

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290034

研究課題名(和文)次世代ヒト化マウスによるヒト免疫アレルギー疾患の再現

研究課題名(英文)Induction of human allergic responses in 2nd generation NOG mice

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：重度免疫不全NOGマウスに遺伝子改良を行い、新たに15系統のNOG亜系統(次世代NOGマウス)を樹立した。ヒト造血幹細胞を移植したのちに、ヒト細胞の発生分化と免疫機能について解析を行った。ヒトIgG産生の亢進を可能とする系統(NOG-pRORgt-gc)、ヒトIgE産生を可能とする系統(TSLP-IL-13)、ヒトHLAを発現する系統(HLA-A 3種類、HLA-DR 2種類)を樹立した。広範なヒト血液細胞を持つヒト化NOG-hGM-CSF/IL-3Tgマウスにラクトグロブリン特異的IgE抗体の投与し、その後ラクトグロブリンを経口投与することにより受動的食アレルギー反応の誘導に成功した。

研究成果の概要(英文)：We extensively gene-modified immunodeficient NOG mice and 15 different sub-strains (2nd generation NOG mice) were generated. The hematopoiesis and immune functions were investigated after transplantation of human hematopoietic stem cells. For example, NOG-pRORgt-gc transgenic (Tg) mice showed enhanced human IgG production. NOG-human (h)TLSP-IL-13 Tg showed human IgE production. And 3 different NOG-HLA-A Tg and 2 different NOG-HLA-DR Tg mice were generated. We also demonstrated that human food allergy symptoms could be recapitulated in humanized NOG-hGM-CSF/IL-3 Tg mice with multiple lineages of human hematopoietic cells. Lactoglobulin specific IgE recombinant antibody was given to the humanized NOG-hGM-CSF/IL-3 and subsequently they were fed with Lactoglobulin proteins. The mice showed anaphylaxis manifested by the reduction of body temperature.

研究分野：免疫学

キーワード：ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒト血液系・免疫系の再構築を可能とするヒト化マウス技術の進展により、ヒト疾患のヒト化マウスでの再現がヒトの免疫関連疾患の治療を目指すうえでも重要な課題となっている。実験動物中央研究所(実中研)ではヒト化マウスの基盤となる NOG マウスを遺伝的に改良することにより、多数の「次世代 NOG マウス」を開発してきた。これらのマウスには広汎なヒトの血液細胞系譜の発生を可能にする系統、またヒト獲得免疫反応によるヒト液性免疫反応の惹起を可能にするマウス系統などが含まれる。実中研のヒト化マウス開発力は世界的にもトップレベルであり、この技術力を用いてヒト免疫関連疾患の再現が可能なマウスモデルを開発することが目標である。

2. 研究の目的

ヒト食物アレルギー反応を能動的にヒト化マウスで再現すること。

3. 研究の方法

ヒト骨髓系細胞含む広汎な免疫細胞を分化可能な NOG-GM-CSF/IL-3Tg、ヒト HLA-DR4 を誘導するためにヒト TSLP 及び IL-13 を発現する NOG-hTSLP/IL-13Tg マウスを作製した。さらに、ヒトリンパ球の環境を改善するために NOG マウスに欠失するリンパ節の発生を回復させた NOG-pRORgt-gcTg マウス、リンパ濾胞形成を促進する目的で NOG-CXCL13Tg マウス、ヒト T 細胞の分化生着の亢進を目的としたヒト IL-7Tg マウスの作製を行い、これらの性質の解析とヒト疾患モデルへの応用について検討した。

4. 研究成果

NOG-GM-CSF/IL-3-HLA-DR4/I-A^{-/-} マウスを交配により作成した。このマウスにヒト造血幹細胞を移植することによりヒト細胞の分化を確認した。一方、移植する造血幹細胞の HLA のハプロタイプを適合させるために川崎市立病院の協力を得て HLA-DR4 陽性のドナー細胞を用いてヒト化し、これらのマウスを牛乳のアレルギー抗原であるラクトグロブリンで免疫したところ特異的な IgG の産生は ELISA 法により確認できたが、IgE は確認できなかった。また、ドナー細胞の取得が 10% 程度であり、臍帯血あたりに採取できる造血幹細胞の数が 5×10^5 程度であったことから継続することが難しく中断を余儀なくされた。

ヒト IgE を B 細胞のクラススイッチにより誘導するためのマウスとして NOG-hTSLP/IL-13Tg マウスを樹立した。このマウスをヒト造血幹細胞移植によりヒト化した後に血清中に抗原非特異的なヒト IgE が検出できた。このことは発現させたサイトカインによりクラススイッチが誘導されたことを示唆する。その一方で本マウスでは NOD-scid 系統に類似する胸腺腫を多発した。

NOG マウスでは胸腺腫の発生頻度は極めて低いため、ヒト TSLP がマウス TSLP レセプター (TSLPR/IL-7Ra) を介して STAT5 の活性化を伴うシグナルを伝達し、マウス γ c 受容体由来のシグナルを代替したものと考えられた。胸腺腫を回避するためにマウス IL-7RaKO を CRISPR/CAS9 で破壊した NOG-mIL-7Ra KO マウスと TSLP/IL-13Tg を交配している。

