

ニッポンハム食の未来財団 平成 28 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	ヒト化マウスを用いた食物アレルギーモデルマウスの開発とアナフィラキシー制御の研究
フリガナ	イトウ リョウジ
代表者名	伊藤 亮治
所属機関（機関名） （役職名）	公益財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室 研究員
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

本研究は、ヒト免疫系を再構築したヒト化マウスを用いて、全身性アナフィラキシーを伴うヒト食物アレルギーモデルを作製し、治療薬開発に向けた薬効評価系の確立を目的としている。平成 28 年度は、アナフィラキシー症状を引き起こすヒト化マウスモデルの開発に注力した。ヒト造血幹細胞移植によりヒト化した NOG マウスあるいは NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスへ、ヒト抗 NP-IgE 抗体と NP-BSA を静脈内投与し、全身性アナフィラキシーが誘導されるか検討した。その結果、NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスにおいて、直腸温の低下およびヒトマスト細胞の脱顆粒が認められ、アナフィラキシー様症状が観察された。次にヒトで見られる食物アレルギー症状が再現されるか、本 Tg マウスを用いて検討した。エピトープが異なる 6 種類の beta-lactoglobline (BLG) 特異的ヒト IgE 抗体を X 社から供与頂き、各クローン単体または 6 クローンを混合した IgE 抗体を静脈内投与し、その後 BLG 精製タンパクを経口投与した。6 クローンのうちの 3 クローンで BLG 投与後に体温低下およびマスト細胞脱顆粒が認められ、特に 1 クローンで非常に顕著にアナフィラキシー症状を誘導した。以上の結果から、NOG IL-3/GM-CSF Tg マウスはヒトマスト細胞を介した生体内食物アレルギーモデルとして有用であり、創薬の前臨床試験系への応用が期待できる。

研究目的

近年先進国ではアレルギー性疾患罹患率が増加傾向にあり、国民の健康被害だけでなく、経済活動への影響も大きく社会問題となっている。乳幼児期に多く見られる食物アレルギーは、アナフィラキシーショックという全身性の急性アレルギー反応を起こし、しばしば生命の危険を伴う重篤な疾患である。申請者は 2013 年にヒトアレルギー疾患を再現したヒト化マウス (NOG hIL-3/GM-CSF

Tg マウス) を樹立した。このヒト化マウスはマスト細胞や顆粒球といったヒトアレルギー関連細胞がマウス体内で機能するため、花粉などのアレルゲンとヒト IgE 抗体をマウスに投与することで、アナフィラキシー反応を引き起こすことが可能である。本研究では hIL-3/GM-CSF Tg マウスを用いて、ソバ抗原や牛乳抗原に対する食物アレルギーモデルを作製し、さらにアレルゲンの高圧酵素処理やアナフィラトキシン阻害剤投与により、アレルギー応答の制御が可能であるかを検討することで当該モデルの有用性を示し、創薬の前臨床試験へ適用可能なヒトアレルギーモデルマウスの開発を目的としている。

本研究にて食物アレルギーへの適用が証明されれば、他のアレルギー疾患に対するモデルマウスとしての応用やその治療薬の試験などへの使用も考えられることから、本研究の医学的意義は大きい。将来的には国内、国外の製薬企業、大学などに頒布することにより多くの科学者に広範に利用されるような体制をとりたいと考えている。また、医薬品開発などの臨床試験における霊長類の使用が厳しく制限されている昨今において、ヒト化マウスはその打開策として有効な実験動物となるため、倫理的観点からも利用価値の高いモデルである。

研究計画及び研究手法

研究の方法

1. ヒト化マウスの作製

8-10 週齢の NOG マウスおよび NOG hIL-3/GM-CSF Tg マウスへ 1.5Gy の放射線を全身に照射し、その翌日に臍帯血由来ヒト CD34 陽性造血幹細胞 (Lonza 社より購入) $4\text{-}5 \times 10^4$ 個を尾静脈経由で移植した。全ての動物は、当研究所の SPF 飼育室にて交配、実験、維持した。

