

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871075

研究課題名(和文) ヒトNK細胞が増殖する新規ヒト化マウスによる in vivo細胞傷害性試験系の開発

研究課題名(英文) Development of in vivo cytotoxicity assay system using humanized mice increasing human natural killer cells

研究代表者

片野 いくみ (Katano, Ikumi)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90442558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト造血幹細胞移植後ヒトNK細胞が優位に分化したNOG-hIL-2 TgマウスにヒトCCR4陽性腫瘍株L428を移植し、抗CCR4抗体を投与することで抗体依存性細胞傷害活性を評価し得る in vivo ADCCモデルを確立した。ヒトNK細胞の成熟度を向上させるためNOG-hIL-15 Tgマウスを樹立した。NOG-hIL-15 Tgマウスは、ヒト造血幹細胞を移植するとヒト成熟NK細胞が顕著に分化・増幅し、また、ヒト血液由来成熟NK細胞を移植すると増幅し3カ月以上維持され、ヒト腫瘍株K562に対する細胞傷害活性も認められたことから、生体内でのヒトNK細胞の解析に適した系統だと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that human NK cells are predominately developed in NOG-hIL-2 Tg mice after human hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. In this study, we assessed in vivo antibody-dependent-cellular-cytotoxicity (ADCC) activity using human HSC-transferred NOG-hIL-2 Tg mice engrafted with CCR4 expressing Hodgkin's lymphoma cell line L428. After treatment with an anti-CCR4 antibody, tumor growth was slightly suppressed in NOG-hIL-2 Tg mice. To improve the function of NK cells, we generated a NOG-hIL-15 Tg mouse. Although human mature NK cells were dominantly differentiated in NOG-hIL-15 Tg mice, they immediately died within 8 weeks after HSC transplantation. In contrast, human peripheral blood-derived mature NK cells succeeded to be maintained over 3 months after transplantation without death. Moreover, these NK cells showed in vivo cytotoxic activity against engrafted K562 cells. Therefore, NOG-hIL-15 Tg mice are useful tools for investigation of in vivo NK cytotoxicity.

研究分野：免疫学、実験動物学

キーワード：ヒト化マウス NK細胞 ヒト免疫 hIL-2 hIL-15

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 超免疫不全 NOD/Shi-scid,IL-2Rg KO (NOG)マウスは、ヒト造血幹細胞(HSC)を移植すると様々なヒト免疫細胞が分化しヒト疑似免疫系の再構築が可能であることから、生体内でのヒト免疫の機能解析に役立つことが期待されている。

(2) 申請者は、ヒト免疫細胞の分化能をさらに向上させることを目的とし、ヒトT細胞およびNK細胞の分化・増幅・活性化に寄与するヒトインターロイキン-2(hIL-2)遺伝子をNOGマウスへ導入したNOG-hIL-2トランスジェニック(Tg)マウス系統を樹立した。NOG-hIL-2 Tgマウスにヒト臍帯血由来HSCを移植してヒト化することで、ヒトCD56陽性NK細胞が劇的に分化・増殖することが判明した。さらに詳細に解析した結果、NK細胞に特異的な細胞表面抗原や細胞傷害顆粒を発現するなど、ヒト末梢血中の成熟NK細胞に極めて類似した特徴が認められた。

(3) NOG-hIL-2 Tgマウスで、ヒトHSCより分化したヒトNK細胞がヒト腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示すか、ヒトNK細胞に感受性を持つヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562を用いて検証した。ヒト化NOG-hIL-2 Tgマウスより採取したヒトNK細胞とK562とを共培養した結果、細胞傷害活性が認められた。また、ヒトHSC移植し、ヒトNK細胞が十分に分化した状態のヒト化NOG-hIL-2 TgマウスへK562を皮下移植した結果、ヒト化NOGマウスと比較し、K562腫瘍の成長が著しく抑制された。以上の結果から、NOG-hIL-2 Tgマウス環境でヒト造血幹細胞から分化したヒトNK細胞は、細胞傷害活性を有する機能的かつ成熟したNK細胞であることが示された。

## 2. 研究の目的

(1) NOG-hIL-2 Tgマウスを用いることで、生体内でヒトNK細胞が関与する免疫反応を検証できる画期的な動物モデルを作製することが可能であると考えられた。従って、ヒト化NOG-hIL-2 Tgマウスに、K562以外のヒト腫瘍細胞株を用いて生体内細胞傷害試験系を確立する。また、臨床で用いられている治療用ヒト型抗体を使用し、マウス生体内で抗体依存性細胞傷害(Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity: ADCC)活性を評定できるin vivo試験系の確立を目指す。

