

- 703-713.
- 5) Aoyama, C., Ohtani, A., & Ishidate, K. (2002) *Biochem. J.*, 363, 777-784.
 - 6) Liao, H., Aoyama, C., Ishidate, K., & Teraoka, H. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 111-120.
 - 7) Ramírez de Molina, A., Bález-Coronel, M., Gutiérrez, R., Rodríguez-González, A., Olmeda, D., Megías, D., & Lacal, J.C. (2004) *Cancer Res.*, 64, 6732-6739.
 - 8) Hernando, E., Sarmentero-Estrada, J., Koppie, T., Belda-Iniesta, C., Ramírez de Molina, V., Cejas P, Ozu, C., Le, C., Sánchez, J.J., González-Barón, M., Koutcher, J., Córdón-Cardó, C., Bochner, B.H., Lacal, J.C., & Ramírez de Molina, A. (2009) *Oncogene*, 28, 2425-2435.
 - 9) Wu, G., Aoyama, C., Young, S.G., & Vance, D.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 1456-1462.
 - 10) Cuadrado, A., Carnero, A., Dolfi, F., Jimenez, B., & Lacal, J. C. (1993) *Oncogene*, 8, 2959-2968.
 - 11) Sher, R.B., Aoyama, C., Huebsch, K.A., Ji, S., Kerner, J., Yang, Y., Frankel, W.N., Hoppel, C.L., Wood, P.A., Vance, D. E., & Cox, G.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 4938-4948.
 - 12) Cohn, R.D. & Campbell, K.P. (2000) *Muscle Nerve.*, 23, 1456-1471.
 - 13) Wu, G., Sher, R.B., Cox, G.A., & Vance, D.E. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 347-356.
 - 14) Janardhan, S., Srivani, P., & Sastry, G.N. (2006) *Curr. Med. Chem.*, 13, 1169-1186.
 - 15) Miyagawa, T., Kawashima, M., Nishida, N., Ohashi, J., Kimura, R., Fujimoto, A., Shimada, M., Morishita, S., Shigeta, T., Lin, L., Hong, S.C., Faraco, J., Shin, Y.K., Jeong, J.H., Okazaki, Y., Tsuji, S., Honda, M., Honda, Y., Mignot, E., & Tokunaga, K. (2008) *Nat. Genet.*, 40, 411-421.

青山 智英子
(獨協医科大学 生化学)

The function of choline kinase
Chieko Aoyama (Department of Biochemistry, Dokkyo Medical University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan)

蛍光プローブによるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) 動態の定量的測定—カルシウムオシレーションと IP₃ 動態—

1. はじめに

Ca²⁺は様々な細胞反応を制御する細胞内メッセンジャーであり、細胞増殖や分化、エネルギー産生、アポトーシス、分泌などの細胞機能の調節に関与している¹⁾。最近の20年の間に、高速・高解像度のイメージング技術の発達

により細胞内のCa²⁺反応をリアルタイムで可視化することが可能になり、様々な細胞でCa²⁺ウェーブやオシレーションなどの複雑なパターンを持ったCa²⁺シグナルが発生することが明らかになってきた。このような時間・空間的パターンを持ったCa²⁺シグナルによって、多彩な細胞機能が調節されると考えられている。

Ca²⁺シグナルの発生には、細胞外から細胞質にCa²⁺を流入させる様々なCa²⁺チャネルに加えて、細胞内ストアからCa²⁺を放出するチャネルであるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) 受容体やリアノジン受容体が関与する。特に非興奮性細胞におけるCa²⁺応答では、IP₃受容体を介するCa²⁺放出が重要な役割を担っている。近年、Ca²⁺シグナルを調節する重要な細胞内メッセンジャーであるIP₃をリアルタイムで計測できる蛍光プローブが開発され²⁻⁴⁾、時間・空間的Ca²⁺シグナルとIP₃動態の関係を解析することが可能になった。本稿では、このIP₃蛍光プローブとそれらを用いた新しいIP₃測定法を紹介する。さらに、このIP₃測定法によって明らかになってきた細胞内のIP₃動態とCa²⁺オシレーションとの関係⁵⁾について解説する。

