

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500395

研究課題名（和文） 好塩基球の恒常的欠損マウスおよび誘導型欠損マウスの開発と免疫応答の解析

研究課題名（英文） Establishment of constitutive- and inducible- basophil depletion mouse models to study critical roles in immunological responses

研究代表者

松岡 邦枝（MATSUOKA KUNIE）

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：40291158

研究成果の概要（和文）：免疫応答における重要性が注目されている好塩基球の機能を解明するためのツールとして、2種類の好塩基球マーカー（FceRIa および CD49b）のプロモーターを用いた Cre-loxP システムにより、マウス生体内から好塩基球を除去する事が可能なマウスを作製した。FceRIa 陽性かつ CD49b 陽性細胞特異的にジフテリア毒素（DT）レセプターを強制発現するモデルでは、DT の投与により末梢血の好塩基球が特異的に減少し、好塩基球の生体内における機能を解析するために有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have newly generated basophil-depletion mouse models to study critical roles in immunological responses by Cre-loxP based system using both *FceRIa* promoter and *CD49b* promoter. After DT administration to the double transgenic mice expressing DTR on basophils, drastic decrease of basophil population were observed in peripheral blood. The mouse models established in this study should be useful and powerful tools to study *in vivo* roles of basophils.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：疾患モデル・アレルギー・好塩基球・IgE・トランスジェニックマウス・ジフテリア毒素・TRECK 法

1. 研究開始当初の背景

好塩基球は末梢の全白血球の 0.5%程度をしめるに過ぎない最少細胞集団である。細胞表面に高親和性 IgE レセプター（FceRI）を発現し、細胞内にはヒスタミンをはじめとする炎症メディエーターを含む顆粒を持つというマスト細胞と類似した特徴を示すことから、「血液中のマスト細胞」と軽視され、

アレルギー研究においてマスト細胞の研究が発展したにも関わらず、好塩基球は注目されず、その機能については不明な点が多かった。我々は、アレルギーモデルとして世界に先駆けて開発した抗原特異的 IgE トランスジェニック（Tg）マウス（*Int. Immunol.* 11: 987-994, 1999）を解析する過程で、「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、「IgEとFcεRI依存的に慢性アレルギーを誘導する機構が存在する」ことを発見し、その責任細胞が好塩基球であることを明らかにした (*Immunity* 23: 191-202, 2005)。その後、好塩基球が注目されるようになり、これまで知られていたマスト細胞がIgE-FcεRIを介したシグナルによりヒスタミンを放出して引き起こされるアナフィラキシー反応とは全く異なり、好塩基球が、IgG1-FcγRIIIを介した抗原刺激によって血小板活性化因子(PAF)を放出しアナフィラキシーを引き起こすという全く新しいアナフィラキシーの発症機構が存在することが明らかにされた (*Immunity* 28: 581-189, 2008)。また、好塩基球はその細胞表面に抗原を保持しており、抗原の再曝露に対してIL-6およびIL-4の主要な産生源となり、B細胞の増殖と抗体産生を促進する、すなわち、好塩基球が免疫記憶において重要な役割を担っていることが判明した (*Nat. Immunol.* 9: 733-742, 2008)。前述のアナフィラキシーや免疫記憶に関する研究においては、抗CD200R3抗体Ba-103あるいは抗FcεRI抗体MAR-1を投与して好塩基球をマウス生体内から除去するという方法がとられている。しかしながら、このBa-103はavailableではないし、MAR-1は好塩基球だけでなくFcεRIを発現するマスト細胞にも影響を与えてしまい、純粋に好塩基球のみを枯渇するわけではない。

我々は以前より、好塩基球の機能を解明するためには好塩基球欠損マウスの樹立が必須と考え、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、標的とする細胞特異的にヒトジフテリア毒素レセプター(DTR)を発現するマウスを作製し、DTを投与することで標的細胞を死に至らしめるTRECK法 (*Nat. Biotechnol.* 19: 746-750, 2001)を応用して、誘導型の好塩基球欠損マウスの樹立を試みてきた。すなわち、ヒトの好塩基球活性化マーカーとして知られるCD203cプロモーターの制御下でDTRを発現するTgマウスを作製した。このTgマウスにDTを投与することにより、末梢血中の好塩基球が著しく減少し、IgE-FcεRI依存性慢性アレルギー反応による耳介腫脹反応が強く抑制されることを見出し、この方法が有効なことが明らかとなった。

2. 研究の目的

従来のTRECK法は標的細胞におけるDTRの発現をただ1種類のプロモーターでしか制御できなかった。そこで、TRECK法を改良し、2種類のプロモーターを用いて、より確実に、より効率的に好塩基球を傷害できる誘導型好塩基球欠損マウスを樹立する。

