

ヒト化マウスを用いたヒト免疫・疾患解析

石川 文彦

これまでの生物学の発展を大きく支えたマウス研究から、メディカルイノベーションへのさらなる貢献にむけて、ヒトそのもののシステムを理解し、疾患の克服を目指すことが重要である。われわれは、この目的のため、ヒトの免疫システム・疾患を実験動物に再現するヒト化マウスシステムの確立を目指してきた。造血幹細胞を新生仔免疫不全マウスに移植して開発した *in vivo* システムにおいて、レシピエントの骨髄、脾臓、リンパ節など複数の免疫組織を解析することで、造血幹細胞から成熟免疫細胞への分化、各組織を移動しながら構築されるダイナミックなヒト免疫システムを理解することが可能となった。さらに、感染症、原発性免疫不全症、白血病などヒト疾患モデルを構築し、からだの深部にある造血・免疫組織における病態形成と治療抵抗性などを直接解析することが実現しつつある。本稿では、このようなヒト化マウスモデルを用いたトランスレーショナルリサーチを目指した取り組みと、あたらしいヒト化マウスの開発を通して担うべき今後の役割などについて述べたい。

1. 免疫系ヒト化マウスの開発

「ヒト化マウス」は、マウスからヒトへの研究の応用に関わるリサーチツールとして、私たちヒトの体内での造血・免疫系の恒常性の維持を理解し、疾患の克服や医薬の創出などトランスレーションを図ることを目的として作製が試みられてきた。ヒトの免疫システムをマウスに再現するとは言うものの、マウスにとって異種細胞となるヒトの免疫細胞は、宿主であるマウスによって速やかに拒絶される。従って、免疫拒絶が起きないよう遺伝的に免疫不全状態としたマウスをレシピエントとして用いる必要がある。一方、多様な免疫細胞のすべてに分化しうる、自己複製可能なヒト造血幹細胞をドナー細胞として臍帯血などから準

備する。成熟T細胞が存在しないヌードマウスをレシピエントに用いた場合、ヒト腫瘍細胞株はマウス皮下や腹腔で生着、増殖するものの、正常造血細胞や患者検体から直接得られる腫瘍細胞は、残存するマウスの免疫系によって排除されるために生着することが極めて困難である。CB-17. scid は、免疫不全マウスとして初めてヒト血液細胞の生着を支持したストレインといえる¹⁾。Scid 変異を NOD マウスにバッククロスした NOD/SCID マウスは、CB-17. scid マウスと比較して NK 活性が低下しているために、ヒト細胞がより効率よく生着することが示された²⁾。この NOD/SCID マウスが、長期にわたって、ヒト細胞を *in vivo* で解析するための主たるレシピエントマウスとして使用されてきた。その後、IL2 受容体サイトカイン共通ガンマ鎖の変異体 (gc^{null}) を NOD/SCID マウスにバッククロスして作製された NOG マウス³⁾ や NOD/SCID/IL2rgKO (NSG) マウス⁴⁾ が開発されたが、これらのマウスストレインは、ヒト T 細胞の分化を可能とし、非常に高率なヒト造血・免疫細胞の生着率を実現し、ヒト免疫学の発展に寄与することが期待される⁵⁾。

われわれは、NOD/SCID/b2mKO マウスや NOD/SCID/IL2rgKO マウスなど自然免疫系も不全状態となったストレ

理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター
ヒト疾患モデル研究ユニット (〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

Creation of *in vivo* models for human immunity and diseases

Fumihiko Ishikawa (Research Unit for Human Disease Models, RIKEN Research Center for Allergy & Immunology (1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan)

インを用いて、生直後の免疫環境の寛容・体重あたりの移植幹細胞数という二つ利点が期待される新生仔期に、経静脈的にヒト臍帯血由来造血幹細胞を輸注する移植法を確立した^{4,6)}。新生仔マウスが成熟する移植数ヶ月後には、骨髄、脾臓、胸腺などの組織に高率にヒト細胞が同定され、ヒト CD45⁺細胞中には移植したヒト造血幹細胞から分化した T 細胞、B 細胞など獲得免疫系と、NK 細胞、ミエロイド細胞が自然免疫系の両者が完全ではないものの、再構築されていることが確認された。

