

末梢血単核細胞でヒト化された新たな MHC クラス I および II 欠損モデルを利用することによって、異種細胞による GVHD を遅延させ、より長期にわたる T 細胞免疫調節療法の前臨床試験が可能になる

著者：Pali Kaur

翻訳：順天堂大学国際教養学部 久原 孝俊

緒言

ヒト免疫細胞を移植した免疫不全マウスは、さまざまな疾患において、免疫媒介性の治療応答を刺激する新たな治療法をわれわれが開発するための道を切り開くものである。しかし、ヒトの免疫系はきわめて複雑である。たくさんの細胞ポピュレーションが相互作用し、絶えずわれわれの皮膚、呼吸器系、消化器系、ならびに内臓諸器官における外来性病原体や腫瘍を監視している。免疫機能が正常なマウスにおける免疫系は、このような複雑な相互作用を解明するのに重要である。しかし、われわれはマウスとヒトの免疫系のあいだに明白な機能の違いがあることも知っている。したがって、創薬をさらに発展させ、臨床に橋渡しするためには、免疫系がヒト化されたマウスを開発、利用することが必要になる。

ヒト化マウスを用いて免疫の研究を実施する

ヒトの免疫系には、いくつかのタイプのユニークな細胞や分子が存在する。したがって、動物モデルは、長いあいだにわたって、新たな治療に対する患者の反応について、部分的な臨床的洞察や予測しか提供することができなかった。しかし、ゲノム編集やゲノム解析の発展にともなって、科学者たちは、現在ではヒトの免疫系を有する重度免疫不全「ヒト化」マウスを作出することができるようになった。たとえば、NOD scid γ (NSG™) 系統やその他の誘導系統である。宿主マウスにヒト造血幹細胞や成人の末梢血単核細胞を移植することによって、多系統の細胞を生着させ、きわめて広範囲にわたる「システム」を得ることができるものの、そのシステムは疑いなく不完全なものである。末梢血単核細胞を移植したモデルマウスにおいては、移植されたおもなヒト細胞は T 細胞であり、それらの T 細胞は時間の経過とともに増殖する。他方、少数の NK 細胞、B 細胞、ならびに骨髄性細胞は、時間とともに末梢血中において減少する。これらのモデルマウスの利点は、放射線照射をしてもしなくても細胞を移植することができること、腫瘍細胞や他の細

胞も移植することができること、そしてこれらのモデルマウスは、わずか6日間で確立することができることである¹。すなわち、6日後には、これらのヒト化マウスは、万能の実験プラットフォームとして利用することができるのである。これらのヒト化マウスを用いて、ヒトのT細胞がどのように刺激（たとえば、感染症、細胞移植、器官移植、腫瘍発生、治療薬など）に反応するか調べることができる。

しかし、末梢血単核細胞を注射した直後に、ヒトT細胞は、マウスの健常な細胞や組織を異物として認識し、攻撃する。その結果、移植片対宿主病（GVHD）に似た急性の異種移植病をひき起こす。GVHDは、ヒトにおいて、HLAが一致しない骨髄細胞を移植したり、白血球を注射したりしたときに起こる。このマウスモデルは、GVHDの発症機序や下流の影響を研究したり、GVHDを抑える治療法を研究したりするためには理想的なモデルであるが、この強い免疫学的悪影響が急速に起こるので、このマウスモデルにおいて、その他の現象について研究することはむずかしい。GVHDは致命的な疾患であるので、このマウスモデルを実験に使うことができる期間（時間枠）は短いのみならず、生存中であっても、異種（ヒト）の細胞とマウスの細胞が相互作用をするので、正常なT細胞の機能を観察するのは困難である。