(2) 機能的NK細胞の分化・成熟にIL-15の重要性が報告されていることから、NOG-hIL-2 Tgマウスで分化したヒトNK細胞にhIL-15の刺激を加えることでヒトNK細胞の成熟度がより高まる可能性が考えられた。従って、NOGマウスにヒトIL-15遺伝子を導入したNOG-hIL-15 Tgマウスを樹立し、さらにNOG-hIL-2/hIL-15ダブルTgマウスの作製を目指す。さらにHSC移植実験を行い、ヒトNK細胞の分化能やヒトNK細胞の成熟度などを検証し、生体内細胞傷害試験系に適用できるか検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト化NOG-hIL-2 Tgマウスの作製

8-12週齢のNOG-hIL-2 Tgマウスに2.5GyのX線を照射した後、ヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞(=HSC)  $2.5 \sim 3 \times 10^4$ 個を尾静脈より移植した。3週後に採血し、フローサイトメトリーでヒト免疫細胞及びヒトNK細胞の分化率を測定した後、各検証実験に用いた。

### (2) ヒト化NOG-hIL-2 Tgマウスを用いたヒト腫瘍細胞株移植実験、および生体内細胞傷害試験系の作製

ヒトHSC移植後3週経過したヒト化NOG-hIL-2 Tgマウスに、CCR4陽性ヒト頭頸部扁平上皮癌腫瘍株HSC4およびホジキンリンパ腫株L428を $5 \times 10^6$ 個皮下移植し、継時的に腫瘍サイズを測定した。さらに、腫瘍細胞移植後、週2回、抗CCR4抗体(製品名:ポテリジオ)を腹腔内へ投与し、腫瘍生育に影響を及ぼすか検証した。

### (3) 新規NOG-hIL-15 Tgマウスの樹立

サイトメガロウイルスプロモーター下流にヒトIL-15遺伝子を組み込んだ遺伝子ベクターを作製し、NOD背景のマウス受精卵へ注入することでFounderマウスを作製した。FounderマウスとNOGマウスとを交配し、NOG-hIL-15 Tgマウスを樹立した。4-5週齢時に採血し、血漿中のヒトIL-15タンパク質の濃度をELISA法で測定した。

### (4) NOG-hIL-15 Tgマウスの特性解析

(1)の手法で、NOG-hIL-15 Tgマウスをヒト化した。フローサイトメトリーを用いて、血液や免疫組織中のヒト免疫細胞の分化率を測定した。

健常人の末梢血よりヒト成熟NK細胞を磁気細胞分離システム(MACS)を用いて単離し、X線照射したNOG-hIL-15 Tgマウスに $1 \sim 2 \times 10^6$ 個、尾静脈より移植した。移植後、継時的に採血し、フローサイトメトリーを用いてヒト成熟NK細胞のキメラ率を測定した。

### (5) NOG-hIL-2/IL-15 double Tgマウスの作製および特性解析

既存のNOG-hIL-2 TgマウスとNOG-hIL-15 Tgマウスを交配し、NOG-hIL-2/IL-15 double Tgマウスを作製した。4-5週齢時に採血し、マウス血漿中のヒトIL-2およびヒトIL-15タンパク質の濃度をELISA法で確認した。

(1)の手法で、NOG-hIL-2/IL-15 Tgマウスをヒト化した。フローサイトメトリーを用いて、免疫組織中のヒトNK細胞の分化率を測定した。

### (6) 人権の保護および法令等の遵守への対応

本研究は、公益財団法人実験動物中央研究所の動物実験委員会、遺伝子組換え安全委員会、研究倫理審査委員会の承認のもと行われた。健常人の血液は、インフォームドコンセントを得た上で、医師免許取得者の管理下のもとで提供された。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウスのヒト腫瘍細胞株移植実験および生体内細胞傷害試験系 (in vivo ADCC モデル) の作製

NOG-hIL-2 Tg マウスで分化したヒト NK 細胞が、ヒト腫瘍細胞株に対して直接的な細胞傷害 (Direct killing) 活性を有するか検討するために、HSC を移植したヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウスに、HSC4 腫瘍株および L428 腫瘍細胞株を移植し、継続的に腫瘍サイズを測定した。未処置 NOG-hIL-2 Tg マウスと比較し、ヒト化した NOG-hIL-2 Tg マウスで強い腫瘍抑制効果が認められた。HSC4 と比較し、L428 の方が腫瘍抑制効果は弱かったことから、ADCC の評価に適していると判断した。

