

令和元年6月5日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07103

研究課題名(和文)次世代ヒト化マウスを用いたヒトアレルギー性喘息モデルの確立と創薬への応用

研究課題名(英文)Development of human allergic asthma models using next-generation humanized mice for drug discovery

研究代表者

伊藤 亮治 (Ito, Ryoji)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・室長代理

研究者番号：60425436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト化マウスを用いた気管支喘息モデルマウスを作製し、抗気管支喘息薬の薬効評価系として利用できるか検討した。喘息誘導に重要なサイトカインであるヒトIL-33をヒト化マウスへ気管内投与し、マウス肺へ集積した炎症細胞の解析および気道過敏性を測定した。その結果、ヒトT細胞、好酸球浸潤や盃細胞過形成、気道過敏性亢進が認められ、重症喘息患者の病態を再現することが可能となった。これら病態は抗ヒトIL-13抗体の投与により顕著に改善したことから、ヒトと同様にIL-13を介したメカニズムが重要であると考えられた。以上の結果から、本喘息モデルは創薬の前臨床評価系として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりヒトアレルギー性喘息モデルが確立されれば、これまで不可能であったヒト喘息病態の生体内モニタリングが可能となり、様々なヒト免疫細胞が関与する喘息発症までの一連の生体内経路を解析できる。また、抗アレルギー薬の薬効評価や安全性試験を生体内で行う事が可能となるため、基礎、臨床の両分野において幅広く利用される実験動物となり得る。将来的には食物アレルギー、アトピー性皮膚炎など、様々なヒトアレルギー疾患を発症するモデルマウスとして世界中の研究者への頒布体制を整え、全世界のアレルギー研究に貢献したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We aim to establish a preclinical animal model of asthmatic airway inflammation using humanized IL-3/GM-CSF or IL-3/GM-CSF/IL-5 transgenic (Tg) NOG mice and investigate the roles of human type-2 immune responses in the asthmatic mice. Several important characteristics of asthma such as AHR, goblet cell hyperplasia, T cell infiltration, IL-13 production, and periostin secretion were induced in IL-3/GM-CSF Tg mice by intratracheally administered human IL-33. In addition to these characteristics, human eosinophilic inflammation was observed in IL-3/GM-CSF/IL-5 Tg mice. Furthermore, treatment of the humanized mice with an anti-human IL-13 antibody significantly suppressed these characteristics. Therefore, the humanized mice may enhance our understanding of the pathophysiology of allergic disorders and facilitate the preclinical development of new therapeutics for IL-33-mediated type-2 inflammation in asthma.

研究分野：免疫学

キーワード：ヒト化マウス 気管支喘息 アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞、組織が効率良く生着する重度免疫不全 NOG マウスは、様々なヒト疾患を in vivo で再現できる「ヒト化マウス」として、しばしば創薬研究に応用されている。申請者は NOG マウスにヒト造血幹細胞を移入し、ヒト免疫系を再現できる「免疫系ヒト化マウス」の開発を長らく行ってきた。NOG マウスをレシピエントとした第一世代ヒト化マウスは、T 細胞、B 細胞などのリンパ球系細胞は効率よく分化するが、マスト細胞や好塩基球などアレルギー応答に重要とされる骨髄系細胞への分化効率が低く、不完全な免疫系を持つヒト化マウスであった。2013 年に研究代表者は、NOG マウスにヒト IL-3 および GM-CSF 遺伝子を導入した次世代ヒト化マウス(hIL-3/GM-CSF Tg マウス)を作製した。hIL-3/GM-CSF Tg マウスへヒト造血幹細胞を移入し、分化、生着したヒト免疫細胞を解析したところ、従来のヒト化マウスでは全く観察されなかった IgE 受容体陽性の成熟ヒトマスト細胞および好塩基球が効率よく分化することを見出した。また花粉症患者の IgE 抗体と花粉抗原の投与により、IgE 依存性受動アナフィラキシー (PCA) 反応の誘導、すなわちマスト細胞の脱顆粒に成功し、生体内ヒトアレルギーモデルマウスとして利用可能なヒト化マウスであることを明らかにした。本研究ではこのヒトアレルギーモデルをさらに発展させ、よりヒトの病態に近い疾患モデルの実現を目指し、ヒトアレルギー性喘息モデルを開発する。

