

ヒト化マウスを用いたヒトウイルス感染症モデルの樹立とその応用

岡田誠治

熊本大学エイズ学研究センター岡田プロジェクト研究室

はじめに

ヒトの病気を理解するためには、様々な実験動物を用いた *in vivo* の解析系が重要である。特にマウスは、①飼育と繁殖が容易である、②遺伝子が同一の系統 (Inbred strain) が存在するため、安定した実験結果が得られやすい、③ヒトの病気のモデルマウスが存在する (高血圧、糖尿病、貧血など)、④遺伝子改変マウス作成技術が確立している、などの理由で医学生物学研究に古くから用いられ、その発展に大きく貢献してきた。しかしながら、ヒトとマウスなどの実験動物では免疫反応など異なる点も多いことから、マウスを用いた研究結果は必ずしもヒトの生体を反映されるものではなく、実験結果の解釈には注意を要する [1]。特に、エイズなどのヒトに特有の感染症はマウスなどの実験動物には感染しないため、実験動物を用いた研究には限界があった。そこで、世界的にヒトの細胞が生着可能な高度免疫不全マウスの開発とヒト細胞が生着した「ヒト化マウス」の開発が進んでいる。本稿では、ヒト化マウスを用いたヒト感染症研究の動向について概説する。

1. 高度免疫不全マウスとヒト化マウスの開発

1962年のNudeマウスの発見以来、様々な免疫不全マウスが開発されてきた。NudeマウスやScidマウスにはヒト腫瘍細胞は生着可能であったが、ヒト血液細胞のような正常細胞の生着は困難であった。そして、1988年のHu-PBL Scidマウス Scid-huマウスの樹立により、免疫不全マウスにヒト血液細胞を移植し、マウス体内でヒト血液細胞が生着し増殖分化する「ヒト化マウス」作成への道が拓かれた。1995年に機能的なT細胞とB細胞が欠損し、NK活性とマクロファージ機能が障害されたNOD/Scidマウスが樹立され、ヒト血液細胞の生着は飛躍的に改善した [2]。その後、ヒト造血幹細胞の生着とT細胞

の分化にはNK細胞活性の制御が重要であることが判明し、NOGマウスやNSGマウスなどのNK細胞が欠損したマウスが樹立された (表1) [3-5]。私達は、Jak3欠損マウスにおいてNK細胞が完全に欠損していることに注目し、NOD/ScidマウスとJak3欠損マウスを10世代交配し、NOD/Scid Jak3欠損マウス (NOJマウス) を樹立した [6]。後に、NOD系統のマウスではマクロファージの*Sirpa*に変異があるため、ヒト細胞を認識して貪食しないため、ヒト細胞の生着が良いことが判明している [7] (図1)。

2. 高度免疫不全マウスを用いたヒト感染症モデル

高度免疫不全マウスにヒト造血幹細胞或いは単核球を移植することで、マウス体内においてヒトの造血免疫系を構築することが可能となった (表1, 2)。これらのヒトの細胞や組織を定着マウスはさせたマウスは、ヒト化マウス (Humanized mice) と呼ばれ、近年様々なヒト研究に使われている [5]。

2-1. HIV-1感染マウスモデルの樹立と治療法開発への応用

ヒト化マウスでは、ヒトCD4陽性T細胞を効率良く構築する事が可能なため、HIV-1感染が成立する。そのため、様々なHIV-1感染マウスモデルが樹立され、HIV-1の病態解析や治療法開発に用いられている [8-11]。

NOJマウスにヒト末梢血由来単核球を移植したところ、マウス体内でヒト成熟リンパ球生着・増殖可能であった。更にHIV-1を攻撃接種したところ、マウス体内におけるHIV-1増殖とヒトCD4陽性細胞の減少が認められた。本マウスを用いて満屋らが開発中であった新規核酸系逆転写阻害薬4'-Ethylnyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine (EFdA)の有効性を評価した。その結果、マウス体内におけるCD4陽性細胞の回復、HIV-1 RNAコピー数の大幅な減少等が認められ、副



