

新たなオンコ-Hu™異種移植モデル 開発に向けた、NSG™マウスモデル およびNSG™-SGM3マウスモデル におけるヒト免疫系再構成に関する 総合評価

Aaron Middlebrook,¹ Eileen Snowden,² Warren Porter,² Friedrich Hahn,² Mitchell Ferguson,² Brian Soper,³ James Keck,³ Joan Malcolm,³ Shannon Dillmore,² Smita Ghanekar,¹ Rainer Blaesius².

¹BD Biosciences, San Jose, CA; ²BD Technologies, Raleigh-Durham, NC; ³The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME

要旨

最近、メラノーマの治療に対する免疫療法が成功をおさめ、さらに他のさまざまながんにおいても同様な治療が有望であることが示されたことによって、がんにおける免疫系の重要性が脚光を浴びている。実際に、効果的な治療法をデザインし、そして評価するためには、免疫系と増殖している腫瘍細胞のあいだにおける相互作用を総合的に理解しなければならない。なぜなら、その相互作用によって、腫瘍のミクロ環境がつくられるからである。患者由来の異種移植片である(PDX)腫瘍を移植されたヒト化マウスモデルは、研究者にとって、きわめて洗練された研究材料である。すなわち、そのようなヒト化マウスモデルは、腫瘍が免疫細胞の攻撃を回避することを防ぎ、免疫細胞による細胞傷害性を亢進させるための治療戦略を考案する際における理想的な研究材料なのである。

NOD scidガンマ (NSG™) マウスやトリプル・トランスジェニックNSG™マウス (NSG™ -SGM3マウス) のような重症複合型免疫不全マウスは、ヒト腫瘍を移植するための宿主として有用であることが示されている。NSG™-SGM3マウスは、ヒトサイトカインKITLG、CSF2、およびIL-3を発現しているトリプル・トランスジェニックマウスである。このような免疫不全マウスに、造血幹細胞 (CD34+) を移植すると、その体内でヒト免疫系を確立することができる。内因性のサイトカインを発現しているので、骨髄細胞系列および制御性T細胞を分化させることができる。このことは、NSG™-SGM3マウスが通常のNSG™マウスにくらべて、大きく改善されている可能性を示している。

本論文においては、われわれは、4種類の14色フローサイトメトリー・パネルを用いて、あらゆる免疫系の詳細かつ総合的な解析をおこなった。4種類のフローサイトメトリー・パネルは、免疫系の特異的な分岐の特徴を解析することができるように設計した。免疫系の特異的な分岐とは、1) T細胞、2) NK細胞/樹状細胞/B細胞、および3) 骨髄細胞系列である。NSG™マウスおよびNSG™-SGM3マウスの血液、脾臓、および骨髄組織について、移植後10週目、16週目、21週目、および31週目に、4種類それぞれのパネルを用いて評価した。われわれの実験結果は、NSG™マウスにくらべて、トリプル・トランスジェニックNSG™-SGM3マウスにおいては、より完全なヒト免疫系が確立していることを示している。とくに、T細胞サブセットの分布および骨髄細胞系列の全般的な成熟において、特異的な改善がみられた。

異系統のヒト腫瘍を移植されたNSGTMマウスは、がん免疫療法の前臨床試験のための貴重なプラットフォームとなる。

翻訳:順天堂大学国際教養学部 久原 孝俊(くはら たかとし)

方法

マウス

NSG[™]マウスおよびNSG[™]-SGM3マウスは、ジャクソン研究所(Bar Harbor, ME)において、ヒト臍帯血由来のCD34+hSCを移植することによってヒト化された。その後、BDテクノロジーズ(Raleigh-Durham, NC)に輸送されて、処置をされた。