2. キメラ率の測定

ヒト化マウス血中のヒト細胞キメラ率を移植後 4、8、12、16 週のポイントでフローサイトメトリーにて測定した。蛍光標識抗体は、hCD45 (白血球)、hCD19 (B 細胞)、hCD3 (T 細胞)、hCD203 (好塩基球、マスト細胞)、hCD14 (単球) を使用し、経時的なキメラ率の変化を調べた。

3. 変性ソバ抗原およびソバアレルギー患者血清を用いた PCA 反応

上記ヒト化マウス皮内へソバアレルギー患者血清 (RAST スコア 5~6) を投与し、翌日に変性または未変性ソバ抗原+エバンスブルー色素をそれぞれ静脈内投与した。投与 30 分後に皮膚を採取して、エバンスブルー色素の皮内組織への漏出が観察されるか調べた。

4. ヒト抗 NP-IgE 抗体による全身性アナフィラキシー誘導

ヒト細胞キメラ率を確認した後、ヒト化 NOG, および NOG hIL-3/GM Tg マウスへ $2 \mu\text{g}$ の抗 NP-IgE 抗体を尾静脈経由で投与し、その翌日に $100 \mu\text{g}$ の NP-BSA を尾静脈投与した。NP-BSA 投与から 1 時間まで 10 分間隔で直腸温の計測を行い、その後 30 分間隔に広げて 3 時間まで計測し

た。体温計測終了後すぐにマウスを解剖し、脾臓マスト細胞の脱顆粒について、CD63 の発現を指標にフローサイトメトリーにて解析した。

5. ヒト抗 BLG-IgE 抗体による食物アレルギー誘導

6 クローンの精製ヒト抗 BLG-IgE 抗体を X 社から入手した。ヒト化 NOG, および NOG hIL-3/GM Tg マウスへ抗 BLG-IgE 抗体を尾静脈経路で投与し、その翌日に BLG タンパクを経口投与した。その後、上記同様にアナフィラキシー症状の解析を行った。

計画の変更について

上記ソバ抗原および血清を使用した PCA 反応に加えて、牛乳由来 BLG タンパクに対するアレルギー応答の解析を本研究に追加した。理由は、患者血清によるアレルギー応答が均一でなく、PCA 反応の強弱にバラツキが認められたことと、血清の入手が思いのほか困難であり、計画していた実験に使用出来る量を確保出来なかったことにある。追加で行った抗 BLG-IgE 抗体は、ハイブリドーマから精製したモノクローナル抗体であるため、均一な反応性を担保することが可能である。

結果と考察

変性ソバ抗原およびソバアレルギー患者血清を用いた PCA 反応

ソバアレルギーは、わずかな量で急激なアナフィラキシーショックを発症することから、当該患者にとっては極めて危険な食品と位置づけられている。代表者らが開発したヒト化 IL-3/GM-CSF Tg マウスは、造血幹細胞移植後にヒトマスト細胞や顆粒球が効率よく分化するマウスであり、ヒト IgE 抗体を介した受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応を誘導することが可能である¹⁾。本マウスを用いて、①ソバアレルギー患者血清とソバ抗原による PCA 反応が惹起可能であるか、②変性ソバ抗原により PCA 反応が減弱するか、これら 2 点の検証を行った。二名の患者血清と一名の健常人血清を提供頂き、IL-3/GM-CSF Tg マウス皮内へ投与、その翌日にソバ抗原とエバンスブルーを静脈内投与した。その結果、健常人血清投与では皮膚組織への色素漏出が全く観察されなかったが、患者血清投与では二名とも顕著な色素漏出が認められた。このことは、ソバ抗原特異的なアレルギー反応が皮膚局所で起こっていることを示唆する。次に、高圧酵素処理を施した変性ソバ抗原を静脈内投与し、アレルギー反応が抑制されるか検討した。変性抗原の投与により、一名の患者血清は色素漏出が抑制されたが、もう一名の患者血清は色素漏出が逆に亢進する結果となった。この結果はおそらく抗原の変性によってタンパクの立体構造が変化し、エピトープの消失または逆に露出が生じたためと考えられる。すなわち、消失したエピトープに対する IgE 抗体を多く持つ患者は変性抗原の恩恵を受けるが、露出したエピトープに対する IgE 抗体を多く持つ患者は、変性抗原によりアレルギー症状を悪化させる危険性があると推察される。本モデルにより有用な知見が得られたも

