

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06477

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルの開発と好酸球標的医薬への応用

研究課題名(英文) Development of atopic dermatitis models using humanized mice for eosinophil target therapy

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・実験動物応用研究部・室長

研究者番号：60425436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト化マウスを用いてヒト細胞誘導性アトピー性皮膚炎モデルを開発し、ヒト細胞の機能解析と前臨床モデルを確立することが本研究の目的である。まず我々は、hIL-3/GM-CSF/IL-5 トリプルTgマウスを用いて、hIL-33の皮下投与によりアトピー性皮膚炎が惹起されるか検討したが、残念ながらこれらはT細胞浸潤や表皮の肥厚を示さなかった。次にTh2細胞が分化するhIL-4 Tgマウスを用い、オキサゾロン塗布による皮膚炎の誘導を試みた。その結果、Tgマウスの皮膚でT細胞の顕著な浸潤が認められた。以上の結果、hIL-4 Tgマウスがヒトアトピー性皮膚炎モデル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

本研究の学術的、社会的意義は、ヒト化マウスを用いてアトピー性皮膚炎を始めとしたアレルギーモデルを開発し、ヒト細胞の機能解析および前臨床モデルを確立し、医学、創薬研究に貢献することにある。ヒトアトピー性皮膚炎の病態解明や新たな治療法の開発において、皮膚炎病態を再現したヒト化動物モデルは極めて有益であり、アトピー性皮膚炎患者の生活の質の向上や、効果的な治療法の開発による医療費の削減につながる可能性がある。また本研究のような免疫系ヒト化マウスの開発、改良を重ねることで、他の免疫関連疾患の研究にも応用できる可能性があり、さらなる疾患治療の進歩に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a human cell-mediated model of atopic dermatitis using humanized mice and to analyze the function of human cells while establishing a preclinical model. Initially, we examined whether subcutaneous administration of hIL-33 induced atopic dermatitis in hIL-3/GM-CSF/IL-5 triple transgenic mice; however, unfortunately, these mice did not demonstrate T cell infiltration or epidermal thickening. Subsequently, we attempted to induce dermatitis by applying oxazolone to hIL-4 transgenic mice, which are capable of differentiating into Th2 cells. Consequently, we observed a significant infiltration of T cells in the skin of these transgenic mice. These findings suggest that the hIL-4 transgenic mouse is a useful model for human atopic dermatitis.

研究分野：アレルギー、実験動物、ヒト化マウス

キーワード：アレルギー ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞や組織が高度に分化、生着するヒト化マウスは、創薬における薬効や安全性の評価モデルとして認知されており、特に癌や感染症の分野では一定の注目を集めている。しかしながら、アレルギーや自己免疫疾患など複数の免疫細胞の相互作用により発症するヒト免疫疾患モデルはあまり検討されておらず、有効なモデル動物の開発が急務である。研究代表者は、これまでにヒト IL-3 と GM-CSF を導入したダブルトランスジェニック NOG マウス (IL-3/GM-CSF Tg マウス) を開発し、アレルゲン特異的 IgE 抗体とアレルゲンの投与により生体内脱顆粒を伴うアレルギー応答が惹起されることを見出した。さらにこの IL-3/GM-CSF Tg マウスとヒト IL-5 Tg マウスを掛け合わせた IL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスを作製し、IL-33 の気管内投与により好酸球性気管支喘息モデルを作製した。本研究では、NOG マウスを基盤とした新たなヒト遺伝子導入ヒト化マウスの開発などを行い、世界的にも未だ実現していないヒト化マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルの確立を目指す。

## 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎は、様々な細胞のクロストークにより引き起こされることがわかっているが、発症メカニズムは未だ不明な点が多く残されており、特に個々の免疫細胞の生体での役割を解明する必要がある。以前に研究代表者らが開発したヒト化 hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスは、ヒト T、B 細胞、マスト細胞、好塩基球、マクロファージなどに加え、ヒト好酸球が多量に分化する新たなヒト化マウスである。本研究では当該マウスまたは新たな NOG トランスジェニックマウスを基盤としてアトピー性皮膚炎を再現したヒト化マウスモデルを作製し、これらの病態形成におけるヒト免疫細胞の寄与について解析する。さらにこれらアトピー性皮膚炎モデルを用い、ヒト免疫細胞を標的とした抗体医薬による薬効評価を行い、前臨床評価モデルへの応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウス (Triple Tg) を用いた皮膚炎モデルの作製

