

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380172

研究課題名（和文）MHC固定ブタ造血幹細胞の同定と性状解析：ヒト免疫モデル動物としての有用性の検討

研究課題名（英文）Identification and characterization of MHC-assigned swine hematopoietic stem cells: availability for the human immunity model animals

研究代表者

北川 均（KITAGAWA HITOSHI）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70144003

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、MHC固定ブタを用いた再生医療の研究に必須であるブタ造血幹細胞の同定と分化過程を明らかにするため、造血幹細胞マーカー候補であるc-kitのマウスモノクローナル抗体を作製し、ブタ造血幹細胞の同定およびMHC固定ブタ骨髄及び臍帯血リンパ球解析を試みた。その結果、c-kit陽性細胞は新生仔骨髄に豊富に存在し、高い赤芽球系・単球系への分化能を示し、重度免疫不全NOGマウスへの移植により、ブタCD45陽性細胞の分化を誘導する事が確認された。

研究成果の概要（英文）：

c-kit molecule is a marker of the wide variety of tissue stem cells. Thus, the utility has been prominently upregulated. However, there are no good monoclonal antibodies against swine c-kit molecule. We prepared the anti-swine c-kit monoclonal antibody with high specificity, mainly available for flow-cytometrical analysis. New-born bone marrow cells contained higher ratio of c-kit positive cells compared to adult bone marrow cells or cord blood cells. The purified swine bone marrow c-kit+ cells mainly developed red blood cells by conventional colony assay with human cytokines. Moreover, transplantation of the c-kit+ cells developed swine CD45+ cells, suggesting that the white blood cells were successfully developed from swine hematopoietic stem/progenitor cells in the immune-deficient NOG mice. The anti-swine c-kit monoclonal antibody did not recognize mouse or human mast cells, suggesting the antibody is species-specific. These results suggest that the c-kit monoclonal antibody prepared by us will become a powerful tool for the study of swine stem cell biology.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 4,900,000  | 1,470,000 | 6,370,000  |
| 2011年度 | 4,500,000  | 1,350,000 | 5,850,000  |
| 2012年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：MHC 固定ブタ、造血幹細胞、抗ブタ c-kit 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

ブタは、高い繁殖効率や臓器サイズ、生理学的類似性からヒトへの異種移植ドナーとして最適であると見なされ、これまで中型動物としては最も免疫系の研究成果が集積している。申請者らや矢田のグループは、このような移植免疫研究の推進のために MHC 固定ブタや、 $\alpha$ Gal-ノックアウトブタ等を開発し、報告してきた。これらの系統を用いて、移植免疫に関する多くの研究成果が得られ、さらに、その過程でブタ免疫系が多くの点でヒトと類似している事が明らかとなったが、MHC 遺伝子構造や発現などを含む様々な相違点も指摘された。しかし、ヒト・ブタ間の免疫系の相違点を詳細に検討するためには、確立された成体免疫系を解析するのみならず、ブタにおける免疫担当細胞の発生・分化とその環境に関する詳細な解析が必要である。しかしながら、ブタのみに特異的な優れた幹細胞マーカー抗体の報告がないことから、ブタ造血幹細胞の同定とその分化過程の解析は、ヒトやマウス、非ヒト霊長類などにおいては一般的な手法となっている異種移植の系を立ち上げることによってリンパ球系への分化を証明することができず、その進展が遅れていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでまだ同定されていないブタ造血幹細胞を「組織適合性抗原複合体 (MHC) が固定された近交系ブタ」において同定し、その多分化能と自己複製能を解析することにより、ヒトにおける移植と臓器再生の動物モデルとして利用することを目的とした。このプロジェクトでは、(1) 種特異的な抗造血幹細胞モノクローナル抗体を作製し、(2) この抗体を用いて造血幹細胞マーカーを発現している細胞を単離し、さらに (3) 造血幹細胞マーカー発現細胞を免疫不全マウスへ移植し、その多分化能と自己複製能を解析することによって、ブタ造血幹細胞を同定する事を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料：