2. 研究の目的

ヒト化マウスを用いて、癌、感染症を始めとして自己免疫疾患やアレルギーなど様々な疾患を標的としたヒト疾患モデルの開発が世界中で実施されているが、呼吸器関連疾患モデルはこれまでに存在しなかった。本研究では、上述した hIL-3/GM-CSF Tg マウスへ喘息惹起に重要なサイトカインであるヒト IL-33 を気管内投与したヒト気管支喘息モデルの構築を目的としている。また、気管支喘息患者で観察される顕著な好酸球浸潤を再現すべく、ヒト好酸球分化に必須の IL-5 遺伝子を導入した hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg (Triple Tg) を作製し、これをヒト化して同様の喘息誘導処置を行い、好酸球性喘息モデルを作製する。これらを用いて、分子標的医薬などの薬効評価系として利用可能であるか検討する。

3. 研究の方法

放射線照射した IL-3/GM-CSF Tg および Triple-Tg マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を尾静脈経由で移入し、ヒト化マウスを作製した。移入から 3~4 ヶ月後に、これらヒト化 Tg マウスの末梢血を採取し、ヒト CD45 陽性細胞を指標としたヒト白血球キメラ率の測定およびヒトリンパ球系マーカー、ミエロイド系マーカーを用いた各細胞系列への分化能をフローサイトメトリーにて解析した。ヒト細胞の生着を確認した後に、リコンビナントヒト IL-33 を気管内投与し、4 日目に肺組織、肺胞洗浄液 (BAL) を回収して、ヒト炎症細胞の浸潤、盃細胞過形成、サイトカイン、ペリオスチンなどの喘息病態因子を解析した。さらに、メサコリン吸入後の気道過敏性を測定した。また、気管支喘息の分子標的治療薬としてヒト抗 IL-13 抗体を投与し、気道へのヒト細胞浸潤、盃細胞過形成が抑制されるか検討した。

4. 研究成果

ヒト化した NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスおよび Triple Tg マウスへヒト IL-33 サイトカインを気管内投与したところ、気管支へのヒト T 細胞をはじめとする白血球浸潤、盃細胞過形成、ペ

リオスチン産生、肺胞洗浄液中の IL-13, IL-5 の亢進などヒトの病態と類似した症状が認められた。さらに当該ヒト免疫系マウスが創薬候補物質の薬効評価系として使用可能か検討すべく、NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスへ抗 IL-13 抗体を投与し、喘息症状が改善されるか検討した。ヒト化 NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスへ IL-33 を 3 日間連続で気管内投与して喘息症状を起こすと同時に、抗ヒト IL-13 抗体を腹腔内投与した。その結果、抗 IL-13 抗体を投与したマウス群では T 細胞、好酸球、好塩基球、マスト細胞の浸潤 (図 1A)、杯細胞過形成 (図 1B)、ペリオスチン産生が顕著に抑制され、ヒト化マウスの喘息症状が著しく改善されたことから、当該マウスが抗喘息治療薬の薬効評価系として利用できることが示唆された。さらに抗 IL-13 抗体投与により、CD4 T 細胞からの IL-4 産生も抑制されたことから、本喘息モデルはヒト喘息患者と同様に Th2 細胞を介した病態形成が主体となっていると考えられた。

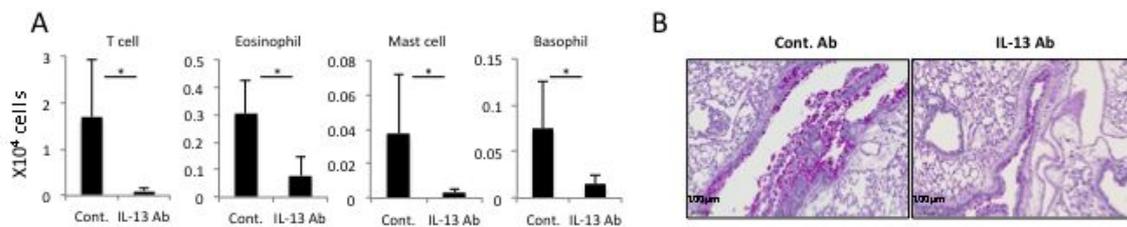


図1 抗IL-13抗体投与後の(A)BAL中の各種ヒト免疫細胞浸潤(B)肺組織中の杯細胞(PAS染色)

さらにヒト喘息患者で見られる気道過敏性、気管支への好酸球浸潤及び好酸球による脱顆粒が再現できるか検討した。ヒト IL-33 を投与したヒト化 IL-3/GM-CSF Tg, Triple Tg, および nonTg マウスへメサコリンを吸入させ、気道抵抗を測定したところ、両 Tg マウスともに nonTg に比べて気道過敏性が有意に亢進していた (図 2)。