2. 免疫環境のヒト化とウイルス感染症に対するヒト免疫応答の解析

このように NOG, NSG マウスなどを用いて高率なヒト細胞のキメリズムを得ることができるようになったヒト化マウスシステムであるが、マウスというげっ歯類にヒトの免疫システムを再構築するわけで、問題点もあげられる。特に免疫システムの構築には各組織にて細胞を取り囲む環境が重要である。たとえば、ヒト T 細胞はマウスの胸腺環境で成熟・教育される。NOD/SCID マウスをレシピエントとして用いた場合は、ヒト造血幹細胞を移植しても、ヒト T 細胞が分化しないことが知られていた。しかし、NOG マウスや NSG マウスを用いることで、レシピエントマウスの胸腺内には、ヒト CD4⁺CD8⁺ T 細胞が存在し、脾臓・腸間膜リンパ節に、ヒト CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞が分化していることが確認された。NSG マウスにヒト造血幹細胞を移植したあとの胸腺組織の構築は皮質・髄質の構築など不完全であるものの、ある程度のヒト T 細胞の発生・分化が実現したことになる。それでも、マウス体内で分化したヒト T 細胞が HLA 拘束性に免疫応答を発揮できないという問題が残されてきた。この HLA に関わる問題を克服するために、われわれは、HLA class I 分子を強制発現したマウスを作成することによってマウスの環境に発現させる取り組みを行った。まず、欧米人に多い HLA A0201 を対象として、HLA A02 tg NSG マウスの有用性についてジャクソン研究所と共同で研究を実施した⁷⁾。まず、HLA A02 のタンパクレベルでの発現をフローサイトメトリーにて確認した後、HLA の適合したヒト臍帯血由来 Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞を移植して、レシピエントマウスにおけるヒト免疫系の解析を実施した。これまでの NSG マウス同様、骨髄・脾臓では、獲得免疫系、自然免疫系を構成するヒト細胞の分化が見られた。特に HLA class I を適合させたことから、CD8⁺ T 細胞についての解析を行った。ヒト CD8⁺ T 細胞分画をフローサイトメトリーで解析すると naïve から central memory, effector memory 細胞へと成熟しており、その成熟過程に一致して、granzyme A, granzyme B などの機能的分子が発現することも確認された (図 1)。これらのヒト T 細胞の発現解析に

基づいて、HLA 拘束性と T 細胞機能についての解析を進めることとした。

ヒト疾患を引き起こす微生物感染の中で、ウイルスは種特異な感染を呈するものが多く、これまでマウスモデルを確立することが困難であった。ヒト免疫細胞に感染するウイルスについては、免疫系ヒト化マウスを用いることでヒト免疫細胞へのウイルス感染を実現し、in vivo モデルを作製し、病態の理解とワクチンを含む新規治療法の開発が期待されている。これまで、Manz らのグループや Yamamoto らのグループは、Rag2KO/gcKO マウス、NOG マウスをレシピエントとして作製した免疫系ヒト化マウスを用いて HIV の感染を試みている^{8,9)}。CCR-5 指向性、CXCR-4 指向性、それぞれの HIV をこれらの免疫系ヒト化マウスに感染したところ、脾臓、リンパ節などレシピエントマウスの免疫組織に p24 の発現を認め、レシピエントマウスにおけるヒト CD4 陽性細胞内におけるウイルスコピー数が高いもので 10⁶ 程度に上昇していることが確認された。治療への応用では、Kumar らが、ヒト T 細胞特異的な siRNA の導入を行うことで、ウイルスの増幅、CD4⁺ T 細胞の減少が抑えられることを証明した¹⁰⁾。このように、感染の成立から病態理解、さらには治療応用まで、ウイルス感染症研究領域において、免疫系ヒト化マウスが貢献できるよう、国際的な共同研究も含めて発展に寄与したいと考えている。

