

一文看懂什么是免疫系统人源化小鼠

免疫系统人源化小鼠模型是通过将人的造血细胞、淋巴细胞或组织植入免疫缺陷小鼠体内，从而使其重建人类免疫系统的小鼠模型。它们可有效地重建人类免疫系统，更好地模拟人体免疫特征。

PART1 什么是免疫系统人源化小鼠模型

免疫系统人源化小鼠模型是通过将人的造血细胞、淋巴细胞或组织植入免疫缺陷小鼠体内，从而使其重建人类免疫系统的小鼠模型。它们可有效地重建人类免疫系统，更好地模拟人体免疫特征。

为什么需要免疫系统人源化小鼠

近交系小鼠由于其具有遗传背景一致、繁殖周期短并且基因修饰操作手段成熟等优势，已成为免疫学研究的重要动物模型。但是，毕竟啮齿动物和人类之间存在巨大的种属差异，人类病原体或针对人类细胞开发的药物也具有种属特异性，在免疫健全的小鼠模型中无法很好的模拟疾病的发生发展。野生型小鼠的免疫系统对于来源于人的异种细胞和组织具有很强的排斥作用。而依赖于免疫缺陷小鼠的人肿瘤移植模型虽然已被广泛使用在肿瘤免疫及新疗法研发中，但由于缺乏人类免疫系统及肿瘤免疫微环境，很大程度上限制了免疫机制及免疫治疗的转化研究。因此，如何利用动物模型模拟人体肿瘤细胞与免疫系统之间的相互作用，也成为肿瘤免疫研究中至关重要的一环。

免疫系统人源化小鼠模型具有人类免疫系统、能够模仿人体免疫机能和病理表现的人源化小鼠模型对于研究人类疾病和新型疗法的开发具有重要意义。

免疫系统人源化小鼠的宿主

应该说，免疫系统人源化小鼠模型建立的前提是免疫缺陷小鼠的构建和不断优化发展。因为只有首先破坏受体的自身免疫系统，移植到其体内的人源组织或者细胞才能重建出具有功能的人源免疫系统

从最早的裸鼠（nude），到后来的SCID小鼠和Rag-/-小鼠，再到NOD-scid小鼠，这些早期的免疫缺陷小鼠或由于固有免疫的存在导致人源细胞的植入成功率低，或由于对辐照高度敏感以及有限的生命周期，均不同程度地限制了免疫系统人源化小鼠在实际研究中的应用。

免疫缺陷小鼠的发展在2000年后迎来了里程碑式的突破。人们发现，干扰白细胞介素2（IL-2）受体γ链(IL-2Rγc)的缺失不仅会导致小鼠T、B细胞发生严重缺陷，而且会干扰NK细胞的发育，从而能够进一步改善人源细胞在小鼠体内的移植效果。在此基础上，多种更为先进的重症免疫缺陷小鼠被世界各地的研究人员繁育出来，成为目前被广泛应用的免疫系统人源化小鼠模型宿主。包括：BALB/c-Rag2-/-γc-/- (BRG)、NOD/shi-SCID γc-/- (NOG) 以及 NOD/SCID-γc-/- (NSG)等等。

品系	适应性免疫	固有免疫	特点
SCID	T、B细胞缺失	正常	人源细胞植入效率低；免疫渗漏；对辐射敏感
Rag1 ^{-/-} 或Rag2 ^{-/-}	T、B细胞缺失	正常	人源细胞植入效率低；无免疫渗漏及辐射敏感
NOD-scid	T、B细胞缺失	NK细胞活性降低，巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率较高；对辐射敏感；自发胸腺瘤，生存期短
NOG	T、B细胞缺失	NK细胞无活性，巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率很高，造血多系重建；对辐射敏感；生存期长
BRG	T、B细胞缺失	NK细胞无活性	人源细胞植入效率高，略低于NOG/NSG，造血多系重建；对辐射不敏感
NSG	T、B细胞缺失	NK细胞缺失，巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率很高，造血多系重建；对辐射敏感；生存期长

注：SCID：重度联合免疫缺陷综合征；NOD：非肥胖糖尿病

表1. 人源化小鼠模型的宿主及其特点（表格来自Ref.6）

建立免疫系统人源化小鼠模型的方法

依据人免疫系统重建的方法，可以将免疫系统人源化小鼠模型分为三大类：

- Hu-PBMC (也叫 Hu-PBL) 小鼠模型 (humanized-peripheral blood mononuclear cells)
- Hu-HSC 小鼠模型 (humanized-hematopoietic stem cells)
- Hu-BLT 小鼠模型 (humanized-bone marrow, liver, thymus)

1) Hu-PBMC 小鼠模型

外周血单核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 即外周血中具有单个核的细胞，主要由淋巴细胞 (T或B细胞)、单核细胞、吞噬细胞、树突状细胞和其他少量细胞类型组成，是机体免疫应答功能的重要细胞组成。

Hu-PBMC 模型，或者被称为 Hu-PBL (perihperal blood lymphocyte, PBL) 模型，是一种构建较为简单和经济的免疫系统人源化小鼠模型。其构建方式是将成熟淋巴细胞 (来自PBMC) 经腹腔 (i.p.) 或静脉 (i.v.) 注射到免疫缺陷宿主小鼠中，该模型常被用于研究人效应T细胞的活化以及评估免疫抑制药物。

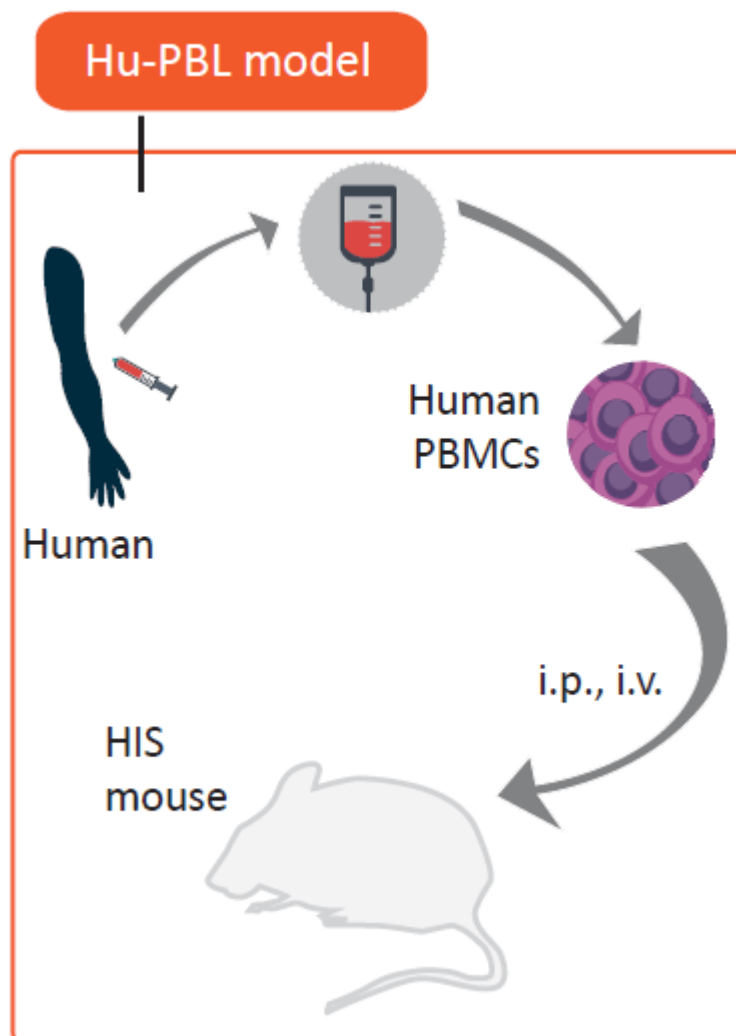


图1. Hu-PBMC模型的构建示意图。（图片来自Ref.2）

Hu-PBMC 模型的准备期较短。在移植PBMC后，最快一周就可以检测到人CD3+ T细胞；大约2周左右，免疫细胞就会快速重建；大约4周左右，小鼠外周血中可检测到约50%的人CD45+细胞，其中约90%为CD3+ T细胞，CD4+:CD8+ T细胞比率约为1:1。但是，Hu-PBMC模型会发生致死性的移植物抗宿主病（GvHD），程度与人T细胞的植入直接相关，可以通过小鼠体重的减轻来评估。一般移植后2-3周就会出现GvHD，因此实验观察窗较短。

□

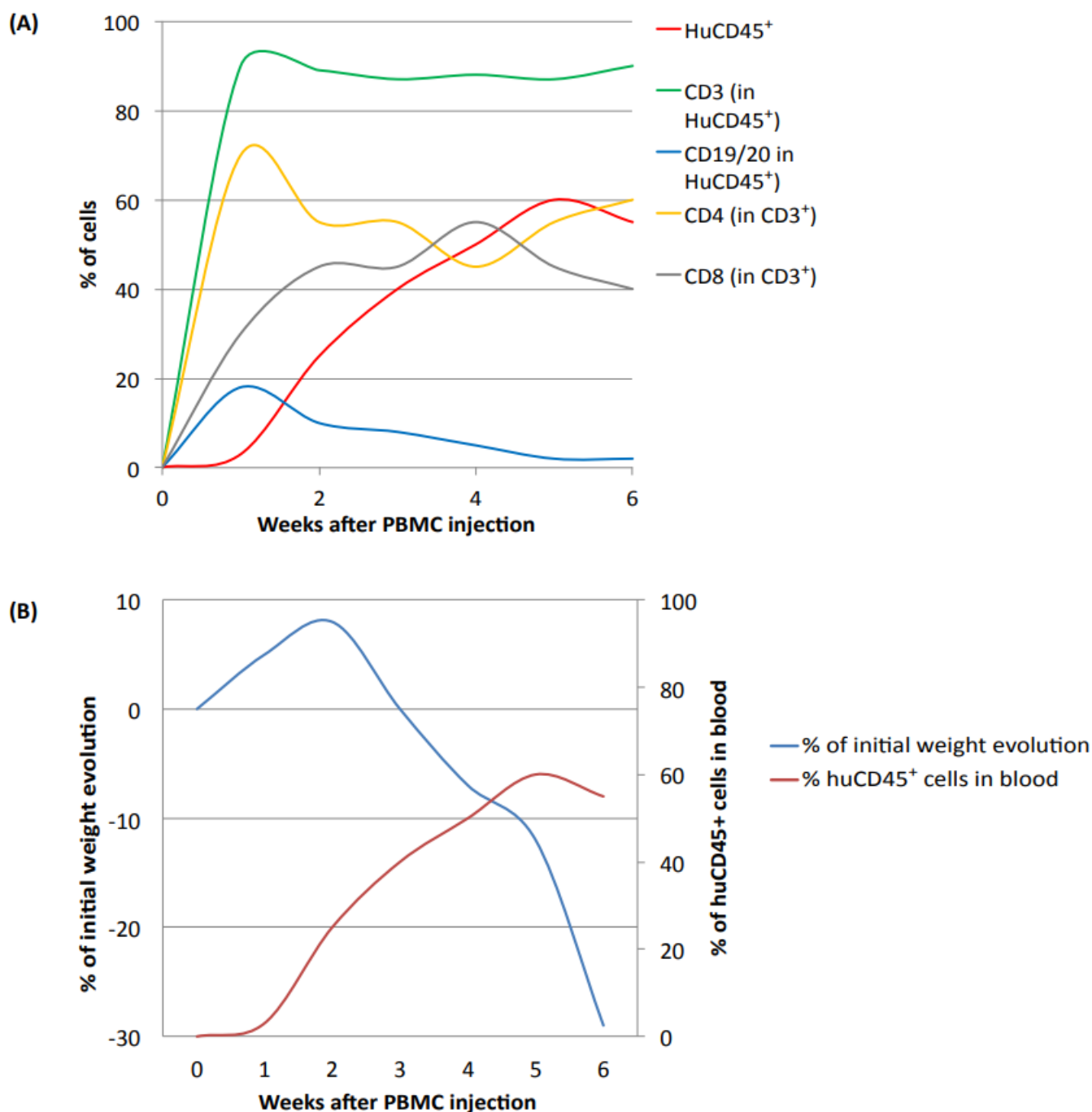


图2. Hu-PBMC免疫系统人源化小鼠的免疫重建情况与GvHD发展。(A) 人源化小鼠中静脉注射 (i.v.) 人外周血单核细胞 (PBMC) 后的重建。(B) 人源化小鼠中注射PBMC后的造血重建和GvHD发展。PBMC注射后2至4周, 血液中人CD45⁺细胞增加, 同时小鼠发生GvHD, 体重快速严重减轻。(Ref.2)

