

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22537

研究課題名(和文)新規ヒト型IgG4産生マウスを用いたIgG4の病理的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathological significance of IgG4 using a novel mouse model

研究代表者

馬場 義裕 (Baba, Yoshihiro)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：20415269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトIgG4関連疾患では血中IgG4免疫グロブリンの高値と線維化を特徴とする自己免疫病である。また、IgG4がアレルギーを抑制することが示されており、IgG4とアレルギー疾患との関連性が疑われているものの、詳細は不明である。IgG4に関する研究が進展しない大きな理由として、マウスにIgG4が存在しないことが挙げられる。そこで、ヒトIgG4を産生する新規マウス樹立を作成した。本マウスのB細胞分化は正常であった。また、免疫によりIgG4の産生がみられた。以上のことから、新規に作成したIgG4産生マウスはin vivoでのIgG4の役割を検証するための有用なツールになる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作成した新規ヒトIgG4産生マウスは、これまで不可能だったIgG4陽性B細胞のin vivoでの活性化や分化、ならびにIgG4抗体の疾患制御の役割を検証することが可能となり、IgG4の病理的意義を直接的に調べることができる。よって、IgG4関連疾患およびアレルギー疾患の理解と予測、さらには、治療の選択に貢献できると考えられる。また、謎の多いIgG4の機能という、基礎免疫学の研究領域の発展に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：IgG4-related disease is characterized by high blood IgG4 antibody levels and fibrosis. In addition, IgG4 has been shown to suppress allergies. Although the relationship between IgG4 and allergic diseases is suspected, the details are unknown. A major reason for the lack of progress in IgG4 research is the absence of IgG4 in mice. Therefore, we generated a new mouse that produces human IgG4. We showed that B cell differentiation of this mouse was normal. In addition, IgG4 production was observed by immunization. Thus, the newly created IgG4-producing mouse may be a useful tool for verifying the role of IgG4 in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：IgG4

1. 研究開始当初の背景

IgG4 はヒト病態の悪化と抑制の二面性が知られている。例えば、IgG4 関連疾患は、様々な臓器の肥厚性病変を認める全身性疾患であり、血中 IgG4 の高値と、罹患部の IgG4 陽性プラズマ細胞の浸潤および線維化を特徴とするが、IgG4 の病的作用が示唆されている (文献 1-3)。一方、IgG4 がアレルギーを抑制することが示されており、IgG4 とアレルギー疾患との関連性が疑われているものの、詳細は不明である (文献 4)。ヒト IgG には IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 が存在するが、IgG4 は他のサブクラスと異なり、1) 補体と結合しない 2) Fc 受容体への結合が弱い 3) Fab-Fc 結合する 4) 二重特異性の IgG 分子を形成するというユニークな特徴をもつ (図 1)。In vitro 実験の報告はあるものの、IgG4 が免疫応答において果たす役割や IgG4 関連疾患における病態形成に対する意義は全く不明である。IgG4 研究の進展を阻んでいる大きな障壁は、マウスに IgG4 が存在しないことだと考えられる。そのため、IgG4 陽性 B 細胞や IgG4 の in vivo 解析ができないのが現状である。そこで、本研究課題ではこれらの問題点を克服するために、ヒト IgG4 を産生する新規マウスを樹立・解析することにより、IgG4 陽性 B 細胞の活性化・分化機序と IgG4 の病的意義を明らかにすることを到達目標とする。

Fabアーム交換による二重特異性抗体 Fab-Fc結合による機能阻害 Fc受容体への弱いシグナル惹起

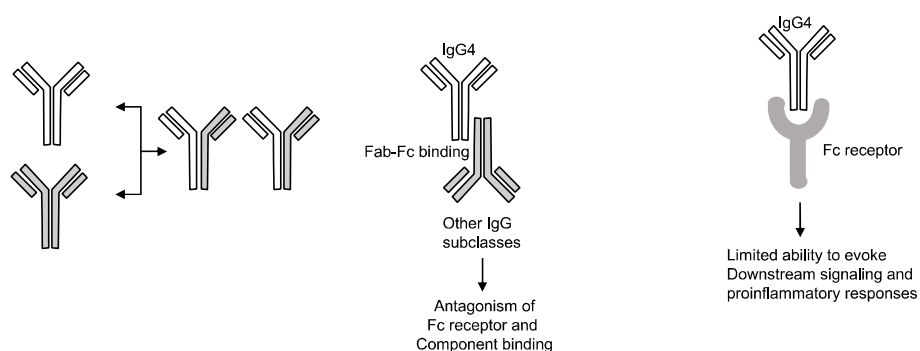


図1 IgG4抗体の特徴

2. 研究の目的

本研究では、新規ヒト IgG4 産生マウスモデルを樹立し、免疫グロブリン IgG4 産生 B 細胞の応答と免疫疾患病態の理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規ヒト IgG4 産生マウスの作成