表 1. 主な免疫不全マウスとその特徴

系統	マウス免疫系				ヒト造血幹細胞の生着と分化		ヒト腫瘍細胞の生着
	T細胞	B細胞	NK細胞	Mφ	造血系	T細胞分化	
Nude	-	+	+	+	-	-	+
Scid	-	-	+	+	-	-	++
NOD	-	-	↓	↓	-	-	-
NOD/Scid	-	-	↓	↓	+	+/-	+++
NOG, NSG (NOD/Scid/γc KO) NOJ (NOD/Scid/Jak3 KO)	-	-	-	↓	+++	+++	++++
Balb/c Rag-2/γc KO Rag-2/Jak3 KO	-	-	-	+	++	++	++++

Mφ：マクロファージ

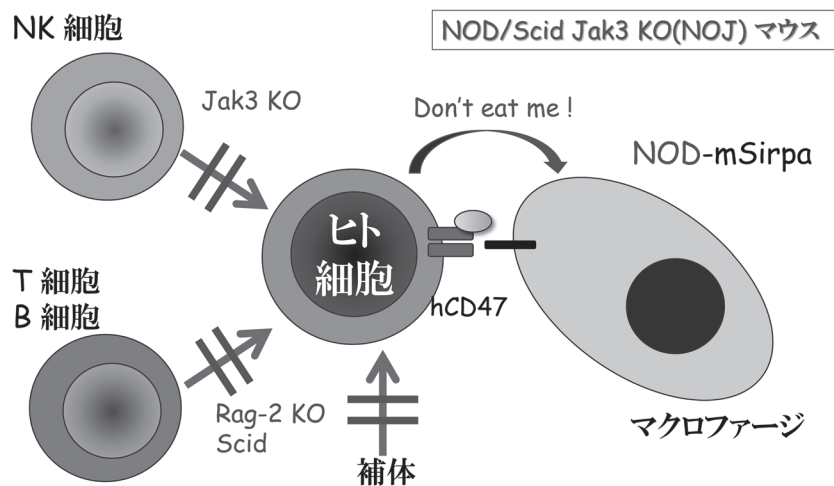


図 1. NOJ マウスにおけるヒト細胞の生着

NOJ マウスは以下の複合的免疫不全を有するため、ヒト細胞の生着が容易である。
 ① Scid 変異があるため成熟した（遺伝子再構築が行われた）T細胞、B細胞及びNKT細胞が存在しない。
 ② Jak3 欠損があるためNK細胞が完全に消失している。
 ③ NOD 変異があるためC5が欠損しており、補体活性がない。
 ④ NOD 変異があるためマクロファージ上のSirpaがヒトCD47を認識し、“Don't eat me”シグナルが働くため、マクロファージが移植されたヒト細胞を貪食しない [7]。
 ⑤ NOD 変異では樹状細胞の機能欠損とマクロファージのインターフェロン産生低下も指摘されている。

作用は認められなかった（図2）[12]。その後、EFdAはMerck社において臨床開発が進められている。このようにHIV-1感染マウスモデルは、前臨床試験で薬剤の有効性と副作用を評価する系として有用である。また、遺伝子治療の可能性を探るために、

ヒト末梢血単核球にHIV-1プロモーターのNF-kappa B領域に対するshRNA (PromA-JRFL)をレンチウイルスを用いて導入した。shRNA導入単核球をNOJマウスに移植し、更にHIV-1を攻撃接種したところ、PromA-JRFL導入細胞群では、CD4陽性細胞の回復