Triple Tg マウスへヒト造血幹細胞を移入し、IL-33 を皮下投与してアトピー性皮膚炎モデルの作製を試みた。これまで報告されている野生型マウスを用いたモデルでは、5 µg のリコンビナントマウス IL-33 を 7 日間連続で皮下投与することにより、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインの上昇とともにアトピー様皮膚炎症状が惹起されることが知られている。そのため、我々もこのプロトコールに準じ、リコンビナントヒト IL-33 を 7 日間連続で皮下投与し、病理学的解析および皮膚から単離した白血球画分のフローサイトメトリー解析により、投与部位へのヒト細胞浸潤を検討した。

### (2) NOG hIL-4 Tg マウスを用いた皮膚炎モデルの作製

新たに我々が作製した NOG hIL-4 Tg マウスを用い、ヒト PBMC 移入によりこれらをヒト化した後に、オキサゾロンの頻回塗布を行い、病理学的解析および皮膚浸潤 T 細胞のフローサイトメトリー解析により Th2 細胞を介した皮膚炎症状が惹起されるか検討した。

### (3) c-kit 変異 NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウス (W41-Triple Tg) の作製

最近我々は、ヒト造血系細胞の生着性を亢進させることを目的とし、c-kit 変異 NOG-W41 マウスを開発し、これらをヒト化する際には放射線前処置をせずともヒト免疫細胞が高度に分化することを見出している。この NOG-W41 マウスと Triple-Tg マウスを交配し、NOG-W41-Triple Tg (W41-Triple) マウスを作製した。これらへヒト造血幹細胞を移植し、好酸球などのアレルギー関連ヒト細胞について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウス (Triple Tg) を用いた皮膚炎モデルの作製

Triple Tg マウスを造血幹細胞によりヒト化し、14-16 週後にマウス皮下または気管内へ hIL-33 を頻回投与した。その結果、気管内投与によりマウス気管支へのヒト 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、従来の報告と同様の炎症病態が認められたが、皮下投与群では皮膚へのリンパ球浸潤、表皮の肥厚など炎症病態はほとんど観察されなかった。この結果から、ヒト化 NOG-Triple Tg マウスの皮膚炎モデルへの応用は困難であると思われた。

### (2) NOG hIL-4 Tg マウスを用いたハプテン誘導性皮膚炎モデルの作製

造血幹細胞移入ヒト化マウスは、ヒト T 細胞の分化は認められるもののアレルギー誘導に寄与する Th2 細胞への成熟が不十分であることが知られている。我々は、ヒト IL-4 を発現する NOG-hIL-4 Tg マウスを開発し、hPBMC 移植後に IL-4 産生 Th2 細胞が分化することを見出した。本研究では、このヒト Th2 誘導モデルを用いてアトピー性皮膚炎の惹起が可能か検討した。NOG マウスおよび NOG-hIL-4 Tg マウスへ hPBMC を尾静脈投与し、その後皮膚にオキサゾロンを経時的に頻回塗布し、皮膚への細胞浸潤について観察した。まず、hIL-4 Tg マウスにおけるオキサゾロン塗布後の皮膚を観察したところ、塗布部位の皮膚がカサブタ様に変質し (図 1)、搔痒行動も見られた。さらに、免疫組織染色により

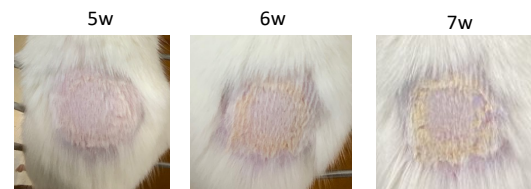


図 1 NOG-CAG-hIL-4 Tg マウスへの OXA 塗布後の皮膚

皮膚浸潤 T 細胞を調べたところ、NOG マウスでは T 細胞の浸潤はほとんど観察されなかったが、hIL-4 Tg マウスでは顕著なヒト T 細胞の皮膚浸潤が認められた (図 2)。本結果から、hPBMC 移入 NOG hIL-4 Tg マウスは、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして有用である可能性が示唆された。

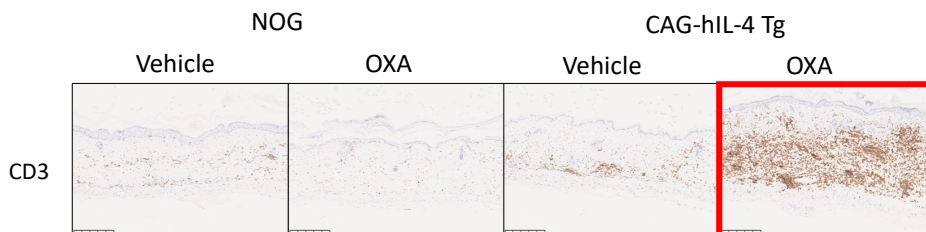


図 2 OXA 塗布後の NOG-CAG-hIL-4 Tg マウス皮膚におけるヒト T 細胞浸潤

(3) c-kit 変異 NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウス (W41-Triple Tg) の作製