MHC 固定ブタ臍帯血、末梢血、成体骨髄、新生仔骨髄、は岐阜大学あるいはオリエンタル酵母(株)より譲渡あるいは購入した。BALB/c マウスは日本クレアより購入した。Cell line

については ATCC Co. LTD あるいは理化学研究所より購入したものをを用いた。

### (2) 免疫：

MHC 固定デュロック種ブタよりブタ臍帯血を採取し、リンフォセパールによる比重遠心分離を行って単核球を得た。これらの細胞を mitomycin C 処理(40 mg/L, 30 min)した後、 $1 \times 10^7$ /head で 8 週齢の BALB/c マウスに免疫した。4 週間後より A20 を親株とした c-kit トランスフェクタントによる 3 回の追加免疫を 2 週間毎に行った後、最終免疫 1 週間後に採血し、血漿中の抗体がトランスフェクタントを特異的に認識するかをフローサイトメトリーにより解析した。

### (3) ハイブリドーマ作製とスクリーニング：

ブタ骨髄細胞を認識する抗体を保有するマウスについて、最終免疫の 4 日後に脾臓を摘出し、定法であるポリエチレングリコール法により P3X 細胞株と融合し、ハイブリドーマを得た。1 次スクリーニングは HEK293 を親株とした c-kit トランスフェクタントを用いて、Array Scan によりハイブリドーマを選択した。クローニングと 2 次スクリーニング、3 次スクリーニングを Array Scan およびフローサイトメトリーを用いて行うと共に、Western blotting, 免疫組織染色に適用可能かについても解析を行った。最適なクローンが得られた後、nude マウスを用いて腹水化を行い、腹水より精製モノクローナル抗体を得た。

### (4) 造血幹細胞の同定：

c-kit 抗体を精製し、細胞の免疫染色を行った後、c-kit を指標に磁気ビーズ法で骨髄細胞を分画し、ヒト及びマウスサイトカイン環境下におけるコロニーアッセイを行った。また、重度免疫不全マウスである NOG (8 週齢) に 2.5Gy の放射線を照射した後、 $1 \times 10^5$  個の骨髄細胞の移植を行い、2 週間後、12 週間後に、再構築能をブタ CD45 の発現を指標にフローサイトメトリーにより解析した。

### (5) 免疫組織化学染色：

ブタ骨髄細胞を(3)で精製した c-kit 抗体 (2A1 抗体) で染色した後、磁気ビーズ法で陽性細胞と陰性細胞に分離した。これらの細胞を  $5 \times 10^5$  ずつ Geno Staff iP Gell を用いてゲル化した後パラフィン包埋し、標本作製した。切片は、脱パラフィン処理の後、0.01 M PBS で洗浄し、ヤギ正常血清により 10 min

ブロッキングを行った。1次抗体として2A1(培養上清 50・1)を用い、1 h 室温で反応させた後、PBS で洗浄し、抗マウス IgG-Alexa488 (1:200 希釈、50 µl) で1 h 室温で反応させた。PBS で洗浄した後、抗退色封入剤 1 ml にPI 添加し、封入を行った。

#### (6) Western blotting:

HEK293およびc-kitトランスフェクタントライセートは定法により  $2 \times 10^6$ /lane で10%アクリルアミド SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜にタンパク質を転写した。一次抗体を2A1 培養上清室温 2 h で、二次抗体を anti-mouse IgG-HRP (1:10000) 室温 1.5 h で反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて発色を行った。

#### (7) フローサイトメトリー

細胞は各抗体で4°C15分反応させた後、PBS で洗浄し、2次抗体として抗マウス IgG-PE あるいは抗マウス IgG-APC を用いて4°C15分反応させた。PBS で洗浄した後、FACScalibur により解析した。解析ソフトは Cellquest を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) ブタ c-kit モノクローナル抗体の作製:

