

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300155

研究課題名(和文) 生物医学研究推進のためのマーモセットMHC情報の総合的理解と研究基盤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of comprehensive MHC information in common marmoset for biomedical studies

研究代表者

椎名 隆 (SHIINA, Takashi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00317744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、コモンマーモセットの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)遺伝子における多型解析、多検体を用いたMHC遺伝子のDNAタイピング、MHC発現により機能する免疫担当細胞の解析、マーモセット特有の問題であるマイクロキメリズムの排除法の開発、MHCクラス 分子に対するモノクローナル抗体の作製、免疫解析ツールの開発および標準臓器・組織アトラスの作成など多型、発現および機能の多面的な観点から、これまで研究報告の乏しかったマーモセットのMHCやそれを取り巻く免疫関連分子についての特徴付けを行ったとともに本知見を速やかに生物医学研究に提供しうる環境基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we characterized major histocompatibility complex (MHC) and MHC-related genes and molecules in common marmosets (*Callithrix jacchus*) by performing polymorphism, expression and functional analyses of such as polymorphism analysis and next generation sequencing based genotyping using 85 related and unrelated animals, specification of immune cells that are driven by MHC expression using flow cytometry, removal method for micro-chimeric cells using GFP transgenic marmoset, development of monoclonal antibodies against MHC class I molecules, development of analysis tool for typing of T cell receptor genes and quantitation of cytokines, and preparing specimens from standard organs and tissues for future immunological studies.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：マーモセット MHC 遺伝子多型 遺伝子発現 遺伝子機能 免疫

## 1. 研究開始当初の背景

真猿類新世界ザルに属するコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) は、体重が 200~500 g と小柄であること、性格が比較的穏やかであること、繁殖においては年 2~3 産で 1 回に 2~3 仔を出産するという次世代の得やすさから動物側の各種要因を均一に揃えた同一条件の実験群とコントロール群に分けての実験が可能であるという利点が挙げられる。また、iPS 細胞樹立とそれに基づく移植・再生医学研究、脳科学研究、発生工学研究、がん研究、感染症研究および遺伝子改変動物技術の開発とそれに基づく遺伝子機能解析など多岐に渡る基礎研究や安全性試験 (毒性試験、依存性試験、生殖毒性試験など)、薬物動態試験、薬効薬理試験などの非臨床試験に国内外を問わず古くから頻繁に利用されていることから、マーモセットにおける生物医学研究は今後も加速的に進展することが有望視されている。マーモセットはこのような高い資質、需要、将来性を有することから、種々の生物医学研究に活用されているが、その研究基盤を圧倒的に弱めている唯一の問題点は遺伝子多型、発現ならびに機能を含めた遺伝情報が全般的に考慮されていないことである。遺伝情報の中でも、自己あるいは非自己由来ペプチドを T リンパ球に提示させ、種々の免疫応答を開始させる働きを担う主要組織適合遺伝子複合体 (major Histocompatibility Complex; MHC) における遺伝情報の総合的理解と基盤整備は国内外ともにニーズが高く、かつ緊急性を要する。例えば、再生医療分野における iPS 細胞の安全性評価のためには、移植の際のドナーと受容個体 (レシピエント) との間の MHC 型を一致させることは拒絶反応回避に必須である。その際、iPS 分化細胞や受容部位にて発現する MHC 分子の種類や抗原提示能など、その多型に基づく MHC 発現や MHC 機能を明確にすることも不可欠である。したがって、MHC 多型情報、MHC 発現情報ならびに MHC 機能情報を網羅的に収集し、その情報を速やかに生物医学研究に活用するシステム構築こそが解決されるべき急務の課題であると考えられる。

ヒトやマウスなどの一般的な MHC 多型解析を進める場合、両親由来の MHC 遺伝子のみを調べればよいが、マーモセットの場合、マイクロキメリズムという大きな問題を考慮しながら多型解析を進めなくてはならない。マイクロキメリズムとは、血液細胞が高いキメラ率を示すことを指し、発

