

免疫系ヒト化 IE-HLA-DRA\*0101/HLA-DRB1\*0405  
transgenic NOD/Shi-scid,IL-2R $\gamma$ KO マウスを利用した  
新たな慢性 graft versus host disease モデルの検討  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系膠原病リウマチ学専攻

都築 広

2021 年

指導教員 武井 正美

## 【背景】

移植片対宿主病 graft versus host disease (GVHD) は同種造血幹細胞移植に特有の合併症で、特に慢性 GVHD の病態に関してはまだ不明な部分が多い。慢性 GVHD 患者の多くに血清から抗核抗体が検出されており<sup>(1)(2)(3)(4)</sup>、液性免疫系が病態の形成に関与することが指摘されている。

近年、慢性 GVHD の研究において免疫系ヒト化マウスを利用した xenograft animal model が注目されている。NOD/Scid/IL-2R $\gamma$ null (以下 NSG) マウスや human IL-6 transgenic NSG マウスを利用した免疫系ヒト化マウスでは慢性 GVHD 様の変化が起きると報告されているが<sup>(5)(6)</sup>、B 細胞の活性化や自己抗体などの液性免疫系が関与する病態を再現できていない。液性免疫系が病態の形成に関与すると考えられている慢性 GVHD の病態を解析するためには、液性免疫系の検討が可能な新たなマウスモデルを開発することが必要である。

NSG マウスは NOD/Scid マウスと IL-12 受容体  $\gamma$  鎖欠損マウスを交配させたマウスで<sup>(7)</sup>、同様のマウスに NOD/Shi-scid,IL-2R $\gamma$ KO (以下 NOG) マウス<sup>(8)</sup>があり、免疫学的特性は一致している。これらの免疫系ヒト化マウスでは外来抗原に対して IgG 抗体が産生されず、液性免疫系の再構築が不完全であることが指摘されている<sup>(9)</sup>。IE-HLA-DRA\*0101

/HLA-DRB1\*0405 transgenic NOD/Shi-scid,IL-2RyKO (以下 HLA-DR4 Tg NOG) マウスに HLA-DRB1\*0405 陽性臍帯血由来の CD34 陽性細胞を移植して作製された免疫系ヒト化マウス (以下、免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウス) では液性免疫系の再構築が良好であり<sup>(10)</sup>、免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスにおいて液性免疫系が病態の形成に関与する慢性 GVHD 様の変化が起きることが予測される。本研究では免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスに液性免疫系が関与する慢性 GVHD 様変化が起きるかどうかを検討した。

## 【方法】

HLA-DR4 Tg NOG マウスを実験動物中央研究所 (Kawasaki, Japan) から入手し、当研究室で繁殖を行った。当学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野が管理する凍結臍帯血の中から HLA-DRB1\*0405 陽性の臍帯血を選出し、磁気細胞分離を利用して CD34 陽性細胞を分離した。分離した CD34 陽性細胞を週齢 8~16 週の HLA-DR4 Tg NOG マウス 13 頭 (雄 7 頭、雌 6 頭) に  $5.8 \times 10^4 \sim 2.1 \times 10^5$ /頭の細胞数で尾静脈注射し、免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスを作製した。細胞移植前に放射線照射を行っていない。全てのマウスは感染症ゲノム研究室の P1A レベ

ル実験室において specific pathogen free (SPF) 条件下で飼育した。移植後 26 週まで GVHD 徴候（脱毛、体重減少、円背、毛を逆立てる、動きが鈍くなる、頻呼吸、歯肉炎や歯の脆弱化）<sup>(5)(6)(11)</sup>の有無を観察した。免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスの苦痛が著しい場合、あるいは期間満了時には安楽死処置（熟練者による頸椎脱臼）を行い、解剖した。解剖後、皮膚、肺、肝臓、消化管の組織学的所見を検討した。また、移植後 26 週時の末梢血を使用して末梢血ヒトリンパ球サブセット、血清ヒト免疫グロブリン濃度、抗核抗体（間接蛍光抗体法）を測定し、液性免疫系に関する項目を検討した。2 群間の平均値の差はウェルチの t 検定、独立性の評価はフィッシャーの正確確率検定を用いて解析した。全ての検定の有意水準を 0.05 に設定した。検定には EZR ver 1.52 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用した<sup>(12)</sup>。本研究ではマウスに移植する目的でヒト臍帯血を使用しており、日本大学医学部の定める倫理委員会で承認された倫理指針に従って実施した（承認番号：211-3）。また、HLA-DR4 Tg NOG マウスは遺伝子組換え生物に該当するため、日本大学医学部遺伝子組換え実験規定に定める学長の承認を受けている（承認番号：2016 医 1-2）。動物実験計画は日本大学動物実験委員会の承認を得ている（承認番号：第

