintain human red blood cells in its bloodstream for a prolonged period. As a result, it was suggested that mouse Kupffer cells bind to human red blood cells through the action of Clec4F and C3 molecules. Additionally, deficiency of C3 molecule and inhibiting Kupffer cells by the administration of gadolinium chloride, we succeeded in maintaining human red blood cells in the mouse bloodstream for over 30 days.

研究分野：実験動物学・獣医学・免疫薬理学

キーワード：クッパー細胞　マクロファージ　NOGマウス　ヒト赤血球モデル

※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。

１．研究開始当初の背景

実験動物中央研究所 (実中研) が開発した超免疫不全 NOG (NOD/Shi-scid, IL-2Rγnull) マウスを遺伝的に改変することにより、NOG マウスよりも優れたヒト造血支持能を持つ“次世代ヒト化 NOG マウス”の開発を行っており、通常の NOG マウスでは発生分化が困難なヒトミエロイド系細胞 (顆粒球、マスト細胞等) やヒト NK 細胞の分化を誘導することに成功してきた。これらのマウスにヒト造血幹細胞 (hHSC) を移植すると、多様なヒト血球・免疫担当細胞が分化・生着する。しかし、通常血液細胞の大部分を占めるはずのヒト赤血球は循環血液に出現しない。また、ヒト由来の赤血球を大量に移入しても 24 – 48 時間以内に排除され、全く生着せず、ヒト赤血球を長期間維持することが可能なモデルマウスの開発には至っていない。

申請者は、ヒト赤血球モデルマウスを開発するために、NOG マウスにおけるヒト赤血球の排除機構の解明に乗り出した。その結果、移入した**ヒト赤血球はマウスマクロファージに貪食されており、中でもマウス肝臓の CD68^{+}CD11b^{low} マクロファージ（クッパー細胞）によって大量に貪食されている**ことを見出した。次に、hHSC を移植してヒト血液細胞を生着させた NOG マウスに、クロドロン酸リポソームを投与してマクロファージの大半を除去したが、予想に反し、循環血液中にヒト赤血球は検出できなかった。申請者らは従来、ヒト赤血球にマウス補体第 3 成分 (C3) が沈着することに着目し、C3 欠損 (KO) NOG マウスを作製し、このマウスではヒト末梢血赤血球を移植するとその生着が 1 週間程度続くことを見出してきた。そこで、この C3KONOG マウスに hHSC を移入し、クロドロン酸リポソームを投与したところ、移入した hHSC 由来のヒト成熟赤血球がマウス末梢血中に循環し、4 週間以上に亘って維持されることを見出した。

このように、申請者らはマウスクッパー細胞と C3 が NOG マウスにおけるヒト赤血球排除の一端を担っていることを見出している。しかし、ヒト化 C3KO-NOG マウスの血液中を循環するヒト赤血球はマウスの赤血球に比べて圧倒的に数が少ないこと、また、C3KO マウスのクッパー細胞は C3 が存在しないにもかかわらずヒト赤血球の貪食が可能であることを明らかにしており、これらの知見は**マウスクッパー細胞が C3 非依存的な経路によってもヒト赤血球を排除していること**を示唆する。

２．研究の目的

本研究では、NOG マウスのクッパー細胞がどのようにヒト赤血球を認識、排除しているのかを分子レベルで解明し、最終的にヒト赤血球が安定的に発生・分化し、ヒト成熟赤血球が長期間に亘って維持される遺伝子改変 NOG マウスを開発することを目的とした。

３．研究の方法

（1）　ヒト赤血球と結合するマウスクッパー細胞に発現する分子の探索

NOG マウスのクッパー細胞と骨髄マクロファージをセルソーターにより単離し、RNA シークエンスに供してクッパー細胞に特異的に発現している膜タンパク質等の遺伝子情報

を得る。公開データベースも活用する。これらの分子をマウス抗体定常部位 (Fc) との融合タンパク質として哺乳類細胞発現系によって作製する。ヒト赤血球をこれらのタンパク質と in vitro においてインキュベートしたのちに、フローサイトメトリーで解析することにより、ヒト赤血球と結合するマウス分子を探索する。

（２） 遺伝子改変 NOG マウスの作製と特性解析

（1）で挙げられた分子について、その遺伝子をゲノム編集技術により破壊した遺伝子改変 NOG・NOG-C3KO マウスを作製する。作製された遺伝子改変マウスにヒト赤血球を尾静脈より移入し、循環血液中に残存するヒト赤血球の割合や、ヒト赤血球の維持期間を調べ、欠損させた分子の機能を評価する。次に、これらの新規遺伝子改変マウスに hHSC を移入し、ヒト成熟赤血球が分化・生着するかについて同様の手法で評価する。