生初期に共有する胎盤を通して幹細胞の受取が兄弟間で起きることに起因する。これまではその優れた解析技術がなかったことから、MHC 遺伝子の多型性や MHC ハプロタイプ構成などの MHC 情報は全く不明であると言っても過言ではない。現実に IPD-MHC データベースには、51 種類のマーモセットの MHC 遺伝子しか登録されていない。したがって、他個体より流入してきた MHC 多型を排除する解析技術を開発しながら、その個体が両親から受け継がれた真の MHC 多型を検出する必要がある。もう一つの大きな問題は、マーモセット MHC 遺伝子の機能的分類がなされていないことである。すなわち、MHC 遺伝子クラス 遺伝子とクラス 遺伝子に大別されるが、マーモセットのクラス 遺伝子構成はヒト MHC (human leukocyte Antigen; HLA) である *HLA-DR*, *HLA-DQ* および *HLA-DP* 座位と同様の遺伝子セットを有することからヒトとの間の保存性が高い。その一方、HLA クラス 遺伝子の場合、ほとんどの細胞上に発現し、多型性に富む古典的 HLA クラス 遺伝子 (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) と発現部位が限定され、多型性に乏しい非古典的 HLA クラス 遺伝子 (*HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G*) に分類されるが、マーモセットの場合、そのような MHC 機能情報は全く不明であり、MHC 多型を検出するとともに、各 MHC 遺伝子の発現パターンを見極め、各 MHC 遺伝子の機能を明確にする必要がある。

このような問題点を解決するために、申請者らは 12 年前より科学研究費特定領域研究ならびに関連研究機関との共同研究を通じて、マーモセット MHC 領域における遺伝子地図の作成やゲノムシーケンシングなどの大規模なゲノム解析を実施した。この過程で、MHC 領域約 4 Mb を網羅する遺伝子地図を作成し、それを他霊長類と比較した結果、MHC クラス 遺伝子の重複領域を除いてはヒト、チンパンジー、アカゲザルと比較してよく保存されていることを明らかにした。そこで種間の違いの大きい MHC クラス 遺伝子の重複領域について、約 1.6 Mb のゲノム塩基配列を決定した結果、発現可能な遺伝子構造を持つ 5 個の *HLA-B* 様遺伝子 (*Caja-B*) と 5 個の *HLA-A* 様の遺伝子 (*Caja-G*) を同定した。さらに、これら遺伝子における遺伝子発現を、末梢血由来 RNA を用いて予備的に調べた結果、複数の *Caja-G* の発現が観察されたものの、*Caja-B* の発現は認められなかった。よって、

マーモセットはヒトと類似する MHC クラス 遺伝子セットを有するが、それら MHC 機能はヒトとは異なり、マーモセット独自の進化を辿っている可能性があることから考えられ、単に MHC 多型のみならず、それらの発現や機能を含めてマーモセット MHC を総合的に理解すべきであると結論付けた。そこで本研究課題ではマイクロキメリズムを考慮し、従来培ってきた技術や知見をさらに展開させ、MHC 多型、発現、機能の多面的な MHC 情報を総合的に理解し、その情報を速やかに生物医学研究に活用するために、「生物医学研究推進のためのマーモセット MHC 情報の総合的理解と研究基盤の開発」という着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではマイクロキメリズムを考慮し、従来培ってきた技術や知見をさらに展開させ、MHC 多型、発現、機能の多面的な MHC 情報を総合的に理解し、その情報を速やかに生物医学研究に活用する研究基盤を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

**MHC 遺伝子の多型解析法：**MHC クラス I 遺伝子の翻訳領域全長を増幅させる PCR プライマーは、2006 年に報告されたプライマー (Prasad et al, J Immunol Methods 314: 153-163, 2006) ならびにマーモセット MHC 領域のゲノム配列 (Shiina et al, Immunogenet. 2011; Kono et al. J. Immunol. 2014) をもとに設計する。血縁個体や非血縁個体の末梢血や組織より抽出した RNA を用いて、PCR を行い、得られた PCR 産物のサブクローニングを行う。1 サンプルあたり 12~24 個のサブクローンの塩基配列をサンガー法により決定することにより、Caja クラス I アリル配列を得る。