2) Hu-HSC 小鼠模型

另一类方法则是将人CD34⁺ HSCs注射到免疫缺陷宿主小鼠中, 该方法需要首先对宿主小鼠进行亚致死剂量的辐照以消除小鼠HSC并促进人HSC的移植。此类模型也叫 hu-CD34⁺, 或叫 hu-SRC (scid-repopulating cell) 模型, 已经被广泛应用于研究人类造血发育、细胞介导的免疫反应以及HIV和EBV等病毒感染性疾病中。

造血干细胞 (Hematopoietic stem cell, HSC) 是人体造血组织中能自我更新, 又能分化产生各系血细胞的一类细胞。CD34抗原是人们普遍认同的造血干/祖细胞的代表性表面标志, 它是一个高度糖基化的I型跨膜糖

蛋白, 具有调节细胞粘附性的作用, 能促进细胞对骨髓基质的粘附。

通过静脉内 (i.v.) 或股骨内 (i.f.) 将来自人脐带血、骨髓、G-CSF激活的外周血或胎肝的人CD34⁺ HSCs注射到成年免疫缺陷小鼠中, 可以产生多种造血干细胞, 但T细胞产生量少, 不具备功能性免疫细胞。或通过静脉注射 (心内或肝内) 将人CD34⁺ HSCs移植到新生受体小鼠中 (小于4周龄), 得到良好的人细胞移植, 并且产生T细胞、B细胞、巨噬细胞、NK细胞和DC细胞。胚胎肝脏和脐带血是最常用的人CD34⁺ HSCs来源, 其较成年人HSCs更易定植于免疫缺陷小鼠。

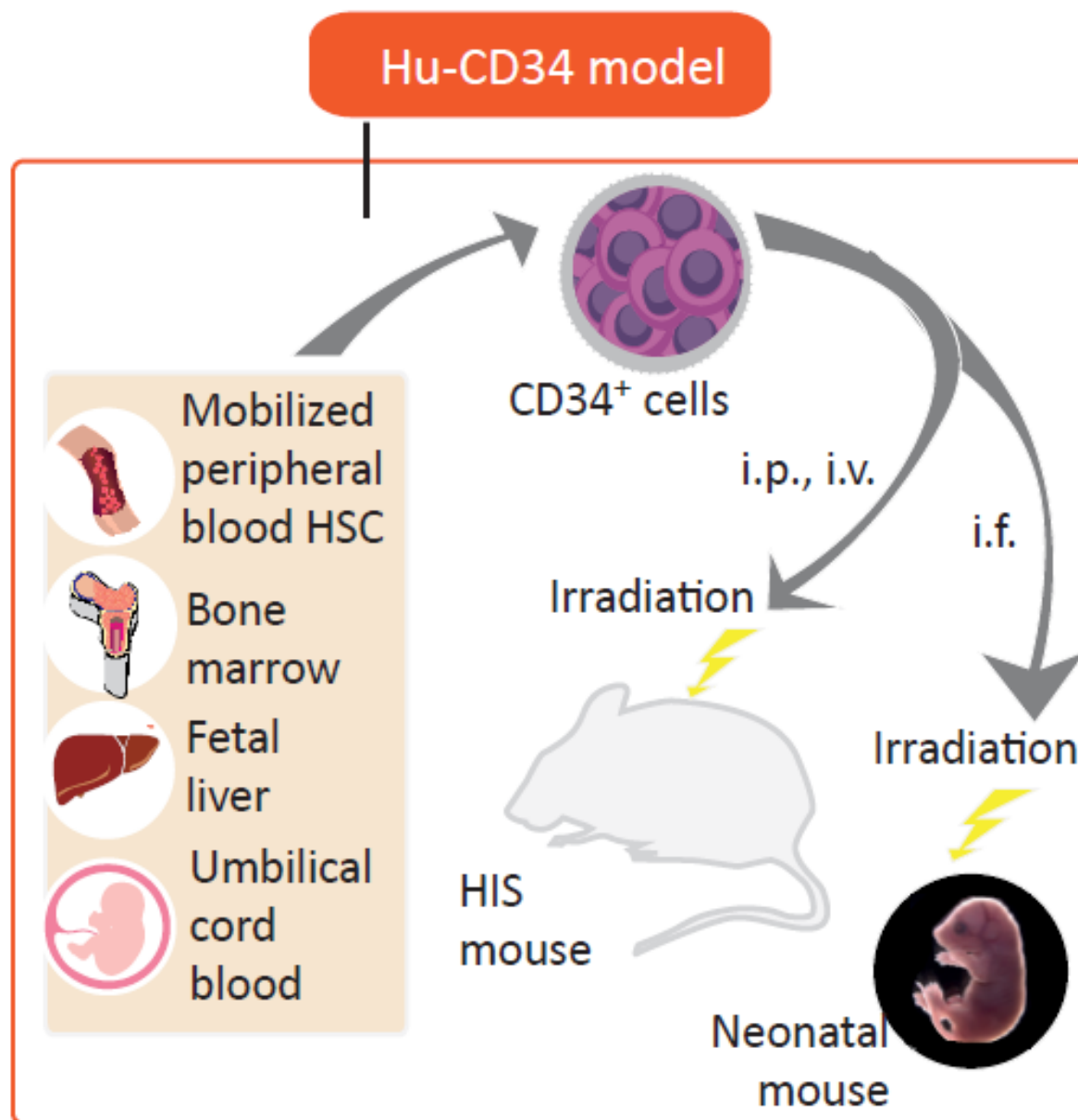


图3. Hu-HSC模型构建示意图。(图片来自Ref.2)

目前认为Hu-HSC模型是最适于研究免疫治疗的动物模型之一, 其能建立人的固有免疫系统和淋巴细胞, 通常不发生或轻微发生GvHD, 可用于长期研究。不过也存在一定的局限性, 例如, 人T细胞在小鼠的胸腺内发育成熟, 小鼠的主要组织相容性复合体 (MHC) 称为H2复合体, 因此T细胞是小鼠H2限制性, 而不表达人类白细胞抗原 (HLA)。另外, 由于人和小鼠之间的种属差异, 小鼠体内缺乏人的细胞因子, 人类干细胞在小鼠体内发育受限。

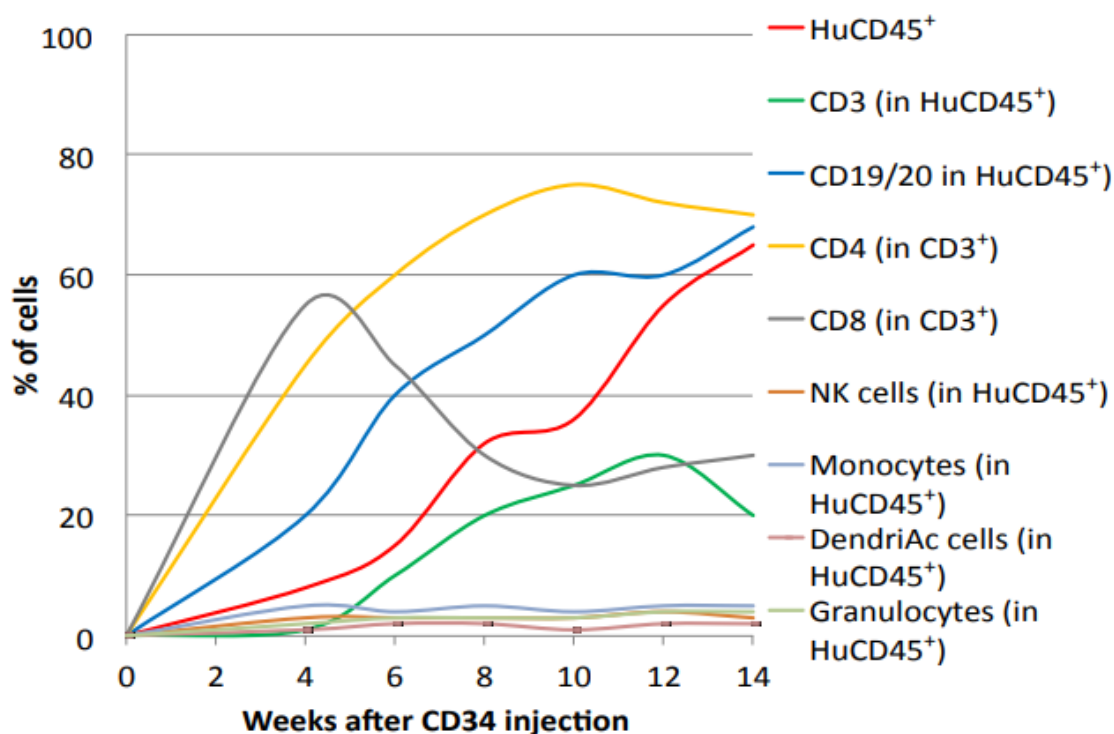


图4. HuCD34⁺ HSCs免疫系统人源化小鼠的免疫重建情况。（图片来自Ref.2）

3) Hu- BLT 小鼠模型

该模型是将免疫缺陷小鼠经亚致死剂量辐照处理后，将人胎肝和胸腺组织移植到成年免疫缺陷受体小鼠肾包膜下，同时将来自同一个体的胎肝或骨髓来源 CD34⁺ HSCs 通过静脉注射（i.v.）给受体小鼠。

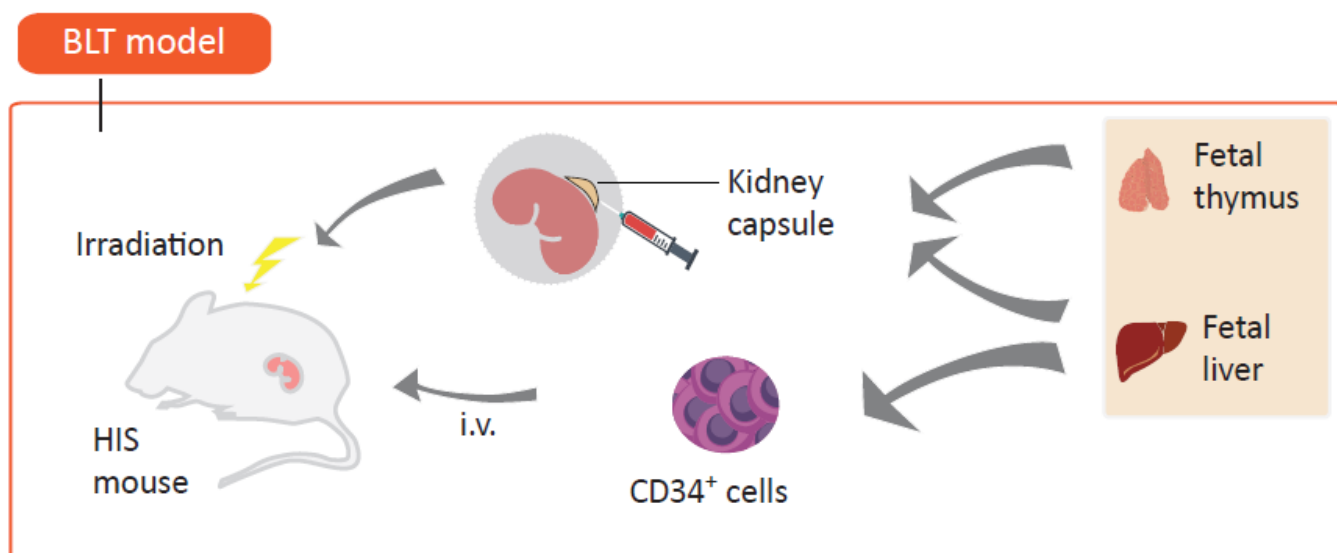


图5. Hu- BLT模型构建示意图。（图片来自Ref.2）

移植的人胎肝和胸腺提供了人胸腺微环境，以支持人T细胞的发育分化，包含多种多样的HLA限制T细胞，可以建立有效的适应性免疫反应。因此，BLT 模型多用于适应性免疫反应的研究，如HIV感染。然而，BLT 模型的GvHD的发生率高于其他CD34⁺ HSC移植模型，也限制了该类模型的研究窗口。另外，由于操作上很难实现同一供者的肿瘤细胞和免疫系统相匹配，且Hu-BLT 模型建立过程中需要复杂精细的手术操作，也限制了Hu-BLT模型在肿瘤免疫药物研发中的应用。