ヒトリンパ球を取り囲む環境の改善のために NOG マウスで遺伝的に欠失するリンパ節を回復させた。マウス γ c をリンパ節起始細胞 (LTi) に特異的に発現させた NOG-pRORgt-gc BACTg マウスを作製した。このマウスでリンパ節の発生が回復しており、ヒト造血幹細胞移植により NOG マウスと比べてヒト T 細胞の有意な増加、ヒト IgG レベルの上昇が認められたことから、このマウスではヒト免疫機能の亢進が可能であると考えられる(投稿準備中)。一方、ヒトリンパ濾胞形成の改善を目指した NOG-CXCL13Tg マウスではヒト細胞の生着性が NOG マウスと比較して低下し、ヒト IL-7 を発現する NOG-hIL-7Tg マウスでは NOG マウスと比較して優位差は認められなかった。

ヒト IL-15 遺伝子を発現させた NOG-hIL-15Tg マウスを樹立し、ヒト末梢血から分離した NK 細胞を移植するとヒト NK 細胞がマウス体内で増殖し、長期にわたって維持されることを見いだした。また、*in vitro* で増殖させた活性化ヒト NK 細胞が NOG-hIL-15Tg マウスで長期に維持されることを確認した。このモデルではヒト腫瘍細胞の移植とともに活性化 NK 細胞と治療抗体の投与により腫瘍成長の抑制が可能であり抗体依存性細胞障害 (ADCC) 試験の生体モデルとして優れていることを明らかにした(論文投稿中)

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 7 件)

1. Ito R, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Takeshi Takahashi T, Ka Y, Ogura T, Takahashi R, and Ito M.

A novel xenogeneic graft-versus-host disease model for investigating the pathological role of human CD4⁺ or CD8⁺ T cells using immunodeficient NOG mice
American Journal of Transplantation 21 DEC 2016 DOI: 10.1111/ajt.14116

2. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E.

Cell Stem Cell. 2016 Jul 7;19(1):127-138

3. Nakabori T, Hikita H, Murai K, Nozaki Y, Kai Y, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Wada H, Eguchi H, Takahashi T, Suemizu H, Sakamori R, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T.
Sodium taurocholate cotransporting polypeptide inhibition efficiently blocks hepatitis B virus spread in mice with a humanized liver. *Sci Rep.* 2016 Jun 9;6:27782. doi: 10.1038/srep27782.

4. Yokoyama Y, Miyagi T, Hikita H, Yoshioka T, Mukai K, Nawa T, Sakamori R, Ohkawa K, Hiramatsu N, Takahashi T, Suemizu H, Ryo A, Tatsumi T, Takehara T.
The Hepatitis B Virus Genotype Affects the Persistence of Viral Replication in Immunodeficient NOG Mice. *PLoS One.* 2015 Dec 14;10(12):

5. Katano I, Takahashi T, Ito R, Kamisako T, Mizusawa T, Ka Y, Ogura T, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M.
Predominant development of mature and functional human NK cells in a novel human IL-2-producing transgenic NOG mouse. *J Immunol.* 2015 Apr 1;194(7):3513-3525

6. Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M.
Visualization of the human CD4⁺ T-cell response in humanized HLA-DR4-expressing NOD/Shi-scid/ c(null) (NOG) mice by retrogenic expression of the human TCR gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2;456(1):219-224.

7. Katano I, Ito R, Kamisako T, Eto T, Ogura T, Kawai K, Suemizu H, Takahashi T, Kawakami Y, Ito M.
NOD-Rag2null IL-2R null mice: an alternative to NOG mice for generation of humanized mice. *Exp Anim.* 2014;63(3):321-330
〔学会発表〕(計 15 件)
・第 61 回 日本実験動物学会 札幌 平成 26 年 5 月 14-17 日
「ヒト IL-5 遺伝子導入型 NOG マウスのヒト好酸球分化能の解析」
・第 62 回 日本実験動物学会 京都 平成 27 年 5 月 28 日-30 日
「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」
・第 44 回 日本免疫学会 札幌 平成 27 年 11 月 18-20 日
「Intratracheal administration of IL-33 effectively induces eosinophilic airway inflammation in novel humanized NOG mice」
「The reconstitution of human tumor microenvironment in NOG-human IL-6 transgenic mice」
「Human interleukin-15 transgenic NOG mice support the long-term maintenance of human mature NK cells from peripheral blood」

・中華実験動物学会 中華民国 台北 Biolasco 主催セミナー(招待) 平成 27 年 11 月 27 日

「Reconstitution of human immune systems in next generation humanized mice and their application.」

・International Workshop on Humanized Mice5 Zurich 平成 28 年 1 月 28-30 日
「Generation of human asthmatic airway inflammation model by administration of IL-33 into novel humanized IL-3/GM-CSF/IL-5 transgenic NOG mice」

「Development of 2nd generation NOG mice in CIEA」

「The reconstitution of human tumor microenvironment in NOG-human IL-6 transgenic mice」

「Human interleukin-15 transgenic NOG mice support the long-term maintenance of human mature NK cells from peripheral blood」

・第 63 回 日本実験動物学会 川崎 平成 28 年 5 月 28 日~30 日

「NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5Tg マウスを用いたヒト喘息モデルの開発」

「LTi 特異的な IL-2Rg 鎖発現による NOG マウスでのリンパ節還元」

・International symposium of humanized mouse model 中国・南京 平成 28 年 9 月 21-24 日

「Generation of 2nd generation NOG mice and application to human immunology」

・AFLAS Congress シンガポール 平成 28 年 11 月 8-10 日(招待)

「Development and applications of novel humanized mice with improved human immune system」

・第 45 回 日本免疫学会 沖縄 平成 28 年 12 月 5-7 日

「A novel xenogeneic graft-versus-host disease model for investigating the pathological role of human CD4⁺ or CD8⁺ T cells using immunodeficient NOG mice.」

〔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：

(4) 研究協力者

()