組織処理

マウスを安楽死させた後、脾臓、骨髄、および末梢血を採取した。脾臓を2枚のスライドガラスの間に挟んで、押しつぶした。2枚のスライドガラスを50mLのチューブに入れ、10-20mLのPBSですすいだ。つぎに、70mmのメッシュを用いて濾過をして、単細胞浮遊液を得た。骨髄は、大腿骨をフラッシングして採取し、先の太いピペットの中を出し入れしてばらばらにした。つぎに、70mmのメッシュを用いて濾過をして、単細胞浮遊液を得た。最終的な全採血において、200-400mLの末梢血を採取した。すべての赤血球を溶かすために、末梢血サンプルならびに脾臓および骨髄から得た単細胞浮遊液を、室温において、4mLのACKバッファー(Gibco A10492-01)で7分間処理した。つぎに、サンプルを45mLのDPBS/2%FBSで1回洗浄した。上清を吸引除去し、沈査をヒトFcRブロックの中でインキュベーションした。つぎに、細胞をPBSに浮遊させ、BD FalconTM96穴プレートに移し、抗体カクテルで染色した。さらに詳細なマウスモデル作製方法については、jax.org/onco-huを参照されたい。

フローサイトメトリー

3種類のサンプル(血液、脾臓、および骨髄)それぞれから得た細胞浮遊液を、「結果」の項に記載したように、4種類の14色パネルそれぞれを用いて30分間染色した。それぞれのパネルの蛍光色素は、BDホリゾン・ガイデッド・パネル・ソリューション (BD Horizon™ Guided Panel Solution) を利用して選択した。さらに詳細なツール情報については、bdbiosciences.com/us/tools/s/gpsを参照されたい。抗体カクテルは、50mLのBDホリゾン・ブリリアント・ステイン・バッファー(BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer: BD Biosciences Cat No.659611)で希釈した。細胞を染色した後、PBSで2回洗浄し、遠心分離(300g、7分間)して細胞を回収した。BDフォルテッサ・X-20スペシャル・オーダー(BD Fortessa™ X-20 Special Order: BD Biosciences Cat No. 658226R1)を使って、BD FACSDiva™ソフトウェアを利用してサンプルのデータ解析をおこなった。