**次世代シーケンシング(NGS) による MHC 遺伝子の DNA タイピング法：**前述の多型解析から得られる Caja クラス I アリル配列から多型に富む領域を含み、かつ保存性の高い部位に NGS 用 PCR プライマーを再設計する。また、クラス 遺伝子である *Caja-DRB* 遺伝子についても IPD-MHC データベースにて公開されている既知アリル情報に基づいて Caja クラス I と同様に設計する。RT-PCR 後、Roche GS Junior system を用いたアンプリコンシーケンシング法により塩基配列を決定し、サブクローニング法による結果と比較する。

**MHC 発現により機能する免疫担当細胞の**

**解析法：**NK 細胞、ミエロイド系細胞、造血幹細胞等を同定するために、各種ヒト抗体およびマーモセット抗体を用いてマーモセット血液細胞およびリンパ組織細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いてセルソーターで分離・精製する。MK 活性、マスト細胞活性、造血幹細胞の多分可能解析はそれぞれ常法に基づいて行う。

**マイクロキメリズムの可能性の排除法：**母体に野生型マーモセット、胎児に GFP マーモセットを用い、それぞれの組織を識別可能とする系を作製する。両組織がキメラとなっている胎盤を中心に、各リンパ組織およびその組織に局在する細胞を調製し、非血球成分(脱落膜細胞、絨毛トロフォブラスト)についてはコラゲナーゼ処理を行い採取する方法を確立する。これら調製した細胞の各種マーカーを認識する蛍光抗体にて染色し、フローサイトメーターにより解析する。

**MHC クラス 分子に対するモノクローナル抗体の作製法：**セルソーターにて母体と胎仔の細胞画分を精製した RNA から胎盤とその他の組織に発現する MHC クラス 遺伝子を前述の方法で検索する。この過程で遺伝子発現が確認された MHC およびマーモセット  $\beta 2$  ミクログロブリン由来の cDNA を発現ベクターに組み込み、トランスフェクタントを作成する。さらに、これら遺伝子を共発現させた 2 種類の親株を用いてトランスフェクタントを作製し、それを元に免疫およびアレイスキャンを用いたスクリーニングを行う事によってモノクローナル抗体を作製する方法を開発する。

**免疫解析ツールの開発法：**Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセット、コモンマーモセット TCR レパトア解析系を確立する。

**標準臓器・組織アトラスの作成法：**コモンマーモセットにおける病理学的評価を実施するためには、正常組織における基礎的情報が必要になる。したがって標準臓器・組織アトラス作成のため、健常コモンマーモセットより組織を採取し、組織標本を作製する。

## 4. 研究成果

**MHC 遺伝子の多型情報：**サブクローニング法にて計 49 種類の Caja クラス 遺伝子の塩基配列が得られた。そこで、各アリル配列に共通な位置(エクソン 2 とエクソン 4)にプライマーを設計し、次世代シーケンサー-GS Junior System (ロシユ) のアンブ

リコンシークエンシングプロトコールにより塩基配列を決定し、サブクローニング法による結果と比較することにより NGS 法の有用性を評価した。13 頭の sib を含む 85 頭を用いた *Caja* 遺伝子の多型解析の結果、サブクローニング法では 1 個体あたり 5~15 種類の *Caja* クラス 配列が検出されたのに対して、NGS 法では 1 個体あたり 11~17 種類が検出された。得られた多型情報から、少なくとも 10 種類の *Caja-G* Hp が推定され、ハプロイドあたり 2~7 個の発現 *Caja-G* 遺伝子が検出された。以上の結果より、本研究にて開発した DNA タイピング法は、移植研究の際のドナーとレシピエントの選抜や MHC 情報付加マーマセットの系統化などに有用であると考えられた。

**MHC を発現する造血系細胞の同定:** MHC を発現する造血系の細胞として、マスト細胞、NK 細胞、造血幹細胞が同定された。特に造血幹細胞としては、CD117 を発現する骨髓細胞を重度免疫不全マウスである NOG マウスに移植することによりマーマセット細胞が生着し、マスト細胞を含むミエロイド系、および T 細胞、B 細胞を含むリンパ球系に分化する事を明らかにした。以上の結果、CD117 がそのマーカーであることが明らかとなった。