また、ヒト気管支喘息の重要な特徴であるヒト好酸球浸潤について解析したところ、

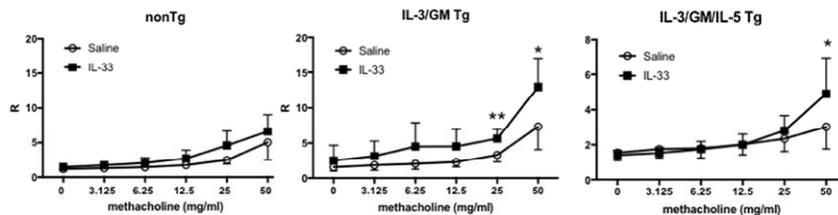


図2 ヒト気管支喘息モデルの気道過敏性評価

、IL-3/GM-CSF Tg に比べ Triple Tg マウスの肺胞洗浄液中でヒト好酸球の顕著な増加が認められた (図 3A)。

さらに好酸球性顆粒である EDN を ELISA にて測定したところ、Triple Tg マウスで有意に亢進し (図 3B)、本マウスが好酸球性気管支喘息モデルとして有用であることが示された。さらに炎症局所へ好酸球を誘引するケモカインであるエオタキシンを測定したところ、IL-33 刺激依存的にマウスエオタキシン 1 およ

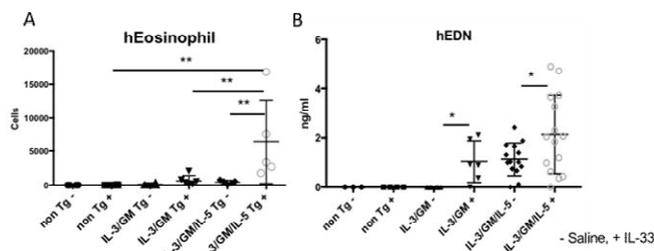


図3 IL-33投与後のヒト好酸球浸潤(A)および肺胞洗浄液中のヒトEDN産生(B)

び 2 の産生が見られ、これらエオタキシンがヒト好酸球をマウスの気管支へ誘引している可能性が示唆された。以上の結果から、本ヒト気管支喘息モデルは多くのヒト喘息病態を再現できることが明らかとなり、創薬の前臨床評価系として十分に使用できると考えられる。

気管支への好酸球浸潤は重症気管支喘息の主要な病態であり、近年はこれら好酸球を標的とした抗 IL-5 及び IL-5 レセプター抗体医薬が注目されている。しかしながら浸潤好酸球のキャラ

クターは十分に解明されておらず、これまでに適切なモデル動物も存在しなかった。我々が開発した NOG IL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスは、世界で初めてヒト好酸球浸潤を伴う気管支喘息病態が再現できる実験動物であり、好酸球性喘息におけるヒト好酸球の性状、機能、分子メカニズムなどを解析することが可能である。そのため、今後喘息誘導時のヒト好酸球機能解析を主体とし、当該モデルのさらなる有用性を示していきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Hanazawa A, Takahashi T, Ogura T, Goto M, Takahashi R, Toyoshima S, Okayama Y, Izuhara K, Gon Y, Hashimoto S, Ito M, Nunomura S. A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis JCI Insight. 2018 Nov 2;3(21) doi: 10.1172/jci.insight.121580.
2. 「NOGマウスを用いた新しいxeno-GVHDモデル」 伊藤亮治、伊藤守 臨床免疫・アレルギー科 2018年 vol.70(1) 101-106
3. Kawasaki Y, Sato K, Hayakawa H, Takayama N, Nakano H, Ito R, Mashima K, Oh I, Minakata D, Yamasaki R, Morita K, Ashizawa M, Yamamoto C, Hatano K, Fujiwara SI, Ohmine K, Muroi K, Kanda Y. Comprehensive Analysis of the Activation and Proliferation Kinetics and Effector Functions of Human Lymphocytes, and Antigen Presentation Capacity of Antigen-Presenting Cells in Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2018 Aug. 24 1563-1574 doi: 10.1016/j.bbmt.2018.04.016.
4. 「次世代型ヒト化マウスの開発と創薬研究への応用」 伊藤亮治 日本薬理学雑誌 2018年 vol.151(4) 160-165 doi: 10.1254/fpj.151.160.
5. Hanazawa A, Ito R, Katano I, Kawai K, Goto M, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M, Takahashi T. Generation of Human Immunosuppressive Myeloid Cell Populations in Human Interleukin-6 Transgenic NOG Mice. Front Immunol. 2018 Feb 2;9:152. doi: 10.3389/fimmu.2018.00152.
6. Takahashi T, Katano I, Ito R, Goto M, Abe H, Mizuno S, Kawai K, Sugiyama F, Ito M. Enhanced Antibody Responses in a Novel NOG Transgenic Mouse with Restored Lymph Node Organogenesis. Front Immunol. 2018 Jan 17;8:2017 doi: 10.3389/fimmu.2017.02017.
7. Katano I, Nishime C, Ito R, Kamisako T, Mizusawa T, Ka Y, Ogura T, Suemizu H, Kawakami Y, Ito M, Takahashi T Long-term maintenance of peripheral blood derived human NK cells in a novel human IL-15- transgenic NOG mouse Scientific Reports 2017, 7: 17230, 17442-7 doi: 10.1038/s41598-017-17442-7.
8. Yaguchi T, Kobayashi A, Inozume T, Morii K, Nagumo H, Nishio H, Iwaata T, Ka Y, Katano I, Ito R, Ito M, Kawakami Y Human PBMC-transferred murine MHC class I/II-deficient NOG mice enable long-term evaluation of human immune responses Cellular and Molecular Immunology 2017 Nov. 15 953-962 doi: 10.1038/cmi.2017.106.
9. Ito R, Nagai D, Igo N, Okuda Y, Sekine K, Ichimura E, Katano I, Mizushima T, Goto M, Ohnishi Y, Ito M, Okamoto K A novel in vivo model for predicting myelotoxicity of chemotherapeutic agents using IL-3/GM-CSF transgenic humanized mice Toxicology Letter 2017 Nov. 5; 281: 152-157 doi: 10.1016/j.toxlet.2017.09.013.
10. Kametani Y, Katano I, Miyamoto A, Kikuchi Y, Ito R, Muguruma Y, Tsuda B, Habu S, Tokuda