小结

我们可以用以下两张表格来大致归纳上述3种免疫系统人源化小鼠模型。

表2. 3种免疫系统人源化小鼠模型的优缺点比较

模型	优点	缺点
Hu-PBMC	构建方法简单 T细胞移植效率高、稳定	因发生GVHD，导致生存期短，研究时间受限。 可通过B2M基因敲除减少GVHD，延长生存期。
Hu-HSC	多系造血细胞发育，包括T细胞、B细胞、NK细胞、髓系细胞	T细胞受小鼠胸腺教育，T淋巴细胞少且无功能，非HLA限制性。
Hu-BLT	具有完整免疫系统 T细胞可在人胸腺上皮内发育成熟	供体来源受限，模型构建复杂。 GVHD发生率较Hu-HSC高。

表3. Hu-PBMC 模型 vs Hu-HSC 模型

特点	Hu-PBMC 模型	Hu-HSC 模型
人免疫细胞来源	外周血单核细胞	人脐带血、骨髓、G-CSF激活的外周血或胎肝
注射方式	i.p. 或 i.v.	i.v. 或 股骨内（成年受体） 心内或肝内（新生受体）
宿主辐照骨髓	不必要	亚致死剂量辐照
免疫细胞重建	人活化的成熟T细胞（HLA限制CD4+和CD8+）和NK细胞 B细胞和髓系细胞重建效率差	多系造血祖细胞，包括T细胞、B细胞、髓系细胞、NK细胞 T细胞受小鼠胸腺教育，缺乏人HLA限制性
免疫重建时间	快速，时间短（约移植后2周）	重建较慢，时间长（大约需要12-16周）
移植成功标志	外周血FACS检测hCD45+细胞百分比达20-30%	外周血FACS检测hCD45+细胞百分比超过25%
移植成功率	高（约95%）	较低（约85%-95%）
GvHD	严重（约移植后4-6周）	huCD34（huSRC）模型不发生 BLT 模型约在移植后2个月发生
实验观察窗口	短	长（可超过12个月）
建立成本	低	高

PART2 免疫系统人源化小鼠在人类疾病与生理研究中的应用

移植相关研究

深入了解同种异体移植排斥的机制对于开发新的免疫疗法以改善器官移植的长期效果至关重要。但由于小鼠和人类免疫反应之间存在许多物种特异性差异，导致在动物模型中成功的疗法在临床转化中遇到许多困难。而免疫系统人源化小鼠成为了研究同种异体移植排斥的机制、分子途径研究以及潜在疗法评估的重要模型。

移植物抗宿主病 GVHD

早前在免疫缺陷小鼠中对人CD4+ Treg进行的体内研究表明，人CD4+ Treg可预防人皮肤异体移植的排斥反应和移植动脉粥样硬化的发展。但由于免疫缺陷小鼠没有稳定的人类免疫系统，因此尚不清楚这些结果与人类疾病的相关性。基于Hu-PBMC模型建立的急性人类同种异体GVHD模型可用于研究了CD8hi Tregs在体内预防GVHD的治疗潜力。研究表明，人类CD8hi Tregs可以通过减少异体反应性T细胞增殖、以及CTLA-4依赖性靶器官内炎症性细胞因子的分泌，减轻急性GVHD反应。且这些CD8hi Tregs可以有效诱导长期耐受，

而不会损害Hu-PBMC小鼠的一般免疫力和移植物抗肿瘤（GVT）活性。

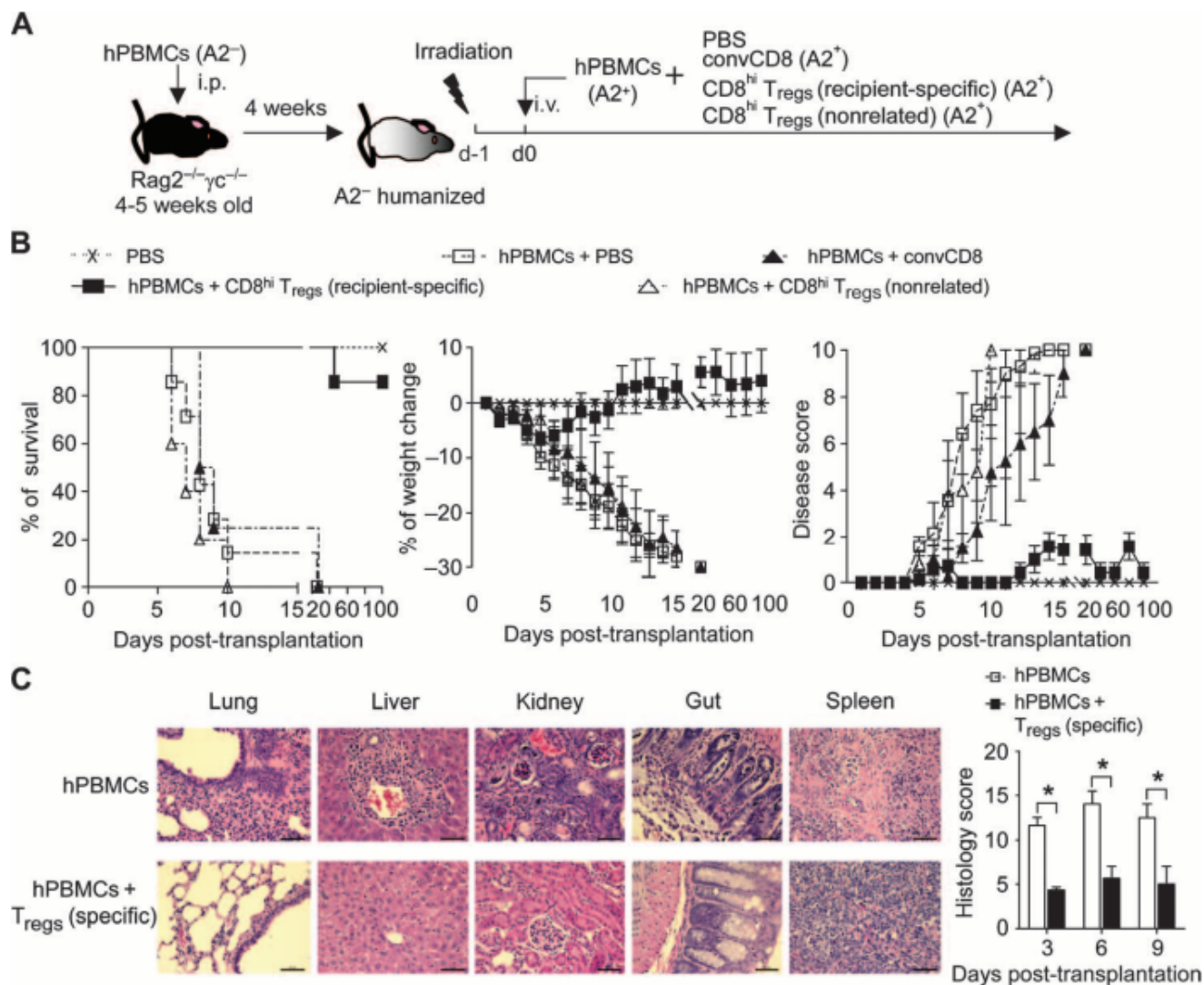


图6. CD8^{hi} Tregs inhibit human allogeneic acute GVHD in an allospecific manner in vivo. (Ref.20)

皮肤移植

在NSG小鼠中进行人皮肤移植，发现小鼠抗粒细胞受体1抗体（anti-Gr1）治疗可以减少Gr1⁺细胞浸润，保留移植内皮，并促进伤口愈合，具有良好的血管生成与血管形态，改善组织发育和移植重构。但在CD4⁺或CD8⁺同种异体人PBMC注射后，已愈合的人类皮肤移植植物在21天内被排斥，这为研究人类T细胞介导的皮肤同种异体排斥提供了可靠且可复制的模型。

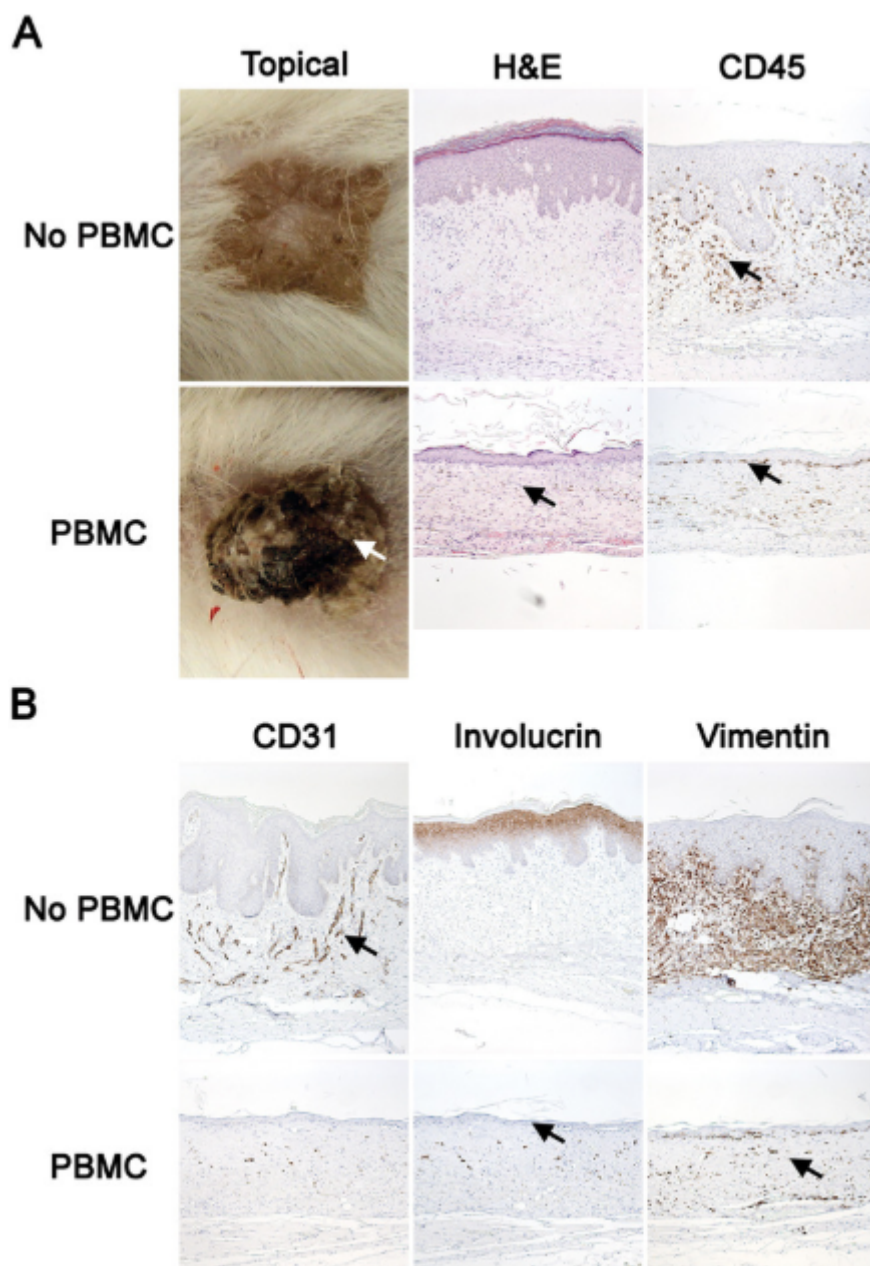


图7. Rejected Human Skin Allografts Anti-Gr1 mAb-treated NSG mice bearing human skin grafts for ~30 days were left untreated (top rows) or injected intravenously with 20×10^6 allogeneic human PBMC (bottom rows) and tissues were recovered from both groups 31 days later. (Ref.21)