われわれは、EBV を用いることで、EBV 感染に伴う多様な病態とウイルス感染細胞に対するヒト免疫応答の解析を実施した。HLA を発現させていない従来 NSG マウスと HLA A02 を発現させ免疫環境のヒト化を試みた NSG マウスにヒト免疫系を構築したマウスに EBV を感染させた。HLA を発現していない免疫系ヒト化マウスにおいては、ウイルス感染が腹腔を中心に多くの臓器に成立していることを病理組織学的に確認した。一方、HLA class I 発現免疫系ヒト化マウスに EBV を同じ titer にて感染させた場合、レシピエントの肺組織においてリンパ増殖性病変が見られた (図 2)。ヒト CD19 に対するモノクローナル抗体にて免疫染色を行うと、確かに、病変部位の多くがヒトの B 細胞であり、またウイルス感染を示す LMP1 も陽性であった (図 2)。さらに、同じ病変部位にウイルス感染ヒト B 細胞より少数であるが CD3⁺ のヒト T 細胞が存在することが分かった (図 2)。EBV のヒト B 細胞における感染と、それに対するヒト免疫応答の成立が期待されたことから、HLA を発現した免疫系ヒト化マウスにおけるヒト免疫の解析を実施した。

レシピエントマウスに生着しているヒト T 細胞を解析すると、ウイルス感染に伴って CD4/CD8 比が逆転するほどに CD8⁺ T 細胞が増加していることが、脾臓、リンパ節において見られた。また、ウイルスに対する特異性を確認

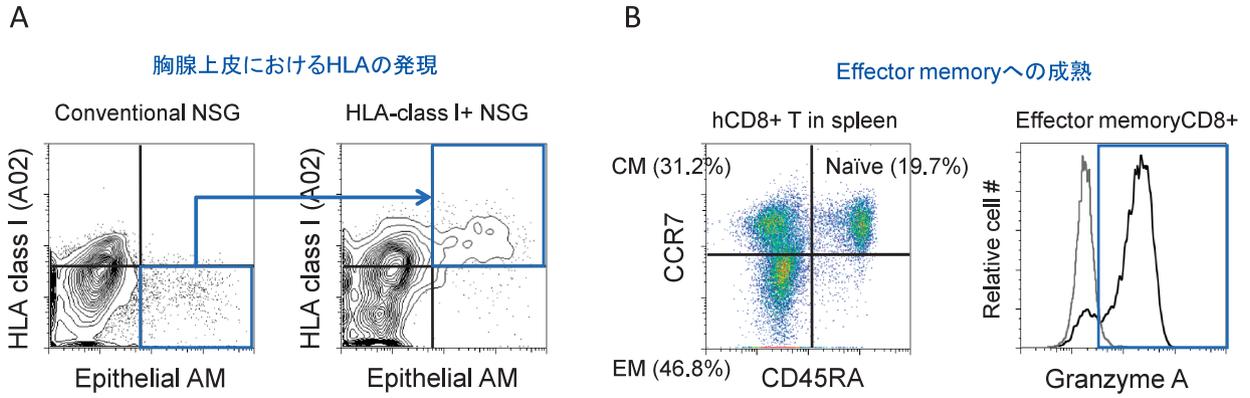


図1 HLA class Iを発現するヒト化マウスの作製
 A：(左) フローサイトメトリーによる従来の免疫不全マウスにおける胸腺上皮細胞の解析，(右) 新規免疫不全マウスにおける胸腺上皮細胞上の HLA class I の発現
 B：(左) ヒト化マウスの脾臓における CD8⁺ T 細胞の成熟，(右) エフェクターメモリー T 細胞の granzyme A の発現

