

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15659

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いたエンドトキシンショックの新規治療法開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for endotoxic shock using a humanized mouse model

研究代表者

渋谷 彰 (Shibuya, Akira)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80216027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：複合型重症免疫不全マウス(NOGマウス)に、ヒト臍帯血を用いて造血幹細胞を移入しヒトの造血系を再構築したマウスを作製した。作製したヒト化マウスに、虫垂穿孔結紮法(CLP)により敗血症を誘導した。それぞれの敗血症モデルマウスについて、生存期間のほか、血清中のALT、ASTなどの肝逸脱酵素やIFN γ 、TNF- α 、IL-6、IL-8などを初めとしたサイトカイン、ケモカインの測定(ELISAまたは免疫ビーズ染色法で定量)動態などを解析した。その結果、抗ヒトCD300a抗体はヒト敗血症性ショックに対して有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established a humanized mouse model, in which the immune responses in human endotoxic shock in vivo can be analyzed. By using this model, we examine the effect of anti-human CD300a monoclonal antibody on the endotoxic shock. First, we established a humanized mouse by transfer of human hematopoietic cells into severe immunodeficiency mouse (NOG mouse) and induced sepsis by cecal puncture and ligation. We analyzed survival, ALT, AST, and proinflammatory cytokines and chemokines such as IFN γ , TNF- α , IL-6, and IL-8 by ELISA and immune-beads analyses. These analyses suggest that anti-human CD300a monoclonal antibody is useful for the treatment of human endotoxic shock.

研究分野：免疫学

キーワード：ヒト化マウス 敗血症 CD300a

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、グラム陰性細菌による感染を発端として、細菌が産生するエンドトキシンにより、多臓器不全、血圧低下、ショックなどの症状を引き起こす重篤な全身疾患である。腹膜炎や肺炎、術後感染などからの敗血症の発症数は世界的に増えつつあり、その死亡率は非常に高く、新たな画期的治療法が望まれる重要な疾患である。日本では年間38万人以上、米国では年間100万人以上が発症すると推定されている。

CD300aは、応募者らが同定したマスト細胞、樹状細胞、マクロファージなどの免疫細胞の細胞膜上に発現している免疫受容体である (Yotsumoto, et al, *J Exp Med* 198:223, 2003)。最近、応募者らは、CD300aがアポトーシス細胞膜上に表出するリン脂質であるフォスファチジルセリン (phosphatidylserine ; PS)に結合して免疫細胞の活性化を負に制御することを報告した (Nakahashi-Oda, et al. *Biochem Biophys Res Comm*, 417:646, 2012)。さらに、CD300a 遺伝子欠損マウスでは、虫垂結索穿孔 (Cecal ligation and puncture: CLP) による腹膜炎モデルで敗血症性ショックによる死亡率が有意に低下することを見いだした。同時に抗 CD300a 中和抗体投与によって CD300a と PS との結合を阻止すると、CD300a 遺伝子欠損マウスと同様に敗血症性ショックによる死亡率が有意に低下することを示した (Nakahashi-Oda, et al. *J Exp Med*, 209:1493, 2012)。しかし、抗ヒト CD300a 抗体によってヒトの敗血症性ショックが治療できるかどうかについては不明である。

ヒト化マウスは NOD/scid マウスと IL-2 レセプター γ 鎖遺伝子欠損マウスを掛け合わせた複合型重症免疫不全マウス (NOG マウス) に、ヒト造血幹細胞を移入しヒトの造

血系を再構築したマウスであり、マウスの体内でヒトの血液免疫系を観察することができる系である。マウスの体内でヒトの敗血症性**ショック**の免疫応答を観察できる系を確立し、治療法を検討することができる点が、本研究の特色である。本研究によって、抗ヒト CD300a 抗体の治療効果が確認できれば、敗血症性**ショック**に対する特異的な新規治療法開発の基礎となる。

マウスの免疫応答とヒトの免疫応答は必ずしも同じではなく、マウス疾患モデルで観察された事象がヒトの疾患にあてはまるとは限らない。本研究の成果により、マウスの体内でヒトの敗血症性ショックの免疫応答が再現できるようになれば、今後のこの領域の研究の推進に大きく貢献できるものと考えられる。さらに、本研究にて、「ヒトのヒト敗血症性ショック」における抗ヒト CD300a 抗体の治療効果が認められれば、敗血症性ショックに対する特異的な新しい治療法の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの造血系を再構築したヒト化マウスを作製し、CLP によりヒト敗血症性ショックの免疫応答をマウス体内で再現できる系を確立する。さらに、この系を用いて、抗ヒト CD300a 抗体の投与による敗血症性**ショック**の治療効果を検討する。

3. 研究の方法

マウスの生体内でヒト敗血症性ショックの免疫応答を観察できる系を確立し、抗ヒト CD300a 抗体の敗血症性ショックに対する治療効果を検討する。具体的には、まず、複合型重症免疫不全マウス (NOG マウス) に、ヒト臍帯血を用いて造血幹細胞を移入しヒトの造血系を再構築したマウスを作製する。ヒト化マウスが作製できたかどうかの確認は、12 週間後の抹消血のヒト CD45