Triple Tg マウスへ c-kit 変異を導入した W41-Triple Tg マウスを開発し、放射線照射を必要とせず、簡便にヒト化できるアレルギーモデルの作出を試みた。従来の放射線照射した Triple Tg マウスと放射線非照射 W41-Triple Tg マウスへ  $2.5 \times 10^4$  個の CD34+造血幹細胞を移入したところ、8 週後の血中ヒト細胞キメラ率はほぼ同等であったが、ヒト好酸球の割合は W41-Triple Tg マウスで顕著に亢進した。この結果から、W41-Triple Tg マウスは高感度で好酸球性アレルギーを誘発できる新たなヒト化アレルギーモデルのレシピエントとなる可能性が示唆された。今後、W41-Triple Tg マウスを用いて気管支喘息、アトピー性皮膚炎などの誘導を試み、当該モデルの更なる有用性を示していきたいと考えている。

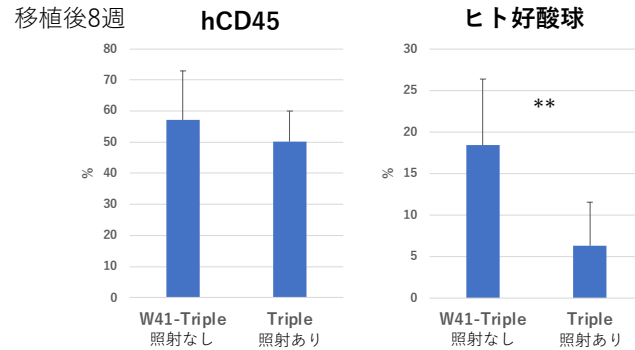


図3 ヒト造血幹細胞移入 W41-Triple Tg マウスの血中 hCD45 細胞とヒト好酸球のキメラ率

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Sakurai Masatoshi, Ishitsuka Kantaro, Ito Ryoji, Wilkinson Adam C., Kimura Takaharu, Mizutani Eiji, Nishikii Hidekazu, Sudo Kazuhiro, Becker Hans Jiro, Takemoto Hiroshi, Sano Tsubasa, Kataoka Keisuke, Takahashi Satoshi, Nakauchi Hiromitsu, Yamazaki Satoshi	4. 巻 615
2. 論文標題 Chemically defined cytokine-free expansion of human haematopoietic stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 127 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-05739-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Ryoji, Katano Ikumi, Kwok Immanuel W.H., Ng Lai Guan, Ida-Tanaka Miyuki, Ohno Yusuke, Mu Yunmei, Morita Hanako, Nishinaka Eiko, Nishime Chiyoko, Mochizuki Misa, Kawai Kenji, Celhar Teja, Takahashi Riichi, Ito Mamoru	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficient differentiation of human neutrophils with recapitulation of emergency granulopoiesis in human G-CSF knockin humanized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111841 ~ 111841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kashiwagi Hirofumi, Seki Toshiro, Oshima Shino, Ohno Yusuke, Shimizu Tomoka, Yamada Soga, Katano Nagi, Goto Yumiko, Yasuda Atsushi, Tsuda Banri, Ito Ryoji, Izumi Shun-ichiro, Ishimoto Hitoshi, Shiina Takashi, Kametani Yoshie	4. 巻 13
2. 論文標題 High-progesterone environment preserves T cell competency by evading glucocorticoid effects on immune regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1000728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yosuke, Takeda Reina, Fukushima Tsuyoshi, Mikami Keiko, Tsuchiya Shun, Tamura Moe, Adachi Keito, Uemoto Terumasa, Asada Shuhei, Watanabe Naoki, Morishita Soji, Imai Misa, Nagata Masayoshi, Araki Marito, Takizawa Hitoshi, Fukuyama Tomofusa, Ito Ryoji, Goyama Susumu, Komatsu Norio, Takaku Tomoiku, Kitamura Toshio	4. 巻 13
2. 論文標題 Eliminating chronic myeloid leukemia stem cells by IRAK1/4 inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27928-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Katano Ikumi, Hanazawa Asami, Otsuka Iyo, Yamaguchi Takuya, Mochizuki Misa, Kawai Kenji, Ito Ryoji, Goto Motohito, Kagawa Takahiro, Takahashi Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a novel humanized mouse model for improved evaluation of in vivo anti-cancer effects of anti-PD-1 antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00641-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi Takuya, Katano Ikumi, Otsuka Iyo, Ito Ryoji, Mochizuki Misa, Goto Motohito, Takahashi Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of Novel Human Red Blood Cell-Bearing Humanized Mouse Models Based on C3-Deficient NOG Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 671648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.671648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohno Yusuke, Ohshima Shino, Miyamoto Asuka, Kametani Fuyuki, Ito Ryoji, Tsuda Banri, Kasama Yukie, Nakada Shunsuke, Kashiwagi Hirofumi, Seki Toshiro, Yasuda Atsushi, Ando Kiyoshi, Ito Mamoru, Tokuda Yutaka, Kametani Yoshie	4. 巻 11