また、DTRの代わりにジフテリア毒素Aフラグメント(DTA)を発現する恒常的好塩基球欠損マウスも併せて樹立する。我々が開発を目指すのは、生体内の好塩基球のみを特異的にDT投与によりある時期から除去するモデルおよび恒常的に好塩基球を欠損するモデルであり、好塩基球の免疫応答における機能解析に役立つ画期的なツールとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 好塩基球誘導的/恒常的欠損マウスの作製

Cre-loxPシステムによりFcεRI⁺CD49b⁺細胞である好塩基球特異的にDTRあるいはDTAを強制発現するTgマウスを作製する。

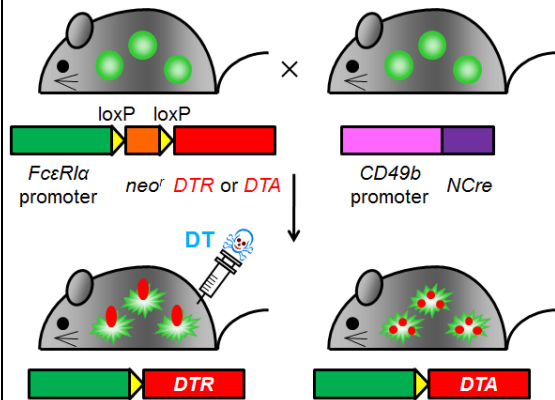


図1. 好塩基球誘導的/恒常的欠損マウス作製の原理

図1に好塩基球誘導的欠損マウスおよび恒常的欠損マウス作製の原理を示した。まず、CD49bプロモーターでCre遺伝子に核移行シグナルを付加したNCreの発現を制御するTgマウス [CD49bプロモーター-NCre] (CD49b-NCreマウス)とloxP配列の下流に配したDTRあるいはDTAの発現をFcεRIαプロモーターで制御するTgマウス [FcεRIαプロモーター-loxP-neo^r-loxP-DTR] (FcεRIα-loxP-DTRマウス)および[FcεRIαプロモーター-loxP-neo^r-loxP-DTA] (FcεRIα-loxP-DTAマウス)を作製した。それらを交配して得られるF₁マウスでは、FcεRIとCD49bを同時に発現する好塩基球のみでDTRもしくはDTAを発現するため、DTR発現マウスはDTを投与することで好塩基球が傷害され、DTA発現マウスは恒常的に好塩基球を欠失するという原理である。これら3種類のDNA組換え体を構築し、C57BL/6N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マウスを作出した。

(2) Tg マウスにおける導入遺伝子 mRNA 発現の解析

CD49b-NCre マウス末梢血白血球を抗 DX5 (CD49b) マイクロビーズを用いて MACS により CD49b 陽性画分と CD49b 陰性画分に分画した。それぞれの細胞画分より RNA を調整し、NCre に対する特異プライマーを用いて RT-PCR を行い、mRNA の発現を解析した。

FcεRIα-loxP-DTR マウスと受精卵早期にのみ Cre を発現する EIIa-Cre マウスのヘミ個体を交配し、野生型・片方のみのシングル Tg およびダブル Tg マウスを得た。それぞれのマウス脾臓細胞を抗マウス IgE 抗体および抗ラット Igk 鎖-マイクロビーズを用いて MACS により好塩基球画分と非好塩基球画分に分離して RNA を調整し、ヒト DTR (HB-EGF) に対する特異プライマーを用いて RT-PCR を行った。

(3) DT 投与後の好塩基球の解析

FcεRIα-loxP-DTR マウスと EIIa-Cre マウスあるいは CD49b-NCre マウスを交配し、ダブル Tg マウスを得た。DT を投与して 4 日後に末梢血中の好塩基球を FACS で解析した。

4. 研究成果

(1) CD49b-NCre マウス

CD49b-NCre マウスは 6 系統のファウンダーが得られた。各系統および野生型 (WT) マウス脾臓より MACS を用いて CD49b 陽性細胞を精製し、RT-PCR を行って NCre mRNA の発現を調べた。樹立した Tg マウスの全ての系統の好塩基球で NCre mRNA が発現していた (図 2)。その中で特に強い発現が認められた #18 系統をダブル Tg マウス作出のために使用することとした。

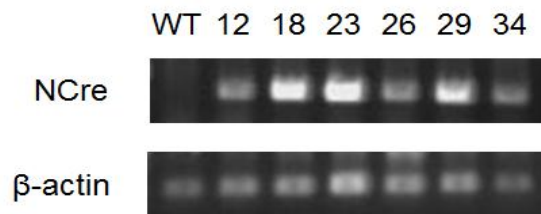


図 2. CD49b-NCre マウスにおける NCre mRNA の発現

(2) FcεRIα-loxP-DTA マウス

3 系統のファウンダーマウス (全てオス) が得られた。しかしながら、そのうち 2 系統

は全く産仔が得られなかった。もう 1 系統は野生型のメスとの交配により、産仔は得られるものの、外来遺伝子が導入された個体は全く得られなかった。これは、DTA が発生段階初期にリーキーに発現してしまい、マウス個体として成熟できなかった、あるいは、ファウンダーマウスがモザイクになっており、生殖細胞系に Tg が導入されなかった等の原因が考えられる。

