

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological
medicine

研究開発課題名： (日本語) バイオ医薬品評価のための新世代ヒト化マウスの開発
(英語) Development of next-generation humanized mice for pre-clinical in vivo
testing

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター
ヒト疾患モデル研究グループ グループディレクター 石川 文彦

所属 役職 氏名： (英語) Fumihiko Ishikawa, M.D., Ph.D.,
Group Director, Laboratory for Human Disease Models, RIKEN IMS

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 胸腺環境をヒト化したマウス開発
開発課題名： (英語) Development of mice with humanized thymic environment

研究開発分担者 (日本語) 小原 収
所属 役職 氏名： (英語) Osamu Ohara,
Group Director, Laboratory for Integrative Genomics, RIKEN IMS

分担研究 (日本語) リンパ節環境をヒト化したマウス開発
開発課題名： (英語) Development of mice with humanized lymphoid environment

研究開発分担者 (日本語) 古関 明彦
所属 役職 氏名： (英語) Haruhiko Koseki,
Group Director, Laboratory for Laboratory for Developmental Genetics,
RIKEN IMS

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

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

HLA class I 分子、class II 分子を発現する免疫不全 NSG マウスを個別に作製してきた。HLA class I においては、我が国で最も多い HLA A24 と世界的に多い HLA A2 を発現するマウスを用いて、class II 分子である HLA-DR4 まで発現させることによって、class I、class II の両者を発現する NSG マウスを作製した。新規の HLA class I x class II 発現 NSG マウスが誕生して 72 時間以内に放射線照射を行い、複数の臍帯血検体で HLA が一致するものを選択した上で、ヒト造血幹細胞をソーティングにて純化し、移植実験を施行した。移植後、3 週おきに採血をして、ヒト造血幹細胞由来のミエロイド系細胞、B 細胞の出現を 1 ヶ月後には認め、3 ヶ月が経過する頃から T 細胞の分化を認めた。4 ヶ月以上の十分な観察ができた時点で、レシピエントマウスの胸腺を解析し、CD4+CD8+ T 細胞など未分化なヒト T 細胞の存在を確認した。一方、二次リンパ組織である脾臓・リンパ節での CD4+CD8-T 細胞、CD4-CD8+ T 細胞の分化と成熟を認めた。さらに、マウスに導入したヒトの HLA 分子、移植する正常な造血幹細胞ソースとなる臍帯血、どちらにもあわせたヒト白血病検体を見出し、移植実験の準備を整えた。

CRISPR による遺伝子導入の評価

新規のヒト化マウスの効率的作製を可能とするため、CRISPR-Cas9 の有効性について、受精卵、及び、ES 細胞を用いて検討を行うこととした。昨年度に作製したヒト遺伝子を含むコンストラクトを用い、組み換え効率を評価した。受精卵への導入については、免疫不全マウス系統においては、コントロールとして用いた B6 系統と比較して、インジェクションによって産仔率が低下することが分かった。また B6 系統においては、コンストラクトがノックインされた産仔が得られたが、免疫不全マウス系統からは得ることが困難になると判明した。そのため、これまで困難とされてきた免疫不全マウスから ES 細胞を樹立することを試みた。さまざまな培養条件の検討の中で、ES 細胞培養における標準的なメEDIUM に、二つのシグナルを阻害することにより、ナイーブな多能性の特徴を満たす ES 細胞を、20 継代を超えて、安定して維持できた。

ヒト化マウスを用いた抗体医薬評価

これまで、ヒト化マウスに抗体を投薬し、抗体と標的抗原を発現する細胞の結合を確認した。皮膚・肺に慢性炎症をきたすヒト化マウスを作製し、サイトカイン受容体に対する抗体を投薬し、制御性 T 細胞の変化を見出すことができた。これらの抗体医薬の薬効を、複数のヒト疾患細胞を対象に評価するため、急性骨髄性白血病に加えて、リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病の検体を用いて、新たなヒト化マウス作製を行った。

Creating mice with humanized thymic environment

We have previously created immune-deficient NSG mice that separately express HLA class I and class II molecules. Furthermore, we have created NSG mice that express both HLA class I and class II molecules together, namely HLA-A24 (most common in Japanese population) or HLA-A2