ブタ臍帯血及びc-kitトランスフェクタントを用いた複数回の免疫により、BALB/c マウス血漿における抗体価の上昇を確認した。これらのマウス脾臓を用いた細胞融合と3回のクローニング・スクリーニングにより、ブタ c-kit 特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (2A1) の確立に成功した。この抗体はマウス IgG1・であり、フローサイトメトリーでc-kitトランスフェクタントを特異的に染色した。この抗体は界面活性化剤存在下での免疫沈降や Western blotting には使用できないが、精製細胞を用いた蛍光免疫組織染色に用いることが可能であることが明らかになった。このクローンをヌードマウスを用いて腹水化し、さらにこれから精製した抗体を用いて、ブタ骨髄細胞からの磁気ビーズ法および cell sorting による c-kit 陽性細胞の精製が可能であった。

次に、本抗体の種特異性を解析した。c-kit はマスト細胞に発現することが知られているため、種特異的 c-kit 抗体及び2A1 抗体を用いて培養ヒトマスト細胞と培養マウスマスト細胞の染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。その結果、ヒト、マウスそれぞれの種特異的 c-kit 抗体はそれぞれの培養マスト細胞と交差反応し、これらの細胞が c-kit を発現していることが示されたが、2A1 は両細胞と交差しなかった。これらの結果、2A1 はブタ特異的な抗 c-kit モノクローナル

抗体であることが示された。

#### (2) ブタ骨髄 c-kit 陽性細胞の多分化能、自己複製能の解析:

新規作成された c-kit モノクローナル抗体 (2A1) を用いてブタ骨髄中の c-kit 陽性細胞の割合を解析したところ、成体ブタと比較して、新生仔骨髄でより高い割合で c-kit 陽性細胞が存在することが明らかとなった。また、新生仔ブタの骨髄には、臍帯血単核球よりも高い割合で c-kit 陽性細胞が存在していた。これら新生仔ブタ骨髄細胞を c-kit 陽性及び陰性細胞画分に分離精製し、ヒトサイトカイン環境下でのコロニーアッセイを行ったところ、赤芽球系及びミエロイド系への分化が確認された。特に赤芽球系への分化は顕著であった。

一方、同様に分画した細胞を 2.5Gy の放射線照射した NOG マウスに移植したところ、移植後2週間で骨髄および末梢リンパ組織にブタ CD45 陽性細胞の存在が確認された上、移植後12週では、末梢リンパ節において CD45 陽性細胞が確認された。さらに、移植マウス末梢血中にはマウス TER119 陰性赤血球が観察され、ブタ赤血球である可能性が示唆された。以上の結果から、c-kit に対する本抗体は、造血幹細胞を認識し単離するために有用であると考えられた。また、これと同時に、ブタ骨髄由来造血幹細胞は赤芽球系への分化が亢進しやすいことが明らかとなった。

今後、さらに造血幹細胞のマーカーである CD34 等の抗体を作製し、造血幹細胞と多能性前駆細胞、ミエロイド系、リンパ球系への分化段階を同定することにより、より詳細な解析が可能になると考えられる。特に、種によって造血幹細胞から分化しやすい分化系統が異なる可能性が考えられ、単なるサイトカインの交差性のみならず幹細胞の分化機構の解明が待たれる。本研究で開発された抗体を用いることにより、ブタにおける幹細胞移植の研究はさらに進展すると考えられる。

### 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15件)

1. Fujii Y, Kametani Y (8番目) et al. Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. Plos One 8: e56296. 2013. 査読有
2. Yamamoto-Suzuki Y, Sakura Y, Fujimura Y, Matsumoto M, Hamako J, Kokubo T, Kitagawa H. et al. Identification and recombinant analysis of botorocetin-2,

a snake venom cofactor for von Willebrand factor-induced platelet agglutination. *Biochemistry* 51: 5329-5338, 2012. 査読有

3. Shinkai H, Ando A (8番目) et al. Genetic variability in swine leukocyte antigen class II and toll-like receptors affects immune responses to vaccination for bacterial infections in pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35: 523-532, 2012. 査読有