(1) の結果から、L428 腫瘍細胞株を in vivo ADCC モデルの作製に用いた。ヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウスに L428 を皮下移植し、抗 CCR4 抗体投与群とコントロール抗体投与群で腫瘍の生育を比較した結果、抗体投与群で、腫瘍成長の抑制が認められた (図 1)。従って、ヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウスを用いることで、生体内細胞傷害試験系 (in vivo ADCC モデル) を樹立することができた。申請者は、この結果を含め論文にて発表をした (J. Immunol., 2015, Katano et al.)

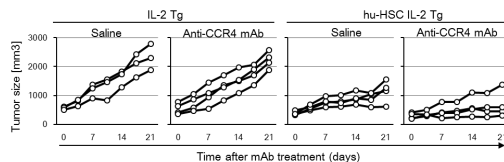


図 1 ヒト CCR4 陽性腫瘍株 L428 および抗 CCR4 抗体を適用したヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウス in vivo ADCC モデル

##### (2) NOG-hIL-15 Tg マウスの樹立・ヒト HSC 移植実験

申請者は、定法にて機能的 IL-15 タンパク質を血液中に分泌する NOG-hIL-15 Tg マウスを樹立した (図 2)。

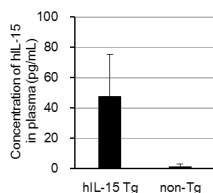


図 2 NOG-hIL-15 Tg マウス血漿中のヒト IL-15 タンパク質の濃度

NOG-hIL-15 Tg マウスにヒト HSC を移植すると、ヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウスと同様に、ヒト末梢血中の NK 細胞に類似した表現型を有するヒト成熟 NK 細胞が劇的に分化・増幅した。しかし、ヒト化 NOG-hIL-2 Tg マウスと比較してヒト NK 細胞の増幅速度が速く、マウス臓器へのヒト NK 細胞の浸潤と重篤な組織傷害が認められ、移植後 8 週以内に大部分のヒト化 NOG-hIL-15 Tg マウスは死亡した (図 3)。

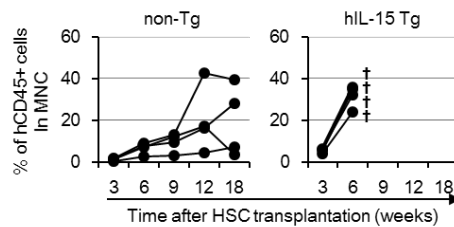


図 3 HSC 移植した NOG-hIL-15 Tg マウスの血液中のヒト免疫細胞のキメラ率

X 線照射量や HSC 移植細胞を減らすなど、ヒト HSC 移植の至適条件を検討したが、ヒト腫瘍細胞株移植モデルを作製する上でバランスの良い実験プロトコルを確立する事は困難であると判断した。

##### (3) ヒト末梢血由来成熟 NK 細胞移植実験およびヒト腫瘍細胞移植モデルの検証

NOG-hIL-15 Tg マウスへ健康人末梢血由来ヒト成熟 NK 細胞を移植した。ヒト成熟 NK 細胞は NOG マウスへ移植すると 2 週間以内に完全に消失するが、NOG-hIL-15 Tg マウスへ移植すると一過性に増幅が認められ、3 ヶ月以上維持されることを確認した (図 4)。

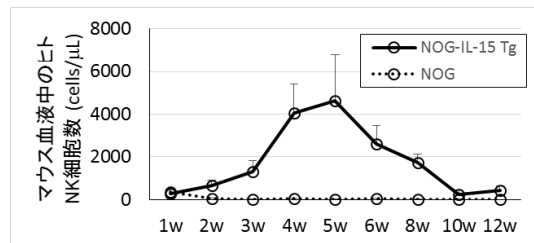


図 4 NOG-hIL-15 Tg マウス血液中のヒト成熟 NK 細胞数の推移

NOG-hIL-15 Tg マウスで増幅したヒト成熟 NK 細胞を詳細に解析した結果、ヒト末梢血中の成熟 NK 細胞の表現型を完全に保持した状態で増幅しており、さらに、細胞傷害顆粒 GranzymeA・GranzymeB・Perforin の産生も認められた。