胰岛移植

Hu-PBMC模型已被用于研究胰岛排斥反应，但是在胰岛排斥反应和GVHD发生之间存在“竞争”，难以长期监测治疗效果。同种异体PBMC与胰岛移植同时注射到NSG小鼠中可导致100%的小鼠在21天之内迅速发生移植物排斥反应并恢复高血糖。而在同种异体PBMC注射前37天，在糖尿病NSG小鼠中建立胰岛移植，由于GVHD的发展，在研究终止之前，三分之二的小鼠恢复了高血糖。

Hu-HSC模型可建立更完整的免疫系统，但不同免疫缺陷小鼠受体的选择可能会影响移植的结果。移植同种异体人类胰岛后，植入HSC的高血糖BRG小鼠不排斥人胰岛，且极少T细胞渗入移植物。而NSG-HSC小鼠中移植物排斥率约为60%，且移植物中单核细胞浸润严重。此外，研究还发现植入的人HSC数量差异也会导致免疫系统人源化小鼠胰岛移植模型中人免疫功能的差异，见下图。

Recipient Strain	Engraftment protocol	HSC source and number injected	Time after engraftment islets transplanted	Graft outcome
BALB/c- <i>Raa2</i> ^{nufl} <i>IL2ra</i> ^{nufl} (BRG) ¹	Pregnant BRG mice injected with 0.5 mg Busulfan 2–7 days prior to delivery, BRG newborns irradiated with 550 cGy	1×10 ⁵ CD34 ⁺ umbilical cord blood cells injected intrahepatically	300–500 human islets transplanted subrenal capsule 8–26 weeks post CD34 HSC engraftment into normoglycemic BRG mice	Human CD45 engraftment levels of 22.0 ± 16.6% in the blood, grafts analyzed histologically day 14 or 35 after transplantation. No evidence of rejection determined by no loss of insulin staining and little CD3 or CD20 infiltration observed in the graft or loss of Human C-peptide in the serum
NOD.Cg- <i>Raa1</i> ^{tm1Mom} <i>IL2ra</i> ^{tm1Wjl} <i>Ins2</i> ^{Akita} (NRG-Akita)	1–3 day old NRG-Akita mice irradiated with 400 cGy	5×10 ⁴ CD34 ⁺ umbilical cord blood cells	4000 human islets transplanted subrenal capsule into diabetic NRG-Akita mice	NSG mice with 12.9 ± 2.5% human CD45 ⁺ blood cells used in experiment. 8/13 (62%) islet grafts rejected as defined by a return to hyperglycemia and loss of insulin staining in graft. CD45 infiltration observed even in non-rejected grafts
NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>IL2ra</i> ^{tm1Wjl} (NSG)	4–6 week old NSG irradiated with 240 cGy	20×10 ⁴ CD34 ⁺ umbilical cord blood cells	3000–4000 human islets transplanted subrenal capsule into diabetic NSG mice, mice treated with streptozotocin to induce diabetes (timing not reported in relation to HSC engraftment or islet transplantation)	NSG mice with >15% human CD45 ⁺ blood cells used in experiment. 21/21 (100%) rejected islet grafts as defined by return to hyperglycemia and loss of insulin staining in graft. Infiltration of graft with macrophages (CD11b), neutrophils (CD66b) and CD4 T cells, but few to no CD8 T cells

图8. Recipient strain and engraftment protocols affect islet allograft survival in humanized mice. (Ref.17)

传染性疾病

免疫系统人源化小鼠在研究人类病原体中具有广泛应用，包括病毒（HIV、爱泼斯坦巴尔病毒、巨细胞病毒和登革热），细菌（肠炎沙门氏菌血清型伤寒、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌等）和寄生虫（恶性疟原虫、大利什曼原虫）感染。

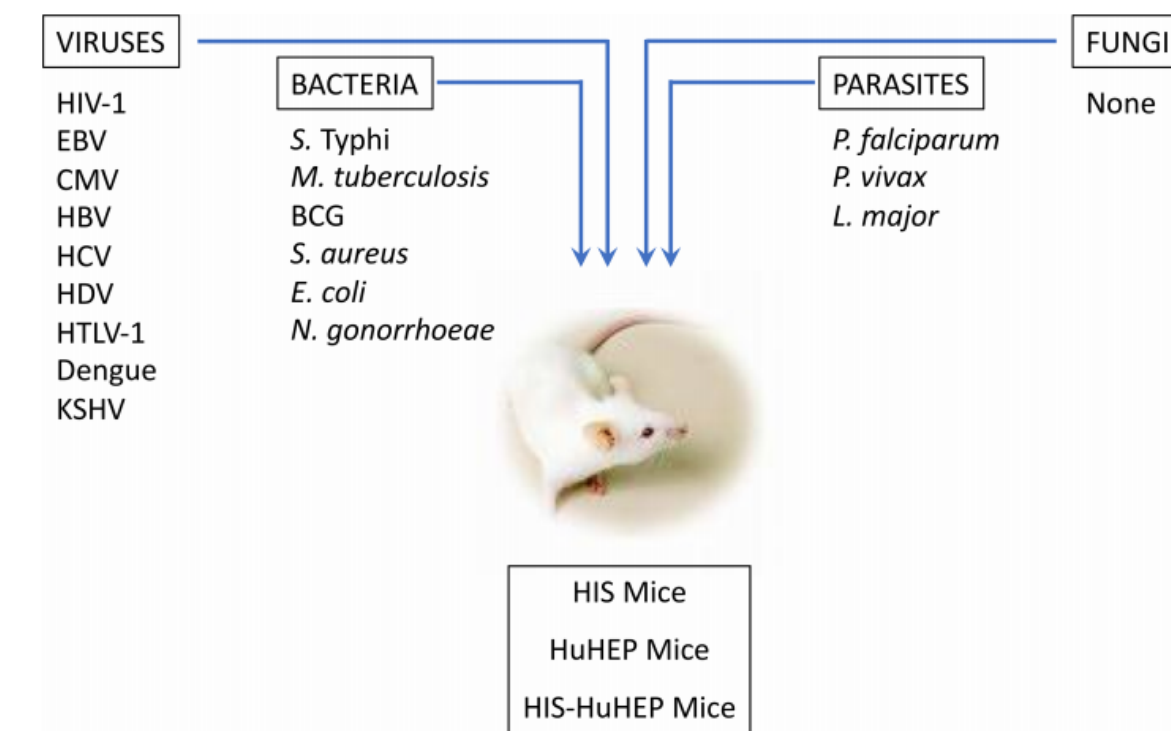


图9. 免疫系统人源化小鼠在研究人类病原体中的应用 (Ref.10)

EBV

爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 是世界上最普遍的人类病原体之一，持续感染90%以上的成年人口。由于EBV对人类细胞具有种属特异性，因此过去对该病毒的研究仅限于体外系统。但随着免疫系统人源化小鼠的产生，使对于EBV的研究得以在体内展开。

将HLA-A2 + CD34 +造血祖细胞注射到NSG小鼠中重建人源免疫系统，如下图所示。在这些Hu-HSC模型中获得平均65%的CD45 +重组，约40%的CD3 + T细胞，约55%的CD19 + B细胞，以及约3%的NKp46 + NK细胞。其中T细胞大约由25%的CD8 + T细胞和75%的CD4 + T细胞组成。再用EBV感染免疫系统人源化小鼠，并对其进行为期5周的追踪。研究结果发现，即使CD8+ T细胞在原发性EBV感染过程中表达包括PD-1在内的多种抑制性受体，但它们仍保留了产生细胞因子、杀死被感染细胞和增殖的能力。而用抗体阻断PD-1并不能改善HIS小鼠的EBV特异性免疫控制，反而会增加病毒相关的淋巴瘤形成，表明PD-1轴对于病毒控制很重要。这些发现与先前的研究相反。可见，基于免疫系统人源化小鼠模型的研究为理解EBV感染的免疫控制与协同抑制途径提供了新的证据。

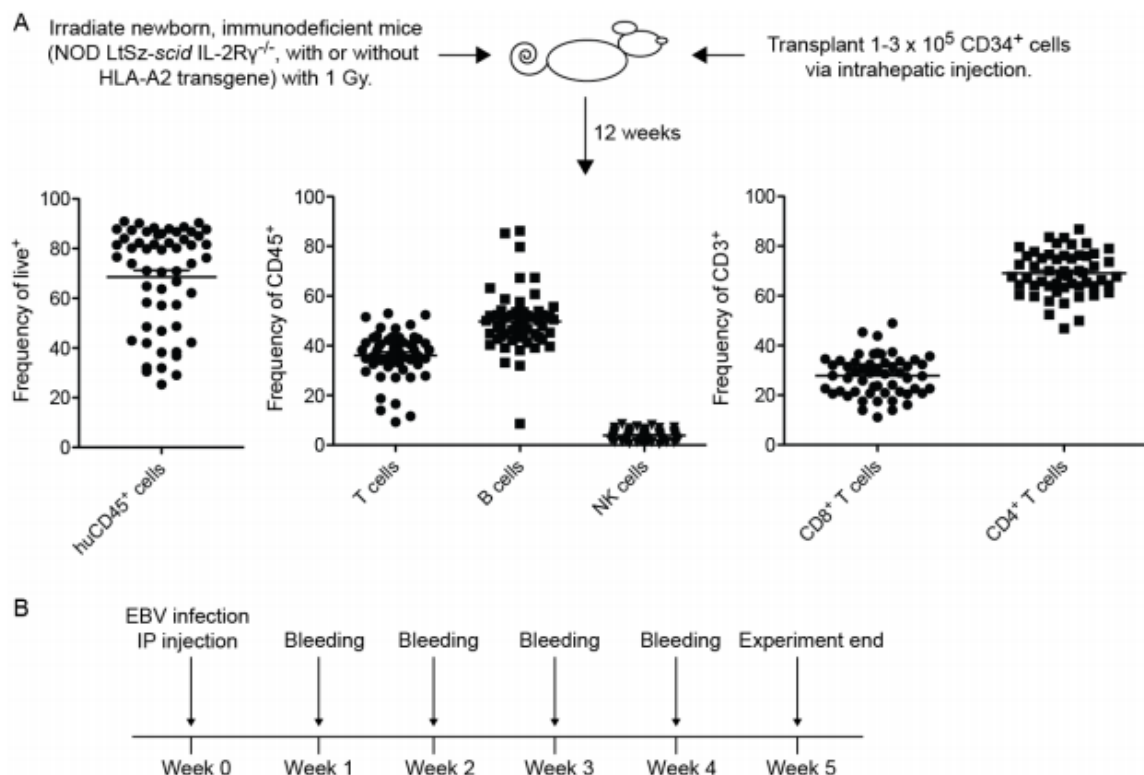


图10. 将HLA-A2 + CD34 +造血祖细胞注射到NSG小鼠中重建人源免疫系统 (Ref.11)

