

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08801

研究課題名(和文) IgG4関連疾患モデル「ヒトIgG4ノックインマウス」の改良と各薬剤の有効性検討

研究課題名(英文) Improvement of IgG4-related disease model and its treatments

研究代表者

吉藤 元 (Yoshifuji, Hajime)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20422975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IgG4は抑制機能を発揮するIgGサブクラスとされ、いくつかの疾患と関連しているが、十分に解明されていない。マウスはヒトIgG4(hIgG4)と同一のIgGサブクラスを発現しないため、hIGHG4ノックイン(KI)マウスを作製した。IgG4の産生を促進するために、MRL/lprマウスと交配した。これらのマウスは血清中に高いIgG4濃度を示し、脾臓内のIgG4陽性形質細胞およびCD3+B220+CD138+ T細胞の増加、唾液腺や胃などの臓器で炎症の増悪を示した。MRL/lpr-IgG4KIマウスモデルは、IgG4関連疾患およびアレルギー性疾患の研究に役立つ可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4型自己抗体は、いくつかの自己免疫疾患において病原性を示す。一方、IgG4は、免疫制御M2マクロファージの機能を促進することにより、食物アレルギーに対する防御に関連している。我々は本マウスモデルにおいてIgG4型抗体が誘導されることを証明した。今回確立したマウスモデルは、アレルギー性疾患、IgG4-RD、IgG4型抗体関連疾患(天疱瘡、重症筋無力症、特発性膜性腎症、血栓性血小板減少症など)の病態生理を解明するために使用できる。

研究成果の概要(英文)：IgG4 is an IgG subclass that can exhibit inhibitory functions under certain conditions. Although several diseases have been associated with IgG4, its role remains unclear. Since mice do not express an identical IgG subclass to human IgG4 (hIgG4), hIGHG4 knock-in (KI) mice were generated and analyzed. To enhance the production of IgG4, an MRL/lpr-IgG4KI mice model was established by backcrossing. These mice showed a high IgG4 concentration in the sera and increased populations of IgG4-positive plasma cells and CD3+B220+CD138+ T cells in the spleen. Moreover, these mice showed aggravated inflammation in organs such as the salivary glands and stomach. The MRL/lpr-IgG4KI mouse model might be useful for studying IgG4-related disease and allergic diseases.

研究分野：膠原病学

キーワード：IgG4 IgG4関連疾患 モデルマウス IgGサブクラス MRL/lprマウス 形質細胞 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫グロブリン G4 (IgG4) は、ヒトに存在する IgG サブクラスの中で最も量が少ない (IgG サブクラスの約 5%) が、他の IgG サブクラスと異なる独自の特徴を有している。まず、IgG4 は Fc R および補体に対する結合親和性が低いため、他のサブクラスと比較して炎症を誘発する能力が低い。さらに、IgG4 は Fab-arm 交換能力 [1] を持ち、重鎖と軽鎖のペアを別の IgG4 分子と交換することで、2 つの異なる抗原結合部位を獲得することができる。さらに、血清 IgG4 レベルは、アレルギー疾患における IgE レベルと並行している。IgG4 は IgE とその抗原との結合を中和し、マスト細胞や好塩基球の活性化を抑制する [2]。IgG4 は、IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) の重要なマーカーであり、天疱瘡、重症筋無力症、血栓性血小板減少症、特発性膜性腎症で見られる自己抗体の主要なサブクラスである。しかし、その生理的意義ははまだ十分に解明されていない。

