

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05992

研究課題名（和文）ヒトの腸内細菌叢と免疫系を再構築したデュアルヒト化マウスの開発

研究課題名（英文）Establishment of a human microbiome- and immune system-reconstituted dual-humanized mouse model

研究代表者

何 裕遥（Ka, Yuyo）

公益財団法人実験動物中央研究所・動物資源技術センター・室長代理

研究者番号：90640772

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）：免疫細胞の分化とその機能に対する腸内細菌叢の生理的な役割が明らかになり、様々な免疫疾患において腸内細菌叢の関与が指摘されている。しかし、ヒト免疫細胞とヒト腸内細菌叢との相互作用を同一生体内で評価できる動物実験モデルの報告はない。本研究では無菌飼育技術とヒト免疫系マウス作出技術を駆使して、ヒトCD34+前駆細胞を移植した無菌ヒト免疫系マウスを開発した。このマウスにヒトの腸内細菌叢を移植すると、腸内細菌叢ドナーによりヒトCD3+T細胞の分化に差があることがわかり、定着した腸内細菌叢がヒト化マウスにおけるT細胞の増殖または維持をサポートしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌や自己免疫疾患など様々な疾患における腸内細菌叢の重要性が指摘されている。これらの治療では腸内細菌を如何にコントロールするのかが、現在の医学研究における課題の一つである。しかし、これらの研究のほとんどが無菌化したマウスを用いた研究であり、ヒト腸内細菌とマウス免疫細胞との相互作用を解析して得られた知見である。ヒト免疫細胞とヒト腸内細菌が同一個体で生着するモデル動物が理想的であるが、そのようなモデルは未だ実現していない。そのような学術的背景のもとヒト免疫系、ヒト腸内細菌の双方を定着させた新たなヒト化マウスを開発することは、様々なヒト免疫疾患研究の前臨床評価系のツールとして応用できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Humanized mice are widely used to study the human immune system in vivo and investigate therapeutic targets for various human diseases. Immunodeficient NOD/Shi-scid-1L2r null (NOG) mice transferred with human hematopoietic stem cells are a useful model for studying human immune systems and analyzing engrafted human immune cells. The gut microbiota plays a significant role in the development and function of immune cells and the maintenance of immune homeostasis; however, there is currently no available animal model that has been reconstituted with human gut microbiota and immune systems in vivo. In this study, we established a new model of CD34+ cell-transferred humanized germ-free NOG mice using an aseptic method.

研究分野：実験動物学

キーワード：ヒト化マウス 腸内細菌叢 腸管免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の分化とその機能に対する腸内細菌叢の生理的な役割が明らかになり、様々な免疫疾患において腸内細菌叢の関与が指摘されている。しかしながら、腫瘍研究や免疫疾患研究のほとんどが無菌化したマウスを用いた研究であり、ヒト腸内細菌とマウス免疫細胞との相互作用を解析して得られた知見である。本来はヒト免疫細胞とヒト腸内細菌が同一個体で生着するモデル動物が理想的であるが、そのようなモデルは未だ実現していない。

本研究では無菌飼育技術、ヒト免疫系マウス作出技術を駆使して、ヒト免疫系と腸内細菌叢を同時に再構築したデュアルヒト化モデルマウスを開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では我々が保有する無菌飼育技術、ヒト免疫系マウス作出技術を駆使して、ヒト免疫系と腸内細菌叢を同時に再構築したデュアルヒト化モデルマウスを開発し、ヒト免疫細胞とヒト腸内細菌叢の相互作用を評価できる動物モデルの確立を目的とする。本研究により、ヒト免疫系とヒト腸内細菌叢との相互作用を解析できる生体モデルが実現すれば、ヒト腫瘍免疫、炎症性腸疾患、アレルギーなど様々なヒト免疫疾患研究の前臨床評価系として重要なツールになりうる。

3. 研究の方法

(1) ヒト糞便のスクリーニング

これまでの研究で超免疫不全マウスである重度免疫不全 NOD/Shi-skid, IL-2R KO(NOG) マウスにヒト糞便を投与すると、サンプルによって 1 ヶ月ほどで突然死する可能性があることがわかっている。そこでヒト免疫化する前に突然死を起こさない(起こしにくい)サンプルをスクリーニングした。

(2) 無菌マウスのヒト免疫化

NOG マウスを無菌化し無菌 NOG を作成した。そのマウスを用いて、無菌状態を維持したまま X 線照射とヒト造血幹細胞を移植することでヒト免疫化無菌 NOG を作製した。無菌状態を保つために、X 線照射では滅菌した X 線照射トレイをビニールアイソレータ (VI) 内に搬入し、マウスを収容後、3 重の紙袋で梱包し VI より搬出した。紙袋 1 重の状態で行い、VI に戻す際は紙袋を滅菌剤でよく噴霧しステリルロックに収容後、マウスのみをケージに戻した。翌日、VI よりマウスを輸送容器に収容し紙袋で梱包しクリーンベンチに搬出後、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を尾静脈投与した。処置後マウスは輸送容器に収容し X 線照射時と同じ要領で VI に戻された。