AP18MED009-5 号、第 AP18MED010-3 号)。

## 【結果】

観察期間中、免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウス 13 頭全てにおいて GVHD 徴候を認めなかった。移植後 26 週時の末梢血ヒトリンパ球サブセットを解析した結果、雌 6 頭と雄 3 頭でヒト B 細胞およびヒト T 細胞の集団が確認されたのに対し (以下、ヒト T 細胞分化良好群)、残りの雄 4 頭ではヒト B 細胞の集団のみが確認され、ヒト T 細胞は極めて少なかった (以下、ヒト T 細胞分化不良群)。

脾臓の組織像では、ヒト T 細胞分化良好群では非移植マウスと比較して血管周囲のリンパ組織が発達して濾胞様構造を呈しており、内部にヒト B 細胞とヒト T 細胞が混在していた。ヒト T 細胞分化不良群では濾胞様構造が小さく、内部のヒト T 細胞が極めて少なかった。ヒト T 細胞分化群 9 頭中 6 頭 (雄 1 頭、雌 5 頭) では皮膚、肝臓、肺に CD4 優位ヒト T 細胞浸潤の所見を認め、いずれも脾臓内ではヒトマクロファージが凝集し、細胞貪食像 (tingible body macrophage) が共通していた。さらにヒト T 細胞浸潤を認めた 6 頭中 3 頭では脾臓の濾胞様構造内に Bcl-6 陽性ヒト B 細胞のクラスターを認め、胚中心を形成していた<sup>(13)(14)</sup>。脾臓内

のマクロファージ凝集や細胞貪食像の所見はヒト T 細胞浸潤を認めなかった 3 頭ではいずれも認められず、脾臓内マクロファージ凝集および細胞貪食像の所見とヒト T 細胞浸潤の所見に関連性が認められた。

ヒト T 細胞分化良好群について、ヒト T 細胞浸潤所見の陽性群 6 頭と陰性群 3 頭 に分けて移植後 26 週時の末梢血ヒトリンパ球 CD3/CD19 比、血清ヒト IgM およびヒト IgG 濃度の平均値を比較した結果、血清ヒト IgM 濃度は 192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vs 43.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で陽性群に高値の傾向を認め、統計学的有意差が検出された (p 値=0.0094)。末梢血ヒトリンパ球 CD3/CD19 比および血清ヒト IgG 濃度においても陽性群で高値の傾向がみられたが、統計学的有意差は検出されなかった。ヒト T 細胞浸潤所見の陽性群 6 頭中 5 頭、陰性群 3 頭中 1 頭の血清中に辺縁型あるいは均質型の染色パターンを示す抗核抗体が検出された。

## 【考察】

本研究ではヒト T 細胞浸潤所見の陽性群で脾臓内のマクロファージ凝集や tingible body macrophage の所見が共通しており、陽性群の一部において濾胞様構造内に明瞭な胚中心形成を認めた。Tingible body macrophage は胚中心の形成過程で出現し<sup>(15)(16)</sup>、アポトーシスを起こし

た抗原親和性の低い B 細胞クローンを処理する<sup>(17)</sup>。したがって本研究における脾臓の所見は、本マウスの B 細胞の活性化を支持する結果と考えられる。

ヒト T 細胞浸潤所見の陽性群 (n=6) では陰性群 (n=3) と比較して移植後 26 週時の血清ヒト IgM 濃度が有意に高値であった。同種造血幹細胞移植例では IgM が移植後最も早期に回復し、IgG および IgA は IgM に遅れて回復することから<sup>(18)(19)(20)</sup>、血清 IgM 値はドナー B 細胞の免疫再構築を反映するマーカーとされている<sup>(21)</sup>。ヒト T 細胞浸潤所見の陽性群では液性免疫系の再構築が良好であったと考えられる。また、移植後 26 週時にヒト T 細胞浸潤所見を認めた免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスはいずれも無症状であり、血清ヒト IgM 高値は臓器病変の存在を示唆する所見として有用と考えられた。

既報の免疫系ヒト化マウスを利用した慢性 GVHD モデル<sup>(8)(9)</sup>と免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスを比較する。免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスでは真皮、門脈域、肺血管周囲の組織像で CD4 優位ヒト T 細胞浸潤を認めており、既報と共通していた。同マウスではさらに脾臓における B 細胞の活性化、抗核抗体などの液性免疫系に関連する所見を認めており、これらは既報では再現されていない所見である。このよ

うに免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスではヒト T 細胞浸潤に加えて液性免疫系に関する所見を再現することができており、既報の免疫系ヒト化マウスを利用した慢性 GVHD モデルと比較して優位性がある。