(2) マウスにおいて IgG1 はヒト IgG4 (hIgG4) のカウンターパートとして機能するとされている。T-ヘルパー2細胞によって誘導されるマウス IgG1 (mIgG1) と hIgG4 は C1q への結合力が弱く、ヒンジ領域において相同であり、抗原結合における柔軟性は同様である [3]。実際、天疱瘡、重症筋無力症、および IgG4-RD のマウスモデルにおいて、hIgG4 のカウンターパートとして mIgG1 が採用された研究がある。しかし、mIgG1 と hIgG4 は Fc RIIb への結合が異なる。mIgG1 は Fc RIIb に強く結合するが、hIgG4 は Fc RIIb と弱く結合する。ヒトでは、IgG3 が Fc RIIb に強く結合する IgG サブクラスである。これまで、mIgG1 を hIgG4 の代替として解析する研究はあったが、hIgG4 の機能をマウスの *in vivo* において解析した研究は少なかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、mIgG1 と機能が完全に一致しない hIgG4 の機能を調べることを目的とした。これまで、hIgG4 タンパク質のマウスへの発現を試みた研究はいくつかあるが、*hIGHG4* 遺伝子を発現するマウスの報告はない。したがって、本研究では、hIgG4-knock-in (KI) マウスモデルを確立し、その表現型を解析した。

(2) この新しく確立されたマウスモデルを、IgG4-RD、IgG4 型抗体関連疾患、アレルギー性疾患などの研究のためのプラットフォームとして役立てることを究極の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

C57BL/6NcrSlc および MRL/MpJmsSlc-lpr/lpr マウスは、株式会社日本 SLC より購入し、京都大学病院において SPF 環境で飼育された。*hIGHG4* ノックイン C57BL/6NcrSlc マウスの作製は、ユニテック株式会社に委託した。遺伝子改変マウスの作製および実験への使用については、京都大学組換え DNA 実験安全委員会の承認 (第 130154 号) を得た。京都大学大学院医学研究科実験動物研究所の承認 (MedKyo14148) を得て、マウスの実験操作に関するプロトコルを作成した。動物の苦痛を軽減するため、採血には麻酔 (イソフルラン吸入、導入: 4~5%、維持: 2~3%) を使用した。安楽死には炭酸ガスを使用した。

(2) *hIGHG4* ノックインマウスの設計と構築

生理機能を維持するため、マウス IgG1 遺伝子の Fc 部分のみをヒト IgG4 遺伝子に組み替え、*mIghg1* 遺伝子のエクソン 1、6、7 とイントロン 1、5、6 を残し、エクソン 2~5 とイントロン 2~4 を *hIGHG4* 遺伝子に置換してキメラ遺伝子とした。この配列を pBluescript II SK ベクターに挿入した。このベクターを C57BL/6NcrSlc マウスの胚性幹細胞 (ES) 細胞にエレクトロポレーションし、サザンブロッティングを行い、相同組換えを示す ES クローンを選択した。組換えられた ES クローンを Balb/c 胚盤胞に注入し、代理母マウスの子宮に移植した。得られたキメラマウスを野生型 C57BL/6NcrSlc マウスと交配し、第一世代 (F1) ヘテロ接合体マウスを作製した。さらに F1 マウスを Cre 遺伝子導入マウスと交配し、ネオマイシン耐性遺伝子を除去した。こうして C57/BL6-hIgG4KI マウスを確立した。

C57/BL6-hIgG4KI マウスを MRL/lpr マウスと 6 世代にわたって戻し交配し、MRL/lpr-hIgG4KI マウスを得た。

(3) 抗原刺激によるマウス抗体の誘導

組み換えヒト筋特異的チロシンキナーゼ (MuSK) とオバルブミン (OVA) (最終濃度 1mg/mL) を Complete Freund's Adjuvant (0日目) または Incomplete Freund's Adjuvant (14日目) で乳化し、C57BL/6NCIS1c マウスに皮下投与した。血清は0日目と56日目にサンプリングした。サブクラス特異的 ELISA は、MuSK と OVA をプレーティングし、マウス血清とインキュベートし、HRP 結合抗マウス IgG1 および抗ヒト IgG4 で検出することにより行った。

(4) フローサイトメトリー

MRL/lpr-hlgG4KI マウスから脾臓細胞を分離し、BD LSR Fortessa を使用して解析した。フローサイトメトリーデータは、FlowJo を用いて分析した。各実験において、非蛍光の抗 CD16/32 抗体を使用して、Fc 受容体をブロックした。