**マーマセット胎盤における MHC 発現の解析;** MHC の発現は、ヒト、マウス等では胎盤で古典的 MHC クラス 遺伝子の発現が低下し、非古典的 HLA-G の発現が亢進することが明らかにされている。そこで、胎盤に特に発現する MHC クラス 遺伝子を同定することを試みた。まず、GFP マーマセット胎仔と野生型母親のキメラ胎盤組織の免疫組織化学的解析により、マーマセット胎盤においても、古典的 MHC の発現がトロフォブラストで低下している事が明らかにされた。次いで、リンパ球マーカーとして CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD16 を用いて各種リンパ球を同定し、さらにトロフォブラストマーカーとしてこれらが陰性で TrkB 陽性の画分を同定し、マーマセット胎盤から Th 細胞、Tc 細胞、B 細胞、NK 細胞およびトロフォブラストをセルソーターにより精製した。その結果、90%以上の精製度を得ることが出来た。また、GFP マーマセットを用いることにより、これら血液系の細胞群の母子の由来を明確にすることも可能となった。これらのうち、*Caja-B* 遺伝子の cDNA を作製し、現在マウスリンフォーマ細胞株である A20 および HEK293 を用いたトランスフェクタントの作製を行

っている。

**MHC 特異的抗体の作製法確立:** 一方、MHC に対するモノクローナル抗体の作製は容易ではなく、方法論の確立が重要であった。我々は、既に構造が明らかになっており、発現が確認されているブタ古典的 MHC である SLA-1 遺伝子を用いて、MHC モノクローナル抗体の作製法を開発し、ブタ MHC クラス アリル特異的な抗体を得た。これらの特許として出願した。本法を用いて、今後 *Caja-B* 遺伝子に対する抗体を作製する準備が確立された。

**Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析:** ウイルス感染に伴う炎症性サイトカインの変化を検出するため、免疫関連の細胞表面抗原および炎症性サイトカイン、それらの数値を補正するためのハウスピーキング遺伝子に対する特異的プライマーを設計した。それらの内の 4 個の遺伝子 (CD14, IL-1a, IL-1b, IL-12b) は本実験によって初めて同定したものである。

**TCR レパトア解析系の確立:** TCR レパトア解析を確立するために、まずコモンマーマセットにおける TCR 遺伝子を同定する必要があった。これまでに TCR における 鎖および 鎖可変領域 (TRAV, TRBV) 遺伝子の同定が完了した。TCR 鎖遺伝子は過去に他のグループで報告された遺伝子群とオーバーラップした TCR ファミリーも含まれたが、Adaptor-Ligation mediated PCR (AL-PCR) によって増幅された TCR 遺伝子に対して 1000 クローンに及ぶシーケンス解析を実施した結果、最終的に 35 の新規 TRAV 遺伝子、21 の新規 TRBV 遺伝子を同定した。これによりコモンマーマセットでは、各 35 種類の TRAV および TRBV 遺伝子が発現することが確認された。これらの情報を基に、TCR レパトア解析系を構築するため、既にヒトおよびマウスにおいて確立された TCRV レパトア解析法を参考にしながら、コモンマーマセット TCRV 遺伝子配列に検出用 DNA プローブの選定し、microplate hybridization 法による定量的・網羅的検出系を確立した。

**標準臓器・組織アトラスの作成:** 採取された全身の臓器に対して、HE 染色および免疫学的染色手法を用いて、他の動物との差異について現在解析中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Common marmoset CD117-positive hematopoietic cells possess multipotency. Shin Shimada, Satoshi Nunomura, Shuya Mori, Hiroshi Suemizu, Toshio Itoh, Shuji Takabayashi, Yoshinori Okada, Takashi Yahata, Takashi Shiina, Hideki Katoh, Ryuji Suzuki, Kenzaburo Tani, Kiyoshi Ando, Hideo Yagita,

Sonoko Habu, Erika Sasaki, Yoshie Kametani. *Int Immunol*. In press. (査読有)

2. NKG2D functions as an activating receptor on natural killer cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). Watanabe M, Kudo Y, Kawano M, Nakayama M, Nakamura K, Kameda M, Ebara M, Sato T, Nakamura M, Omine K, Kametani Y, Suzuki R, Ogasawara K. *Int Immunol*. 26(11): 597-606, 2014. (査読有)

