

ヒト免疫系再構築 NOG マウスの発展

Development of human immune system in the immunodeficient NOG mouse

宮本 あすか、亀谷 美恵
東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門
Asuka Miyamoto and Yoshie Kametani
Division of Pharmaceutical Sciences
Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

ヒト化マウスは、医薬品として分子標的薬の開発が進められるに従って、その重要性が明らかになった。NOG マウスは、ヒト免疫系再構築の効率が高い重度免疫不全マウスであり、日本で開発され、汎用される系統である。これらのマウスにはヒト造血幹細胞及びヒト末梢血単核球が生着する。しかしその免疫系は完全にヒトを模倣する事はできない。そこで、現在はさらに遺伝子を改変した新たなマウスの開発が進められている。

[Abstract]

The importance of the mouse system reconstituted with human immune system has been gradually accepted by the researchers engaged in the development of the molecular targeting reagents. While the immune cells are engrafted in the NOG mouse, a severely immunodeficient mouse system, the immune system is not completely human type. For example, when the hematopoietic stem cells are transplanted, the T cells and B cells do not become completely mature, and when the peripheral blood mononuclear cells are transplanted, the mouse will be affected by graft versus host disease (GVHD). Therefore, the development of NOG mouse with human genes such as IL-4, IL-3 and GM-CSF has been established in order to improve the human immune system in the mouse.

[Key Words]

NOG mouse, human immune system, molecular targeting reagent, GVHD

1.はじめに

臨床応用可能な医薬品開発には、今までげっ歯類・霊長類等の動物実験が広く行われてきた。これらの実験動物が研究開発に有用であったのは、今まで開発されてきた医薬品の多くは、これらの動物に共通の毒性を持つ可能性があったためである。しかし、近年、癌をはじめとして、多くの医薬品開発が、種特異性の高い性質を持つ分子標的薬に移行し、これらげっ歯類や非ヒト霊長類では不十分な側面がある事が指摘されるようになった。筆者らは、2000年以降に大きく発展したヒト免疫系再構築マウスの研究に従事してきた。本総説では、現在に至るまでのヒト免疫系再構築マウスについて概説したい。

2. ヒト化 NOG マウスの開発

1) ヒト化マウスの有用性

疾患の研究や薬剤の開発に当たって、人間を用いる実験は出来ない。一般には動物で実験するが、動物モデルの結果が必ずしも人間に当てはまるとは限らない。実際に2006年3月にロンドンで行なわれた抗CD28抗体医薬の第Ⅰ相試験では、被験者が投与された直後から異常を訴え、全員が集中治療室に入院する事態となった。この抗体医薬もウサギやサルを用いた動物モデルではヒトの500倍投与しても異常は見られていなかった。そのため従来の動物モデルを用いた安全性試験ではヒトの安全性を完全には確保できないとの警鐘が鳴らされている¹⁾。

後日、この原因はヒトと動物モデルのCD28分子架橋機構に種差があり、ヒトではスーパーアゴニストとしてサイトカインストームを誘導してしまう事が

他の動物では検証できなかった、という事が明らかとなった。このような重篤な事象は必ずしも生じないが、マウスで明らかになった有効性がヒトでは立証されないという事はもっと頻繁に生じている²⁾。