B 細胞レセプター (BCR) の多様性を維持したままヒト IgG4 を発現する B 細胞および IgG4 抗体を分泌できるマウスの樹立を行った。マウス IgG1 の定常領域 (C 1) をヒト IgG4 の定常領域と入れ替えた系統を作成した (1-hIgG4 マウス)。コントロールとして同じ部位を欠損させた IgG1 ノックアウトマウスを樹立した。

(2) 1-hIgG4 マウスマウスの B 細胞分化と抗体産生

フローサイトメトリー

1-hIgG4 ヘテロマウスおよびコントロール IgG1 ヘテロ欠損マウスの骨髄、脾臓、腹腔内液から細胞を回収し、フローサイトメトリーにより B 細胞の数、分化の状態を解析した。

免疫と ELISA

静脈血から採血後、血清を回収し、ELISA 法により IgG1 および IgG4 の抗体価を検証した。100 μg NP-CGG (4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル・ハプテンが、アミド結合を介してチキンガンマグロブリン (CGG) リジンに結合させた抗原) とアラムを腹腔内に投与することによりマウスを免疫し、免疫後、1週間ごとに採血した。2nd チャレンジでは 100 μg NP-CGG で腹腔内投与により免疫した。免疫後の抗原特異的抗体は NP-BSA を用いた ELISA 法により検出した。

B 細胞培養実験

脾臓 B 細胞を CD43 ビーズによりネガティブセレクションでナイーブ B 細胞を単離した (95%以上の精度)。単離した B 細胞は anti-CD40+IL-4 で培養し、3 日後にフローサイトメトリーにて IgG1 および IgG4 のクラススイッチを検証した。

4. 研究成果

(1) 1-hIgG4 マウスの樹立

1-hIgG4 マウス F1 と C57B6/J WT マウスとの交配により 1-hIgG4 ヘテロマウスを樹立した。Genomic PCR によりノックインを確認した。本マウスはヒト 1 とマウス 1 を入れ替えているため、1-hIgG4 ヘテロはマウス IgG1 の片アリルがノックアウトされた状態になる。よって、コントロールとして IgG1 ノックアウトマウスを独自に樹立した。本マウスは生存可能で、繁殖に問題なく、予想されるメンデルの法則の頻度で仔が生まれた。

(2) 1-hIgG4 マウス解析

定常状態(非免疫) 1-hIgG4 ヘテロマウスマウスの血清を用いて、ELISA により抗体価を検証したところ、IgG1 抗体は野生型の約半分であった。1-hIgG4 ホモマウスでは、IgG1 抗体は完全にノックアウトされていることも確認した。血中ヒト IgG4 抗体は ELISA にて確認することができたことから、ヒト IgG4 産生マウス(1-hIgG4 マウス)の樹立に成功した。また、IgG1 ノックアウトマウスも同様に ELISA にて目的のターゲティングできていることを確認した。

1-hIgG4 ヘテロマウスおよび IgG1 ヘテロマウスの B 細胞分化を検証したところ、骨髄(proB, PreB, immature B, mature B 細胞) 脾臓(濾胞性 B 細胞、辺縁帯 B 細胞) リンパ節(B 細胞) 腹腔内 B 1 細胞の頻度および絶対数に野生型 B6 マウスと比較して大きな変化はなかった。よって、今回樹立したマウスラインは IgG4 を検証するためのツールとして問題ないと判断した。

(3) 1-hIgG4 マウスの IgG4 抗体応答

1-hIgG4 マウスを T 細胞依存的抗原である NP-CGG とアラムで免疫し、抗原特異的な免疫応答を経時的に検証した。その結果、NP 特異的な IgG1 抗体だけでなく、IgG4 抗体を検出することができた。この結果は、ヒト型 IgG4 を発現する B 細胞が、B-T 相互作用を介して、プラズマ細胞へ分化し、IgG4 抗体を産生することが可能であることを示している。さらに、IgG4 抗体において 2 次応答も示したことから、IgG4 陽性記憶 B 細胞が産生していることを強く示唆する。よって、本マウスは IgG4 抗体産生応答を検証するモデルとして有用であると考えられる。

(4) 1-hIgG4 マウス由来 B 細胞の IgG4 へのクラススイッチ

1-hIgG4 ヘテロマウス由来 B 細胞の IgG4 へのクラススイッチの頻度や IgG4 陽性 B 細胞の性状を検証するため、単離したナイーブ B 細胞を *in vitro* で anti-CD40 抗体と IL-4 で刺激した。3 日後にフローサイトメトリーにて、IgG1 と IgG4 陽性 B 細胞を調べると、IgG4 へのクラススイッチは IgG1 と同程度に起きていることがわかった。このことから、ヒト型 IgG4 を発現したマウス B 細胞の生存にも大きな影響がないと考えられる。

