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 IP_3 dynamics

Akihiko Tanimura (Health Sciences University of Hokkaido, Devision 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たりがある．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たず，その病態が成立しないこともしばしばである．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し，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，免疫グログ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*, IL2Rγ^{null}) マウスは，NOD-*scid* 系への IL-2 受容体 γ 鎖 (IL2Rγ) 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

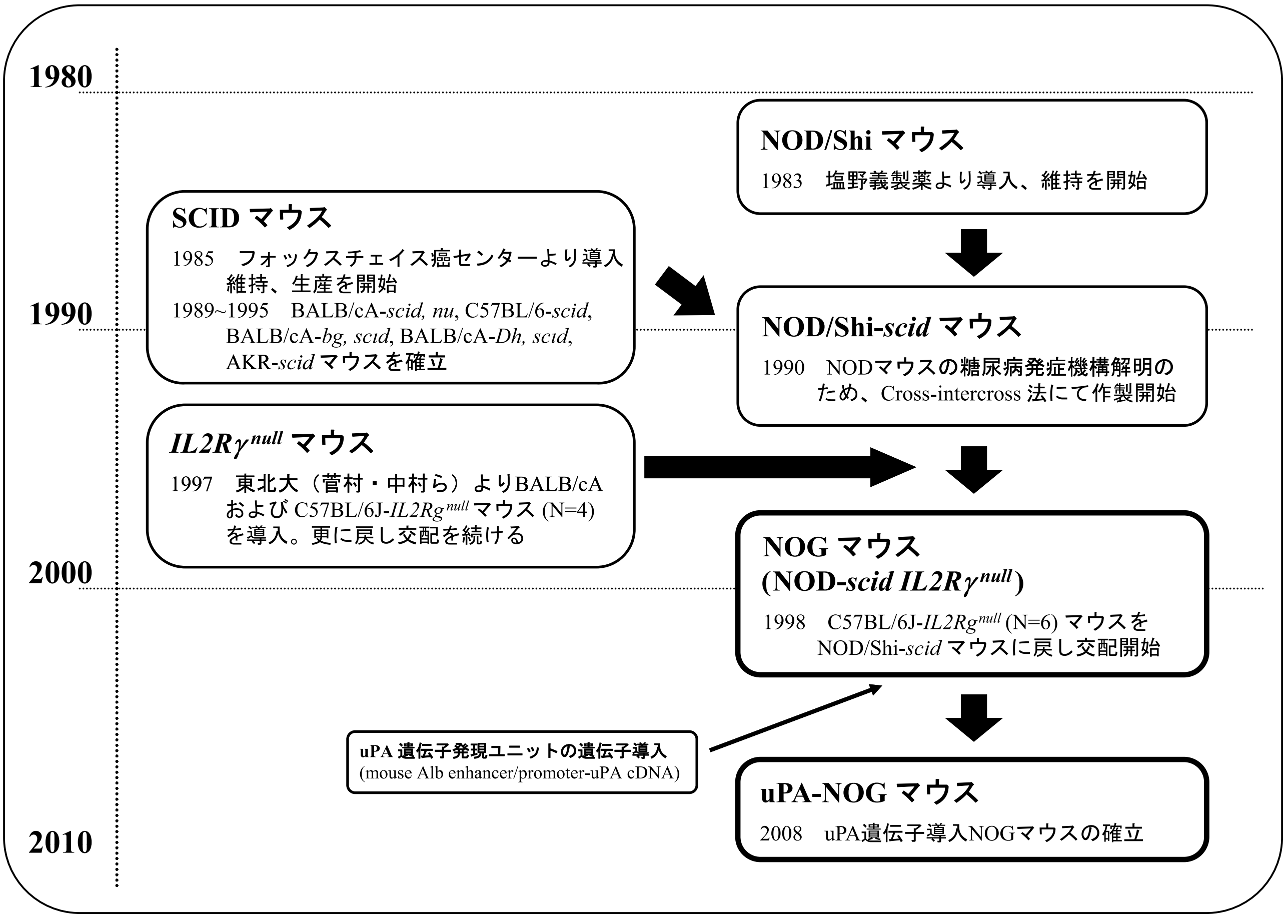

図 1　NOG マウス樹立までの歴史

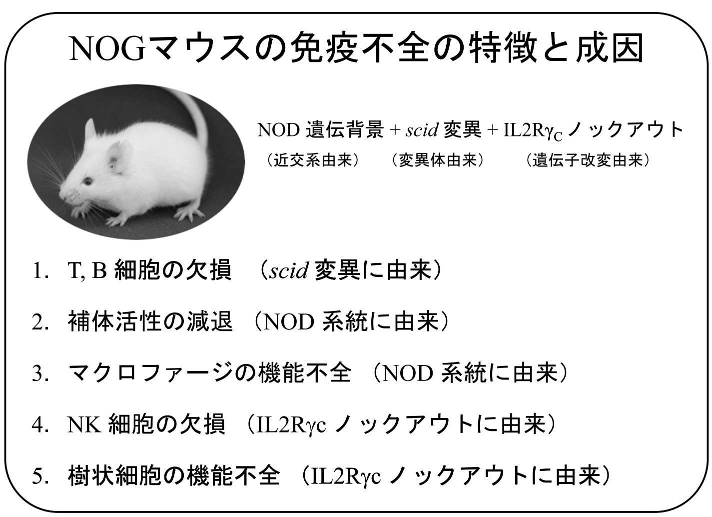

図 2　NOG マウスの超免疫不全の“レシピ”

構成するサブユニットの一つ，IL2Rγを遺伝子ノックアウトで欠落させることでNK細胞欠損とDCsのIFN-γ産生障害をもたらした．つまりNOGマウスの“超免疫不全”のレシピは，*scid* 変異に由来するT/B細胞欠損，NOD系統に由来する一部の自然免疫機能低下，IL2Rγノックアウトに由来するNK細胞欠損とDCsのIFN-γ産生障害ということになる（**図2**）．なお，米国のジャクソン研究所も同様のNOD-*scid* 系にIL2Rγノックアウトを導入したマウスを樹立し，2005年に報告している[5]．

3.　NOGマウスを用いたヒト化動物

(1)　ヒト造血モデル

