

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590561

研究課題名(和文) ヒト液性免疫反応を惹起できるヒト化マウスの開発

研究課題名(英文) Development of humanized mouse with functional immune systems

研究代表者

高橋 武司 (Takahashi, Takeshi)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・室長

研究者番号：80335215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：重度免疫不全NOGマウスにヒト免疫系を再構築するヒト化免疫マウス技術における大きな課題の一つはヒト獲得免疫機能が不全であることである。なかでも液性免疫反応が不十分で、外来抗原刺激に対し抗原特異的IgG反応はほとんど誘導されない。この課題の解決のためにヒトHLA-DR4をNOGマウスに導入した新規マウスを開発した。このHLA-DR4NOGマウスに同じハプロタイプを有する造血幹細胞を移植したヒト化マウスでは抗原特異的IgG反応が誘導できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Humanized mice, in which human hematopoietic and immune systems are reconstituted in severe immunodeficient NOG mice by transplanting human hematopoietic stem cells, have a lot of attention. In the humanized mouse, humoral immune responses against exogenous substances are generally weak. IgG responses, especially, have been difficult to induce. To improve the immune systems, we established a novel mouse strain which expresses human HLA class II genes. We found that the HLA-DR4 expressing NOG mice could produce antigen specific human IgG responses, when they were transplanted with HSC from HLA-haplotype identical donors. This model will be useful to study human immune responses and in developing various therapeutic drugs.

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：ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

免疫不全マウスに様々なヒト組織を移植し、その機能を調べるヒト化動物の作製が活発に試みられている。近年の超免疫不全マウス NOD/scid/gcnull(NOG)マウスの開発によりヒト正常組織の生着が可能になるに至り、このようなヒト化マウスが医学生物学に果たす役割がクローズアップされている。我々はなかでもヒト造血幹細胞の移植により NOG マウスに疑似ヒト血液免疫系を再構築し、ヒト免疫反応やヒト免疫関連疾患の再現を試みてきた。しかし研究が進むにつれて、ヒト化 NOG マウスを用いたヒト免疫反応は極めて制限されたものであることが明らかになってきた。その代表的な例として、ヒト化マウスを抗原で免疫しても抗原特異的な IgG がほとんど検出されないことがあり、この原因として T 細胞の不活性化、B 細胞の分化停滞、T 細胞がマウス MHC に拘束されて、ヒト HLA を認識できないなどが考えられた。そこで、NOG マウスに HLA-DR を導入したマウスを作製し、ドナー血液幹細胞 HLA と適合させ、ヒト化マウスにおいてヒト液性免疫が惹起できるかを検討した。また、NOG マウスの高度なリンパ球減少(リンフォペニア)環境での T 細胞増殖を抑制し、ナイーブ T 細胞の回復を目的に胸腺上皮細胞に cyclinD1 を発現するマウスを作製した。

2. 研究の目的

ヒト化マウスにおいて、ヒト液性免疫反応を惹起し、機能的免疫反応を実現することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) HLA-DRA/DRB1 発現トランスジェニック NOG マウス (NOG-DRtg) の作製

マウスクラス II プロモーター下流に HLA-DRA 及び DRB1 遺伝子の cDNA を繋げたプラスミドを NOG/NOD ヘテロマウスの受精卵にマイクロインジェクションし、NOG-DRtg を作製する。

2) HLA-DRtg マウスへのヒト造血幹細胞の移植

ヒト造血幹細胞を臍帯血より磁気ビーズ法により単離し、HLA-DR ハプロタイプの検査後、X 線照射 HLA-DRtg マウスに移植し、経時的に採血によりヒト細胞の発分化を確認する。

3) HLA-DRtg マウスを外来抗原により免疫し、抗原特異的 IgG の産生を ELISA 法により検出する

4) ケラチンプロモーター下で cyclinD1 を発現する (K5-cyclinD1) NOG マウスを作製する。

4. 研究成果

1) HLA-DRB1*0405, 0901, 1502 マウスの作製を HLA-DRA とともに発現するトランスジェニックマウスを作製した。このうち末梢 B 細胞、胸腺上皮細胞で HLA-DR 分子が高く発現

する HLA-DR4tg マウスを用いて実験を行った。本マウスは更にマウス MHCII 分子を欠損させた I-A^o/o マウス(I-A^o)の背景に置換済みであり MHCII 分子としてはヒト HLA-DR9 のみを発現する。

HLA-DR9, HLA-DR15 マウスについては樹立済みであるが、HLA-DR の発現が低く、今後解析していく必要がある。

2) ヒト造血幹細胞を HLA-DR4 I-A^otg マウスに移植し、ヒト免疫系の再構築を行った。NOG マウスと同様にヒト化が可能であることが明らかになった。

次に、HLA-DR4 適合の幹細胞と不適合の幹細胞を移植することにより、ヒト化の状態に違いがあるか検討した。HLA-DR4 適合状態のヒト化マウスでは HLA-DR 不適合ヒト化マウスと比較してエフェクターメモリー CD4T 細胞の顕著な増加が認められた。このことから HLA の適合が T 細胞ホメオスタシスに影響を与えていることが明らかとなった。

