

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06478

研究課題名（和文）コモンマーモセットを用いた食物アレルギーモデルの確立と前臨床評価系への応用

研究課題名（英文）Establishment of a food allergy model using common marmosets and applicable for preclinical evaluation systems.

研究代表者

佐藤 賢哉（Sato, Kenya）

公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット医学生物学研究部・室長代理

研究者番号：00549149

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）：食物アレルギー患者は増加傾向にあるが、疾患研究に資する前臨床モデル動物はこれまでに確立されていない。本研究では霊長類の実験動物であるコモンマーモセットを用いて食物アレルギーモデル動物の作出、および疾患研究に資する抗マーモセットイムノグロブリンモノクローナル抗体の作製を実施した。動物実験においては、まず野生型のコモンマーモセットがヒトと同様のアレルギー反応系を持つことが解った。さらに、作出した疾患モデル動物にヒト抗体医薬を投与したところ、ヒト患者と同様にアレルギー反応が抑制されることが示された。したがって、本研究で作出した疾患モデル動物は将来的に前臨床研究に貢献す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

食物アレルギーの研究ではマウスモデルが広く用いられているが、生物学的な種差により得られた結果のすべてをヒトに外挿することは難しい。本研究はそのギャップを霊長類の実験動物で補充可能であるかを検討した。研究成果では、コモンマーモセットを用いて食物アレルギーモデルの作製方法やその特性が示され、前臨床モデルとなり得る可能性が見出された。将来的にこのモデル動物が普及すれば、アレルギーの新薬の開発や新たな治療法の確立の加速化に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although the number of patients with food allergies is increasing worldwide, no preclinical animal models have been established for research into this condition. In this study, we used the common marmoset as a primate experimental animal to develop a food allergy animal model and generate anti-marmoset immunoglobulin monoclonal antibodies for disease research. In our animal experiments, we found that wild-type common marmosets have an allergic response system similar to that of humans. Furthermore, when the disease model animals were administered a human antibody drug, their allergic reactions were suppressed, as observed in human patients. Therefore, this indicates that the animal model generated in this study will contribute to future preclinical studies.

研究分野：発生生物学

キーワード：コモンマーモセット 食物アレルギー

1. 研究開始当初の背景

近年、先進諸国での食物アレルギー罹患患者は増加しており、我が国で実施された大規模調査でも乳児の有病率は 5~10%と試算されている。乳幼児期の患者で問題となるのはアナフィラキシーと呼ばれる全身性の急性アレルギー反応であり、患者とその関係者はアレルゲンの誤飲・誤食へ常に気を配り、また発症した場合に備えて常時アドレナリン製剤を携帯するなど精神的に非常に大きな負担を負う。したがって、食物アレルギーを根治するような新薬の研究開発は不可欠である。一般的に抗アレルギー薬の薬効および安全性試験は、げっ歯類を用いて行われているが、米国 FDA の報告によると、ほとんどの化合物はフェーズ 2 または 3 で開発中止を余儀なくされており、その原因として前臨床試験と臨床試験の隔たりが大きい点を挙げている。このことは、新薬の開発元にとって大きな損失となるだけでなく、何よりも患者の治療の機会を遠ざける大きな要因となる。このことから、ヒトへの外挿性が担保され、かつヒトと同様の薬効を再現できるような前臨床モデル動物の確立は重要である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトに近縁な非ヒト霊長類の実験動物であるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*、以下マーモセット) を用いて、これまでに報告の無い食物アレルギーモデルマーモセットの作出および前臨床研究への応用の可能性を検証する。また、食物アレルギーに関連する取り組みとして近年注目されている減感作療法 (Natsume et al. Lancet. 21; 389:276-286. 2017) にも着目し、依然として不明な点が多い免疫寛容のメカニズムについても併せて検討を行う。さらに、将来的な研究の発展に伴って必要と考えられる IgE 抗体の作製を行い、研究の基盤の整備を目指す。最後に、発展的な研究の一つとして、高度な清浄環境下で飼育しているクリーンマーモセットを用いたアレルギー誘導実験を行い、野生型との差異を評価することで、その有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) パッシブ全身性アナフィラキシー (PSA) 実験

Anti-NP キメラヒト IgE (Anti-NP-huIgE) モノクローナル抗体と NP-BSA (ハプテン) を用いて、マーモセット体内に人工的にアナフィラキシー反応を起こすことが可能であることを検証する。

(2) 食物アレルギーモデルの作出

野生型マーモセットに卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) を免疫することで食物アレルギーモデルの作出が可能かを検討する。また最適な OVA 投与方法を探索的に検証する。

