

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659809

研究課題名(和文) ヒト化マウスモデルを用いた金属アレルギーの研究

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of metal allergy using humanized murine model

研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, Shunji)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10241639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ヒト免疫細胞を生着させたヒト化マウスを用いて金属アレルギーモデルを確立し、ヒト免疫細胞による生体内での金属アレルギー発症機序を解明することを目的に計画した。

レシピエントマウスは遺伝子組換え免疫不全マウスを用い、ヒト末梢血単核細胞の生着を試みた。このマウスの免疫不全状態をさらに亢進させるため、マクロファージ除去を行って検討した結果、弱いながらヒトリンパ球の生着をみた。金属アレルギーの誘導までには至らなかった。ヒト化マウスによる金属アレルギーの病態解明は、次世代の医療開発を可能にする魅力的な研究課題であることに変わりはなく、今後も挑戦を続ける。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate pathogenesis of metal allergy using humanized mice by reconstituting human immune system in the mice. We used genetically modified immunodeficient mice as recipients and tried to engraft human peripheral blood mononuclear cells in the mice. We also depleted macrophages in the mice to increase immunodeficiency. We observed very weak engraftment of human lymphocytes in the mice but are unable to induce metal allergy. As analysis of pathogenesis of metal allergy using humanized mice is still fascinating project to develop medical service for the next generation, we continue to realize this project.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：金属アレルギー ヒト化マウス ニッケル

1. 研究開始当初の背景

金属イオンはアレルギー性皮膚炎のアレルゲンであり、ニッケル(Ni)は金属アレルギーの原因のトップである。金属アレルギーは、装飾品をつける人口の増加や、歯科治療における補綴治療やインプラント治療など医療技術の発展による金属暴露の機会の増大に伴って増加しており、その克服は重要課題の一つである。

金属アレルギーは、ヒト末梢血から分離した単核細胞(PBMC、リンパ球と単球/マクロファージ)を用いた *in vitro* での研究から、T細胞依存性のⅠ型過敏症として位置づけられているが、いまだに発症機序は明確ではなく、原因金属の除去しか解決策がないのが現状である。この理由としては、実験動物に金属アレルギーを起こすことは難しく、適切な動物モデルがなく、*in vivo* での研究ができなかったことが大きな一因として考えられる。

グラム陰性菌細胞壁成分のリポ多糖(LPS、内毒素とも呼ばれる)は、宿主の Toll-like receptor 4 を介して自然免疫系を刺激する代表的な物質の一つである。我々は、この LPS をアジュバントとして Ni とともに投与すると容易にしかも低濃度の Ni イオンで Ni アレルギーを誘導できることに成功した(Sato N et al. *Clin Exp Allergy* 37: 743-751, 2007)。LPS は Ni だけでなく、Cr、Co、Pd、Ag などに対する金属アレルギーも誘導できた。本マウスモデルを用いた研究により多くの知見が得られている。しかし、ヒトとマウスでは種が異なるため、マウスでの知見がヒトの生体内で現実に起きているとは限らない。

近年、ヒト細胞を *in vivo* で解析できる高度免疫不全マウスが開発されている。このマウスはヒト臍帯血由来の造血幹細胞だけでなく、PBMC も生着し(Abele-Ohl S et al. *Transplant Immunol* 23: 59-64, 2010)ヒト化マウスとなる。ヒト化マウスは、創薬のための研究材料としての利用だけでなく、ヒト細胞の分化・機能解析等の基礎研究にも有用であり、医療への貢献が期待できる実験動物である。ヒト化マウスを用いたヒト化モデルは、ヒト感染症モデル、GVHD モデルなどがあるが、金属アレルギーモデルはない。我々は、このヒト化マウスで金属アレルギーモデルを確立すれば、これまで不可能であった、ヒト免疫細胞による金属アレルギー発症機序を *in vivo* で解明することが可能になるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の目的は、以下の通りである。

(1) Ni アレルギーのヒト化マウスモデルの確立・最適化を行う。このヒト化マウス Ni アレルギーモデルを用いて、ヒト免疫細胞の *in vivo* での Ni アレルギーの発症機序を以下