ヒト造血幹細胞移植により構築したヒト造血モデルにおいて，宿主がNOD-*scid* マウスの場合，偏った細胞系列への増殖分化がみられるが，NOGマウスを宿主とした場合は広汎な細胞系列への増殖分化が認められる[4]．NOGマウスでは造血幹細胞移入後12–16週で末梢血単核球の20–40% がヒトに由来し，骨髄や脾臓ではその割合が60–80% に達する．特にヒトT/B細胞の分化が顕著に認められるのが特徴的であり，初期はB細胞優位で，後にT細胞が優位となる．また，NOD-*scid* マウスを宿主に用いた場合とは異なり，ヒトT細胞のCD4陽性細胞とCD8陽性細胞への分化も観察される．これらのヒト細胞は移植から10ヶ月を経過すると漸減するが，その間，脾臓ではリンパ濾胞様構造が出現し，抗原接種により抗原特異的IgMクラス抗体の誘導が認められる．しかし，現時点では抗原特異的IgGクラス抗体はほとんど誘導されない．これは生体内でのT細胞とB細胞の相互作用が不十分であるため有効なクラススイッチに至らないことを示唆している．宿主マウス内で構築されたヒト免疫系においても，通常の生体内と同様にヒトT-B細胞相互作用が支障なく生じ，獲得免疫応答をうまく作動させる工夫が求められている．

このようにまだ解決・改良すべき点はあるが，特定のヒト血液細胞の増幅生産やヒト用ワクチン・免疫療法の開発など，NOGマウスのヒト造血モデルの応用発展が期待される．

(2)　ヒト感染症モデル

NOGマウスを宿主としたヒト造血モデルでは増殖分化するT/B細胞が得られるので，それらに特異的に感染するヒト病原性ウイルスによる病態モデルの作製が可能である．ヒトCD4陽性T細胞に感染して後天性免疫不全症候群を起こすヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus；HIV），成人T細胞性白血病を起こすヒトTリンパ球向性ウイルス1型（human T-lymphotropic virus-1；HTLV-1），主にB細胞に感染してリンパ球腫瘍性増殖疾患を起こすエプスタイン・バーウイルス（Epstein-Barr virus；EBV）は，ヒト感染症モデルとして好例といえる[6〜8]．NOD-*scid* マウスを用いた従来のヒト末梢血単核球移入による系とは異なり，NOGマウスによるヒト造血モデルではHIV感染が長期にわたって成立し，ヒトの病態と同様にCD4陽性細胞の減少やHIV特異抗体の出現が観察できる．EBV感染モデルについては，特徴的なリンパ節腫脹やCD8陽性T細胞の反応性増多がみられ，ヒトの病態に類似する．後述するヒト肝臓モデルを用いれば，C型肝炎ウイルス（hepatitis C virus；HCV）など，ヒト肝臓に特異的に感染する病原体の感染症モデルの作製も可能である．