(3) FcεRIα-loxP-DTR マウス

FcεRIα-loxP-DTR マウスは 6 系統のファウンダーが得られた。FcεRIα-loxP-DTR マウスでは、Cre リコンビナーゼの存在下でのみ loxP 配列の組換えが起こり、DTR が発現するようになる。まず、Cre の陽性コントロールとして EIIa-Cre マウスを用いて FcεRIα-loxP-DTR マウスとのダブル Tg マウスを作出して DTR の発現を確認した。FcεRIα-loxP-DTR マウス #132 系統のヘミ個体と EIIa-Cre ヘミ個体を交配して得た F₁ の各遺伝子型のマウス脾臓より MACS を用いて好塩基球とその他の細胞に分画し RT-PCR を行った結果、ダブル Tg マウスの好塩基球にのみ DTR mRNA の発現が認められた (図 3)。

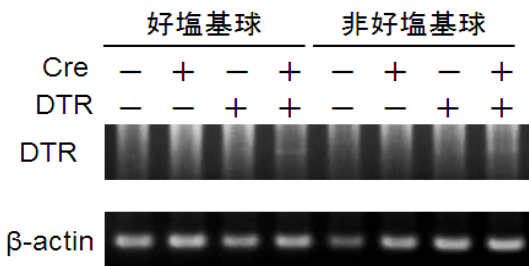


図 3. FcεRIα-loxP-DTR#132 と EIIa-Cre の F₁ における DTR の発現

(4) NCre/DTR ダブル Tg マウスへの DT 投与による好塩基球の傷害

WT、EIIa-Cre、CD49b-NCre#18、FcεRIα-loxP-DTR#132、EIIa-Cre と FcεRIα-loxP-DTR#103 または #115 のダブル Tg マウス、CD49b-NCre#18 と FcεRIα-loxP-DTR#132 のダブル Tg マウスに DT を 100 μg/kg 腹腔投与して 4 日後に末梢血の FACS 解析を行った。EIIa-Cre マウスと交配したマウスにおいて、FcεRIα-loxP-DTR#103 のダブル Tg マウスでは好塩基球の減少は認められなかったが、FcεRIα-loxP-DTR#115 とのダブル Tg マウスで好塩基球の軽微な減少が認められた。これは、系統による DTR の発現量の差に起因するものと考えられる。本研究の真の目的である好塩基球特異的に傷害する CD49b-NCre#18 と FcεRIα-loxP-DTR #132 のダブル Tg マウスでは、DT の投与に

より好塩基球が50%程度に減少した(図4)。

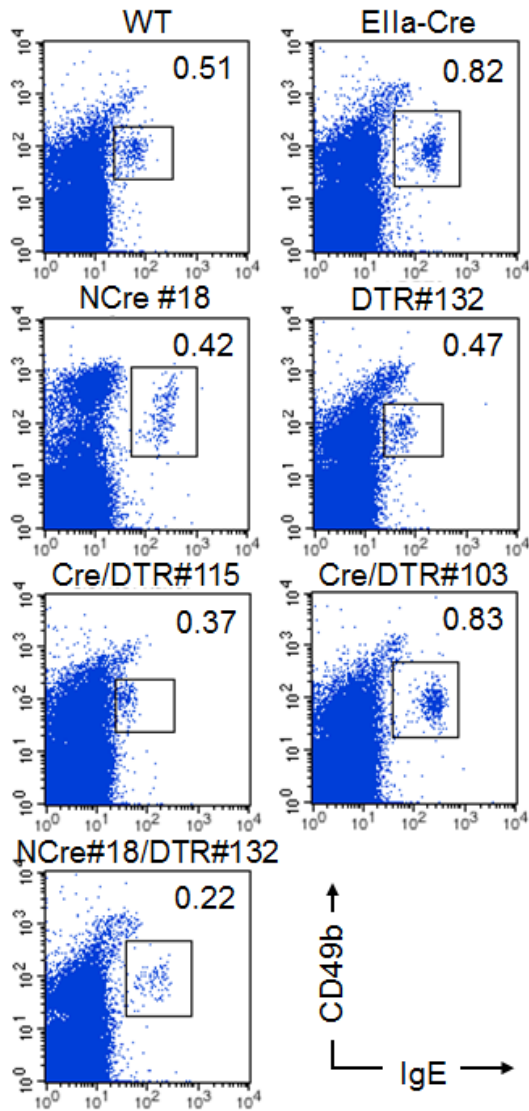


図4. DT投与後の末梢血好塩基球

本研究で樹立した DTR 発現型ダブル Tg マウスは、DT の投与により誘導的に好塩基球を傷害することができ、好塩基球の生体内における機能の解析に有用である。また、TRECK 法と Cre-loxP システムを組み合わせることで、マウス生体内の様々な細胞を標的とすることが可能であることが示された。