4. Kitaura K, Kametani Y (8番目) et al. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Immunol Methods* 384: 81-91, 2012. 査読有

5. Nunomura S, Shimada S, Kametani Y, et al. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Calithrix Jucchus* (common marmoset). *Int Immunol* 24: 593-603, 2012. 査読有

6. Tsuda B, Kametani Y, et al. A human B cell receptor epitope-based erbB-2 peptide (N:163-182) with pan-reactivity to the T cells of Japanese breast cancer patients. *Vaccine Vaccinat* 3: 4172/2157-7560. 1000159, 2012. 査読有

7. Kametani Y, Ohshima S, et al. Porcine MHC classical class I genes are coordinately expressed in superantigen-activated mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 148: 252-259, 2012. 査読有

8. Kawaguchi A, Kametani Y (6番目) et al. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on antigen-presenting cells in mice. *Artif Organs* 36: 194-201 2012. 査読有

9. Kita YF, Ando A, et al. Application of high-resolution, massively parallel pyrosequencing for estimation of haplotypes and gene expression levels of swine leukocyte antigen (SLA) class I genes. *Immunogenetics* 64: 187-199, 2012. 査読有

10. 高島 諭, 大場恵典, 渡邊一弘, 北川均 他: 消化管近傍リンパ節にT細胞性リンパ腫を発症した若齢犬の1例. *日獣会誌* 64: 390-393, 2011. 査読有

11. Miyako H, Kametani Y, et al. Antitumor effect of new HER2 peptide vaccination based on B cell epitope. *Anticancer Res* 31: 3361-3368, 2011. 査読有

12. Ando A et al. SLA-DRB1 and -DQB1

genotyping by the PCR-SSOP-Luminex method. *Tissue Antigens* 78: 49-55, 2011. 査読有

13. Abe K, Kametani Y (15番目) et al. A novel ENU-induced mutation in phospholipase C gamma 2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects, and in vitro infertility in the mouse. *Arthritis Rheumatism* 63: 1301-1311, 2011. 査読有

14. 北 夕紀, 安藤麻子 他 次世代シーケンサーRoche 454FLXを用いたMHC タイピング法と遺伝子発現解析法の開発. *DNA 多型* 19: 223-229, 2011. 査読有

15. 亀谷 美恵 IL-10産生CD4+ T細胞について-コモンマーモセット免疫系の解析から. *臨床免疫・アレルギー科* 54: 477-483, 2010. 査読無

[学会発表] (計 42 件)

1. 亀谷美恵 他 免疫不全マウスを用いた非ヒト霊長類コモンマーモセットの造血幹細胞同定. 第46回日本無菌生物ノートバイオロジー学会 2013年1月 伊勢原・フォーラム 246

2. 北川 均, 安藤麻子 他: マイクロミニピッグの成長・CTによる骨と内臓サイズの変化. 医療用ミニ豚利活用セミナー in Tokyo. 2012年11月 東京

3. 津田万里, 亀谷美恵 他 日本人HLA汎親和性のHer-2ペプチドによる乳癌患者末梢血単核球反応性の解析. 日本組織適合性学会 2012年9月 東京・明治大学

4. 亀谷美恵 他 Human transitional B cells secrete antigen specific IgM in humanized NOG mouse. 第41回日本免疫学会 2012年12月 神戸国際会議場 2012年9月 岩手大学、盛岡

5. 角 佳憲, 安藤麻子 (7番目), 北川均 (8番目) 他 マイクロミニピッグではSLAハプロタイプ-0.37のホモ個体は産まれない. 第154回日本獣医学会学術集会 2012年9月 岩手大学、盛岡

6. 辻英里子, 安藤麻子 (9番目), 北川均 (10番目) 他 新しい実験動物ブタ マイクロミニピッグの身体・内臓サイズ. 第154回日本獣医学会学術集会2012年9月 岩手大学、盛岡

7. 安藤麻子 北川均 (8番目) 他 超小型実験動物用ブタのMHCタイプと体重との関連性. 第21回日本組織適合性学会大会 2012年9月 明治大学駿河台キャンパス、東京