(3)　ヒトがんモデル

免疫不全の程度が高いNOGマウスはヒトがん細胞に対する可移植性も極めて高い．我々の検討例ではヒト子宮頚がん細胞株HeLa S3の皮下移植において，NOD-*scid* マウスでは1×10^3個で0%，1×10^4個で40% の生着率を示したのに対し，NOGマウスでは1×10^2個で60%，1×10^4個で100% という結果を得ている[9]．また，これまで可能な限り多くの細胞を移入しても生着が困難であったヒト造血器腫瘍もNOGマウスを宿主にすることで初めて移植が可能になった[10]．このような高い可移植性は各種実験の再現性や定量性の向上につながる．我々は低酸素培養したがん細胞をNOGマウスの皮下に移植する系が，ヒトがん細胞の低酸素環境適応の意義を *in vivo* で検証する新たなモデルになり得ることを見出した（投稿準備中）．

一方，ヒトがん転移モデルの宿主としてもNOGマウスは有力である．膵臓がんや大腸がんでよく見られる血行性肝転移は，ヒトがん細胞をマウスの脾臓内に移入して経門脈的に肝臓に移行・生着させ，増殖したものを転移形成巣として扱うことでモデル化できる．NOGマウスへの移入で得られる転移形成巣は再現性・定量性に優れ，ヒト膵臓がん細胞株BxPC-3による検討では，NOD-*scid* マウスでは1×10^5個で肝転移発生率0% であるのに対し，NOGマウスでは100% と高感度であり，移植細胞数を1×10^4個に減じても12.5% の肝転移発生が認められた．他のヒト膵臓がん細胞株MIA PaCa-2やAsPC-1，PANC-1細胞でも同様の傾向が見られ，NOGマウスでは僅か1×10^2個の細胞移植でもそれぞれ71.4%，57.1%，37.5% の転移発生が認められた[11]．このようにNOGマウスを用いた肝転移

能評価系は，従来のNOD-*scid* マウスなどの宿主動物では検討できなかった転移現象の定量的解析に道を拓くものとなった．また，NOGマウスを用いた系では，比較的容易に低転移能のがん細胞株から高転移能の亜株が樹立可能であり，これらは転移性の分子基盤解明に応用されている．

(4) ヒト臓器モデル

NOGマウスではマスト細胞や血小板などのヒト化モデルも作製されている．また，造血系のみならず卵巣や子宮内膜のヒト化モデルが既に報告されている．これらのモデルでは皮下や腎被膜下に移植された細胞・組織片が生着し，部分的ではあるがヒトの組織・器官を構築する．ヒト子宮内膜モデル[12]では，移植により構築した子宮内膜様組織がホルモンの調節投与によって月経周期を示すなどヒトと同様な生理機能が再現できる．最近，我々は“ヒト肝臓保有NOG（humanized liver-NOG）マウス”の開発に成功した[13]．肝臓には極めて高い再生能力があるにもかかわらず，試験管内での安定した長期培養は極めて難しい．マウス生体内でヒト肝細胞を増殖させる試みは2000年頃から始まり，いくつかのヒト肝臓モデルが報告されている[14]．これらの報告では1990年にHeckelらが樹立したurokinase-type plasminogen activator（uPA）トランスジェニックマウス[15]が用いられているが，現在一般には供給されていない．そこで，我々はNOGマウスを基盤とし，マウスアルブミン遺伝子エンハンサー／プロモーターに人工イントロンとuPAのcDNA配列を連結した発現ユニットを作製し，肝臓特異的にuPA遺伝子を発現するuPA-NOGマウスを樹立した．我々のuPA-NOGマウスの肝細胞傷害は比較的緩慢で，従来のuPAマウスで報告されているような新生児出血による高い致死性は全く見られない．市販の凍結ヒト正常肝臓細胞をuPA-NOGマウスの脾臓から経門脈的に移入することでヒト化肝臓の構築をもたらすことができる．ヒト肝細胞の生着性は，肝臓を採取せずに血中に分泌されたヒトアルブミン量をELISAで測定することで評価できる．移植後6週で7割以上のマウスが血中濃度1 mg/ml以上を示し，その大半は移植後20週を越えても3 mg/ml以上の血中濃度を維持した．これらのマウスの肝臓組織切片を対象に抗ヒトサイトケラチン8/18抗体染色による検討を行った結果，血中ヒトアルブミン濃度が1 mg/ml程度のマウスでも肝臓の約1割が，6 mg/ml以上を示したマウスでは約7割の肝実質細胞がヒト由来の細胞であることが確認できた．また，これらマウスの肝臓でヒトの薬物代謝関連酵素群やトランスポーターなどの遺伝子が発現していることも確認している．現在，ヒト肝臓モデルが肝炎ウイルス研究やヒト型薬物代謝研究において実用性を発揮するか否かについて検討中である．