の方法で解明する。

(2) T細胞の性状解析: Ni アレルギー発症に関与するヒトT細胞の TCR レパートリーの解明

(3) 関与する他のリンパ球の解析: T細胞以外にも Ni アレルギーに関与するヒトリンパ球が存在するかについての検討

(4) 交差反応の検討: パッチテストの妥当性についての検討

(5) 自然免疫の関与: 微生物への暴露、感染などの環境要因の重要性の検討

3. 研究の方法

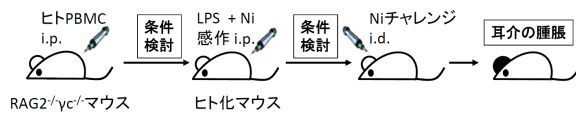
(1) マウス: RAG (recombination activation gene: 組換え活性化遺伝子) 2 は免疫系の抗原受容体遺伝子の V-(D)-J 組換え反応を担う酵素で、未分化段階の T細胞と B細胞に発現している。インターロイキン-2 (IL-2) 受容体鎖は common (c)とも呼ばれ、数種のサイトカイン受容体の共通ドメインである。これら遺伝子を欠損した RAG2^{-/-} c^{-/-} マウスは極めて重度な複合免疫不全を呈することとから、本研究課題のレシピエントとして選択した。RAG2^{-/-} c^{-/-} マウスは東北大学の遺伝子組換え実験と動物実験の承認を得て、(財)実験動物中央研究所から入手し、東北大学医学系研究科附属動物実験施設のバリアのあるクリーンルームで繁殖し、実験に供試した。

(2) マクロファージの除去: マウス生体内からマクロファージを除去するために、クロドロネート封入リポソーム (clodronate-liposome, Clo-lip) を Endo らの方法 (*Br. J. Pharmacol.* 114, 187-193, 1995) で作製した。ホスファチジルコリン 75 mg とコレステロール 11 mg 丸底フラスコ (1,000 ml) に入れ、クロロホルム (20 ml) に完全に溶解させた。ロータリーエバポレーター (37 °C) でクロロホルムを留去させ、フラスコ内に薄膜を形成させた。薄膜に 10 ml のクロドロネート溶液 (200 mg/ml in PBS) を加え、10 分間薄膜を剥がしつつ振とうした。2 時間放置後、超音波をかけ (50 Hz, 3 分間) さらに、2 時間放置した。パストールピペットで水相上のリポソームを回収し、10 ml の PBS に懸濁し、遠心した (5,000 × g, 30 min)。ペレットを PBS 4 ml に懸濁し、オリジナル溶液とした。

(3) ヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs): ヘパリン加末梢血より lympholyte-H (セダーレン社、Ontario, Canada) 比重遠心法にて分離した。

(4) ヒト化マウスモデルの確立: Abele-Ohl S らの方法 (*Transplant Immunol* 23: 59-64, 2010) に準じて行った。8 週令の RAG2^{-/-} c^{-/-} マウスにヒト PBMCs を移入した (静脈注射)。

ヒト PBMC 投与後の期間、投与量などを検討した（下図参照）。



(5) マウス Ni アレルギー発症は、我々が開発した方法 (Sato N et al. Clin Exp Allergy 37: 743-751, 2007) に従って次の通り実施した。NiCl₂ (1 mM) と LPS (1 μg/ml) の混合液をマウスに 0.25 ml 腹腔内投与し、感作した。10 日後、麻酔し、両耳の耳介部に NiCl₂ (1 mM) 20 μl を皮内注射し、チャレンジした。金属アレルギー発症の程度は、継時的に耳介の腫脹をマイクロゲージにて測定し、定量化した。

(6) フローサイトメトリー: EDTA 加マウス末梢血を採取し溶血緩衝液で溶血させて使用した。細胞は、抗 CD16/32 (2.4G2) 抗体とヒト IgG で Fc 受容体をブロックした後、抗マウス CD45-PE/Cy7, 抗ヒト CD45-Pacific Blue で染色した。CD45 は白血球共通マーカーとして使用した。死細胞は DAPI で染色し、分析から除外した。データは LSRFortessa セルアナライザー (BD バイオサイエンス, San Diego, CA, USA) と FlowJo 7.6.5 ソフトウェア (Tree-Star, Ashland, OR, USA) にて解析した。