（３） 塩化ガドリニウムによるマウスクッパー細胞制御の分子機構

本研究では、マクロファージ抑制効果が報告されている塩化ガドリニウムを NOG マウスに投与したところ、マウスの健康に明らかな影響を及ぼさずに移入ヒト赤血球残留期間を延長することを見出した。そこで、塩化ガドリニウムが直接的にクッパー細胞を抑制しているのかを明らかにすることを目的とし、単離したクッパー細胞に塩化ガドリニウムの標的分子が発現しているかを RT-qPCR 法により調べた。

４．研究成果

（１） ヒト赤血球と結合するマウスクッパー細胞に発現する分子の探索

RNA シークエンスならびに公開データベースの検索により、異物認識に関わる自然免疫系受容体かつマウスクッパー細胞に特異的に発現する細胞表面分子を RNA シークエンスデータベースより抽出し、マウス抗体定常部位 (Fc) との融合タンパク質として哺乳類細胞発現系によって作製した（図 1)。抗マウス Fc 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって、培養上清中に十分量の分泌が認められた受容体タンパク質について、ヒト赤血球に結合するかどうか検討した。その結果、

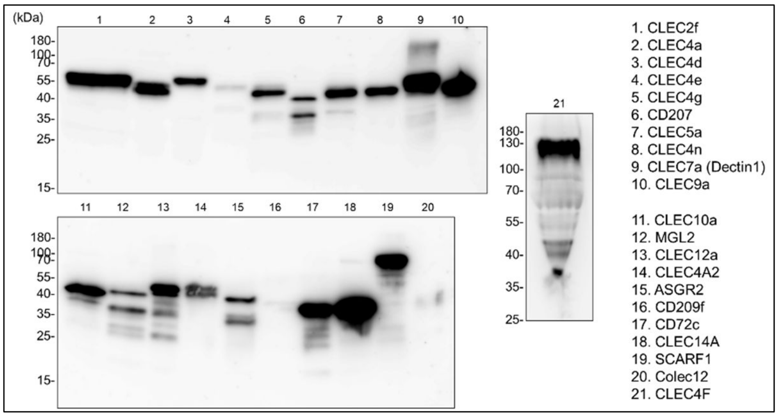


図 1. 作製した Fc 融合タンパク質の発現解析

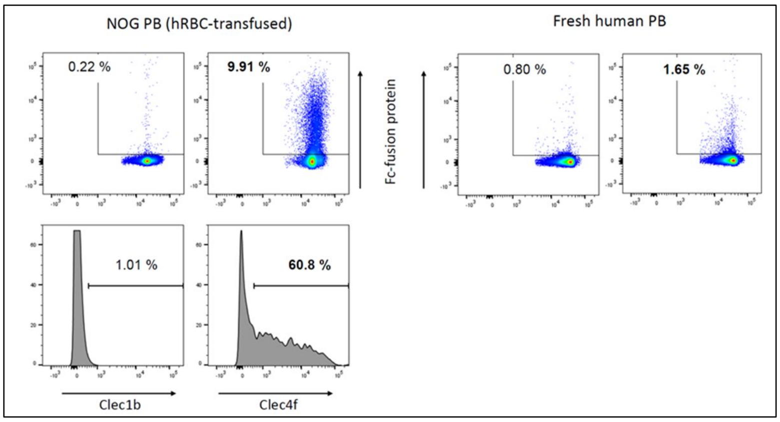
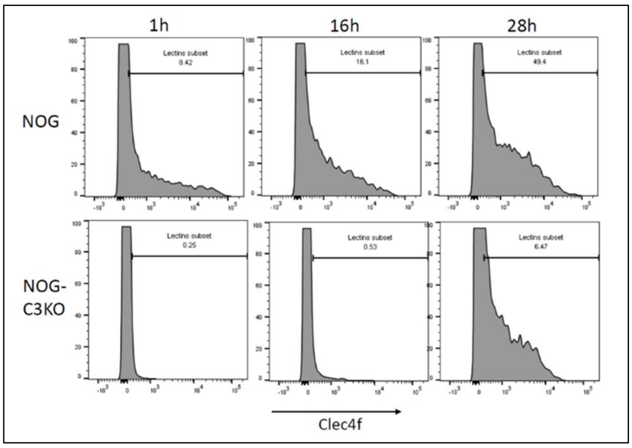