陽性細胞の有無を指標とする。すでに当研究室で樹立した抗ヒト CD300a 中和抗体産生ハイブリドーマから大量の抗体を作製する。具体的にはハイブリドーマをヌードマウス腹腔内に移入し、腹水を得、これをカラム精製する。得られた精製抗体が、CD300a とフォスファチジルセリン (PS) の結合を阻害することを、ヒト CD300a トランスフェクタントと PS リポゾームを用いて *in vitro* の実験系で確認する。また、抗ヒト CD300a 抗体を生体に投与した際に、CD300a 発現細胞を除去してしまわないことも、*in vivo* で確認する。作製したヒト化マウスに、虫垂穿孔結索法(CLP)、または LPS 静注により敗血症を誘導する。それぞれの敗血症モデルマウスについて、生存期間のほか、血清中の ALT、AST などの肝逸脱酵素や IFN γ , TNF- α , IL-6, IL-8などを初めとしたサイトカイン、ケモカインの測定(ELISA または免疫ビーズ染色法で定量)、各臓器障害に対する組織学的解析、アポトーシス細胞の生成(AnnexinV 陽性細胞をフローサイトメトリー法および Tunnel 陽性細胞を組織学的に解析) 免疫組織である脾臓での各免疫細胞分画 (CD4 $^{+}$ T, CD8 $^{+}$ T, NK 細胞, B1 細胞, B2 細胞, 片縁帯 B 細胞, 樹状細胞, マクロファージ, 好中球, マスト細胞など) の動態などを解析する。また、それらのマウスに抗ヒト CD300a 抗体を投与し、その治療効果を観察する。

4 . 研究成果

マウスの生体内でヒト敗血症性ショックの免疫応答を観察できる系を確立し、抗ヒト CD300a 抗体の敗血症性ショックに対する治療効果を検討した。まず、複合型重症免疫不全マウス(NOGマウス)に、ヒト臍帯血を用いて造血幹細胞を移入しヒトの造血系を再構築したマウスを作製した。作製したヒト化マウスに、虫垂穿孔結索法(CLP)によ

り敗血症を誘導した。それぞれの敗血症モデルマウスについて、生存期間のほか、血清中のALT、ASTなどの肝逸脱酵素や IFN γ , TNF- α , IL-6, IL-8などを初めとしたサイトカイン、ケモカインの測定(ELISAまたは免疫ビーズ染色法で定量)動態などを解析した。その結果、抗ヒトCD300a抗体はヒト敗血症性ショックに対して有効である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計9件)

1. Nakahashi-Oda C, Udayanga KGS, Nakamura Y, Nakazawa Y, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. *Nature Immunol*, 17(4):441-450, 2016 査読有 (DOI: 10.1038/ni.3345)
2. Georgiev H, Ravens I, Shibuya A, Förster R, Bernhardt G. CD155/CD226-interaction impacts on the generation of innate CD8 $^{+}$ thymocytes by regulating iNKT-cell differentiation. *Eur J Immunol*, 1-11, 2015 査読有 (DOI: 10.1002/eji.201546073)
3. Vo AV, Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. *Mol Immunol*, 69:70-76, 2015 査読有 (DOI: 10.1016/j.molimm.2015.11.009)
4. Kanemaru K, Noguchi E, Tokunaga T, Nagai K, Hiroshima T, Nakamura Y, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Tie2 Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) through $\alpha 4\beta 1$ Integrin. *PLoS One*, 10(12), 2015 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone.0144436)
5. Weinstein JR, Quan Y, Hanson JF, Colonna L, Iorga M, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Elkouss KB, Möller T. IgM-Dependent Phagocytosis in Microglia Is Mediated by Complement Receptor 3, Not Fc α/μ Receptor. *J Immunol*, 195(11):5309-5317,

2015 査読有

(DOI: 10.4049/jimmunol.1401195)

6. Shibuya A, Honda S. Immune regulation by Fc α / μ receptor (CD351) on marginal zone B cells and follicular dendritic cells. Immunol Rev, 268(1):288-295, 2015 査読有 (DOI: 10.1111/imr.12345)
7. Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Noguchi E, Shibuya A. Identification and Characterization of CD300H, a New Member of the Human CD300 Immunoreceptor Family. J. Biol. Chem, 290(36):22298-22308, 2015 査読有 (DOI: 10.1074/jbc.M115.643361)
8. Yamashita--Kanemaru Y, Takahashi Y, Wang Y, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Bernhardt G, Shibuya A, Shibuya K. CD155 (PVR/Necl5) Mediates a Costimulatory Signal in CD4+ T Cells and Regulates Allergic Inflammation. J Immunol, 194(12):5644-5653, 2015 査読有 (DOI: 10.4049/jimmunol.1401942)
9. Miki H, Nakahashi-Oda C, Sumida T, Shibuya A. Involvement of CD300a Phosphatidylserine Immunoreceptor in Aluminum Salt Adjuvant-Induced Th2 Responses. J Immunol, 194(11):5069-5076, 2015 査読有 (DOI: 10.4049/jimmunol.1402915)

〔学会発表〕(計2件)

1. Vo AV, Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. The 55th Midwinter Conference of Immunologists. (Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove California, USA) 2016.1.24
2. Shibuya A. Regulation of immune responses by apoptotic cells. The 4th CSI/JSI/KAI Joint Symposium. (Jinling Guanyuan International Hotel, Suzhou Industrial Park, Suzhou, China) 2015.9.20

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：可溶性 CD155 タンパク質を用いた癌の

検出方法

発明者：渋谷 彰、渋谷 和子、井口 研子

権利者：同上

種類：日本特許

番号：特許第 5,850,508 号

出願年月日：2013 年 1 月 28 日

取得年月日：2015 年 12 月 11 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渋谷 彰 (SHIBUYA, Akira)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80216027