2. IP₃ 蛍光プローブの開発

IP₃はホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PIP₂) の加水分解によって産生され、細胞内Ca²⁺チャネルであるIP₃受容体を活性化することによって細胞内ストアからのCa²⁺放出を調節する情報伝達分子である。IP₃の産生系としては、Gタンパク共役型レセプターを介して活性化されるホスホリパーゼC (PLC) βがよく知られているが、それ以外にもT細胞レセプターやB細胞レセプター刺激によるチロシンリン酸化酵素を介して活性化されるPLCγが知られている。

従来のIP₃測定では、³H-D-ミオイノシトールの代謝で生成されたIP₃を陰イオン交換カラムや高速液体クロマトグラフィーを使って分離・定量する方法や、IP₃結合タンパク質を使ったバインディングアッセイが使われてきた。しかし、Ca²⁺ウェーブやCa²⁺オシレーションに代表される時間・空間的に制御されたCa²⁺シグナルとIP₃の関係を解析するためには、単一細胞レベルで細胞内IP₃濃度 ([IP₃]_i) 変化の測定ができる蛍光プローブを使ったIP₃測定法が必要である。

蛍光による [IP₃]_i 変化の測定に初めて利用されたのは、蛍光タンパク質 GFP と PLCδ の PH ドメインの融合タンパク質 (GFP-PHD) である⁶⁾。PLCδ の PH ドメインは、PIP₂ と結合する特性を持っており、PIP₂ をモニターする蛍光プ

ローブとして用いられていた。しかし IP_3 が PIP_2 と競合的に GFP-PHD と結合することによって、細胞膜の PIP_2 に結合した GFP-PHD を遊離させることが示された⁶⁾。このことから GFP-PHD は、リアルタイムで IP_3 動態を測定できる初めての蛍光プローブとして注目された。一方で、GFP-PHD の細胞質への遊離が PIP_2 の代謝や他の PIP_2 結合タンパク質との競合などでも起こりうることから、この方法の IP_3 特異性に対する問題も指摘されるようになった⁷⁾。

現在、 IP_3 のリアルタイム測定に使われているのは、 IP_3 受容体のリガンド結合部位を使った蛍光プローブである。 IP_3 受容体は IP_3 特異性が非常に高い自然界の分子センサーであり、そのアミノ末端側 604 個のアミノ酸からなる領域が IP_3 結合ドメインを構成する⁸⁾。筆者らはタイプ 3 IP_3 受容体のリガンド結合ドメインの両端に GFP 変異体である CFP (青緑色) と YFP (黄色) を結合させた最初の IP_3 蛍光プローブ「LIBRA」を開発した²⁾。これは、二つの近接する蛍光タンパク質 CFP と YFP の間で起こる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した蛍光プローブで、 IP_3 結合に伴うリガンド結合ドメインの立体構造変化によって FRET 効率が変化し、CFP と YFP の蛍光比が変化すると考えられている。その後、タイプ 1 IP_3 受容体のリガンド結合ドメインの一部を使った IP_3 プローブ「Fretino」³⁾ や「IRIS」⁴⁾ が発表され、この FRET 型 IP_3 蛍光プローブの有効性が確認されている。

IP_3 受容体リガンド結合ドメインには、アミノ末端側のサブプレッサー領域とカルボキシル末端側のコア領域がある。コア領域は IP_3 が結合する部分であるのに対して、サブプレッサー領域は IP_3 の結合を弱める作用を持っている。 IP_3 受容体の三つのサブタイプ (タイプ 1, 2, 3) は、それぞれ IP_3 に対する親和性が異なる。この IP_3 親和性の違いは、サブプレッサー領域によって決定することが明らかにされている⁹⁾。 IP_3 プローブとしてリガンド結合ドメイン全体が使われている LIBRA と比較して、コア領域だけが使われている Fretino と IRIS は IP_3 に対する親和性が非常に高く、そのままでは無刺激時の細胞内 IP_3 に反応してしまうため、刺激による $[IP_3]_i$ の測定には効率が良くない。従って $[IP_3]_i$ 変化の測定には、アミノ酸の置換によって IP_3 親和性を低下させたものが用いられる。一方、リガンド結合ドメイン全体が使われている LIBRA は、 IP_3 に対する親和性が低いと小さな IP_3 濃度 ($[IP_3]$) 変化の測定には不向きであった。また、市販されている黄色蛍光タンパク質 (EYFP) には、pH の影響を受けやすいという欠点がある。そこで筆者らは、pH の影響を受けにくい黄色蛍光タンパ

