

## 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20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790986

 研究課題名（和文） XLA患者骨髄造血幹細胞移植 humanized マウスにおける  
ヒトB細胞の分化

 研究課題名（英文） Normal and Pathological Development of Human B Cells in Humanized  
Mice Transplanted with Normal and XLA patients.

研究代表者

土居 岳彦 (DOI TAKEHIKO)

九州大学・大学病院・特任講師

研究者番号：20572100

研究成果の概要（和文）：

X連鎖性無ガンマグロブリン血症（XLA）は *Btk* 遺伝子の異常により、B細胞数の減少と抗体産生不全をきたす疾患である。本研究において、ヒト化マウスを用いて、よりヒト XLA に近いモデルマウスの作製を行った。正常臍帯血から分離した造血幹細胞を移植したヒト化マウスと比較して、XLA患者の骨髄から分離した造血幹細胞を移植したマウスではB細胞の分化停止と血清免疫グロブリンの低下が認められた。XLAの病態解析や新規治療法を開発する上で有用かもしれない。

研究成果の概要（英文）：

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is a primary B cell deficiency and hypogammaglobulinemia due to the absence of the *BTK* gene. In this study, we generated human XLA mouse model using NOD/SCID/IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> mouse. The recipients engrafted with XLA patient human stem cells (HSCs) demonstrated significant pathology in human B cell development *in vivo*, including severe B cell maturation arrest and impaired immunoglobulin production, in contrast with the mice engrafted with normal human HSCs. These *in vivo* models of human hematopoiesis enable direct *in vivo* investigation of normal and pathological human B cell ontogeny and facilitate the development of therapeutic strategies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
11年度	1,100,000	330,000	1,430,000
12年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：ヒト化マウス、B細胞、原発性免疫不全症候群

## 1. 研究開始当初の背景

X連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia: XLA) は B 細胞分化障害を主体とする原発性免疫不全症候群の一つである。Btk 遺伝子の異常により B 細胞数の減少と無ガンマグロブリン血症を生じる。XLA のモデルマウスとして BTK 遺伝子異常をもつ CBA/N マウス (Murine X-linked immunodeficiency; XID マウス) が知られている。しかし末梢 B 細胞数の低下は正常マウスの 50%程度とマイルドであり、ヒト XLA の病態を必ずしも反映しているわけでない。ヒトとマウスにおいてなぜこのような相違点があるのかまだ明らかでない。

## 2. 研究の目的

ヒト造血幹細胞を移植した NOD/SCID/IL2 receptor gamma KO マウス (以下ヒト化マウス) はヒト造血幹細胞・免疫細胞システムを解析するうえで有用な動物モデルである。XLA 患者から採取した骨髄造血幹細胞をヒト化マウスに移植し、ヒト XLA を再現するマウスモデルを作成し、XLA の病態解析や治療法の開発への応用を基礎とすること目的として研究を行った。

今回の研究において2つの到達目標を設定した。(1) Linage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を新生仔期に移植したヒト化マウスにおける B 細胞分化について詳細な解析を行うこと。(2) XLA 患者骨髄由来造血幹細胞を新生仔ヒト化マウスに移植して XLA モデルマウスを構築し、ヒト XLA での所見を指標に B 細胞分化を評価し、他の免疫サブセットの構築についても評価を行うこと。

## 3. 研究の方法

(1) 正常ヒト造血能を持つヒト化マウスの作製方法

まず臍帯血由来 Linage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を新生仔期ヒト化マウスに移植し、正常造血能をもつヒト化マウスを作成した。インフォームドコンセントにより同意を得た臍帯血よりリンパ球分離用溶液を用いて単核細胞を分離した。セルソーターで Linage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞 (CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) を純化し、放射線照射を行った新生仔ヒト化マウスの顔面静脈より静注し細胞を移植した。

### (2) リンパ球サブセットの解析

移植から4ヶ月以上後、骨髄、胸腺、脾臓および末梢血を採取し、各臓器におけるヒト CD45<sup>+</sup>細胞の割合 (キメリズム) を算出した。ヒト CD3<sup>+</sup>T 細胞、ヒト CD19<sup>+</sup>B 細胞およびヒト CD33<sup>+</sup>骨髄系細胞の割合と絶対数を調べた。

### (3) B 細胞分化の解析

ヒト CD19<sup>+</sup>B 細胞を CD10、CD20、CD38、CD24、IgM および IgD で染色し、各臓器における ProB 細胞、PreB 細胞、Immature B 細胞、Transitional B 細胞および Mature B 細胞 (Naïve B 細胞) の割合を調べた。また脾臓を蛍光免疫組織染色し、形態学的な評価を行った。さらに脾臓 B 細胞をヒト CD40 抗体や各種サイトカインで刺激を行い、B 細胞の増殖能および免疫グロブリンクラススイッチについて解析した。

### (4) XLA 病態モデルの作成

上記の手法を用いて、インフォームドコンセントにより同意を得られた XLA 患者の骨髄細胞から Linage<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を分離し、新生仔期ヒト化マウスに移植した (以下 XLA マウス)。ヒト XLA では、B 細胞以外の免疫細胞数は正常であり、B 細胞数の減少と ProB 細胞から PreB 細胞への分化停止、低ガンマグロブリン血症が認められる。XLA マウスにおいてヒト XLA と同様の表現型が得られるか解析を行った。