の、患者の個人差による反応のバラツキは大きく、創薬の前臨床モデルとしては不適であると考えられたため、以下、計画には掲げなかった新たな食物アレルギーモデルの開発を検討した。

ヒト抗 NP-IgE 抗体による全身性アナフィラキシー誘導

安定したアレルギー応答の誘導にはモノクローナル IgE 抗体の利用が不可欠であるが、食物由来抗原特異的なヒト IgE 抗体は市販されていない（平成 29 年 4 月現在では、いくつかの当該抗体が市販されるようになっている）。食物由来抗原ではないが、NP ハプテンに対する特異的ヒト IgE 抗体が市販されているため、これを用いて全身性アナフィラキシーを惹起出来るか検討した。なお、この系は既に先行論文が公表されており²⁾、当該論文のプロトコールを参考にした。ヒト化 IL-3/GM-CSF Tg マウスに NP-IgE 抗体を静脈内投与し、翌日に NP-BSA を静脈内投与したところ、投与から 30 分程度で顕著な体温低下が認められ、また解剖後に脾臓マスト細胞を解析したところ、脱顆粒に伴って発現上昇する CD63 の発現が亢進していた。このことから、本 Tg マウスが全身性アナフィラキシーを惹起可能なモデルであることが示された。しかしながら、NP-BSA の経口投与では当該のアナフィラキシー症状を示さなかったことから、この系で食物アレルギーを再現することは出来なかった。おそらく抗原の腸管透過が不十分であったことが考えられるが、いずれにしても食物由来抗原によるアナフィラキシー応答の再現は重要な課題として残された。

ヒト抗 BLG 抗体による食物アレルギー誘導

食物由来アレルゲンが誘発するヒトアレルギーモデルマウスの開発には、食物抗原特異的ヒト IgE モノクローナル抗体を利用した受動アナフィラキシーの系が有効と考えられる。しかしながら、本モノクローナル抗体は市販品が存在しないため入手が容易ではない。X 社は牛乳ホエイ成分に含まれる beta-lactoglobulin (BLG)特異的なヒト IgE モノクローナル抗体を産生する 6 クロンのハイブリドーマの樹立に成功した。彼らはこれらの抗体がいずれも RBL-2H3 というヒトマスト細胞株の脱顆粒を *in vitro* で惹起できることを確認し、*in vitro* でのミルクアレルギー評価系を確立した³⁾。代表者は、X 社からこれら 6 クロンの抗体を共同研究にて入手し、モノクローナル IgE 抗体による安定した食物アレルギーモデルの作製を試みた。まず投与抗体量の最適化の為に、プールした 6 クロンの総抗体量を 48 µg, 24 µg, 12 µg, 6 µg, 2 µg と振って静脈内投与し、翌日に BLG タンパクを経口投与した。しかしながら、48, 24, 12, 6µg の抗体を投与した群は、抗体投与のみでアナフィラキシー症状を呈し、死亡個体が散見された。この原因は定かではないが、一因として過剰な IgE 抗体が投与されたことによって凝集が起こりやすくなり、マスト細胞上の IgE レセプターが架橋されたためと考えられた。一方 2 µg の抗体投与ではこのようなアナフィラキシー症状は観察されず、その後の BLG 投与により体温低下および脱顆粒の誘導が起こったことから、生理的なアナフ