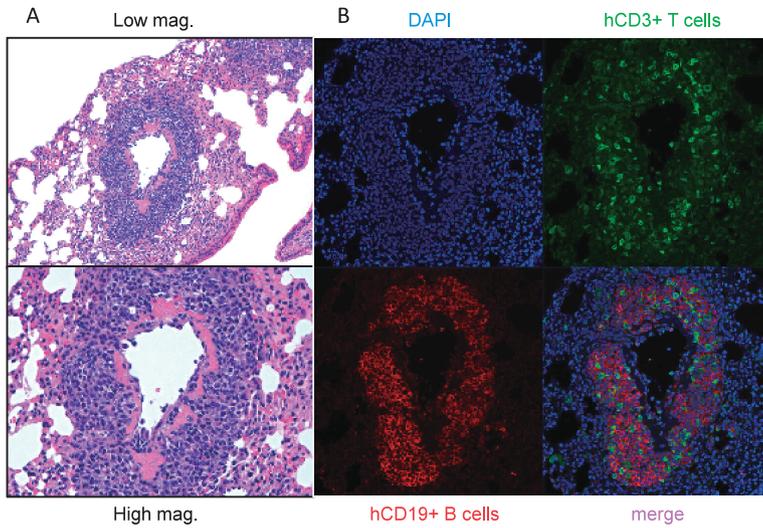


図2 EBV 感染に伴うリンパ増殖性病変の形成
 A：レシピエント肺組織の HE 染色 (上) 低倍率 (下) 高倍率
 肺組織構築の異常とリンパ球の集簇を認める。
 B：抗ヒト CD19 (赤) および抗ヒト CD3 (緑) モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色

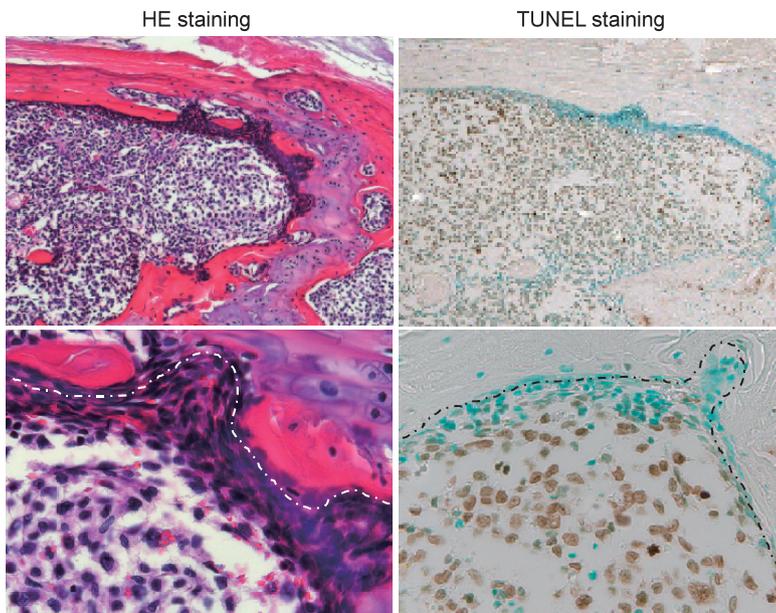


図3 抗がん剤抵抗性白血病幹細胞の局在
 (左) 白血病幹細胞を移植したレシピエントマウスに抗がん剤治療後の骨髄の HE 染色 (上：低倍，下：高倍)
 (右) 白血病幹細胞を移植したレシピエントマウスに抗がん剤治療後の骨髄の TUNEL 染色 (上：低倍，下：高倍)