MHC I/II ノックアウト NSG マウスを使って研究領域を広げる

これらの限界に取り組むために、ジャクソン研究所（JAX）の研究者たちは、マウスの主要組織適合遺伝子複合体（MHC）のふたつのクラス（IおよびII）をノックアウトすることを試みた。研究者たちは、このような抗原提示分子がなければ、ヒトT細胞がマウスの細胞を認識することが妨げられるだろうという仮説を立てた。その結果、異種細胞によるGVHDの発現を遅らせたり、あるいは抑えたりすることができるであろう。研究者たちは、いくつかの系統の作出に成功し、その結果、それぞれのクラスのMHC分子の影響を区別することができるようになった。すなわち、クラスIノックアウトマウス、クラスIIノックアウトマウス、ならびにクラスI/IIノックアウトマウスを作出した。これら3つの系統のいずれにもヒト末梢血単核細胞が生着したものの、最も生存期間が長かったのは、MHC I/IIノックアウトNSGマウスであった。このことは、MHC I/IIノックアウトNSGマウスにおいて、GVHDの発現が最も有意に遅かったことを示している。これら3系統のヒト化マウスモデルは、きわめて広範囲にわたる免疫学的研究、とくに、ヒトT細胞応答の研究をサポートする。これらのマウスモデルを適切に利用することによって、研究者たちは、ヒトの免疫系を新たなレベルにおいて理解することができるようになる。その結果、安全で有効な治療薬を必要な患者により迅速に提供することができる。

MHC I/II ノックアウト NSG マウスモデルの検証

ヒト化MHC I/IIノックアウトNSGマウスモデルを最大限有効に研究に使うためには、このマウスモデルがどのように作出されたかを理解することが重要である。また、異なる研究課題に対処するために、このマウスモデルをどのように改変することができるかについて理解することも重要である。

JAXの研究者たちは、GVHDの発症におけるCD4 T細胞とCD8 T細胞のそれぞれの役割について、より深く理解することに興味をもっている。CD4 T細胞の役割を調べるために、NSGマウスにおいて、H2-Ab1 (IA)を欠損させることによって、MHC IIノックアウトマウスを1系統作出した。このようにして、NSG-(IAヌル)が得られた。CD8 T細胞の役割を調べるために、NSGマウスにおいて、H2-K1 (K^b)およびH2-D1 (D^b)を欠損させることによって、MHC Iノックアウトマウスを1系統作出した。このようにして、NSG-(K^b D^bヌル)が得られた。MHC I/IIノックアウトNSGマウスは、これら3つの遺伝子座のすべてを欠損している。この系統は、NSG-(K^b D^bヌル IAヌル)ともよばれる²。これら3系統のマウスがそれぞれ該当するMHCクラスIおよびクラスIIの発現を欠損していることを確認した後、研究者たちは、それぞれの系統のコホートに 1×10^7 個のヒト末梢血単核細胞を注射した。その後、ヒト細胞の生着の可否、体重減少、ならびに生存率を調べた。

標準の NSG マウスならびに MHC クラス II のみをノックアウトした NSG-(IA ヌル) マウスにおいては、急速に GVHD が発症し、末梢血単核細胞注射後の生存率も低かった。このことは、すでに先行研究において観察されていた。他方、MHC クラス I のみをノックアウトした NSG-(K^b D^b ヌル) マウスにおいては、生存率が有意に増加していた。これらの初期の実験結果は、CD8 細胞傷害性 T 細胞にくらべて、CD4 ヘルパー T 細胞は大きなはたらきをしていないことを示唆している。しかし、MHC I/II ノックアウトマウスコホートである NSG-(K^b D^b ヌル IA ヌル) マウスにおいては、NSG-(K^b D^b ヌル) マウスよりもさらに顕著に寿命が延伸していた。このことは、GVHD の発症において、CD4 ヘルパー T 細胞も重要な役割を果していることを明確に示している。したがって、マウスの寿命を最適に延伸するためには、MHC クラス I および II 両方を欠損させることが必要であることが示された (図 1)。

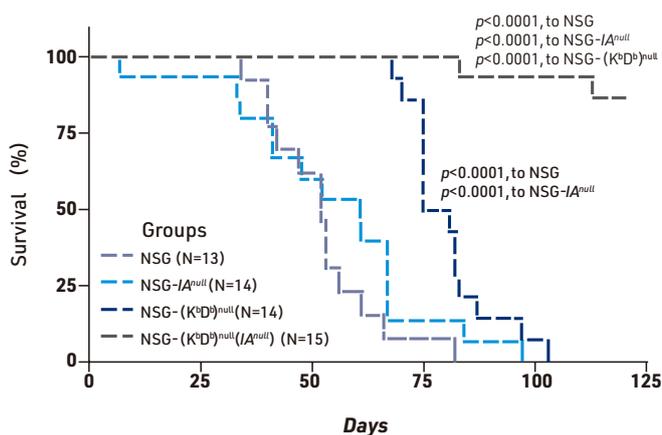


図 1
この図は、異なる系統における 125 日までの平均生存日数を示す。マウスには、放射線照射をせずに、 1×10^7 個のヒト末梢血単核細胞を注射した。この実験においては、NSG-(K^b D^b ヌル IA ヌル) マウスを NSG マウス、NSG-(K^b D^b ヌル) マウス、ならびに NSG-(IA ヌル) マウスと比較した。すべての実験において、ヒト末梢血単核細胞注射後、MHC I/II ノックアウト NSG マウスが、他の系統にくらべて、最も高い生存率を示した。