(5) 病理組織学的解析

マウスの脾臓、膵臓、腎臓、唾液腺、甲状腺、胃、前立腺、リンパ節は、免疫蛍光染色用に OCT コンパウンドで冷凍保存した。以下の一次抗体を使用した：抗マウス PE-CD4、FITC-IgG1 (1:100 希釈)、ヒト FITC-IgG4 (Abcam; ab99821) 抗体 (1:200 希釈)。組織は 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色および labelled streptavidin biotinylated antibody (LSAB) 染色を、京都大学院医学研究科解剖・病理・法医学研究センターへ委託した。LSAB の一次抗体として、抗マウス IgG および抗ヒト IgG4 を使用した。各臓器の炎症の重症度は in house で作成したスケールで評価した。各臓器に 0~2 点または 0~3 点を割り当て、0 点は各臓器の正常な観察に留めた。

4. 研究成果

(1) hIGHG4 ノックインマウスの作製

Rajewsky らの報告[4]を踏襲し、マウス *Igh* 遺伝子の *Ighg1* 定常領域を相同組換えにより hIGHG4 定常領域の配列に置換した hlgG4 ノックインマウスを作製した (C57BL/6NCrSlc バックグラウンド)。得られた F1 マウス同士を交配し、113 匹の子孫を得ることができた。その結果、野生型、ヘテロ型、ホモ型の遺伝子を 31:56:26 の割合で有していることがわかった。この比率はメンデル遺伝に合致しており、ホモ接合体マウスが致死的でなかったことが示唆された。マウスの外観に異常は見られなかった。

(2) C57BL/6-IgG4KI マウスにおける hIGHG4 mRNA および蛋白発現

C57BL/6-IgG4KI マウスの脾臓における m*Ighg1* および hIGHG4 遺伝子の mRNA レベルを定量化した。野生型マウス、ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスのそれぞれにおいて、m*Ighg1* 単独、m*Ighg1* と hIGHG4 の両者、hIGHG4 遺伝子単独の発現を検出した。次に、分泌型 IgG の発現を確認するために、マウスから得た血清を用いた ELISA を実施した。その結果、野生型マウスでは mIgG1 が、ヘテロ接合体マウスでは hlgG1 と mlgG4 の両方が、ホモ接合体マウスでは hlgG4 が検出された。ただし、hlgG4 の濃度は mlgG1 よりはるかに低かった。

しかし、C57BL/6-IgG4KI マウスの脾臓において、病理学的解析およびフローサイトメトリーにより hlgG4+細胞が検出されなかった。

(3) C57BL/6-IgG4KI マウスにおける IgG4 型抗 OVA 抗体および抗 MuSK 抗体の発現

特定の抗原に特異的な IgG4 型抗体がマウスで生理的に産生されているかどうかを確認するため、免疫実験を行った。重症筋無力症で hlgG4 型抗 MuSK 抗体が報告されていることから、hlgG4-KI マウスに OVA と組換えヒト MuSK を免疫した。MuSK 免疫野生型マウスでは、mIgG1 型抗 MuSK 抗体を検出したが、mIgG1 型抗 OVA 抗体は検出されなかった。MuSK で免疫した hlgG4-KI ホモマウスでは、hlgG4 型抗 MuSK 抗体が検出されたが、hlgG4 型抗 OVA 抗体は検出されなかった。OVA 免疫マウスではそれとは逆の結果が得られ、免疫マウスでは hlgG4 型特異的抗体が産生されていることが示唆された。

(4) MRL/lpr-hlgG4KI マウスにおける分泌型および膜型 IgG4 分子の発現

C57BL/6-IgG4KI マウスでは hlgG4 タンパク質量が少なかったため、MRL/lpr マウスとの戻し交配により MRL/lpr-hlgG4KI マウスモデルを作成した。MRL/lpr マウスは自己免疫背景を持ち、高ガンマグロブリン血症を呈するためである。その結果、MRL/lpr-hlgG4KI マウス末梢血中に高