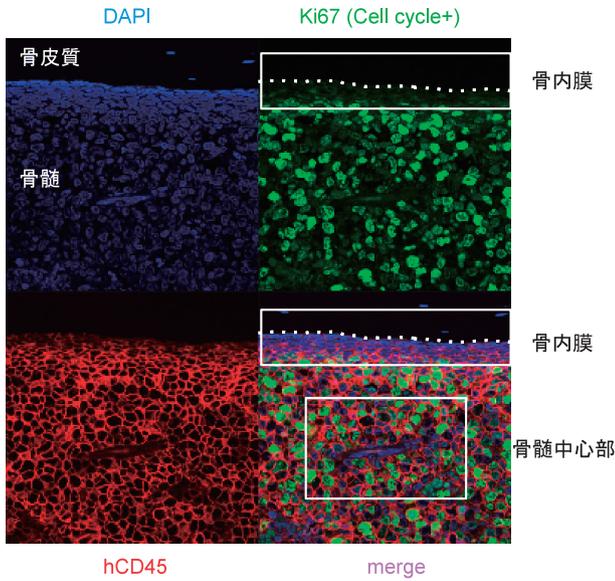


図 4

図 4 白血病幹細胞の細胞周期

青：DAPIによる核染色，緑：Ki67による細胞周期，赤：hCD45によるヒト白血病細胞

骨内膜に存在する白血病幹細胞の細胞周期はKi67陰性で細胞周期が静止期にある．一方，骨髓中央部の白血病非幹細胞は多くがKi67陽性で細胞周期が回っている．

図 5 白血病幹細胞とニッチの結合阻害による治療の可能性

(A) 青：DAPIによる核染色，緑：Ki67による細胞周期の同定，赤：hCD45によるヒト白血病細胞

(左) 定常状態における白血病幹細胞の細胞周期はKi67陰性で細胞周期が静止期にある．一方，骨から離れた骨髓中央部の白血病非幹細胞は多くがKi67陽性である．

(右) サイトカイン投与後，骨内膜に接する白血病幹細胞の多くがKi67陽性に変化した．

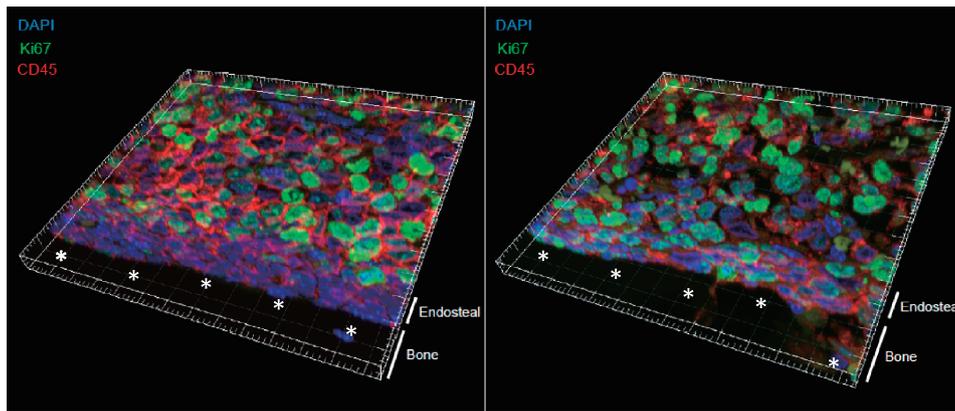
(B) 化学療法後，骨髓中央に存在する白血病非幹細胞は効率良く死滅するが，骨内膜に接して存在する白血病幹細胞が残存し，再発の原因となっている可能性が示唆される．

サイトカインなどを用いて幹細胞とニッチの結合を阻害し，白血病幹細胞の細胞周期を誘導することで，より多くの白血病幹細胞の抗がん剤感受性を高めることに繋がると考えられる．

A

サイトカイン投与 (-)

サイトカイン投与 (+)