これらのマウスモデルにおいて、移植した T 細胞の表現型解析についてもさらに検証した。NSG マウスにおいては、ヒト CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の両方が活性化されており、急速に増殖していた。CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の比率は約 4:1 であった。予測されたように、MHC クラス II のみを欠損するマウスにおいては、CD4 T 細胞の増殖が顕著に減少しており、他方、MHC クラス I のみを欠損するマウスにおいては、CD8 T 細胞の増殖が減少していた。ヒト末梢血単核細胞を注射した NSG-(K^b D^b ヌル IA ヌル) マウスにおいては、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の比率は、NSG マウスと有意な差はみられなかった。このことは、長期間にわたる治療効果の研究において、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の両方の存在と相互作用を必要とする研究者たちにとっては、MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスが必要であることを示している。すなわち、T 細胞の機能をさらに正確に評価することができるのである (図 2)。

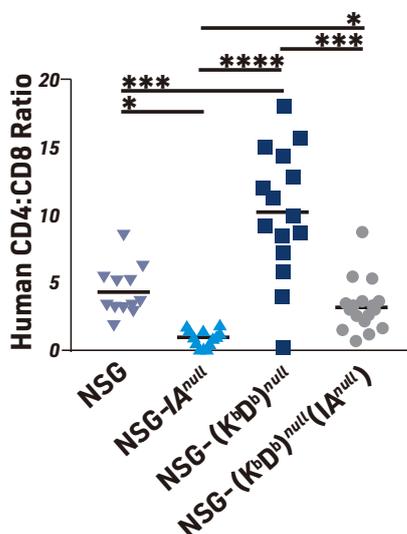


図 2
放射線照射をしていないレシピエントマウスにヒト末梢血単核細胞を移植した後 4 週間におけるヒト T 細胞の表現型解析。MHC クラス II のみを欠損する NSG-(IA ヌル) マウスにおいては、CD4 T 細胞の割合は低く、CD8 T 細胞の割合は高かった。MHC クラス I のみを欠損する NSG-(K^b D^b ヌル) マウスにおいては、その割合は逆であった。NSG-(K^b D^b ヌル IA ヌル) マウスは、MHC クラス I/II 両方を欠損するが、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の割合は、NSG と同様であった。

これらのマウスにおいて、CD4 T細胞と CD8 T細胞の割合を解析するのみならず、JAXの研究者たちは、細胞の活性化状態に関する表現型についても調べた²。これら4系統の宿主系統のすべてにおいて、T細胞サブセットの分布は同様であることが示された。これらのすべての系統において、ナイーブT細胞およびセントラル・メモリーT細胞の比率はきわめて低く、大部分のT細胞は、エフェクター/エフェクター・メモリーT細胞の表現型をもっていた。しかし、NSG-(K^bD^bヌルIAヌル)マウスにおいては、CD8エフェクター/エフェクター・メモリーT細胞の比率は、他の3系統の宿主マウスにくらべて、有意に低かった。すべてのヒトT細胞ポピュレーションは、免疫チェックポイント・インヒビターPD-1.2陽性であった。これらの実験結果は、マウスMHCの非存在下においてさえ、ヒトの細胞は活性化され、エフェクター細胞ポピュレーションへと正常に分化することを示している。

研究者たちは、あらかじめ性質のわかっているヒト末梢血単核細胞によってヒト化されたMHCクラスI/IIノックアウトNSGマウスを入手して、自信をもってすぐに実験を開始することができる。なぜなら、このマウスは、急速なGVHDをひき起こす可能性がほとんどないからである。