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 Sekine M, Monkawa T, Morizane R, Matsuoka K, Taya C, Akita Y, Joh K, Itoh H, Hayashi M, Kikkawa Y, Kohno K, Suzuki A, Yonekawa H: Selective depletion of mouse kidney proximal

straight tubule cells causes acute kidney injury. *Transgenic Res.*, 査読有, 21, 51-62, 2012,

DOI: 10.1007/s11248-011-9504-z

- ② Matsushima Y, Kikkawa Y, Takada T, Matsuoka K, Seki Y, Yoshida H, Minegishi, Y, Karasuyama H, Yonekawa H: An atopic dermatitis-like skin disease with hyper-IgE-emia develops in mice carrying a spontaneous recessive point mutation in the *Traf3ip2 (Act1/CIKS)* gene. *J. Immunol.*, 査読有, 185 : 2340-2349, 2010
DOI: 10.4049/jimmunol.0900694

[学会発表] (計9件)

- ① Ozaki M, Matsuoka K, Takada T, Ohno T, Tsuda K, Kono T, Yonekawa H, Kikkawa Y: Characterization of candidate genes associated with 2,4-dinitrofluorobzene-induced atopy-like dermatitis in NC/Nga. 第34回日本分子生物学会年会、2011.12.13-16、横浜
- ② 松岡邦枝, 設楽浩志, 河野憲二、米川博通 : TRECK 法による誘導型好塩基球破壊マウスの樹立と免疫応答の解析. 第58回日本実験動物学会総会、2011. 5. 25-27、東京
- ③ Matsushima Y, Kikkawa Y, Takada T, Matsuoka K, Yonekawa H: An Atopic Dermatitis-Like Skin Disease with Hyper-IgE-Emia Develops in Mice Carrying a Spontaneous Recessive Point Mutation in the *Traf3ip2 (Act1/CIKS)* Gene. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12. 7-10、神戸
- ④ Matsuoka K, Shitara H, Kohno K, Yonekawa H: Establishment of a basophil-less mouse line by TRECK method. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010.12. 7-10、神戸
- ⑤ 松岡邦枝, 設楽浩志, 元田明日香、松尾千古、河野憲二、米川博通 : 誘導型好酸球欠損マウスを用いた皮膚アレルギーの解析. 第57回日本実験動物学会総会、2010. 5. 12-14、京都
- ⑥ Yamaguchi J, Sekine M, Matsuoka K, Shitara H, Kohno K, Yonekawa H : Development of TRECK which is controllable by double promoters. 第32回日本分子生物学会大会、2009. 12. 9-12、横浜
- ⑦ 松岡邦枝, 元田明日香、設楽浩志, 松尾千

古、河野憲二、米川博通：誘導型好酸球欠損マウスを用いた皮膚アレルギーの解析。第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 21-24、神戸

- ⑧米川博通、関根美知子、多屋長治、松岡邦枝、秋田朗子、高浜純代、門川俊明、吉川欣亮、鈴木明身：標的細胞ノックアウト法 (TRECK 法) を利用した病態モデルの作製：腎臓近位尿細管直部特異的傷害モデルマウスを例にして。日本遺伝学会第 81 回大会。2009.9.16-18. 松本
- ⑨山口潤也、関根美知子、松岡邦枝、設楽浩志、河野憲二、米川博通：2 種類のプロモーターで制御可能な TRECK 法 (DPD-TRECK 法) の開発。第 56 回日本実験動物学会総会。2009. 5. 14-16、大宮

[図書] (計 2 件)

- ①Yonekawa H, Takada T, Shitara H, Taya C, Matsushima Y, Matsuoka K, Kikkawa Y: Mouse models for atopic dermatitis developed in Japan. Atopic Dermatitis—Disease etiology and Clinical management, 査読有, pp.21-38, 2012
DOI: 10.5772/26084
- ②米川博通、松岡邦枝：TRECK 法。モデル動物利用マニュアル <生物機能モデルの作製/新しいリソース・リサーチツール>小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 (編集)、査読無, pp.611-622, 2011
<http://homepage3.nifty.com/lic/books/nbs09.html>

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/mammal/index.html>

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総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員
研究者番号：40291158

(2)研究分担者

設楽 浩志 (SHITARA HIROSHI)
財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員
研究者番号：90321885