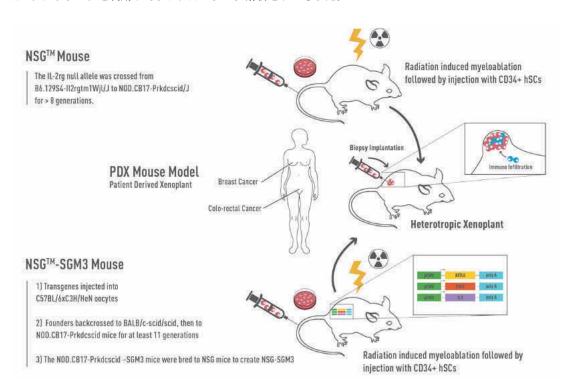


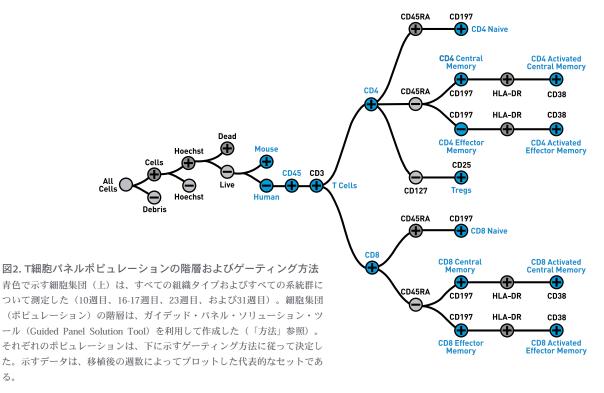
図1. NSG™マウスとNSG™-SGM3マウスの比較

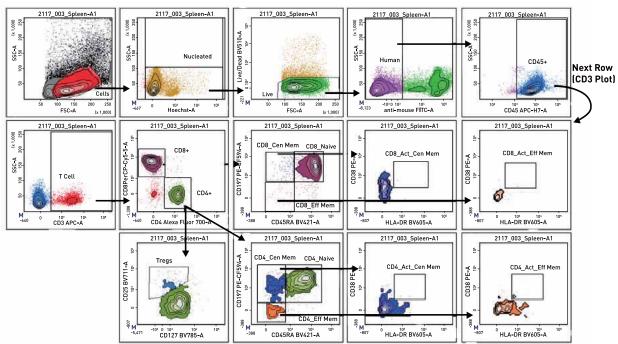
NSG™マウス (NOD.Cg-*Prkde^{scid} II2rg^{mnWij}* SzJ, 005557) は、成熟したB細胞、T細胞、およびNK細胞をもっていない。NSG™-SGM3 (NOD.Cg-*Prkde^{scid} II2rg^{mnWij}* Tg(CMV-IL3, CSF2, KITLG)1Eav/MloySzJ, 013062) マウスは、次の導入遺伝子をもつトリプル・トランスジェニックNSG™マウスである。すなわち、ヒト幹細胞因子 (KITLG) 、GM-CSF (CSF2) 、およびIL-3遺伝子である。レシピエントマウスは、3-4週齢において放射線を照射した後、ヒト臍帯血由来のCD34+造血幹細胞を移植された。ヒト腫瘍を移植する前に、レシピエントマウスが多系列の造血細胞を有し、ヒト免疫系が確立していることを確認した。

結果

T細胞パネル

サンプル組織(骨髄、脾臓、および末梢血)を14色パネルで染色した(試薬リストは次ページの図に示す)。色パネルは、T細胞サブセットを計数することができるように設計した。下に示す代表的なフロー・プロット(移植後の週数)は、解析のために利用したゲーティング方法を示している。算出した細胞集団は、ボックスプロットとしてプロットした(次ページ、下)。それぞれのプロットを通る緑色のバンドは、同じ色パネルを用いて測定した、正常な健常成人ドナー(n=6)末梢血中のそれぞれのサブポピュレーションの範囲を示している。すべての算出したポピュレーションのプロットが示されているわけではない。基準値(緑色のバンド)と比較して、ほとんど違いがないプロット、または基準値ときわめてよく一致しているプロットは示していない。中間の16-17週目、および23週目のデータは示していない。

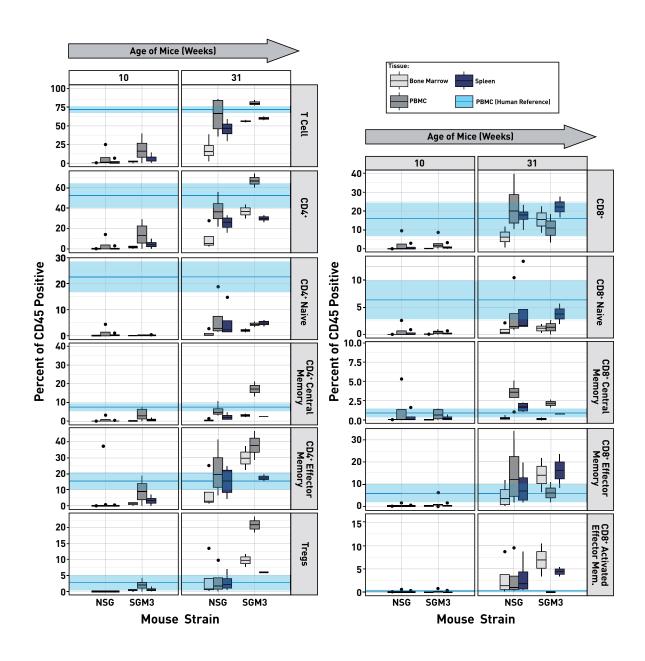




Reagents used in T cell panel.

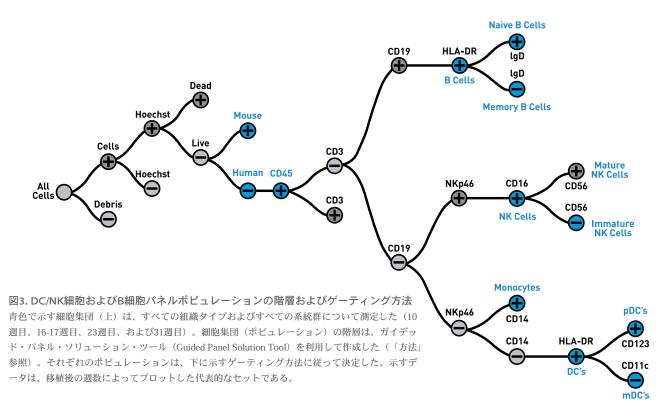
LASER	FLUOR	T CELL	BD CATALOG #	
488	FITC PerCp-Cy™5.5	*Mouse Dump CD8	(at right) 560662	
561	PE PE-CF594 PE-Cy™7	CD38 CD197 CD28	555460 562381 560684	
652	APC APC-H7 AF 700	CD3 CD45 CD4	555342 560274 557922	
405	BV 421 BV 510 BV 605 BV 711 BV 786	CD45RA FVS Live/Dead HLA-DR CD25 CD127	562885 564406 562845 563159 563324	
355	BUV 395	Hoechst 33342	561908	