あらかじめ性質のわかっているヒト末梢血単核細胞によってヒト化されたMHCクラスI/IIノックアウトNSGマウスを使う利点

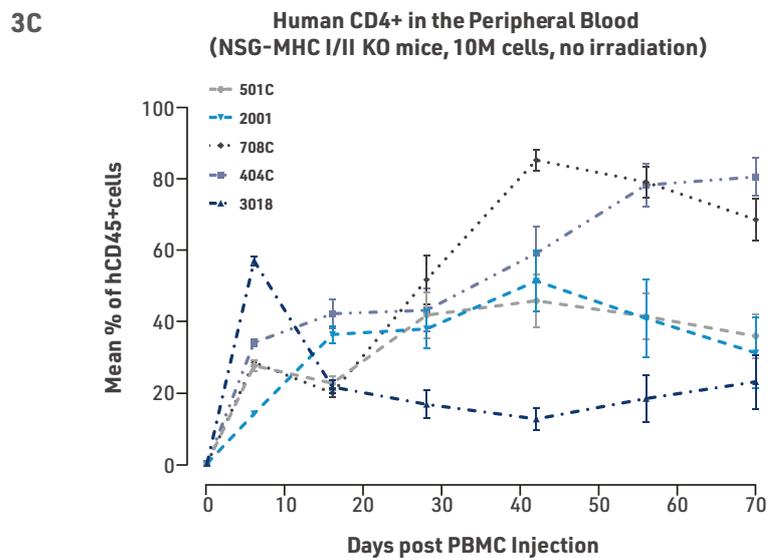
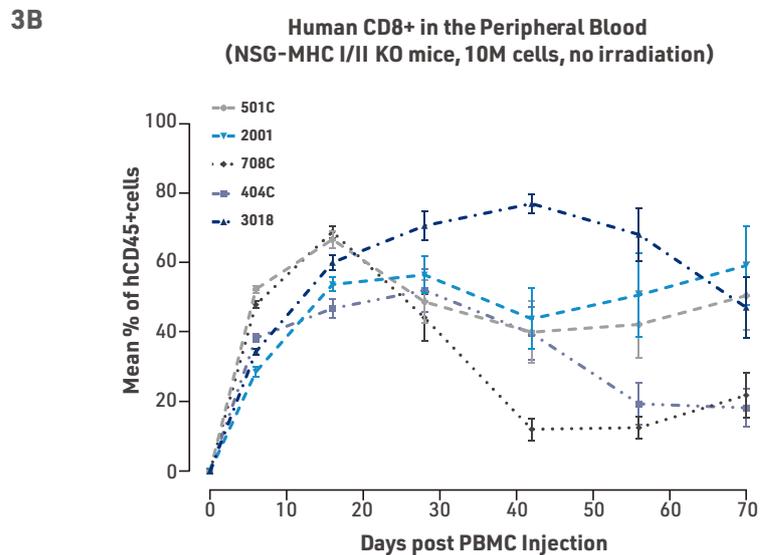
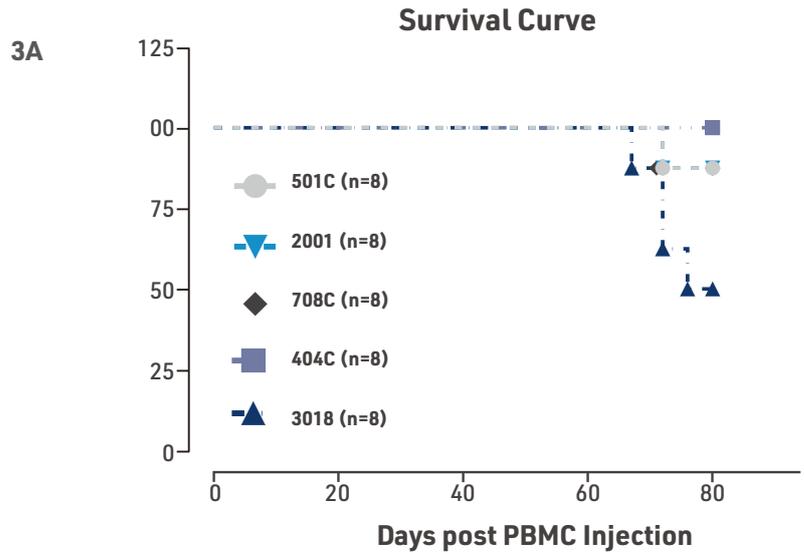
さまざまな個別のヒトドナーから得られた末梢血単核細胞を用いてNSGマウスをヒト化することによって、研究上の多くの利益が得られる。たとえば、マウスコホートを用いた研究において、ポピュレーションの不均一性にもとづくモデルを開発したり、研究したい特定のヒト遺伝子型のモデルを開発したりすることができる。しかし、事前にわかっていない場合は、まさにその不均一性によって、ヒト化マウスコホートを用いておこなう実験に問題をひき起こすことがある。MHCクラスI/IIノックアウトNSGマウスの大部分は、75日間は生存し、末梢血単核細胞を注射した後も急速なGVHDを発症することはないが、ある特定のドナーから得られた末梢血単核細胞は、強い異種反応をひき起こし、場合によっては、そのようなマウスは生存することができないことがある。ドナーの遺伝的背景、それまでの免疫学的経験、細胞数、あるいはマウスが放射線照射を受けたか否かということなどすべてがレシピエントにおける細胞の生着動態、平均生存日数、ならびにGVHDの発症に重要な影響を及ぼす(図3)

MHCクラスI/IIノックアウトNSGマウスを入手して実験をおこなう研究者たちが素性のわからない末梢血単核細胞を用いてマウスをヒト化しようとするのは、もし急速なGVHDが起これば、時間を損失し、マウスを損失し、さらにその他の貴重な資源を失うという危険を冒すことになる。

ヒト化マウスを用いた実験を開始する前に、研究者自身がヒト末梢血単核細胞に関する必要な特徴を調べることは可能であるが、そのためには、貴重な時間や資源が必要になることがある。その結果、実験の開始日が何か月も遅れる可能性が生じる。JAXの専門家たちは、あらかじめ性質のわかっている個別のドナーから得られた堅固な末梢血単核細胞のバンクをつくっている。したがって、研究者たちは、あらかじめ性質のわかっているヒト末梢血単核細胞によってヒト化されたMHCクラスI/IIノックアウトNSGマウスを入手して、自信をもってすぐに実験を開始することができる。なぜなら、このマウスは、急速なGVHDをひき起こす可能性がほとんどないからである。

図3

5人のヒト末梢血単核細胞ドナーの特徴。放射線照射をしていないMHCクラスI/IIノックアウトNSGマウスに 1×10^7 個のヒト末梢血単核細胞を注射した。(A)生存率(%)。(B)それぞれのドナーに関する末梢血中のヒトCD8 T細胞の経時的動態。(C)それぞれのドナーに関する末梢血中のヒトCD4 T細胞の経時的動態。それぞれのドナーは、レシピエントマウスの生存に関してユニークな影響を及ぼす。また、CD4 T細胞とCD8 T細胞の増殖動態もそれぞれのドナーに特徴的であり、それぞれの増殖動態にはきわめて高い再現性がみられた。



研究ならびに薬剤試験のための貴重な応用

GVHD を起こさないこのマウスモデルは、自己免疫疾患の研究、免疫療法、腫瘍免疫学その他の分野において、可能性のある世界を解放する。

ヒトの免疫反応を解明する

ヒトの免疫系に関する大局的な洞察をもたらすような実験を計画し実施することは、長年にわたる課題であった。ヒトを利用した研究は、患者の安全性の観点から、きわめて限られている。ヒト以外の霊長類を含む非ヒト化動物モデルは、ヒト免疫細胞のもついくつかの特性を欠いている。その欠陥は、ある種の治療薬やその他の刺激に対する反応に大きな影響を及ぼすことがある。ヒト末梢血単核細胞を用いた *in vitro* の研究によって、薬物毒性や腫瘍細胞に対する効果はある程度は洞察することができるものの、閉鎖された試験管内のシステムにおいては、多くの重要な免疫反応を特徴づけている全身的なカスケード効果をモデル化することは不可能である。ヒト化された MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスは、サイトカイン放出症候群のような現象におけるダウンストリーム器官への影響をモデル化することができる。サイトカイン放出症候群は、ウイルス感染や腫瘍増殖のような刺激によって引き起こされ、致命的になる可能性がある。