NOG-hIL-15 Tg マウスで増幅したヒト NK 細胞がヒト腫瘍細胞株に対する細胞傷害能を保持しているか検討した。ヒト化 NOG-hIL-15 Tg マウスの脾臓よりヒト NK 細胞を分取し、ヒトサイトカイン存在下で前培養した後に K562 腫瘍細胞株と共培養することで、細胞傷害活性を検出できた。さらに、ヒト化した NOG-hIL-15 Tg マウスに K562 を皮下移植すると、未処置 NOG-hIL-15 Tg マウスと比較して腫瘍成長の抑制が認められ、細胞傷害能を保持していることが明らかとなった。

上述の NOG-hIL-15 Tg マウスの結果をまとめ、マウス単体でヒト NK 細胞を増幅することができる免疫不全マウスとして、特許を出願した。

##### (4) NOG-hIL-2/IL-15 double Tg マウスの作製および特性解析

IL-2 と IL-15 の両が存在することでヒ

ト NK 細胞の成熟度が向上するか検証するために、NOG-hIL-2 Tg マウスと NOG-hIL-15 Tg マウスとを交配し、NOG-hIL-2/IL-15 double Tg マウスを樹立した。マウス血漿中で、ヒト IL-2 および IL-15 タンパク質が分泌されている事を ELISA で確認した後、HSC 移植実験を行った。その結果、NOG-hIL-2 Tg, NOG-hIL-15 Tg マウスよりも、さらに劇的にヒト NK 細胞が増幅した。

#### (5) 展望

NOG-hIL-2 Tg マウスの HSC を移植することで機能的なヒト成熟 NK 細胞が優位に分化する特徴を有用し、ヒト腫瘍細胞株と臨床抗体を併用することで、マウス生体内で抗体依存性細胞傷害 (Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity: ADCC) 活性を評価できる in vivo 実験系を確立することができた。

また、新しく樹立した NOG-hIL-15 Tg マウスは、ヒト末梢血由来 NK 細胞を生体内で解析できる有用な系統であることを明らかにした。今後は、NOG-hIL-15 Tg マウス、および、NOG-hIL-2/IL-15 Tg マウスを用いて in vivo ADCC モデルを確立できるか、検証を進める。

#### <引用文献>

なし。

#### 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1件)

1. Katano Ikumi et al., Predominant development of mature and functional human NK cells in a novel human IL-2-producing transgenic NOG mouse., Journal of Immunology, 査読有り、2015 Apr 1;194 巻、2015、3513-3525 DOI:10.4049/jimmunol.1401323

#### [学会発表](計5件)

1. Ikumi Katano, Takeshi Takahashi, Ryoji Ito, Asami Hanazawa, Mamoru Ito, Human interleukin-15 transgenic NOG mice support the long-term maintenance of human mature NK cells from peripheral blood、iwhm5 (5<sup>th</sup> international workshop on humanized mice)、平成28年1月28日~平成28年1月30日、Zurich (Switzerland)
2. Ikumi Katano, Takeshi Takahashi, Ryoji Ito, Asami Hanazawa, Yutaka Kawakami, Mamoru Ito、Human interleukin-15 transgenic NOG mice support the long-term maintenance of human mature NK cells from peripheral blood、平成27年11月19日~平成27年11月21日、札幌コンベンションセンター(札幌市)

3. 片野 いくみ、高橋 武司、伊藤 亮治、花澤 麻美、高橋 利一、末水 洋志、河上 裕、伊藤 守、ヒト IL-15 遺伝子導入 NOG マウスはヒト末梢血由来成熟 NK 細胞を長期間維持できる、平成27年5月28日~平成27年5月30日、京都テルサ(京都市)
4. Katano Ikumi, 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、iwmh4 (4<sup>th</sup> international workshop on humanized mice)、平成25年9月30日~平成25年10月3日、Seoul (Korea)
5. Katano Ikumi, Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Mamoru Ito、Functional NK cells developed from human hematopoietic stem cell in human interleukin-2 transgenic NOG mice、15<sup>th</sup> ICI (International Congress of Immunology)、Milan (Italy)

#### [図書](計0件)

なし

#### [産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: ヒト IL-15 分泌免疫不全マウス

発明者: 伊藤守・片野いくみ

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-107932

出願年月日: 平成27年5月27日

国内外の別: 国内・国外

取得状況(計0件)

#### [その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片野 いくみ (KATANO, Ikumi)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

研究者番号: 90442558

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし