

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430099

研究課題名(和文) 生体内ヒトアレルギー応答を可能にしたヒト化マウスの開発

研究課題名(英文) Development of novel humanized mouse model recapitulated human allergic responses.

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・その他部局等・研究員

研究者番号：60425436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトマスト細胞、好塩基球が生体内で分化するNOG IL-3/GM-CSF Tgマウスを用い、ヒトアレルギー反応を起こすモデルマウスの確立を目的としている。スギ花粉症患者血清と花粉抽出液によるPCA試験を行ったところ、Tgマウスの皮膚組織においてヒトマスト細胞の脱顆粒に伴う顕著な反応が見られた。また当該TgマウスにさらにIL-5遺伝子を導入したIL-3/GM/IL-5トリプルTgマウスを作製し、これらの気管内にHDMを投与したところ、肺組織への好酸球浸潤を認めた。以上の結果から、本ヒト化マウスは抗アレルギー薬開発の前臨床モデルとして有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A purpose of this study is to develop human allergy model using humanized mice. We evaluated human allergic responses by PCA reaction using humanized hIL-3/GM-CSF Tg mice, which can be fully differentiated human mast cells and basophils, after administration of the serum from pollinosis patients and pollen extract. Human mast cell-mediated allergic reaction efficiently developed in the skin of Tg mice but not of nonTg mice. Furthermore, we established novel humanized mice introduced hIL-5 gene into IL-3/GM Tg mice. In lungs of these triple-Tg mice, human eosinophils has infiltrated after intratracheal administration of HDM. Therefore, these humanized mice may contribute to develop the new anti-allergic drugs.

研究分野：免疫学

キーワード：ヒト化マウス アレルギー

1. 研究開始当初の背景

花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患罹患率は先進国で特に増加傾向にあり、国民の健康被害だけでなく、経済活動への影響も大きく社会問題となっている。そのため、アレルギー疾患の制御に向けたヒトアレルギー反応を再現できる動物モデルの開発が急務である。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、様々な血液疾患、免疫疾患を *in vivo* で再現できる「ヒト化マウス」として、医薬品開発など臨床応用ツールとしての期待が高まっている。申請者は、NOG マウスにヒト造血幹細胞を移入し、ヒト造血・免疫系を再現する「免疫系ヒト化マウス」の開発を行ってきた。しかしながら、この免疫系ヒト化マウスにて分化するヒト免疫細胞系列は、主として T 細胞、B 細胞などのリンパ球系に偏っており、単球、顆粒球、マスト細胞などの骨髄系細胞への分化効率が極めて低く、このことは免疫系ヒト化マウスにおける重大な欠点と捉えられていた。特に顆粒球、マスト細胞はアレルギー応答に必須の細胞であるため、免疫系ヒト化マウスを用いたヒトアレルギー関連研究や抗アレルギー薬開発への応用は困難であった。申請者は、ヒト顆粒球、マスト細胞など骨髄系細胞の分化亢進を目的として、ヒト IL-3 および GM-CSF 遺伝子を導入したダブルトランスジェニック NOG マウス (NOG hIL3/GM-Tg マウス) を作製した。NOG hIL3/GM-Tg マウスへヒト造血幹細胞を移入し、ヒト免疫細胞の再構築能を解析したところ、従来のヒト化マウスでは全く観察されなかった CD203c 陽性かつ IgE 受容体 (FcεR) 陽性の成熟ヒト好塩基球およびマスト細胞が効率よく分化することを見出した。またこれらの細胞を試験管内で刺激すると、活性化マーカーである CD63 が発現し、さらには細胞内顆粒であるヒスタミンの放出が認められた。さらにヒト化 NOG hIL3/GM-Tg マウスへの抗 NP-IgE 抗体および NP-BSA 投与により、受動アナフィラキシー (PCA) 反応の誘導にも成功した。これらのことから、NOG hIL3/GM-Tg マウス内で分化したヒト好塩基球、マスト細胞はアレルギー反応を誘起できる機能的な細胞であり、本マウスを用いてヒトアレルギー応答を生体内で再現できる可能性が示唆された

2. 研究の目的

申請者はヒト顆粒球、マスト細胞など骨髄系細胞の分化亢進を目的として、NOG hIL3/GM-Tg マウスを作製した。本研究ではこの NOG hIL3/GM-Tg マウスを用い、アレルギー患者血清とそのアレルギーに対するアレルギー反応を示すヒトアレルギーモデル

マウスの開発を目的としている。ヒトアレルギーモデルマウスが実現できれば、抗アレルギー薬の前臨床試験やヒトアレルギー関連細胞の分化、機能解析等の基礎的研究にも有用であり、医学への貢献が十分に期待できる。