さらに、ヒト化された MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスに異なる種類の腫瘍を移植することによって、科学者たちは、腫瘍免疫学の研究をおこなうことができる。そのような研究においては、異なる全身状態において、ヒトの免疫細胞がどのようにしてがん細胞を認識して攻撃するかについて調べることができる。たとえば、MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウス体内のヒト免疫細胞は、免疫調節剤に反応することができるので、このマウスを使うことによって、新規の免疫調節剤がどのようにして T 細胞の動態を変化させ、腫瘍の体積を減少させることができるのかということに関する前臨床データが得られる。

抗体療法を評価する

創薬におけるリスクを最小限に抑えるためには、科学者たちは、前臨床試験のためのツールを必要とする。そのようなツールによって、新規の治療薬の安全性および有効性を調べるための正確かつ包括的なモデルの作製が可能になる。そのようなツールがないと、前臨床試験に参画している患者は、不必要な危険にさらされることになる。異種 GVHD 遅発性のヒト化マウスモデルを利用することによって、ヒト免疫細胞と周囲の組織のあいだにおけるユニークな相互作用を調べるための前臨床試験が可能になる。あらかじめ性質のわかっている複数のヒトから得られた末梢血単核細胞によってヒト化された MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスを用いることによって、薬剤開発者は、臨床的な事象をより強力に予測することができる多様なデータセットを得られるような研究を計画することができる。

JAX の研究者たちは、腫瘍を移植したヒト化 MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスを用いた治療研究において、既存の治療薬が予測どおりに作用することを確認した。この研究結果は、このマウスモデルを、まだ上市されていない治療薬やまだ臨床試験に使われていない治療薬の安全性試験や有効性試験のために利用できることを支持している。薬剤開発者は、すぐに利用可能なデータやよりすぐれたトランスレーショナルデータを得ることを期待できる。その結果、候補薬剤の選択や用量設定に関する情報が得られる。

このマウスモデルは、異なる免疫療法の比較研究のためにも利用することができる。たとえば、共通の標的に対するモノクローナル抗体と二重特異性抗体の比較などである (図 4)。このマウスモデルにおいては、GVHD が発症しない、あるいは GVHD が遅れて発症するために、末梢血単核細胞によってヒト化された他のマウスにくらべて、より長い生存期間が得られる。したがって、科学者たちは、より長期にわたる効果を容易に調べることができる。すなわち、数日のレベルではなく、数週間にわたって、測定を続けることができるのである。