濃度の hlgG4 を検出した。hlgG4 が MRL/lpr-IgG4KI ホモ接合体マウスでのみ発現していたのに対し、mIgG1 は MRL/lpr マウスでのみ発現していた。IgG2b と IgG3 の発現量は 2 系統間で差がなかった。

その後、MRL/lpr-hlgG4KI マウスから切除した臓器を病理学的に調べたところ、脾臓の赤脾髄に hlgG4+細胞が多数点在していた（図 1）。hlgG4+細胞は、形態的には形質細胞であった。さらに、免疫蛍光染色により、ホモ接合体 MRL/lpr-hlgG4KI マウスの脾臓では hlgG4+細胞が、MRL/lpr マウスの脾臓では mIgG1+細胞が検出されました。MRL/lpr マウスおよび MRL/lpr-hlgG4KI マウスの系球体にはそれぞれ mIgG1 および hlgG4 の沈着が検出された。

図 1.

anti-IgG4, avidin-HRP, DAB

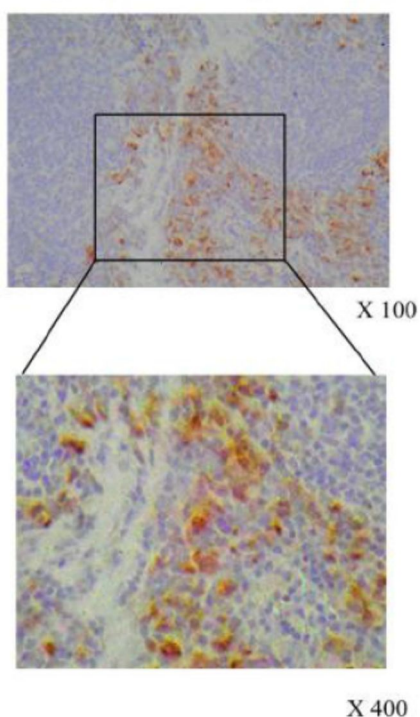


図 1. LSAB 染色で評価した MRL/lpr-hlgG4KI マウス脾臓（16 週齢）の赤脾髄における IgG4 陽性細胞。

(5) MRL/lpr-hlgG4KI マウスにおける炎症病態の亢進

C57BL/6-IgG4KI マウスの臓器には異常が見られなかったため、MRL/lpr-hlgG4KI マウスと MRL/lpr マウスの臓器標本を H&E 染色で比較しました。16 週齢では、MRL/lpr-hlgG4KI マウスと MRL/lpr マウスの臓器に明らかな差は見られませんでした。しかし、52 週齢では、MRL/lpr-hlgG4KI マウスの臓器は、MRL/lpr マウスの臓器よりも重度の炎症を示した（表 1）。しかし、血清中の IgG 型抗 DNA 抗体価は、MRL/lpr-hlgG4KI マウスで MRL/lpr マウスよりも低かった。

(6) MRL/lpr-hlgG4KI マウスの脾臓細胞の解析

MRL/lpr マウスは一般的に炎症性細胞の浸潤を特徴とする。MRL/lpr-hlgG4KI ホモ接合体マウスにおいて、どの脾臓細胞が活性化されるかを検討した。絶対脾臓細胞数は、野生型 MRL/lpr マウス ($2.03 \pm 0.19 \times 10^8$ /body) に比べ、MRL/lpr-IgG4KI マウス ($4.18 \pm 0.54 \times 10^8$ /body) では有意に多かった ($P = 0.0041$)。2 系統のマウス間でリンパ球の割合に差は見られなかった。MRL/lpr-IgG4KI マウスでは、CD3+B220-CD4+単一陽性 (SP) 細胞の割合が著しく低下していることがわかった。MRL/lpr-hlgG4KI マウスの CD4-SP 集団では、MRL/lpr マウスの CD4-SP 集団よりもセントラルメモリー (CM) T 細胞が増加し、エフェクター T 細胞が減少する傾向にあった。CD8-SP 細胞の割合、ナイーブ細胞、CM 細胞、エフェクター細胞の比率は、MRL/lpr マウスの CD8-SP 集団と比較して差はなかった。MRL/lpr マウスの特徴的な細胞である C3+CD4-CD8-B220+細胞の割合は、2 系統間で差がなかった。MRL/lpr マウスにおいて自己抗体産生と関連することが報告されている CD3+B220+CD138+T 細胞の割合が MRL/lpr-hlgG4KI マウスで有意に増加していた。また、CD69+