Y, Ando K, Ito M NOG-hIL-4-Tg, a new humanized mouse model for producing tumor antigen-specific IgG antibody by peptide vaccination PLoS One. 2017 Jun 15;12(6):e0179239 doi: 10.1371/journal.pone.0179239.

11. Ito R, Takahashi T, Ito M Humanized mouse models: Application to human diseases. J Cell Physiol. 2018 May;233(5) 3723-3728. doi: 10.1002/jcp.26045.
12. Ito R, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Takahashi T, Ka Y, Ogura T, Takahashi R, Ito M. A Novel Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease Model for Investigating the Pathological Role of Human CD4+ or CD8+ T Cells Using Immunodeficient NOG Mice. Am J Transplant. 2017 May;17(5):1216-1228 doi: 10.1111/ajt.14116.
13. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. Cell Stem Cell. 2016 Jul 7;19(1):127-138 doi: 10.1016/j.stem.2016.06.003.

〔学会発表〕(計7件)

1. Ito R, Katano I, Takahashi T, Goto M, Takahashi R, and Ito M, Development of human neutrophils in hG-CSF knockin NOG mouse transferred with human HSC. 第80回日本血液学会、10/12-14、大阪、ポスター
2. Ito R A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via human IL-33/IL-13 axis. International symposium of humanized mouse model, 9/26-9/28 南京、ポスター
3. 伊藤亮治、片野いくみ、高橋武司、位高美香、川井健司、後藤元人、小倉智幸、高橋利一、伊藤守 ヒト CD4 T 細胞移入 NOG hIL-1b/IL-23 Tg マウスを用いた皮膚 GVHD 症状の解析. 第65回日本実験動物学会 5/16-18 富山、口頭
4. 伊藤亮治 「ヒト造血系 hIL-3/GM-CSF Tg NOG マウスを用いた殺細胞性抗がん剤のヒト血液毒性評価系の確立」第64回日本実験動物学会 5/25-27 郡山、ポスター
5. Ito R A novel xenogeneic graft-versus-host disease model for investigating the pathological role of human CD4+ or CD8+ T cells using immunodeficient NOG mice. 第45回日本免疫学会 12/5-7 沖縄、口頭
6. 伊藤亮治 「ヒト免疫系マウスを用いた IL-33 誘導型ヒト喘息モデルの開発」アレルギー好酸球研究会 10/22 東京、口頭
7. 伊藤亮治 「IL-3/GM-CSF/IL-5 Tg NOG マウスを用いたヒト喘息モデルの開発」第63回日本実験動物学会 5/18-20 川崎、口頭

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ヒト好中球が分化するヒト G-CSF ノックインげっ歯類
発明者：伊藤亮治
権利者：公益財団法人実験動物中央研究所
種類：特許

番号：特願 2019-62919

出願年：2019

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 <https://www.ciea.or.jp>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。