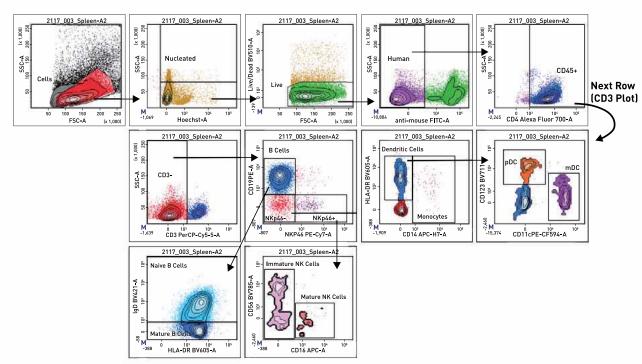
*MOUSE DUMP			
ANTIBODY	BD CATALOG #		
mCD45	553079		
mH2Kd	553592		
mTer119	561032		
mCD31	558738		
mCD41	561849		
mCD71	553266		



DC/NK細胞およびB細胞パネル

サンプル組織(骨髄、脾臓、および末梢血)を14色パネルで染色した(試薬リストは次ページの図に示す)。色パネルは、DC細胞、NK細胞、およびB細胞サブセットを計数することができるように設計した。下に示す代表的なフロー・プロット(移植後の週数)は、解析のために利用したゲーティング方法を示している。算出した細胞集団は、ボックスプロットとしてプロットした(次ページ、下)。それぞれのプロットを通る緑色のバンドは、同じ色パネルを用いて測定した、正常な健常成人ドナー(n=6)末梢血中のそれぞれのサブポピュレーションの範囲を示している。すべての算出したポピュレーションのプロットが示されているわけではない。基準値(緑色のバンド)と比較して、ほとんど違いがないプロット、または基準値ときわめてよく一致しているプロットは示していない。中間の16-17週目、および23週目のデータは示していない。

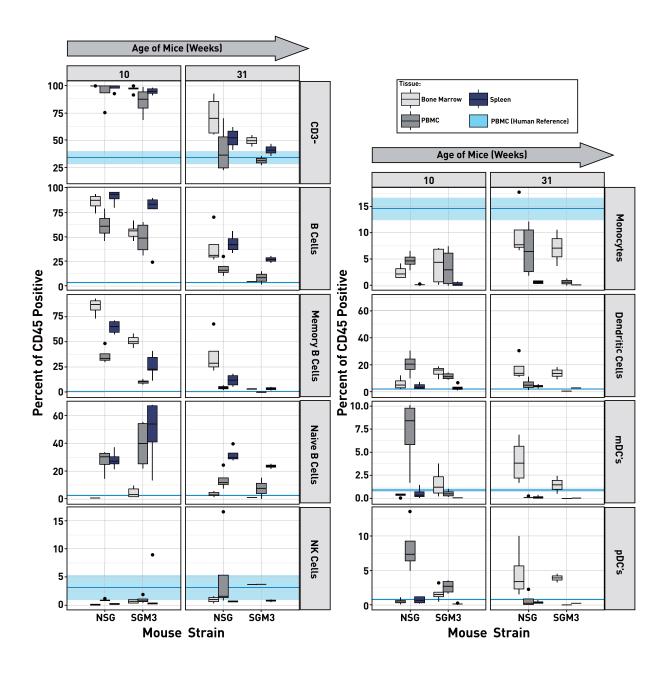




Reagents used in DC/NK and B cell panel.

