

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08613

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いた難治性喘息動物モデルの構築と病態解析への応用

研究課題名(英文) Establishment and analysis of humanized murine model for refractory asthma

研究代表者

権 寧博 (GON, Yasuhiro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：80339316

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)：NOGマウスをベースとし、ヒト化IL-3 / GM-CSF / IL-5を遺伝子導入したマウス(ヒト化マウス)を作製し、ヒトIL-33とTSLPを経気道的に投与すると気道のヒト好酸球の増加が認められた。デキサメサゾンの投与は、IL-33とTSLPの共刺激によるヒト好酸球浸潤を抑制しなかった。ハウスダストアレルゲン(Der-p2)特異的な合成ヒト化IgE抗体をヒト化マウスに投与し受動感作を行った後、Der-p2で気道を刺激し、ヒト細胞成分を採取したところ、気道へのヒト好酸球の浸潤が生じることが確認され、また、メサコリンによる気道過敏性テストを行ったところ、気道過敏性の亢進が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で初めてヒト化喘息マウスモデルを樹立した。ヒト・サイトカインやヒト・炎症細胞によって、好酸球炎症や気道過敏性という喘息の特徴を保持しアレルギー炎症を惹起できる、アレルギー性喘息やステロイド抵抗性の難治性喘息のヒト化マウスモデルを作製することに成功した。本研究成果は、今後、ヒト化マウスモデルを用いて新たな治療薬や検査方法を開発するために有用な研究モデルとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Human IL-3 / GM-CSF / IL-5 gene-introduced NOG mice (humanized mice) are established, and human IL-33 and TSLP are administered into the airway. An increase in eosinophils was observed in the airway. Administration of dexamethasone did not suppress human eosinophil infiltration by co-stimulation with IL-33 and TSLP. House dust allergen (Der-p2) -specific synthetic humanized IgE antibody was administered to the humanized mice for passive sensitization, and then the airway was stimulated with Der-p2. Infiltration of human eosinophils was confirmed, and an airway hypersensitivity test with methacholine confirmed an increase in airway hypersensitivity.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：気管支喘息 IL-33 TSLP 好酸球 気道過敏性 ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は多様な気道の慢性炎症による症候群であり、世界中で約3億人が罹患しているが、この中で既存治療に抵抗性を示す難治性喘息は全体の5~10%程度とされている。特に難治性喘息患者においては、長期にわたる気道炎症によって、気道のリモデリングが生じるため呼吸機能は著しく低下し、場合によっては24時間の酸素吸入(在宅酸素療法)が必要になるなど、患者の生活の質(QOL)が低下するため、社会生活や医療経済に及ぶ影響は著しい。一方、多様な慢性炎症の機序や気道のリモデリングについては、様々な細胞が複雑に関与しておりその全貌は明らかにされていない。特に、種々の臨床的なエンドタイプを同定し、病態生理に応じた有効な治療を行う precision medicine は難治性の喘息の克服には不可欠となるが、現在のところ実臨床においてエンドタイプを正確に同定する手段は得られていない。

ヒトを対象とした研究は、年々高い倫理性が求められるようになってきている。ヒトを対象に直接実施することが困難な研究には動物実験が不可欠となるが、同じホモログ分子であってもヒトとマウスにはしばしば大きな隔りがある。例えば、ヒトには存在するがマウスにはその遺伝子が存在しない分子や、両者に存在はするが組織における発現に大きな差がみられる分子が多く知られている。このようなことは、マウスの病態モデルとヒトの実際の病態との間に違いを生じさせ、マウスの研究で得られた知見をヒトの研究へとトランスレーションする上で大きな障壁となる。ヒト研究と動物実験にはこのようなボトルネックがあり、喘息における動物モデルを利用した新規治療薬の発見やエンドタイプの同定を含む病態解析やバイオマーカーの発見の機会を妨げる要因となっている。このような問題を克服するために、我々は新たなアプローチの一つとして「ヒト化動物モデル」に着目した。呼吸器疾患の研究において、これまでにヒト化動物モデルが利用されたことはなく、ヒト化喘息疾患マウスモデルが確立されれば、新たな創薬や病態解析における有意義なツールになりうると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、NOGマウスの開発元である実験動物中央研究所と共同で、NOGマウスをベースとしたヒト化マウス呼吸器疾患モデルの開発を行い、ヒト化 IL-3 / GM-CSF または IL-3 / GM-CSF / IL-5 を用いたトランスジェニック (Tg) NOGマウスを作製し、呼吸器疾患における顆粒球やリンパ球の役割を明らかにすることを試みている。自然免疫を刺激するヒト IL-33 を気道内に投与し、気道にヒト好酸球による気道炎症を引き起こすことで、喘息の特徴である気道過敏性、杯細胞過形成による粘液産生の亢進、気道リモデリングを生じることを確認し、世界で初めてヒト化喘息マウスモデルを確立した。研究代表者らは本研究において、種々の難治性喘息のエンドタイプのヒト化難治性喘息モデルの作製を目指した。研究代表者らはヒト化 IL-3 / GM-CSF または IL-3 / GM-CSF / IL-5 を用いたトランスジェニック (Tg) NOGマウスにヒト IL-33 を気道内に投与し、ヒト喘息モデルを作製したが、本研究では、このモデルをさらに発展させ、ステロイド抵抗性ヒト化喘息モデルの構築を目指す。マウス喘息モデルにおいては、IL-33 と TSLP を同時に気道内に投与した場合、ステロイド抵抗性を示す気道炎症が生じることが確認されているが、喘息におけるステロイド抵抗性は、喘息の難治化に係る重要な機序のひとつであるが、そのメカニズムは十分に明らかにされていない。IL-33 と TSLP によるステロイド抵抗