3. 研究の方法

1. hIL-3/GM-Tg マウスへの受動皮膚アナフィラキシー (PCA) の誘導

申請者は、既にヒト化 hIL3/GM-Tg マウスで分化したマスト細胞・好塩基球が FcεR の架橋により脱顆粒を起こす機能的成熟した細胞である事を明らかにしている。しかしながら、これらマスト細胞・好塩基球がヒト生体内で起こるアレルギー反応を再現し得るか、すなわちアレルギー患者由来特異的 IgE 抗体と当該アレルギーの複合体が、マスト細胞・好塩基球上の FcεR へ結合し、脱顆粒を引き起こすかについては未検討であった。そのため以下の手法により PCA 反応を指標とした生体内アレルギー応答の誘導を試みた。

高力価の抗原特異的 IgE 抗体を含む花粉症患者から血清を供与頂き、造血幹細胞によってヒト化した NOG hIL3/GM-Tg マウス皮内に投与する。その後、花粉抽出液とエバンスブルー色素を混合して静脈内投与し、皮内局所でのエバンスブルー色素の漏出、すなわち PCA 反応を指標としたアレルギー応答を惹起できるか検討した。

2. ヒト IL-33 の効能について検討する。マスト細胞や好塩基球は IL-33 レセプターを発現し、IL-33 刺激により脱顆粒が亢進する事が知られている。前述した花粉症患者由来血清にリコンビナント hIL-33 を混合して PCA 試験を試み、アレルギー反応の亢進が見られるか検討した。

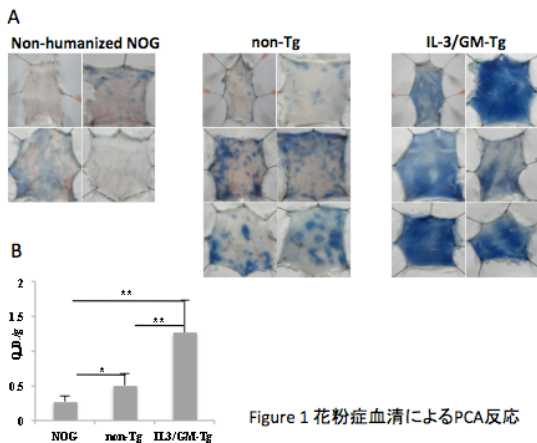
3. hIL3/GM-CSF/IL-5 トリプルトランスジェニックマウスを作製

以前に我々は、造血幹細胞移入後にヒト好酸球が顕著に分化する hIL-5 Tg マウスを開発した。本研究ではさらに hIL-3/GM Tg と hIL-5 Tg との交配により、hIL-3/GM/IL-5 トリプル Tg マウスを作製し、これらを造血幹細胞によりヒト化した後にハウスダストマイト (HDM) による気道炎症誘導、特に好酸球性炎症が惹起されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) hIL-3/GM-Tg マウスへの受動皮膚アナフィラキシー (PCA) の誘導

ヒト造血幹細胞によりヒト化した hIL-3/GM-CSF Tg マウスおよび nonTg マウスに花粉症患者血清を皮内投与し、翌日に花粉抽出液+エバンスブルーを静脈内投与した。その結果、IL-3/GM Tg マウスの皮膚組織において顕著な色素漏出が認められた (Figure 1A)。また、ヒト化していない NOG マウスでは色素漏出がほとんど見られなかったことから、この PCA 反応はヒトマスト細胞を介した反応である事が示唆された。さらにこれらの皮膚をホルムアミドに浸し、Tg マウスと nonTg マウスあるいは非ヒト化 NOG マウス間で有意差を認めた (Figure 1B)。この結果から、IL-3/GM Tg マウスは患者由来血清によってもアレルギー応答を観察できることが明らかとなり、アレルギー制御を目的とした前臨床モデルすなわち抗アレルギー薬開発の in vivo ツールとして応用可能である。



(2) IL-33 投与による PCA 反応の亢進
アレルギー応答の誘導には Th2 サイトカインが主体的な役割を担っており、特に最近では IL-33 がマスト細胞の脱顆粒を亢進させ、アレルギー症状を悪化させることが報告されている。ヒト化マウスにおいてもこの IL-33 のエフェクター機能が再現されるか調べるために、前述したアレルギー誘導試験系にヒト IL-33 を添加し、色素漏出を観察した。その結果、IL-3/GM Tg マウス皮内への IL-33 投与により、色素漏出が亢進している事が示された (Figure 2)。