4. おわりに

NOGマウスを用いたヒト化動物モデルは極めて有力なツールとなるが，一方では限界があることも認識しなければならない．ヒト造血幹細胞移植により構築したヒト造血モデルでは，特異的なIgG抗体が産生されず，末梢血中には顆粒球や赤血球が十分に出現しない．また，ヒト肝臓モデルの場合，ヒト細胞による置換率が比較的低くても定性的な研究には有用であるが，ヒト型代謝研究には高い置換率が求められる．これらの問題が克服された時，さらに進化したヒト化動物モデルとして研究の進展を大いに加速させるであろう．今後は複数のヒト化モデルを組み合わせるなど，研究者のアイデアによる更なる用途の拡大が期待される．

1）Kirchgessner, C.U., Patil, C.K., Evans, J.W., Cuomo, C.A., Fried, L.M., Carter, T., Oettinger, M.A., & Brown, J.M.（1995）*Science*, **267**, 1178–1183.
2）Koyanagi, Y., Tanaka, Y., Kira, J., Ito, M., Hioki, K., Misawa, N., Kawano, Y., Yamasaki, K., Tanaka, R., Suzuki, Y., Ueyama, Y., Terada, E., Tanaka, T., Miyasaka, M., Kobayashi, T., Kumazawa, Y., & Yamamoto, N.（1997）*J. Virol.*, **71**, 2417–2424.
3）Ohbo, K., Suda, T., Hashiyama, M., Mantani, A., Ikebe, M., Miyakawa, K., Moriyama, M., Nakamura, M., Katsuki, M., Takahashi, K., Yamamura, K., & Sugamura, K.（1996）*Blood*, **87**, 956–967.
4）Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T., & Nakahata, T.（2002）*Blood*, **100**, 3175–3182.
5）Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, L.D., & Harada, M.（2005）*Blood*, **106**, 1565–1573.
6）Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., & Fujiwara, S.（2008）*J. Infect. Dis.*, **198**, 673–682.
7）Watanabe, S., Ohta, S., Yajima, M., Terashima, K., Ito, M., Mugishima, H., Fujiwara, S., Shimizu, K., Honda, M., Shimizu, N., & Yamamoto, N.（2007）*J. Virol.*, **81**, 13259–13264.
8）Dewan, M.Z., Uchihara, J.N., Terashima, K., Honda, M., Sata, T., Ito, M., Fujii, N., Uozumi, K., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Kubuki, Y., Okayama, A., Toi, M., Mori, N., & Yamamoto, N.（2006）*Blood*, **107**, 716–724.
9）Machida, K., Suemizu, H., Kawai, K., Ishikawa, T., Sawada, R., Ohnishi, Y., & Tsuchiya, T.（2009）*J. Toxicol. Sci.*, **34**, 123–127.
10）Hayashi, M., Kondoh, K., Nakata, Y., Kinoshita, A., Mori, T.,

Takahashi, T., Sakamoto, M., & Yamada, T.（2007）*Br. J. Haematol*., **137**, 221–232.
11）Suemizu, H., Monnai, M., Ohnishi, Y., Ito, M., Tamaoki, N., & Nakamura, M.（2007）*Int. J. Oncol*., **31**, 741–751.
12）Matsuura-Sawada, R., Murakami, T., Ozawa, Y., Nabeshima, H., Akahira, J., Sato, Y., Koyanagi, Y., Ito, M., Terada, Y., & Okamura, K.（2005）*Hum. Reprod*., **20**, 1477–1484.
13）Suemizu, H., Hasegawa, M., Kawai, K., Taniguchi, K., Monnai, M., Wakui, M., Suematsu, M., Ito, M., Peltz, G., & Nakamura, M.（2008）*Biochem. Biophys. Res. Commun*., **377**, 248–252.
14）Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L., & Kneteman, N.M.（2001）*Nat. Med*., **7**, 927–933.
15）Heckel, J.L., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L.（1990）*Cell*, **62**, 447–456.