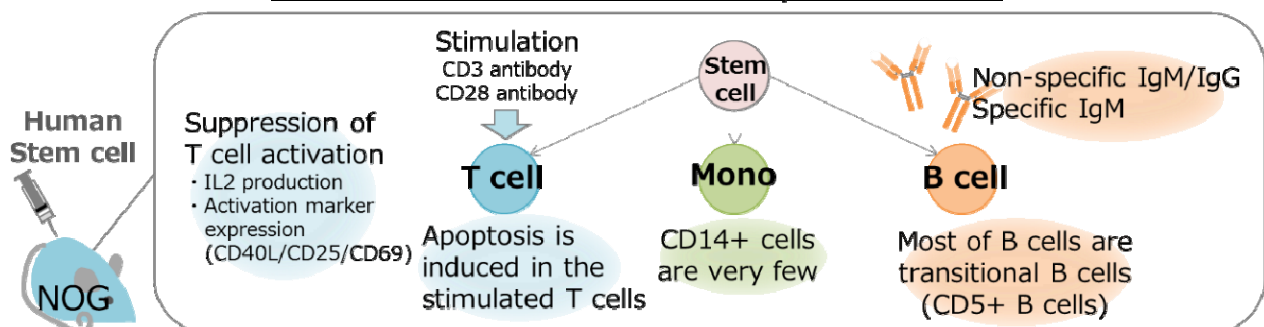
これらの事実から、動物にヒトの正常細胞や疾患細胞を移植し定着させたヒト化動物の有用性が期待されている。ヒト免疫細胞をマウスに移植するとマウス体内でヒト免疫系を再現できるが、普通のマウスに移植するだけでは生着しない。これは、移植されたヒト細胞がマウスの免疫細胞によって攻撃され最終的には排除されるためである。そのため移植したヒト細胞を生着させるためには、マウスの免疫細胞をできる限り欠損・抑制する必要がある。

2) 重度免疫不全 NOG マウスの開発

実験動物中央研究所が2002年に開発したNOG (NOD/Shi-scid, IL-2R null) マウスは、現在最も重度の免疫不全を呈するマウスのひとつである³⁾。NOGマウスは、幹細胞研究の分野でスタンダードマウスであったNOD-scidマウスと、免疫細胞の分化・成熟に関わる複数のサイトカインの共通鎖の細胞内領域をノックアウトしたIL-2R KOマウスを交配して得られた系統である。このマウスはT細胞・B細胞・NK細胞・補体活性の欠損および樹状細胞・マクロファージの機能不全を有しており、CD34+ヒト幹細胞を移植すると生着し、多様な免疫細胞へと分化した⁴⁾。ヒト幹細胞を移植したマウス胸腺にはCD4+CD8+T細胞が存在しているのに対し、脾臓や骨髄ではCD4+T細胞またはCD8+T細胞が分布していた。また脾臓ではリンパ濾胞用構造が観察され、中心にはCD3+細胞、周辺部にはCD19+細胞が分布していた。

しかし、NOGマウス体内で分化したヒトCD4+T細胞

Human stem cell transplantation



胞は CD3 抗体や CD28 抗体の刺激に対する CD40L・CD25・CD69 の発現量や IL-2 産生量が正常ヒト CD4+T 細胞に比べて低く、B 細胞はほとんどが CD19+CD5+ を示す未熟な Transitional B 細胞であった(図参照)。また、ヒト型抗体は非特異的 IgM/IgG・特異的 IgM は産生されるが特異的 IgG は検出されない⁵⁾。これはクラススイッチに必要な T 細胞と B 細胞の分化や相互作用が不十分であることが原因であると推測された。また、樹状細胞やマクロファージを含むミエロイド系細胞は、分化が抑制され CD14+細胞はほとんど検出されなかった事から、抗原提示細胞の分化が不十分である事による T 細胞の活性化不全も原因の一つとして考えられた。また、ヒト T 細胞がマウス胸腺で分化する事から、マウス MHC を認識する T 細胞とヒト MHC を発現する B 細胞の相互作用が不全である、との仮説もたてられた。

3) NOG マウスの発展

上記の解析結果をふまえて、NOG マウス体内でよりヒトに近い免疫系を再構築するために、現在までに様々なヒト遺伝子を導入したトランスジェニック NOG マウスの開発が進められてきた。

一つは、HLA を発現するマウスの開発である。実験動物研究所高橋らは、HLA-DR4 を発現する NOG マウスを作製した⁶⁾。しかし、このマウスにおける体液性免疫は、当初予測されたほどには改善しなかった。