HIV

免疫系统人源化小鼠不仅增进了我们对HIV传播、潜伏期和发病机理的了解，而且为抗病毒研究提供了前所未有的平台。

利用免疫系统人源化小鼠模型，研究者得以进一步探索有效的病毒特异性抗体和常规抗逆转录病毒疗法。基于Hu-HSC小鼠模型的研究表明，靶向CCR5的抑制性药物Maraviroc可预防HIV的传播。同时，还研究了HIV特异性CD8⁺ T细胞和浆细胞样DC (pDC) 在病毒复制和免疫应答激活中的关键作用，以及它们在靶向治疗中的潜力。

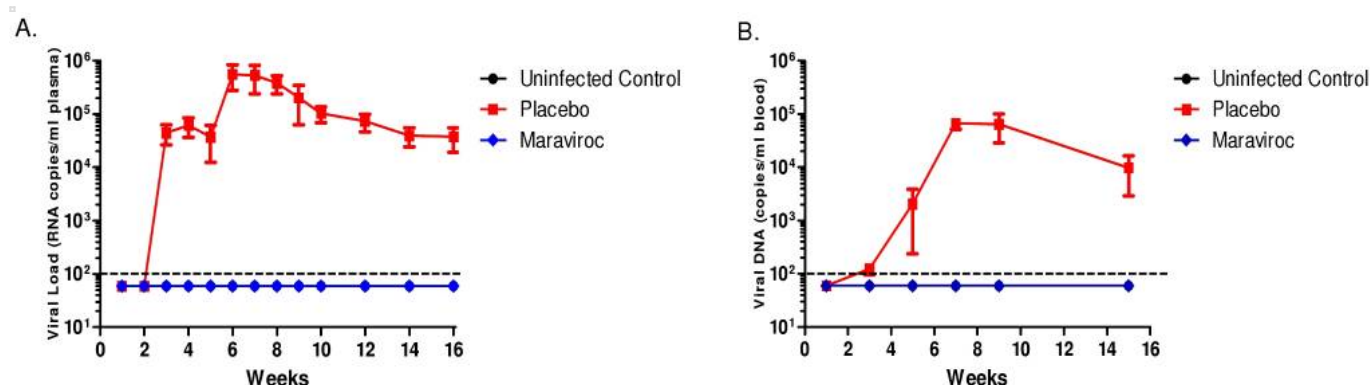


图11. 靶向CCR5的抑制性药物Maraviroc对HIV的预防效果 (Ref.14)

在针对I型干扰素的抗病毒研究中，在Hu-HSC小鼠中用单克隆抗体阻断IFN α/β 受体（IFNAR）信号传导，从而减少了抗逆转录病毒治疗过程中的免疫过度活化并改善了HIV特异性T细胞免疫反应。阻断I型干扰素还减少了淋巴组织中的持久性HIV病毒库，延迟了抗逆转录病毒疗法停止后病毒的反弹。可见，免疫系统人源化小鼠模型使研究人员可以直接在体内比较不同的抗逆转录病毒药物及其抑制HIV复制或阻止传播的能力，以及耐药性发展、相关的副作用和毒性。特别是在Hu-HSC和BLT小鼠体内产生的人类免疫细胞可以更完全地重建阴道和直肠黏膜，这使研究人员能够比以前更准确地模拟人源化小鼠中HIV的黏膜传播。

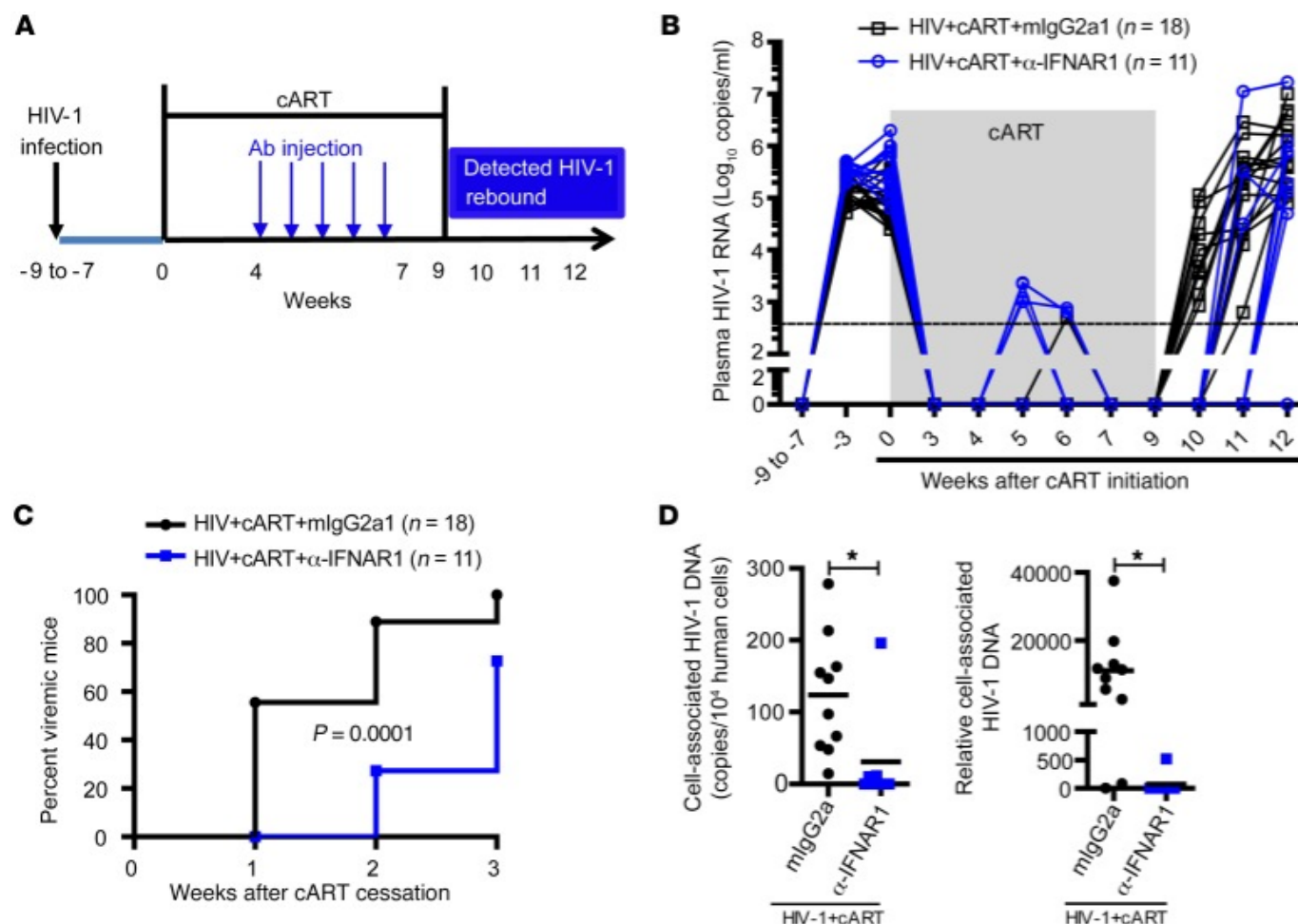


图12. IFNAR blockade during cART delays HIV-1 rebound after cART cessation. (Ref. 18)

在HIV抗体疗法研究中，针对HIV的强粘膜抗体是预防性疫苗研究的主要目标。免疫系统人源化小鼠对抗HIV的广泛中和抗体（bNAbs）研发也具有重要意义。近年来，优化的HIV双特异性抗体（biNAbs）通过改造后的IgG3铰链结构增加Fab灵活性，合并来自两个亲本中和抗体的Fab片段，实现了更高效的病毒靶向。若biNAbs具有与HIV包膜糖蛋白（Env）中两个不同表位的Fab片段，可表现出协同活性，具有中和不同HIV分离物的广泛能力和高效性。利用HIV感染的Hu-HSC小鼠模型评估该双特异性抗体的体内活性，并证明该抗体比亲本抗体混合物更有效地降低了病毒载量。若biNAbs具有靶向人CD4或人CCR5受体的Fab片段和另一个靶向HIV Env的Fab片段，可使抗体集中在病毒进入的确切位置，从而增强通过抗HIV Env臂介导的病毒中和作用。这些CD4-Env或CCR5-Env双特异性抗体能更有效地抑制感染的Hu-HSC小鼠中的HIV病毒载量。并且，若在HIV感染前使用，具有预防感染HIV的效果。

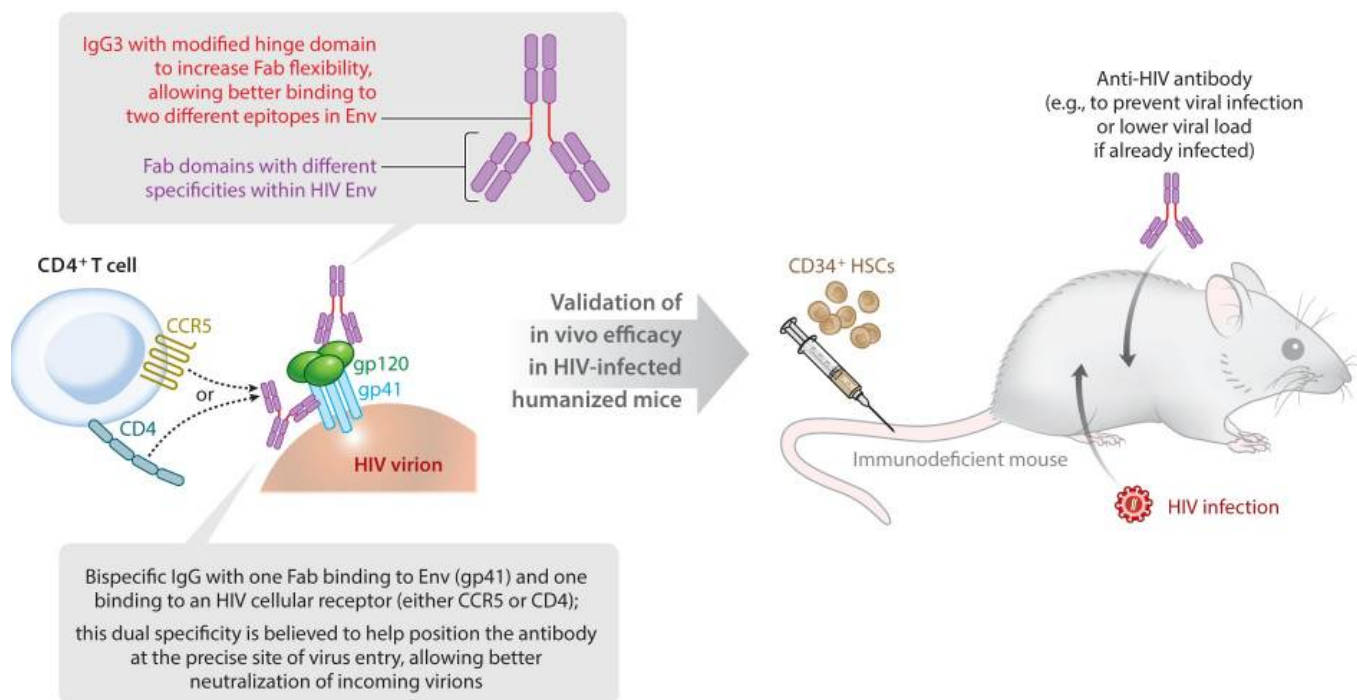


图13. Testing bispecific antibodies in humanized mice. (Ref.12)

肿瘤免疫研究

与人类肿瘤共移植的免疫系统人源化小鼠模型是研发肿瘤免疫疗法新策略的有效工具。在免疫系统人源化小鼠的基础上植入人的肿瘤细胞（CDX）或肿瘤组织（PDX），能够更好地模拟人体内的肿瘤微环境，用于研究人类免疫系统环境下肿瘤的生长情况、评估抗肿瘤治疗，尤其是免疫治疗效果及相关作用机制。