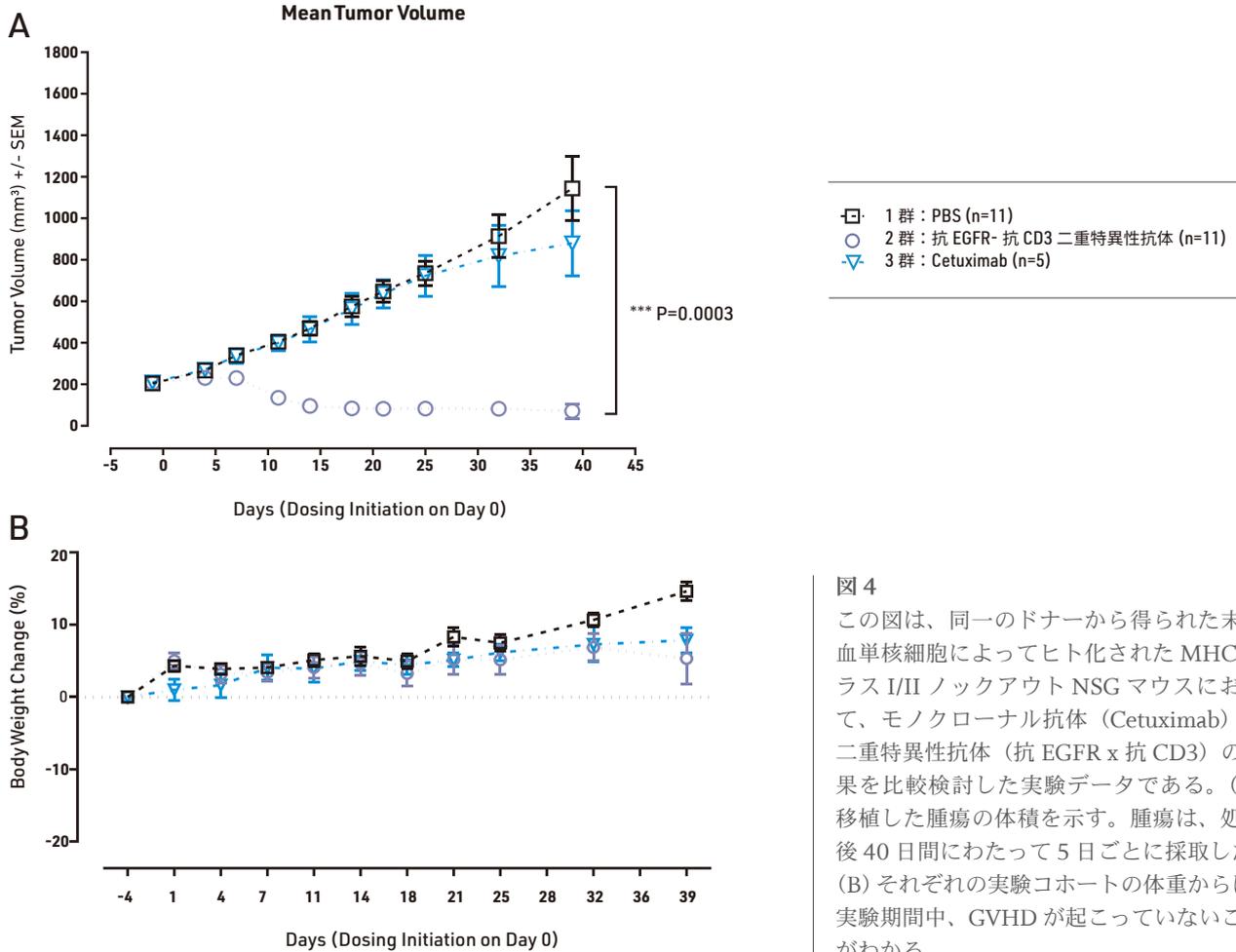


図 4

この図は、同一のドナーから得られた末梢血単核細胞によってヒト化された MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスにおいて、モノクローナル抗体 (Cetuximab) と二重特異性抗体 (抗 EGFR x 抗 CD3) の効果を比較検討した実験データである。(A) 移植した腫瘍の体積を示す。腫瘍は、処置後 40 日間にわたって 5 日ごとに採取した。(B) それぞれの実験コホートの体重からは、実験期間中、GVHD が起こっていないことがわかる。

結論

マウス MHC クラス I およびクラス II を欠損するヒト化 NSG マウスによって、科学者は、マウス体内において、ヒトの免疫反応をモデル化することができる。このヒト化マウスにおいては急速な GVHD が起こらないので、実験結果が GVHD の複雑な影響を受けることはない。これまでは、GVHD が起こるために、他のヒト化マウスモデルの応用は限られていた。この MHC クラス I/II ノックアウト NSG マウスは、腫瘍移植片ならびにヒト末梢血単核細胞を受容する。また、このマウスの免疫調節剤に対する反応から、さまざまな応用研究において、よりすぐれたトランスレーショナルデータが得られることが示唆される。たとえば、探索的免疫研究や前臨床治療試験評価などの応用研究である。ヒト化した後における急速な GVHD 発症の機会を最小限にするためには、あらかじめ性質のわかっているドナーから得られたヒト末梢血単核細胞を移植するのが有効である。このマウスモデルを戦略的に利用することによって、科学者は、ヒト免疫系に関するより深い理解を得られるであろう。そしていつの日か、多くの疾患に対するよりよい治療法が提供されることであろう。

参考文献

- ¹ Ye, C., Yang, H., Cheng, M., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Brehm, M. A., & Keck, J. G. (2020, August 9). A rapid, sensitive, and reproducible in vivo PBMC humanized murine model for determining therapeutic-related cytokine release syndrome. *The FASEB Journal*, 34(9), 12963–12975.
<https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202001203R>
- ² Brehm, M. A., Kenney, L. L., Wiles, M. V., Low, B. E., Tisch, R. M., Burzenski, L., Mueller, C., Greiner, D. L., & Shultz, L. D. (2018, November 1). Lack of acute xenogeneic graft-versus-host disease, but retention of t-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression. *The FASEB Journal*, 33(3), 3137–3151.
<https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.201800636R>

JAX[®] Mice, Clinical & Research Services

The Jackson Laboratory

Maine | Connecticut | California | Japan | China

ask@jax.or.jp

www.jax.or.jp

WPJ22-01A