ク質 (Venus) を用いた LIBRAvIII を作成した (図 1A)。さらに、タイプ 1 やタイプ 2 IP_3 受容体のリガンド結合ドメインを用いたり、リガンド結合ドメインのアミノ酸を置換することによって感受性を高めた高親和性タイプ (LIBRAvI, II, IIS, IIIS) や、コントロール実験用の IP_3 非感受性タイプ (LIBRAvN) を作成した (図 1A)。これらの改良型 IP_3 プローブは、図 1B に示すような IP_3 親和性を持っており、細胞や刺激の種類に応じて適した IP_3 蛍光プローブを用いることが可能である。

IP_3 受容体のリガンド結合ドメインを用いた FRET 型プローブは、1, 4, 5- IP_3 に対する特異性が高いことに加えて、蛍光比による測定ができるという利点がある。一般的に蛍光比による測定は、定量的な解析がやり易いという大きな利点がある¹⁰⁾。さらに、高濃度の IP_3 による最大蛍光変化を測定し (キャリブレーション)、それに対する変化率を比較すれば個々の細胞の反応を定量的に調べることができる。Fura-2 や Indo-1 等の Ca^{2+} 蛍光プローブを用いた測定では、イオノフォアを使ったキャリブレーションによって、反応性の比較や細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の計算が可能である。原理的には膜透過性 IP_3 アナログを使ってキャリブレーションを行うことは可能と思われるが、その透過速度やコストを考えるとあまり現実的とは言えない。一方、サポニンや β エスチンなどで細胞に小さな穴を空けて細胞内に IP_3 を導入することが可能であり、適当な条件で穿孔すれば、分子サイズの大きな蛍光タンパク質を細胞内にとどめたままで IP_3 を細胞内に導入することができる。しかし、このキャリブレーションにはかなりの経験が必要である。筆者らが開発した LIBRA は GAP43 という細胞膜局在シグナルが付加されており、細胞外に漏出しないためキャリブレーション操作を確実に行うことができる (図 1C)。図 1D はその実験例である。 IP_3 蛍光プローブには固有の解離定数と Hill 係数があり、これらの値は図 1B に示す濃度反応曲線から得ることができる。これらの値とキャリブレーションによって得られた個々の細胞における最大蛍光変化、および無刺激時の $[IP_3]_i$ から、刺激による $[IP_3]_i$ 変化を計算することが可能である。LIBRAv シリーズの中で IP_3 親和性が最も高い LIBRAvIIS の場合、250 nM 程度までの比較的小さな $[IP_3]_i$ の変化の測定に適しているが、それ以上の $[IP_3]_i$ 濃度測定では信頼性が低下する (図 1E2, E4)。従って、 Ca^{2+} オシレーションを起こすような比較的弱い刺激で起こる $[IP_3]_i$ の解析に向いている。一方、様々な濃度のアゴニスト刺激による $[IP_3]_i$ 変化の解析には、広範囲の $[IP_3]_i$ 測定が可能な低親和性