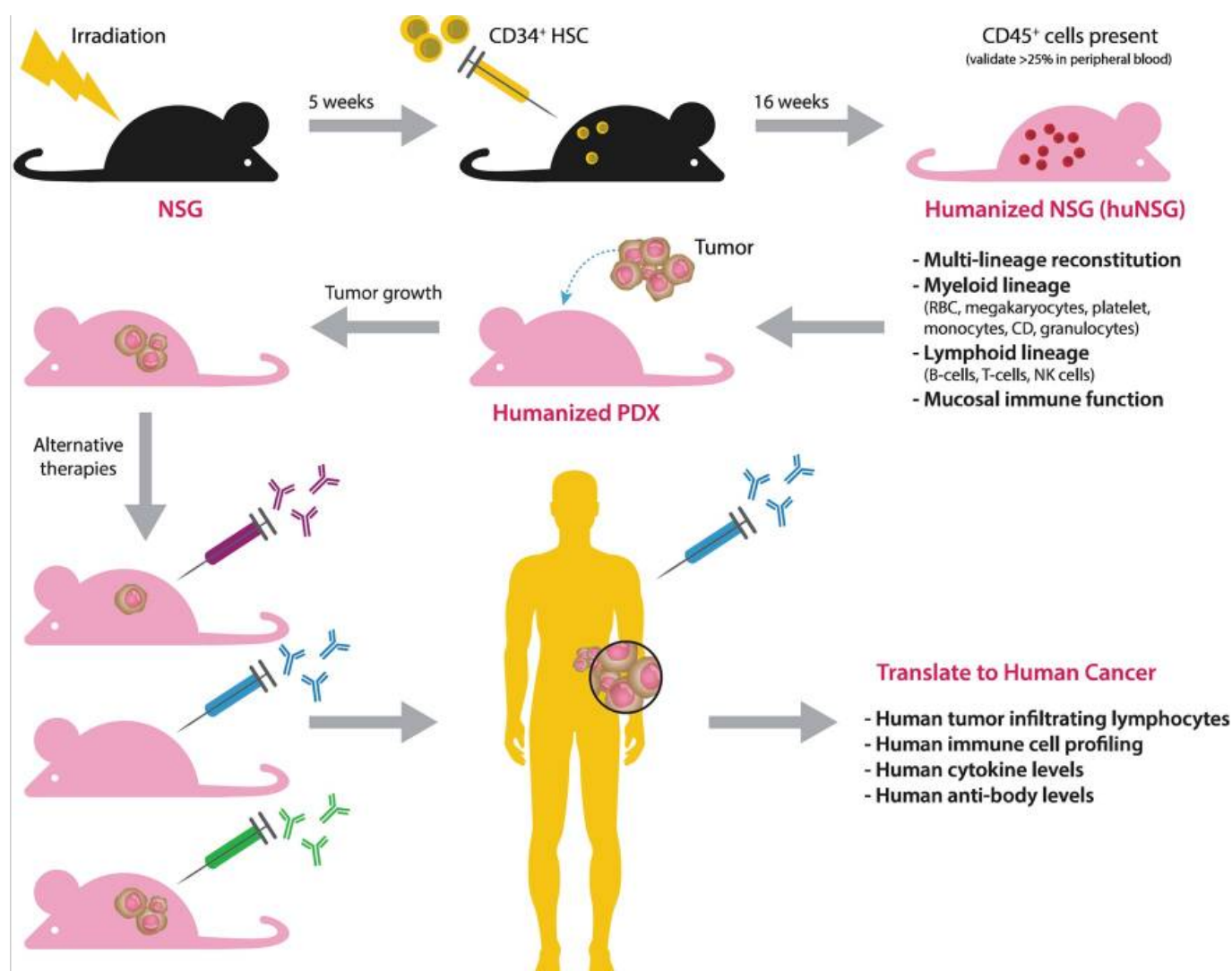


图14. 基于免疫系统人源化小鼠（Hu-HSC）的PDX模型。全身 γ 射线辐照NSG小鼠后，在第5周将人CD34 + 造血干细胞（HSC）注射到NSG小鼠中。通过流式细胞仪检测小鼠外周血中分化的人CD45 + 细胞百分比，监测人HSCs的植入情况。然后将患者的肿瘤组织移植到免疫系统人源化小鼠中，并用于研究多种疗法的功效。（Ref.22）

在Hu-PBMC 模型和 Hu-HSC模型上进行肿瘤细胞或组织接种，建立荷瘤人源化小鼠模型，可以用于以下几方面的肿瘤免疫治疗研究：

评估基于细胞的免疫疗法

免疫系统人源化小鼠模型为评估过继细胞疗效提供了有力工具。利用Hu-PBMC模型的研究提示了，靶向间皮素的CAR-T疗法对恶性间皮瘤具有显著抗肿瘤作用。这为后来首个获FDA批准的用于治疗B细胞急性淋巴细胞白血病的CAR-T疗法的诞生提供了有力支持。在Hu-PBMC卵巢癌 PDX 模型中，CD27能够共刺激 CAR-T 细胞，从而获得更高的持久性和抗肿瘤活性。

此外，在NK细胞过继性免疫疗法的研究中，免疫系统人源化小鼠也已被应用到包括胶质母细胞瘤、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌等在内的肿瘤中。

评估免疫检查点抑制剂的治疗效果

越来越多的研究表明，免疫系统人源化小鼠模型在免疫检查点抑制剂研究中具有独特优势。例如：在Hu-PBMC小鼠中接种KHOS细胞，建立免疫系统人源化骨肉瘤小鼠模型。并利用该模型证明PD-1抑制剂可有效抑制骨肉瘤肺转移。在Hu-PBMC小鼠中接种人淋巴瘤SCC-3细胞或胶质母细胞瘤U87细胞模型中，PD-1抗体可使肿瘤大小减少50%以上。可见免疫系统人源化小鼠荷瘤模型是评估免疫检查点抑制剂的良好平台。

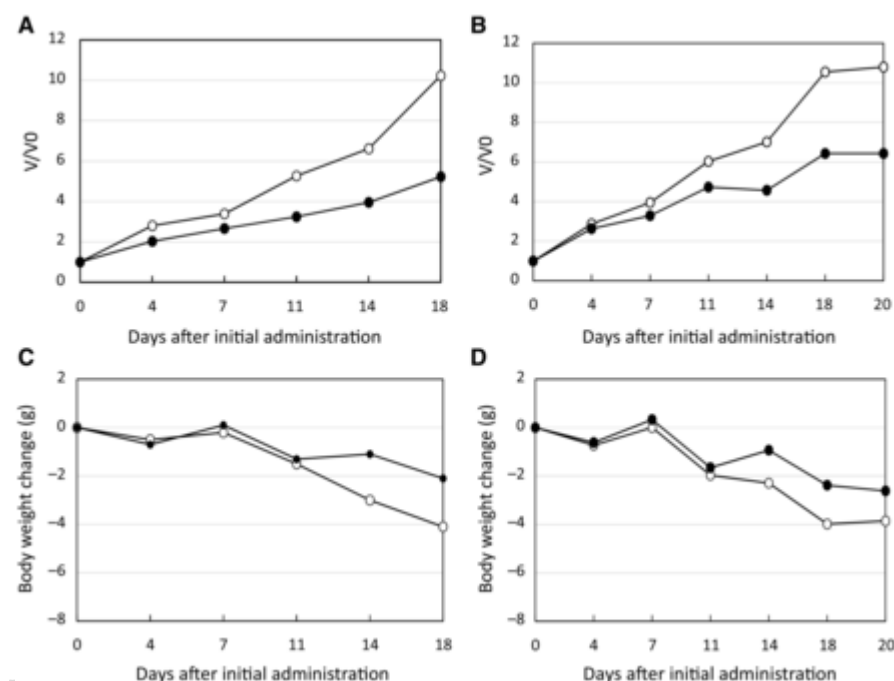


图15. Inhibitory effect of anti-PD-1 on the growth of SCC-3 and U87 tumors in vivo. (Ref.23)

评估联合治疗的效果，例如：双重检查点抑制剂

Hu-PBMC小鼠中接种人结肠直肠HT-29细胞和胃癌组织，并给予urelumab（抗hCD137）或/和nivolumab（抗PD-1）治疗，结果发现联合治疗或单抗单独用药均可使肿瘤生长减缓，联合治疗未明显提高疗效；且肿瘤移植中分泌IFN γ 的人T细胞的增加以及人Treg细胞减少。

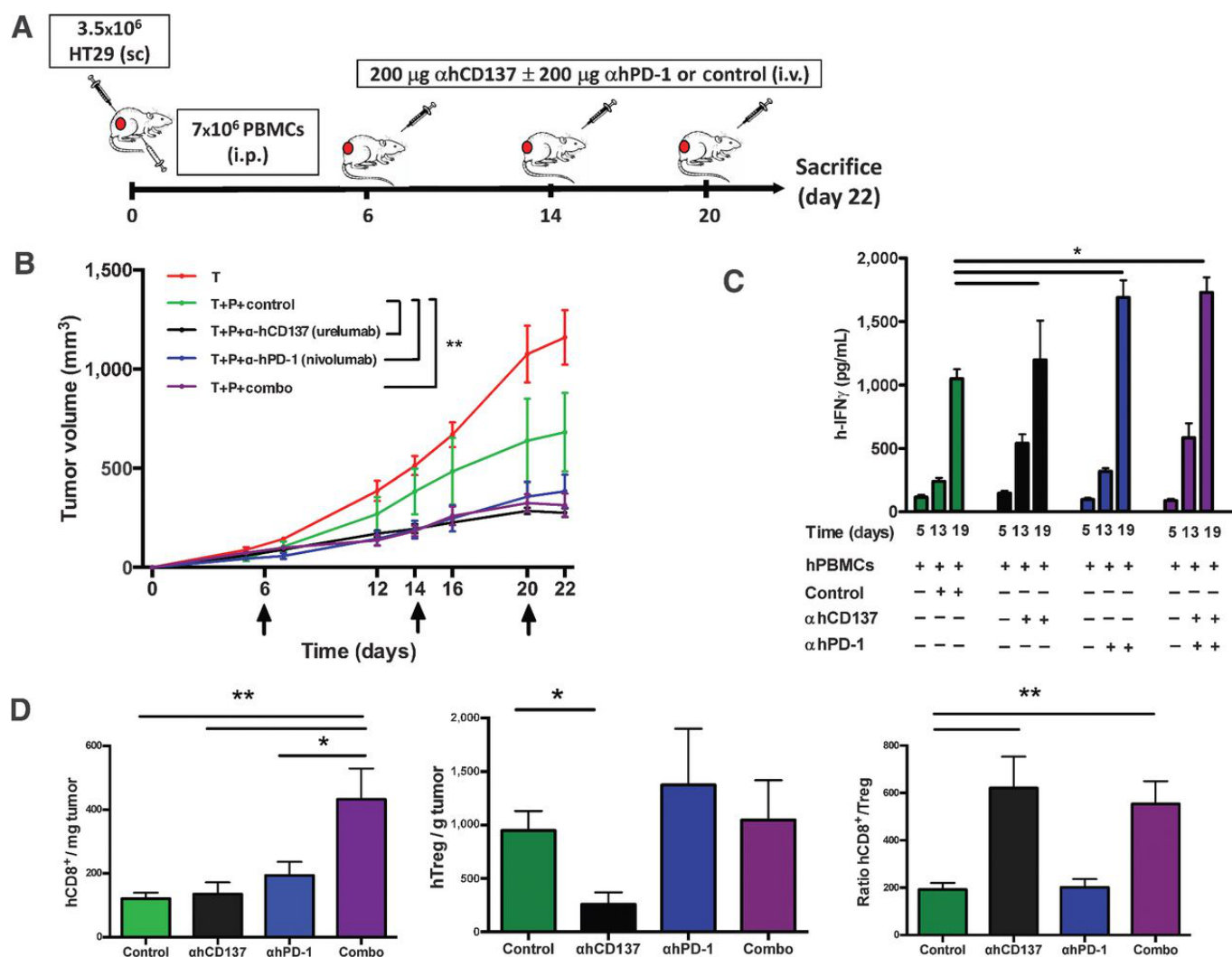


图16. Immunostimulatory mAbs anti-hCD137 (urelumab) and anti-hPD-1 (nivolumab) alone or in combination show antitumor activity against a xenografted human colon cancer mediated by transferred allogeneic human PBMC. (Ref.24)