* 白血病幹細胞の存在する骨髓—骨の境界部位＝ニッチ

図 5A

B

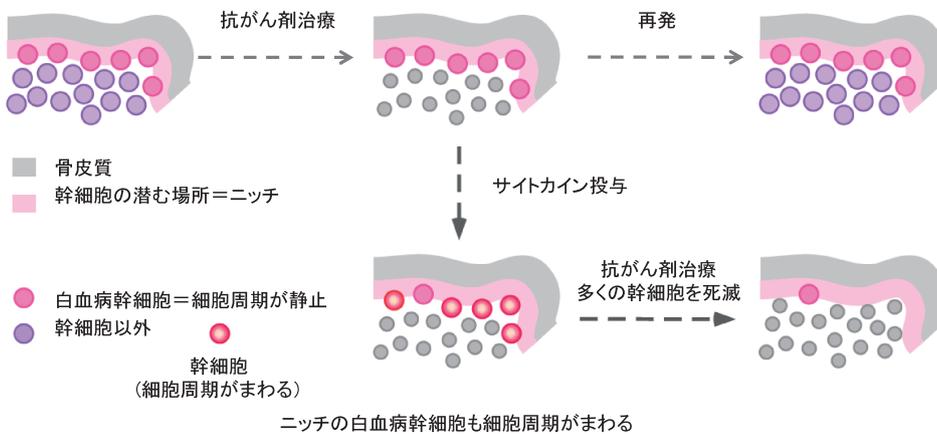


図 5B

したところ、LMP1, EBNA などEB ウイルス由来のペプチドに対するテトラマー陽性のヒト CD8⁺ T 細胞が同定された。さらに、これらの T 細胞の機能解析として、われわれは、ELISPOT アッセイを実施した。EB ウイルスを感染した免疫系ヒト化マウスから得られた CD8⁺ T 細胞は、感染細胞を認識して IFN γ などサイトカインを産生することが確認され、ウイルス感染細胞に対して特異的な細胞傷害活性を有することも分かった。サイトカイン産生、細胞傷害活性というふたつの機能は、HLA class I 分子に対する抗体を加えることで抑制され、一方、HLA class II 分子に対する抗体を加えても著明な抑制が見られないことから、HLA 拘束性を有するヒト CD8 陽性 T 細胞の分化が実現したことが、感染免疫の成立とともに確かめられた⁷⁾。

3. 急性骨髄性白血病のヒト化マウスを用いた幹細胞研究

このように、ウイルス感染症を再現するヒト化マウスモデルを確立する一方、われわれは、白血病について根治を目指して研究を実施している。特に、成人に多い造血器悪性疾患である急性骨髄性白血病は、この数十年にわたる医療・創薬の発展に伴って、多くの患者が完全寛解を得ることができるようになった。しかし、特定の遺伝子異常などリスク因子を持つ場合、寛解導入後も再発を来し、最終的に死の転帰を辿る症例も少なくない。このような背景から、われわれは、急性骨髄性白血病の再発克服と根治を実現すべく、ヒト化マウスのシステムを白血病研究に応用した。まず、患者由来の白血病細胞において、疾患の根源となる幹細胞を同定することができれば、新生仔免疫不全マウスに移植することで、患者病態を再現するモデルマウスを作成できると考えた。実際の患者検体を用いて白血病細胞から CD34, CD38 の抗原の発現様式に従って、CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁻ という 3 種類の異なる細胞分画を純化して、それぞれを移植して *in vivo* での白血病発症を長期的に観察した。その結果、Lin⁻CD34⁺CD38⁻ 細胞を移植した NOD/SCID/IL2rgKO マウスにおいて、正常造血の抑制とヒト白血病細胞の生着および増殖が確認された。さらに、Lin⁻CD34⁺CD38⁻ 細胞を移植したレシピエントマウスの骨髄では CD34⁺CD38⁺ 細胞や CD34⁻ 細胞など他の白血病細胞が作られている。さらに、マウス骨髄からヒト CD34⁺CD38⁻ 細胞をソーティングによって純化した後、2 次移植を行うと、再び、マウスの体内で白血病を発症させることから、この細胞分画が自己複製能を有することが証明された¹¹⁾。一方、このような白血病幹細胞と階層性はすべての造血器疾患に適用されるわけではなく、小児の急性リンパ球性白血病においては、同一の移植システムを用いても、CD34⁺CD38⁺ 細胞や CD34⁻ 細胞など他の白血病細胞にも白血病発症能が確認された^{12,13)}。

4. 急性骨髄性白血病の再発の原因

白血病の病態形成について幹細胞を中心とした階層性の存在が分かってきたが、治療への還元を目指して、白血病の再発がどのようにして発生するかについて研究を進めた。そこで、ヒト白血病幹細胞を移植して、白血病を発症したレシピエントマウスに抗がん剤 (Cytosine Arabinoside : Ara-C) を投与する白血病治療モデルを作製した。白血病治療において用いられる化学療法が、生体内で白血病幹細胞と幹細胞以外の白血病細胞にどの程度効果を発揮するかについて評価するために、フローサイトメトリーを行った。その結果、CD34⁺CD38⁺ 細胞や CD34⁻ 細胞など非幹細胞分画は有効に死滅するものの、CD34⁺CD38⁻ 白血病幹細胞は強い抗がん剤抵抗性を示して、細胞死に陥りにくいことが分かった。この結果に基づいて、われわれは、1) 抗がん剤抵抗性の白血病幹細胞がどこに局在するか、2) どのようなメカニズムで白血病幹細胞が抗がん剤抵抗性を示すか、という問題について答えたいと考えた。