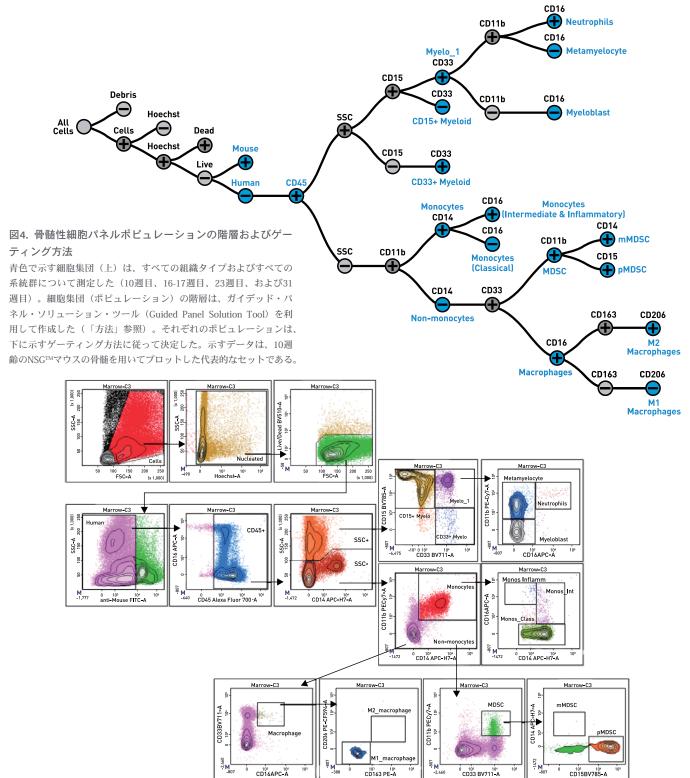
LASER	FLUOR	NK/B/DC PANEL	BD CATALOG #
488	FITC	*Mouse Dump	(at right)
	PerCp-Cy™5.5	CD3	560835
561	PE	CD19	555413
	PE-CF594	CD11c	562393
	PE-Cy™7	NKp46	562101
652	APC	CD16	561304
	APC-H7	CD14	560180
	AF 700	CD45	560566
405	BV 421	IgD	562518
	BV 510	FVS Live/Dead	564406
	BV 605	HLA-DR	562845
	BV 711	CD123	563161
	BV 786	CD56	564058
355	BUV 395	Hoechst 33342	561908

*MOUSE DUMP			
ANTIBODY	BD CATALOG #		
mCD45	553079		
mH2Kd	553592		
mTer119	561032		
mCD31	558738		
mCD41	561849		
mCD71	553266		



骨髄性細胞パネル

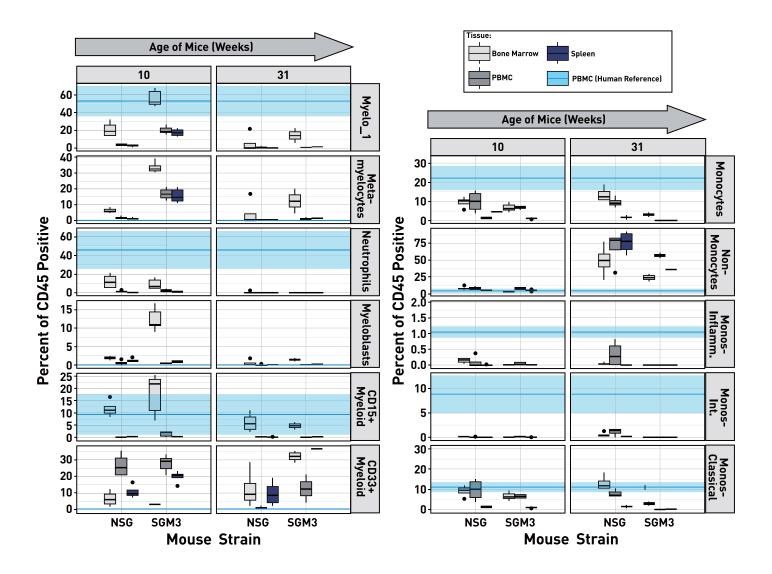
サンプル組織(骨髄、脾臓、および末梢血)を14色パネルで染色した(試薬リストは次ページの図に示す)。色パネルは、骨髄性細胞サブセットを計数することができるように設計した。下に示す代表的なフロー・プロット(骨髄、10週齢のNSG™マウス)は、解析のために利用したゲーティング方法を示している。算出した細胞集団は、ボックスプロットとしてプロットした(次ページ、下)。それぞれのプロットを通る緑色のバンドは、同じ色パネルを用いて測定した、正常な健常成人ドナー(n=6)末梢血中のそれぞれのサブポピュレーションの範囲を示している。すべての算出したポピュレーションのプロットが示されているわけではない。基準値(緑色のバンド)と比較して、ほとんど違いがないプロット、または基準値ときわめてよく一致しているプロットは示していない。中間の16-17週目、および23週目のデータは示していない。