性には、これにより活性化された2型自然リンパ球(ILC2)が関係していると報告されているが、実際、ヒトにおいて、このようなステロイド抵抗性の機序が存在するかは明らかにされていない。ヒト化マウスを用いて新たな治療標的やエンドタイプを同定するために有用なヒト化喘息マウスモデルの作成を試みた。

3. 研究の方法

(1)ステロイド抵抗性喘息ヒト化マウスモデルの確立

IL-3/GM-CSF/IL-5 を用いたトランスジェニック (Tg) NOG マウスにヒト IL-33 または IL-33+TSLP を3日間気道内に投与し、投与終了後4日目に肺胞洗浄液中のヒト好酸球数及び気道過敏性を測定した。また、IL-33またはIL-33+TSLPの投与1日前から4日間デキサメサゾンを経口投与し、投与終了後4日目に肺胞洗浄液中のヒト好酸球数を測定した(図1)。

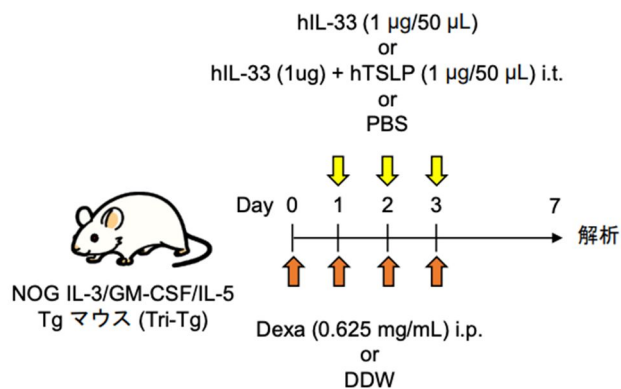


図1 ステロイド抵抗性喘息ヒト化マウスモデルの実験方法

(2)アトピー型ヒト化喘息モデルマウスの確立

IgE を介した喘息病態を解明するために、新たにヒト化アトピー型喘息マウスモデルを作製する。ハウスダストアレルゲン (Der-p2) に特異的な合成ヒト化 IgE 抗体をヒト化 hIL-3 / GM-CSF / IL-5Tg NOG マウスに気道投与し受動感作を行った後、Der-p2 で気道を刺激し、投与終了後4日目に肺胞洗浄液中のヒト好酸球数及び気道過敏性を測定した(図2)。

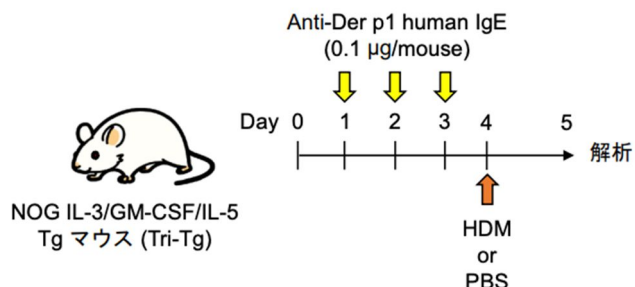


図2 ステロイド抵抗性喘息ヒト化マウスモデルの実験方法

4. 研究成果

(1)ステロイド抵抗性喘息ヒト化マウスモデルの確立

IL-3 / GM-CSF / IL-5 を用いたトランスジェニック (Tg) NOG マウスに、ヒト IL-33 に加えて TSLP を経気道的に投与すると、肺胞洗浄液中のヒト好酸球の増加が認められた。次に、デキサメサゾンを経気道的に投与し、IL-33 誘導性喘息モデル及びそれに TSLP を加えた場合におけるステロイド反応性について検討した。下図 (図 1) に示すように、IL-33 によって誘導された気道へのヒト好酸球浸潤はデキサメサゾンで完全に抑制されたが、TSLP の共存下ではヒト好酸球浸潤は抑制されなかった。以上より、ヒト炎症細胞によりなるマウス気道の炎症のネットワークにおいても、IL-33 と TSLP の共刺激下で、マウス同様にステロイド抵抗性の気道炎症が惹起されることが明らかになった。このような難治性喘息のヒト化動物モデルを用いることは、新たな創薬治療の開発ツールとなる可能性が示唆される。