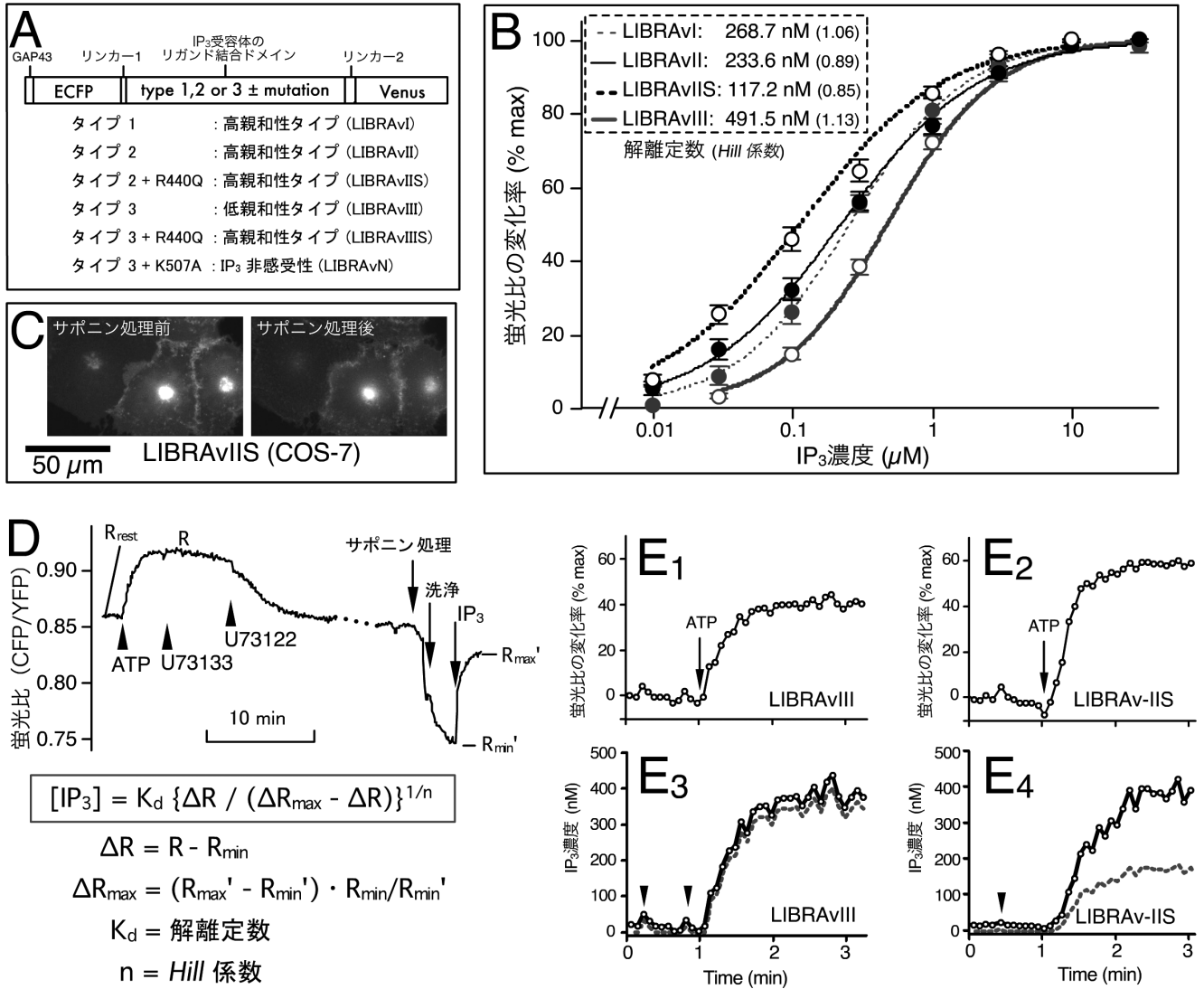


図1 IP₃プローブ LIBRAv シリーズの特徴と [IP₃]_i測定法

A: IP₃プローブ LIBRAv シリーズの構造. B: IP₃による蛍光比 (CFP/YFP) の変化. C: COS-7 細胞に発現させた IP₃ 蛍光センサーの細胞内局在. 細胞膜局在シグナルによって細胞膜に局在し, その蛍光はサポニン処理前と処理後でほとんど変化しない. D: LIBRA を使った [IP₃]_i 濃度の測定法 (実験例と計算式). 高感受度タイプ (LIBRAvIIS) を発現させた COS-7 細胞を ATP (10 μM) で刺激して蛍光比の変化を測定した. この ATP による反応は PLC 阻害薬 U73122 (5 μM) で抑制されるが, 非活性アナログ U73133 の影響は受けない. この実験の最後に細胞をサポニンで穿孔し, 10 μM IP₃ による蛍光比の変化 (最大蛍光比変化) を測定した. E: LIBRA の蛍光変化率 (E1, E2) と [IP₃]_i (E3, E4). 無刺激時の [IP₃]_i を 15 nM として [IP₃]_i 変化を計算した. 無刺激時の [IP₃]_i を 0 nM として計算した結果 (灰色点線) と比較すると, IP₃ 親和性が低い LIBRAvIII を使った測定は無刺激時の [IP₃]_i の影響がほとんど無いのに対し, 親和性が高い LIBRAvIIS を使った測定は, 無刺激時の [IP₃]_i を考慮しないと濃度を過小評価してしまうことがわかる. また LIBRAvIII (E1, E3) では, 無刺激時のノイズ (矢頭) がそのまま [IP₃]_i に反映するが, 広い範囲で蛍光変化率と [IP₃]_i 変化のパターンが良く一致する. 一方, LIBRAvIIS (E2, E4) では, 無刺激時のノイズの影響を受けにくい, [IP₃]_i が高い時のノイズを拾いやすい.