(3) オマリズマブ投与実験

作出したモデル動物にヒトの抗体医薬品であるオマリズマブ (商品名: ゾレア) を投与することで、その薬効を評価する。

(4) 免疫寛容の誘導と抑制性免疫細胞の解析

減感作療法を用いて免疫寛容を誘導し、腸管粘膜中のリンパ球サブセットの検出を試みる。

(5) 抗マーモセット IgE モノクローナル抗体の作製

マーモセットの IgE コード領域のゲノム情報を基にリコンビナントタンパクを作製し、モノクローナル抗体の作製を試みる。

(6) クリーンマーモセットを用いた食物アレルギーモデルの作出

確立したモデル動物作出プロトコルを用いて、クリーンマーモセットを用いたアレルギー誘導実験を実施し、野生型マーモセットでの同実験との差異を評価する。

4. 研究成果

(1) PSA 実験

野生型マーモセットに Anti-NP-huIgE を静脈注射し、24 時間後に NP-BSA を静脈注射した。NP-BSA 投与後 0, 15, 30, 60 分の各時点で採血を実施し、血漿中のヒスタミン濃度を ELISA 法で測定したところ、BSA 投与の 15 分後からヒスタミン濃度の上昇が確認された (図 1)。以上の結果により、マーモセットを用いてアナフィラキシー反応を人工的に惹起させることが可能であることが示され、さらにヒト IgE はマーモセットのマストセル上の IgE レセプターと結合性を持つことが示唆された。

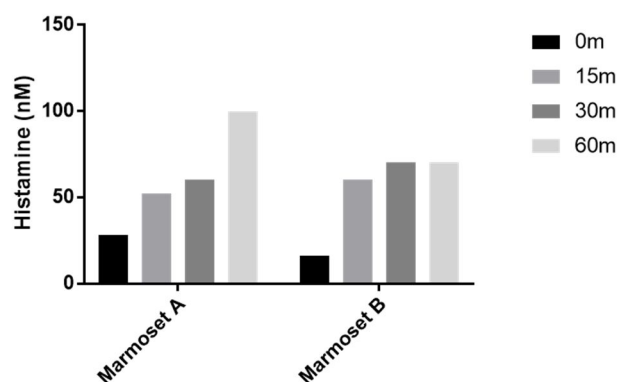


図 1. PSA実験における血中ヒスタミン濃度の経時変化

(2) 野生型マーマセットを用いた食物アレルギーモデルの確立

マウスを用いた先行研究 (Ando et al. J Clin Invest. 127: 4541-4553. 2017) を参考に、OVA をマーマセットに免疫し、その後 OVA の経口チャレンジを実施した。OVA チャレンジ実施後 0, 30, 60, 120 分の各時点で採血を実施し、血漿中のヒスタミン濃度を ELISA 法で測定したところ、OVA 経口チャレンジの 30 分後にヒスタミン濃度の上昇が見られることが示された (図 2)。また、条件検討の結果、OVA を用いてマーマセットに食物アレルギーを誘導するためには、OVA の免疫を 3 回実施すること、OVA の経口チャレンジを 3 回以上行うこと、またチャレンジ開始から 14 日以上を経過する必要があることが判明した。

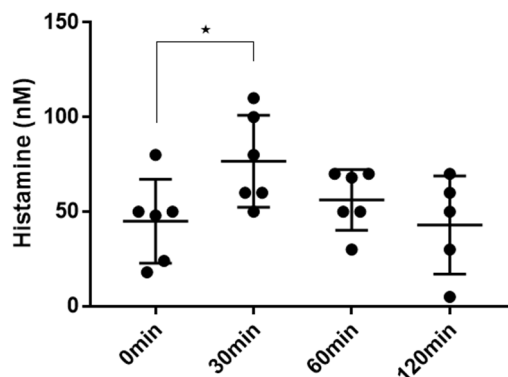


図2. 野生型マーマセットを用いたOVAチャレンジにおける血中ヒスタミン濃度。★: $P < 0.05$

(3) オマリズマブ投与実験

先述の検討によって見出した条件に従って 2 匹のマーマセットに OVA を免疫し、3 回目の経口チャレンジの前日に一方の個体にオマリズマブを投与した。OVA チャレンジ実施後 0, 30, 60, 120 分の各時点で採血を実施し、血漿中のヒスタミン濃度を ELISA 法で測定したところ、オマリズマブを投与した個体ではヒスタミン濃度の上昇が見られなかった (図 3)。以上の結果により、ヒトのアレルギー治療薬はマーマセットにおいてもヒトと同様の薬効を示すことが判明した。