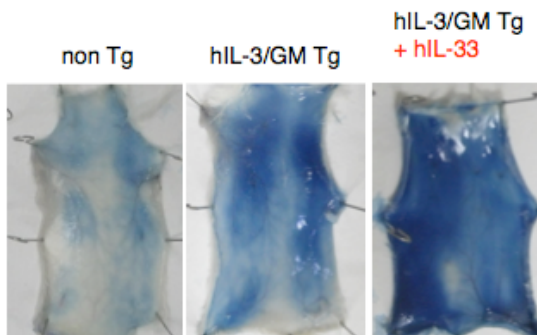


Figure 2 IL-33によるPCA反応の亢進

(3) hIL3/GM-CSF/IL-5 トリプルトランスジェニックマウスの作製

本研究では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、好酸球が分化するヒト化マウスを開発した。これまでの知見から、多くのアレルギー性喘息患者では気道粘膜下への好酸球浸潤が病態悪化の一因になると考えられている。そこで好酸球分化を誘導するサイトカイン IL-5 Tg マウスを樹立し、上述した IL-3/GM Tg と組み合わせたトリプル Tg マウスを作製し、ハウスダストマイト (HDM) の気管内投与によって好酸球浸潤を伴う喘息病態が再現されるか検討した。その結果、有意差は見られなかったものの、トリプル Tg マウスの肺胞洗浄液中に多数の好酸球浸潤が認められた (Figure 3)。今後、HDM 投与量、投与間隔、ヒト化後の実験適齢を検討して好酸球浸潤を伴うヒト喘息モデルを開発し、前臨床応用可能なヒト化マウスモデルの確立を目指す。

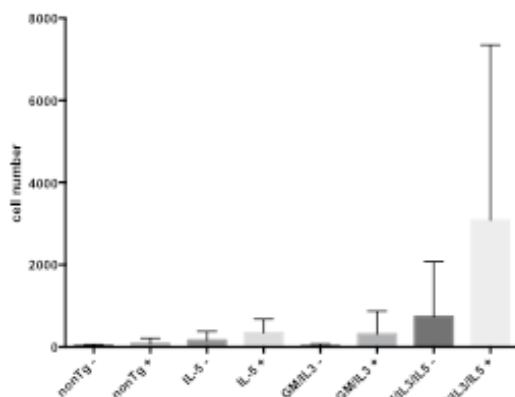


Figure 3 HDM投与後の好酸球数

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 8 件)

1. ヒト化マウスを用いたヒトアレルギーモデルの確立

伊藤亮治 「アレルギーの臨床」2015年11月号 No. 478:1164-68

2. Predominant development of mature and functional human NK cells in a novel human IL-2-producing transgenic NOG mouse.

Katano I, Takahashi T, Ito R (著者数 10 名、3 番目) Journal of Immunology 2015 Apr 1;194(7):3513-25

3. Visualization of the human CD4+ T-cell response in humanized HLA-DR4 expressing

NOD/Shi-scid/ γ c(null) (NOG) mice by retrogenic expression of the human TCR gene.

Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M. Biochem Biophys Res Commun. 2015;456:219-24

4. Role of Mouse Innate Immunity in Immunodeficient Mice for Xenotransplantation.

Ito R, Katano I and Ito M. Humanized Mice for HIV Research, Springer book in 2014, 25-32

5. NOD-Rag2null IL-2R γ null mice: an alternative to NOG mice for generation of humanized mice.

Katano I, Ito R, Kamisako T (著者数 10 名、2 番目) Experimental Animals 2014;63(3):321-30.

6. Effective expansion of engrafted human hematopoietic stem cells in bone marrow of mice expressing human Jagged1.

Negishi N, Suzuki D, Ito R (著者数 14 名、3 番目) Experimental Hematology 2014 Jun;42(6):487-94

7. Efficient in vivo depletion of CD8(+) T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration.

Yoshida T, Suzuki S, Ito R (著者数 15 名、13 番目) Immunology Letter 2013;154:12-7

8. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice.

Ito R, Takahashi T, Katano I (著者数 13 名、筆頭) Journal of Immunology 2011;191:2890-9

[学会発表] (計 5 件)

1. Intratracheal administration of IL-33 effectively induces eosinophilic airway inflammation in novel humanized NOG mice. 第44回日本免疫学会 札幌 2015 Dec 伊藤亮治

2. Pathology of cutaneous xeno-GVHD in human CD4 T cell transplanted NOG mice. 第42回日本免疫学会 幕張 2013 Nov 伊藤亮治

3. ヒト IL-3/GM-CSF トランスジェニック NOG マウスを用いたヒトアレルギーモデルの開発 第 60 回日本免疫学会 つくば 2013 May 伊藤亮治

4. IgE-mediated allergic responses in human mast cells in humanized NOG mice expressing human IL-3 and GM-CSF. Milano, Italy 2013 Aug 伊藤亮治

5. Human mast cell mediated allergic responses in humanized NOG mouse expressing human IL-3 and GM-CSF. 4th International Workshop on Humanized mice. Seoul, Korea 2013. Sep 伊藤亮治

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.ciea.or.jp/>

6. 研究組織
(1) 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 免疫研究室 研究員
研究者番号：60425436
(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号：