タイプが向いている (図 1E1, E3).

3. Ca²⁺オシレーションに伴う IP₃ 動態

筆者らはこの定量的 IP₃ 測定法と LIBRAvIIS を使って,

Ca²⁺オシレーションに伴う IP₃ 動態を明らかにした⁵⁾. Ca²⁺オシレーションは, Ca²⁺スパイクの規則的な繰り返りで, その頻度が刺激の強さによって変化する. 刺激の強さというアナログ信号を Ca²⁺パルスの頻度というデジタル信号

に変換する細胞のA/Dコンバータとしての役割があるとも考えられている¹¹。Ca²⁺オシレーションの発生機構は長い間議論され、これまでに多くの実験的アプローチや数理モデルによる説明が試みられてきた。これらの議論の中で最も重要な焦点のひとつは、[IP₃]_iの振動の有無である¹¹。IP₃振動によってCa²⁺オシレーションが起こるというモデルはわかりやすいが、IP₃振動の実証が必要である。一方、[IP₃]_iが振動しなくてもCa²⁺オシレーションが起こるといふモデルは、それを支持する実験的研究が報告されている。例えば、非代謝性のIP₃アナログを細胞内に注入してCa²⁺オシレーションが起こることや¹²、サポニンで穿孔した細胞をIP₃で刺激すると、ストア内Ca²⁺のオシレーシ

ョンが観察されるといった報告は^{13,14}、Ca²⁺オシレーションに[IP₃]_iの変動が必要ないことを示している。しかしこれらの実験結果は、[IP₃]_iが振動しないことを証明したものではない。

筆者らは以前からCa²⁺オシレーションの研究にHSY-EA1細胞というヒト耳下腺導管由来の培養細胞を用いていた¹³。この細胞は、強いアゴニスト刺激でもCa²⁺オシレーションが起こり易いという特徴がある。それに対してCOS-7細胞の場合は、比較的弱いアゴニスト刺激ではCa²⁺オシレーションが起こるが、強い刺激では持続的な細胞内Ca²⁺濃度上昇が起こる。図2はCOS-7細胞とHSY-EA1細胞にLIBRAvIISを発現させ、Fura-2を取り込ませ