ヒト IL-3 および GM-CSF を遺伝子導入した hGM-CSF/hIL3-NOG マウスは、当初 NOG マウスで分化しにくいミエロイド系の細胞を分化させる事を目的として開発されたが、現在ではアレルギー研究の動物モデルとして適している事が報告されている⁷⁾。マウス体内で発現している IL-3 と GM-CSF によってヒト幹細胞はミエロイド系の細胞への分化が優位となり、従来の NOG マウスに比べて好塩基球や肥満細胞への分化が増加した。

また、NOG-IL-2-Tg マウスは、NOG マウス体内でヒト T 細胞機能が抑制傾向になる事から、これを活性化する事が予測され開発されたが、現在 NK 細胞の生理学的・病理学的機能を研究できる有用なモデルとなっている⁸⁾。NOG-IL-2-Tg マウスに移植した CD34+ ヒト幹細胞は NK 細胞への分化が促進され、従来の NOG マウスに比べて 10 倍以上の CD56+細胞が誘導された。またこれら NK 細胞には様々な NK レセプター

(NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD94)を発現しており、グランザイム A とパーフォリンを産生した。hu-HSC-NOG-IL-2-Tg マウスに移植された CCR4(+)ホジキンリンパ腫系細胞株は、ヒト型抗 CCR4 抗体投与によって増殖が抑制されたため、抗体依存性細胞障害活性(ADCC)が行なわれたことが示唆された。

これらマウス以外にも、特異的 IgG の産生を目指した NOG-IL-4-Tg マウスや、単球への分化促進を目指した NOG-IL-6-Tg マウスなどの解析も進んでおり、今後さらなる進展が期待される。

3. 展望

本総説で示したように、現在多くの遺伝子改変 NOG マウスの開発が行われている。造血幹細胞の分化に限界がある事から、今後は、ヒト末梢血の生着しやすいマウスの開発の重要性が論じられるようになるであろう。現在我々も、ヒト末梢血が生着し、免疫系の活性化が可能となる系の解析を行っている。さらに、新たなコンセプトによるヒト免疫系を受容する NOG マウスの開発が行われるようになるであろう。我々は、特に妊娠時アロを受容する母体免疫系をヒントに新たなマウスの開発を行いたいと考えている。

4. 引用文献

- [1] D. Tyrsin *et al.* *Clin Exp Rheumatol*, **34**, 45(2016)
- [2] T. Hunig. *Nat Rev Immunol* **12**, 317(2012)
- [3] 伊藤守 *細胞工学* **29**, 238(2010)
- [4] M. Ito *et al.*, *Blood* **100**, 3175(2002)
- [5] Y. Kametani *et al.* *Exp Hematol* **34**, 1240(2006)
- [6] T. Takahashi *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* **456**, 219(2014)
- [7] R. Ito *et al.*, *J Immunol* **191**, 2890(2013)
- [8] I. Katano *et al.*, *J Immunol*, **194**, 3513(2015)

5. 業績

【論文発表】

- 1) Y Kametani, S Ohshima, A Miyamoto, A Shigenari, M Takasu, N Imaeda, T Matsubara, M Tanaka, T Shiina, H Kamiguchi, R Suzuki, H Kitagawa, J K. Kulski, N Hirayama, H Inoko, A Ando Production of a Locus and

Allele-Specific Monoclonal Antibody for the Characterisation of SLA-1*0401 mRNA and Protein Expression Levels in MHC-Defined Microminipigs. *PLOS ONE* **11**, e0164995 (2016)

2) T Matsubara, N Nishii, S Takashima, M Takasu, N Imaeda, K A-Oshimo, K Yamazoe, M Kakisaka, S Takeshima, Y Aida, Y Kametani, J K Kulski, A Ando, H Kitagawa Identification and characterization of two CD4 alleles in Microminipigs. *BMC Veterinary Research* **12**, 222. (2016)