(most common globally) together with HLA-DR4. We transplanted sorted HLA class I- and class II-matched human cord blood hematopoietic stem cells into these NSG mice within 72 hours after irradiation. By performing phlebotomy every 3 weeks, we detected human myeloid and B cells at 1 month post-transplantation and human T cells at 3 months post-transplantation in peripheral blood of the recipients. After long-term observation past 4 months post-transplantation, we detected human CD4+CD8+ T cells and other immature human T cells in the thymus of the recipients. In addition, we found human CD4+CD8- and CD4-CD8+ T cells in the spleen and lymph nodes, as evidence of human T cell maturation in NSG recipients. Moreover, we have collected human cord blood and leukemia samples that match both class I and class II molecules expressed in NSG mice for co-transplantation experiments.

Expression of human environmental molecules through CRISPR and conventional genetic modifications

To more efficiently create NSG recipients expressing other molecules that constitute the human immuno-hematopoietic microenvironment, we assessed the use of CRISPR-Cas9 in fertilized oocytes and ES cells. To do so, we used constructs containing human genes that were created last year. We found that introduction of human genes using CRISPR-Cas9 into fertilized NSG oocytes led to decreased birth rates with low knock-in rates compared with B6 controls. Therefore, we went on to develop ES lines from NSG mice which have been technically difficult to date and succeeded in developing an ES line that were stable for over 20 passages in culture by inhibition of two key signals in standard ES culture conditions.

Assessment of antibody drugs using humanized mice

We have previously confirmed antibody binding to the target molecule in vivo in NSG mice engrafted with human hematopoietic cells. In addition, in newly created humanized mouse model showing chronic inflammation in the skin and lungs, anti-cytokine receptor antibody resulted in alterations in human regulatory T cells. To test these antibody drugs in vivo, we created humanized NSG mice engrafted with human acute myeloid leukemia, human chronic myeloid leukemia and human acute lymphoblastic leukemia.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. Ishikawa F. Guest editorial: Connecting multiple aspects of hematologic malignancies toward creation of new therapeutics. International Journal of Hematology; 105: 547-548, 23 Feb. 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Ishikawa F. “Exploring complexity and heterogeneity of human acute myeloid leukemia”, 2016 the Japanese Society of Medical Oncology 2016 Annual Meeting (第14回日本臨床腫瘍学会学術集会) (7/29/2016), 兵庫県神戸市, 国内
2. Ishikawa F. “Overview of Heme Focused models”, Preclinical models for Immunotherapy Development Scientific Input Engagement (organized by MERCK & CO., INC.) (9/27/2016), San Francisco, CA, USA., 国外
3. Ishikawa F. “Targeting acute myeloid leukemia with genetic complexity and heterogeneity” (急性骨髄性白血病のゲノム複雑性と分子標的治療), 第75回日本癌学会学術総会 (10/6/2016), Yokohama, Japan, 国内
4. Ono, R., Tomizawa-Murasawa, M., Sato, K., Matsuda, M., Hasegawa, T., Yoshida, H., Ohara, O., Amagai, M., Koseki, H., Ishikawa, F. Understanding the role of interleukin-6 in human immune system. International Congress of Immunology 2016 (8/24/2016), Melbourne, Australia, 国外
5. Ono, R., Tomizawa-Murasawa, M., Yoshida H., Ohara O., Amagai M., Koseki H., Ishikawa F. Understanding the role of Interleukin-6 in human immune system. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (12/2016), 沖縄県宜野湾市, 国内
6. Tomizawa M., Saito Y., Watanabe T., Yamada D., Ono R., Najima Y., Fujiki S., Kawamoto H., Ohara O., Koseki H., Ishikawa F. In vitro and in vivo differentiation capacity of human iPS-derived CD34+ cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 (12/2016), 沖縄県宜野湾市, 国内
7. Ishikawa F. “Creating a therapeutic strategy overcoming genetic heterogeneity in AML”, 2017 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies (2/21/2017), Hawaii, USA, 国外
8. Ishikawa F. “Targeting genetically-complex human leukemia”, Humanized mice and Patient Derived Xenografts in Individualized Medicine” (3/17/2017), Yokohama, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 血液のがん「白血病」とからだを守る「白血球」～血液の善玉と悪玉の違いを見つけよう！～, 石川文彦, 2016年度理化学研究所横浜キャンパス一般公開, 2016/9/10, 国内

(4) 特許出願

該当なし