(3) ヒト免疫化した無菌マウスへのヒト糞便移植

ヒト造血幹細胞移植後 16 週目にヒト糞便の希釈液を 3 回経口投与(FMT)しヒト腸内細菌叢を定着させた。その後、継時的に採糞や採血を行い、ヒト造血幹細胞移植後 23 週時に採材した。得られた材料を用いマウスの腸内細菌叢解析や各臓器におけるヒト免疫細胞の割合を解析した。

4. 研究成果

3 名のドナー糞便を無菌 NOG マウスに投与したところ、1 ドナーは無菌 NOG マウスが 1 ヶ月ほどで死亡した。そのためその後の実験には 2 ドナー (B 菌叢、C 菌叢) の糞便を移植することとした。

ヒト造血幹細胞とヒト腸内細菌叢を無菌 NOG マウスで同時に再構成し、移植されたヒト細胞の免疫学的特徴を分析するデュアルヒト化マウスを確立した。末梢血中の CD33⁺単球、CD66b⁺顆粒球は無菌およびヒト腸内細菌叢定着による影響はなかった(図 1a,b,d,e)。CD3⁺T 細胞の割合は、FMT7 週後では無菌 NOG マウスまたは B 菌叢定着マウスよりも C 菌叢定着 NOG マウスの方が高かった。これと一致して、FMT7 週後の CD19⁺B 細胞の割合は、無菌 NOG マウスまたは B 菌叢定着マウスよりも C 菌叢定着 NOG マウスの方が低かった(図 1c)。

また、C 菌叢定着 NOG マウスの脾臓において有意差はなかったが、CD3⁺T 細胞の割合が増加した(図 2a-c)。さらに脾臓の CD3⁺T 細胞の naïve、central memory、effector memory (EM)、terminally differentiated effector memory の割合を調査した。FMT 後に優位な変化はなかったが、EM 細胞において 3 匹中 2 匹のマウスは無菌 NOG グループよりも B、C 菌叢定着 NOG マウスのグループで高い割合(>50%)を示した(図 3a-d)。これらの結果はデュアルヒト化マウスにおけるヒト腸内細菌叢の定着により、ヒト T 細胞の生着と活性の増加が明らかになったことを示している。

さらに、16S rRNA シーケンスを使用して、マウス系統間の腸内細菌叢の違いを調査した。免疫正常マウスである無菌 C57BL/6N (B6N)、ヒト造血幹細胞未移植無菌 NOG、ヒト造血幹細胞移植無菌 NOG に B 菌叢を投与し、マウス糞便を採取し腸内細菌叢を UniFrac 解析で比較したところ、無菌 C57BL/6N はヒト造血幹細胞未移植無菌 NOG およびヒト造血幹細胞移植無菌 NOG とは異なるクラスターを形成した(図 4a,b)。B 菌叢、C 菌叢を移植されたデュアルヒト化マウスの腸内細菌叢と元となるドナー糞便である B 菌叢、C 菌叢を UniFrac 解析で比較すると C 菌叢のデュアルヒト化マウスの方がドナー糞便に似ていた。さらに FMT によって定着した腸内細菌叢の組成を分析した。B 菌叢では *Prevotellaceae* が組成比 26.86%、C 菌叢では *Bifidobacteriaceae* が組成

比 8.77%と高く、各菌叢毎に特徴的であった。B 菌叢、C 菌叢を移植されたデュアルヒト化マウスの腸内細菌叢の組成は *Prevotellaceae* が 4.52% および 0.00%、*Bifidobacteriaceae* が 0.00% と 2.55%であった。つまり、各デュアルヒト化マウスの腸内細菌叢には各ドナーに特徴的な腸内細菌叢の定着が確認された(図 5a)。また、FMT されたデュアルヒト化マウスの多様性はドナー糞便よりも低い傾向にあった(図 5b,c)。ドナー固有の菌株が定着し元の腸内細菌叢をある程度反映しているため、デュアルヒト化マウスは免疫正常マウスと同じ方法で FMT 実験を行うことができると考えられた。これらの結果はデュアルヒト化マウスにおける移植されたヒト細胞の免疫学的特徴が、ヒト腸内細菌叢の定着によって影響を受ける可能性があることを示している。したがって、本研究によりマウス生体内でヒトの免疫系とヒトの腸内細菌叢を同時に評価する新しい実験系を確立することができた。