Reagents used in Myloid cell panel.

LASER	FLUOR	MYELOID PANEL	BD CATALOG #
488	FITC PerCp-Cy™5.5	*Mouse Dump CD195	(at right) 560635
561	PE PE-CF594 PE-Cy™7	CD163 CD206 CD11b	560933 564063 557743
652	APC APC-H7 AF 700	CD16 CD14 CD45	561304 560180 560566
405	BV 421 BV 510 BV 605 BV 711 BV 786	CD192 FVS Live/Dead HLA-DR CD33 CD15	564067 564406 562845 563171 563383
355	BUV 395	Hoechst 33342	561908

*MOUSE DUMP			
ANTIBODY	BD CATALOG #		
mCD45	553079		
mH2Kd	553592		
mTer119	561032		
mCD31	558738		
mCD41	561849		
mCD71	553266		



結論

NSGTMマウスにおいて、3種類のヒト成長因子(SCF、GM-CSF、およびIL-3)を発現させると、適切な異種移植モデルの開発が著しく改善することが示された。BDの柔軟性のある洗練されたフローサイトメトリー・ツールによって、これらのマウスにおける免疫系を深く総合的に解析することができるようになった。NSGTM-SGM3マウスは、NSGTMマウスにくらべて、ヒト免疫系の再構成がより改善していた。すなわち、大部分の主要な免疫細胞サブセットーT細胞、B細胞、NK細胞、およびDC細胞ーの数が改善していたのである。骨髄性細胞集団数の著しい低値(とくに、単球数および好中球数の低値が最も顕著である)が、NSGTMマウスおよびNSGTM-SGM3マウスの両系統においてみられた。NSGTM-SGM3マウスにおいては、制御性T細胞(Treg)が増加していた(NSGTMマウスにおいては、Tregはほとんど見られなかった)。また、NSGTM-SGM3マウスにおいては、記憶T細胞プールが増大しており、それにともなって、未熟なT細胞(CD4+およびCD8+)の数が減少していた。重要なことは、JAX® In Vivoファーマコロジー・サービス(JAX® In Vivo Pharmacology Services)のデータによると、NSGTM-SGM3マウスにおいては、NSGTMマウスにくらべて、骨髄性細胞およびリンパ系細胞ともに有意に数(個数/ μ L)が多かったということである。NSGTMマウスにくらべて、NSGTM- SGM3マウスにおいては、ヒト免疫系の再構成が全般的に改善していたという研究結果は、PDX腫瘍の宿主としてNSGTM- SGM3マウスが有用であること、そして研究者が腫瘍のミクロ環境内における免疫細胞と腫瘍細胞のあいだの複雑な相互作用の研究をさらに進展させることができることを示している。このことは、がんの治療において、がん免疫療法を設計し、さらにそれを発展させることにつながるのであろう。

Class 1 Laser Product.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

 Cy^{TM} is a trademark of GE Healthcare.

Alexa Fluor® is a registered trademark of Life Technologies Corporation.

NSG™ and NSG™-SGM3 are trademarks of the Jackson Laboratory.

Trademarks are the property of their respective owners.

BD Life Sciences, San Jose, CA, 95131, USA

bdbiosciences.com

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton,

Dickinson and Company

JAX® Mice, Clinical & Research Services

The Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine | Farmington, Conn. | Sacramento, Calif.

jax.org/onco-hu 1-800-422-6423 (US, Canada & Puerto Rico) 1-207-288-5845 (from any location)