4. 研究成果

(1) PBMCs の細胞数を 1×10^5 から 1×10^7 個まで変えて、RAG2^{-/-} c^{-/-} マウスに静脈注射にて移入した。移入後 7, 14, 21 日目にマウスを過剰麻酔により安楽死させた後、末梢血を採取し、ヒト細胞定着の状態を、フローサイトメトリーでヒト CD45 陽性細胞の割合を算出することで解析した。その結果、いずれの採取日でもヒト PBMCs の定着は観察されなかった。

この結果は、RAG2^{-/-} c^{-/-} マウスは免疫不全マウスではあるが、ヒトリンパ球を定着させるまでの免疫不全状態に至ってはいないことを示唆する。

(2) RAG2^{-/-} c^{-/-} マウスの免疫不全状態をさらに亢進させるために、本マウスの抗原提示細胞を除去することにした。この目的を達成するために、我々がこれまで行ってきた、“Clo-lip を投与することにより、マウス生体内からマクロファージを除去する方法”を適用した。

Clo-lip オリジナル溶液を PBS にて 5 倍希釈し、0.2 ml/mouse で静脈注射した。24 時間後には F4/80 陽性のマクロファージが除去されることを確認した。

(3) Clo-lip 5 倍希釈液 0.2 ml を RAG2^{-/-}

c^{-/-} マウスに静脈注射 24 時間後に、ヒト PBMCs (1×10^7 個) を静脈注射にて移入した。移入後 7 日目以降には弱いながらヒト PBMCs が検出された (約 1%) (図 1)。

(4) この条件で我々が開発した方法でニッケルアレルギー誘導を試みたが、明確なアレルギー反応 (マウス耳介の腫脹) を誘導することはできなかった。

(5) 上記の条件では、Clo-li 投与 10 日目からマウスの衰弱がみられ安楽死させる個体が出始めた。過度の免疫不全状態は、マウスにとって危険であることが示唆された。

(6) さらに、ヒト細胞の定着効率を上げるための条件検討をいろいろと試みたが、(3)を上回る条件は見いだせなかった。

(7) 本研究課題の当初の計画・方法では、ヒト化マウスモデルの確立・最適化の後、T 細胞の性状解析、関与する T 細胞以外のリンパ球の解析、自然免疫の関与などの研究を進める計画であったが、残念ながら、この段階には至らなかった。

(8) ヒト化マウスを用いた金属アレルギーを含むヒト疾患の病態解明は、次世代の医療開発を可能にする重要な研究課題であり、重要性はさらに増していると考えられる。近年、MOG マウス、NSG マウスなど別のタイプの免疫不全マウスが開発されており、今後はこれらのマウスの使用、放射線照射、造血幹細胞の移植など、今後も引き続き実現に向けて挑戦していくつもりである。

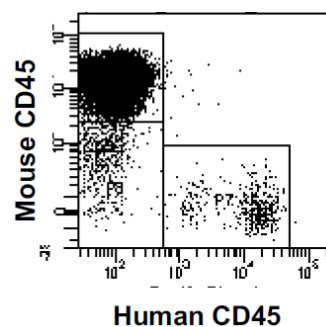


図 1 フローサイトメトリーによるヒトとマウスの白血球の分析

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 1 件)

Nagai Y, Shiraishi D, Tanaka Y, Nagasawa Y, Ohwada S, Shimauchi H, Aso H, Endo Y, Sugawara S. Transportation

of sublingual antigens across sublingual ductal epithelial cells to the ductal antigen-presenting cells in mice. *Clin. Exp. Allergy* 査読有、印刷中
doi: 10.1111/cea.12329.

〔学会発表〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者と研究分担者の所属する分野
(東北大学 大学院歯学研究科 口腔生物学
講座 口腔分子制御学分野)のホームページ
URL

<http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, SHUNJI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 10241639

(2)研究分担者

黒石 智誠 (KUROISHI, TOSHINOBU)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 30400261

遠藤 康男 (ENDO, YASUO)
東北大学・大学院歯学研究科・技術補佐員
研究者番号: 50005039