

**ヒト化 NOG マウスを基盤とした個別医療に
対応するヒト型実験システムの開発**
Development of experimentation systems related
to personalized medicine using humanized NOG mice

伊藤 守 (ITO MAMORU)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・部長



研究の概要

重度免疫不全 NOG マウスはヒトの組織や細胞を生着し易く、そのためヒト化動物モデルの作製が可能である。この NOG マウスを改良することで、より良いヒト化動物モデルの開発を行う。特に、免疫疾患解明やワクチン等の開発のためのヒト型免疫マウスを作製する。また、iPS 細胞等の幹細胞を用いた個別医療に対応するヒト化マウスモデル作製のための基礎的検討を行う。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：実験動物、免疫不全動物、ヒト化マウス、個別医療

1. 研究開始当初の背景

我々が作製した重度免疫不全 NOG マウスはヒトの細胞や組織を拒絶することなく、生着させることでヒト化動物モデルの作製に極めて有用であることを、2002年に世界に先駆けて報告した。我々は、この NOG マウスを更に改良するために、基盤研究 S「重度免疫不全 NOG マウスの改良・改変によるヒト化モデル動物の基盤創設」（平成 18～22 年度）によって、多様な改良型動物を開発した。これら動物を元に、更に新しい動物モデルを作出することが求められた。

2. 研究の目的

ヒトの免疫系完全構築、ヒト特定細胞生着増殖、ヒト組織・臓器易生着のヒト化動物モデルに最適な改良型 NOG マウスの探索および作製を通じ、最適なヒト化動物実験系の確立を行う。また、NOG マウスより ES 細胞を樹立することによって、新たな改良 NOG マウス作製法を確立する。加えて、その発展型として、個別化医療にも応用可能な実験系の確立を検討する。

3. 研究の方法

1. ヒト化動物モデル作製のために改良・開発された基盤動物（多様な重度免疫不全動物）のヒト化モデルとしての有用性とその特性検索、2. 完全ヒト型免疫系保有ヒト化動物の確立とその詳細検討、3. NOG マウス由来 ES 細胞の樹立とそれを用いた遺伝子改

変法の確立、4. 個別型ヒト型動物実験系の開発のための基礎研究として、iPS 細胞からの人工胸腺、各幹細胞の樹立法の開発を検討する。

4. これまでの成果

現在まで作製した改良型マウスは 52 系統に及ぶ。そのうち、31 系統が系統樹立と解析がほぼ終了した。残る 21 系統については、現在系統樹立と特性解析中である。その幾つかを紹介する。

1) ヒト NK 細胞が分化増殖する hIL-2-NOG マウス

hIL-2-NOG マウスにヒト臍帯血 CD34+造血幹細胞 (HSC) を移入すると、マウスの中でヒト NK 細胞が優位に分化、増殖する。これら NK 細胞は細胞障害顆粒である Perforin や Granzyme をヒトと同様に保有、分泌する。このヒト NK マウスに、ヒト白血病細胞株で NK 感受性の K562 を移植するとその増殖を拒絶する。ヒト NK 細胞の In vivo モデルとして有用と思われる。

2) Th2 細胞へ極性が移行する hIL-4-NOG マウス

hIL-4-NOG マウスでは、ヒト末梢血単核球 (PBMC) を移入すると、GVHD で死亡せず、ヒト細胞が長期に存在する。この hIL-4-NOG マウスで存在するヒト T 細胞を解析したところ、Th2 細胞への移動が認められた。このことから、このマウスを用いることによって、ヒト Th1 と Th2 細胞の役割を

検討する動物実験系が可能と思われる。

3) ヒト顆粒球が分化する hGM-CSF/IL-3-NOG マウスとそれを使ったヒトアレルギーモデル

GM-CSF/IL-3-NOG マウスにヒト HSC を移入すると、NOG マウスの中で検出できないヒトの好中球、抗酸球や好塩基球や単球、肥満細胞が分化増殖する。このマウスに、花粉症患者血清を皮内に接種後、花粉抗原を色素とともに静脈内注射すると、受動皮膚アナフィラキシー反応を呈する。このマウスを用いることでヒトアレルギーモデルの作出が可能と思われる。