3) K Sato, R Oiwa, W Kumita, R Henry, T Sakuma, R Ito, R Nozu, T Inoue, I Katano, K Sato, N Okahara, J, Okahara Y Shimizu, M Yamamoto, K Hanazawa, T Kawakami, Y Kametani, R Suzuki, T Takahashi, EJ Weinstein, T Yamamoto, Y Sakakibara, S Habu, JI Hata, H Okano, E Sasaki. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. **19**, 127-138 (2016)

4) K Suzuki, S Inoue, Y Kametani, Y Komori, S Chiba, T Sato, S Inokuchi, S Ogura. Reduced Immunocompetent B Cells and Increased Secondary Infection in Elderly Patients with Severe Sepsis. *Shock*. **46**, 270-8 (2016)

5) Y Kametani, S Shimada, S Mori, M Kojima, S Ohshima, K Kitaura, T Matsutani, Y Okada, TYahata, R Ito, I Katano, H Suemizu, R Suzuki, M Ito, S Habu and K Ando, Antibody-secreting plasma cells with unique CD5+IgG+CD21lo phenotype developed in humanized NOG mice. *Clinical Research and Trials* **2**, 164-173(2016)

【学会発表】

1) Asuka Miyamoto, Ikumi Katano, Ryoji Ito, Banri Tsuda, Yutaka Tokuda, Sonoko Habu, Mamoru Ito, Yoshie Kametani : Production of specific IgG against HER2 peptide CH401MAP in NOG-IL-4-Tg mice. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、2016.12 沖縄

2) Yusuke Ohno, Mika Kojima, Rihito Kinami, Mamoru Ito, Sonoko Habu, Yoshie Kametani : Humanized mouse as a model of human pregnant immunity. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、2016.12 沖縄

3) 木南理仁、柏木寛史、沼尾絵里奈、寺山隼人、坂部貢、石本人士、和泉俊一郎、亀谷美恵 : Analysis of TrkB and PD1/PDL1 expression in Common Marmoset placenta

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences, Vol.1, March 2017

第31回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2016.12 神戸

4) Asuka Miyamoto, Ikumi Katano, Ryoji Ito, Banri Tsuda, Yutaka Tokuda, Sonoko Habu, Mamoru Ito, Yoshie Kametani : Production of specific IgG against HER2 peptide CH401MAP in NOG-IL-4-Tg International Congress of Immunology 2016、2016.8 Melbourne

5) Rihito Kinami, Hirofumi Kashiwagi, Erina Numao, Hitoshi Ishimoto, Shun-ichiro Izumi, Yoshie Kametani : ,Analysis of TrkB and PD1/PDL1 expression in Common Marmoset placenta International Symposium on Pituitary Gland and related Systems、2016.9 Waikiki

6) Hirofumi Kashiwagi, Yoshie Kametani, Takashi Shiina, Masaki Momose, Miwa Yasaka, Yasuhisa Kanno, Takahiro Suzuki, Yusuke Ono, Rihito Kinami, Hitoshi Ishimoto, Shun-ichiro Izumi, Mikio Mikami : Comparison of pregnancy associated proteins –PZP, A2ML1, PSG-expression in human and Common marmoset. International Symposium on Pituitary Gland and related Systems、2016.9 Waikiki

7) Yusuke Ohno, Mika Kojima, Rihito Kinami, Yoshie Kametani : Humanized mouse as a model of human pregnant immunity International Symposium on Pituitary Gland and related Systems、2016.9 Waikiki

8) Yuko Haida, Rihito Kinami, Akane Konodo, Tomomi Iba, Shizue Nambara, Michiko Sone, Kazuhisa Maeda, Yoshie Kametani : Analysis of TrkB isoform expression in the placental tissue of fetal growth restriction. International Symposium on Pituitary Gland and related Systems、2016.9 Waikiki

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただき、様々なご指導を賜っている平山令明先生、また、共同研究を行わせていただいている実験動物中央研究所伊藤守先生に心より感謝いたします。