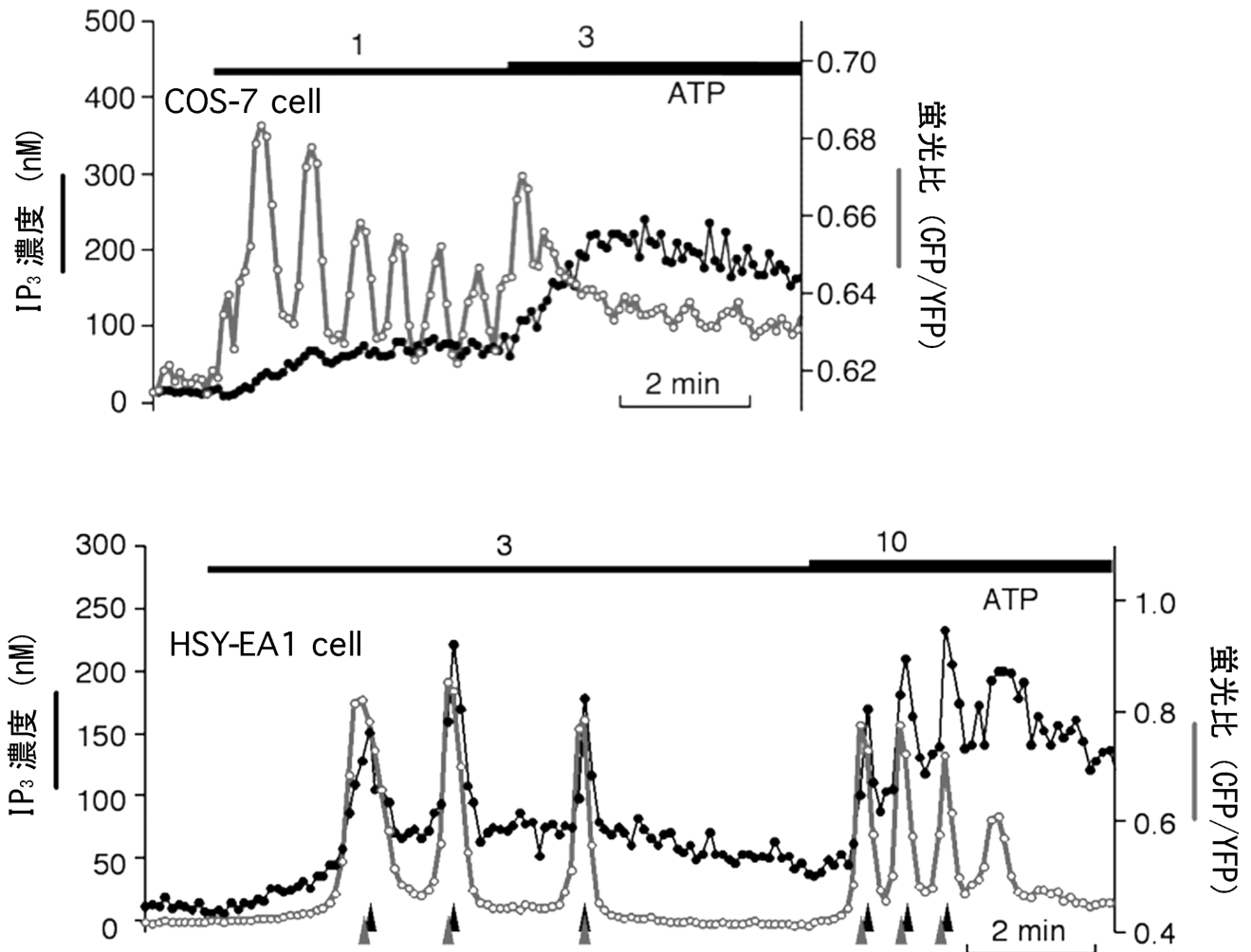


図2 COS-7細胞とHSY-EA1細胞のCa²⁺オシレーションと[IP₃]_i動態

LIBRAvIIS発現細胞にFura-2を負荷し、[IP₃]_iと[Ca²⁺]_iを同時測定した。HSY-EA1細胞ではCa²⁺オシレーション(灰色)と同調したIP₃振動(黒)が観察されたが、COS-7細胞ではIP₃振動は認められなかった。HSY-EA1細胞のCa²⁺オシレーションのスパイクピーク(灰色の矢頭)は、IP₃振動のスパイクピーク(黒の矢頭)に先行する。

て $[IP_3]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ の変化を同時に解析した結果である。LIBRA と Fura-2 の同時解析の場合、Fura-2 の負荷を少なく (1-3 分程度) にして LIBRA 蛍光への干渉を最小限にする等の注意が必要である。我々の実験結果では、COS-7 細胞では IP_3 振動が認められず、多くの場合 $[IP_3]_i$ が 100 nM 程度の時に Ca^{2+} オシレーションが起こった (図 2, 上段)。それに対して HSY-EA1 細胞では、明らかな IP_3 振動が観察された (図 2, 下段)。この時の IP_3 スパイクの大きさは 50-150 nM 程度で、スパイク頻度が小さい時ほど明確な IP_3 振動が観察された。しかし Ca^{2+} オシレーションと IP_3 振動のスパイクピークを比較すると、 Ca^{2+} が先行することから、 IP_3 振動は Ca^{2+} オシレーションの結果であって、原因では無いと考えられる (図 2, 下段)。

COS-7 細胞と HSY-EA1 細胞を比較すると、 IP_3 振動が起こらない COS-7 細胞では、 $[IP_3]_i$ が 100 nM 以上になると Ca^{2+} オシレーションはあまり起こらなくなったのに対して、 IP_3 振動が起こる HSY-EA1 細胞では、 $[IP_3]_i$ が 250 nM 程度まで上がっても 60% 以上の細胞で Ca^{2+} オシレーションが起こった。 IP_3 振動は、 Ca^{2+} オシレーションの発生に必須では無いと考えられるが、なんらかの補助的な役割があるのかもしれない。今後、このような Ca^{2+} オシレーションと IP_3 動態に関する知見が蓄積することで、 IP_3 振動の意義がわかってくると考えられる。