4) 完全ヒト型免疫系保有マウスの作製

ヒト型免疫系保有マウス作製のために、ヒト HLA class II 分子の DRA0405 を導入した NOG マウスを作製した。このマウスに、DRA0405 ハプロタイプを持つヒト HSC を移入した後、Ovalbumin で免疫すると、血液中で Ovalbumin 特異的な IgG 抗体を検出できた。一方で、DRAB0405 ハプロタイプを持たないヒト HSC の移入では特異 IgG 抗体は検出できなかった。このことから、胸腺にヒト HLA を発現させることによって、従来難しかったマウス内でのヒト T 細胞と B 細胞の相互作用が可能になったと考えられ、この手法論で完全ヒト型免疫系保有マウスの作製ができると思われる。

5) NOG マウス由来 ES 細胞の樹立と遺伝子改変法の開発

NOG 由来の ES 細胞の樹立に分化阻害剤 2i を添加した培養系を用いて実施し、その結果、極めて高率に ES 細胞の樹立ができた。また、得られた ES 細胞は生殖系列への寄与が確認された。現在、この ES 細胞を用いて、マウス遺伝子をヒト遺伝子に入れ替えた KI マウスの作製を実施した。現在、3 遺伝子を実施中で、1 遺伝子で F1 が得られ、この ES 細胞を用いた遺伝子改変法が有効であることが確認できた。

6) iPS 細胞からのヒト人工胸腺の作製や造血幹細胞の樹立の試み

ヒト人工胸腺の作製のための基礎的検討として、ヒト iPS 細胞の代わりにマウス ES 細胞を用いて、人工胸腺作出への要点と思われる ES 細胞から胸腺上皮細胞 (TEC) への分化誘導法の検討を行った。方法としては、再凝集胸腺器官培養 (RTOC) または胸腺臓器培養 (FTOC) にマウス ES 細胞を混入させた培養系で胸腺上皮細胞 (TEC) に発現する Foxn1 等の遺伝子発現を指標に、条件を検討しているが、現在までに胸腺上皮細胞 (TEC) の分化促進には成功していない。

5. 今後の計画

1) 改良型 NOG マウスのヒト化モデルとしての解析とその特性検索を継続し、有用なヒト型動物実験モデルを確立する。

2) 完全ヒト型免疫系保有マウスの作製のため、HLA class I 遺伝子導入 NOG マウスの作製を行う。また、HLA 遺伝子のウイルス感染による胸腺への導入を検討する。NOG マウスではリンパ節形成が極めて悪い。リンパ節形成が良好な NOG マウスを作製する。

3) NOG マウス由来 ES 細胞を使ったマウス遺伝子をヒト遺伝子に置き換えた NOG マウスの作製を行う。

4) iPS 細胞からのヒト人工胸腺の作製や造血幹細胞の樹立の試みを継続する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Suzuki, M., Takahashi, T., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Harigae, H., Ishii, N., and Sugamura, K.: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/gammacnull mouse. *Int Immunol* 24:243-252, 2012.
2. Ito, R., Negishi, N., Irie, N., Matsuo, K., Suzuki, D., Katano, I., Hayakawa, E., Kawai, K., Kamisako, T., Eto, T., Ogura, T., Hozumi, K., Ando, K., Aiso, S., Tamaoki, N., Habu, S., and Ito, M.: Osteosclerosis and inhibition of human hematopoiesis in NOG mice expressing human Delta-like 1 in osteoblasts. *Exp Hematol* 40:953-963 e953, 2012.
3. Ito, R., Katano, I., Ida-Tanaka, M., Kamisako, T., Kawai, K., Suemizu, H., Aiso, S., and Ito, M.: Efficient xenoengraftment in severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rgammanull mice is attributed to a lack of CD11c+B220+CD122+ cells. *J Immunol* 189:4313-4320, 2012.
4. Yahata, T., Takanashi, T., Muguruma, Y., Ibrahim, A. A., Matsuzawa, H., Uno, T., Sheng, Y., Onizuka, M., Ito, M., Kato, S., and Ando, K.: Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118:2941-2950, 2011.
5. Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., and Koyanagi, Y.: A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 117:5663-5673, 2011.

ホームページ等

<http://www.ciea.or.jp/kiban-s/index.html>