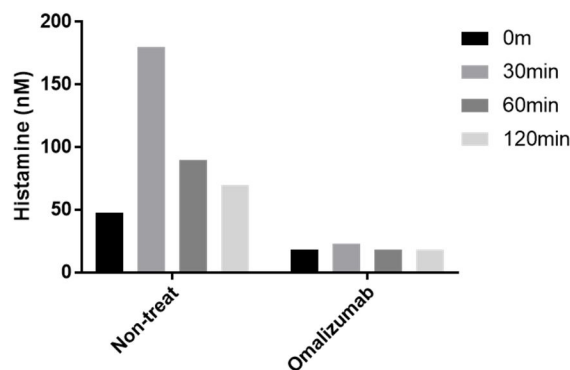


図3. オマリズマブ投与実験における血中ヒスタミン濃度の経時変化

(4) 免疫寛容の誘導と抑制性免疫細胞の解析

2 匹のマーマセットを準備し、一方の個体に OVA を感作する 1 ヶ月前から 100 μ g の OVA 経口投与を 1 日おきに実施した。OVA チャレンジ実施後 0, 30, 60, 120 分の各時点で採血を実施し、血漿中のヒスタミン濃度を ELISA 法で測定したところ、オマリズマブを投与した個体ではヒスタミン濃度の上昇が見られなかった。また、免疫寛容に関連するリンパ球の動向を捉えることを目的として、両個体の腸管粘膜の一部からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーによる解析を実施したが、明確な差異は見られなかった。

(5) 抗マーマセット IgE モノクローナル抗体の作製

マーマセットのゲノムデータベース中で IgE のコード領域を検索したところ、Fc の定常領域の情報のみが得られた。そのため、マーマセット IgG の Fab 部分を代用することで完全長の遺伝子組換え抗体を構築した。また抗体作製の際のコントロールとしての使用を目的として、マーマセット IgG の遺伝子組換え抗体も構築した。それらの抗体を抗原としてマウスに免疫することで、抗マーマセット IgE および IgG モノクローナル抗体のハイブリドーマを獲得した (図 4)。

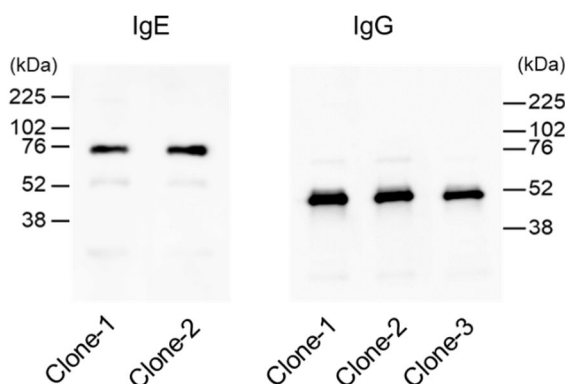


図4. 作製したモノクローナル抗体とマーマセット血漿を用いたウェスタンブロッティング

(6) クリーンマーマモセットを用いた食物アレルギーモデルの作出
先述の検討によって見出した条件に従ってクリーンマーマモセット OVA を免疫し、その後、経口チャレンジを実施した。OVA チャレンジ実施後 0, 30, 60, 120 分の各時点で採血を実施し、血漿中のヒスタミン濃度を ELISA 法で測定したところ、クリーンマーマモセットでは野生型マーマモセットの同実験と比較して、極めて早期にヒスタミン濃度の上昇が見られることが判明した (図 5)。

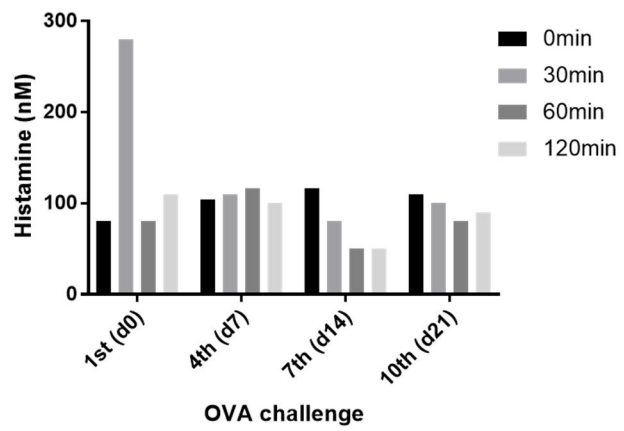


図 5. クリーンマーマモセットを用いた食物アレルギー実験の結果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------