在EBV相关淋巴瘤的Hu-HSC模型中，PD-1和CTLA-4抑制剂的联合用药可有效抑制 EBV诱导的弥漫性大B细胞淋巴瘤的生长，且抗肿瘤效果优于单药治疗。

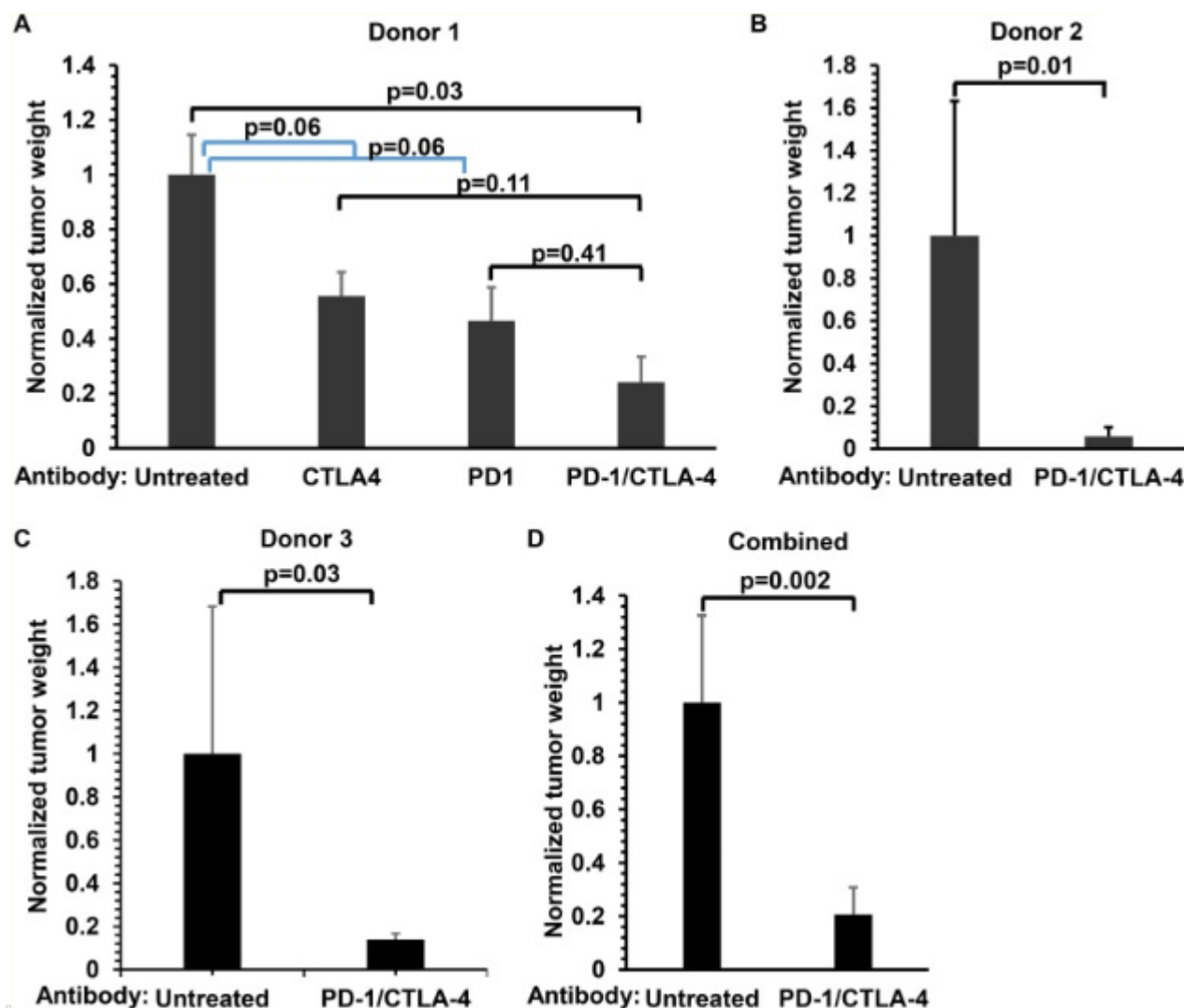


图17. Combined PD-1/CTLA-4 blockade inhibits the growth of EBV-induced lymphomas in cord blood-humanized mice. (Ref.25)

评估免疫综合疗法，例如：CAR-T与免疫检查点抑制剂联合治疗

在基于Hu-PBMC的原位胸膜间皮瘤小鼠模型中，研究了PD-1介导的T细胞衰竭对靶向间皮素的CAR-T细胞的影响。结果表明，阻断PD-1/PD-L1可以增强CD28共刺激的CAR-T细胞功效。

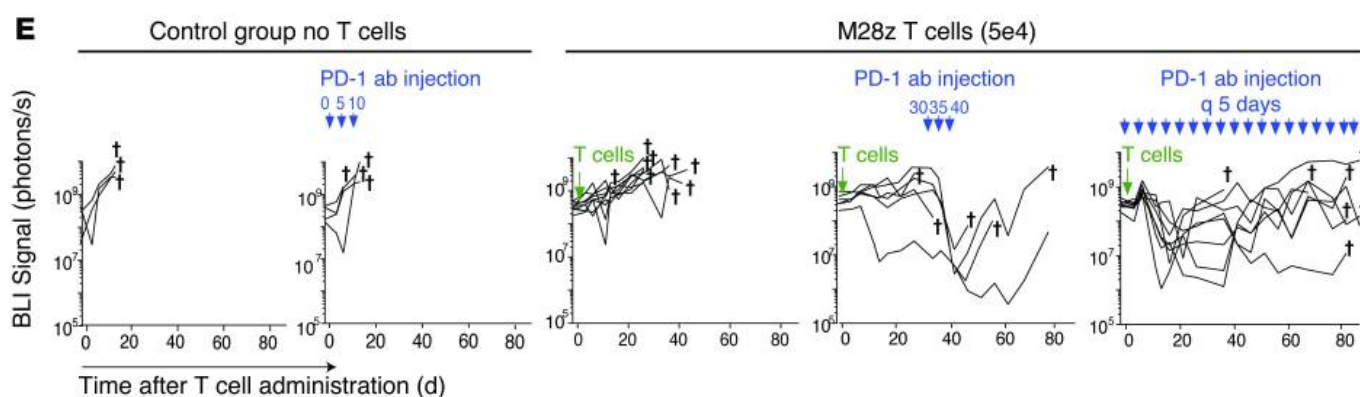


图18. Injection of PD-1-blocking antibody rescues M28z CAR T cells in vivo as shown by tumor BLI in a model treating established high tumor burdens with a single low dose of intrapleurally

administered M28z CAR T cells. (Ref.26)

评价ADCC、双特异性抗体等

在Hu-PBMC小鼠中进行肾细胞癌（RCC）原位荷瘤，获得的人源化荷瘤小鼠模型用于评估碳酸酐酶IX抗体（anti-CAIX）的抗肿瘤效果。结果发现，anti-CAIX mAb能在体外通过NK细胞介导的细胞毒性（ADCC），补体依赖性细胞毒性（CDC）和巨噬细胞介导的抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）杀伤RCC。在体内能够介导体内的人体免疫应答，包括肿瘤浸润NK细胞的活化和T细胞的活化，从而抑制CAIX+肿瘤的生长。

在Hu-HSC结肠癌小鼠模型中评价了双特异性EpCAM/CD3抗体的效果；在Hu-PBMC B细胞淋巴瘤模型中评价了双特异性CD20/CD3抗体（REGN1979）对B细胞的定向杀伤，抑制了B细胞肿瘤的生长；在Hu-PBMC 卵巢癌临床前模型中评估了双特异性CD3/CLDN6抗体（6PHU3）靶向T细胞的免疫调节疗效，6PHU3能有效动员表达CD3的静止T细胞，可几乎消除表达CLDN6的肿瘤。

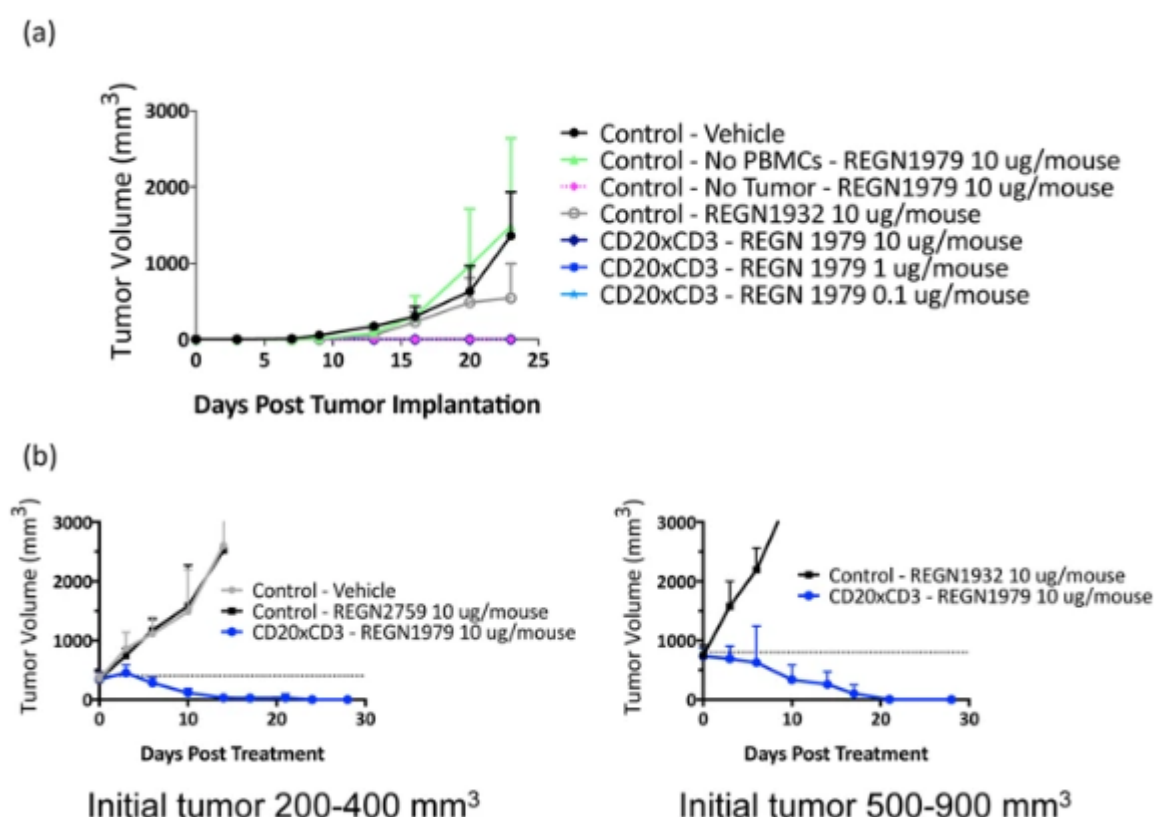


图19. Effects of REGN1979 on tumor growth in in vivo mouse tumor models. (Ref.28)

PART 3 免疫系统人源化小鼠模型的选择与优化

如果是短期药效研究，如早期药效筛选，且靶向T细胞或NK细胞，那么Hu-PBMC模型是非常理想的模型，因为Hu-PBMC模型在细胞移植后2周即可快速投入使用，但Hu-PBMC模型中B细胞重建情况较差，且发生GVHD会导致Hu-PBMC模型的有效窗口较短（大约仅15-20天）。为降低Hu-PBMC的GVHD发生，可以通过引入小鼠主要组织相容性复合体I类分子（B2M, beta-2 microglobulin）基因敲除，延长模型的生存周期，放大Hu-PBMC模型的使用窗口。

