

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19500374
研究課題名 (和文) 誘導型好塩基球／好酸球欠損マウスの樹立と IgE 依存性慢性アレルギー反応の解析
研究課題名 (英文) Establishment of inducible basophil-less and eosinophil-less mouse lines to study critical roles in the IgE-mediated chronic allergic inflammation
研究代表者 松岡 邦枝 (MATSUOKA KUNIE) 財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員 研究者番号：40291158

研究成果の概要：ジフテリア毒素 (DT) 受容体を好塩基球あるいは好酸球に特異的に発現するトランスジェニックマウスを樹立した。DT の投与により末梢血中の好塩基球あるいは好酸球数が著明に減少し、抗原 TNP-OVA の皮内投与で誘導される IgE-Fc γ RI 依存性の慢性アレルギー反応による皮膚腫脹が軽減した。これらのマウスは好塩基球・好酸球の機能を解明する上で極めて有用であり、好塩基球・好酸球を標的とするアレルギーの治療法の開発に応用できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：病態モデル・慢性アレルギー・好塩基球・好酸球・IgE・トランスジェニックマウス・ジフテリア毒素

1. 研究開始当初の背景

我々は、アレルギー性疾患の病態を解析して新しい治療法を開発するためには、ヒトのアレルギー疾患を再現できる動物モデルの樹立が必須であるという立場から、トリニトロフェノール (TNP) 特異的 IgE トランスジェニック (Tg) マウスを世界に先駆けて樹立し、マウスの生体内で IgE 依存性のアレルギー反応を誘導することに成功した (*Int. Immunol.* 11: 987-994, 1999)。この Tg マウスの耳介に TNP で標識した卵白アルブミン

(TNP-OVA) をただ 1 回皮内投与すると、投与後 30～60 分をピークとする即時相 (第 1 相) と数時間後をピークとする遅発相 (第 2 相) の皮膚腫脹に続き、投与後 3～4 日をピークとする抗原特異的かつ IgE 依存的なより強い皮膚腫脹 (第 3 相) が認められることが判明した (*J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 143-148, 2003)。第 3 相の皮膚腫脹は抗原投与量の増加により 30 日以上長期にわたって持続し、過角化を伴う表皮肥厚や炎症局所への好酸球を中心とする著明な顆粒球の浸潤等アトピー性皮膚炎と類似する所見を示

すことから、アトピー性皮膚炎慢性化のメカニズムの解明に繋がることが期待された。それまで、アトピー性皮膚炎等慢性アレルギー疾患の責任細胞集団としてはマクロファージやT細胞に注目が集まり、その他の血球細胞はほとんど無視されてきたが、我々はこの3相性の皮膚腫脹反応の解析から、「IgE/マスト細胞が即時型アレルギー反応を引き起こし、T細胞が遅延型アレルギー反応を引き起こす」という既成概念を覆し、「末梢白血球のわずか0.5%を占めるに過ぎない好塩基球が、IgEと高親和性IgEレセプターFc \cdot RI依存的に慢性アレルギー(IgE-CAI)を誘導する機構が存在する」ことを発見した(*Immunity* 23: 191-202, 2005)。

好塩基球は、白血球細胞に占める割合が0.5%程度と最も数が少なく、細胞表面におけるFc \cdot RIの発現、ヒスタミンをはじめとする炎症メディエーターを蓄積した顆粒の存在など、マスト細胞と多くの特徴を共有することから「循環型マスト細胞」と考えられてきた。また、有用な特異抗体や欠損マウスも存在しないことから、好塩基球に関する研究はほとんど進展していなかった。一方、第3相目の炎症局所への著明な浸潤の認められる好酸球は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などのアレルギー疾患患者において、末梢血における好酸球の増多や炎症組織への浸潤が認められることは古くから知られており、病変組織に浸潤した好酸球数やその活性化と炎症の重症度に正の相関が認められるなど、好酸球はアレルギー性炎症における中心的なエフェクター細胞であると考えられているが、その役割については、まだ十分な理解には及んでいなかった。

