

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名： バイオ医薬品評価のための新世代ヒト化マウスの開発
3. 研究開発代表者： 石川 文彦
4. 研究開発の成果

1. CRISPR による遺伝子導入の検証

CRISPR-Cas9 によるヒト遺伝子の検証について、リンパ節形成に必要な分子 X 発現を見据えて、検討を進めた。ヒト分子 X を含む CRISPR-Cas9 コンストラクトを作成し、C57BL/6 マウスの受精卵にインジェクションを行い、それぞれの生存率を解析し、誕生したマウスにおいては、ゲノム編集の成否を評価した。生存した 150 の B6 胚について、3つの胚で編集が個体レベルで成功していることを確認した。免疫不全マウス胚を直接用いて CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行う実験については、マウス遺伝子の deletion によって、ゲノム編集ならびに胚の評価を実施した結果、B6 胚と比較して効率は低いもののゲノム編集がなされていた胚が少数見られた。あわせて、ヒト分子を含むコンストラクトの作製を完了し、受精卵へのインジェクション準備を進めた。CRISPR-Cas9 と効率・発現を比較すべく、従来の遺伝子組換え技術を用いたノックインによる F1 マウスを得ることができた。

2. 胸腺環境をヒト化したマウスの作製とアジュバントの評価

日本人に最も多く見られる HLA class I 分子、HLA A24 を発現したマウスを用いて、複数の腫瘍に発現する WT1 分子のペプチドを用いて、ヒト化マウスに免疫した。PolyI:C をアジュバントとして用いた場合、抗原特異的 CD8+ T 細胞が誘導されることを、テトラマーアッセイにて確認した。さらに、単球由来樹状細胞を用いて HLA class I 分子を発現したヒト化マウスに免疫した場合、ペプチド単独より効率良い T 細胞の誘導が骨髄・脾臓で実現されることをフローサイトメトリーならびにテトラマーアッセイにて明らかにした。アジュバント・樹状細胞を用いた免疫に加えて、抗原特異的な T 細胞受容体をヒト造血幹細胞に遺伝子導入する遺伝子細胞治療モデルを新たに構築した。抗原特異的な CD8+ T 細胞がヒト化マウスモデルでの胸腺、脾臓、骨髄に認められた。これらのヒト T 細胞は、生体内で幹細胞から分化した場合も、導入した特定の受容体を維持できることを明らかにした。胸腺環境をヒト化したマウスで分化・成熟した T 細胞は、WT1 分子に対する特異性をテトラマーアッセイにて、IFN γ などサイトカインを産生する機能性を ELISPOT アッセイにて確認した。これらのことから、免疫細胞治療の評価系としてのヒト化マウスの意義・有用性について確認した。HLA class II 分子についても、免疫不全マウスへのバッククロスを終了し、数匹のマウスから胸腺を採材し、細胞を取り出したうえで、HLA 分子の発現をフローサイトメトリーにて確認した。マウスの MHC 分子を遺伝子組換えにて欠失させることで、胸腺環境をより完全にヒト化したマウスの作製も進めることができた。

3. ヒト化マウスを用いた抗体医薬評価

抗体医薬評価については、急性骨髄性白血病患者由来単核球を、複数の表面抗原分子に対するモノクローナル抗体で染色した。目的とする分子を高発現する症例を選び、新生仔免疫不全マウスに移植して、急性骨髄性白血病のヒト化マウスを作製した。ADCC 活性を測定するため、抗体をヒト化マウスに投薬

した。ヒト化マウスから骨髄・脾臓を採材して、ヒト白血病細胞の解析を行ったところ、抗体の目的分子への結合が確認された。一方、当該分子を発現する白血病細胞の十分な減少を認めなかったことから、さらに効果のある抗体を同定する作業を進めながら、活性の強い抗体を見出せた段階で、今一度、白血病ヒト化マウスを用いて検討を続ける。白血病モデル以外のヒト化マウスモデルでも、抗体評価を実施する準備を行った。

4. プロジェクトの総合的推進

3つのグループが定期的に議論して、課題推進に努めた。胸腺環境のヒト化については、コンストラクト作成を小原らが、マウス作出を古関らが、移植から解析までを研究代表者らが進めて、HLA分子、マウスMHC分子などの遺伝子組換えが正確に個体レベルで成功するための議論と実験を重ねた。抗体については、積極的に企業の意見を取り入れることを今年度の課題とした。急性骨髄性白血病ヒト化マウスを用いた投薬実験を行い、解析を進めたが、実際に臨床上、有益と判定された抗体を用いるために、あらたな抗体の使用とヒト化マウスの作製に着手した。