図 2. Clec4F-Fc 融合タンパク質とヒト赤血球の結合解析

上記タンパク質のうち、Clec4F-Fc についてマウスの赤血球や採血直後の新鮮ヒト赤血球にはほとんど結合しなかったが、NOG マウスに移入したヒト赤血球に結合することを見出した (図 2)。また、Clec4F-Fc は NOG マウス血漿と混和した新鮮ヒト赤血球に対しても結合した。加えて、NOG マウスまたは C3KONOG マウスに移入したヒト赤血球に対する Clec4F-Fc の結合能を比較したところ、C3 分子が存在しない状況では Clec4F-Fc と移入ヒト赤血球の結合が部分的に抑制されていた (図 3)。これらのことから、Clec4F は<u>ヒト赤血球に結合した何らかのマウス由来成分を認識しており、かつ、この反応には C3 分子が関係している可能性</u>が示唆された。



<u>図 3. Clec4F-Fc 融合タンパク質とヒト赤血球の結合に C3 分子が与える解析</u>

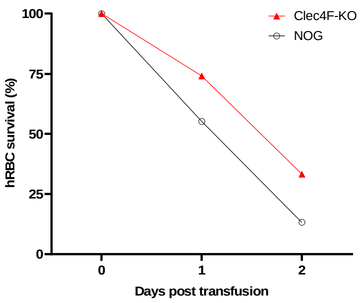
（2） 遺伝子改変 NOG マウスの作製と特性解析

次に、ゲノム編集によって Clec4F 欠損 NOG マウスを作製した。本マウス系統における Clec4F 遺伝子のゲノム配列では、開始コドンを含む 49 bp の欠損が認められ、フレームシフトをおこすと考えられる配列であった。(図 4)

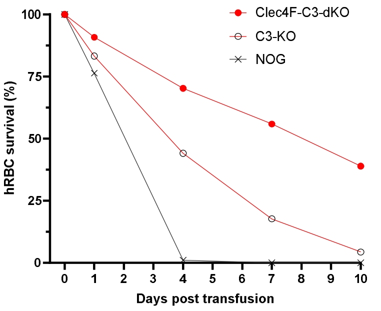
```
Clec4F      AGGCTCCCACTGTGTTTCAGGCTCTCACTACTGTGGGCTTGCAGGACAGGCTTTAGGAAC
Clec4FKO    AGGCTCCCACTGTGTTTCAGGCTCTCACTACTGTGGGCTTGCAGGACAGGCTTTAGGAAC
            ************************************************************

Clec4F      CAGTGGCAAGAACGGTGCAGGAGGATGAAGGAGGCCGAGCTGAACAGAGATATGGCTAGA
Clec4FKO    CAGTGGC-------------------------------------------------TAGA
            *******                                                 ****

Clec4F      TATTGCACAGACAACCAGTGTGTCTCCCTACAGCCCCAAGGACTGGGGCCTAAGTCAGCT
Clec4FKO    TATTGCACAGACAACCAGTGTGTCTCCCTACAGCCCCAAGGACTGGGGCCTAAGTCAGCT
            ************************************************************
```

<u>図 4. Clec4F-KO NOG マウスと野生型マウスにおける Clec4F 遺伝子ゲノム配列の比較（一部）</u>

この Clec4F-KO NOG マウスにヒト赤血球を移入し、マウス循環血液中における動態を調べたところ、対照群である NOG マウスに比べてヒト赤血球の残留性が僅かに改善されたものの、3 – 4 日のうちに完全に消失した（図 5）。そこで、Clec4F-KO NOG マウスと C3-KO NOG マウスを交配し、両遺伝子を欠損したマウス（Clec4F-C3-dKO NOG）を作出し、同様の実験を行った。その結果、Clec4F-C3-dKO NOG では、従来の C3-KO NOG マウスに比べて移入ヒト赤血球の残存性が向上しており、移入 10 日後においても循環赤血球のおよそ 40 % を占めていた（図 6）。