4. IP_3 振動の発生機構

IP_3 振動の発生に関する実験的解析が蛍光プローブによって可能になったばかりの現時点では、その重要性は明確ではない。しかし、これまでは単なる仮説であった IP_3 振動が実際に起こることが示されたことによって、その役割に関する議論の重要性が高まったと考えられる。また IP_3 振動の発生機構についても現時点では不明である。以前から論じられてきた数理モデルでは、 IP_3 生成系に対する Ca^{2+} のフィードバック促進による IP_3 振動モデルと、 Ca^{2+} のフィードバック抑制による IP_3 振動モデルがある¹⁵⁾。フィードバック促進は、主に PLC に対する Ca^{2+} の促進作用が重要と考えられている。一方、フィードバック抑制では、 Ca^{2+} による IP_3 分解酵素の活性化と Ca^{2+} 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKC) のトランスロケーションによる PLC の抑制が考えられている。これらのモデルを比較すると、フィードバック促進モデルでは $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に伴うスパイク状の $[IP_3]_i$ 上昇と、 $[IP_3]_i$ の変化に先行して $[Ca^{2+}]_i$ が変化することが予測されている。それに対し、フィードバック抑制モデルでは、比較的ゆっくりと $[IP_3]_i$

が上昇し、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に少し遅れて急速に $[IP_3]_i$ が低下するジグザグ型の IP_3 振動が予測されている。筆者らの $[IP_3]_i$ の実測値データは、フィードバック促進モデルと良く一致する。興味深いことに、フィードバック促進モデルでは、 IP_3 オシレーションは Ca^{2+} オシレーションを起こしやすくしていることが予測されており¹⁵⁾、その IP_3 振動が起こる HSY-EA1 細胞で Ca^{2+} オシレーションが起こりやすいという実験結果と一致する。

5. おわりに

これまで Ca^{2+} シグナルと IP_3 動態の関係は様々な数理モデルによって予測され、それらに基づいて Ca^{2+} オシレーションなどの発生機構が議論されてきた。今まではそれらの妥当性を検証することができなかったが、蛍光プローブと定量的解析法によって検証が可能になった。今後、これらの実測値に基づいてさらに正確な数理モデルの作成が可能になるものと期待される。また IP_3 は Ca^{2+} と比較して、伝搬が早く、広い範囲に伝わるメッセンジャーと考えられている。しかし、これらは IP_3 結合タンパク質や代謝酵素の影響を受けるため、細胞種や刺激によって異なる可能性がある。多くの FRET 型蛍光プローブと同様に LIBRA の蛍光変化率は Fura-2 等の蛍光プローブほど大きくないので高速イメージングは難しいが、今後の改良による IP_3 イメージングに期待したい。

- 1) Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 11-21.
- 2) Tanimura, A., Nezu, A., Morita, T., Turner, R.J., & Tojyo, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 38095-38098.
- 3) Sato, M., Ueda, Y., Shibuya, M., & Umezawa, Y. (2005) *Anal. Chem.*, 77, 4751-4758.
- 4) Matsu-ura, T., Michikawa, T., Inoue, T., Miyawaki, A., Yoshida, M., & Mikoshiba, K. (2006) *J. Cell Biol.*, 173, 755-765.
- 5) Tanimura, A., Morita, T., Nezu, A., Shitara, A., Hashimoto, N., & Tojyo, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 8910-8917.
- 6) Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., & Iino, M. (1999) *Science*, 284, 1527-1530.
- 7) Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., & Balla, T. (2006) *J. Cell Biol.*, 175, 377-382.
- 8) Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuchi, T., & Mikoshiba, K. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 18277-18284.
- 9) Iwai, M., Michikawa, T., Bosanac, I., Ikura, M., & Mikoshiba, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 12755-12764.
- 10) Miyawaki, A. (2003) *Develop. Cell*, 4, 295-305.
- 11) Sneyd, J., Tsaneva-Atanasova, K., Reznikov, V., Bai, Y., Sanderson, M.J., & Yule, D.I. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 103, 1675-1680.

- 12) Wakui, M., Potter, B.V.L., & Petersen, O.H. (1989) *Nature*, 339, 317-320.
- 13) Tanimura, A. & Turner, R.J. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 30904-30908.
- 14) Hajnóczky, G. & Thomas, A.P. (1997) *EMBO J.*, 16, 3533-3543.
- 15) Politi, A., Gaspers, L.D., Thomas, A.P., & Höfer, T. (2006) *Biophys. J.*, 90, 3120-3133.