8. 津田万里, 亀谷美恵 他 Human IL-4 transgenic NOG mouseにおける乳癌患者HLA型に依存する抗Her-2/neu抗体エピトープペプチドCH401の抗腫瘍効果の解析. 第10回日本臨床腫瘍学会 2012年7月 大阪

9. Ando A, Kitagawa H (8番目) et al. Assignment of SLA class II haplotypes and

outcome of the heterozygous breeding in microminipigs. 33 rd Conference of the International Society of Animal Genetics 2012年7月 Cairns Convention Center, Australia

10. 津田万里、亀谷美恵 他 Her2 部分配列を持つCH401MAP ペプチドの乳癌患者血液細胞に対する反応性の解析. 第20回日本乳癌学会 2012年6月 熊本

11. Kametani Y Transitional B cell development in humanized NOG mice. 3rd International Synthetic Immunology Workshop 2012年5月 京都・紫蘭会館

12. 安藤麻子 北川 均 (8番目) 他 マイクロミニピッグ: 超小型実験用ブタのMHCタイプと体重との関連性. 第59回日本実験動物学会総会 2012年5月 別府国際コンベンションセンター、別府

13. Kametani Y Humanized mouse as a model to study B cell differentiation. 1<sup>st</sup> Samsung Humanized Mice Symposium 2012年4月 Seoul Korea

14. 亀谷美恵 他 造血幹細胞のNOGマウスへの移植はtransitional B細胞分化を誘導する. 第40回日本免疫学会 2011年11月 幕張メッセ、千葉

15. Kametani Y et al. Immature phenotype of human B cells developed in humanized NOG mouse. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Humanized Mice 2011年10月 Pittsburgh, USA

16. 今枝紀明, 大場恵典, 高島 諭, 安藤麻子, 北川 均 MHC固定デュロック種近交系における勃起不全出現率. 第151回日本獣医学会学術集会 2011年9月 大阪府立大学、大阪

17. 安藤麻子 北川 均 (7番目) 他 抗病性育種の選抜家系におけるSLAタイプの特徴—SLAタイプと免疫関連形質との相関—. 第20回日本組織適合性学会大会 2011年8月 ツインメッセ静岡、静岡

18. 亀谷美恵 他 コモンマーマセット免疫系ツールの開発. 第23回日本比較免疫学会 2011年8月 海洋研究開発機構、横浜研究所、横浜

19. Ando A, Kitagawa H (8番目) et al. (Microminipigs: New SLA-defined Pigs for Biomedical Research. Swine in Biomedical Research International Conference 2011 2011年7月 Chicago, USA

20. 今枝紀明, 大場恵典, 安藤麻子, 北川 均 (7番目) 他 ブタ組織適合性抗原複合体ハプロタイプはブタの産肉能力や死亡率に影響を与えるか. 第150回日本獣医学会学術集会 2010年9月 帯広

21. 安藤麻子, 北川 均 (7番目) 他 抗病性育種の選抜家系におけるSLAタイプの特徴

—SLAタイプと選抜形質との相関—. 第19回日本組織適合性学会大会 2010年9月 東京 22 Ando A, Kitagawa H (8番目) et al.

Association of SLA-class II types and biological traits in selectively bred Landrace pigs. 9th International Veterinary Immunology Symposium 2010年8月 Tokyo

23. Kametani Y, et al. Analysis of T cell characters in common marmoset. 14th International Congress of Immunology 2010年8月 Kobe

24. Kametani Y Analysis of hematopoietic progenitor cells of common marmoset. 9th International Veterinary Immunology Symposium 2010年8月 Tokyo

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北川 均 (KITAGAWA HITOSHI)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 70144003

### (2) 研究分担者

大場 恵典 (OHBA YASUNORI)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 20377691  
亀谷 美恵 (KAMETANI YOSHIE)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号: 50338787  
安藤 麻子 (ANDO ASAKO)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40101935

### (3) 連携研究者