本研究では移植後の観察期間を 26 週までに限定しており、組織病変が今後どのような経過をとるのかまでは明らかにできなかった。免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスを新たな慢性 GVHD モデルとして確立するためには、移植後長期の経過を今後明らかにしていく必要がある。

免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスでは液性免疫系に関連する所見を認めており、既報の免疫系ヒト化マウスを利用した慢性 GVHD モデルと比較して病態をより正確に再現できていると考えられる。免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスによる慢性 GVHD のモデルを確立することで、本疾患の病態解明や治療実験への応用が期待できる。

## 【結論】

免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスでは造血幹細胞移植後 26 週の時点で皮膚、肺、肝臓に CD4 優位ヒト T 細胞浸潤が起こり、脾臓における B 細胞活性化や自己抗体など液性免疫系が病態の形成に関与する所見を認めており、既報の免疫系ヒト化マウスを利用した慢性 GVHD モデル



では再現することができなかつた液性免疫系に関連する所見を示すことができた。本研究の結果から、免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスを液性免疫系の検討が可能な新たな慢性 GVHD モデルに応用できると考えられた。免疫系ヒト化 HLA-DR4 Tg NOG マウスが慢性 GVHD の新たな免疫系ヒト化マウスモデルとして確立されるためには、移植後長期の経過について今後明らかにする必要がある。

【引用文献】

1. Wesierska-Gadek J, Penner E, Hitchman E et al. Nucleolar protein B23 and C23 as target antigens in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 1992; **79**(4): 1081-1086.
2. Kier P, Penner E, Bakos S et al. Autoantibodies in chronic GVHD: high prevalence of antinucleolar antibodies. *Bone Marrow Transplant*. 1990; **6**(2): 93-96.
3. Patriarca F, Skert C, Sperotto A, et al. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graftvs-host disease and immune recovery. *Exp Hematol*. 2006; **34**: 389-396.
4. Fujii H, Cuvelier G, She K, et al. Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children' s Oncology Group. *Blood*. 2008; **111**: 3276-3285.
5. Sonntag K, Eckert F, Welker C, et al. Chronic-graft-versus-disease in CD34(+)-humanized NSD mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2015; **62**: 55-66.

6. Ono R, Watanabe T, Kawakami E, et al. Co-activation of macrophages and T cells contribute to chronic GVHD in human IL-6 transgenic humanized mouse model. *EbioMedicine*. 2019; **41**: 584-596.
7. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 2005; **174**(10): 6477-6489.
8. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002; **100**(9): 3175- 3182.
9. Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, et al. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG Mice). *int. Immunol*. 2009; **21**(7): 843-858.
10. Suzuki M, Takahashi T, Katano I, et al. Induction of Human Humoral Immune Responses in a Novel HLA-DR-expressing Transgenic NOD/Shi-scid/ycnull Mouse. *int. Immunol*. 2012; **24**(4): 243-252.

11. M.A.King, L.Covassin, M.A.Brehm, et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol.* 2009; **157**: 104-118.
12. Kanda Y, Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013; **48**(3): 452-458.
13. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood.* 1995; **86**(1): 45-53.
14. Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, et al. BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood.* 1995; **86**(1): 28-37.
15. Kamperdijk E.W.A., Raaymakers E.M., de Leeuw J.H.S., et al. Lymph node macrophages and reticulum cells in the immune response.
  1. The primary response to paratyphoid vaccine. *Cell Tiss. Res.* 1978; **192**: 1-23.

16. Kamperdijk E.W.A., de Leeuw J.H.S., Hoefsmit E.C.M. Lymph node macrophages and reticulum cells in the immune response. The secondary response to paratyphoid vaccine. *Cell Tiss. Res.* 1982; **227**: 277-290.
17. Smith JP, Burton GF, Tew JG, et al. Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. *Dev. Immunol.* 1998; **6**(3-4): 285–294.
18. Kalwak K, Gorczynska E, Toporski J, et al. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *Br J Haematol.* 2002; **118**: 74–89.
19. D'Sa S, Peggs K, Pizzey A, et al. T- and B-cell immune reconstitution and clinical outcome in patients with multiple myeloma receiving T-cell-depleted, reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation with an alemtuzumab-containing conditioning regimen followed by escalated donor lymphocyte infusions. *Br J Haematol.* 2003; **123**: 309-322.

20. Peggs KS. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2004; **45**: 1093-1101.
21. Fukatsu Y, Nagata Y, Adachi M, et al. Serum IgM levels independently predict immune response to influenza vaccine in long-term survivors vaccinated at >1 year after undergoing allogeneic hematopoietic stem cell. *Int J Hematol*. 2017; **105**: 638–645.