2. 研究の目的

T細胞・B細胞・マスト細胞の欠損マウスは古くから知られ、免疫学における分子メカニズムの解明に大きく寄与してきた。しかしながら、好塩基球欠損マウスは、好塩基球のアレルギー性炎症における重要性が指摘されながらもまだ樹立には至っていない。好酸球を恒常的に欠損するマウスは2004年に異なる方法で2種類のマウスが樹立され(*Science* 305: 1773-1776 および 1776-1779, 2004)、気道炎症のモデル系を用いて好酸球が気道過敏性やリモデリングに関与することが示された。好酸球のアレルギー性炎症への関与は、これまで喘息(気道炎症)モデルを中心に研究されてきており、アトピー性皮膚炎の病変組織に著明な好酸球の浸潤が認められているにもかかわらず、皮膚の炎症局所における好酸球の役割は気道炎症における知見と比べてまだ不明な点が多い。そこで本研究では、誘導型の好塩基球欠損マウスお

よび好酸球欠損マウスを樹立し、前述のIgE-CAIをモデルとして、アトピー性皮膚炎の慢性相を模倣する第3相目の皮膚炎症における好塩基球および好酸球の作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 誘導型好塩基球/好酸球欠損マウスの樹立

標的細胞ノックアウト法(TRECK法)を用いて、誘導型好塩基球/好酸球欠損マウスを樹立した。すなわち、マウスがジフテリア毒素(DT)に耐性であることを利用して、マウスのある特定の細胞系列にDT受容体(DTR)の本体であるヒトHB-EGFを強制発現するTgマウスを作製し、DTを投与することにより、任意の時期に任意の強さで標的とする細胞を傷害する。まず、好塩基球あるいは好酸球に特異的に発現する分子のプロモーターをC57BL/6マウスゲノムDNAを鋳型としたPCRによりそれぞれクローニングした。その下流に、ウサギ β -グロビンの第2イントロン、ヒトHB-EGF翻訳領域のcDNA、ウサギ β -グロビンのポリA付加シグナルおよびSV40初期遺伝子のポリA付加シグナルを連結して、Tgマウス作製のためのDNA組換え体を構築した。これらをC57BL/6マウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠ICR雌マウスに移植して、Tgマウスをそれぞれ樹立した(Basophil-TRECKおよびEosinophil-TRECKマウス)。

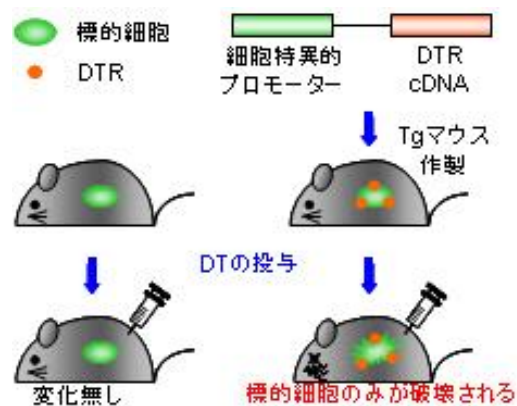


図1 TRECK法の原理

(2) TgマウスにおけるヒトHB-EGFの発現の解析

Basophil-TRECKおよびEosinophil-TRECKマウス末梢血から、MACSにより好塩基球あるいは好酸球を分離し、ヒトHB-EGFの特異プライマーによるRT-PCRを行って、mRNAの発現を解析した。一方、末梢白血球のサイトスピン標本を作製し、抗ヒトHB-EGF抗体、抗マウスIgE抗体あるいは抗CCR3抗体を用いて免疫染色を行い、好塩基球あるいは好酸

球細胞表面におけるヒト HB-EGF タンパク質の発現を調べた。

(3)DT の投与による標的細胞の傷害様式の解析

Basophil-TRECK および Eosinophil-TRECK マウスに DT を 25 μ g/kg あるいは 5 μ g/kg 腹腔内投与し、1~3 日後の末梢血中の好塩基球 (IgE⁺CD49b⁺) あるいは好酸球 (CCR3⁺Siglec-F⁺) の変化を FACS で調べた。

(4)DT の投与により好塩基球あるいは好酸球を傷害した場合の IgE-CAI

IgE-CAI は TNP 特異的 IgE 300 μ g を静脈内投与し、1 日後に TNP-OVA をマウス耳介に皮内投与して惹起した。DT を任意の時期に腹腔内に投与し、好塩基球あるいは好酸球を傷害した場合の皮膚腫脹反応を耳介厚を指標として測定した。

4. 研究成果

(1)Basophil-TRECK マウス

①好塩基球におけるヒト HB-EGF の発現

Basophil-TRECK マウス末梢血白血球の解析の結果、ヒト HB-EGF mRNA は抗 IgE 抗体を用いた MACS によって調整された好塩基球画分特異的に発現していた。また、末梢血白血球サイトスピン標本の免疫染色により、抗 IgE 抗体で染色される細胞すなわち好塩基球のみにヒト HB-EGF の発現が認められた。