イラキシー反応を再現することに成功したと言える。ただ残念なことに、症状が認められた個体は全体の 7 割に留まり、残りの 3 割は体温低下および脱顆粒が顕著ではなかった。これら 6 クローンは抗原への結合エピトープがそれぞれ異なるため、例えばマスト細胞に対して低反応性を示す抗体が優先的に抗原を補足した場合は、3 割の個体で観察されたように低レベルなアナフィラキシー応答に留まる可能性が考えられる。そのため代表者は、より確度の高いアナフィラキシーモデルを確立するために安定的に症状を誘発する IgE クローンの選別を行った。6 クローンの IgE 抗体 (A~F) およびコントロールのヒト IgE 抗体をヒト化 IL-3/GM-CSF Tg マウスに静脈内投与し、翌日に BLG を経口摂取させた。その結果、A, B, C およびコントロール抗体を投与したマウスでは、BLG 投与後のアナフィラキシー症状はほとんど観察されず、一方で D, E, F の 3 クローンを投与したマウスは、BLG 投与後に体温低下および顕著なマスト細胞脱顆粒を認めた。特に F クローンは、実験を行った全てのマウスに対して症状を誘導したことから、本アナフィラキシーモデルへの適用には最も有用な抗体であると思われる。

以上のことから、本研究テーマである「ヒト化マウスを用いた食物アレルギーモデルの開発」という主たる目的については、安定したヒト化動物モデルの作製に成功したことから、一定の成果は挙げられたものと考えられる。しかしながら、もう一つの大きな目標である「アナフィラキシー制御可能な治療モデル」については、次年度以降の課題として残されている。

今後の研究活動について

本研究にて得られた成果はヒト食物アレルギーモデルマウスの構築であるが、今後はアレルギー抑制薬の薬効評価や安全性試験の前臨床試験モデルとして本ヒト化マウスが利用されるための適用性を担保する実験を進めていく。具体的には、急性アナフィラキシーショックを回避するエピネフリンのようなアドレナリン製剤や、抗ヒスタミン薬など既存の薬を投与して症状が改善するかを検討する。さらにアレルギーの重篤化に関わるとされているアナフィラトキシンの阻害薬やその他効果が期待出来そうな非適用製剤を使用し、ドラッグリポジショニングの可能性を探ることも可能である。このような治療モデルとしての利用に加え、牛乳以外の食物アレルギーへの適用についても検討する。最近、台湾の試薬メーカー AllergMAbs が卵白アルブミン、卵白オボムコイド、小麦グリアジンなど数種類の食物抗原特異的ヒト IgE モノクローナル抗体の販売を開始した。これら抗体を購入し、ヒト化マウスへ投与することで BLG と同様のアナフィラキシー症状が起こるか検討する。最終的には、新たな抗アレルギー薬や低アレルゲン性食品開発のためのスタンダードな評価系として使われるようなクオリティの高いモデルマウスの開発を目指す。

参考文献

- 1) Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, Ida-Tanaka M, Suemizu H, Nunomura S, Ra C, Mori A, Aiso S, Ito M. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. *J Immunol.* 2013 Sep 15;191(6):2890-9
- 2) Bryce PJ¹, Falahati R², Kenney LL³, Leung J², Bebbington C², Tomasevic N², Krier RA¹, Hsu CL¹, Shultz LD⁴, Greiner DL³, Brehm MA. Humanized mouse model of mast cell-mediated passive cutaneous anaphylaxis and passive systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Sep;138(3):769-79
- 3) Knipping K, Simons PJ, Buelens-Sleumer LS, Cox L, den Hartog M, de Jong N, Teshima R, Garssen J, Boon L, Knippels LM. Development of β -lactoglobulin-specific chimeric human IgE_K monoclonal antibodies for in vitro safety assessment of whey hydrolysates. *PLoS One.* 2014 Aug 25;9(8):e106025

以上