谷村 明彦

(北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野)

Use of fluorescent probes for the quantitative analysis of inositol 1, 4, 5-trisphosphate dynamics—Calcium oscillations and IP₃ dynamics

Akihiko Tanimura (Health Sciences University of Hokkaido, Division of Oral Biology, Department of Pharmacology, 1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan)

NOG マウスを用いたヒト化動物モデルの研究展開

1. はじめに

実験動物はヒトを対象に直接実施することが困難な *in vivo* 研究に不可欠である。近年、遺伝子改変動物により多数の分子の生体内機能が明らかにされたと同時に、様々なヒトの疾患・病態を反映する動物モデルも報告されている。しかし、同一生体分子であってもヒトとヒト以外の種にはしばしば大きな隔りがある。例えば、ヒトには存在するがマウスにはその遺伝子が存在しない分子、または両者に存在するが発現する組織が大きく異なる分子が多く知られている。このような分子を標的とした遺伝子改変動物は、その分子の量的・質的異常に起因するヒトの疾患・病態を必ずしも的確に構築できるとはいえない。代謝については、薬物代謝や解毒に関与するシトクロム P450 メンバーのプロフィールが種間で大きく異なることはよく知られている。ビタミン C 合成酵素や尿酸分解酵素はマウスには存在するがヒトには存在しないなどの例もあり、マウスでの薬物代謝・毒性・栄養代謝の検討結果がヒトには適用できないケースもめずらしくない。また、ヒト細胞に特異的に感染する病原体はマウスやラットに直接接種しても感染が成りたらず、その病態が成立しないこともしばしば

ある。様々な培養技術の向上が得られた今日でも *in vitro* で増殖不能なヒト由来細胞があり、何らかの生体内環境のもとでの維持が必須となる。

上述の問題を克服するアプローチの一つが「ヒト化動物モデル」である。すなわち、異種細胞・組織を拒絶できない免疫不全動物を宿主として、その生体内に特定のヒト細胞・組織を再建し、ヒトに特異的な病態や代謝プロフィールの構築をめざすアプローチである。本稿では NOG マウスを用いたヒト化動物モデルの研究展開について概説する。

2. 超免疫不全動物としての NOG マウスの樹立

先天性の重度免疫不全を呈する SCID (severe combined immunodeficiency) マウスに由来する変異遺伝子 *scid* は T 細胞と B 細胞の欠損をもたらす。分子生物学的アプローチによりその原因責任遺伝子の実体は *Prkdc* 遺伝子の変異であることが後に明らかにされた¹⁾。この遺伝子は T 細胞受容体、および、免疫グロブリンの遺伝子再構成に関与する DNA 依存性プロテインキナーゼをコードし、その変異によって遺伝子再構成が障害されて発生・分化が停止した結果、T 細胞と B 細胞の欠損が生じる。また、遺伝子再構成に重要な役割を果たす *Rag1*、および、*Rag2* 遺伝子の欠失も *scid* 変異と同様に T 細胞と B 細胞の欠損をもたらす。

コンジェニック手法による *scid* 遺伝子導入、または遺伝子改変による *Rag1/Rag2* 遺伝子ノックアウトによる獲得免疫の喪失のみでは異種移植拒絶を十分に妨げられず、更なる生着性向上のため宿主の自然免疫の部分的欠損も付加する必要があった。自己免疫型糖尿病を自然発症することで広く知られている NOD (non-obese diabetic mouse) マウスでは、自然免疫を構成する細胞の機能の一部が低下している。これに着目した伊藤らは、NOD 系統へ *scid* 遺伝子をコンジェニック導入して NOD-*scid* マウスを樹立した²⁾。NOD-*scid* マウスはヒト造血幹細胞移植による造血系再構築モデルやヒトがん移植モデルに広く用いられるようになったが、構築される細胞系列の偏りや生着効率の低さといった点があり、ヒト化動物モデルの宿主として格段の改良が望まれた。

NOG (NOD/Shi-*scid*, IL2R γ^{null}) マウスは、NOD-*scid* 系への IL-2 受容体 γ 鎖 (IL2R γ) ノックアウト³⁾ 導入によって実験動物中央研究所が樹立し、2002 年に報告した超免疫不全動物である (図 1)⁴⁾。NK 細胞の発生・分化や樹状細胞 (DCs) の IFN- γ 産生に必須である IL-15 の受容体を