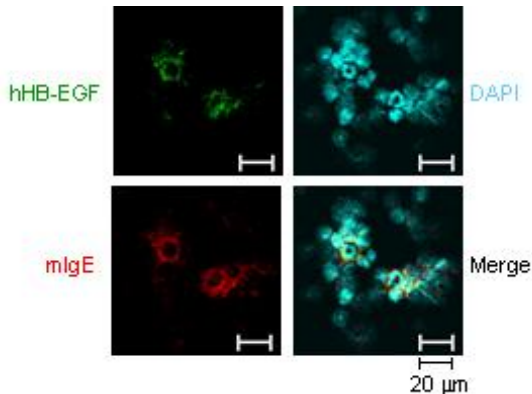


図2 好塩基球特異的なヒト HB-EGF の発現

②DT の投与による好塩基球の傷害

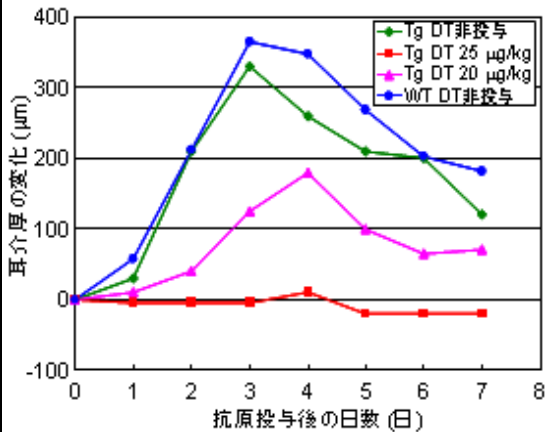
Basophil-TRECK マウスに TNP 特異的 IgE で受動感作した 1 日後に、DT を 25 μ g/kg 投与すると、DT 投与後 3 日目には全白血球における好塩基球の割合が 1/10 に減少した。しかしながら、DT を 50 μ g/kg 投与しても、腹腔マスト細胞の減少は認められなかった。Basophil-TRECK マウスへの DT の投与では、マスト細胞は影響を受けず、好塩基球のみが

傷害されることが明らかとなった。

③DT 投与によって好塩基球を傷害した場合の IgE-CAI

Basophil-TRECK マウスに対して抗原 TNP-OVA の投与 2 日前に DT を腹腔内投与すると、DT の投与量依存的に皮膚腫脹が抑制され、25 μ g/kg の DT の投与で完全に抑制された。すなわち、マウス生体内から好塩基球の機能を除去することが可能であることが判明した。また、好塩基球の傷害の程度は投与 DT 量に依存することが明らかとなった。

図3 DT を投与による IgE-CAI の抑制



(2)Eosinophil-TRECK マウス

①好酸球におけるヒト HB-EGF の発現

Eosinophil-TRECK マウスの末梢血白血球のサイトスピン標本を免疫染色した結果、抗 CCR3 抗体で染色される好酸球のみにヒト HB-EGF の発現が認められた。

②DT の投与による好酸球の傷害

Eosinophil-TRECK マウスに 5 μ g/kg の DT を投与すると、2 日目には末梢好酸球は 1/5 に減少した。

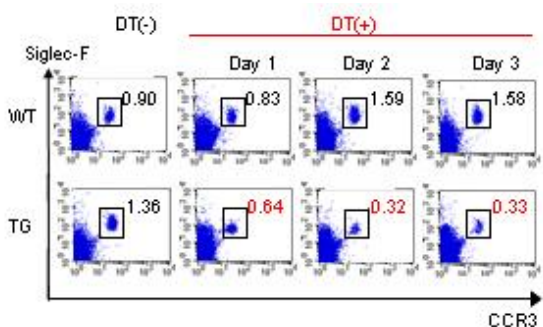


図4 DT の投与による好酸球の減少

③DT 投与によって好酸球を傷害した場合の IgE-CAI

DT 5 μ g を抗原投与 2 日前、抗原投与と同時に、あるいは抗原投与後 2 日目に腹腔内

投与した場合の IgE-CAI による耳介の厚さの変化を測定した。抗原投与 2 日前に DT を投与すると、皮膚腫脹は 1/3 程度に減弱した。抗原投与と同時に DT を投与した場合は、炎症のピークとなる 3-4 日目の皮膚腫脹が約 1/2 に抑えられた。皮膚腫脹反応が開始された抗原投与後 2 日目に DT を投与すると、それ以降の皮膚腫脹が顕著に軽減された。これらのことは、好酸球が IgE-CAI において慢性炎症の初期および増悪化に密接に関わっていることを示している。