3) ヒト造血幹細胞を移植した HLA-DR4 I-A^otg マウスを卵白アルブミン(OVA)/アラムで免疫することによりヒト化マウス内で OVA 特異的 IgG が産生されるかを検討した。週 1 回の免疫を 3 回繰り返したのちにマウス血清中の IgG 力価を測定したところ、HLA-DR 適合臍帯血を移入したヒト化マウスでのみ有意な OVA 特異的 IgG が検出された。HLA-DR 4 不適合臍帯血の移植によっては IgG は産生されなかった。このことからヒト化マウスにおける液性免疫の誘導には NOG マウスとドナー臍帯血の HLAII の適合が必須であることが明らかになった。

4) B6 で作成された K5-cyclinD1 は胸腺肥大を起こすことが知られているので、このマウスを NOG 背景に置き換えヒト化マウスの胸腺に与える影響を検討した。しかし、cyclinD1tg NOG マウスは、ヒト造血幹細胞移植しなくても 4 か月程度で全身衰弱を発症し、実験遂行が不可能であった。比較的健康的な状態を保っていた一部のヒト化マウスで早期に解析を行ったところ、胸腺が通常の NOG マウスと比較して肥大しており、胸腺上皮に cyclinD1 を発現させることにより T 細胞の供給を改善できる可能性が示唆された。組織特異的なプロモーターにより cyclinD1 を発現させることを検討している。

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 6 件)

1. Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, Ida-Tanaka M, Suemizu H, Nunomura S, Ra C, Mori A, Aiso S, Ito M. Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF-Transgenic NOG Mice.

Journal of Immunology. 191,2890-2899, 2013 査読有り

2. Kawabe T, Sun SL, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T, Ishii N

Homeostatic proliferation of naive CD4+ T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. Journal of Immunology, 190,5788-5798, 2013 査読有り

3. Sun SL, Horino S, Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Funayama R, Ishii N.

Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. Journal of Immunology, 190,6209-6220, 2013 査読有り

4. Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N.

Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice.

PLoS One, 7(6), e37892, 2012 査読有り

5. Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M.

Current advances in humanized mouse models. Cell Mol Immunol. 9(3), 208-214, 2012

6. Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, Sugamura K.

Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γcnll mouse. Int Immunol. 24, 243-252, 2012 査読有り

〔学会発表〕(計 21 件)

1) 伊藤亮治、片野いくみ、高橋武司、川井健司、上迫努、布村聡、相磯貞和、伊藤守. ヒト IL-3/GM-CSF トランスジェニック NOG マウスを用いたヒトアレルギーモデルの開発. 第 60 回日本実験動物学会総会、つくば/茨城, 15-17/5/2013.

2) Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Kenji Kawai, Satoshi Nunomura, Chisei Ra, Akio Mori, Sadakazu Aiso, Mamoru Ito. IgE-mediated allergic responses in human mast cells in humanized NOG mice expressing human IL-3 and GM-CSF. 15th International Congress of Immunology, Milano, 22-27/8/2013.

3) Ikumi Katano, Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Mamoru Ito. Functional NK cells developed from human hematopoietic stem cell in human interleukin-2 transgenic NOG mice. 15th International Congress of Immunology, Milano, 22-27/8/2013.

4) Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Ryoji Ito, Mamoru Ito. Retrogenic expression of human TCR in HLA-DR4 transgenic NOG mice. 5th International Congress of Immunology, Milano, 22-27/8/2013.

5) Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Ikumi

Katano, Kenji Kawai, Mamoru Ito. Human mast cell mediated allergic responses in humanized NOG mouse expressing human IL-3 and GM-CSF. 4th International workshop on humanized mice, Seoul, 30/9-2/10/2013.

6) Ikumi Katano, Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Mamoru Ito. Predominant development of mature and functional human NK Cells in a novel human IL-2 producing transgenic NOD-scid, IL-2Rg KO (NOG) mouse. 4th International workshop on humanized mice, Seoul, 30/9-2/10/2013.

7) Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Ryoji Ito, Mamoru Ito. Retrogenic expression of human TCR in HLA-DR4 transgenic NOG mice. 4th International workshop on humanized mice, Seoul, 30/9-2/10/2013.

8) 高橋武司、片野いくみ、伊藤亮治、伊藤守. Retrogenic expression of human TCR in HLA-DR4 transgenic NOG mice. 第 42 回日本免疫学会. 幕張/千葉, 11-13/12/2013.

9) 片野いくみ、高橋武司、伊藤亮治、伊藤守. Characterization of human Eosinophil in HSC-transferred NOG-human IL-5 transgenic mice. 第 42 回日本免疫学会. 幕張/千葉, 11-13/12/2013.

10) 伊藤亮治、片野いくみ、高橋武司、伊藤守. Pathology of cutaneous xeno-GVHD in human CD4 T cell transplanted NOG mice. 第 42 回日本免疫学会. 幕張/千葉, 11-13/12/2013.

その他 11 報

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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)
実験動物中央研究所・実験動物研究部
免疫研究室・室長

研究者番号：80335215

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：