本研究で作成した新規ヒト IgG4 産生マウスは、これまで不可能だった IgG4 陽性 B 細胞の *in vivo* での活性化や分化、ならびに IgG4 抗体の疾患制御の役割を検証することが可能となり、IgG4 の病理的意義を直接的に調べることができる。よって、IgG4 関連疾患およびアレルギー疾患の理解と予測、さらには、治療の選択に貢献できると考えられる。また、謎の多い IgG4 の機能という、基礎免疫学の研究領域の発展に大きく貢献することが期待される。

< 引用文献 >

1. Kamisawa, T., Zen, Y., Pillai, S. & Stone, J. H. IgG4-related disease. *Lancet* 385, 1460-1471 (2015).
2. Huijbers, M. G., Plomp, J. J., van der Maarel, S. M. & Verschuuren, J. J. IgG4-mediated autoimmune diseases: a niche of antibody-mediated disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1413, 92-103 (2018).
3. Trampert, D. C., Hubers, L. M., van de Graaf, S. F. J. & Beuers, U. On the role of IgG4 in inflammatory conditions_ lessons for IgG4-related disease. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1864, 1401-1409 (2018).
4. Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J. & Rispens, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 39, 469-477 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuda T, Saito Y, Ono C, Kawata K, Baba A, Baba Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation and characterization of CD19-iCre mice as a tool for efficient and specific conditional gene targeting in B cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84786-6.	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 S, Ise W, Inoue T, Ito A, Ono C, Shima Y, Sakakibara S, Nakayama M, Fujii K, Miura I, Sharif J, Koseki H, Koni PA, Raman I, Li QZ, Kubo M, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Araki H, Miura F, Ito T, Kawakami E, Baba Y, Kurosaki T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Tet2 and Tet3 in B cells are required to repress CD86 and prevent autoimmunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Immunol.	6. 最初と最後の頁 950-961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-020-0700-y.	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 Sakaguchi T, Okumura R, Ono C, Okuzaki D, Kawai T, Okochi Y, Tanimura N, Murakami M, Kayama H, Umemoto E, Kioka H, Ohtani T, Sakata Y, Miyake K, Okamura Y, Baba Y, Takeda K.	4. 巻 31
2. 論文標題 TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 107755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107755.	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 Tanaka S, Baba Y.	4. 巻 1254
2. 論文標題 B Cell Receptor Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv. Exp. Med. Biol.	6. 最初と最後の頁 23-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-3532-1_2.	査読の有無 無
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 Baba Y, Saito Y, Kotetsu Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Heterogeneous subsets of B-lineage regulatory cells (Breg cells).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 155-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz068.	査読の有無 無
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 Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kurosaki T, Herrera PL, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N.	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store-operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 15562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52048-1.	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 Nakai A, Fujimoto J, Miyata H, Stumm R, Narazaki M, Schulz S, Baba Y, Kumanogoh A, Suzuki K.	4. 巻 216
2. 論文標題 The COMMD3/8 complex determines GRK6 specificity for chemoattractant receptors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Exp. Med.	6. 最初と最後の頁 1630-1647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181494.	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 齋藤雄一、馬場義裕	4. 巻 68
2. 論文標題 アレルギー発症と制御におけるB細胞の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギー	6. 最初と最後の頁 661-667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15036/arerugi.68.661.	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬場義裕
2. 発表標題 B細胞の免疫応答制御機構
3. 学会等名 第16回皮膚免疫疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場義裕
2. 発表標題 B細胞による自己免疫疾患制御
3. 学会等名 免疫と神経疾患オンラインセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場義裕
2. 発表標題 B細胞はどのようにして免疫応答を制御するのか
3. 学会等名 第93回染色体工学研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場義裕
2. 発表標題 B細胞の免疫応答制御機構
3. 学会等名 がん免疫セミナー（千葉）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場義裕
2. 発表標題 B細胞の免疫応答制御機構
3. 学会等名 がん免疫セミナー（東京）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場義裕
2. 発表標題 第18回レジェンドセミナー
3. 学会等名 免疫反応を抑制するB細胞（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono C, Kochi Y, Tanaka S, Yamamoto K, Baba Y.
2. 発表標題 Role of Fcrl5 in B cell immune response and peripheral tolerance.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka S, Ise W, Kurosaki T, Baba Y
2. 発表標題 Ten-eleven translocaion (Tet) in B cells prevent autoimmunity.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatano S, Tun X, Matsumoto M, Baba Y, Yoshikai Y.
2. 発表標題 Development of IL-17A+ V β 6 T cells in mouse thymus.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 馬場義裕	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 9
3. 書名 「B細胞分化」標準免疫学	

〔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