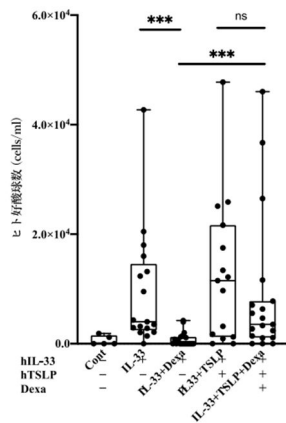


図 2 IL-33 及び TSLP 刺激後の肺胞洗浄液中のヒト好酸球数

(2)アトピー型ヒト化喘息モデルマウスの確立

ハウスダストアレルゲン (Der-p2) に特異的な合成ヒト化 IgE 抗体をヒト化 hIL-3 / GM-CSF / IL-5 Tg NOG マウスに気道投与し受動感作を行った後、Der-p2 で気道を刺激し、ヒト細胞成分を採取したところ、気道へのヒト好酸球の浸潤が生じることが確認された。また、メサコリンによる気道過敏性テストを行ったところ、気道過敏性の亢進が確認された。以上より、ヒト IgE と抗原刺激より気道にヒト好酸球が誘導されるヒト化アトピー喘息モデルが作成され、アトピー型喘息の病態解明、薬剤開発において有用なツールとなることが示唆された。

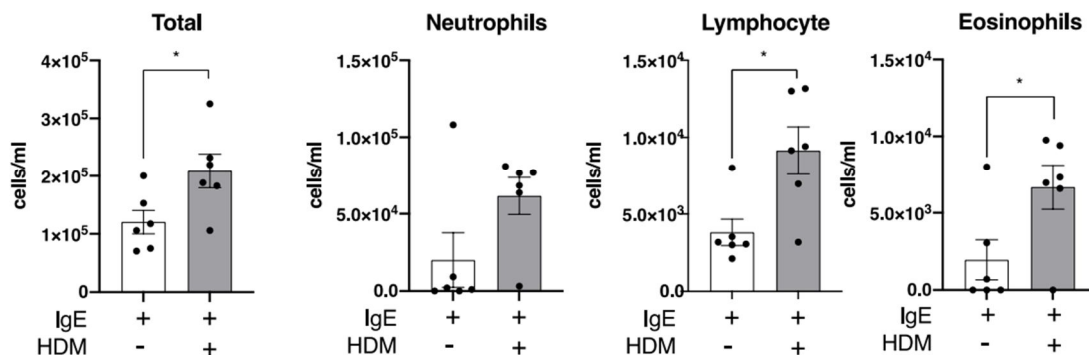


図 3 IgE + ハウスダスト刺激後の肺胞洗浄液中のヒト炎症細胞数

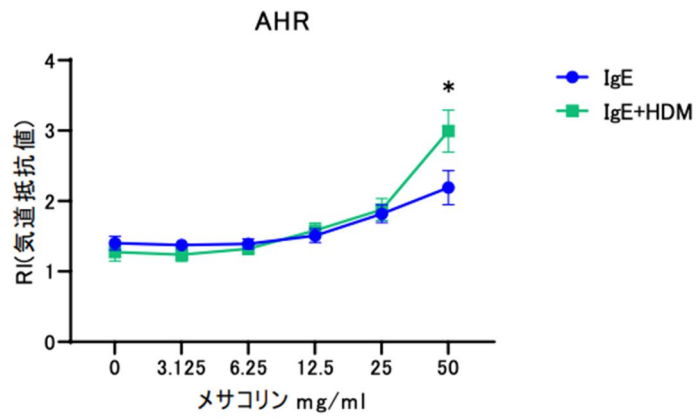


図4 IgE + ハウスダスト刺激後のメサコリンによる気道過敏性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Ito Ryoji, Maruoka Shuichiro, Gon Yasuhiro, Katano Ikumi, Takahashi Takeshi, Ito Mamoru, Izuhara Kenji, Nunomura Satoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Recent Advances in Allergy Research Using Humanized Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112740	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田志保, 丸岡秀一郎, 伊藤亮治, 布村 聡, 豊島翔太, 岡山吉道, 出原賢治, 橋本 修, 伊藤 守, 権 寧博
2. 発表標題 NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tgマウスを用いたIL-33, ダニ誘導型ヒト喘息モデルの開発
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸岡秀一郎, 伊藤亮治, 布村 聡, 豊島翔太, 岡山吉道, 出原賢治, 橋本 修, 伊藤 守, 権 寧博
2. 発表標題 NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tgマウスを用いたIL-33, ダニアレルゲン誘導型ヒト喘息モデルの開発
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田麻佐美, 丸岡秀一郎, 山田志保, 黒澤雄介, 神津 悠, 権 寧博
2. 発表標題 ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルでのangiotensin converting enzyme 2(ACE2)の役割
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会関東地方会
4. 発表年 2019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
研究分担者	清水 哲男 (SHIMIZU Tetsuo) (00339326)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	伊藤 亮治 (ITO Ryoji) (60425436)	公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・室長 (72611)	
研究分担者	丸岡 秀一郎 (MARUOKA Shuichiro) (80599358)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

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
---------	---------