図.1

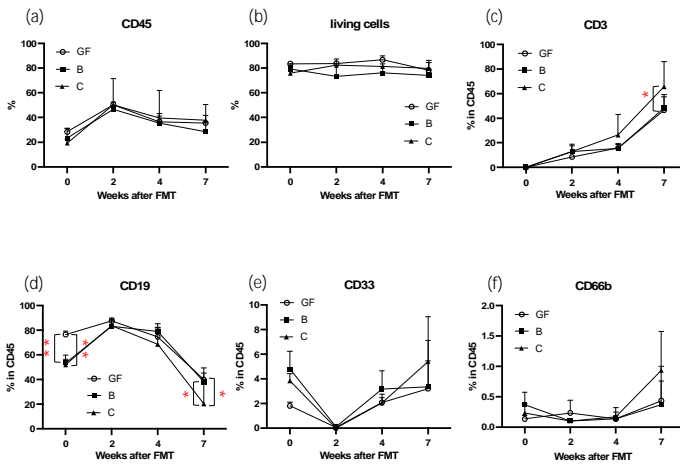


図.1 デュアルヒト化マウスにおける末梢血のヒト細胞の生着率

ヒト CD45⁺(a)、生細胞 (b)、CD3⁺(c)、CD19⁺(d)、CD33⁺(e)、CD66b⁺(f)細胞の割合。Two-way ANOVA 解析と Tukey's test によって有意差は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ を示す。(; ヒト造血幹細胞移植無菌 NOG、 ; B 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス、 ; C 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス)

図.2

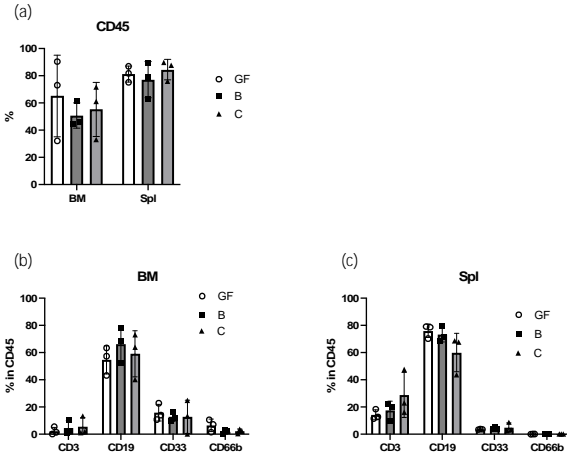


図.2 デュアルヒト化マウスにおける骨髄および脾臓のヒト細胞の生着率

(a) ヒト造血幹細胞移植無菌 NOG、B,C 菌叢移植されたデュアルヒト化マウスの骨髄および脾臓におけるヒト CD45⁺細胞の割合。(; ヒト造血幹細胞移植無菌 NOG、 ; B 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス、 ; C 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス) 各マウスの骨髄 (b) または脾臓 (c) におけるヒト CD3⁺、CD19⁺、CD33⁺、および CD66b⁺細胞の割合。データは平均値 \pm SD として表示され、One-Way ANOVA 解析と Dunn's tests を行った。

図.3

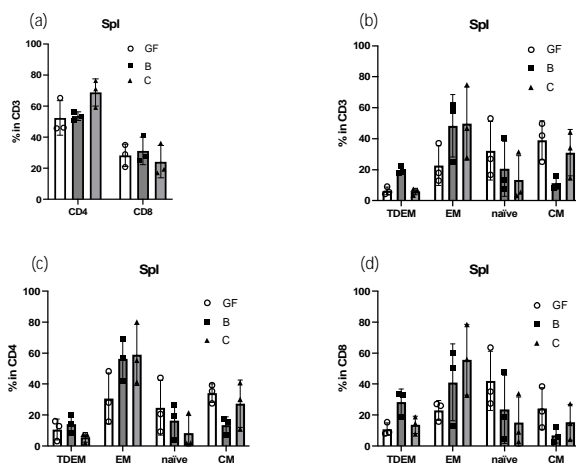


図.3 デュアルヒト化マウスにおける脾臓のヒト T 細胞の特徴

(a) デュアルヒト化マウスの脾臓における CD3⁺T 細胞におけるヒト CD4⁺または CD8⁺T 細胞の割合(; ヒト造血幹細胞移植無菌 NOG、 ; B 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス、 ; C 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス)(b-d)CD3⁺(b)、CD4⁺(c)、または CD8⁺(d)T 細胞における CD45RA⁺CD62L⁺ naive、CD45RA⁺CD62L⁻ CM、CD45RA⁻CD62L⁻ EM、および CD45RA⁺CD62L⁻ TDEM T 細胞の割合。データは平均値 \pm SD として表示され、One-Way ANOVA 解析と Dunn's test を行った。