表2. ヒト感染症研究に用いられる主なヒト化マウス

ヒト化マウス	Hu-PBL Scid	Hu-HSC	SCID-hu / BLT
作成法	ヒト単核球を腹腔内, 静脈内, 脾内投与する。	ヒト造血幹細胞を放射線照射した新生仔に肝臓内・静脈内(顔静脈)投与する。放射線照射した成獣マウスに静脈内・骨髄内投与する。	ヒト胎児胸腺と肝臓をマウスの腎皮膜化に移植する。放射線照射後に同じドナー由来の造血幹細胞を静脈内投与する。
特徴	短期間, ヒト免疫細胞, 特にT細胞の構築が認められる。	ほぼすべてのヒト免疫細胞の構築が長期間認められる。	粘膜免疫を含めたほぼすべての免疫細胞が長期にわたり構築される。
欠点	構築されたT細胞は活性化しており, GVHが認められる。ドナーにより構築の程度が違う。	マウス胸腺を介して分化するため, HLA拘束性を獲得していない。獲得免疫が不完全である。	本邦では, 胎児組織を入手することは極めて困難である。

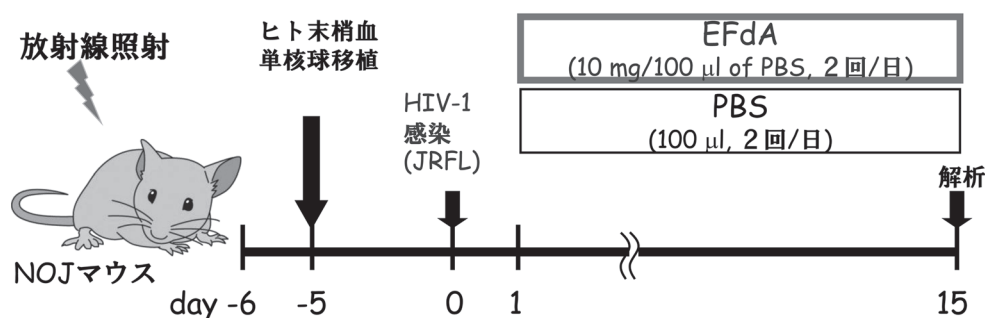


図2. HIV-1 感染マウスモデルを用いた抗 HIV-1 薬の評価

NOJ マウスに放射線照射 (1 Gy) し, 翌日ヒト末梢血由来単核球 (1×10^7 個) をする。5日後に HIV-1(JRFL) を攻撃接種すると, マウス体内で HIV-1 感染が成立する。翌日より2週間抗 HIV-1 薬 (ここでは EFdA) を投与後, マウス体内のヒト CD4 陽性細胞数, HIV-1 RNA 量, p24 等を解析することにより, 抗 HIV-1 薬の *in vivo* における有効性が検討可能である。

と HIV-1 感染細胞の減少が認められた [13]。また, 寺原らは蛍光標識された HIV-1 をヒト化マウスに感染させることで, 感染後の HIV-1 の動態を経時的に解析する事に成功している [14]。

2-2. Human T cell leukemia virus-1 (HTLV-1) 感染モデル

ヒト化マウスに HTLV-1 を攻撃接種することで HTLV-1 の持続感染と Adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) 発症モデルが樹立されている [15, 16]。また, ATL 細胞は NOJ マウスなどの高度免疫不全マウスに容易に生着することが示されている [17]。今後, ATL の発症機序の解析や治療法開発への活用が期待される [9]。

2-3. Epstein-Barr virus (EBV) 感染モデル

ヒト化マウスに EBV を接種すると, Lymphoproliferative disease を発症することから, B 細胞性リンパ腫発症のモデルとされている。また, EBV で不死化した EBV-transformed B cells は, NOJ マウス体内で増殖することが確認されている。EBV は B 細胞以外にも T 細胞や NK 細胞等にも感染して腫瘍化することが知られているが, ヒト化マウスは, その病態解析や治療法開発に極めて有用であると考えられている [18]。