而对于长期研究或需要评估药物作用于多种免疫细胞时，那么使用Hu-HSC模型是更好的选择，可以评估药物或治疗方法的长期记忆效应和长期抗肿瘤作用。虽然Hu-HSC模型的免疫重建周期要比Hu-PBMC模型长，但Hu-HSC模型中可重建起不同的淋系及髓系的细胞，且GVHD的发生非常轻微及延迟，因此对于复杂系统中的长期研究具有明显优势。不过，Hu-HSC模型重建后的NK细胞比例是很低的，为了更接近于人体内的细胞比例，可以通过腹腔注射重组人IL15来刺激重建后的NK细胞活化与分化。

有研究比较了Hu-PBMC与Hu-HSC模型在PD-L1/PD-1免疫检查点靶向治疗中的效果。在这两种免疫系统重建小鼠中接种非小细胞肺癌模型，结果显示，阻断PD-L1/PD-1信号在Hu-PBMC中，较Hu-HSC，表现出更显著的抗肿瘤效果。

为解决免疫系统人源化小鼠不能很好地体现肿瘤免疫疗法在人体中的不良反应，如神经毒性、细胞因子释放综合征等，一些新的人源化小鼠模型也应运而生。如用于检测细胞因子释放综合征的人源化小鼠模型：在Hu-PBMC小鼠中注射anti-CD3 mAb (OKT3) 或anti-CD28 mAb (TGN1412)。anti-CD3 mAb可诱发急性临床症状，如毛细血管扩张，运动不足和体温过低。而TGN1412可导致小鼠体温迅速下降并在2-6小时内死亡。

随着免疫系统人源化小鼠模型的应用越来越广泛和深入，我们也看到目前的模型中有许多局限性，包括GVHD的可能性及其随之而来的并发症、有限的生存期、人类免疫功能不完整，肠道相关淋巴组织的人细胞重组水平低，淋巴器官发育不全，淋巴结构不发达等等。同时，不同人细胞或组织来源的移植物对于在小鼠体内免疫系统重建的效果及对后续实验的影响，也需要研究者的仔细比较和谨慎选择。下图提示了未来免疫系统人源化小鼠模型的优化方向。

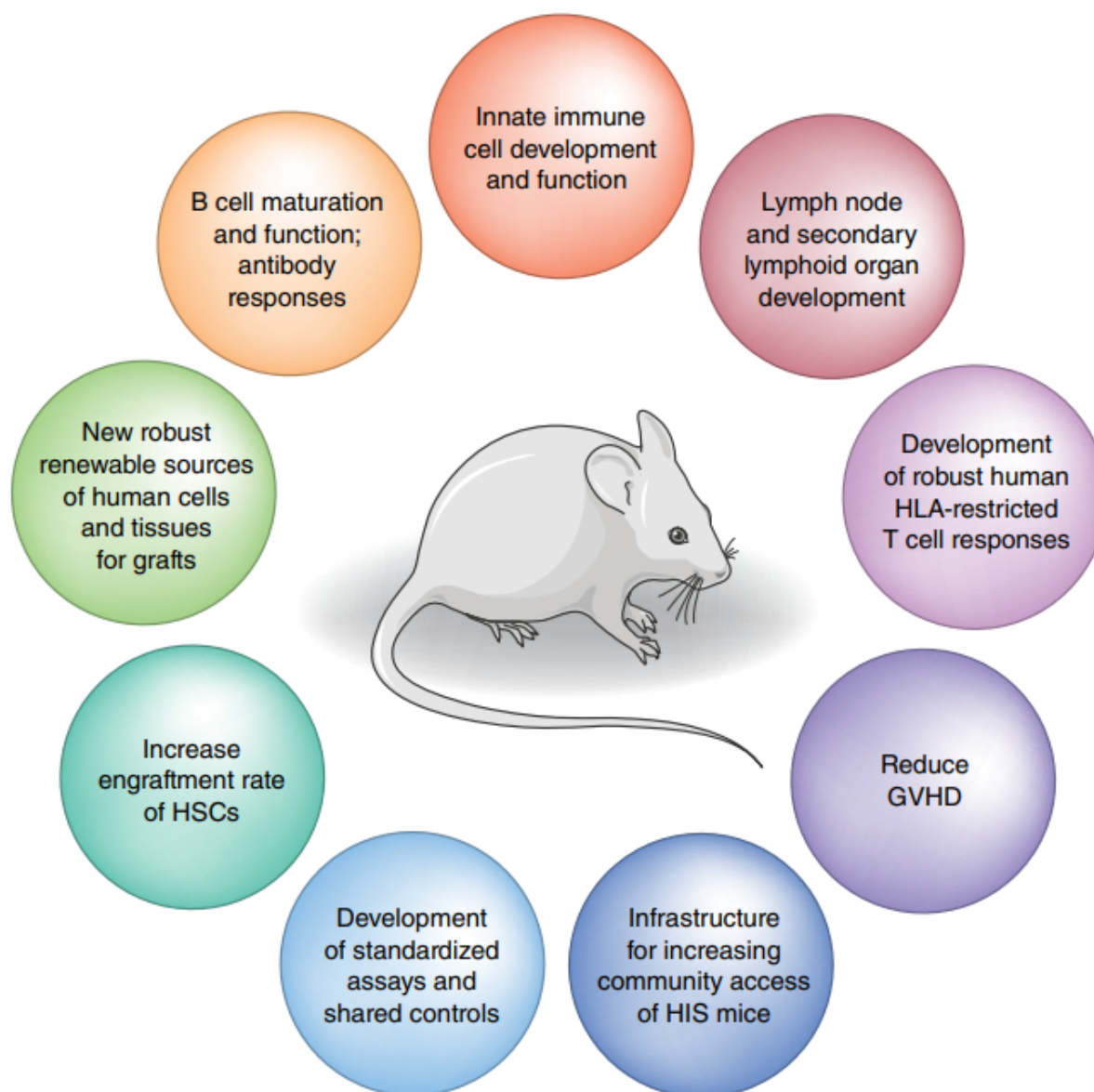


图20. 未来免疫系统人源化小鼠模型的发展与改进方向。（Ref.30）

PART 4 南模生物Hu-PBMC与Hu-HSC模型

[HSC 人源化小鼠](#)

[PBMC 人源化小鼠](#)

References

1. Shultz LD, Keck J, et al. Humanized mouse models of immunological diseases and precision medicine. Mamm Genome. 2019 Mar 7.

2. De La Rochere P, Guil-Luna S, et al. Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology. *Trends Immunol.* 2018 Sep;39(9):748-763.
3. Shultz LD, Brehm MA, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol.* 2012 Nov;12(11):786-98.
4. Sanmamed MF, Rodriguez I, et al. Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T Lymphocytes Engrafted in Rag2-/-IL2Rnull Immunodeficient Mice. *Cancer Res.* 2015 Sep 1;75(17):3466-78.
5. Morton JJ, Bird G, et al. XactMice: humanizing mouse bone marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xenograft model of head and neck cancer. *Oncogene.* 2016 Jan 21;35(3):290-300.
6. 郑亚伟, 郝莎, 胡林萍, 等. 免疫缺陷小鼠和人源化小鼠模型的发展及其在血液学研究中的应用. *中华血液学杂志*, 2015, 36(11): 966-971.
7. Akkina R. New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. *Virology.* 2013 Jan 5;435(1):14-28.
8. 李爽, 邹建玲, 鲁智豪, 沈琳. 免疫系统人源化小鼠模型的建立、应用及挑战. *中国医学前沿杂志（电子版）*, 2017, 9(10): 15-20.
9. Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1 [J]. *Nat Med*, 2006, 12(11): 1316-1322.
10. Stripecke R, Münz C, Schuringa JJ, et al. Innovations, challenges, and minimal information for standardization of humanized mice. *EMBO Mol Med.* 2020;12(7):e8662.
11. Chatterjee B, Deng Y, Holler A, et al. CD8+ T cells retain protective functions despite sustained inhibitory receptor expression during Epstein-Barr virus infection in vivo. *PLoS Pathog.* 2019;15(5):e1007748.
12. Marsden MD, Zack JA. Humanized Mouse Models for Human Immunodeficiency Virus Infection. *Annu Rev Virol.* 2017;4(1):393-412
13. [Cheng L, Ma J, Li G, Su L. Humanized Mice Engrafted With Human HSC Only or HSC and Thymus Support Comparable HIV-1 Replication, Immunopathology, and Responses to ART and Immune Therapy. *Front Immunol.* 2018;9:817. Published 2018 Apr 19. doi:10.3389/fimmu.2018.00817](#)
14. Neff CP, Kurisu T, Ndolo T, Fox K, Akkina R. A topical microbicide gel formulation of CCR5 antagonist maraviroc prevents HIV-1 vaginal transmission in humanized RAG-hu mice. *PLoS One.* 2011;6(6):e20209.
15. Bournazos S, Gazumyan A, Seaman MS, Nussenzweig MC, Ravetch JV. Bispecific Anti-HIV-1 Antibodies with Enhanced Breadth and Potency. *Cell.* 2016;165(7):1609-1620

16. Huang Y, Yu J, Lanzi A, et al. Engineered Bispecific Antibodies with Exquisite HIV-1-Neutralizing Activity. *Cell*. 2016;165(7):1621-1631.
17. Humanized Mouse Models for Transplant Immunology. L L Kenney , L D Shultz , D L Greiner , M A Brehm *Am J Transplant*. 2016 Feb;16(2):389-97.
18. Cheng L, Ma J, Li J, et al. Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2017;127(1):269-279. doi:10.1172/JCI90745
19. [Tu W, Zheng J. Application of Humanized Mice in Immunological Research. *Methods Mol Biol*. 2016;1371:157-176. doi:10.1007/978-1-4939-3139-2_10](#)
20. Zheng J, Liu Y, Liu Y, et al. Human CD8+ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci Transl Med*. 2013;5(168):168ra9.
21. Racki WJ, Covassin L, Brehm M, et al. NOD-scid IL2rgamma(null) mouse model of human skin transplantation and allograft rejection. *Transplantation*. 2010;89(5):527-536.
22. Choi Y, Lee S, Kim K, Kim SH, Chung YJ, Lee C. Studying cancer immunotherapy using patient-derived xenografts (PDXs) in humanized mice. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):99.
23. Ashizawa T, Iizuka A, Nonomura C, et al. Antitumor Effect of Programmed Death-1 (PD-1) Blockade in Humanized the NOG-MHC Double Knockout Mouse. *Clin Cancer Res*. 2017;23(1):149-158.
24. Sanmamed MF, Rodriguez I, Schalper KA, et al. Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T Lymphocytes Engrafted in Rag2-/-IL2Rynull Immunodeficient Mice. *Cancer Res*. 2015;75(17):3466-3478.
25. Ma SD, Xu X, Jones R, et al. PD-1/CTLA-4 Blockade Inhibits Epstein-Barr Virus-Induced Lymphoma Growth in a Cord Blood Humanized-Mouse Model. *PLoS Pathog*. 2016;12(5):e1005642.
26. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3130-3144. doi:10.1172/JCI83092
27. Wulf-Goldenberg, A. et al. (2011) Intrahepatically transplanted human cord blood cells reduce SW480 tumor growth in the presence of bispecific EpCAM/CD3 antibody. *Cytherapy* 13, 108-113
28. Smith, E.J. et al. (2015) A novel, native-format bispecific antibody triggering T-cell killing of B-cells is robustly active in mouse tumor models and cynomolgus monkeys. *Sci. Rep.* 5, 17943
29. Stadler, C.R. et al. (2016) Characterization of the first-in-class Tcell-engaging bispecific single-chain antibody for targeted immunotherapy of solid tumors expressing the oncofetal protein claudin 6. *Oncoimmunology* 5, e1091555

30. Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy. MAbs. 2018;10(8):1301-1311.