2. 論文標題 HER2-antigen-specific humoral immune response in breast cancer lymphocytes transplanted in hu-PBL hIL-4 NOG mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92311-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomoo Eto, Hiroki Ueda, Ryoji Ito, Tsukasa Takahashi, Toshiaki Watanabe, Motohito Goto, Yusuke Sotomaru, Nobuaki Tanaka, Riichi Takahashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of an integrated automated embryonic manipulation system for producing genetically modified mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91148-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang B, Iriguchi S, Waseda M, Ueda N, Ueda T, Xu H, Minagawa A, Ishikawa A, Yano H, Ishi T, Ito R, Goto M, Takahashi R, Uemura Y, Hotta A, Kaneko S.	4. 巻 5
2. 論文標題 Generation of hypoinmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 429-440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-021-00730-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 伊藤亮治	4. 巻 76
2. 論文標題 ヒト化マウスを用いたアレルギー疾患解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫アレルギー科	6. 最初と最後の頁 229-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kayamori Kensuke, Nagai Yurie, Zhong Cheng, Kuribayashi Wakako, Oshima Motohiko, Nakajima-Takagi Yaeko, Yamashita Masayuki, Mimura Naoya, Becker Hans Jiro, Izawa Kiyoko, Yamazaki Satoshi, Iwano Satoshi, Ito Ryoji, Lennox William, Sheedy Josephine, Yokote Koutaro, Iwama Atsushi	4. 巻 5
2. 論文標題 DHODH inhibition synergizes with DNA-demethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 438 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020001461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ka Yuyo, Katano Ikumi, Nishinaka Eiko, Welcker Jochen, Mochizuki Misa, Kawai Kenji, Goto Motohito, Tomiyama Kayo, Ogura Tomoyuki, Yamamoto Taichi, Ito Mamoru, Ito Ryoji, Takahashi Riichi	4. 巻 229
2. 論文標題 Improved engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NOG MHC double knockout mice generated using CRISPR/Cas9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 55 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2020.11.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Ryoji, Katano Ikumi, Otsuka Iyo, Takahashi Takeshi, Suemizu Hiroshi, Ito Mamoru, Simons Peter J	4. 巻 33
2. 論文標題 Bovine $\gamma$ -lactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM-CSF transgenic mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 183 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhong Cheng, Kayamori Kensuke, Koide Shuhei, Shinoda Daisuke, Oshima Motohiko, Nakajima Takagi Yaeko, Nagai Yurie, Mimura Naoya, Sakaïda Emiko, Yamazaki Satoshi, Iwano Satoshi, Miyawaki Atsushi, Ito Ryoji, Tohyama Kaoru, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Lennox William, Sheedy Josephine, Weetall Marla, Iwama Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 Efficacy of the novel tubulin polymerization inhibitor PTC 028 for myelodysplastic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4336 ~ 4347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katano Ikumi, Ito Ryoji, Kawai Kenji, Takahashi Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Improved Detection of in vivo Human NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Using a Novel NOG-Fc $\gamma$ R-Deficient Human IL-15 Transgenic Mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.532684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -



〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤亮治、Yunmei Mu、大野裕介、後藤元人、高橋利一、伊藤守
2. 発表標題 ヒト樹状細胞が分化する免疫系ヒト化マウスの開発
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoji Ito, Yunmei Mu, Yuyo Ka, Yusuke Ohno, Motohito Goto, Riichi Takahashi, Mamoru Ito
2. 発表標題 Improvement of human hematopoiesis in c-kit mutant NOG mice transferred with human HSCs
3. 学会等名 第84回日本血液学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤亮治
2. 発表標題 免疫不全マウスの開発とヒト化マウスへの応用
3. 学会等名 第36回日本下垂体研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoji Ito, Ikumi Katano, Immanuel W.H. Kwok, Lai Guan Ng, Miyuki Ida-Tanaka, Yusuke Ohno, Teja Celhar, Motohito Goto, Riichi Takahashi, Mamoru Ito
2. 発表標題 Human neutrophil differentiation in HSC-transferred NOG hG-CSF knock-in mice
3. 学会等名 International workshop on humanized mice 6th（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------