まず、白血病幹細胞の骨髄内の局在について、ヒト白血病幹細胞を移植して数ヶ月後、抗がん剤を投与していない白血病モデルマウスと抗がん剤を投与した白血病モデルマウスの骨切片の病理組織学的解析を実施した。抗がん剤を投与していない白血病マウスにおいては、骨髄全体に白血病細胞が増殖しているが、抗がん剤を投与した白血病モデルマウスの骨切片を解析したところ、骨髄中心部においては、白血病細胞の数が減少し、核の凝集した細胞が多数認められ、TUNEL 染色陽性であることから、多数の白血病細胞がアポトーシスに陥っていることが確認された (図 3)。しかし、抗がん剤治療を施行したマウスの骨内膜に接する部位に局在する白血病細胞を観察すると、抗がん剤投与後にもかかわらず、細胞の減少や核の変化は HE 染色でも認められず、TUNEL 染色においても、大多数の白血病細胞が陰性であった (図 5)。すなわち、白血病幹細胞が骨内膜に接する特定の場所 (ニッチ) において、抗がん剤抵抗性を示していることを突き止めた。

次に、白血病幹細胞の抗がん剤抵抗性に関する検討を行った。原因となる遺伝子異常が多岐にわたる急性骨髄性白血病については、幹細胞レベルでの抗がん剤抵抗性メカニズムもひとつに限定しない可能性が高い。例えば、薬剤排泄能を有する ABC transporter が白血病幹細胞に多く存在する可能性や、抗アポトーシス関連遺伝子が高く発現する可能性などが考えられている。われわれは、これらの解析を実施するとともに、細胞周期について評価した。フローサイトメトリー解析によって、CD34⁺CD38⁺ 細胞分画は、細胞周期に入った細胞を多く含む一方、CD34⁺CD38⁻ 白血病幹細胞では G₀ 期にて静止しているものが大部分であることが分かった。特に、細胞周期依存性の抗がん剤に

対しては、白血病幹細胞の細胞周期が静止していることが、治療抵抗性のひとつの原因である可能性が示唆された¹¹⁾。さらに、抗がん剤抵抗性の白血病幹細胞が骨内膜に接する場所に多く認められることから、骨髄内の共焦点イメージングによって、白血病細胞の局在と細胞周期の関係性について解析した。ヒト白血病細胞の細胞周期は、マウスという環境ではあるものの、骨髄の場所に依存して異なる¹⁰⁾。すなわち、骨髄の中央にある白血病細胞は細胞周期が進んでおり、骨内膜に接する幹細胞が細胞周期の静止期(G0)にとどまる(図4)。これらの結果から、急性骨髄性白血病において、幹細胞が骨内膜に接する場所に多く局在し、細胞周期が静止することによって抗がん剤抵抗性を発揮し、再発のひとつの原因となっている可能性が考えられた。

5. 急性骨髄性白血病の幹細胞を標的とした治療の可能性

従来の抗がん剤治療に抵抗性を示す白血病幹細胞をどのように根絶するかが、今後の急性骨髄性白血病の治療成績の向上に重要であると考えられる。われわれは、まず、幹細胞とニッチの結合を阻害することで、幹細胞の細胞周期を誘導し、抗がん剤に対する感受性を改善できないか検討した。これまで臨床の現場においても報告のあるG-CSFの効果を見るため、白血病を発症したヒト化マウスを用いて、細胞周期と抗がん剤感受性について解析した。症例ごとに幹細胞レベルでのG-CSFに対する感受性・細胞周期の変化にばらつきを認めるものの、白血病幹細胞が、細胞周期の静止期から細胞周期に誘導される現象をとらえることができた。すなわち、白血病を発症した際には、骨内膜に接着するニッチ部位で、白血病幹細胞の細胞周期は多くが静止期にあるが、サイトカインを投与することで、多くの白血病幹細胞が細胞周期に誘導されたことが、細胞周期の共焦点イメージングによって確認された(図5A)。このように幹細胞レベルでの細胞周期の誘導が可能となれば、確かに、ニッチに残存する抗がん剤抵抗性の白血病幹細胞もAraCなどの抗がん剤によってある程度細胞死を誘導することも可能である。われわれは、G-CSFというサイトカインに着目したが、ほかにもIFN α の使用、SDF1-CXCR4の結合阻害にも同様の可能性があると考えられており、基礎研究から臨床試験の実施を目指して、複数のグループが取り組んでいる¹⁵⁻¹⁷⁾(図5B)。