涌井 昌俊[1]，末水 洋志[2]
（[1] 慶應義塾大学医学部臨床検査医学教室）
（[2] 財団法人 実験動物中央研究所
バイオメディカル研究部 分子解析研究室）

Development of humanized models using NOG mice
Masatoshi Wakui[1] and Hiroshi Suemizu[2]（[1]Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160–8582, Japan; [2]Biomedical Research Department, Central Institute for Experimental Animals, 1430 Nogawa, Miyamae, Kawasaki 216–0001, Japan）

人工核酸を用いたポリメラーゼ反応と人工核酸アプタマーの創製

1. は じ め に

DNAやRNAなどの核酸は，その配列によって抗体のように特定の物質を特異的に認識し結合する機能をもつもの（核酸アプタマー）がある．抗体は腫瘍マーカー検査やインフルエンザ検査，妊娠検査などの診断薬として既に実用化されており，最近ではがんや免疫疾患などの治療薬としての応用に大きな注目が集まっている．一方，核酸アプタマーには，生物を用いることなく作製できる点や，化学合成によって安価に製造できる点，乾燥状態で常温保存できる点など，抗体にはない特長があるため，抗体に次ぐ新しい医薬・診断薬の候補として研究開発が進められている．核酸アプタマーはSELEX（systematic evolution of ligand by exponential enrichment）法[1,2]や一段階セレクション法[3]などのランダムスクリーニング法によって，任意の標的分子に対応する分子を創製することが可能である．しかし，核酸はヌクレアーゼ（核酸分解酵素）によって生体内で容易に分解されてしまうので，実用化するためにはヌクレアーゼ耐性の向上が重要な課題となっている．

人工核酸は，目的に応じて化学的に修飾を施した核酸分子である．この人工核酸を天然型の核酸と同様に，前述のランダムスクリーニング法に適用させることができれば，導入した修飾基の効果によって，標的分子に対する親和性やヌクレアーゼ耐性を向上させた人工核酸アプタマーの創製が期待できる．なお，本稿ではDNA，RNA，人工核酸で構成されるものを，それぞれDNAアプタマー，RNAアプタマー（単にアプタマーということが多い），人工核酸アプタマーとよぶ．また，DNAアプタマーとRNAアプタマーを併せて核酸アプタマーとよぶこととする．DNAアプタマーとRNAアプタマーとで本質的な差異はないが，RNAには糖の2′位に水酸基があり，リン酸ジエステル結合が加水分解を受けやすいので，後者の方が化学的に不安定である．

2. SELEX法による核酸アプタマーの創製

SELEX法では，配列の異なる一本鎖オリゴDNAの混合物を初期ライブラリとして目的の活性をもつ核酸のスクリーニングを行う．初期ライブラリはDNA固相合成法により化学的に合成される．初期ライブラリに含まれる合成オリゴDNAの配列はおよそ10^{10}～10^{14}種類であり，合成オリゴDNAの長さは，構築したスクリーニングの系や標的分子の分子量などによって変えることができるが，四十～百数十ヌクレオチド程度のものを用いるのが一般的である．DNAアプタマーの場合はその初期ライブラリを標的分子が固定化されたアフィニティカラムなどに通し，結合活性があるものとないものに選別する（**図1A**）．標的分子に親和性を示したDNAはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で増幅した後に一本鎖を調製し，それを二次ライブラリとする．PCR増幅後の二本鎖を一本鎖にする方法には，ビオチン–アビジンを用いる方法やλエキソヌクレアーゼを用いる方法などがある．二次ライブラリは再びアフィニティカラムなどを用いた選別にかける．この選別と増幅の過程を幾度も繰り返すことにより，標的分子に親和性を示す配列をもつDNAが濃縮される．クローニング法によって，濃縮されたDNAライブラリからDNAアプタマーが単離され，さらに各々のDNAアプタマーについて配列解