図.4

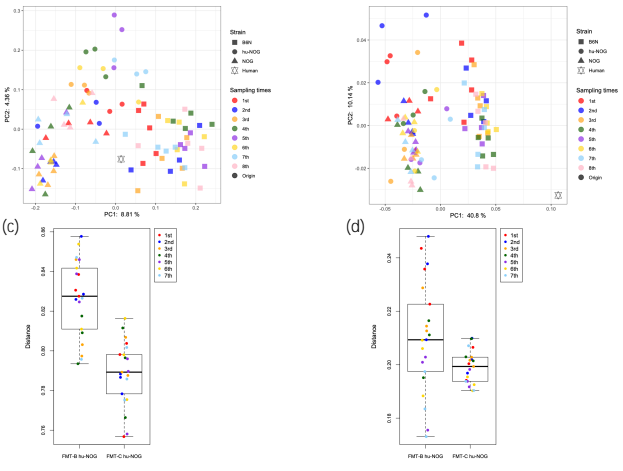


図.4 ヒト、B6N、ヒト造血幹細胞未移植NOG、ヒト造血幹細胞移植NOGの腸内細菌叢の主座標分析

B 菌叢における各グループの (a)unweighted と (b)weighted UniFrac 距離の主座標分析 (; B 菌叢移植されたデュアルヒト化マウス、 ; B6、 ; ヒト造血幹細胞未移植無菌 NOG、ヘキサグラム; ヒト)。デュアルヒト化マウスとヒトの菌叢における (c)unweighted と (d)weighted UniFrac 距離の箱ひげ図。糞便サンプルは、週 1 回合計 8 回採取され、16S rRNA シーケンスにより分析された。

図.5

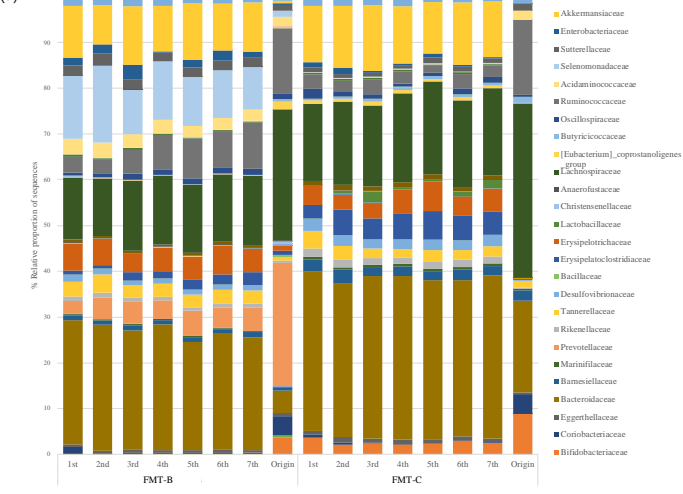
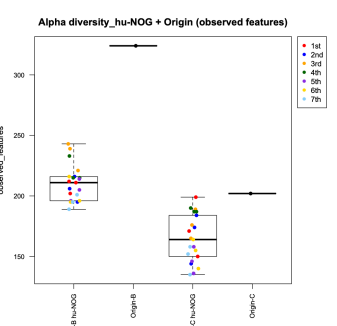


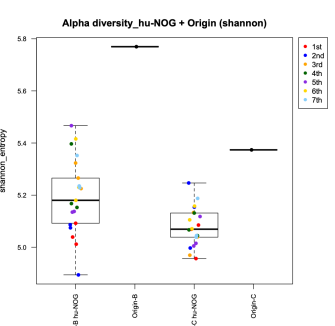
図.5 腸内細菌の菌株組成と多様性

(a) 糞便サンプル中の細菌分類群の菌株組成 (存在量 >0.1%)。observed features (b) と shannon (c) によるデュアルヒト化マウスとドナー菌叢の多様性の比較。細菌分類群の菌株組成は 16S rRNA シーケンスにより分析し、科レベルで示された。

(b)



(c)



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 Ka Yuyo、Ito Ryoji、Nozu Ryoko、Tomiyama Kayo、Ueno Masami、Ogura Tomoyuki、Takahashi Riichi	4. 巻 72
2. 論文標題 Establishment of a human microbiome- and immune system-reconstituted dual-humanized mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 402 ~ 412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.23-0025	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 Yuyo ka
2. 発表標題 Establishment of germfree humanized mice for microbiome research
3. 学会等名 The 6th International Workshop on Humanized Mice (IWHM6) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuyo ka
2. 発表標題 Generation of germ-free humanized mice reconstituted with human immune system for microbiome research
3. 学会等名 The International Congress of Immunology (IUIS) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	伊藤 亮治 (Ito Ryoji) (60425436)	公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物応用研究部・室長 (72611)	

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
---------	---------