リンパ球の割合が MRL/lpr-hlgG4KI マウスで有意に増加していた。B220+CD69+細胞の割合は、MRL/lpr-hlgG4KI マウスでは MRL/lpr マウスよりも有意に高かった。B 細胞系統 (CD3-B220+) の解析では、MRL/lpr-hlgG4KI マウスでは CD3-B220+CD38+メモリーB 細胞の割合が減少し、一方 CD3-B220+CD138+形質細胞の割合は増加した。

表 1. H&E 染色した組織切片の病理スコア

	MRL/lpr (n = 3)	MRL/lpr-IgG4KI (n = 3)	<i>p</i>
唾液腺	1.33 ± 0.33	2.33 ± 0.33	0.1
甲状腺	1	2	-
肺	2.33	2.33	-
腎	2 ± 0.58	2.67 ± 0.33	0.37
膵	1	2	-
胃	1 ± 0.58	2.67 ± 0.33	0.08
前立腺	1 ± 0	1.67 ± 0.33	0.12
合計点	8.67 ± 1.76	15.67 ± 1.20	0.04

炎症の重症度スコアについては「研究の方法」を参照。
データは平均値 ± 標準偏差。p 値は Welch 検定で算出。

(まとめ)

本研究では、*h1GHG4* 定常領域を *mlghg1* 定常領域に置き換えたノックインマウスを作成し、hlgG4 の役割を検討しました。MRL/lpr-hlgG4KI マウスは、血清中の hlgG4 濃度が高く、IgG4+形質細胞が出現し、脾臓の CD3+B220+CD138+T 細胞数が増加した。また、MRL/lpr-hlgG4KI マウスは唾液腺や胃などの臓器の炎症が悪化していた。MRL/lpr-hlgG4KI マウスでは、hlgG4 レベルと CD3+B220+CD138+T 細胞数の増加が炎症の亢進に関与していると考えられた。MRL/lpr-hlgG4KI マウスモデルは、IgG4-RD、IgG4 型抗体関連疾患、アレルギー性疾患の研究に有用であると考えられる。

(参考文献)

1. van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*. 2007; 317(5844): 1554-1557.
2. Kanagaratham C, El Ansari YS, Lewis OL, Oettgen HC. IgE and IgG Antibodies as Regulators of Mast Cell and Basophil Functions in Food Allergy. *Front Immunol*. 2020; 11: 603050.
3. Lilienthal GM, Rahmoeller J, Petry J, Bartsch YC, Leliavski A, Ehlers M. Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fc Receptor Activation Pathways. *Front Immunol*. 2018; 9: 958.
4. Zou YR, Muller W, Gu H, Rajewsky K. Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr Biol*. 1994; 4(12): 1099-1103.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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）

1. 著者名 吉藤元	4. 巻 28
2. 論文標題 IgG4関連疾患のモデル動物と病因	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 315-320
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 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 Gon Yoshie, Kandou Tsugumitsu, Tsuruyama Tatsuaki, Iwasaki Takeshi, Kitagori Koji, Murakami Kosaku, Nakashima Ran, Akizuki Shuji, Morinobu Akio, Hikida Masaki, Mimori Tsuneyo, Yoshifuji Hajime	4. 巻 18
2. 論文標題 Increased number of T cells and exacerbated inflammatory pathophysiology in a human IgG4 knock-in MRL/lpr mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0279389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0279389	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉藤元, 権 淳英.
2. 発表標題 【シンポジウム3: IgG4関連疾患の病因・病態と治療】ヒトIgG4ノックインマウスの検討.
3. 学会等名 日本シェーグレン症候群学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------