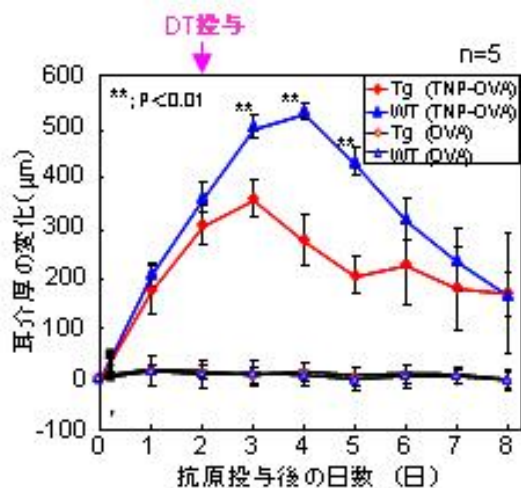


図5 IgE-CAI 誘導後 DT を投与すると皮膚腫脹が軽減される

(3) まとめ

本研究で樹立した誘導型好塩基球/好酸球欠損マウス (Basophil-TRECK マウスおよび Eosinophil-TRECK マウス) において、DT を投与することによって任意の時期に標的細胞をマウス生体内から除去することが可能であった。好塩基球は、近年急速に世界中の注目を集めるようになった免疫細胞である。次々と、好塩基球の新たな機能が解明されていく中で、Basophil-TRECK マウスは極めて有用であると考えられる。一方、好酸球はアレルギー性炎症で増加し、炎症を増悪化させるエフェクターとして重要な細胞であるが、その機能の詳細に関しては不明な点が多い。炎症局所における活性化好酸球が注目されているが、その機能を解析する上で Eosinophil-TRECK マウスが役立つと考えられる。これらのマウスは、好塩基球・好酸球の機能の解明に役立つばかりでなく、好塩基球・好酸球をターゲットとしたアレルギーの治療法の開発等への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yamashita H., Tasaki D., Makino T., Matsuoka K., Nose M., Inagaki N., Mizukami H.: The role of IgE and repeated challenge in the induction of persistent increase in scratching behavior in a mouse model of allergic dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* 605, 153-157, 2009 (査読有り)
- ② Takada T., Shitara H., Matsuoka K., Kojima E., Ishii R., Kikkawa Y., Taya C., Karasuyama H., Kohno K., Yonekawa H.: A novel hairless mouse model on an atopic dermatitis-prone genetic background generated by receptor-mediated transgenesis. *Transgenic Res.* 17, 1155-1162, 2008 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 元田明日香、松岡邦枝、設楽浩志、飛田良美、松尾千古、河野憲二、小原道法、米川博通：誘導型好酸球欠損マウスを用いたアレルギー反応の解析。第 31 回 日本分子生物学会年会、第 81 回 日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) 2008. 12. 10 神戸
- ② Yonekawa H., Shibata K., Sekine M., Matsuoka K., Shitara H., Taya C. and Amano T.: Improvement of a tissue-specific gene expression for TRECK method using a BAC clone. The 22nd International Mammalian Genome Conference (IMGC 2008), 2008. 11. 2-5, Prague, Czech
- ③ Motoda A., Shitara H., Kohno K., Yonekawa H. and Matsuoka K.: Establishment of an eosinophil-less mouse line by TRECK method. 首都大学東京バイオコンファレンス 2008, 2008. 10. 23., 東京
- ④ 松岡邦枝、元田明日香、設楽浩志、河野憲二、米川博通：標的細胞ノックアウト (TRECK) 法による誘導型好酸球欠損マウスの樹立とアレルギー反応の解析。第 30 回 日本分子生物学会年会、第 80 回 日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007), 2007. 12. 14., 横浜
- ⑤ Matsuoka K., Motoda A., Shitara H., Kohno K., Yonekawa H.: Establishment of an eosinophil-less model line by TRECK method. 21st International Mammalian Genome Conference, 2007. 10. 30., Kyoto

[その他]

ホームページ

<http://www.rinshoken.or.jp/LAS/index-jp.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 邦枝 (MATSUOKA KUNIE)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都

臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：40291158

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者