サイトカインで白血病幹細胞の細胞周期を修飾することが臨床への還元においてより早期に実現される可能性を持つ一方、白血病幹細胞に発現する抗原分子に対する創薬を実施することで、特異性をもった治療薬の開発が期待される。特に、正常造血幹細胞に発現しておらず、白血病幹細胞に発現する分子を見出すことで、重篤な造血抑制を回避し、再発のリスクを最小限とすることを目指して、網羅的な遺伝子解析を実施してきた。マイクロアレイによって抽

出された多数の表面抗原分子について、RNAレベル、タンパクレベルでの検証を通して、FCGR2A, IL2RAが解析した白血病症例の約3割程度に幹細胞レベルで発現していることが分かった¹⁸⁾。このような発現解析に加えて、これらの抗原を発現する白血病細胞が白血病発症能を有する機能性や、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓などの非造血組織に発現していない安全性も確認できた。国内外でこのような研究が活発になっており、同定された幾つかの抗原分子が抗体医薬など創薬に還元されるべく、創薬の専門家との連携が実施されている¹⁹⁾。

このように、ヒト化マウス研究は、scid-huシステムの報告以来20年を経て、マウスという実験動物の体内に長期にわたって高いヒト細胞のキメリズムを維持することに成功し、多様な免疫細胞の分化・成熟を実現した。正常のヒト造血・免疫系の理解に加えて、造血・免疫に関わる疾患の一部を再現できることも確かめられてきた。これから、疾患を克服する重要な役割を担う免疫と免疫監視から逃避して発症・再発をおこす疾患の関係性を明らかにすべく、造血・免疫系の微小環境のヒト化などあたらしいヒト化マウスシステムの開発と改良に期待が寄せられる。このような取り組みを通して、正常なヒト造血・免疫系の構築と、まだ克服できていないヒト疾患について、あらたな知見を得て、今後の臨床・創薬への還元を目指したい。

文 献

- 1) McCune, J.M., *et al.* (1988) *Science*, 241, 1632-1639.
- 2) Shultz, L.D., *et al.* (1995) *J. Immunol.*, 154, 180-191.
- 3) Ito, M., *et al.* (2002) *Blood*, 100, 3175-3182.
- 4) Ishikawa, F., *et al.* (2005) *Blood*, 106, 1565-1573.
- 5) Shultz, L.D., Ishikawa, F., & Greiner, D.L. (2007) *Nature Reviews*, 7, 118-130.
- 6) Ishikawa, F., Livingston, A.G., Wingard, J.R., Nishikawa, S., & Ogawa, M. (2002) *Exp. Hematol.*, 30, 488-494.
- 7) Shultz, L.D., *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 13022-13027.
- 8) Baenziger, S., *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 15951-15956.
- 9) Watanabe, S., *et al.* (2007) *Blood*, 109, 212-218.
- 10) Kumar, P., Ban, H.S., Kim, S.S., *et al.* (2008) *Cell*, 134, 577-586.
- 11) Ishikawa, F., *et al.* (2007) *Nature Biotechnology*, 25, 1315-1321.
- 12) Kong, Y., *et al.* (2008) *Leukemia*, 22, 1207-1213.
- 13) le Viseur, C., Hotfilder, M., Bomken, S., *et al.* (2008) *Cancer Cell*, 14, 47-58.
- 14) Saito, Y., *et al.* (2010) *Nature Biotechnology*, 28, 275-280.
- 15) Essers, M.A., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., *et al.* (2009) *Nature*, 458, 904-908.
- 16) Sato, T., *et al.* (2009) *Nature Medicine*, 15, 696-700.
- 17) Zeng, Z., *et al.* (2009) *Blood*, 113, 6215-6224.
- 18) Saito, Y., *et al.* (2010) *Science Translational Medicine*, 2, 17ra19.
- 19) Jordan, C.T. (2010) *Science Translational Medicine*, 2, 31ps21.