#### 4. 研究成果

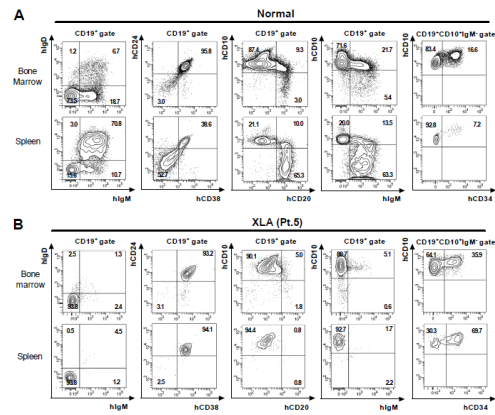
##### (1) リンパ球サブセットの解析

臍帯血由来正常造血幹細胞を移植したヒト化マウス（以下、コントロールマウス）ではT細胞、B細胞、NK細胞や樹状細胞を認めた。コントロールマウスと比較してXLAマウスでは骨髄、脾臓および末梢血で有意にB細胞の割合が減少していた。

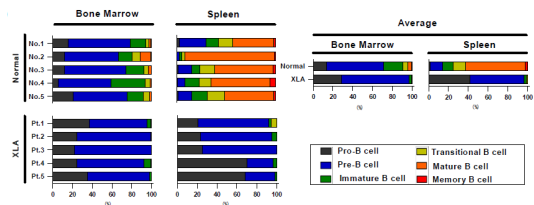
##### (2) B細胞分化

B細胞分化を調べるために、コントロールマウス末梢血、ヒト臍帯血およびヒト成人末梢血で比較を行った。ヒト臍帯血では、大部分がIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞であった。ヒト成人末梢血では多くがIgM<sup>low</sup>~<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞だったが、CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>メモリーB細胞も多く見られた。コントロールマウスの末梢血では、大部分がIgM<sup>low</sup>~<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞であった。CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞の頻度は臍帯血と同じ程度であり、ヒト成人末梢血と比べて低かった。コントロールマウスのB細胞は、ヒト臍帯血や成人末梢血と同一ではないが、成熟B細胞が末梢血中に循環していたことが分かった。

次にコントロールマウスの各臓器におけるB細胞分化について調べた（図1、図2）。骨髄ではB細胞の大部分がPre B細胞であった。脾臓ではIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B細胞が大部分であった。B細胞サブセットの頻度は個体差が認められるものの、ヒトB細胞の成熟が見られていた。一方で、XLAマウスの骨髄ではPro B細胞とPre B細胞が大部分を占めていた。脾臓ではB細胞分化が停止し、コントロールマウスと比較してPro B細胞とPre B細胞の有意な集積が見られた。フローサイトメトリーの結果を支持するように、免疫染色においてXLAマウスではIgD<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>B細胞が欠如していた。



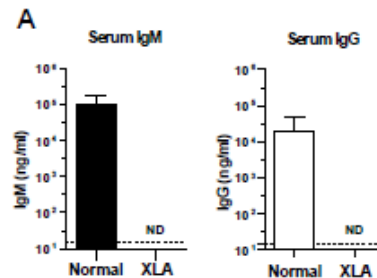
(図1 フローサイトメトリー結果)



(図2 B細胞サブセットの割合)

##### (3) B細胞の機能評価

コントロールマウスの脾臓細胞をヒト抗CD40抗体とIL-4で刺激を行ったところB細胞は増殖しIgGを産生した。また末梢血中の免疫グロブリン測定を行ったところIgMのみならず、IgG/A/Eの産生がみられた。一方で、XLAマウスについても同様の解析を行ったがin vitroにおけるB細胞の増殖および抗体産生は認められず、血清中の免疫グロブリンも欠如していた（図3）。



(図3 血清中の免疫グロブリン比較)

以上の結果から、正常ヒト造血細胞を移植したコントロールマウスでは未分化なProB細胞から成熟したNaiveB細胞、メモリーB細胞

胞まで広く B 細胞が分化していることを確認できた。血清中にヒト免疫グロブリンを認められた。一方で XLA 患者の骨髄から分離した造血幹細胞を移植した XLA マウスでは B 細胞が ProB 細胞から PreB 細胞に分化する過程で停止していた。血清中にも免疫グロブリンを認めなかった。以上の結果から、ヒト化マウスを用いてヒト XLA の病態をもつマウスモデルを作成できることが示された。現在、このモデルを用いて遺伝子治療に関する研究を行っており、レンチウイルスベクターに *BTK* 遺伝子を搭載し、ヒト造血幹細胞に遺伝子導入が可能であるかどうか検討を行っている。ヒト XLA の病態を反映するモデルマウスを使用することによって病態の解析や新規の治療法開発を行うことができるかもしれない。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①第 38 回日本免疫学会総会・学術集会

ヒト化マウスにおけるヒト B 細胞機能と原発性免疫不全症モデルへの応用

Doi Takehiko, Takada Hidetoshi, Kanegane Hirokazu, Tomizawa Mariko, Nakayama Toshinori, Ohara Osamu, Miyawaki Toshio, Hara Toshiroh, Ishikawa Fumihiko

2008 年 12 月 1 日～3 日 京都

②第 112 回日本小児科学会

ヒト化マウスにおけるヒト B 細胞解析と新規 XLA マウスモデル確立への応用

土居 岳彦, 高田 英俊, 金兼 弘和, 宮脇 利男, 原 寿郎

2009 年 4 月 17 日～19 日 奈良

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

土居 岳彦 (DOI TAKEHIKO)

九州大学・大学病院・特任講師

研究者番号：20572100