2-4. 麻疹ウイルス感染モデル

寺原らは, EGFP を発現する麻疹ウイルスをヒト化マウスに攻撃接種し, 麻疹ウイルスの持続感染を

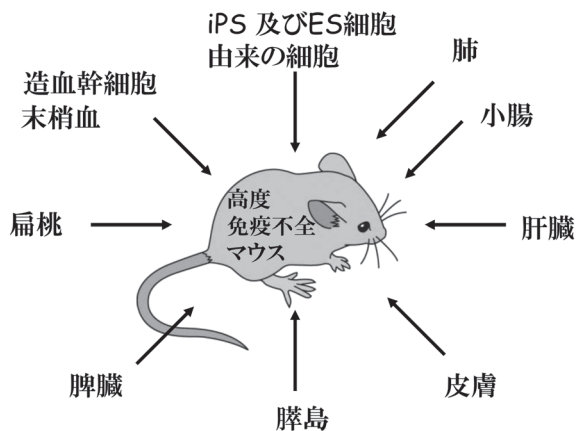


図3. 高度免疫不全マウスへのヒト細胞移植による様々なヒト感染症モデルの樹立

高度免疫不全マウスにヒトの様々な細胞や臓器を移植することで、ヒト臓器特異的な感染症のマウスモデルの樹立が可能である [24]。

確認している [19]。また、佐藤らは、NOJ マウス脾臓にヒト臍帯血単核球を移植した hu-PBL Scid モデルに C 型肝炎ウイルスの E1/E2 蛋白遺伝子を組み込んだ麻疹ウイルスを攻撃接種し、麻疹ウイルスの感染、抗麻疹抗体、抗 E2 抗体の産生を確認している [20]。

2-5. その他の感染症モデル

ヒト造血・免疫系を構築したヒト化マウスでは、ヒト血球に感染するウイルスであれば感染可能なので、様々なヒトウイルス感染症モデルが樹立されている [21, 22]。また、高度免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したヒト化マウス樹立されており [23]、これらのマウスには肝炎ウイルスやマラリアが感染可能であり、既に治療法開発などに用いられている。高度免疫不全マウスにヒトの様々な細胞や臓器を移植することで、今後ヒト感染症の様々なマウスモデルの樹立が期待できる (図3)。

3. 今後の展開

これまでに樹立された造血免疫系のヒト化マウスでは、残念ながらヒトの造血免疫系を完全に構築するには至っていない。BLT マウスでは、造血幹細胞と共にヒト胎児胸腺と胎児肝を同時移植するため、獲得免疫を含めたヒト免疫の構築が可能であるが、ヒトの胎児組織を使用するため、倫理的に問題があり、本邦での使用は困難である。ヒト造血幹細胞の

みを移植した場合には、マウス胸腺を介して T 細胞分化が行われるため、HLA 依存的な獲得免疫反応の再現は困難である。また、これらのマウスでは、骨髄系 (Myeloid) 細胞や赤血球の分化が良くないなど、完全にヒトの造血・免疫系を構築するには至っていない。そこで、ヒトの HLA の導入やヒトサイトカインをノックインしたマウスの作成が試みられている [24]。また、NK 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞などヒトの特定の免疫細胞のみを構築したヒト化マウスも樹立されており [25, 26]、これらの手法の活用により、より適切で使いやすいヒトウイルス感染症モデルの樹立が期待される。

謝 辞

高度免疫不全マウスの飼育に携わっている熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究施設 (CARD) の皆様に深謝致します。

文 献

1. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, and Tompkins RG: Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3507–3512, 2013.
2. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, and et al.: Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154: 180–191, 1995.
3. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, and Nakahata T: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175–3182, 2002.
4. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, and Handgretinger R: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-

- scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174: 6477–6489, 2005.
5. Shultz LD, Ishikawa F, and Greiner DL: Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7: 118–130, 2007.
 6. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T, and Suzu S: Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3null mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34 + cells. *Int J Hematol* 88: 476–482, 2008.
 7. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI, Dick JE, and Danska JS: Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 8: 1313–1323, 2007.
 8. Berges BK and Rowan MR: The utility of the new generation of humanized mice to study HIV-1 infection: transmission, prevention, pathogenesis, and treatment. *Retrovirology* 8: 65, 2011.
 9. Marsden MD and Zack JA: Studies of retroviral infection in humanized mice. *Virology* 479–480: 297–309, 2015.
 10. Karpel ME, Boutwell CL, and Allen TM: BLT humanized mice as a small animal model of HIV infection. *Curr Opin Virol* 13: 75–80, 2015.
 11. Yamada E, Yoshikawa R, Nakano Y, Misawa N, Koyanagi Y, and Sato K: Impacts of humanized mouse models on the investigation of HIV-1 infection: illuminating the roles of viral accessory proteins in vivo. *Viruses* 7: 1373–1390, 2015.
 12. Hattori S, Ide K, Nakata H, Harada H, Suzu S, Ashida N, Kohgo S, Hayakawa H, Mitsuya H, and Okada S: Potent activity of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosine, against human immunodeficiency virus type 1 infection in a model using human peripheral blood mononuclear cell-transplanted NOD/SCID Janus kinase 3 knockout mice. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3887–3893, 2009.
 13. Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, and Kelleher AD: Promoter Targeting shRNA Suppresses HIV-1 Infection In vivo Through Transcriptional Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e137, 2013.
 14. Terahara K, Ishige M, Ikeno S, Mitsuki YY, Okada S, Kobayashi K, and Tsunetsugu-Yokota Y: Expansion of activated memory CD4+ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3null mice. *PLoS One* 8: e53495, 2013.
 15. Hiyoshi M, Okuma K, Tateyama S, Takizawa K, Saito M, Kuramitsu M, Araki K, Morishita K, Okada S, Yamamoto N, Biragyn A, Yamaguchi K, and Hama-guchi I: Furin-dependent CCL17-fused recombinant toxin controls HTLV-1 infection by targeting and eliminating infected CCR4-expressing cells in vitro and in vivo. *Retrovirology* 12: 73, 2015.
 16. Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, and Fujisawa J: An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. *Blood* 123: 346–355, 2014.
 17. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, and Komano J: A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. *Leukemia* 27: 1621–1627, 2013.
 18. Fujiwara S, Imadome K, and Takei M: Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* 47: e135, 2015.
 19. Ikeno S, Suzuki MO, Muhsen M, Ishige M, Kobayashi-Ishihara M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, and Tsunetsugu-Yokota Y: Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front Microbiol* 4: 298, 2013.
 20. Satoh M, Saito M, Tanaka K, Iwanaga S, Ali SN, Seki T, Okada S, Kohara M, Harada S, Kai C, and Tsukiyama-Kohara K: Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: e81–88, 2010.
 21. Leung C, Chijioke O, Gujer C, Chatterjee B, Antsiferova O, Landtwin V, McHugh D, Raykova A, and Munz C: Infectious diseases in humanized mice. *Eur J Immunol* 43: 2246–2254, 2013.
 22. Crawford LB, Streblow DN, Hakki M, Nelson JA, and Caposio P: Humanized mouse models of human cytomegalovirus infection. *Curr Opin Virol* 13: 86–92, 2015.
 23. Douglas DN and Kneteman NM: Generation of improved mouse models for the study of hepatitis C virus. *Eur J Pharmacol* 759: 313–325, 2015.
 24. Brehm MA, Wiles MV, Greiner DL, and Shultz LD: Generation of improved humanized mouse models



- for human infectious diseases. *J Immunol Methods* 410: 3–17, 2014.
25. Harada H, Suzu S, Ito T, and Okada S: Selective expansion and engraftment of human CD16⁺ NK cells in NOD/SCID mice. *Eur J Immunol* 35: 3599–3609, 2005.
26. Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, and Okada S: Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced Vgamma9Vdelta2 T cells against primary effusion lymphoma. *Cancer Lett* 331: 174–182, 2013.