3. Genomic sequence analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I G/F segment in common marmoset (*Callithrix jacchus*). Kono A, Brameier M, Roos C, Suzuki S, Shigenari A, Kametani Y, Kitaura K, Suzuki R, Inoko H, Walter L, Shiina T. *J. Immunol*. 192(7): 3239-3246, 2014. (査読有)

4. エストロゲンと胎盤形成；新たな非ヒト霊長類コモンマーモセットを用いたヒト妊娠免疫モデルの提案 亀谷美恵、宮本あすか、石本人史、和泉俊一郎 比較内分泌学. 40(151): 11-13, 2014. (査読無)

5. 非ヒト霊長類コモンマーモセット免疫系の重度免疫不全マウスへの移植による再構築 亀谷美恵、嶋田新、森修弥、佐々木えりか、安藤潔. *J. Germfree life and Gnotobiol* 43(2): 113-118, 2014. (査読有)

6. Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K., Suzuki S., Takasaki T, Kumagai K., Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S., Katoh H., Hamada Y., Kurane I, Suzuki R. *PLoS ONE* 8(2) e56296, 2013. (査読有)

7. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. *J Immunol Methods* 384: 81-91, 2012. (査読有)

8. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). Nunomura S, Shimada S, Kametani Y, Yamada Y, Yoshioka M, Suemizu H, Ozawa M, Itoh T, Kono A, Suzuki R, Tani K, Ando K, Yagita H, Ra C, Habu S, Satake M, Sasaki E. *Int. Immunol* 24: 593-603, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. Improved Hematopoietic Differentiation of Primate Embryonic Stem Cells Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi,

Hiroataka Kawano, Yoshie Kametani, Kenzaburo Tani. 56<sup>th</sup> AHS Annual meeting and exposition San Francisco, CA December 6-9, 2014.

2. Analysis of immune cells in the fetal/maternal interface of the primate placenta. Kametani Yoshie, Numao Erina, Mori Shuya, Kinami Rihito, Kitaura Kazutaka, Shiina Takashi, Suzuki Ryuji, Sasaki Erika. The 43<sup>rd</sup> Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2014. Dec. 10-12, Kyoto, Kyoto International Conference Center

3. 森修弥、沼尾絵里奈、大島志乃、嶋田新、岡原純子、佐々木えりか、鈴木隆二、石本人史、椎名隆、亀谷美恵. コモンマーモセット胎盤における妊娠免疫系の解析 2014年5月17日. 第61回日本実験動物学会総会 札幌・札幌コンベンションセンター

4. 椎名隆、重成敦子、森修弥、北浦一孝、亀谷美恵、鈴木隆二. コモンマーモセット MHC 遺伝子に置ける DNA タイピング法の開発と多型解析 2014年5月17日 第61回日本実験動物学会総会 札幌・札幌コンベンションセンター

5. 北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、亀谷美恵、倉根一郎、鈴木隆二. コモンマーモセットにおけるリアルタイム PCR を用いた免疫関連遺伝子発現解析 2013年5月16日第60回日本実験動物学会総会 茨城・筑波国際会議場

6. 亀谷美恵、嶋田新、森修弥、佐々木えりか、安藤潔. 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26日フォーラム 246

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：ブタ主要組織適合性抗原(MHC) SLA-1 を特異的に認識するモノクローナル抗体

発明者：亀谷美恵

権利者：安藤麻子、大島志乃、平山令明

種類：特許

番号：特願 2015-004905

出願年月日：2015/01/14

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕  
特になし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

椎名 隆 (SHIINA, Takashi)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：00317744

### (2)研究分担者

亀谷美恵 (KAMETANI, Yoshie)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：50338787

### (3)研究分担者

鈴木隆二 (SUZUKI, Ryuji)  
独立行政法人国立病院機構・臨床研究センター・室長  
研究者番号：70373470

### (4)連携研究者

佐々木えりか (SASAKI, Erika)  
実験動物中央研究所・応用発生学研究部・部長  
研究者番号：70390739