<u>図 5. Clec4F-KO NOG マウスと NOG マウスにおける移入ヒト赤血球の残存性比較</u>



<u>図 6. Clec4F-C3-dKO NOG マウスにおけるヒト赤血球の残存性</u>

（3） 塩化ガドリニウムによるマウスクッパー細胞制御の分子機構

ヒト赤血球を長期に亘って維持できるモデルマウスを作製するため、薬物によるマウスクッパー細胞の機能抑制法を検討することとした。クッパー細胞を抑制する薬物として、

はクロドロン酸リポソームが良く用いられるが、クッパー細胞の枯渇状態を維持するためには繰り返し投与する必要があり、クロドロン酸の高い毒性によってマウスがしばしば死亡してしまう状況となり、安定的な実験を行う上で大きな障害となる。そこで、マクロファージを抑制する働きがあり、マウスに対するストレスがクロドロン酸よりも低いとされる塩化ガドリニウムを繰り返し投与することとした。C3KO-NOG マウスに塩化ガドリニウムを数日おきに投与し、また、ヒト赤血球もおよそ 1 週間間隔で数回移入したところ、マウス循環血液中のヒト赤血球の割合は徐々に上昇し、およそ 8 割程度をヒト赤血球に置き換えることに成功した（図 7：Yamaguchi et al., 2021）。ヒト赤血球の維持期間についても、30 日間以上に延長し、最長で 2 か月程度となった。

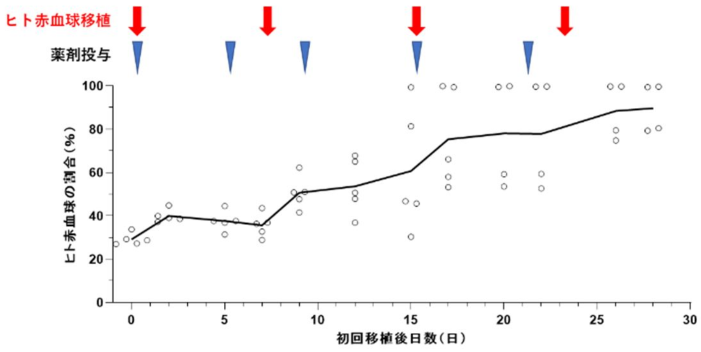


図 7. 塩化ガドリニウム投与 C3-KO NOG マウスにおけるヒト赤血球の長期維持

塩化ガドリニウムによるクッパー細胞抑制のメカニズムを明らかにするため、実験を行った。塩化ガドリニウムは、Transient Receptor Potential (TRP) チャネル群の非選択的阻害剤として知られているが、クッパー細胞における TRP チャネルの発現についてはほとんど知られていない。そこで、クッパー細胞に富む肝臓単核球における遺伝子発現解析を行ったところ、TRPV2, TRPV4, TRPM2 ならびに TRPM7 の各遺伝子の発現が確認された（図 8）。これらのチャネルは、骨髄由来マクロファージの機能調節に関わるとされるチャネルであるため、クッパー細胞においても同様の機能を示す可能性がある。

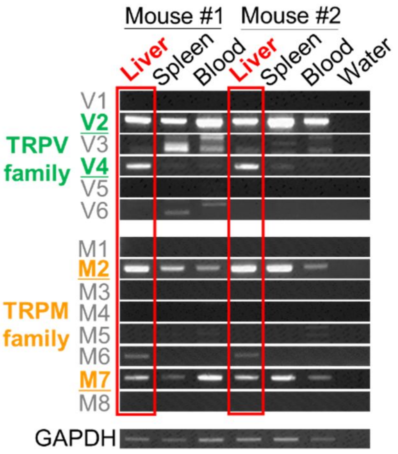


図 8. マウス単核球における TRP 遺伝子の発現解析

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Yamaguchi Takuya、Katano Ikumi、Otsuka Iyo、Ito Ryoji、Mochizuki Misa、Goto Motohito、Takahashi Takeshi	４．巻 12
２．論文標題 Generation of Novel Human Red Blood Cell-Bearing Humanized Mouse Models Based on C3-Deficient NOG Mice	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Frontiers in Immunology	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.671648	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2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Takuya Yamaguchi, Iyo Ootsuka, Takeshi Takahashi
２．発表標題 Prolonged survival of hRBC in NOG-C3-Clec4f double deficient mice
３．学会等名 6th International Workshop on Humanized Mice（国際学会）
４．発表年 2022年

１．発表者名 Takuya Yamaguchi
２．発表標題 Improved engraftment of human red blood cells in C3-deficient NOG mouse treated with gadolinium chloride
３．学会等名 4th Annual HuNIT Platform Virtual Symposium（国際学会）
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	髙橋　武司 (TAKAHASHI Takeshi)		

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